

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní obor: BIOCHEMIE



Příprava a testování polyklonálních protilátek proti Cbf11 a Cbf12, transkripčním faktorům rodiny CSL kvasinek *Schizosaccharomyces pombe*

Preparation and testing of polyclonal antibodies against Cbf11 and Cbf12, the fission yeast CSL transcription factors

Bakalářská práce

Jarmila Tvarůžková

Školitel: doc. RNDr. František Půta, CSc.

Konzultanti: RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.

prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

PRAHA 2013

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením doc. RNDr. Františka Půty, CSc. a RNDr. Martina Převorovského, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 27.5.2013

Jarmila Tvarůžková

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. a vedoucímu laboratoře doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za všechny cenné rady a trpělivý přístup. Zvláště děkuji RNDr. Martinu Převorovskému, Ph.D. za veškerou odbornou i technickou pomoc při vypracovávání této práce. Také bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za její vstřícnost při sepisování této práce. Za bioinformatickou podporu děkuji Mgr. Marianu Novotnému, Ph.D. Velký dík patří také ostatním členům laboratoře regulace genové exprese za vytvoření přátelské pracovní atmosféry.

Abstrakt

Proteiny rodiny CSL (CBF1/RBP-Jκ, Suppressor of Hairless, Lag-1) jsou transkripční faktory s klíčovou rolí ve vývoji metazoálních organismů, kdy působí nejen jako součást dráhy Notch, ale i nezávisle na této dráze. Homology proteinů CSL byly identifikovány i v houbových organismech postrádajících signální dráhu Notch. Proteiny Cbf11 a Cbf12 jsou antagonistické paralogy důležité pro koordinaci buněčného a jaderného dělení, regulaci buněčné adheze a integrity chromosomů v jednobuněčné kvasince *Schizosaccharomyces pombe*. Rovnováha v aktivitě proteinů Cbf11 a Cbf12 je klíčová pro jejich správnou funkci a doposud připravené chromosomálně značené alely těchto proteinů vykazují chování v různé míře odlišné od divokého typu. Dostupnost specifických protilátek by tedy výrazně usnadnila studium biologické funkce proteinů CSL v kvasince *S. pombe*. V předkládané bakalářské práci je prezentován návrh a příprava imunogenu a testování protilátek proti proteinům CSL získaných z komerčního zdroje. Pomocí bioinformatických nástrojů byly vybrány vhodné imunogenní fragmenty proteinů Cbf11 a Cbf12 a korespondující sekvence DNA byly klonovány do expresního plasmidu. Expese solubilních proteinů značených hexahistidinem na N-konci byla optimalisována a nativní protein byl purifikován pomocí afinitní (chelatační) chromatografie. Produkt purifikace byl použit k přípravě králičí polyklonální protilátky. Citlivost a specificita připravené protilátky byly určeny metodou imunodetekce proteinů imobilisovaných na nitrocelulosoové membráně. Připravená protilátka rozpoznává oba paralogy proteinů CSL kvasinky *S. pombe* fusovaných se značkou pro tandemovou afinitní purifikaci (TAP). Vazba protilátky na endogenní neznačené proteiny CSL nebyla pravděpodobně kvůli nízké koncentraci těchto proteinů v buňce detekována.

Klíčová slova: proteiny CSL, *Schizosaccharomyces pombe*, heterologní exprese proteinů, afinitní chromatografie, příprava polyklonální protilátky

Abstract

CSL (CBF1/RBP-J κ , Suppressor of Hairless, Lag-1) protein family members are transcription factors critical for metazoan development as the effectors of Notch signaling pathway as well as in a Notch-independent manner. CSL homologues have been identified in fungal organisms lacking the Notch signaling pathway. Cbf11 and Cbf12 are antagonistic paralogous proteins that are important for proper coordination of cell and nuclear division, regulation of cell adhesion and chromosome integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The activities of Cbf11 and Cbf12 proteins need to be finely balanced for their proper biological function, however, chromosomally tagged alleles of these proteins exhibit properties different from wild type. Therefore, the availability of specific antibodies would greatly enhance the study of CSL proteins in the fission yeast. In this bachelor's thesis, design and preparation of immunogen for commercial antibody production followed by antibody testing is presented. Using bioinformatics, suitable immunogenic Cbf11 and Cbf12 protein fragments were selected and the corresponding DNA sequences were cloned into an expression vector. His-tagged expression was optimized in a bacterial expression system and the native protein was purified using immobilized metal affinity chromatography. Rabbit polyclonal antibody against the prepared protein was commercially acquired. The sensitivity and specificity of the polyclonal antibodies raised were validated using Western blot. Both fission yeast CSL paralogues were recognized by the prepared polyclonal antibody, however, only the TAP-tagged proteins were detected. Interaction of the antibody with the endogenous untagged CSL proteins was not found, likely due to low copy number of these proteins.

(In Czech)

Key words: CSL proteins, *Schizosaccharomyces pombe*, heterologous protein expression, immobilized metal affinity chromatography, polyclonal antibody preparation

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod.....	11
1.1 Signální dráha Notch.....	11
1.1.1 Proteiny CSL.....	12
1.1.2 Struktura proteinů CSL.....	13
1.1.3 Proteiny CSL <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14
1.2 Heterologní exprese proteinů	15
1.2.1 Heterologní exprese proteinů v <i>Escherichia coli</i>	15
1.3 Purifikace proteinů	17
1.3.1 Purifikace proteinů s polyhistidylovou značkou.....	19
1.4 Příprava polyklonálních protilátek.....	20
2 Cíl práce.....	23
3 Materiál a metody.....	24
3.1 Materiál	24
3.1.1 Seznam použitých chemikálií	24
3.1.2 Ostatní materiál.....	26
3.1.3 Seznam použitých přístrojů	27
3.1.4 Použité mikroorganismy	28
3.2 Metody práce s mikroorganismy.....	29
3.2.1 Kultivace mikroorganismů	29
3.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk	30
3.2.3 Příprava nativních buněčných lysátů BL21(DE3) <i>E. coli</i>	31
3.2.4 Příprava nativních buněčných lysátů <i>S. pombe</i>	32
3.3 Metody práce s DNA	33
3.3.1 Transformace buněk <i>E. coli</i> elektroporací.....	33
3.3.2 Isolace plasmidové DNA alkalickou metodou	33
3.3.3 Isolace plasmidové DNA pomocí adsorpce na membránu na bázi silikagelu.....	34
3.3.4 Amplifikace části genů <i>cbf11</i> a <i>cbf12</i> pomocí PCR	34
3.3.5 Polymerasová řetězová reakce s buňkami <i>E. coli</i>	35
3.3.6 TOPO® TA klonování.....	36

3.3.7	Adenylace 3' konců produktů PCR	36
3.3.8	Štěpení DNA pomocí restričních endonukleas	36
3.3.9	Ligace DNA	37
3.3.10	Horizontální agarosová elektroforesa	37
3.3.11	Extrakce DNA z agarosového gelu	38
3.3.12	Sekvenace DNA	38
3.3.13	Bioinformatická analýza	38
3.4	Metody práce s proteiny	38
3.4.1	Polyakrylamidová gelová elektroforesa v prostředí SDS	38
3.4.2	Elektropřenos proteinů	40
3.4.3	Imunodetekce proteinů	41
3.4.4	Chelatační purifikace proteinu	42
3.4.5	Měření koncentrace proteinů	43
3.4.6	Odsolování a výměna pufru proteinů	43
4	Výsledky	44
4.1	Návrh imunogenních částí proteinů Cbf11 a Cbf12	44
4.2	Příprava expresních plasmidů	46
4.3	Exprese proteinů Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829)	47
4.4	Optimalisace purifikace proteinu Cbf11(303-492)	51
4.4.1	Purifikace proteinu Cbf11(303-492) ve vsádkovém uspořádání	51
4.4.2	Purifikace proteinu Cbf11(303-492) chromatografií na nosiči Talon	52
4.5	Příprava imunogenu	54
4.6	Testování králičího polyklonálního séra anti-Cbf11	55
5	Diskuse	59
6	Závěr	63
7	Seznam použité literatury	65
	Seznam příloh	70

Seznam použitých zkratek

APS	peroxodisíran amonný
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
bp	párů basí (z ang. <i>base pairs</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (z ang. <i>bovine serum albumin</i>)
BTD	doména „beta-trefoil“ proteinů CSL
CBF1	transkripční faktor, lidský protein CSL, označován také RBP-J κ a Su(H)
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CIR	transkripční korepresor interagující s proteiny CSL
CSL	proteiny rodiny CSL (C <u>B</u> F1/RBP-J κ , S <u>u</u> ppressor of Hairless, L <u>a</u> g-1)
CTD	C-terminální doména (z ang. <i>C-terminal domain</i>)
CV	objem purifikačního nosiče (z ang. <i>column volume</i>)
dH ₂ O	deionisovaná voda
DMF	dimethylformamid
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
GAM-AP	kozí protilátka rozpoznávající myší protilátky, konjugovaná s alkalickou fosfatasou
GAR-AP	kozí protilátka rozpoznávající králičí protilátky, konjugovaná s alkalickou fosfatasou
GAR-HRP	kozí protilátka rozpoznávající králičí protilátky, konjugovaná s křenovou peroxidasou
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein (z ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
HA	hemaglutinin
HAT	histonacetyltransferasa
HDAC	histondeacetylasa
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HERP	transkripční represor
HES	transkripční represor

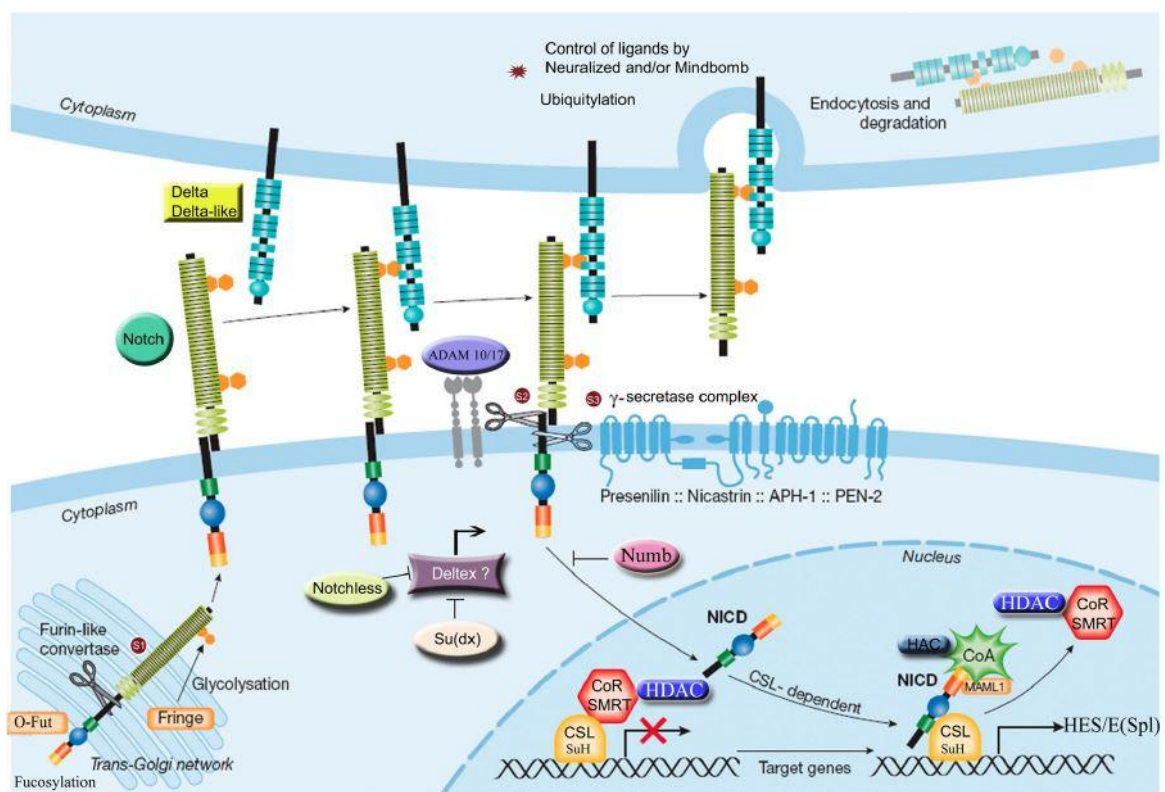
ChIP-chip	chromatinová imunoprecipitace s analýsou DNA pomocí hybridizace na DNA-čip
ChIP-seq	chromatinová imunoprecipitace s analýsou DNA pomocí sekvenace
Igepal® CA-630	(oktylphenoxy)polyethoxyethanol
IgG	imunoglobulin G
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
JAK/STAT	signální dráha skládající se z cytokinového receptoru, kinasy Janus (JAK) a transkripčních faktorů (STAT)
Lag-1	transkripční faktor, protein CSL <i>Caenorhabditis elegans</i>
LB	bakteriální živné médium (z ang. <i>lysogeny broth</i>)
NBT	3,3'-(3,3'-dimethoxybiphenyl-4,4'-diyl)bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazol-3-ium], nitrotetrazoliová modř
NICD	intracelulární doména receptoru Notch
Nodal	protein regulující diferenciaci v rané embryogenezi
Notch	transmembránový receptor signální dráhy Notch
NTD	N-terminální doména (z ang. <i>N-terminal domain</i>)
OD	optická hustota (z ang. <i>optical density</i>)
ORF	otevřený čtecí rámec (z ang. <i>open reading frame</i>)
p21	inhibitor cyklin-dependentních kinas
PEST	proteolytický signál, peptidová sekvence bohatá na prolin, kyselinu glutamovou, serin a threonin
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid
RAM	část intracelulární domény receptoru Notch interagující s CSL (z ang. <i>RBP-J associated molecule</i>)
Rel	transkripční faktor, protoonkoprotein
rpm	otáčky za minutu (z ang. <i>revolutions per minute</i>)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa v prostředí dodecylsírany sodného (z ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Slm9	jaderný protein komplexu HIRA <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SMRT/N-Cor	transkripční korepresor interagující s proteiny CSL
Su(H)	transkripční faktor, protein CSL octomilky <i>Drosophila melanogaster</i> (z ang. <i>Suppressor of Hairless</i>)

TAP	proteinová značka pro tandemovou afinitní purifikaci
TEMED	tetramethylethylendiamin
ŽA	živný agar
Wnt	signální dráha sekretovaného glykoproteinu Wnt

1 Úvod

1.1 Signální dráha Notch

Mezibuněčná interakce zprostředkovaná signálními dráhami je nezbytná pro vývoj mnohobuněčných organismů. Využití těchto signálních drah ve vývoji vede k ustanovení buněčné polarity, vzniku tělních os a koordinaci morfogeneze a diferenciaci [1]. Metazoálním organismům postačuje méně než 20 signálních drah k vytvoření všech buněčných typů a tkání a pouze 7 z nich reguluje většinu mezibuněčné komunikace během vývoje organismu: Wnt, kaskáda transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), Hedgehog, kaskáda receptoru s tyrosinkinasovou aktivitou (RTK), JAK/STAT, kaskáda receptoru jaderných hormonů a Notch.



Obr. 1.1 Signální dráha Notch. Pro získání své aktivní formy musí být vznikající receptor Notch O-fukosylován, glykosylován a proteolyticky štěpen furinovou proteasou (S1) v trans-Golgi aparátu. Po transportu na buněčný povrch vzniká transmembránový heterodimer vázající transmembránový ligand Delta. Receptor Notch je dále štěpen metaloproteasou ADAM 10/17 (S2) a γ -sekretasovým komplexem (S3). Extracelulární doména receptoru Notch je spolu s navázaným ligandem endocytována signalisující buňkou a intracelulární doména receptoru Notch (NICD) je translokována do jádra, kde váže transkripční komplex CSL/SMRT/HDAC a rekrutuje histonacetyltransferasu (HAT), čímž aktivuje transkripci cílových genů. Převzato z [2].

Signální dráha Notch je majoritní parakrinní signální systém, který se podílí na regulaci buněčné identity, proliferace, diferenciaci a apoptosy u většiny metazoálních

organismů [3,4]. Receptor Notch i jeho ligandy DSL (orthology Delta, Serrate/Jagged, Lag-2) jsou transmembránové proteiny s velkou extracelulární doménou obsahující převážně repetice EGF. Receptor Notch je buňkou syntetisován jako inaktivní prekursor a pro svou aktivaci musí být třikrát proteolyticky štěpen a dále posttranslačně modifikován. První proteolytická reakce (S1) probíhá v Golgiho aparátu furinovou proteasou za vzniku dvou fragmentů, které poté vytvoří heterodimerní receptor Notch na buněčné membráně [5]. Po vazbě ligandu typu DSL je receptor Notch dále štěpen (S2) metaloproteasou ADAM10/17 [6] a γ -sektretasovým komplexem (S3). Vzniklý intracelulární fragment Notch (NICD) je translokován do buněčného jádra, kde váže transkripční komplex CSL/SMRT/HDAC a rekrutuje transkripční koaktivátor Mastermind a histonacetyltransferasu (HAT), čímž aktivuje transkripci cílových genů (Obr. 1.1, strana 11) [4]. Poruchy v signalisaci Notch vedou k závažným onemocněním, jakými jsou Allagilův syndrom, autosomálně dominantní cerebrální arteriopatie se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií (CADASIL), a také k několika typům rakoviny, např. k akutní lymfoblastické leukemii, rakovině prostaty, kůže, děložního čípku nebo prsu [7]. Signalisace Notch je díky své funkci v proliferaci a diferenciaci buněk cílem viru Epstein-Barrové, adenoviru a herpetického viru asociovaného s Kaposiho sarkomem. Tyto viry kódují proteiny vázající proteiny CSL, čímž napodobují jejich vazebné partnery a aktivují transkripci cílových genů podporujících replikační cyklus viru [8].

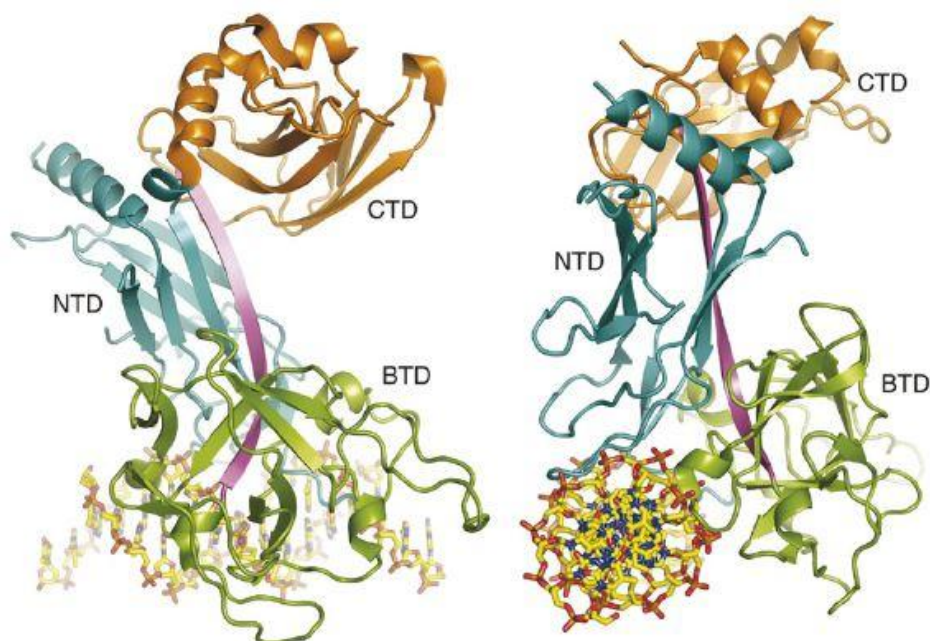
1.1.1 Proteiny CSL

Proteiny rodiny CSL (savčí CBF1, Su(H) octomilky *Drosophila melanogaster*, Lag-1 háďátka *Caenorhabditis elegans*) jsou evolučně konservované transkripční faktory, jejichž konsenzuální vazebná sekvence DNA je 5'- GTG(G/A)GAA - 3' [9,10]. U metazoálních organismů jsou proteiny CSL hlavním efektozem signální dráhy Notch a po vazbě intracelulární domény receptoru Notch fungují jako transkripční aktivátory. Bez signálu Notch proteiny CSL naopak reprimují transkripci cílových genů [7]. Nedávno byly díky rozvoji metod ChIP-chip a ChIP-seq identifikovány tisíce genů regulovaných CSL-dependentní signální dráhou Notch [11,12]. Mezi nejlépe studované cíle proteinů CSL patří proteiny rodin HES a HERP [13], cyklin D1 [14], p21, GFAP a Nodal [15]. U proteinů CSL byly také pozorovány funkce nezávislé na signální dráze Notch [16–18].

1.1.2 Struktura proteinů CSL

První model struktury proteinů CSL je založen na krystalografické analýze proteinu Lag-1 *C. elegans* navázaném na DNA [19]. Krystalografické analýzy byly také podrobeny myší a lidské homology spolu s jejich vazebnými partnery Mastermind, intracelulární doménou receptoru Notch a DNA. Všechny studované proteiny vykazují velmi podobnou strukturu [20–23].

Proteiny CSL jsou tvořeny třemi dobře definovanými doménami: N-terminální RHR-N (Rel-homology region), centrální BTD (ang. *beta-trefoil domain*) a C-terminální RHR-C. N-terminální (NTD) a C-terminální (CTD) domény jsou homologní s doménami transkripčních faktorů Rel a stejně jako domény Rel se skládají ze sedmi β -řetězců tvořících „sendvič“ dvou β -listů, které obsahují tři a čtyři β -řetězce charakteristické pro strukturu imunoglobulinových proteinů. Struktura proteinů CSL je propojena dlouhým β řetězcem přispívajícím k β -listům všech tří domén (Obr. 1.2).



Obr. 1.2 Struktura proteinů CSL. Proteiny CSL sestávají ze tří domén s převládající β strukturou: C-terminální CTD (oranžově), centrální BTD (zeleně) a N-terminální NTD (modře). Struktura tří domén je propojena dlouhým β -řetězcem (růžově). Domény NTD a BTD se podílejí na vazbě DNA. Převzato z [20].

Proteiny CSL interagují s fosfodiesterovou kostrou DNA přes vysoce konservovanou elektropositivní plochu tvořenou částmi NTD a BTD. Všechny sekvenčně specifické interakce s velkým i malým žlábkem dvoušroubovice DNA jsou závislé na konsenzuální sekvenci 5'-GTG(G/A)GAA-3' [19,22]. Doména „beta-trefoil“ je tvořena β -barelem

s exponovanou hydrofóbní kapsou, která je pravděpodobně zodpovědná za vazbu intracelulární domény receptoru Notch. Oblast blízká hydrofóbní kapse se účastní vazby korepresorů SMRT/N-Cor a CIR [22]. Při vazbě části intracelulární domény Notch RAM na doménu BTB se indukuje změna struktury smyčky na N-koncové doméně CSL, čímž se částečně vytvoří vazebné místo pro koaktivátor Mastermind [20,21,24]. C-koncová doména nemá přímý kontakt s DNA, i když je nutná pro její vazbu [19], a také interaguje s ankyrinovými repeticemi intracelulární domény receptoru Notch, čímž způsobuje konformační změnu CTD z neuspořádané formy na uspořádanou [24]. Vazebné analýsy komplexů DNA-CSL *in vitro* ukazují středně silnou ($K_d \sim 200$ nM) vazbu ke konsensuální vazebné sekvenci, což naznačuje, že vazba na DNA může být modulována dalšími interakčními partnery [22].

1.1.3 Proteiny CSL *Schizosaccharomyces pombe*

Komponenty signální dráhy Notch byly navzdory nepřítomnosti receptoru Notch a dalších klíčových proteinů této signální dráhy identifikovány i mimo metazoální organismy [2,25]. Některé houbové organismy včetně modelové kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* obsahují dvě nové třídy proteinů CSL s dobře definovanými doménami typickými pro proteiny této rodiny. Fylogenetická analýza proteinů CSL naznačuje posledního společného předka hub a metazoi jako evolučního původce těchto proteinů [25].

Poltivá kvasinka *S. pombe* patřící do kmene Ascomycota je jednobuněčný organismus s haploidním genomem a slouží jako modelový organismus pro studium regulace buněčného cyklu, buněčné polarity, replikace a oprav DNA [26]. *S. pombe* obsahuje tři chromosomy a její genom obsahující přibližně 5000 genů kódujících proteiny byl kompletně sekvenován [27]. Na rozdíl od známější kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která neobsahuje žádné proteiny CSL, kvasinka *S. pombe* má dva paralogy proteinů CSL, Cbf11 a Cbf12 [25]. Notch-independentní funkce proteinů CSL mohou být konservovány i u houbových paralogů a jejich studium pomocí tohoto modelového organismu umožňuje získat výsledky rychleji vzhledem ke krátké generační době, snadné genetické manipulovatelnosti a jednoduchosti organismu.

Proteiny CSL *S. pombe* hrají důležitou roli v regulaci buněčné adheze, koordinaci jaderného a buněčného dělení, a udržování integrity chromosomů. U Cbf11 i Cbf12 byla ověřena vazba na konsensuální sekvenci DNA proteinů rodiny CSL a pomocí analýs *in vitro* i *in vivo* byla nedávno také prokázána schopnost těchto proteinů spouštět

transkripci DNA [28,29]. Z výsledků analýsy vazebných míst obou paralogů pomocí metody ChIP-seq se ale zdá, že nefungují výlučně jako kanonické transkripční faktory, protože jejich vazba byla detekována i mimo promotorové oblasti genů [30,31]. U obou paralogů CSL jsou dobře identifikovatelné domény NTD a BTD, naopak CTD je málo konservovaná a na základě sekvenční analýsy není u *S. pombe* detekovatelná. Aminokyseliny nutné pro vazbu kanonické sekvence DNA jsou na rozdíl od aminokyselin účastnicích se vazby intracelulární domény receptoru Notch u *S. pombe* konservované [25,28]. N-terminální část houbových proteinů CSL je typicky delší než u metazoálních homologů a bioinformatická analýza poukazuje na jejich nízkou strukturní komplexitu, přítomnost protein-degradačních signálů (PEST) a velkého množství fosforylačních míst. Experimentální data také indikují roli proteolysy N-koncové části proteinu Cbf12 v regulaci jeho vazby na DNA a potvrzují fosforylaci této domény [32].

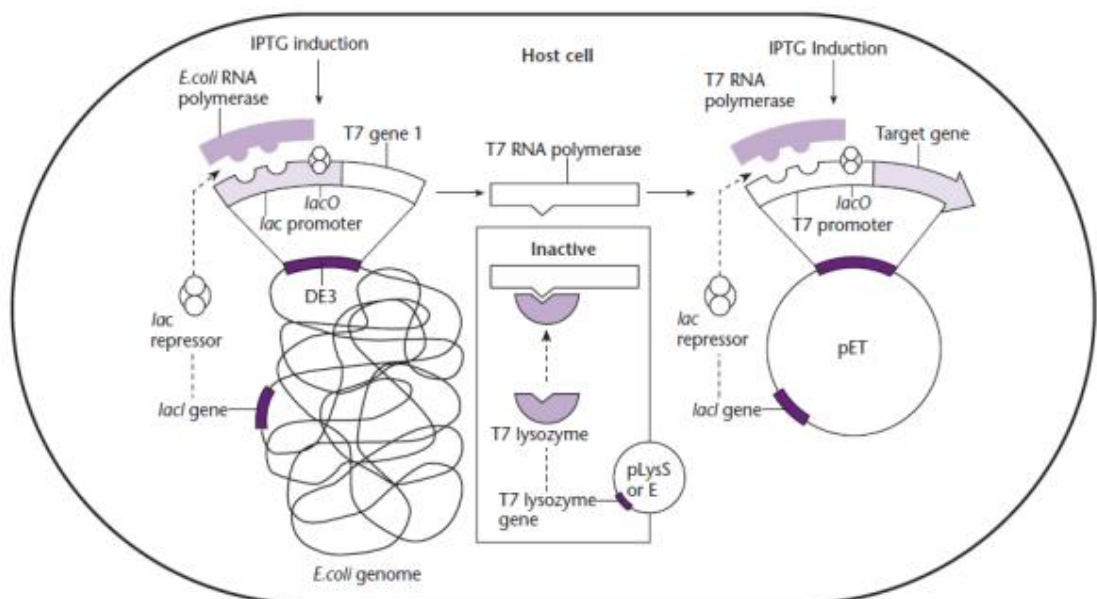
1.2 Heterologní exprese proteinů

Metoda heterologní exprese využívá expresi cizorodého genu v hostitelském organismu pro studium funkce genů a také produkci proteinů pro výzkumné, průmyslové nebo lékařské využití. Volba hostitele závisí na nutnosti posttranslačních modifikací produkovaných proteinů, škále metod pro genetické manipulace a v neposlední řadě také ceně pěstování daného organismu. Hlavními přednostmi prokaryotických expresních systémů jsou rychlý růst, nízké náklady na pěstování a prozkoumanost jejich genomů. V nedávné době byla navíc u několika bakteriálních organismů objevena schopnost glykosylace, acetylace a fosforylace proteinů [33]. Mezi prokaryotické expresní systémy patří *Escherichia coli*, bakterie rodu *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. brevis*) nebo *Pseudomonas fluorescens*. Oblíbenými eukaryotickými hostitelskými organismy jsou kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), vláknité plísňe (rod *Aspergillus*), hmyzí a savčí buňky. V průmyslu jsou také využívány transgenní zvířata a rostliny [34].

1.2.1 Heterologní exprese proteinů v *Escherichia coli*

Gram-negativní bakterie *E. coli* jsou nejpoužívanějším expresním systémem pro produkci rekombinantních proteinů díky své krátké generační době, nenáročné a levné kultivaci, vysokému výtěžku proteinu na množství biomasy a širokému spektru nástrojů pro genetickou manipulaci [35]. Pro vnesení a expresi cizorodé DNA v *E. coli* se využívají plasmidy, kruhové molekuly DNA, jejichž esenciálními částmi jsou počátek replikace,

promotor, Shine-Dalgarnova sekvence, terminátor transkripce a selekční marker. Při použití vhodného expresního plasmidu jsou *E. coli* schopny akumulovat rekombinantní proteiny až do 80% hmotnosti sušiny [34]. Mezi nejvyužívanější expresní plasmidy patří plasmidy typu pET využívající promotor bakteriofága T7 regulovaný T7 RNA polymerasou, jejíž gen je lysogenem DE3 vnesen do genomu *E. coli* (Obr. 1.3). T7 promotor je tvořen 20-nukleotidovou sekvencí nerozeznávanou bakteriální RNA polymerasou. Transkripce T7 polymerasy pomocí bakteriální RNA polymerasy je řízena promotorem *lacUV5* indukovatelným laktosou a jejími deriváty, jakým je například isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) používaný v laboratorní praxi [36]. V nepřítomnosti induktoru je transkripce T7 polymerasy i genu kódovaného plasmidem reprimována tetramerickým represorem LacI, jehož gen se v několika kopiích nachází v genomu *E. coli* i v řadě plasmidů pET [37]. Nevýhodou tohoto systému je produkce malého množství proteinu i bez přítomnosti induktoru, což u toxických proteinů vede k oslabení stability expresního plasmidu, a tak i nízkému výtěžku proteinu [38]. Basální expresi z plasmidů pET je možné eliminovat přítomností přírodního inhibitoru T7 polymerasy, T7 lysozymu, koexprimovaného z plasmidu pLysS nebo pLysE [39].



Obr. 1.3 Expresní systém pET. Cílový gen klonovaný do plasmidu typu pET je po indukci IPTG transkribován virovou T7 polymerasou, která je vnesena do genomu *E. coli* lysogenem DE3. Produkce T7 polymerasy je také indukována přidavkem IPTG. V nepřítomnosti induktoru je transkripce genů kódujících T7 polymerasu i cílový protein reprimována represorem LacI, avšak i v tomto případě dochází k basální expresi. T7 polymerasa může být inaktivována T7 lysozymem koexprimovaným z plasmidu pLysS nebo pLysE. Převzato z [40].

Expresní plasmidy se silným promotorem, např. T7, vedou k vysoké rychlosti transkripce, což může způsobovat tvorbu tzv. inklusních tělísek, nerozpustných proteinových agregátů. Inklusní tělíška se skládají z nesprávně složených, často neaktivních proteinů s hydrofóbními částmi na povrchu proteinu. Důvodem vzniku inklusních tělísek může být nedostatek enzymů potřebných pro správné složení nebo degradaci proteinů hostitelskou buňkou při rychlé syntese rekombinantních proteinů. Rekombinantní proteiny je možné renaturovat z inklusních tělísek, je to však poměrně složitý proces a často vede k malému výtěžku proteinu nebo jeho nízké čistotě [41]. Podíl solubilního rekombinantního proteinu je možné zvýšit sníženou teplotou exprese, úpravou proteinu přidáním fusního partnera, doplněním tRNA s kodóny neobvyklými pro *E. coli*, cíleným transportem proteinu do média nebo periplasmatického prostoru, použitím různých expresních kmenů, kultivačních médií, ko-expresí molekulárních chaperonů, přítomností kofaktoru nebo interakčního partnera, apod. [34,35,41–44].

1.3 Purifikace proteinů

Proteiny jsou tradičně izolovány metodami jako jsou frakční srážení, elektroforesa, iontoměničová chromatografie nebo gelová chromatografie [45]. Problémem těchto metod je ale nutnost vícekové purifikace pro dosažení dostatečné čistoty proteinu. Fuse cílového proteinu s krátkým peptidem nebo proteinem, dále v textu označovaném jako značka, umožňuje obecnou jedнокrokovou purifikaci využívající afinitu této značky k jiné sloučenině. Optimální značka by měla umožňovat expresi fusního proteinu s vysokým výtěžkem, fusi s jakýmkoliv proteinem bez změny jeho funkce, umístění na N-terminální i C-terminální část proteinu, nenáročnou purifikaci z libovolného expresního systému a detekci fusního proteinu [46]. Podle druhu značky a jejího interakčního partnera odlišujeme dvě třídy značek. První třída využívá interakci peptidové nebo proteinové značky s neproteinovou imobilisovanou molekulou, např. glutathion S-transferasa s imobilisovaným glutathionem nebo polyhistidylová značka koordinovaná na ion přechodného kovu. Ve druhé třídě interaguje peptidová nebo proteinová značka s jejím vazebným proteinem, např. interakce kalmodulin-vazebného peptidu s imobilisovaným kalmodulinem. Speciální podtřídu druhé třídy tvoří protilátky jako vazebné proteiny, např. peptid FLAG a příslušná monoklonální protilátka.

Protože každý protein má své unikátní vlastnosti, neexistuje universální značka použitelná pro všechny proteiny. Mezi nejčastěji používané proteinové značky patří malé peptidy,

jakými jsou polyhistidin (Poly-His), FLAG (DYKDDDDK) nebo Strep-tag II (WSHPQFEK), které by neměly interferovat se strukturou a funkcí proteinu, a tak nemusí být při purifikaci pro některé účely odštěpeny.

Tabulka 1: Vybrané proteinové značky (upraveno dle [47])

Ligand	Matrix	Použití v organismu	Využití
kalmmodulin-vazebný peptid	kalmmodulin	bakterie	purifikace proteinu
doména vázající celulosu	celulosa	bakterie, kvasinky, savčí a hmyzí buňky, rostliny	imobilisace proteinu, purifikace
c-myc	monoklonální protilátka	bakterie, kvasinky, savčí buňky	imunoprecipitace, průtoková cytometrie
FLAG	monoklonální protilátka	bakterie, kvasinky, savčí buňky	imunochemická detekce, purifikace
glutathion transferasa	S- glutathion	bakterie, kvasinky, savčí a hmyzí buňky	zvýšení rozpustnosti proteinu, purifikace, protein-proteinové a DNA-proteinové interakce
HAT ¹	Co ²⁺ -CMA ²	bakterie	purifikace proteinu
doména vázající chitin	chitin	bakterie	purifikace proteinu s inteinovou strukturou
protein vázající maltosu	amylosa	bakterie	zvýšení rozpustnosti proteinu, purifikace
poly-Arg	katexový nosič	bakterie	imobilisace proteinu
poly-His	Ni ²⁺ -NTA ³ , Co ²⁺ -CMA ²	bakterie, kvasinky, savčí a hmyzí buňky	purifikace proteinu
peptid S	S-fragment RNasy A	bakterie, savčí a hmyzí buňky	kolorimetrická/fluorimetrická detekce
Strep-tag II	Strep-Tactin ⁴	bakterie, kvasinky, savčí a hmyzí buňky, rostliny	purifikace, studium protein-proteinových interakcí

¹ HAT 19-aminokyselinová polyhistidylová afinitní značka

² Co²⁺-CMA kobaltnatý ion chelátován karboxymethylaspartátem na agarosové matrici

³ Ni²⁺-NTA nikelnatý ion chelátován kyselinou nitrilotrioctovou na agarosové matrici

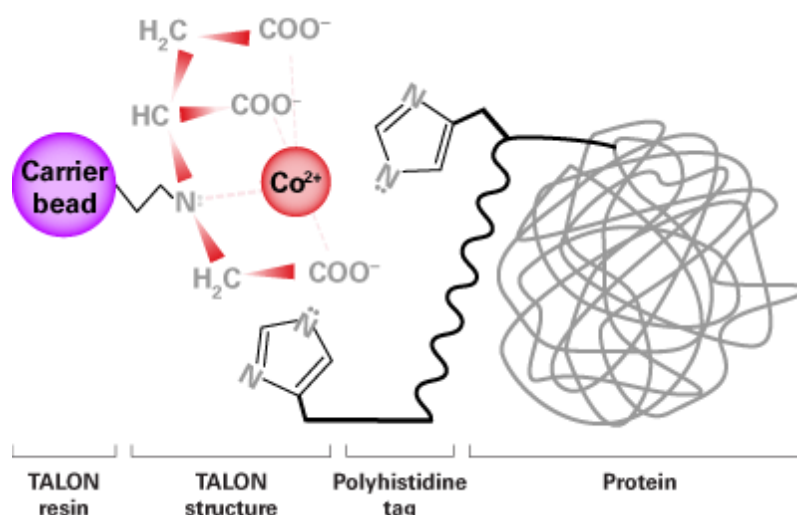
⁴ Strep-Tactin modifikovaný streptavidin

Další strategií značení proteinů je využití fuse s proteinovým partnerem, který napomáhá sbalení a rozpustnosti produkovaného proteinu [42,47,48]. Mezi takovéto značky patří

glutathion S-transferasa (GST) nebo protein vázající maltosu (MBP), které je ale pro studium vlastností proteinů nutné proteolyticky odstranit pomocí specifických proteas, jakými jsou například proteasa viru tabákové mosaiky (TEV), faktor X_a nebo thrombin [42,47]. Ačkoli zůstává výběr vhodné proteinové značky subjektivní, některé výsledky naznačují vyšší dosažitelnou čistotu proteinu purifikovaného na základě interakce značky FLAG s příslušnou monoklonální protilátkou [46]. Samozřejmým faktorem při výběru proteinové značky za účelem purifikace je cena purifikační kolony; mezi nejlevnější systémy patří Talon (Co^{2+} -CMA) a Ni^{2+} -NTA pro purifikaci proteinů značených polyhistidinem, MBP a GST kolony [46]. Běžně používané proteinové značky jsou uvedeny v tabulce 1 (strana 18).

1.3.1 Purifikace proteinů s polyhistidylovou značkou

Polyhistidylová značka patří mezi nejčastěji používané proteinové značky v prokaryotických i v eukaryotických expresních systémech [47]. Skládá se z 2-10 histidinových zbytků (obvykle 6) umístěných na N-terminální nebo C-terminální části proteinu. Purifikace je založená na afinitní chromatografii s imobilisovanými ionty kovu (IMAC), kde dochází k interakci přechodného kovu (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) imobilisovaného na agarosové matrici s aminokyselinami s elektron-donorovými postranními řetězci, jakými jsou histidin nebo cystein [49].



Obr. 1.4 Nosič Talon. Nosič Talon sestává z kobaltnatých iontů chelátovaných karboxylmethylaspartátem navázaném na modifikované agarose (carrier bead). Kobaltnaté ionty interagují dvěma koordinačními vazbami s histidiny proteinu. Převzato z [50].

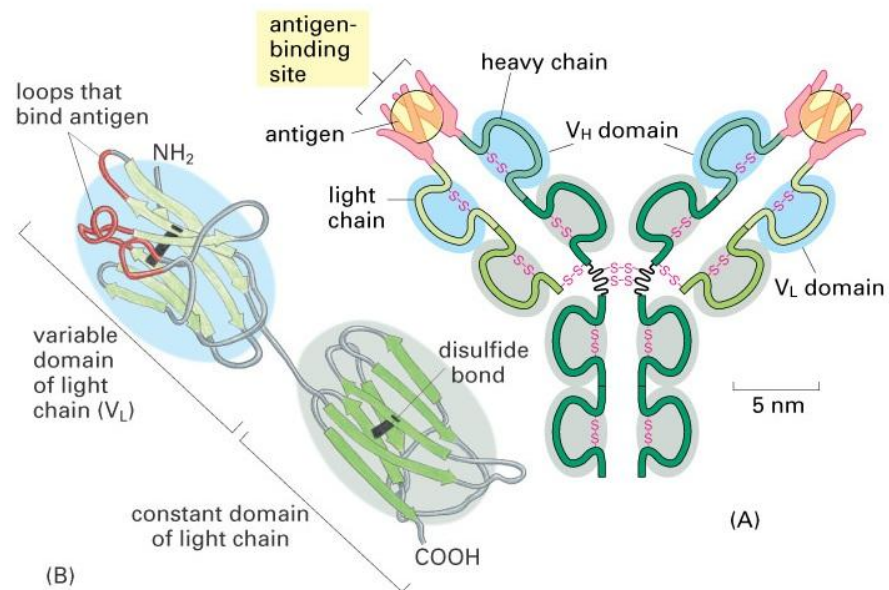
Dnes se využívá komerčně dostupných systémů s nikelnatými a kobaltnatými ionty chelátovanými pomocí kyseliny nitrilotrioctové (NTA), resp. karboxylmethylaspartátu (CMA) na agarosové matrici [47]. Nikelnaté i kobaltnaté ionty poskytují 6 koordinačních

vazeb a umožňují tak vazbu dvou imidazolových skupin a tetradentátního chelátoru jakými jsou NTA a CMA (Obr. 1.4, strana 19). Protein je eluován z komplexu roztokem imidazolu nebo snížením pH prostředí. Nezávislost této metody purifikace na definované struktuře proteinové značky připouští purifikaci nativního i denaturovaného proteinu.

1.4 Příprava polyklonálních protilátek

Protilátky jsou glykoproteiny sekretované plasmatickými B lymfocyty imunitního systému, které se skládají se ze čtyř podjednotek - dvou těžkých řetězců (55 kDa) a dvou lehkých řetězců (22 kDa) spojených disulfidickými můstky a nekovalentními vazbami (Obr. 1.5A, strana 21). Monoklonální protilátky jsou vyrobeny klonem jediného plasmatického B lymfocytu, na rozdíl od polyklonálních protilátek, které obsahují směs molekul exprimovaných dceřinými buňkami různých plasmatických buněk. Výhodou polyklonálních protilátek je jednodušší, kratší a levnější příprava a vzhledem k přítomnosti více druhů molekul protilátky také vyšší stabilita při změně pH nebo iontové síly prostředí a menší citlivost ke změnám struktury jednoho z rozeznávaných epitopů. Jejich nevýhodou je naopak limitované množství polyklonálních protilátek s konstantními vlastnostmi kvůli omezenému objemu krve a délce života imunizovaného organismu. Vzhledem k vysoké afinitě a specificitě vazby protilátky a antigenu mají protilátky široké využití v medicíně i výzkumu [51].

Protilátky, také nazývané imunoglobuliny, mají globulární strukturu. N-koncové části lehkých i těžkých řetězců tvořené 100-110 aminokyselinami jsou na rozdíl od ostatních úseků sekvenčně variabilní. Nejvíce variabilní jsou smyčky spojující β -řetězce variabilního úseku, jež tvoří specifické vazebné místo pro antigen (Obr. 1.5B, strana 21). Protilátky nerozeznávají antigen jako celek, ale pouze 15-22 aminokyselin tvořících epitop proteinového antigenu. Epitop může být determinován strukturně i sekvenčně. Centrální část těžkých řetězců je bohatá na prolin, serin a threonin a tvoří tzv. pantovou oblast, která je odpovědná za rotační a laterální pohyb dvou ramen protilátky umožňující optimální vazbu antigenu. U některých isotypů protilátek pantová oblast chybí. C-koncová část těžkých řetězců je sekvenčně konservována a má efektorovou funkci protilátky, aktivuje například proteiny komplementu nebo opsonizaci [51,53].



Obr. 1.5 Struktura protilátky. **A)** Schematické znázornění typické protilátky skládající se ze čtyř polypeptidových řetězců [dva lehké řetězce (z ang. *light chain*) a dva těžké řetězce (z ang. *heavy chain*)] spojených disulfidickými můstky. Antigen-vazebné místo (z ang. *antigen-binding site*) je tvořeno variabilní doménou těžkého (z ang. *V_H domain*) i lehkého (z ang. *V_L domain*) řetězce. **B)** Znárodnění jednoho lehkého řetězce tvořeného variabilní a konstantní doménou. Antigen-vazebné smyčky variabilní domény jsou označeny červenou barvou. Převzato z [52].

Na základě sekvenční odlišnosti konstantní části těžkého řetězce rozeznáváme pět hlavních tříd protilátek – IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Imunoglobuliny G (IgG) jsou protilátky v krevním séru nejvíce zastoupené a hrají roli v obraně plodu v těle matky, aktivují proteiny komplementu a opsonizaci. Cizorodou látku schopnou vyvolat imunitní odpověď organismu nazýváme imunogen. Imunoglobuliny M (IgM) jsou prvními protilátkami produkovanými jako odpověď na přítomnost imunogenu v organismu a mohou tvořit pentamery. Imunoglobuliny A (IgA) se nacházejí především v sekrečních tekutinách, jakými jsou slzy, sliny nebo mléko, a mohou také tvořit multimery. Imunoglobuliny E jsou sice v krevním séru velmi málo zastoupené, ale vyvolávají hypersenzitivní reakce typu anafylaktického šoku. Imunoglobuliny D (IgD) jsou spolu s IgM hlavními membránově vázanými protilátkami [53].

Protilátky jsou tvořeny plasmatickými B lymfocyty jako odpověď na přítomnost cizorodých látek v organismu. Naivní B lymfocyty rozeznávají antigen pomocí membránově vázané protilátky, čímž se aktivuje jejich proliferace a diferenciace na paměťové a plasmatické B lymfocyty. Paměťové B lymfocyty obsahují stejnou membránově vázanou protilátku jako naivní B lymfocyt, ze kterého vznikly, a urychlují

tak imunitní odpověď při opětovném vystavení cizorodé látce. Další dráhou zpracování cizorodé látky je její štěpení a presentace hlavním histokompatibilitním komplexem (MHC II). Vazbou komplexu MHC II a cizorodé látky na pomocné T lymfocyty se tyto aktivují a začnou sekretovat cytokiny aktivující B lymfocyty [54]. Imunogenicita proteinů je způsobena strukturní a sekvenční odlišností od proteinů hostitelského organismu, dostatečnou molekulovou hmotností (obvykle alespoň 10 kDa), heterogenním chemickým složením a schopností být fagocytován a degradován imunitním systémem hostitele. Imunogenicita je také ovlivněna genotypem hostitelského organismu, dávkou imunogenu a způsobem podání [53]. Protože imunogenicita proteinu souvisí s genotypem hostitelského organismu, je při přípravě protilátek nutné vybrat hostitelský organismus fylogeneticky vzdálený od organismu, ze kterého pochází imunogen. Dalším faktorem při výběru imunizovaného organismu je jeho velikost, respektive objem krve potřebný pro získání požadovaného množství protilátky. Nejčastěji se pro výzkumné účely používá králík, potkan, ovce nebo koza. Vzhledem k jednoduchosti izolace protilátek z vaječného žloutku se také často imunizují slepice [51,55].

Samotná příprava protilátek sestává z injekce imunogenu subkutánně, intradermálně nebo intramuskulárně do vybraného organismu a opakované injekci imunogenu, tzv. booster, po několika dnech až týdnech v závislosti na konkrétní metodě a vybraném organismu. Opakovaným podáním se zvyšuje proliferace antigen-specifických B a T lymfocytů. Pro zvýšení imunogenicity se imunogen podává s aditivou prodlužujícími uvolňování imunogenu do organismu, stimujícími nespecifickou proliferaci lymfocytů a zvyšujícími kostimulační signály. Mezi aditiva patří například kamenec nebo Freundovo adjuvans připravené z oslabených *Mycobacteria tuberculosis* v emulsi vody v oleji. Během procesu je odebírána krev, ze které je po koagulaci získáno krevní sérum [53,55]. Pro výzkumné účely je dle výtěžku a specificity připravených protilátek možné použít sérum, ale většinou je nutné zvýšit koncentraci všech protilátek v séru nebo protilátky vázající studovaný antigen izolovat.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce byla příprava a testování králičí polyklonální protilátky proti proteinům rodiny CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1) *Schizosaccharomyces pombe* pro následné experimenty zahrnující chromatinovou imunoprecipitaci, ko-precipitaci proteinů CSL a jejich interakčních partnerů a imunodetekci proteinů CSL imobilisovaných na nitrocelulosoové membráně. Pro dosažení tohoto cíle bylo nutné:

- navrhnout vhodnou imunogenní část proteinů Cbf11 a Cbf12
- vytvořit konstrukty pro heterologní expresi navržených imunogenů v *E. coli*
- optimalisovat expresi rekombinantních proteinů pro získání nativního imunogenu
- purifikovat imunogeny s hexahistidylovou značkou pro imunisaci králíků pomocí chelatační chromatografie
- testovat citlivost a specificitu vazby protilátek na proteiny CSL *S. pombe*.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Seznam použitých chemikálií

Bio-Rad, USA

Akrylamid ($\geq 99,9\%$), kyselina ethylendiaminotetraoctová, dithiothreitol, blokovací mléko Blotting grade blocker, TEMED (tetramethylethyldiamin), N-N-methylenbisakrylamid, Bradfordovo činidlo BioRad Protein Assay, Lowryho činidlo DC Protein Assay, Coomassie Brilliant Blue R-250, hovězí sérový albumin, Coomassie Brilliant Blue R-250

Biotika, Slovenská republika

Ampicilin

Clontech, USA

Talon Superflow Metal Affinity Resin

Covance, USA

Posi-tag Epitope Tag Control Protein

Formedium, Velká Británie

Kvasinkový extrakt (Yeast Extract Powder), SP supplements

Imuna Pharm, Slovenská republika

Živný agar č. 2

Lachema, Česká republika

Hydroxid sodný, kyselina octová, bromfenolová modř, kyselina chlorovodíková

Lach-Ner, Česká republika

Chlorid sodný, isopropanol, ethanol 96%, kyselina octová 99%

Life Technologies, USA

TOPO® TA Cloning® Kit (pCR® 2.1-TOPO® vektor)

Linde, Česká republika

Tekutý dusík

Lonza, Švýcarsko

SeaKem LE Agarose

Macherey-Nagel, Německo

Nucleospin Plasmid Kit, Nucleospin Extract II Kit

Merck, Německo

Universal pepton M 66

MP Biomedicals, USA

Glycerol

PML Protein. Mléko. Laktóza, Česká republika

Odtučněné mléko Laktino

Serva, Německo

Tris [*Tris*(hydroxymethyl)aminomethan], Triton X-100, chlorid lithný, Tween 20, glycin, inhibitory proteas (Protease-Inhibitor Mix FY; AEBSF, E-64, Pepstatin A, 1,10-fenanthrolin)

Sigma-Aldrich, USA

HEPES, ethidium bromid, thiamin, glukosa, dodecylsírán sodný ($\geq 99\%$), persírán amonný ($\geq 98\%$), dimethylsulfoxid, glycerol ($\geq 99\%$), dihydrát chloridu vápenatého ($\geq 99\%$), octan draselný ($\geq 99\%$), phenylmethylsulfonylfluorid, azid sodný, hexahydrát chloridu hořečnatého, imidazol, Igepal® CA-630, Bismarck Brown R

Thermo Scientific, USA

pufr pro DNA polymerasu (High Fidelity Buffer with 15 mM Mg^{2+}), DNA polymerasa (High Fidelity PCR Enzyme Mix), dATP, dTTP, dCTP, dGTP, rekombinantní DNA polymerasa Taq, pufr pro DNA polymerasu [10X Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$], chlorid hořečnatý, restriční endonukleasy *NdeI* a *BamHI*, pufr pro restriční štěpení (10X Tango Buffer), velikostní standard pro agarosovou elektroforesu DNA (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), T4 DNA ligasa, pufr pro T4 ligasu (10X T4 DNA ligase buffer), značený velikostní standard pro PAGE (PageRuler Prestained Protein Ladder), nanáškový pufr pro agarosovou DNA elektroforesu (6X DNA Loading Dye), isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid, bakteriologický agar, substráty pro křenovou peroxidasu (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate)

3.1.2 Ostatní materiál

plastové centrifugační zkumavky 250 ml (Nalgene, USA), elektroporační kyvety (Cell Projects, Velká Británie), nitrocelulosevá membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA), injekční stříkačka Injekt®-F (BBraun, Německo), jehla Sterican 26G x 1" (BBraun, Německo), Poly-Prep chromatografická kolona (Bio-Rad, USA), centrifugační filtrační jednotky Amicon® Ultra – 4 Ultracel® NWML 10 000 (Millipore, USA)

Primární a sekundární protilátky použité pro imunodetekci proteinů imobilisovaných na nitrocelulosevé membráně jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled použitých protilátek

Protilátka	Popis	Výrobce, katalogové číslo
GAM-AP	kozí protilátka rozpoznávající myší protilátky, konjugovaná s alkalickou fosfatasou	Bio-Rad, USA, #170-6520
GAR-AP	kozí protilátka rozpoznávající králičí protilátky, konjugovaná s alkalickou fosfatasou	Bio-Rad, USA, #170-6518
GAR-HRP	kozí protilátka rozpoznávající králičí protilátky, konjugovaná s křenovou peroxidasou	Thermo Scientific, USA, # 31460
anti-TAP	králičí protilátka rozpoznávající značku TAP	Genscript, USA, #A00683
anti-PSTAIR	myší monoklonální protilátka rozpoznávající CDK různých organismů	Sigma-Aldrich, USA, # P 7962
anti-His·Tag®	myší monoklonální protilátka rozpoznávající polyhistidylovou značku	EMD Millipore, USA, #70796
HA.11	myší monoklonální protilátka rozpoznávající hemaglutininovou značku	Covance, USA, #MMS-101-P

Plasmidy využívané v této práci jsou uvedeny v tabulce 3 (strana 27).

Tabulka 3 Přehled použitých plasmidů

Název konstruktů	Vektor	Insert	Zdroj
pJR05	pUC19	<i>cbf11</i> ORF	laboratorní sbírka
pMP35	pET-15b	<i>cbf12</i> ORF	laboratorní sbírka
pJT01	pET-15b	<i>cbf11(303-492)</i>	tato práce
pJT02	pET-15b	<i>cbf12(626-829)</i>	tato práce

DNA primery využitě v této práci pro amplifikaci genů *cbf11(303-492)* a *cbf12(626-829)* a ověření připravených konstruktů sekvenací jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. DNA primery

Název primeru	Sekvence
CBF11F	5'- GACCATATGAGTAATATTACGTTGCGAT - 3'
CBF11R	5'- AATGGATCCTTAGCCCACTATAGTCC - 3'
CBF12F	5'- GACCATATGAAAGTGTCTGACAT - 3'
CBF12R	5'- GAAGGATCCTAGGAAATAATTGACCACAT - 3'
M13F	5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3'

3.1.3 Seznam použitých přístrojů

Centrifugy

Janetzki K26D (MLW, Německo), Janetzki K23 (MLW, Německo), Jouan MR22i – rotory AM2.18, AM38.15, SWM 180.5 (Jouan, Francie), mikrocentrifuga model 5418, 5417R a miniSpin plus (Eppendorf, Německo)

Třepačky

Orbital shaker model 420 a 4520 (Thermo Scientific, USA), kývací třepačka Mini-rocker shaker (Biosan, Lotyšsko), orbitální třepačka IKA KS 260-basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo), orbitální třepačka Infors Ecotron AG CH-4103 (Infors HT, Švýcarsko)

Elektroforetické a přenosové (blotovací) aparatury

Horizontální elektroforetický systém Blue Marine 100 a 200 (Serva, Německo), vertikální elektroforetický systém Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad, USA), vertikální elektroforetický systém Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, USA), přenosová aparatura Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA)

Zdroje napětí

Lightning Volt Power Supply Model OSP-300 (Thermo Scientific, USA), Bluepower 500 (Serva, Německo), PowerPac™ Universal (Bio-Rad, USA)

Termobločky a termostaty

Termostat TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), termobloček IncuBlock model 285 (Denville Scientific, USA), termobloček Dry bath incubator model MD-01 (Major science, USA)

Spektrofotometry

NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), Spekol 20 (Carl Zeiss Jena, Německo), UVmini-1240 (Shimadzu, Japonsko), WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter (Biochrom, Velká Británie)

Váhy

Předvážky A&D Model EK-120G (A&D Company, Japonsko), analytické váhy A&D Model GR-120 (A&D Company, Japonsko)

Další přístroje

Transiluminátor FOTO/UV21 (Fotodyne Incorporated, USA), sonikátor BioRuptor™ Next Gen (Diagenode, Belgie), homogenizátor French Press Cell Disruptor FA080A s pístem Mini-Cell FA003 (Thermo Scientific, USA), laminární box HS12 (Heraeus Instruments, Německo), elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, USA), Vortex-2 Genie® (Scientific Industries, USA), pH metr pH/ION analyser OP-271/1 (Radelkis, Maďarsko), thermocykler PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA), thermocykler Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies, USA), FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA), LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Japonsko)

3.1.4 Použité mikroorganismy

Escherichia coli

Kmen DH5α F- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*

Kmen BL21(DE3) F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm λ*(DE3)

Kmen TOP10 F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1*
araD139 $\Delta(araleu)7697$ *galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

Kmeny kvasinky *S. pombe* použité v této práci (Tabulka 5) pochází ze sbírky kmenů laboratoře doc. RNDr. Petra Folka, CSc.

Tabulka 5. Použité kmeny *Schizosaccharomyces pombe*

Kmen	Genotyp
MP19	<i>cbf11-ctap4::natR, h⁺</i>
MP20	<i>cbf12-ctap4::natR, h⁺</i>
MP25	$\Delta cbf11::kanR, \Delta cbf12::natR, h+$
MP26	<i>cbf11-3HA::natR, h⁺</i>
MP27	<i>cbf12-3HA::natR, h⁺</i>
JB32	<i>h^{+s}</i>
MaP35	<i>cbf11-ctap4::natR, \Delta cbf12::natR, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216, h⁺</i>
MaP36	<i>cbf12-ctap4::natR, \Delta cbf11::kanR, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216, h⁺</i>
MP47	<i>ura4-D18, pJR2-3XU-cbf11, h⁻</i>
JB1105	<i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 slm9::CTAP(ura4+), h⁺</i>

3.2 Metody práce s mikroorganismy

3.2.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivační média byla připravována z deionisované vody a sterilisována v autoklávu 20 minut při 119°C. Standardní kultivační teplota pro *E. coli* byla 37°C, pro expresi proteinů 18°C – 30°C. Běžná kultivační teplota pro *S. pombe* byla 32°C. Kultury narostlé na pevných médiích byly skladovány v lednici při teplotě do 8°C maximálně 2 týdny pro *E. coli* a 4 týdny pro *S. pombe*. Kultivace buněk v tekutém médiu byla prováděna v sterilních Erlenmayerových baňkách (případně sterilních kultivačních zkumavkách pro izolaci plasmidové DNA z *E. coli*) naplněných maximálně do 1/3 objemu baňky

pro dostatečnou aeraci. Buněčné kultury byly inkubovány v termostataném inkubátoru při 150-200 rpm. Koncentrace buněk v kultuře byla měřena na spektrofotometru Spekol20 při 595 nm (označováno OD₅₉₅) nebo na spektrofotometru Cell Density Meter (označováno OD). Pro dlouhodobé uskladnění byly z kultur *E. coli* vytvořeny glycerolové konzervy tak, že kultury ve stacionární fazi růstu byly smíchány se sterilním glycerolem na výslednou koncentraci 10%, zmrazeny v tekutém dusíku a poté uskladněny v -80°C.

Bakteriální kultivační média

LB 10 g/l Universalpepton M66
5 g/l kvasinkový extrakt
5 g/l NaCl

ŽA 40 g/l Živný agar č. 2

V případě potřeby bylo do sterilního média přidáno selekční antibiotikum ampicilin na výslednou koncentraci 100 µg/ml.

Kultivační média pro *S. pombe*

YES 5 g/l kvasinkový extrakt
30 g/l glukosa
0,25 g/l SP supplements

Glukosa (200 g/l) byla sterilisována odděleně od ostatních složek YES média a poté přidána na uvedenou výslednou koncentraci. Pevné médium bylo připraveno přidáním 2% agaru před autoklávováním.

3.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk

Elektrokompetentní buňky *E. coli* [kmény DH5 α , BL21(DE3)] byly připraveny inokulací 20 ml LB média v 250 ml Erlenmayerově baňce 2-3 dobře oddělenými koloniemi příslušného kmene *E. coli* čerstvě narostlého na pevném médiu a následnou kultivací přes noc při 37°C za dostatečné aerace (180 rpm). Následující den byla kultura ředěna LB médiem s 0,1 mM thiaminem ve 4 Erlenmayerových baňkách na výsledný objem 250 ml tak, aby výsledné OD₅₉₅ bylo 0,05-0,1. Kultura byla inkubována na třepačce při 37°C a 180 rpm do dosáhnutí OD₅₉₅ 0,5-0,6. Poté byla kultura chlazená v ledové lázni 10 minut. Po schlazení byly buňky centrifugovány (3500 g, 10 min, 0°C) v 250 ml plastových centrifugačních zkumavkách, sediment byl resuspendován v 10 ml chlazené sterilní

deionisované vody (~1°C), deionisovanou vodou doplněn na původní objem a opětovně centrifugován (3500 g, 10 min, 0°C). Sediment byl resuspendován ve 100 ml chlazené sterilní deionisované vody (~1°C), převeden do dvou 50 ml centrifugačních zkumavek a opětovně centrifugován (2800 g, 20 min, 4°C). Sediment byl dvakrát promyt sterilním 10% glycerolem (25-50 ml). Promyté sedimenty byly resuspendovány v 2 ml sterilního 10% glycerolu a 100-200 µl alikvoty byly rozplněny do 1,5 ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku. Kompetentní buňky je po rychlém ochlazení tekutým dusíkem možné dlouhodobě skladovat při -80°C.

3.2.3 Příprava nativních buněčných lysátů BL21(DE3) *E. coli*

Sterilní LB médium (10-25 ml) se 100 µg/ml ampicilinu bylo inokulováno monoklonií BL21(DE3) transformovanou expresním plasmidem čerstvě narostlou na pevném médium ŽA se 100 µg/ml ampicilinu nebo glycerolovou konzervou BL21(DE3) buněk obsahující expresní plasmid. Inokulum bylo kultivováno přes noc při teplotě 23-37°C v třepačce. Buněčná kultura byla ráno ředěna na objem 10-400 ml o OD 0,05-0,1 sterilním LB médiem se 100 µg/ml ampicilinu a 0,2% glukosou a kultivována při 37°C v třepačce do dosažení požadované optické density. Poté byla buněčná kultura ochlazená na expresní teplotu (18°C-30°C) a exprese požadovaného genu byla indukována IPTG o koncentraci 0,1-1 mM několik hodin (dle konkrétního pokusu). Růst buněk byl zastaven ochlazením buněk na ledu a buňky byly následně sedimentovány centrifugací (3000 g, 4°C, 10 min). Buněčný sediment byl obvykle zmražen na teplotu -80°C, případně ihned použit k přípravě lysátu.

Příprava lysátu z malého objemu buněčné kultury (do 15 ml) – Buněčná peleta byla na ledu resuspendována v malém množství lisačního pufru (200 µl – 1 ml) v 1,5 ml mikrozkušavkách. Resuspendované buňky byly sonikovány (Bioruptor, Diagenode) desetkrát (30 s sonikace na “HIGH”, 30 s pauza) při 2°C. Po sonikaci byl odebrán malý vzorek celkového lysátu a zbytek lysátu byl centrifugován (20 000 g, 20 min, 4°C) pro získání solubilní frakce. Obě frakce byly analysovány prostřednictvím SDS-PAGE pro stanovení celkové hladiny exprese a míry solubility proteinu.

Příprava lysátu z většího objemu buněčné kultury - Buněčný sediment byl na ledu resuspendován v lisačním pufru o objemu desetinásobku hmotnosti buněčné pelety. K lysi buněk byl použit homogenizátor (French Press Cell Disruptor, Thermo Scientific) při 18 000 psi. Po lysi byl odebrán malý vzorek celkového lysátu a zbytek lysátu byl

centrifugován (20 000 g, 20 min, 4°C) pro získání solubilní frakce. Obě frakce byly analysovány pomocí SDS-PAGE pro stanovení celkové hladiny exprese a solubility proteinu.

Lysační pufr 50 mM HEPES, pH 7,0 (u některých experimentů 7,5)
 150-500 mM NaCl (dle konkrétního experimentu)
 5-10% glycerol (w/v)
- u některých experimentů byl přidán také 0,1% Triton X-100 (v/v), 0,6 mM PMSF, 5 mM imidazol, 3 mM β-merkaptoethanol nebo 0,5% Igepal® CA-630 (v/v)

3.2.4 Příprava nativních buněčných lysátů *S. pombe*

Sterilní médium YES (10 - 15 ml) bylo inokulováno buňkami (ne monoklonií) *S. pombe* čerstvě narostlými na pevném médiu YES. Po kultivaci přes noc při 32°C v třepačce byla kultura v exponenciální fazi růstu ředěna na celkový objem kultury 30-50 ml sterilním médiem YES na OD₅₉₅ přibližně 0,5. Buňky byly sklizeny v pozdní exponenciální fazi růstu kultury při OD₅₉₅ 0,7-1,2 centrifugací (3000 g, 4°C, 3 minuty). Sediment byl resuspendován ve STOP pufru (3-4 ml, dle objemu kultury) a opět centrifugován (3000 g, 3 min, 4°C). Sediment byl resuspendován v 500 µl STOP pufru a převeden do 1,5 ml mikrozkušavky, ve které byl opět centrifugován (3000 g, 3 min, 4°C). Buněčný sediment byl zmrazen na teplotu -80°C pro pozdější zpracování nebo resuspendován ve 40 µl lysačního pufru s inhibitory proteas (Protease-inhibitor mix FY) a DTT. Buněčná suspence byla na ledu převedena na skleněné kuličky v 2 ml šroubovacích mikrozkušavkách. Buňky byly lysovány pomocí FastPrep®-24 třikrát (20 s, rychlostní stupeň 5,5), mezi jednotlivými kroky byly buňky chlazeny 5 minut na ledu. Do buněčného lysátu na skleněných kuličkách bylo přidáno 400 µl lysačního pufru s inhibitory proteas a DTT, dno i víčko mikrozkušavky s kuličkami bylo propíchnuto nahřátou jehlou a buněčný lysát byl získán centrifugací do čisté mikrozkušavky (1500 g, 2 min, 4°C). Solubilní frakce lysátu byla získána centrifugací (20 000 g, 20 min, 4°C). Koncentrace proteinu byla změřena podle návodu v kapitole 3.4.5 (Lowryho metoda).

STOP pufr 25 mM HEPES, pH 8,0
 50 mM NaF
 1 mM NaN₃
 150 mM NaCl

Lysační pufr 25 mM HEPES, pH 7,6
 0,1 mM EDTA
 150 mM KCl
 0,1% Triton X-100
 25% glycerol
 1 M močovina

- před použitím bylo přidáno 1/100 objemu Protease-Inhibitor Mix FY a 1/500 objemu 1 M DTT

3.3 Metody práce s DNA

3.3.1 Transformace buněk *E. coli* elektroporací

Pro elektroporaci elektrokompetentních buněk DH5 α a BL21(DE3) byl použit přístroj Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad) s 2 mm elektroporačními kyvetami s napětím 2,5 kV. Příprava elektrokompetentních buněk je uvedena v kapitole (3.2.2). Před elektrickým šokem byly buňky s plasmidovou DNA umístěny na ledu a ihned po elektrickém šoku byly buňky převedeny do 1 ml LB média s 0,5% glukosou předeřátého na 37°C. Buňky byly inkubovány v třepačce 1 hodinu při 37°C a poté byla na pevné médium ŽA s příslušným antibiotikem (100 μ g/ml ampicilin pro všechny použité plasmidy v této práci) vyseta různá množství kultury pro dosažení přiměřeného množství monoklonií po inkubaci při 37°C v termostatu přes noc.

3.3.2 Isolace plasmidové DNA alkalickou metodou

Metoda pro izolaci plasmidové DNA z bakterií *E. coli* je upravena dle Birnboim a Doly [56]. LB médium s antibiotikem (100 μ g/ml ampicilin pro všechny použité plasmidy v této práci) o objemu 15 ml bylo inokulováno jednou monoklonií čerstvě narostlou na pevném médiu a následně kultiváno přes noc při 37°C za dostatečné aerace (180 rpm). Následující den byla kultura ochlazená v ledové lázni 10 minut a centrifugována (3000 g, 20 min, 0°C). Sediment byl dokonale resuspendován v 2 ml roztoku I (viz. strana 34) a poté byly k němu mimo ledovou lázeň přidány 4 ml roztoku II (viz. strana 34). Buněčná suspence byla promíchána překlápěním zkumavky a inkubována 1-10 minut do dostatečné lyse buněk (pozorovatelné zvýšenou viskositou a projasněním suspence). Buněčný lysát byl opět umístěn do ledové lázně a byly k němu přidány 3 ml roztoku III (viz. strana 34). Obsah zkumavky byl promíchán lehkým překlápěním a inkubován 15 minut na ledu. Směs byla převedena do centrifugačních zkumavek

a sraženina byla centrifugována (20 000 g, 20 minut, 4°C). Supernatant byl smísen s isopropanolem o objemu 0,6 násobku objemu supernatantu a ihned centrifugován (3000 g, 6 min, 4°C). Sediment byl rozpuštěn v 300 µl dH₂O a k roztoku byl přidán stejný objem 10 M LiCl, který byl poté inkubován při -80°C 10 minut. Vzniklá sraženina byla centrifugována (16000 g, 5 minut, 4°C) a supernatant byl přesrážen stejným objemem 96% ethanolu při -80°C 10 minut. Sraženina DNA byla usazena centrifugací (16000 g, 5 minut, 4°C), sediment byl promyt 1 ml 70% ethanolu a následně vysušen pro odstranění zbytků ethanolu. Isolovaná plasmidová DNA byla rozpuštěna v 60 µl dH₂O.

Roztoky:

I: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukosa

II: 1% SDS, 0,2 M NaOH

III: 3 M octan draselný, 2 M kyselina octová, pH 5,4

3.3.3 Isolace plasmidové DNA pomocí adsorpce na membránu na basi silikagelu

V této práci byl použit kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel). Pro izolaci plasmidové DNA byl použit postup doporučený výrobcem.

3.3.4 Amplifikace části genů *cbf11* a *cbf12* pomocí PCR

Části genů *cbf11* a *cbf12*, konkrétně *cbf11*(303-492) a *cbf12*(626-829), kódující protein pro přípravu protilátky proti endogenním proteinům Cbf11 i Cbf12 *S. pombe* byly amplifikovány z plasmidu obsahující sekvenci genů *cbf11* a *cbf12* pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR). Navržené primery (Tabulka 4, strana 27) mají „nástavce“ rozeznávané endonukleasami *Bam*HI a *Nde*I a několik nukleotidů navíc pro efektivnější štěpení produktů PCR těmito endonukleasami. Pro popis návrhu imunogenu viz kapitola 4.1.

Reakční směs obsahovala:

- 1X pufr pro polymerasu s nízkou chybovostí s 15 mM MgCl₂ (10X High Fidelity Buffer with 15 mM MgCl₂)
- 0,2 mM dNTP (zásobní koncentrace 2,5 mM)
- 0,4 µM primer F (zásobní koncentrace 10 µM)
- 0,4 µM primer R (zásobní koncentrace 10 µM)
- templátová DNA

- 0,4 µl (5 U/µl) polymerasy s nízkou chybovostí (High Fidelity PCR Enzyme Mix)
- dH₂O doplněná na celkový objem 50 µL

Pro amplifikaci *cbf11(303-492)* byly použity primery CBF11F a CBF11R a plasmid pJR05 jako templát. Pro amplifikaci *cbf12(626-829)* byly použity primery CBF12F a CBF12R a plasmid pMP35 jako templát.

Reakce probíhala v thermocykleru za následujících podmínek:

1. 94°C 4 min
2. 94°C 30 sec }
47°C 30 sec } 3x
72°C 40 sec }
3. 94°C 30 sec }
58°C 30 sec } 14-18x
72°C 40 sec }
4. 72°C 10 min

Produkt PCR byl po horizontální agarosové elektroforese (kapitola 3.3.10) obarven ethidium bromidem a visualisován na transiluminátoru.

3.3.5 Polymerasová řetězová reakce s buňkami *E. coli*

Metoda „colony PCR“ využívá jako zdroj templátové DNA celé buňky *E. coli*. Malá část biomasy z čerstvé monokolonie (maximálně 3 dny) narostlé na pevném médiu ŽA byla resuspendována v 7,5 µl dH₂O v 0,2 ml PCR mikrokumavkách a povařena v thermocykleru 5 minut při 95°C. Považené buňky byly přeneseny na led a bylo k nim přidáno 7,5 µl směsi o následujícím složení:

- 1X pufr pro Taq polymerasu [10X (NH₄)₂SO₄ buffer]
- 1 µM primer F (zásobní koncentrace 10 µM)
- 1 µM primer R (zásobní koncentrace 10 µM)
- 2,5 mM roztok MgCl₂ (zásobní koncentrace 25 mM)
- 0,25 mM dNTP (zásobní koncentrace každého 2,5 mM)
- 0,5 µl Taq polymerasy (5 U/ µl) pro 100 µl připravené reakční směsi

Po smíchání všech reagensů byla provedena polymerasová řetězová reakce s následujícími kroky:

1. 94°C 4 min
 2. 94°C 30 sec
 - 58°C 30 sec
 - 72°C 40 sec
 3. 72°C 7 min
- } 30x

Produkt PCR byl po horizontální agarosové elektroforese (kapitola 3.3.10) obarven ethidium bromidem a visualisován na transiluminátoru.

3.3.6 TOPO® TA klonování

Pro klonování produktů PCR pomocí topoisomerasy byl použit TOPO® TA Cloning Kit s pCR®2.1-TOPO® vektorem. Reakční směs byla připravena dle návodu výrobce. Pro transformaci produktu byly použity buňky *E. coli* TOP10.

3.3.7 Adenylace 3' konců produktů PCR

Reakční směs pro doplnění 3' adenosinových přesahů obsahovala:

- 1X pufr pro Taq polymerasu [10X (NH₄)₂SO₄ buffer]
- 2 mM MgCl₂ (zásobní koncentrace 25 mM)
- 0,2 mM dNTP (zásobní koncentrace každého 2,5 mM)
- 0,2 μl Taq polymerasy (zásobní koncentrace 5 U/μl) pro 100 μl připravené reakční směsi
- PCR produkt (templátová DNA)
- dH₂O doplněná na objem 10 μl

Směs byla inkubována v thermocykleru 7 minut při 72°C. Produkt PCR byl poté použit k TOPO TA klonování (kapitola 3.3.6).

3.3.8 Štěpení DNA pomocí restričních endonukleas

V této práci bylo použito štěpení DNA pomocí restričních endonukleas *Nde*I a *Bam*HI pro přípravu a ověření expresních vektorů.

Reakce o objemu 50 μ l obsahovala:

- 1X Tango pufr (zásobní koncentrace 10X)
- 1 μ l *Nde*I (zásobní koncentrace 10 U/ μ l)
- 1 μ l *Bam*HI (zásobní koncentrace 10 U/ μ l)
- DNA pro štěpení
- dH₂O doplněná na celkový objem 50 μ L

Reakční směs byla inkubována 3-16 hodin při 37°C. Reakce byla ukončena přidavkem vzorkového pufru (6X DNA Loading dye) obsahujícím chelatační činidlo EDTA, případně zmražením na teplotu -20°C. Štěpení plasmidu bylo ověřeno pomocí horizontální elektroforesy DNA (kapitola 3.3.10).

3.3.9 Ligace DNA

Ligační směs o objemu 20 μ l byla připravena z následujících složek:

- přibližně ekvimolární množství ligovaných fragmentů DNA (desítky nanogramů)
- 1X pufr pro T4 DNA ligasu (zásobní koncentrace 10X)
- 0,2 μ l T4 DNA ligasa (1 U/ μ l)
- dH₂O doplněná na celkový objem 20 μ l

Reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 23°C. Enzym byl inaktivován zahřátím na 65°C po dobu 10 minut.

3.3.10 Horizontální agarosová elektroforesa

Pro všechny aplikace byl použit 1-1,5% agarosový gel v Tris-acetátovém pufru s obsahem EDTA a pH 8,5 (1X TAE). Pohyb molekul DNA byl zajištěn napětím 8 V/cm délky gelu. Vzorkový pufr (6X Loading dye) byl použit pro aplikaci vzorku do gelu a visualisaci pohybu molekul DNA v elektrickém poli. K zobrazení separace molekul DNA bylo využito fluorescence interkalačního činidla ethidium bromidu v UV světle na transiluminátoru.

50X TAE 2 M Tris, pH 8,5
 0,1 M EDTA (Na₂EDTA·2 H₂O)
 1 M kyselina octová

3.3.11 Extrakce DNA z agarosového gelu

Po separaci molekul DNA v agarosovém gelu byla část gelu obsahující molekuly očekávané velikosti vyříznuta z gelu skalpelem. Extrakce z gelu byla provedena pomocí komerčního kitu NucleoSpin Extract II dle pokynů výrobce. Koncentrace DNA byla určena měřením absorbance při 260 nm na spektrofotometru Nanodrop.

3.3.12 Sekvence DNA

Sekvence fragmentů DNA, odpovídající *cbf11(303-492)* a *cbf12(626-829)*, klonovaných do vektoru pCR®2.1-TOPO® byly ověřeny sekvenací DNA jednoho klonu pro oba konstrukty pomocí primeru M13F. Sekvenační výsledek byl porovnán se sekvencí *cbf11(303-492)* a *cbf12(626-829)* využitím algoritmu BLAST (BLASTN) [57].

3.3.13 Bioinformatická analýza

Aminokyselinové sekvence homologních proteinů CSL byly porovnány pomocí algoritmu MUSCLE [58]. Konservované DNA-vazebné aminokyseliny a rozdělení proteinů na domény jsou popsány podle anotace v database PDBsum [59]. Pro sekvenční srovnání proteinů Cbf11 (RefSeq: NP_587779) a Cbf12 (RefSeq: NP_588358) s proteiny CSL se známou terciární strukturou v komplexu s DNA byly použity peptidové sekvence ze strukturních modelů PDB: 1ttu (Lag-1), 3iag (myší Su(H)), 3brg (myší Su(H)), 3v79 (lidský Su(H)), a 2f8x (lidský Su(H)).

3.4 Metody práce s proteiny

3.4.1 Polyakrylamidová gelová elektroforesa v prostředí SDS

Pro polyakrylamidovou gelovou elektroforesu v prostředí SDS (dále SDS-PAGE) byla použita aparatura Mini-PROTEAN® 3 cell nebo Mini-PROTEAN® Tetra System. Aparatura byla složena dle instrukcí výrobce. V kádince byl připraven separační polyakrylamidový gel požadované koncentrace (pro jeden gel o tloušťce 0,75 mm):

Koncentrace akrylamidu v gelu	30% AA, 0,8% BIS [ml]	4X Tris-HCl/SDS, pH 8,8 [ml]	dH ₂ O [ml]
7,5%	1,25	1,25	2,5
12%	2,0	1,25	1,75

Těsně před pipetováním gelu do aparatury bylo do směsi přidáno 3,4 µl TEMED a 16,5 µl 10% (w/v) APS. Gel v aparatuře byl převrstven dH₂O pro zamezení přístupu vzduchu. Po polymeraci separačního gelu byla odstraněna vrstva vody vylitím a následným

vysušením filtračním papírem. Poté byla nanášena vrstva zaostřovacího gelu o složení (pro jeden gel o tloušťce 0,75 mm):

30% AA, 0,8% BIS [ml]	4X Tris-HCl/SDS, pH 6,8 [ml]	dH ₂ O [ml]
0,325	0,625	1,55

Těsně před nanášením gelu do aparatury bylo do směsi přidáno 2,5 µl TEMED a 12,5 µl 10% (w/v) APS. Gel byl nanášen na separační gel a následně byl vsazen hřebínek tvarující jamky v gelu. Po polymeraci gelu byl hřebínek odstraněn a skla byla vložena do aparatury pro vertikální elektroforesu, do které byl nalit 1X SDS pufr. Vzorek proteinu byl připraven v Laemmliho pufru s 0,6 µl 1 M DTT na 10 µl proteinového vzorku. Před nanášením na gel pomocí mikrostříkačky Hamilton byl vzorek povařen při 95°C 5 minut a následně krátce centrifugován. Jako standard molekulových hmotností proteinů byl použit PAGERULER™ Prestained Protein Ladder v nanášce 2 µl na gel. Pro rozdělení proteinů dle jejich hydrodynamického poloměru byl aplikován elektrický proud 10 mA při průchodu proteinů zaostřovacím gelem a následně 20 mA pro separaci. Po rozdělení proteinů v gelu byla aparatura rozebrána a proteiny byly přeneseny na nitroceluloseovou membránu metodou elektropřenosu (ang. *Western blot*) nebo visualisovány barvením. Barvení bylo provedeno v Petriho misce s barvicím roztokem na třepačce při pokojové teplotě minimálně 60 minut. Poté bylo nenavázané barvivo odmyto odbarvovacím roztokem do požadovaného kontrastu. Odbarvování gelu je možné urychlit přidáním buničité vaty do odbarvovacího roztoku.

6x Laemmli	0,336 M Tris, pH 6,8 10,26% (w/v) SDS 36% (v/v) glycerol 0,006% bromfenolová modř
4X Tris-Cl/SDS, pH 8,8	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS Roztok je nutné filtrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat při 4°C
4X Tris-Cl/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS Roztok je nutné filtrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat při 4°C

5x SDS pufr	125 mM Tris, pH 8,3 950 mM glycin 0,5% SDS
30% AA, 0,8% BIS	30% akrylamid 0,8% (w/v) N,N'-methylenbisakrylamid Roztok je nutné filtrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat v temnu při 4°C
Odbarvovací roztok	7% (v/v) kyselina octová 5% (v/v) methanol
Barvicí roztok	20% (v/v) methanol 0,117% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 0,051% (w/v) Bismarck Brown R 7% (v/v) kyselina octová v H ₂ O

3.4.2 Elektropřenos proteinů

Pro elektropřenos proteinů (ang. *Western blot*) byla využita aparatura Mini Trans-Blot Module po rozdělení proteinů na polyakrylamidovém gelu. Tento systém využívá tzv. mokrého přenosu (blotování). K přenosu byla použita kazeta, do které byly na černou desku postupně umístěny těsnící houbička, filtrační papír Whatman 3 MM, separační část polyakrylamidového gelu s rozdělenými proteiny, nitrocelulosaová membrána, filtrační papír Whatman 3 MM, těsnící houbička. Všechny součásti kazety byly nejdříve navlhčeny v přenosovém pufru. Kazeta byla vložena do blotovací aparatury s vaničkou s ledem a takovým objemem chlazeného přenosového pufru, aby byla celá nitrocelulosaová membrána ponořena. Aparatura byla umístěna na magnetickou míchačku a připojena k elektrickému zdroji s procházejícím proudem 200 mA. Průběžně byla vyměňována vanička s ledem pro stálé chlazení. Po 1,5-2 h byl přenos proteinů ukončen a aparatura byla rozebrána. Proteiny na membráně byly detekovány protilátkami (kapitola 3.4.3) a proteiny na polyakrylamidovém gelu byly obarveny barvicím roztokem (kapitola 3.3.1).

Přenosový pufr	25 mM Tris, pH 8,0 192 mM glycin 20% methanol
----------------	---

3.4.3 Imunodetekce proteinů

Po elektropřenosu proteinů na nitrocelulosovou membránu byla membrána omyta v TBS 5 minut na třepačce a poté byla blokována v 3-5% mléku v TTBS při pokojové teplotě 1 hodinu za stálého míchání na překlápěčce. Po blokování byla membrána zatavena do fólie spolu s 5 ml 3-5% mléka v TTBS (objem odpovídá membráně o velikosti Mini-PROTEAN® gelu, při menších membránách byl objem patřičně upraven) s primární protilátkou resp. sérem ve vhodném ředění a inkubována přes noc při 4°C za stálého míchání na překlápěčce. Po inkubaci byla membrána vyjmuta z roztoku protilátky a omyta v TTBS třikrát 5 minut na třepačce. Membrána byla zatavena do fólie s 5 ml 3-5% mléka v TTBS (objem odpovídá membráně o velikosti Mini-PROTEAN® gelu, při menších membránách byl objem patřičně upraven) se sekundární protilátkou ředěnou 1:2000 a inkubována při 23°C 1 hodinu na překlápěčce. Po inkubaci byla membrána vyjmuta z roztoku protilátky a omyta třikrát 5 minut v TTBS a jedenkrát 5 minut v TBS. Při použití sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase byla membrána ekvilibrována 10 minut v AP pufru (10 ml pro membránu o velikosti Mini-PROTEAN® gelu) na překlápěčce. Do čistého AP pufru bylo přidáno 1/2000 objemu 1 M MgCl₂ a 1/100 objemu chromogenních substrátů A i B, které v přítomnosti alkalické fosfatasy tvoří nerozpustnou fialovou sraženinu. Membrána byla zatavena do fólie spolu s připraveným AP pufrům s ostatními složkami a inkubována ve tmě při 37°C do vyvinutí dostatečného signálu. Při použití sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidase byla membrána po oplachu v TBS důkladně zbavena přebytečného pufru a následně inkubována ve 2 ml vyvíjecího roztoku 5 minut ve tmě (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, vyvíjecí roztok byl vytvořen smícháním dvou složek Stable Peroxide Solution a Luminol/Enhancer Solution v poměru 1:1). Chemiluminiscence byla snímána pomocí LAS-4000.

TBS	20 mM Tris, pH 7,5 500 mM NaCl
TTBS	20 mM Tris, pH 7,5 500 mM NaCl 0,05% Tween 20
AP pufr	100 mM Tris-HCl, pH 9,5

substrát A 30 mg NBT v 70% DMF

substrát B 15 mg BCIP v 100% DMF

3.4.4 Chelatační purifikace proteinu

Purifikace byla provedena pomocí chelatace kobaltnatých iontů nosiče Talon histidylovými zbytky značeného proteinu. Základní postup vychází z doporučení výrobce a následně byl v této práci optimalisován pro *cbf11(303-492)* značený hexahistidylovým peptidem. Experimenty byly prováděny vsádkovým uspořádáním a chromatografií na koloně. Resuspendovaný nosič Talon Superflow v 50% ethanolu byl odebrán v potřebném množství ze zásobní lahve a poté centrifugován (700 g, 2 min). Supernatant byl odebrán pomocí injekční stříkačky s jehlou. Nosič byl dvakrát promyt (ekvilibrován) 20 CV (ekvivalentů objemu purifikačního nosiče, z ang. *column volume*) lysačního pufru (složení dle konkrétního experimentu), centrifugován (700 g, 2 minuty) a supernatant byl odebrán pomocí injekční stříkačky. Na promytý nosič byl aplikován lysát (pouze solubilní frakce), který byl jemně promícháván na rotační třepačce 20-60 minut při 4°C.

Vsádkové uspořádání - Po inkubaci s lysátem byl nosič centrifugován (700 g, 5 minut, 4°C) a supernatant byl odebrán injekční stříkačkou. Poté byl nosič promyt 20 CV lysačního pufru a pufr se zvyšující se koncentrací imidazolu (50-70 mM) pro odstranění proteinů nespecificky navázaných na nosič. Purifikovaný protein s hexahistidylovou značkou byl eluován lysačním pufrem s 200 mM imidazolem. Po každém promývacím kroku byl nosič centrifugován (700 g, 5 minut, 4°C) a supernatant byl odebrán stříkačkou. Supernatanty byly analysovány pomocí SDS-PAGE.

Chromatografie na koloně – Pro purifikaci byla použita modifikovaná kombinovaná metoda doporučená výrobcem nosiče Talon. Tato metoda využívá inkubaci solubilní frakce buněčného lysátu s nosičem Talon ve zkumavce a následnou aplikaci na chromatografickou kolonu. Poté byl nosič promyt několika CV lysačního pufru (dle konkrétního experimentu) a pufr se zvyšující se koncentrací imidazolu (30-70 mM) pro odstranění proteinů nespecificky navázaných na nosič. Purifikovaný protein s hexahistidylovou značkou byl eluován lysačním pufrem s 200 mM imidazolem. Všechny pufrы byly na kolonu aplikovány napipetováním po 1 ml krocích. Frakce proteklé kolonou byly sbírány po 1 ml pro promývací kroky a 0,5 ml pro eluční kroky. Frakce eluované z kolony byly analysovány pomocí SDS-PAGE.

3.4.5 Měření koncentrace proteinů

Měření koncentrace proteinů dle Bradforda [60] - K měření koncentrace proteinů dle Bradforda bylo použito reagens Bio-Rad Protein Assay. Metoda je založená na posunu absorpčního maxima barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 při vazbě na protein (obzvláště basické a aromatické aminokyseliny).

K sestrojení kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin v rozmezí koncentrací 1,25 µg/ml až 10 µg/ml. Vzorek proteinu byl ředěn tak, aby jeho koncentrace spadala do rozmezí koncentrací v kalibrační křivce. Pro přípravu vzorků pro spektrofotometrické měření byl využit postup dle výrobce (Microassay Procedure). Absorbance byla měřena při 595 nm na spektrofotometru UVmini-1240.

Měření koncentrace proteinů dle Lowryho [61] - K stanovení koncentrace proteinů byl použit kit DC Protein Assay, který využívá upravenou Lowryho metodu fungující i v přítomnosti detergentů. Lowryho metoda je kolorimetrická metoda detekující především tyrosin a tryptofan. K sestrojení kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin v rozmezí koncentrací 0,2 mg/ml až 1,5 mg/ml. Vzorek proteinu byl ředěn tak, aby jeho koncentrace spadala do rozmezí připravené kalibrační křivky. Vzorky pro spektrofotometrické měření byly připraveny podle drobně modifikovaného standardního postupu výrobce. Na každý mililitr roztoku A (alkalický roztok vlnanu měďnatého) bylo přidáno 20 µl roztoku S (pokud byly ve vzorku přítomny detergenty). K 25 µl standardů a vzorků v mikrozkušnicích bylo přidáno 125 µl roztoku A+S, směs byla smíchána a krátce centrifugována. Poté byl přidán 1 ml roztoku B (naředěné Folinovo činidlo) a roztok byl ihned intenzivně promíchán. Po 15 min inkubace byla měřena absorbance při 750 nm.

3.4.6 Odsolování a výměna pufru proteinů

Po purifikaci proteinů byl roztok proteinu odsolen, případně zbaven dalších činidel (např. detergentů) pomocí centrifugačních filtračních jednotek Amicon® Ultra – 4 Ultracel® NWML 10 000. Centrifugační filtrační jednotky s maximálním objemem 4 ml roztoku proteinu byly centrifugovány ve výkyvném rotoru (4000 g, 4°C) do dostatečného zmenšení objemu retentátu. Retentát byl opakovaně ředěn pufrům se sníženou koncentrací soli a bez detergentu a následně centrifugován pro snížení koncentrace nežádoucích látek (soli, detergent, proteiny pod 10 kDa) ve vzorku proteinu.

4 Výsledky

4.1 Návrh imunogenních částí proteinů Cbf11 a Cbf12

Proteiny CSL metazoí a kvasinky *S. pombe* jsou sekvenčně příbuzné, ale obvykle jsou konservovány pouze úseky podílející se na vazbě DNA (Obr. 4.1, strana 45). Podle krystalové struktury proteinů CSL se tyto proteiny skládají ze tří strukturně integrovaných domén. N-terminální doména a centrální doména „beta-trefoil“ se podílejí na vazbě DNA. N-terminální část je v Cbf12 výrazně prodloužena oproti Cbf11 a metazoálním proteinům CSL. Výsledky bioinformatické analýsy naznačují nízkou frekvenci výskytu sekundárních struktur typu α a β v této části proteinu a možnost jejího proteolytického štěpení a fosforylace [32]. V houbových stejně tak jako v metazoálních proteinech CSL je C-terminální doména málo konservována. Je proto možné, že C-koncová doména potřebuje pro dosažení stabilní struktury *in vivo* přítomnost vazebného partnera [19,21,24]. Proteiny s nízkou hladinou strukturní komplexity jsou často při produkci v *E. coli* nerozpustné, což komplikuje získání solubilního imunogenu. Proto byla jako imunogen navržena doména BTD, která odpovídá aminokyselinám 303-492 proteinu Cbf11 a 626-829 proteinu Cbf12. Doména BTD je dále v textu označována jako Cbf11(303-492), resp. *cbf11(303-492)* pro gen kódující tento protein. Analogicky je označována doména BTD proteinu Cbf12, resp. její kódující sekvence. Imunogenní část proteinů Cbf11 a Cbf12 byla navržena ve spolupráci s Mgr. Marianem Novotným, Ph.D.

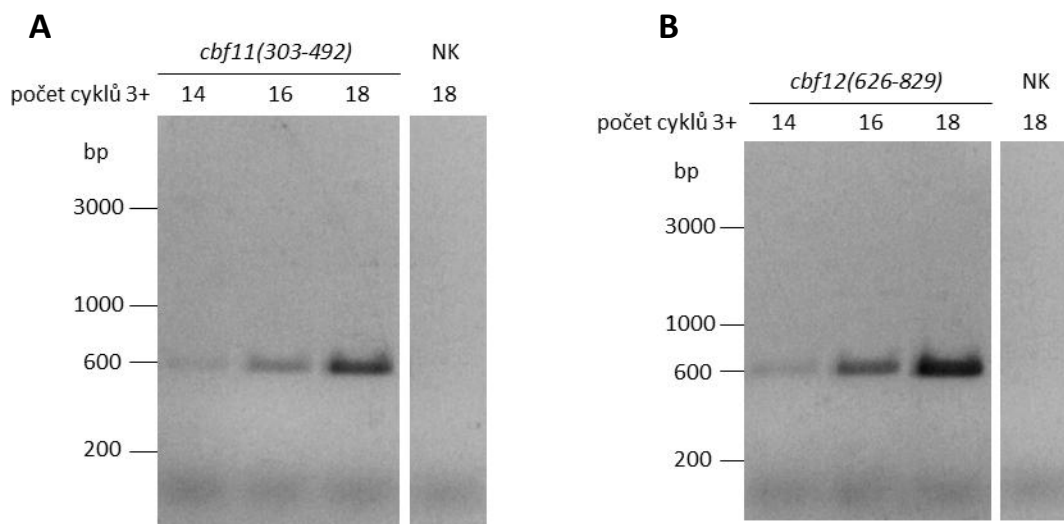
Pro expresi a purifikaci Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829) byl zvolen expresní vektor pET-15b, vyznačující se silným promotorem z fága T7, genem pro β -laktamasu a polylinkerem restričních míst pro *Nde*I, *Bam*HI a *Xho*I, umožňující vložení kódující sekvence proteinu. Rekombinantní protein exprimovaný z tohoto plasmidu je vybaven hexahistidylovou značkou (His-Tag®) na N-konci, za níž následuje aminokyselinová sekvence rozeznatelná thrombinem. His-Tag® umožňuje jednokrokovou purifikaci proteinu na nosiči Talon nebo Ni-NTA. Rekombinantní protein je vhodný k imunisaci králíka, a to i bez proteolytického štěpení thrombinem, protože His-Tag® pro králíka není ani toxický, ani imunogenní.

	225	245	265	285
Cbf12	SLC QKSYGTERRYL CPPIVLYLLGTTWLNNVTD-----NLKISAQTTLEDKDNPKFA			
Cbf11	-VI QKSYGSEKRYL CPPPMVYINGNYSSIFNQSF-----TEIS			
Lag-1	-VA QKSYGNEKRFF CPPPCIYLIQGWLKDRVAQLYKTLKASAKDAIENDPIHEQQATELV			
Su (H) M	-VA QKSYGNEKRFF CPPPCVYLMGSGWKKKKEQ-----MERDGCSEQE-SQPC			
Su (H) H	-VA QKSYGNEKRFF CPPPCVYLMGSGWKKKKEQ-----MERDGCSEQE-SQPC			
		305	325	
Cbf12	KNIFYYNADGALISPETDIAKSTYQLTNYNENTNFDSFPVWGNALLKTIYYTG--QG KNDG FGFRS			
Cbf11	IMNDFGQCSQPISE-EYT-GQ-----GC-----MIFRSLHISSLVAAKSKNLRLS			
Lag-1	AYIGIGSDTSEKQQLDFSTGKVRHPGDQRQDPNIYDY-----CAAKTLYISD--SD KRKY FDLN			
Su (H) M	AFIGIGNSDQEMQQLNLE-GK-----NY-----CTAKTLYISD--SD KRKH FMLS			
Su (H) H	AFIGIGNSDQEMQQLNLE-GK-----NY-----CTAKTLYISD--SD KRKH FMLS			
	345	365	385	405
Cbf12	TFLQLSVQSK-TKYFKLENLRLGVI SKPSQ KRALM KVSD --MSIRHGDC VCLFN RYRAQHNNAL			
Cbf11	LDMFSNVNNQLLSHLVTS--SISIV SKPSK KGSKL KISN --ITLRSGSV VSLYN RINSQTVRTK			
Lag-1	AQFFYGCME-IGGFVSQ--RIKVI SKPSK KKQSM KNTD CKYLCIASG TKVALFN RLRSQTVSTR			
Su (H) M	VKMFYGNSSD-IGVFLSK--RIKVI SKPSK KKQSL KNAD --LCIASG TKVALFN RLRSQTVSTR			
Su (H) H	VKMFYGNSSD-IGVFLSK--RIKVI SKPSK KKQSL KNAD --LCIASG TKVALFN RLRSQTVSTR			
			425	
Cbf12	FLGTSNVQRAISKVSLNMKYNSNYFPTDAPNDAEN EGAG LAMANN LWEP FYIFSV-- DEL NKGN			
Cbf11	YTSI----- EAGQ FCLRGDR WVPL RINLLLP DENG KLK			
Lag-1	YLHV----- EGNA FHASST KGAF TIHLF-- DDER GLQ			
Su (H) M	YLHV----- EGGN FHASS QWGA FYIHL-- DDDE --S			
Su (H) H	YLHV----- EGGN FHASS QWGA FFIHL-- DDDE --S			
	445	465	485	
Cbf12	NSNPDSRSKVLCSNMVII LVSKI TGVQ SP LI LKKHDNWKVLSLSSRAPSEAINCLSKLAFQ-CH			
Cbf11	VCDDVDNPEP-IKYGSIV LVDEA TGTT SD LI IRVEKDHIAEE----DGYNQMHRIVLESAY			
Lag-1	ETDNFAVRDGFVYYSVVK LVDSV TGIAL PR LI RIRKVDKQVILDASCSEEPVSQLHKCAF----			
Su (H) M	EGEFTVRDGYIHYGQTVK LVCSV TGMAL PR LI IRKVDKQTALLDA---DDPVSQ LHKCAF ----			
Su (H) H	EGEFTVRDGYIHYGQTVK LVCSV TGMAL PR LI IRKVDKQTALLDA---DDPVSQ LHKCAF ----			
	505		525	
Cbf12	ETKRFLYIDEKQSSEISFTSGE-----LEYSDPNDPTKATHSVLPWS			
Cbf11	PISNVRHLKIAEHSSLAYSNNISVRWFLGATSAQNRNASSEAILPIEWEAVGNLSSNEMTRVGDS			
Lag-1	----- Q MIDNELVYLCLSHDKI-----IQHQATAI--NEHRHQINDG			
Su (H) M	-----Y LKD TERMYLCLS QERI -----IQFQATPC PKEQ NKEMINDG			
Su (H) H	-----Y LKD TERMYLCLS QERI -----IQFQATPC PKEP NKEMINDG			
	545	565	585	
Cbf12	AM W S I IISTQSVRTMFYNEPIHQNAFHVVPSMPFVKFIRLD---ENSMFHIYGTGFANDVQ I W MAY			
Cbf11	VC W T I VGISHFDC TMM -LFPNQNPVPTVTDYPIIEE--PPEYLESSRSLQFKIGGYSVGLQ I W LGV			
Lag-1	AA W T I IISTDKAEYRFF-EAMGQVANPISP-CPVVGSLVDGHGEASRVELHGRDFKPNLKV W F G A			
Su (H) M	AS W T I IISTDKAEYTFY-EGMGPVLPVTP-VPVVESLQLNGGGDVAMLELTGQNFTPNLRV W F G D			
Su (H) H	AS W T I IISTDKAEYTFY-EGMGPVLPVTP-VPVVESLQLNGGGDVAMLELTGQNFTPNLRV W F G D			
	605	625	645	
Cbf12	T-----RCEV--KSINAFKPD T LL P DIISDSRFSSRVYACTAN L IELIC---EIPVCMFEPT			
Cbf11	HGPLSYSFTAADTSTMGT V TLGLS Q ISYD-----PS-----CAEQKYPLLFV I PG			
Lag-1	T-PVET T FRSE---ESLHCSIPPVSQVRNEQ T H M FT N RT-----TGDVEV P ISLVR D D			
Su (H) M	V-EAETMYRCG---ESMLCV V PDISAFREG---WRV V RQP-----V---QVPV T LVR N D			
Su (H) H	V-EAETMYRCG---ESMLCV V PDISAFREG---WRV V RQP-----V---QVPV T LVR N D			

Obr. 4.1. Sekvenční porovnání Cbf11 a Cbf12 s metazoálními proteiny CSL. NTD (označena zeleně) a BTD (označena červeně) se podílejí na vazbě DNA (aminokyseliny podílející se na vazbě jsou indikovány modrými trojúhelníky). Pro sekvenční srovnání byly použity háďátkové (Lag-1), myši [Su(H) M] a lidské [Su(H) H] homology. Aminokyseliny jsou číslovány podle aminokyselinové sekvence Lag-1, proložení zvýrazněné aminokyseliny jsou konzervovány.

4.2 Příprava expresních plasmidů

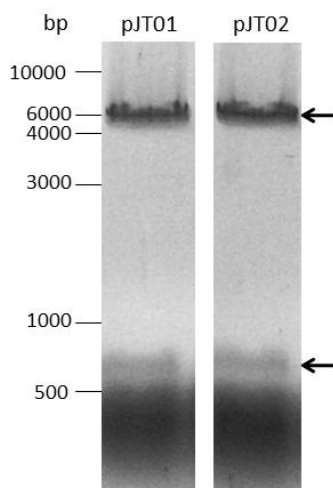
Úseky genů *cbf11(303-492)* a *cbf12(626-829)* byly amplifikovány pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) z plasmidů nesoucích gen *cbf11* a *cbf12* o plné délce (pJR05, respektive pMP35). Počet cyklů PCR potřebných pro přípravu dostatečného množství produktu a minimalisaci přítomnosti mutací byl optimalisován (Obr. 4.2).



Obr. 4.2 Agarosová elektroforesa zobrazující amplifikaci domény BTD pomocí PCR s 3 cykly při 47°C pro navázání primerů přes jejich sekvenční komplementární k templátu a 14-18 cyklů při 58°C pro navázání primerů v jejich plné délce. Primery obsahují „nástavce“ rozpoznávané endonukleasami a nejsou komplementární k sekvenci použitého templátu. **A)** Amplifikace *cbf11(303-492)* o velikosti 591 bp z plasmidu pJR05. **B)** Amplifikace *cbf12(626-829)* o velikosti 629 bp z plasmidu pMP35. Negativní kontrola (NK) neobsahovala templátovou DNA.

Pro amplifikaci fragmentů BTD pro další klonování bylo použito 16 cyklů pro navázání primerů v jejich plné délce. Pro klonování do vektoru pCR®2.1-TOPO® byly dodatečně adenylovány 3' konce produktů PCR. Přítomnost insertu v plasmidu pCR®2.1-TOPO® byla potvrzena metodou „colony PCR“ (kapitola 3.3.5). Ze třech testovaných kolonií pro *cbf11(303-492)* i *cbf12(626-829)* byly všechny pozitivní. Správnost sekvence obou konstruktů byla ověřena sekvenací DNA (viz Příloha 1). Oba konstrukty byly štěpeny dvojicí restričních endonukleas *Bam*HI a *Nde*I, a fragmenty DNA byly rozděleny pomocí agarosové elektroforesy. Fragmenty o odpovídající délce [591 bp pro *cbf11(303-492)* a 629 bp pro *cbf12(626-829)*] pak byly z agarosového gelu izolovány. Plasmid pET15-b byl získán štěpením endonukleasami *Bam*HI a *Nde*I z plasmidu pMP35. Fragmenty *cbf11(303-492)* a *cbf12(626-829)* byly ligovány s linearisovaným plasmidem pET15-b pomocí T4 DNA ligasy a touto liguací směsí byly transformovány bakterie *E. coli* DH5 α . Kolonie *E. coli* narostlé na selekčním médiu byly testovány na přítomnost insertu

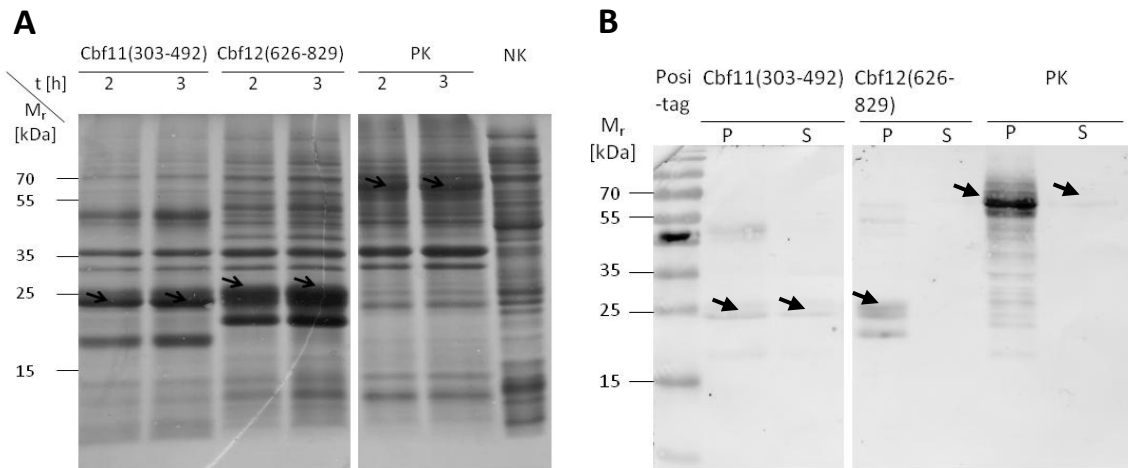
ve vektoru metodou „colony PCR“ (kapitola 3.3.5). Z pozitivních kolonií byly izolovány plasmidy a jejich identita byla ověřena štěpením endonukleasami *Bam*HI a *Nde*I (Obr. 4.3). Vzniklé plasmidy byly označeny pJT01 [insert *cbf11*(303-492)] a pJT02 [insert *cbf12*(626-829)].



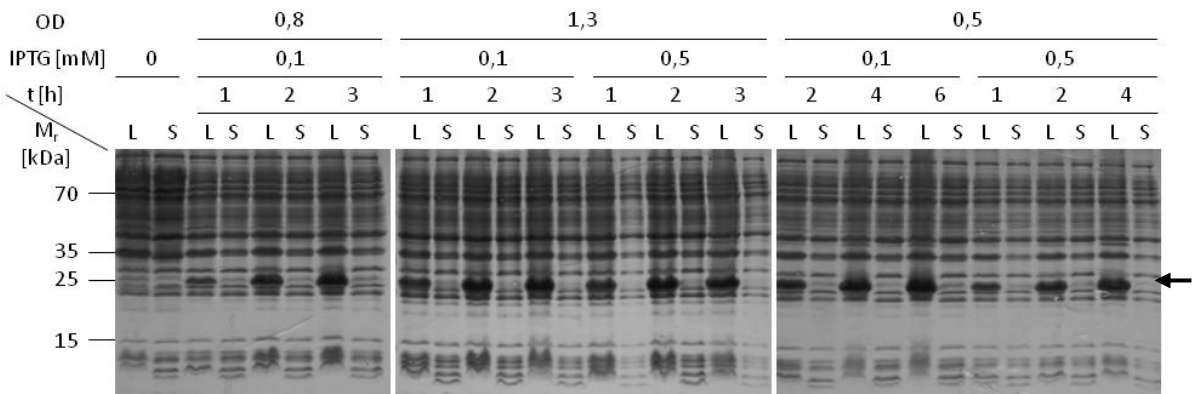
Obr. 4.3 Agarosová elektroforesa produktů restrikčního štěpení plasmidů pJT01 a pJT02. Restrikční štěpení enzymy *Bam*HI a *Nde*I probíhalo při 37°C 16 hodin. Pozorované štěpné produkty (označené šipkou) odpovídají očekávaným velikostem (pJT01: 5698 bp, 578 bp; pJT02: 5698 bp, 616 bp). Difusní signál s velikostí pod 500 bp představuje kontaminující RNA.

4.3 Exprese proteinů Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829)

Proteiny Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829) byly exprimovány v buňkách *E. coli* kmene BL21(DE3), do nichž byl plasmid pJT01, respektive pJT02, vnesen elektroporací. Produkce obou proteinů byla ověřena sledováním přítomnosti majoritního proteinu očekávané molekulové hmotnosti [23 kDa pro Cbf11(303-492) a 25 kDa pro Cbf12(626-829)] na SDS-PAGE (Obr. 4.4A, strana 48) a imunodetekcí proteinů po přenosu na nitrocelulosovou membránu pomocí protilátky anti-His·Tag® ředěné 1:1000 (Obr. 4.4B, strana 48). Pro tuto analýzu byly použity lysáty připravené sonikací buněk resuspendovaných v lisačním pufru (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0,6 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, pH 7,0). Z obr. 4.4A (strana 48) vyplývá, že prodloužení doby exprese z 2 hodin na 3 hodiny nevede k vyšší expresi sledovaných proteinů. Protein Cbf12(626-829) není při expresi v 30°C a indukci 1 mM IPTG 3 hodiny solubilní, jak je patrné z absence tohoto proteinu v solubilní frakci buněčného lysátu na obr. 4.4B (strana 48).



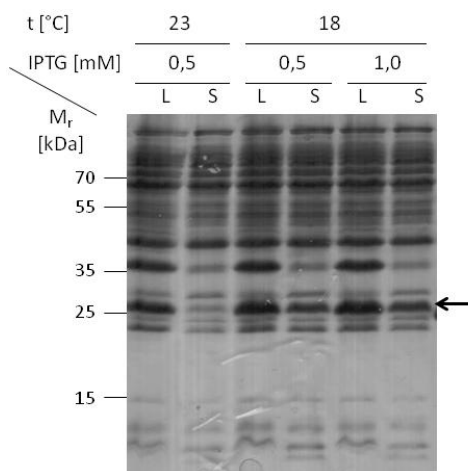
Obr. 4.4 SDS-PAGE a imunodetekce proteinů Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829) exprimovaných 2 h a 3 h v přítomnosti IPTG. Podmínky exprese: 30°C, 1 mM IPTG, indukce při OD 0,5, exprese probíhala 2 h nebo 3 h. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel. Proužky odpovídající proteinům očekávané molekulové hmotnosti jsou označeny šipkou. **A)** SDS-PAGE nesolubilních frakcí buněčných lysátů. Positivní kontrolou (PK) byl buněčný lysát z buněk exprimující Cbf11 s polyhistidylovou značkou (69 kDa, exprese dříve ověřena v naší laboratoři). Negativní kontrolou (NK) byl buněčný lysát z buněk nesoucích vektor pCR®2.1-TOPO®. **B)** Imunodetekce proteinů Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829) pomocí protilátky anti-His-Tag®. Exprese probíhala 3 h. Positivní kontrolou (PK) byl protein Cbf11 s polyhistidylovou značkou (69 kDa) a komerční protein obsahující His-Tag (Positag). Z porovnání intenzity signálu v nerozpustné frakci buněčného lysátu (P) a v rozpustné frakci buněčného lysátu (S) lze usuzovat na míru rozpustnosti produkovaného proteinu.



Obr. 4.5 Optimalisace optické hustoty buněčné kultury při indukci, koncentrace induktoru a času indukce pro expresi Cbf12(626-829) sledovaná pomocí SDS-PAGE. Exprese Cbf12(626-829) byla indukována při OD 0,5, 0,8 a 1,3 pomocí 0,1 a 0,5 mM IPTG; probíhala 1-6 hodin při 23°C. Poměr signálu v celkovém buněčném lysátu (L) a solubilní frakci buněčného lysátu (S) charakterizuje rozpustnost produkovaného proteinu. Proteinový produkt o očekávané molekulové hmotnosti 25 kDa je označen šipkou. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel.

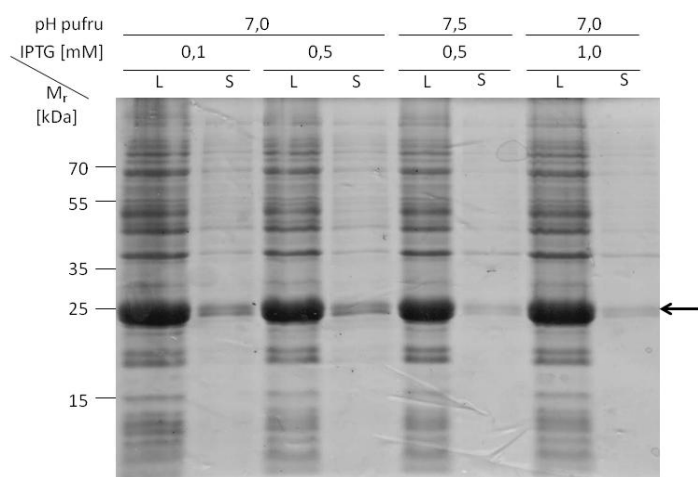
Z literatury je známo, že tvorba inkluzních tělísek je potlačena expresí proteinu při snížené teplotě [35,42,44]. Z toho důvodu byla exprese solubilního proteinu Cbf12(626-829) rovněž prováděna při 23°C s indukcí 1-6 hodin při různém množství buněk v buněčné kultuře (optická hustota) a různé koncentraci induktoru IPTG. Míra exprese celkového

proteinu vzrůstá s delší dobou exprese (Obr. 4.5, strana 48), ale žádná z testovaných podmínek není vhodná pro získání dostatečného výtěžku solubilního proteinu Cbf12(626-829) k jeho efektivní purifikaci. Snížením teploty exprese na 18°C s koncentrací IPTG 0,5 mM i 1 mM bylo dosaženo pozorovatelného zvýšení výtěžku solubilního proteinu Cbf12(626-829) v porovnání s expresí při 23°C (Obr. 4.6).

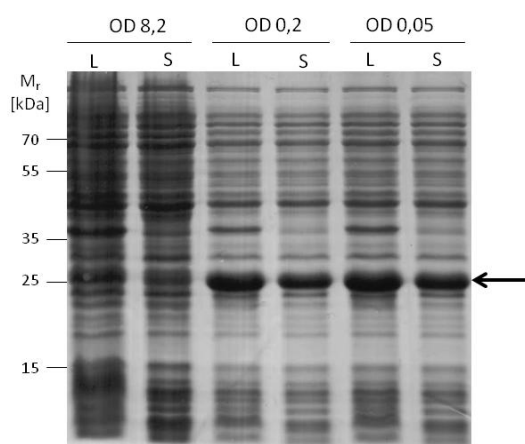


Obr. 4.6 Expresa Cbf12(626-829) při teplotě 18°C a 23°C analysována pomocí SDS-PAGE. Expresa byla indukována při OD 0,5 pomocí 0,5 mM a 1 mM IPTG. Expresa probíhala 3h v 23°C a 6 h v 18°C. Poměr signálu v celkovém buněčném lysátu (L) a solubilní frakci buněčného lysátu (S) charakterizuje rozpustnost produkovaného proteinu. Protein Cbf12(626-829) o očekávané molekulové hmotnosti 25 kDa je označen šipkou. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel.

Podmínky exprese solubilního proteinu Cbf11(303-492) v dostatečném množství pro imunisasi dvou králíků (1 mg) byly optimalisovány testováním různých koncentrací transkripčního induktoru IPTG a pH lisačního pufru (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 3 mM β -merkapt ethanol, 5% glycerol) při teplotě exprese 23°C. Hladina exprese a míra rozpustnosti proteinu Cbf11(303-492) byly analysovány pomocí SDS-PAGE. Produkovaný protein patří mezi majoritní proteiny celkového lysátu i solubilní frakce za všech sledovaných podmínek (Obr. 4.7, strana 50). Vzhledem k nedostatečné lysi buněk, a proto i malému množství celkového proteinu naneseného na polyakrylamidový gel, není možné zhodnotit ani vliv pH lisačního pufru, ani vliv koncentrace induktoru na solubilitu proteinu Cbf11(303-492). Nicméně je možné uzavřít, že indukce při 23°C je vhodná pro získání solubilního proteinu Cbf11(303-492) v dostatečném množství pro jeho následnou purifikaci.



Obr. 4.7 Optimalisace koncentrace induktoru a pH lysačního pufru pro expresi Cbf11(303-492) sledovaná pomocí SDS-PAGE. Podmínky exprese: 23°C, indukce při OD 0,5 pomocí 0,1 mM, 0,5 mM a 1 mM IPTG, exprese probíhala 9 hodin. Buněčné lysáty byly připraveny v lysačním pufru o pH 7,0 a 7,5. Poměr intenzity signálu odpovídající rekombinantnímu proteinu v celkovém buněčném lysátu (L) a solubilní frakci buněčného lysátu (S) popisuje rozpustnost produkovaného proteinu. Malé množství proteinu v solubilní frakci buněčného lysátu je pravděpodobně způsobeno nedostatečnou lýsí buněk. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel.



Obr. 4.8 Exprese Cbf11(303-492) v buněčné kultuře ředěné z inokula kultury s různou koncentrací buněk sledovaná prostřednictvím SDS-PAGE. Podmínky exprese: 23°C, 0,5 mM IPTG, indukce při OD 0,5, doba indukce byla 3 h. OD inokula pro expresní kulturu byla 8,2, 0,2 a 0,05. Poměr signálu v celkovém buněčném lysátu (L) a solubilní frakci buněčného lysátu (S) charakterizuje rozpustnost produkovaného proteinu. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel.

V některých experimentech, které byly použity pro optimalisaci produkce Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829), byla pozorována velmi nízká hladina exprese proteinu a zhoršený růst buněk po ředění inokula do finálního objemu média. Proto byla dále porovnávána produkce proteinu Cbf11(303-492) v buněčných kulturách získaných ředěním inokul o různé koncentraci buněk. Expresní kultury byly připraveny ředěním inokul s koncentrací buněk odpovídající OD 8,2, 0,2 a 0,05 čerstvým médiem s antibiotikem na finální objem

15 ml a OD 0,05. Buňky byly inkubovány do OD 0,5 a indukovány při 23°C 0,5 mM IPTG po dobu 3 hodin. Fenomén snížené exprese proteinu Cbf11(303-492) byl reprodukován, pokud bylo inokulum přes noc inkubováno do vysoké buněčné koncentrace (Obr. 4.8, strana 50), přičemž buněčná kultura vykazovala také zpomalený růst. Vysoké exprese bylo dosaženo, pokud použité inokulum nedosáhlo stacionární fáze růstu. O možných příčinách tohoto jevu bude pojednáno v kapitole 5, diskusní části této práce.

4.4 Optimalisace purifikace proteinu Cbf11(303-492)

Protein Cbf11(303-492) byl exprimován z plasmidu pJT01 v expresním kmeni *E. coli* BL21(DE3). Sterilní LB médium se 100 µg/ml ampicilinu o objemu 25 ml bylo inokulováno z čerstvě narostlé monokolonie. Buňky byly inkubovány přes noc při 32°C tak, aby optická hustota kultury do rána nepřesáhla hodnotu 1,0. Ráno byla kultura ředěna LB médiem se 100 µg/ml ampicilinu a 0,2% glukosou na celkový objem 400 ml v dvoulitrových Erlenmayerových baňkách. Kultura byla inkubována do dosažení koncentrace buněk v kultuře odpovídající OD 0,5 při 37°C a 150 rpm. Exprese proteinu byla indukována 0,5 mM IPTG po dobu 3 hodin při 23°C (OD při „sklizení“ buněk byla 1,7). Takto připravené buňky byly použity k purifikaci proteinu Cbf11(303-492). Pro purifikaci proteinu byla použita technika založená na chelataci kobaltnatých iontů imobilisovaných na nosiči Talon Superflow hexahistidylovou značkou proteinu.

4.4.1 Purifikace proteinu Cbf11(303-492) ve vsádkovém uspořádání

Ve vsádkovém uspořádání byl testován vliv pH promývacího pufru 7,0 resp. 7,4 na množství a čistotu eluovaného proteinu Cbf11(303-492). Buněčný lysát byl připraven resuspendováním buněk odpovídajících 100 ml kultury (příprava buněk viz kapitola 4.4) v 2,5 ml lysačního pufru (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 7,0) a jejich lysis v homogenizátoru French Press Cell Disruptor. Solubilní frakce lysátu byla získána centrifugací (20 000 g, 20 min, 4°C) a rozdělena na dvě části, které byly použity pro souběžné experimenty lišící se promývacími kroky (označené jako experiment A a B). V experimentech bylo použito 100 µl nosiče Talon a 750 µl solubilní frakce lysátu. Lysát byl inkubován s nosičem po dobu 30 minut.

- Experiment A
- Promytí 1 (W1) - 20 CV (ekvivalentů objemu purifikačního nosiče) lysačního pufru, pH 7,0
 - Promytí 2 (W2) - 5 CV lysačního pufru s 50 mM imidazolem, pH 7,0
 - Promytí 3 (W3) - 5 CV lysačního pufru s 50 mM imidazolem, pH 7,0

Promytí 4 (W4) - 5 CV lysačního pufru se 70 mM imidazolem, pH 7,0

Eluce 1 (E1) - 5 CV lysačního pufru s 200 mM imidazolem, pH 7,0

Eluce 2 (E2) - 5 CV lysačního pufru s 200 mM imidazolem, pH 7,0

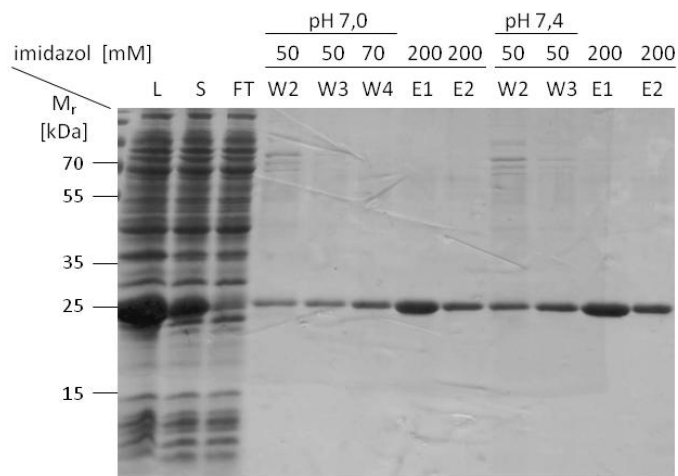
Experiment B Promytí 1 (W1) - 20 CV lysačního pufru, pH 7,0

Promytí 2 (W2) - 5 CV lysačního pufru s 50 mM imidazolem, pH 7,4

Promytí 3 (W3) - 5 CV lysačního pufru s 50 mM imidazolem, pH 7,4

Eluce 1 (E1) - 5 CV lysačního pufru s 200 mM imidazolem, pH 7,0

Eluce 2 (E2) - 5 CV lysačního pufru s 200 mM imidazolem, pH 7,0



Obr. 4.9 Purifikace Cbf11(303-492) ve vsádkovém uspořádání sledovaná pomocí SDS-PAGE.

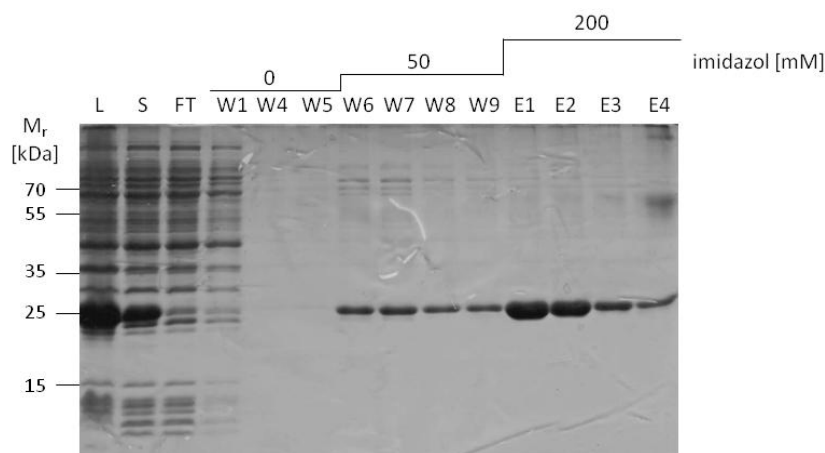
Eluce proteinů nespecificky navázaných na nosič byla prováděna v pufru o pH 7,0 a 7,4. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel. Na gel bylo naneseno 0,4 % množství solubilní frakce lysátu použitého pro purifikaci a 1 % získaných supernatantů. L - celkový lysát, S - solubilní frakce lysátu, FT - supernatant po inkubaci solubilní frakce lysátu s nosičem Talon, W2-W4 – supernatant po opakovaném promytí lysačním pufrům s 50-70 mM imidazolem, E1-E2 - supernatant po promytí lysačním pufrům s 200 mM imidazolem

Z pozorovaných výsledků vyplývá (Obr. 4.9), že použitím obou postupů dochází k získání proteinu s porovnatelnou čistotou, ale je patrné, že použití pufru o pH 7,4 vede k větším ztrátám značeného proteinu Cbf11(303-492) během promývání. Pro další purifikace byl tedy používán promývací pufr o pH 7,0.

4.4.2 Purifikace proteinu Cbf11(303-492) chromatografií na nosiči Talon

V dalším experimentu byla testována efektivita purifikace proteinu Cbf11(303-492) pomocí chromatografie. Buněčný lysát byl připraven resuspendováním buněk odpovídajících 100 ml kultury (příprava buněk viz kapitola 4.4) v 2,5 ml lysačního pufru (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 7,0) a následnou lysis v homogenizátoru French Press Cell Disruptor. Solubilní frakce lysátu byla získána centrifugací (20 000 g,

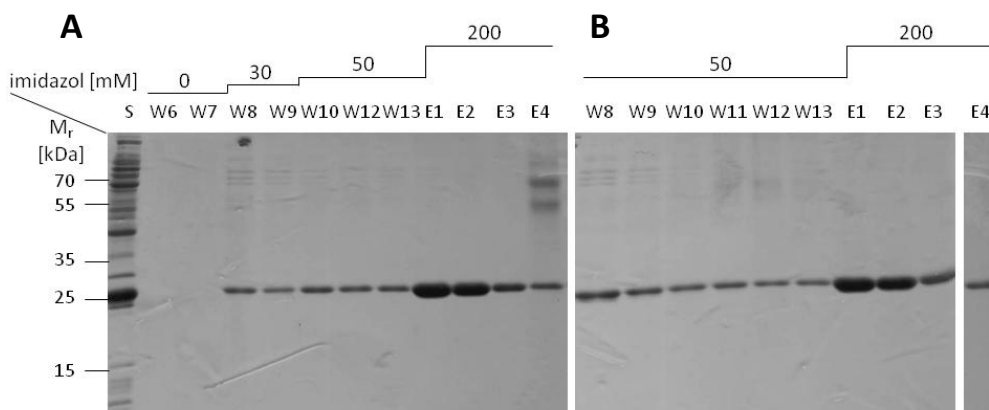
20 min, 4°C) a poté byla inkubována s 200 µl nosiče Talon 30 minut. Nosič byl promyt 25 CV lysačního pufru a 10 CV promývacího pufru (lysační pufr s 50 mM imidazolem). Protein Cbf11(303-492) s hexahistidylovou značkou byl z nosiče eluován přidáním 10 CV elučního pufru (lysační pufr 200 mM imidazolem). Výsledky naznačují, že purifikace pomocí chromatografie (Obr. 4.10) nezlepšuje čistotu získaného proteinu Cbf11(303-492) v porovnání s purifikací ve vsádkovém uspořádání (Obr. 4.9, strana 52).



Obr. 4.10 Purifikace Cbf11(303-492) pomocí chromatografie sledovaná prostřednictvím SDS-PAGE. Eluce nespecificky navázaných proteinů byla prováděna v pufru o pH 7,0. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel. Na gel bylo naneseno 0,15 % množství solubilní frakce lysátu použitého pro purifikaci, 0,5 % získaných frakcí W1-W5 a 1 % získaných frakcí W6-W9 a E1-E4. L - celkový lysát, S - solubilní frakce lysátu, FT - frakce proteklá kolonou s nosičem Talon po inkubaci solubilní frakce lysátu s tímto nosičem, W1-W5 - frakce proteklá kolonou po promytí lysačním pufrům, W6-W9 frakce proteklá kolonou po promytí nosiče promývacím pufrům s 50 mM imidazolem, E1-E4 - frakce proteklá kolonou po promytí lysačním pufrům s 200 mM imidazolem

V dalším experimentu byla hledána optimální koncentrace imidazolu v promývacím pufru, přičemž pro zvýšení specifity vazby značeného proteinu na nosič byla navíc zvýšena iontová síla používaných pufrů a do všech pufrů byl přidán neiontový detergent. Buněčný lysát byl připraven resuspendováním buněk odpovídajících 200 ml kultury (příprava buněk viz kapitola 4.4) v 5 ml lysačního pufru (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 0,5% Igepal® CA-630 (v/v), pH 7,0) a následnou lysis v homogenizátoru French Press Cell Disruptor. Solubilní frakce lysátu byla získána centrifugací (20 000 g, 20 min, 4°C) a rovnoměrně rozdělena do dvou paralelních experimentů. Solubilní frakce lysátu byly inkubovány s 200 µl nosiče Talon po dobu 30 minut. Po inkubaci byly nosiče s lysáty přelity do chromatografických kolon a nosiče byly promyty 35 CV lysačního pufru. V souběžných experimentech byl sledován vliv snížení koncentrace imidazolu

v promývacím pufru z 50 mM na 30 mM na míru eluce Cbf11(303-492) a proteinů nespecificky navázaných na nosič Talon.



Obr. 4.11 Purifikace Cbf11(303-492) pomocí chromatografie s promývacími kroky o různé stringenci sledovaná pomocí SDS-PAGE. Nosič Talon byl inkubován se solubilní frakcí buněčného lysátu (S). Na gel bylo naneseno 0,15 % množství S použitého pro purifikaci, 0,5 % získaných frakcí W1-W9 a 1 % získaných frakcí W10-W13 a E1-E4. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel. **A)** Eluce proteinů nespecificky navázaných na nosič Talon lisačným pufrům se zvyšující se koncentrací imidazolu: 0, 30 mM a 50 mM. Protein Cbf11(303-492) byl eluován lisačným pufrům s 200 mM imidazolem. **B)** Eluce proteinů nespecificky navázaných na nosič Talon lisačným pufrům se zvyšující se koncentrací imidazolu: 0 (W6 a W7 na Obr. A) a 50 mM. Protein Cbf11(303-492) byl eluován lisačným pufrům s 200 mM imidazolem.

V experimentu A (Obr. 4.11A) byly nespecificky navázané proteiny eluovány 10 CV promývacího pufru 1 (lysační pufr s 30 mM imidazolem), 10 CV promývacího pufru 2 (lysační pufr s 50 mM imidazolem) a Cbf11(303-492) byl eluován přidáním 10 CV elučního pufru (lysační pufr s 200 mM imidazolem). V experimentu B (Obr. 4.11B) byly nespecificky navázané proteiny eluovány 20 CV promývacího pufru 2 a protein Cbf11(303-492) byl eluován přidáním 10 CV elučního pufru. Promývání pufrům se sníženou koncentrací imidazolu z 50 mM na 30 mM nezvyšuje pozorovatelně výtěžek proteinu a nesnižuje ani jeho čistotu. Ve frakci E4 získané v experimentu A (Obr. 4.11A) byly po obarvení proteinů v polyakrylamidovém gelu pozorovány kontaminanty.

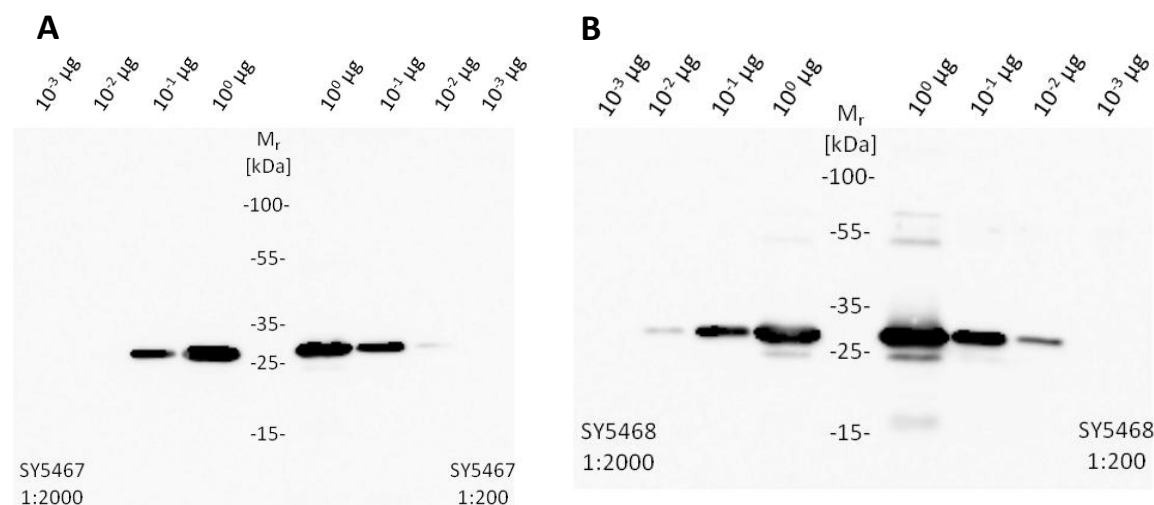
4.5 Příprava imunogenu

Pro přípravu imunogenu byly použity frakce proteinu Cbf11(303-492) s hexahistidylovou značkou získané isolačními postupy uvedenými v kapitole 4.4, které vykazují dostatečnou čistotu proteinu. Konkrétně šlo o všechny frakce eluované z nosiče ve vsádkovém uspořádání (kapitola 4.4.1), frakce E1 a E2 eluované z chromatografické kolony v experimentu bez detergentu (Obr. 4.10, strana 53) a frakce E1-E3 eluované z chromatografické kolony v experimentu A i B s detergentem (Obr. 4.11). Tyto frakce

byly spojeny do jednoho vzorku, který byl „odsolen“ převedením do pufru bez detergentu a imidazolu (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 5% glycerol, pH 7,0) pomocí centrifugačních filtračních jednotek Amicon® Ultra – 4 Ultracel® NWML 10000. Koncentrace detergentu a imidazolu ve vzorku purifikovaného proteinu Cbf11(303-492) se tímto procesem dostala pod hodnotu 2 % jejich původní koncentrace. Část proteinu Cbf11(303-492) se během ultrafiltrace vysrážela a musela být odstraněna. Protein byl koncentrován na objem 1,5 ml o koncentraci 1 mg/ml (kapitola 4.4.5), zmražen v tekutém dusíku a skladován při -80°C. Takto připravený protein (1 mg) byl odeslán ke komerční přípravě králičí polyklonální protilátky (Eurogentec, Belgie; protokol AS-SUPR-ANTIGEN, Rabbit - Speedy 28 days - Your antigen – Pab production - 2 animals).

4.6 Testování králičího polyklonálního séra anti-Cbf11

Citlivost a specifita polyklonální protilátky v krevním séru izolovaného ze dvou králíků (SY5467 a SY5468) imunisovaných proteinem Cbf11(303-492) s hexahistidylovou značkou byla testována imunodetekcí imunogenu nebo proteinů buněčného lysátu *S. pombe* imobilisovaných na nitrocelulosové membráně po rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE.

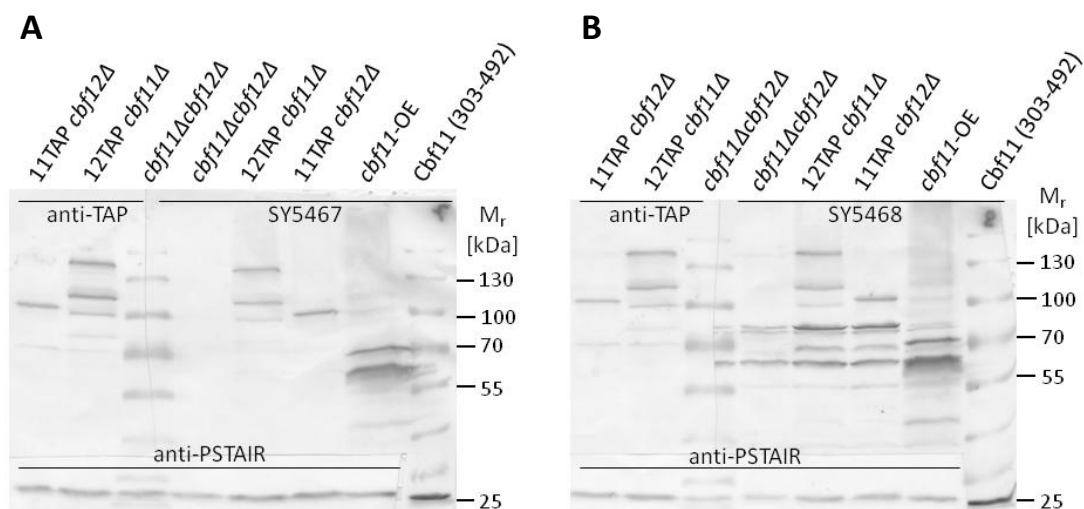


Obr. 4.12 Imunodetekce Cbf11(303-492) protilátkami v králičím séru. Polyklonální sérum bylo ředěno 1:200 a 1:2000 v 3% mléku v TTBS. Jako sekundární protilátka byla použita GAR-HRP. Imunogen byl ředěn desítkovou řadou od 1 µg do 1 ng. Pro separaci proteinů byl použit 12% polyakrylamidový gel. **A)** Imunodetekce sérem SY5467. **B)** Imunodetekce sérem SY5468.

Pro ověření kvality dodaných králičích krevních sér byla sledována vazba protilátek v séru na imunogen Cbf11(303-492) ředěný desítkovou řadou. Po inkubaci nitrocelulosové membrány s navázaným imunogenem s primární protilátkou (sérum) ředěnou 1:200 a 1:2000 byla membrána inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou

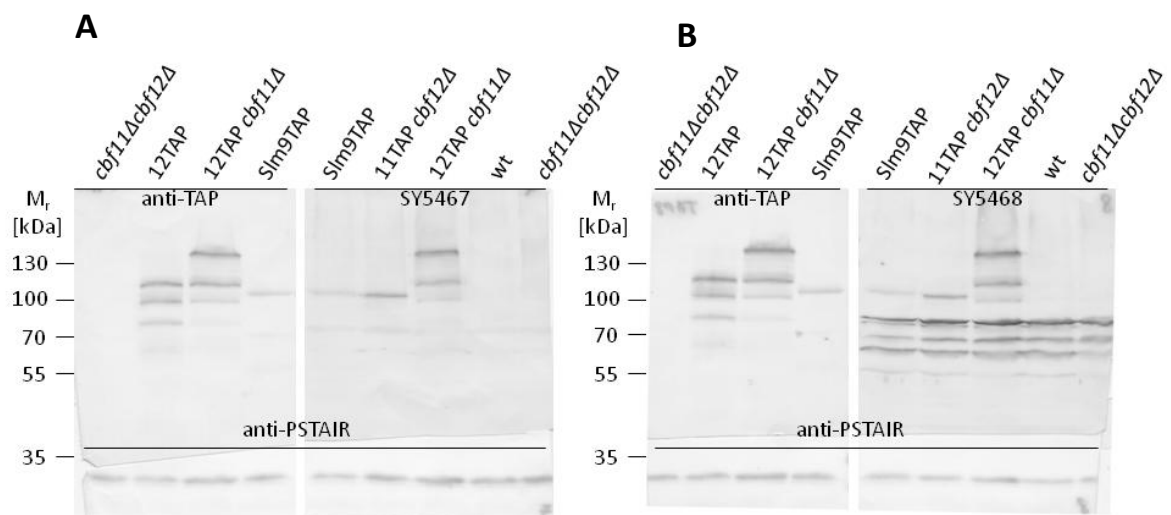
peroxidasou. Z obr. 4.12 (strana 55) vyplývá, že obě séra detekují téměř výhradně protein o molekulové hmotnosti přibližně 25 kDa, odpovídající imunogenu Cbf11(303-492). Sérum SY5467 detekuje minimálně 10 ng imunogenu při ředění 1:200 a 100 ng při ředění 1:2000; sérum SY5468 detekuje minimálně 10 ng imunogenu při obou ředění séra.

Cílem dalšího experimentu bylo zjistit interakci těchto protilátek s endogenním proteinem Cbf11 a jejich případnou křížovou reakcí s proteinem Cbf12. Přítomnost proteinů Cbf11 a Cbf12 v nativních lysátech *S. pombe* byla sledována imunodetekcí proteinů imobilisovaných na nitrocelulosové membráně po SDS-PAGE připraveným polyklonálním králíčím sérem. Integrita proteinů byla ověřena obarvením proteinů na polyakrylamidovém gelu po elektropřenosu proteinů na nitrocelulosovou membránu (výsledek není presentován). Pro identifikaci proužků odpovídajících proteinům Cbf11 a Cbf12 byly použity kmeny s delecí jednoho z paralogů a se značením druhého paralogu proteinů CSL pomocí značky TAP. Přítomnost proteinů CSL se značkou TAP (*11TAPcbf12Δ*, *12TAPcbf11Δ*) byla sledována vazbou protilátky anti-TAP ředěnou 1:1000 a séry ředěnými 1:200.



Obr. 4.13 Imunodetekce proteinů Cbf11 a Cbf12 se značkou TAP v buněčných lysátech *S. pombe*. Proužky odpovídající proteinům Cbf11 a Cbf12 byly identifikovány pomocí jejich značení proteinem TAP. Takto značené proteiny (100 kDa, respektive 142 kDa), byly detekovány protilátkou anti-TAP i sérem. Neznačený protein Cbf11 (*cbf11OE*) o molekulové hmotnosti 67 kDa byl detekován v lysátu z kmene produkujícího tento protein ve vysokých koncentracích. Imunogen Cbf11(303-492) byl použit jako pozitivní kontrola. Negativní kontrola (*cbf11Δcbf12Δ*) byla pro detekci protilátkou anti-TAP nanášena na gel spolu se standardem molekulových hmotností. Protilátka anti-PSTAIR rozpoznávající Cdk2 byla použita jako kontrola nanášky. Pro separaci proteinů byl použit 7,5% polyakrylamidový gel. Ředění primárních protilátek: 1:200 SY5467 a SY5468, 1:1000 anti-TAP, 1:10000 anti-PSTAIR. Sekundární protilátky GAR-AP a GAM-AP byly použity dle primární protilátky. **A)** Imunodetekce sérem SY5467. **B)** Imunodetekce sérem SY5468.

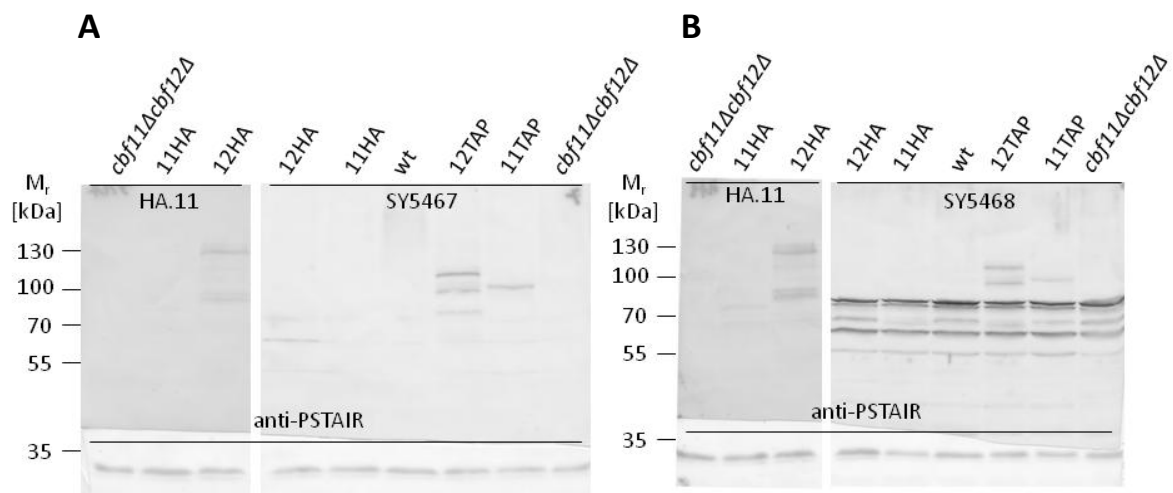
Z obr. 4.13 (strana 56) je patrné, že sérum SY5467 i SY5468 detekuje oba paralogy proteinů CSL navzdory tomu, že imunogenem byl fragment proteinu Cbf11. Obě séra rozeznávají také neznačený protein Cbf11 (67 kDa) produkovaný z plasmidu se středně silným promotorem genu *nmt1* (*cbf11-OE*). Proteiny CSL v nativním lysátu *S. pombe* jsou sérem SY5467 rozpoznávány specificky (viz porovnání s negativní kontrolou *cbf11Δcbf12Δ*, Obr 4.13, strana 56). Více polypeptidů detekovaných v lysátu obsahujícím protein Cbf12 se značkou TAP (*12TAPcbf11Δ*) je pravděpodobně způsobeno přítomností několika isoform nebo degradačních produktů tohoto proteinu [30,31]. Ve vzorku lysátu buněk produkujících protein Cbf11 (*cbf11-OE*) je sérem rozpoznáváno několik dalších proteinů. Proužek odpovídající proteinu o molekulové hmotnosti přibližně 60 kDa by mohl odpovídat potenciálnímu štěpnému produktu proteinu Cbf11 a difusní proužek odpovídající proteinům s molekulovou hmotností vyšší než 100 kDa je pravděpodobně způsoben nedostatečnou redukcí proteinového vzorku.



Obr. 4.14 Porovnání imunodetekce endogenních a značených proteinů CSL v nativních lysátech *S. pombe*. Protilátka anti-PSTAIR rozpoznávající Cdk2 byla použita jako kontrola nanásky vzorků. Pro separaci proteinů byl použit 7,5% polyakrylamidový gel. Ředění primárních protilátek: 1:200 SY5467 a SY5468, 1:1000 anti-TAP, 1:10000 anti-PSTAIR. Sekundární protilátky GAR-AP a GAM-AP byly použity dle primární protilátky. **A)** Imunodetekce sérem SY5467. **B)** Imunodetekce sérem SY5468.

Endogenní proteiny Cbf11 a Cbf12 nebyly v solubilní frakci buněčného lysátu divokého kmene kvasinky *S. pombe* po denuraci prostřednictvím SDS-PAGE připraveným sérem detekovány (Obr. 4.14, Obr. 4.15, strana 58). Endogenní proteiny nebyly detekovány navzdory tomu, že proteiny CSL se značkou TAP detekovány byly. Ty by se ale měly v buňkách vyskytovat v koncentracích blízkých neznačeným proteinům, jak bylo vyvozeno na základě fenotypisace [30]. Proto bylo testováno, zda přítomnost značky TAP není

příčinou detekce proteinů CSL na nitroceluloseové membráně. Postupováno bylo tak, že byla detekována vazba připraveného séra na nepříbuzný protein se značkou TAP a proteiny Cbf11 a Cbf12 s jinou značkou. Bylo zjištěno, že protilátky v séru SY5467 i SY5468 vážou také sekvenčně nepříbuzný protein Slm9 se značkou TAP (Obr. 4.14, strana 57), ale zároveň nedetekují proteiny Cbf11 (70 kDa, 11HA) a Cbf12 (111 kDa, 12HA) značené hemaglutininem (Obr. 4.15). Proteiny CSL s hemaglutininovou značkou jsou však rovněž velmi slabě detekovány komerční protilátkou proti této značce (Obr. 4.15), což naznačuje malé množství proteinů CSL v buňce. Dále jsme zjistili, že protein Cbf12 o plné délce se značkou TAP (142 kDa) je sérem i protilátkou anti-TAP detekován pouze u kmene s deletovaným genem jeho paraloga, přičemž za přítomnosti obou paralogů v buňce jsou pozorovány pouze fragmenty proteinu Cbf12 se značkou TAP. U proteinu Cbf12 značeném hemaglutininem k tomuto jevu nedochází (Obr. 4.14, strana 57, Obr. 4.15).



Obr. 4.15 Porovnání imunodetekce endogenních proteinů CSL a proteinů CSL fuzovaných se značkou HA a TAP v nativních lysátech *S. pombe*. Protilátka anti-PSTAIR rozpoznávající Cdk2 byla použita jako kontrola nanášky vzorků. Pro separaci proteinů byl použit 7,5% polyakrylamidový gel. Ředění primárních protilátek: 1:200 SY5467 a SY5468, 1:1000 HA.11, 1:10000 anti-PSTAIR. Sekundární protilátky GAR-AP a GAM-AP byly použity dle primární protilátky. **A)** Imunodetekce sérem SY5467. **B)** Imunodetekce sérem SY5468.

5 Diskuse

Proteiny rodiny CSL jsou transkripční faktory hrající klíčovou roli ve vývoji metazoálních organismů jako součást signální dráhy Notch [3,4], ale i nezávisle na této dráze [17,18,63]. U jednobuněčného modelového organismu *Schizosaccharomyces pombe*, u něhož není signální dráha Notch přítomna, byly objeveny dva paralogy proteinů CSL, Cbf11 a Cbf12, které se účastní regulace koordinace jaderného a buněčného dělení, buněčné adheze a udržování integrity chromosomů [29,30]. Studium proteinů kvasinky *S. pombe* je kvůli nedostupnosti komerčních protilátek proti tomuto organismu závislé na značení studovaných proteinů nebo přípravě vlastní protilátky. Pro studium endogenních proteinů CSL bylo připraveno několik C-terminálně značených proteinů CSL získaných homologní rekombinací v chromosomálním lokusu. V buňkách produkujících takto značené proteiny byl ale minimálně pro jeden ze zkoumaných paralogů pozorován fenotyp alespoň částečně se lišící od divokého typu. Protilátka, která specificky rozpoznává endogenní proteiny Cbf11 a Cbf12, by umožňovala sledování množství těchto proteinů v buňce v přirozeném stavu. Tato práce popisuje první důležitý krok k získání protilátky specifické pro proteiny Cbf11 a Cbf12.

Centrální doména „beta-trefoil“ (BTD) proteinů Cbf11 a Cbf12 byla exprimovaná z plasmidu pET15-b pro přípravu hexahistidylovaného imunogenu v *Escherichia coli* BL21(DE3). Ukázalo se, že exprese proteinů Cbf11 a Cbf12 není pro buňky toxická, nicméně pro získání solublních proteinů byla snížena teplota exprese. Agregace proteinů je totiž při snížené teplotě potlačena kvůli závislosti stability hydrofóbních interakcí, nutných pro vznik agregovaných proteinů, na teplotě [42].

Během exprese proteinu Cbf11(303-492) bylo pozorováno, že v buněčné kultuře BL21(DE3) obsahující plasmid pJT01 typu pET nedochází k expresi proteinu, pokud inokulum dosáhlo vysoké koncentrace buněk v kultuře. U expresních systémů *E. coli* využívajících T7 promotor bylo popsáno, že dlouhou kultivací buněk dochází k mutacím genu pro T7 RNA polymerasu v genomu bakterie, a tak i k poškození T7 RNA polymerasy a snížení hladiny exprese genů kódovaných vektorem pET [64]. Po ředění buněčné kultury BL21(DE3) s plasmidem pJT01 inkubované přes noc byl také pozorován zpomalený růst v selektivním médiu obsahujícím ampicilin, což by ukazovalo na možnou ztrátu plasmidu ve stacionární fazi růstu buněčné kultury. Jak je známo, ampicilin je degradován β -laktamasou, která je sekretována buňkami s příslušným genem pro resistenci, do živného

média. V kultuře ve stacionární fazi růstu tak dochází k hydrolyse ampicilinu a ztrátě selekčního tlaku v médiu [65]. Je tedy důležité, aby byly buňky BL21(DE3) před expresí čerstvě transformovány expresním plasmidem a nebyly inkubovány až do stacionární faze. Basální exprese proteinu kódovaného plasmidem v buňkách BL21(DE3) v nepřítomnosti induktoru může také způsobovat indukci profágu λ (DE3), a tak i lysi buněk [39].

Protein Cbf11(303-492) byl purifikován na nosiči Talon chelatací kobaltnatých iontů hexahistidylovou značkou proteinu. Cílem purifikace bylo získat nativní imunogen Cbf11(303-492) obsahující co nejméně kontaminujících proteinů, které často vyvolávají u imunisovaného zvířete i v malé koncentraci silnou imunitní odpověď [55]. Purifikace tohoto typu je ovlivněna vlastnostmi pufrů používaných k promývání nosiče a eluci proteinu (např. pH, iontová síla, přítomnost detergentu), ale také poměrem koncentrace lysátu a množství chelatační matrice nebo podílem cílového proteinu v lysátu. Nejvyšší čistoty purifikovaného proteinu Cbf11(303-492) bylo dosaženo přidáním neiontového detergentu (Igepal® CA-630) a zvýšením koncentrace chloridu sodného ve všech pufrech potřebných pro purifikaci proteinu. Těmito látkami by měla být snížena nespecifická hydrofóbní, respektive iontová vazba kontaminujících proteinů na purifikační nosič. Zvýšení pH pufru ze 7,0 na 7,4 pro eluci proteinů nespecificky navázaných na nosič Talon by mělo mít za následek zvýšení vazby značených proteinů, ale snížení její selektivity. V pH nižším než 7,0 dochází totiž k deprotonaci imidazolů ($pK_A \sim 6$) histidylové značky a rozrušení koordinační vazby s kobaltnatými ionty [66]. Při purifikaci proteinu Cbf11(303-492) nebylo snížení selektivity vazby změnou pH pufru pozorováno, ale zvýšením pH promývacího pufru na 7,4 dochází k nežádoucí eluci značeného proteinu Cbf11(303-492) ve větší míře než při pH 7,0. Je možné, že očekávané zvýšení vazby hexahistidylovaného proteinu Cbf11(303-492) na nosič Talon nebylo pozorováno, protože pufr o pH zvýšeném na 7,4 byl použit pouze pro promytí nosiče a nikoliv pro navázání proteinů na nosič. Vzhledem k dosažení potřebného množství proteinu Cbf11(303-492) o vysoké čistotě nutné pro imunisaci králíků, další parametry ovlivňující purifikaci proteinu již nebyly testovány.

Vzhledem k tomu, že bakteriální proteiny kontaminující purifikovaný protein vyvolávají u imunisovaného organismu většinou silnější imunitní odpověď než studované eukaryotické proteiny, připravená polyklonální protilátka často obsahuje velkou část protilátek proti kontaminujícím proteinům. Připravená polyklonální protilátka

v purifikovaném imunogenu imobilisovaném na nitrocelulosoové membráně po SDS-PAGE detekuje specificky protein o velikosti odpovídající Cbf11(303-492), takže je možné usoudit, že purifikovaný protein byl velmi čistý, případně neobsahoval proteiny silně imunogenní pro králíka. Metodou imunodetekce proteinů imobilisovaných na nitrocelulosoové membráně jsou polyklonální králičí séra v ředění 1:2000 schopné rozpoznávat 10 ng imunogenu Cbf11(303-492) v případě jednoho a 100 ng v případě druhého připraveného séra.

Vazba proteinů CSL se značkou TAP byla metodou imunodetekce imobilisovaných proteinů na nitrocelulosoové membráně detekována u obou připravených polyklonálních sér. Fenotypické porovnání buněk se značenými proteiny CSL a divokého typu ukázalo, že pouze kmen se značeným proteinem Cbf12 vykazuje mírně zvýšenou buněčnou adhezi v porovnání s divokým typem [30]. Je tedy možné usoudit, že proteiny Cbf11 a Cbf12 fuzované se značkou TAP se v buňce nachází v koncentraci blízké přirozené. Nicméně vazba endogenních proteinů CSL, ani proteinů CSL značených hemaglutininem, nebyla pomocí polyklonálního séra detekována, a to navzdory skutečnosti, že množství proteinu Cbf12 značeného hemaglutininem je v buňkách několikanásobně zvýšeno [30]. Protein A, který je součástí značky TAP, váže C-terminální doménu IgG a má schopnost renaturace po odstranění denaturačních činidel [67]. Námí nalezená schopnost séra detekovat proteiny se značkou TAP, nikoliv neznačené proteiny či proteiny značené epitopem HA, je tedy možné vysvětlit renaturací proteinu A po odstranění denaturačního činidla (dodecylsírán sodný). Renaturovaný protein A by tedy mohl neselektivně vychytávat protilátky séra i sekundární protilátky. Tuto hypotézu podporuje také detekce zcela nepříbuzného proteinu Slm9 vybaveného značkou TAP získanými séry anti-CSL. Cbf11 a Cbf12 patří, jako regulační proteiny, v buňce mezi málo zastoupené proteiny a pro jejich antagonistickou funkci je velmi důležitá přesná rovnováha jejich aktivit. Proliferující buňky *S. pombe* obsahují přibližně 1000 molekul proteinu Cbf11 na buňku z celkového počtu 60 milionů proteinových molekul [68]. Je tedy možné, že připravená séra mají nízkou koncentraci nebo aviditu specifických protilátek pro detekci nativního množství proteinů CSL. Teoreticky lze absenci detekovatelné vazby protilátek séra na denaturovaný antigen bez značky TAP vysvětlit i nepřítomností protilátek, které rozpoznávají denaturovaný antigen, protože byly vytvořeny imunisací králíků nativním proteinem Cbf11(303-492). Interakce nativních proteinů CSL se sérem nebyla testována.

Vzhledem k nedostatečné míře exprese solubilního proteinu Cbf12(626-829) pro purifikaci tohoto proteinu v době přípravy protilátky proti Cbf11(303-492), protein Cbf12(626-829) nebyl dále purifikován. Koncentraci protilátek specifických proti proteinům CSL obsažených v séru je možné zvýšit purifikací pomocí afinity protilátek k imobilisovanému purifikovanému antigenu. Využití této skutečnosti by mohlo vést k získání protilátky s vyšší citlivostí, a tak i detekci endogenních proteinů CSL v lysátech *S. pombe*.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala přípravou protilátek proti Cbf11 a Cbf12, proteinům CSL kvasinky *Schizosaccharomyce pombe*, a následnému testování jejich aktivity.

Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

- Na základě bioinformatického porovnání s proteiny CSL se známou terciární strukturou byla pro přípravu protilátky proti proteinům Cbf11 a Cbf12 *S. pombe* navržena doména „beta-trefoil“ těchto proteinů.
- Využitím expresního systému pET byly připraveny plasmidy pro expresi domény „beta-trefoil“ proteinů Cbf11 [Cbf11(303-492)] a Cbf12 [Cbf12(626-829)].
- Proteiny Cbf11(303-492) a Cbf12(626-829) s N-koncovou hexahistidylovou značkou byly v kmeni *Escherichia coli* BL21(DE3) exprimovány s vysokou hladinou exprese po indukci IPTG. Protein Cbf11(303-492) je dobře rozpustný při expresi probíhající při 23°C. Protein Cbf12(626-829) získaný za stejných expresních podmínek je méně rozpustný než jeho paralog. Zvýšené rozpustnosti produkovaného proteinu Cbf12(626-829) je možné dosáhnout snížením expresní teploty na 18°C.
- Protein Cbf11(303-492) byl purifikován využitím chelatace kobaltnatých iontů nosiče Talon hexahistidylovou značkou proteinu. Vysoké čistoty proteinu bylo dosaženo použitím lysačního pufru se zvýšenou iontovou silou a přidáním neiontového detergentu Igepal® CA-630. Purifikačním procesem bylo získáno 5 mg purifikovaného proteinu Cbf11(303-492) z jednoho litru buněčné kultury BL21(DE3).
- Imunizací dvou králíků celkovým množstvím 1 mg purifikovaného Cbf11(303-492) byla připravena polyklonální protilátka SY5467, specificky detekující 10 ng imunogenu v ředění 1:200 a SY5468, specificky detekující 10 ng imunogenu v ředění 1:2000. Krevní sérum SY5467 vykazuje vyšší specifitu detekce imunogenu.
- Obě připravená séra obsahují polyklonální protilátky detekující oba paralogy proteinů CSL *S. pombe* v přítomnosti značky TAP a při produkci proteinu Cbf11

z plasmidu se středně silným promotorem. Protilátka nedetekuje endogenní proteiny Cbf11 a Cbf12 při použití metody imunodetekce proteinů buněčného lysátu rozdělených na SDS-PAGE a imobilisovaných na nitrocelulosové membráně.

7 Seznam použité literatury

1. Pires-daSilva A, Sommer RJ (2003) The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature Reviews Genetics* 4: 39–49.
2. Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky A V, et al. (2009) Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology* 9:249.
3. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling : Cell fate control and signal integration in development. *Science* 284.
4. Mumm JS, Kopan R (2000) Notch signaling: from the outside in. *Developmental Biology* 228: 151–165.
5. Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, et al. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8108–8112.
6. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, et al. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell* 5: 207–216.
7. Lai EC (2004) Notch signaling : control of cell communication and cell fate. *Development* 131: 965–973.
8. Hayward SD (2004) Viral interactions with the Notch pathway. *Seminars in Cancer Biology* 14: 387–396.
9. Minoguchi S, Taniguchi Y, Kato H, Okazaki T, Strobl LJ, et al. (1997) RBP-L, a transcription factor related to RBP-J. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2679–2687.
10. Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T (1994) Recognition sequence of protein RBP-Jx a highly conserved DNA binding. *Nucleic Acids Research* 22: 965–971.
11. Hamidi H, Gustafson D, Pellegrini M, Gasson J (2011) Identification of novel targets of CSL-dependent Notch signaling in hematopoiesis. *PloS one* 6: e20022.
12. Chen X, Thiaville MM, Chen L, Stoeck A, Xuan J, et al. (2012) Defining NOTCH3 target genes in ovarian cancer. *Cancer Research* 72: 2294–2303.
13. Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* 194: 237–255.

14. Ronchini C, Capobianco AJ (2001) Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch IC: Implication for cell cycle disruption in transformation by Notch IC. *Molecular and Cellular Biology* 21:5925-5934.
15. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G (2004) Notch signaling in development and disease. *Seminars in Cancer Biology* 14: 320–328.
16. Kaspar M, Klein T (2006) Functional analysis of murine CBF1 during *Drosophila* development. *Developmental Dynamics* 235: 918–927.
17. Barolo S, Walker RG, Polyanovsky AD, Freschi G, Keil T, et al. (2000) A Notch-independent activity of Suppressor of Hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* 103: 957–969.
18. Beres TM, Masui T, Swift GH, Shi L, Henke RM, et al. (2006) PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue , RBP-L. *Molecular and Cellular Biology* 26: 117–130.
19. Kovall RA, Hendrickson WA (2004) Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO Journal* 23: 3441–3451.
20. Kovall RA (2007) Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex. *Current Opinion in Structural Biology* 17: 117–127.
21. Friedmann DR, Wilson JJ, Kovall RA (2008) RAM-induced allostery facilitates assembly of a Notch pathway active transcription complex. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 14781–14791.
22. Friedmann DR, Kovall RA (2010) Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. *Protein Science* 19: 34–46.
23. Wilson JJ, Kovall RA (2006) Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* 124: 985–996.
24. Kovall RA (2008) More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene* 27: 5099–5109.
25. Převorovský M, Půta F, Folk P (2007) Fungal CSL transcription factors. *BMC Genomics* 12: 1–12.
26. Egel R (2004) *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe: Genetics, genomics and beyond*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
27. Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, et al. (2002) Genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871–880.

28. Oravcová M, Teska M, Půta F, Folk P, Převorovský M (2013) Fission yeast CSL proteins function as transcription factors. *PLoS one* 8:e59435.
29. Převorovský M, Groušl T, Staňurová J, Ryneš J, Nellen W, et al. (2009) Cbf11 and Cbf12, the fission yeast CSL proteins, play opposing roles in cell adhesion and coordination of cell and nuclear division. *Experimental Cell Research* 315: 1533 – 1547.
30. Převorovský M: osobní sdělení
31. Oravcová M: osobní sdělení
32. Převorovský M, Atkinson SR, Ptáčková M, McLean JR, Gould K, et al. (2011) N-termini of fungal CSL transcription factors are disordered, enriched in regulatory motifs and inhibit DNA binding in fission yeast. *PLoS one* 6:e23650.
33. Chen R (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30: 1102–1107.
34. Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27: 297–306.
35. Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 411–421.
36. Studier FW, Moffatt B (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189: 113–130.
37. Dubendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology* 219: 45–59.
38. Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L (2004) The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expression and Purification* 37: 203–206.
39. Studier FW (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology* 219: 37–44.
40. Cloning procedure and Recombinant Expression [online]. Dostupné z WWW: <http://hemankumar.wordpress.com/2012/07/26/cloning-procedure-and-recombinant-expression/>. Zobrazeno dne 25.4.2013.
41. Villaverde A, Carrió MM (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* 25: 1385–1395.
42. Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 4:1

43. Makino T, Skretas G, Georgiou G (2011) Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories* 10:32.
44. Hannig G, Makrides SC (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 16: 54–60.
45. Janson J-C (2011) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
46. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* 41: 98–105.
47. Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 523–533.
48. Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113–128.
49. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599.
50. His-Tagged Protein Purification: Obtain Highest Purity with Cobalt Resin [online]. Dostupné z WWW: http://www.clontech.com/US/Support/Applications/His-Tagged_Protein_Purification/Ni-NTA_Resin_vs._Talon. Zobrazeno dne 23.4.2013.
51. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal* 46: 258–268.
52. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, et al. (2003) *Essential cell biology*. 2nd ed. New York, London: Garland Science.
53. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007) *Antigens and antibodies*. Kuby immunology. New York: W. H. Freeman and Company.
54. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007) *Overview of the immune system*. Kuby immunology. New York: W. H. Freeman and Company.
55. Cooper HM, Paterson Y (1999) Production of polyclonal antisera. *Current Protocols in Cell Biology*. Unit 16.2.
56. Birnboim H, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513–1523.
57. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.

58. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
59. PDBsum, Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank [online]. Dostupné z WWW: <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>. Zobrazeno dne 5.2.2013
60. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
61. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193:2 65-275.
62. Clontech Laboratories (2011) TALON Metal Affinity Resins User Manual.
63. Koelzer S, Klein T (2003) A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*. *Development* 130: 1973–1988.
64. Vethanayagam JG, Flower AM (2005) Decreased gene expression from T7 promoters may be due to impaired production of active T7 RNA polymerase. *Microbial Cell Factories* 4: 3.
65. Novagen (1999) pET System Manual.
66. Bornhorst JA, Falke JJ (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology* 326: 245–252.
67. EMD Millipore: Protein A and Protein G Related Products - Protein A [online]. Dostupné z WWW: http://www.emdmillipore.com/life-science-research/protein-a-and-protein-g-related-products-protein-a/c_S_Wb.s1O0eAAAAEhafosgn0N. Zobrazeno dne 29.4.2013.
68. Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, Chen W, Aebersold R, et al. (2012) Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells. *Cell* 151: 671–683

Seznam příloh

Příloha 1

Sekvenční porovnání připravených konstruktů *cbf11(303-492)* a *cbf12(626-829)* v plasmidu pCR®2.1-TOPO® pomocí algoritmu BLAST.

