

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Salome Kylarová

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE VAZEBNÝCH PARTNERŮ
FOSDUCINU**

Preparation and characterization of binding partners of phosducin

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

.....

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a cenné rady, které mi v průběhu jejího zpracování poskytl.

Dále děkuji doc. RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. za měření rozptylu světla a jeho odbornou spolupráci při zpracování dat.

Zvláštní poděkování patří RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za její laskavý přístup a veškerou pomoc při získávání praktických znalostí v laboratoři a celému kolektivu laboratoře biofyzikální chemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Na závěr nesmím opomenout poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantových vědeckých projektů podporovaných GA ČR (P305/11/0708) a MŠMT (MSM0021620857).

ABSTRAKT

Fosducin (Pdc) je vysoce konzervativní fosfoprotein, který hraje důležitou roli v regulaci G-proteinové signalizace ve fotoreceptorových buňkách sítnice. Jeho funkce spočívá ve vazbě $G_i\beta\gamma$ dimeru G-proteinu transducinu, čímž dochází k poklesu množství dostupného transducinu a modulaci signálu. Funkce fosducinu je negativně regulována prostřednictvím fosforylace a následné interakce s proteinem 14-3-3. Přestože je mechanismus této regulace již do jisté míry znám, narůstá zájem o poznání jeho dalších interakčních partnerů, jmenovitě SUG1 a CRX. SUG1 je podjednotka 26S proteasomu, která zajišťuje mnoho biologických funkcí, zejména pak degradaci mnoha transkripčních faktorů. Jeho úloha v regulační dráze fosducinu není stále dostatečně prozkoumána, ale pravděpodobně se podílí na transportu fosducinu do proteasomu k jeho degradaci. Pro bližší studium tohoto proteinu byly připraveny a testovány jeho čtyři různé expresní konstrukty pro nalezení optimálních podmínek pro jeho expresi a purifikaci. Výsledky těchto purifikací naznačily, že SUG1 vytváří stabilní a velmi dobře rozpustné vysokomolekulární oligomery. Tyto domněnky byly následně potvrzeny měřením dynamického rozptylu světla a analytickou ultracentrifugací. Jeho chování je však plně v souladu s jeho dobře prozkoumaným archeálním homologem, proteinem PAN.

Klíčová slova: fosducin, SUG1, 26S proteasom, CRX, exprese a purifikace, rozptyl světla

ABSTRACT

Phosducin (Pdc) is a highly conserved acidic phosphoprotein, which plays an important role in the regulation of G-protein signalization in intact retina. It binds to G $\beta\gamma$ dimer of heterotrimeric G-protein transducin thereby decreases the pool of available transducin resulting in modulation of signal. Function of phosducin is negatively regulated by its phosphorylation followed by interaction with the 14-3-3 protein. Besides this established way of regulation, we were interested in other putative interaction partners of phosducin, like SUG1 and CRX. SUG1 is a subunit of 26S proteasome with a large scale of biological functions, especially a degradation of many transription factors. Its role in regulation of phosducin is still unclear, but is probably involved in targeting of phosducin to 26S proteasome for its degradation. Subsequently, we prepared four different expression constructs of full-length protein in order to find the best expression and purification strategy. These results suggest that all purified fusion proteins of SUG1 form stable and soluble high molecular weight oligomers. This behaviour was confirmed by dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation measurements. In addition, this observation is consistent with previous studies of its bacterial counterpart, PAN protein.

Key words: phosducin, SUG1, 26S proteasome, CRX, expression and purification, light scattering

OBSAH

Seznam použitých zkratk	9
1 Úvod	11
2 Přehled literatury	13
2.1 Přenos světelného signálu ve fotoreceptorových buňkách.....	13
2.2 Fosducin	14
2.2.1 Struktura fosducinu a jeho komplexu s $G_{\beta\gamma}$	15
2.2.2 Fosforylace fosducinu a jeho interakce se 14-3-3	17
2.3 SUG1.....	18
2.3.1 26S proteasom a regulační komplex	18
2.3.2 Struktura a funkce proteinu SUG1	21
2.4 CRX	24
2.5 Bakteriální exprese a purifikace rekombinantních proteinů	26
2.5.1 Výběr expresního plasmidu	26
2.5.2 Expresní kmen bakterií a kultivační podmínky	27
2.5.3 Další prostředky k dosažení lepších výsledků při purifikaci	28
3 Cíl práce	30
4 Metody a materiál	31
4.1 Použitý materiál	31
4.1.1 Chemikálie.....	31
4.1.2 Přístroje.....	32
4.2 Příprava expresních konstruktů.....	34
4.2.1 Plasmidy	34
4.2.2 Vnesení plasmidové DNA do bakterií metodou tepelného šoku	37
4.2.3 Kultivace bakterií na LB-agaru	37
4.2.4 Příprava miniprepů	37
4.2.5 Minipreparace plasmidové DNA.....	38
4.2.6 Amplifikace genu lidského SUG1	39
4.2.7 Horizontální agarosová elektroforéza DNA	42
4.2.8 Purifikace produktu PCR.....	43

4.2.9 Štěpení produktu PCR a plasmidu	44
4.2.10 Gelová extrakce a izolace plasmidové DNA	46
4.2.11 Ligace	46
4.2.12 PCR z kolonií.....	47
4.2.13 Sekvence DNA	49
4.3 Exprese a purifikace proteinu SUG1.....	50
4.3.1 Expresní konstrukty SUG1	50
4.3.2 Expresní testy	51
4.3.3 SDS-PAGE	52
4.3.4 Kultivace bakterií v 11 LB média.....	55
4.3.5 Sonikace.....	56
4.3.6 Afinitní chromatografie	57
4.3.7 Dialýza.....	59
4.3.8 Měření koncentrace proteinu	60
4.3.9 Štěpení fúzního proteinu proteasou	60
4.3.10 Gelová permeační chromatografie (SEC).....	61
4.4 Biofyzikální charakterizace SUG1.....	62
4.4.1 Rozptyl světla	62
4.4.2 Měření stability proteinu.....	66
5 Výsledky	67
5.1 Příprava expresních konstruktů.....	67
5.1.1 Amplifikace genu lidského SUG1	67
5.1.2 Ligace a kontrola expresních konstruktů.....	68
5.2 Exprese a purifikace proteinu SUG1.....	70
5.2.1 Expresní testy při 37 °C.....	71
5.2.2 Purifikace proteinu SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pET-29b)	72
5.2.3 Purifikace proteinu SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pST39).....	75
5.2.4 Purifikace proteinu GST-SUG1.....	78
5.2.5 Purifikace proteinu 6×His-G_B1-SUG1.....	80

5.2.6 Purifikace proteinu SUG1.....	83
5.3 Biofyzikální charakterizace proteinu SUG1	86
5.3.1 Měření rozptylu světla	86
5.3.2 Měření stability proteinu při 18 °C.....	89
6 Diskuze	90
7 Závěr.....	92
Seznam citované literatury	93
Příloha A.....	100
Příloha B.....	102

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

βARK	kinasa β-adrenergního receptoru
βME	2-merkaptoethanol
AAA	skupina proteinů s ATPasovou funkcí mj. součást regulační části proteasomu (ATPase family associated with a variety of cellular activities)
AF-2	aktivační doména jaderných receptorů (z angl. Activation function-2)
bp	páry nukleových bází
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní kinasa
cDNA	komplementární deoxyribonukleotidová kyselina
CRX	transkripční faktor nalezený v sítnici a pinealocytech (z angl. Cone rod homeobox)
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
dNTP, ddNTP	deoxyribonuklosid trifosfát (dd-dideoxy) (z angl. deoxyribonucleoside triphosphate)
GAP	proteinový komplex stimulující GTPasovou aktivitu G-proteinů (z angl. GTPase-activating protein)
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny (z angl. G-protein coupled receptors)
G _t	G-protein transducin
GST	glutathion-S-transferasa
His-tag (6×His)	histidinová kotva
Ipaf	aktivátor kaspasy 1 vedoucí k apoptose (z angl. interleukin-1β-converting enzyme-protease-activating factor)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
mRNA	informační ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)

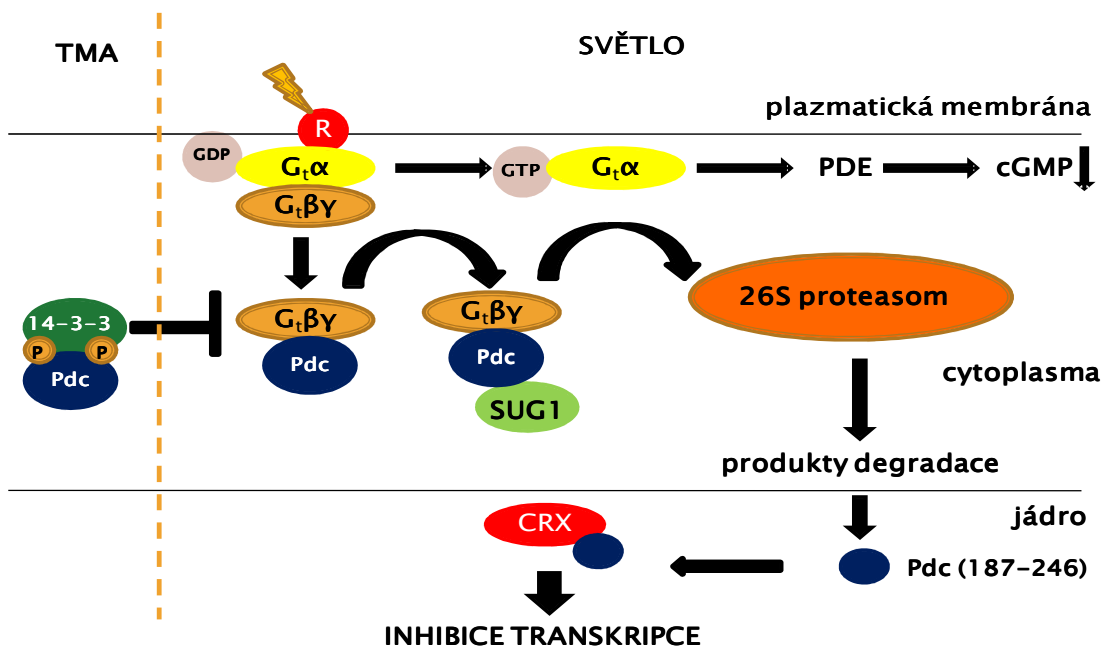
Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	dihydrát ethylediamintetraacetátu disodného
NMR	nukleární magnetická rezonance
ot/min	otáčky za minutu
PAN	protein tvořící regulační komplex archeálního proteasomu (z angl. proteasome-activating nucleotidase)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
Pdc	fosducin
PDE	fosfodiesterasa
PhLP	isoformy fosducinu (z angl. phosducin-like proteins)
PhOLP	skupina proteinů podobných fosducinu (z angl. phosducin-like orphan protein)
PKA	proteinkinasa A
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
protein G_B1	B1 doména proteinu G
RAR	receptor retinové kyseliny (z angl. retinoic acid receptor)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)

1 ÚVOD

V posledních letech je upírána velká pozornost na studium rodiny dimerních proteinů 14-3-3 a jejich obrovskou škálu interakčních partnerů. Tato skupina proteinů se účastní mnoha regulačních a metabolických pochodů v buňkách, buněčného cyklu, apoptosy či transkripce na základě interakce se specificky fosforylovanými ligandy [1,2]. Účelem této interakce může být vyvolání strukturních změn vázaného ligandu, vedoucí k jeho aktivaci nebo vypnutí, popř. stabilizaci při tvorbě multimerních komplexů. V jiných případech se může jednat o maskování některých sekvencí rozhodujících o buněčné lokalizaci vázaného ligandu [1]. Jedním z jeho vazebných partnerů je i cytosolický protein fosducin, který se účastní regulace G-proteinové signalizace při transmissi světelného signálu ve fotoreceptorových buňkách sítnice. V rámci adaptace buněk na tmu je proces negativně regulován fosforylací fosducinu a jeho interakcí se zmiňovaným proteinem 14-3-3 [3]. Přestože byly tyto regulační mechanismy již do jisté míry objasněny, na povrch vyvstaly další skutečnosti, které do doposud známého modelu zasahují. Jedná se především o úlohu dvou domnělých vazebných partnerů fosducinu, CRX a SUG1. SUG1 je jedna z regulačních podjednotek 26S proteasomu s ATPasovou funkcí, která pravděpodobně transportuje volný fosducin, či komplex fosducin-G_iβγ do proteasomu k jeho následné degradaci. CRX působí jako transkripční faktor regulující expresi odpovídajících genů ve tkáni sítnice. Jeho funkce je však blokována interakcí s C-terminální částí fosducinu [4,5]. Propojení všech těchto procesů je graficky vystiženo na obr. 1.1 (viz str. 12).

Velký nárůst zájmu o studium fosducinu byl zaznamenán v souvislosti s regulací stresem indukované hypertenze. Zvýšené riziko jejího vzniku totiž ve velké míře závisí na daném genotypu fosducinu a jeho úplná delece vede k významným změnám mnohých determinantů výše krevního tlaku. V budoucnosti léčby hypertenze se tak fosducin stává dalším možným cílem terapeutického zásahu [6, 7].

Tato diplomová práce představuje hlubší pohled na problematiku týkající se proteinu SUG1 a jeho interakcí s fosducinem. Experimentální část byla plně zaměřena na jeho výrobu v rozpustné a stabilní formě. Pro tento účel byly testovány celkem čtyři expresní konstrukty, jejichž produkty jsou různé fúzní varianty proteinu SUG1. Cílem tohoto postupu bylo nalezení optimálních podmínek pro jeho expresi a purifikaci pro další studium jeho biofyzikálních vlastností.



Obr. 1.1 Schéma signální dráhy blokované fosducinem a navržený model jeho interakce s proteiny *SUG1* a *CRX*. **SVĚTLO**: Světelný impuls aktivuje fotoreceptor, což vyvolá spuštění G-proteinové signální dráhy iniciované rozpadem heterotrimeru G_i . Fosducin váže $G_i\beta\gamma$ ve vnitřním segmentu tyčinek a blokuje zpětnou reasociaci s $G_i\alpha$. Tvorba tohoto komplexu brání aktivaci dalších fotoreceptorů, což vede k modulaci signálu. Vazba *SUG1* patrně zajistí transport komplexu $G_i\beta\gamma$ -fosducin do 26S proteasomu. C-konec fosducinu vzniklý degradací interaguje s *CRX* v jádře a brání tak aktivaci transkripce odpovídajících genů. Částečně upraveno z [4]. **TMA**: Fosducin je fosforylován a vázán v komplexu s dimerem 14-3-3 [3].

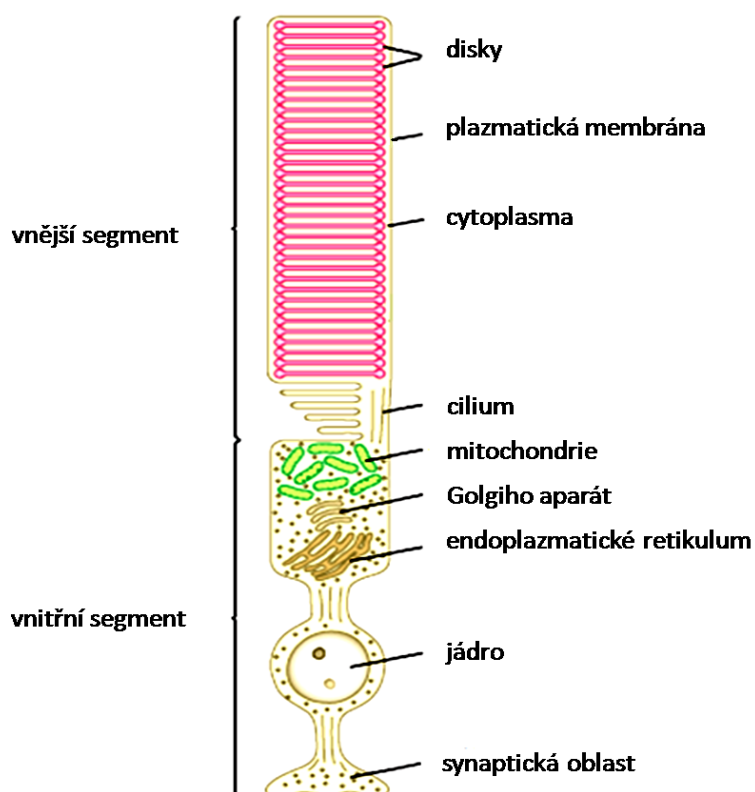
2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Přenos světelného signálu ve fotoreceptorových buňkách

Jedna z nejvíce prostudovaných signálních drah spojených s G-proteiny je přenos světelného signálu ve světločivných buňkách sítnice. Unikem této signalizace je nadprůměrná amplifikace výchozího signálu a rychlá buněčná odpověď na základě produkce velkého množství jednotlivých účastníků přenosu [8].

Prvním impulsem pro spuštění této složité kaskády je světelný signál, který je zachycen receptory rhodopsinu v buňkách oční sítnice (viz obr. 2.1, str. 14). Tento fotoreceptor patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR = **G**-**P**roteins **C**oupled **R**eceptors). Při adaptaci na světlo dochází po aktivaci fotoreceptoru ke konformačním změnám v intracelulární oblasti a následkem výměny GDP za GTP k rozpadu heterotrimeru G-proteinu transducinu (G_t) na dvě podjednotky, $G_t\beta\gamma$ a $G_t\alpha$ [9,10]. Vazba GTP na podjednotku $G_t\alpha$ vyvolává konformační změnu, která mnohonásobně zvyšuje její afinitu k aktivovanému efektoru [11]. V tomto případě se jedná o aktivaci cGMP fosfodiesterasy (PDE), která katalyzuje hydrolýzu cGMP na 5'-GMP. Pokles cGMP v buňce má za následek uzavírání kationtových kanálů v plazmatické membráně, které jsou citlivé na změny intracelulární koncentrace cGMP. Tím dochází ke snížení přítoku kationtů Na^+ a následné hyperpolarizaci membrány. Tato změna membránového potenciálu je signálem pro uzavření kanálů pro vápenaté ionty v presynaptickém prostoru vedoucí k poklesu množství uvolněného neurotransmiteru glutamátu. Tímto způsobem je modulován přenos nervového vzruchu při dopadu světla na sítnici, kdy k jeho vyvolání postačuje absorpce jediného fotonu jednou molekulou receptoru rhodopsinu. Uzavření kationtových kanálů a stálá aktivita Na^+/Ca^{2+} přenašeče má za následek pokles množství vápenatých iontů uvnitř buňky. Při dosažení prahové hodnoty koncentrace těchto iontů je zahájena zpětná syntéza cGMP činností guanylylcyklyasy vedoucí k otevření těchto kanálů a návratu do původního stavu depolarizací membrány [8,9,12].

Pro vypnutí odpovědi iniciuje podjednotka $G_t\alpha$ společně s proteinovým komplexem GAP (z angl. **G**TTPase **A**ctivating **P**rotein) hydrolýzu vázaného GTP, což vede k reasociaci podjednotek za zpětné tvorby inaktivního heterotrimeru G-proteinu [12].



Obr. 2.1 Stavba tyčinky oční sítnice. Jejich šířka odpovídá přibližně 1 μm a délka 40 μm . Disky obsahují hojný počet molekul rhodopsinu. V plazmatické membráně vnějšího segmentu jsou umístěny sodíkové kanály, ve vnitřním segmentu napěťově řízené draselné kanály, které zajišťují odtok draselných iontů. Světelný impuls indukuje hyperpolarizaci, která se podél těchto kanálů šíří až do prostoru synapse, kde dochází k uvolnění neurotransmiteru [12]. Převzato a upraveno z [13].

Amplifikace signálu prostřednictvím G-proteinové signalizace fotoreceptorových buněk je natolik účinná, že při dlouhodobému vystavení přímému světlu musí dojít k její rychlé adaptaci prostřednictvím řady buněčných mechanismů. Pro rychlou inaktivaci fotoreceptorů je to především jejich fosforylace pomocí rhodopsinkinasy a následná vazba proteinu arrestinu, který svou objemností brání interakci s inaktivovaným transducinem [12,14].

2.2 Fosducin

Mezi další významné regulátory cGMP kaskády světlocitlivých buněk sítnice patří i evolučně konzervovaný protein fosducin. Výskyt fosducinu byl však zaznamenán i v jiných tkáních, nejvíce pak v nervovém systému, šišince a sympatických gangliích.

Právě regulace aktivity sympatiku, úzce spojovaná s funkcí fosducinu, udržuje kardiovaskulární homeostázu a odvrací riziko vývoje hypertenze [6].

cGMP signální dráha uvnitř tyčinek zahrnuje aktivaci efektoru a následnou tvorbu druhých posílů zprostředkovaně přes aktivaci podjednotky $G_t\alpha$ heterotrimeru G- proteinu. Cílovým objektem působení fosducinu je však druhá z podjednotek, heterodimer $G_t\beta\gamma$ [14]. Ke vzniku komplexu s fosducinem dochází po translokaci dimeru $G_t\beta\gamma$ do vnitřního segmentu tyčinek, čímž je zabráněno jeho zpětné reasociaci s $G_t\alpha$ a obnově heterotrimeru [15]. V sítnici tedy dochází ke kompetici mezi $G_t\alpha$ a fosducinem o vazbu na $G_t\beta\gamma$. V jiných tkáních se tento heterodimer podílí na aktivaci mnoha jiných interakčních partnerů a jejich nedostatečná aktivita může vést k nízké produkci dalších členů kaskády, např. inositolfosfátu nebo cAMP. [14,16]

V tyčinkách adaptovaných na tmu je nutné účinkům fosducinu bránit, aby byla zajištěna co nejvyšší citlivost vůči dopadajícímu světlu. Proto je fosducin regulován prostřednictvím fosforylace a následné interakce s dimerem 14-3-3 (lidská isoforma 14-3-3ζ) [3].

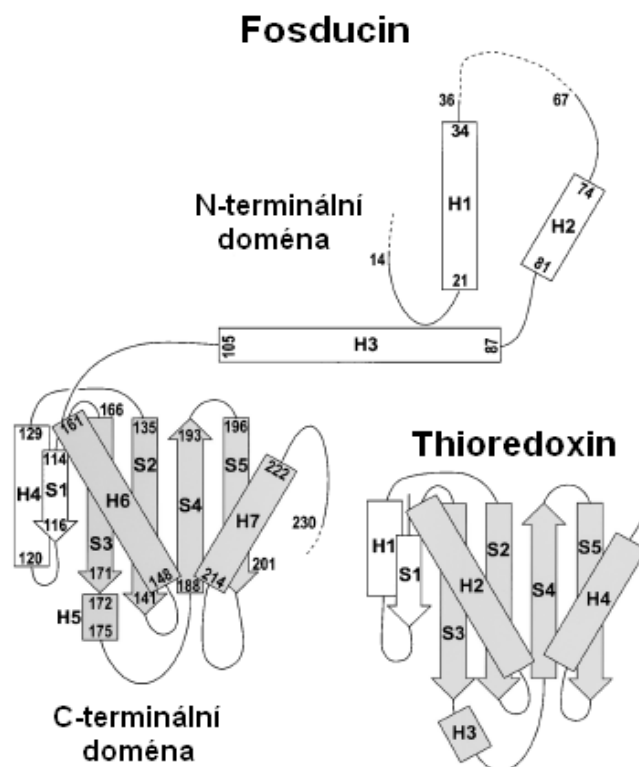
2.2.1 Struktura fosducinu a jeho komplexu s $G_t\beta\gamma$

Jeden z efektorů aktivovaných podjednotkou $G_t\beta\gamma$, kinasa fosforylující beta-adrenergní receptory - β ARK (z angl. **β -Adrenergic Receptor Kinase**), vykazuje výraznou sekvenční podobnost s N-terminální částí fosducinu v části své vazebné domény pro tuto podjednotku [16]. Na základě této podobnosti byl prozkoumán vliv vazby fosducinu na inhibici aktivace jednoho z dalších efektorů, fosfolipasy $C\beta 2$. Značný pokles aktivace v přítomnosti tohoto kompetitivního antagonisty poukázal na důležitou úlohu N-terminální domény fosducinu při vazbě na $G_t\beta\gamma$ s nezastupitelnou funkcí tryptofanu 29, jehož substituce vedla ke značnému snížení afinity [17].

Vlastní struktura fosducinu (viz obr. 2.2, str. 16) byla získána z rentgenové strukturní analýzy jeho komplexu s $G_t\beta\gamma$. Ta potvrdila uspořádání fosducinu do dvou funkčních domén. N-terminální doména je tvořena především helikální strukturou a je velmi flexibilní především v místech, kde nedochází k jejímu kontaktu s tímto heterodimerem [14]. Neuspořádanost této domény lze vysvětlit primární strukturou s vysokým obsahem polárních a nabitých aminokyselin [16].

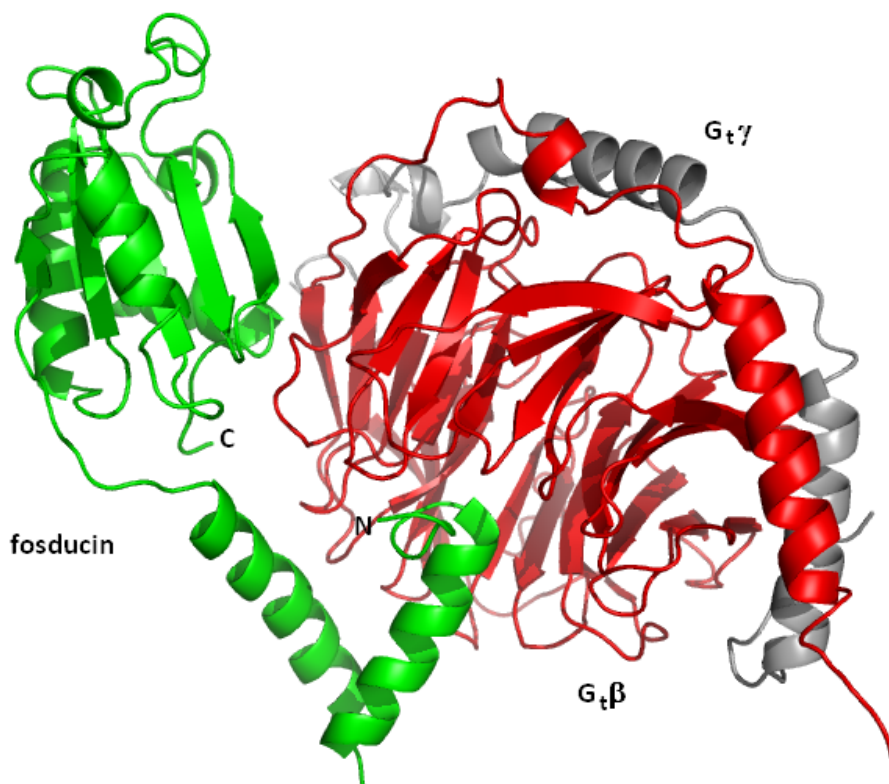
C-terminální doména se díky své kombinaci 5 vláken tvořených β -strukturou a α -helixů řadí mezi proteiny, jejichž struktura se podobá thioredoxinu (obr. 2.2), přestože jeho sekvenční homologie s tímto proteinem je poměrně nízká [14].

Vazebná doména pro $G_t\beta\gamma$ se nerozkládá pouze v oblasti N-konce fosducinu, jelikož pro plnou vazebnou aktivitu je nutná účast i dalších elementů C-terminální domény [18].



Obr. 2.2 Uspořádání prvků sekundární struktury v řetězci fosducinu v rámci jeho dvou domén. Podobné strukturální elementy C-terminální domény s thioredoxinem jsou zvýrazněny šedivou barvou. Převzato a upraveno z [14].

Krystalická struktura komplexu fosducinu s $G_i\beta\gamma$ (viz obr. 2.3, str. 17) potvrdila, že jeho N-terminální doména se účastní vazby ve stejných místech, kde dochází k vazbě podjednotky $G_i\alpha\cdot\text{GDP}$. Naopak C- koncová doména fosducinu interaguje s heterodimerem v oblasti, kterou je poután k membráně v blízkosti receptoru. Tato doména oplývá negativním elektrostatickým potenciálem, který výrazně napodobuje záporný membránový potenciál a tím se omezuje možnost zpětné tvorby inaktivního heterotrimeru ($G_i\beta\gamma\alpha\cdot\text{GDP}$) v prostředí membrány. Mezi touto oblastí fosducinu a membránou se uplatňují repulzní síly, které patrně usnadňují translokaci heterodimeru $G_i\beta\gamma$ do cytosolu. Mutace úseků thioredoxinové domény jsou navíc spojovány s častějším výskytem patologických změn sítnice [14].



Obr. 2.3 Komplex fosducinu s podjednotkou $G_i\beta\gamma$ [20]. (PDB 1B9X) Hlavní účast na vzájemné interakci a tedy i stabilitě komplexu má N-terminální doména a podjednotka $G_i\beta$. Patrně nedochází ke kontaktu mezi fosducinem a podjednotkou $G_i\gamma$. Vytvořeno v programu PyMOL.

2.2.2 Fosforylace fosducinu a jeho interakce se 14-3-3

Fosforylace fosducinu vedoucí ke zpětnému transportu obou oddělených podjednotek transducinu do vnějšího segmentu tyčinek je klíčová pro maximální amplifikaci signálu v buňkách adaptovaných na tmou [3,19]. U fosducinu byla objevena dvě důležitá fosforylační místa, Ser-54 a Ser-73. Fosforylaci těchto míst zajišťují dvě proteinkiny, Ca^{2+} /kalmulin-dependentní proteinkinasa (CaMKII) a proteinkinasa A (PKA) [15].

Zatímco aktivace kinyzy CaMKII je odpovědí na zvýšení hladiny vápenatých iontů, proteinkinasa A reaguje na vzestup koncentrace cAMP. Vyšší množství těchto druhých posílů je ukazatelem probíhající adaptace buněk na tmou [12,14,15]. Přístup proteinkinyzy či fosfatasy je lehce umožněn, jelikož úsek 30 aminokyselin (od Asp-37 do Arg-66) N-terminální domény, která se nachází v těsné blízkosti tohoto fosforylačního místa, je velmi flexibilní [14]. Při fosforylaci Ser-73 nedochází k rozsáhlým konformačním změnám a k významnému snížení afinity, ale roste schopnost podjednotky $G_i\alpha$ soupeřit s fosducinem o vazbu s jejím partnerem $G_i\beta\gamma$ [20]. Z toho vyplývá, že pro rozpad i tvorbu tohoto komplexu je limitujícím faktorem rychlost fosforylace/defosforylace Ser-54. [15]

Inhibice interakce mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ vedoucí ke zvýšení počtu dostupných molekul transducinu je prvotně zprostředkována posttranslační modifikací fosducinu. V další fázi je fosforylovaný fosducin rozpoznáván a vázán do komplexu s dimerem 14-3-3.

Prvotním záměrem proteinů 14-3-3 je blokovat účinky fosducinu, ale zároveň ho také chránit před proteolytickou degradací či agregací a bránit jeho rychlé defosforylaci v okamžiku dopadu světla na sítnici [3]. Vazba v tomto komplexu způsobuje konformační změnu v celé struktuře fosducinu a snížení flexibility vybraných úseků především v rámci N-terminální domény [21]. V případě interakce nefosforylovaného fosducinu s $G_i\beta\gamma$ představují obě domény fosducinu dvě navzájem závislé strukturní jednotky a své funkce vykonávají nezávisle [14,20]. Z měření časově rozlišené fluorescence bylo zjištěno, že přítomnost fosfátových skupin v části N-terminální domény fosducinu výrazně ovlivňuje strukturu jeho C-koncových oblastí, což naopak poukazuje na jejich vzájemnou interakci [21].

Zpětná defosforylace fosducinu je zajištěna činností dvou fosfatasy, protein fosfatasy 2A a 1, přičemž rozhodující je opět defosforylace Ser-54. Ser-73 je pravděpodobně defosforylován až po uspořádání komplexu s $G_i\beta\gamma$ [15].

2.3 SUG1

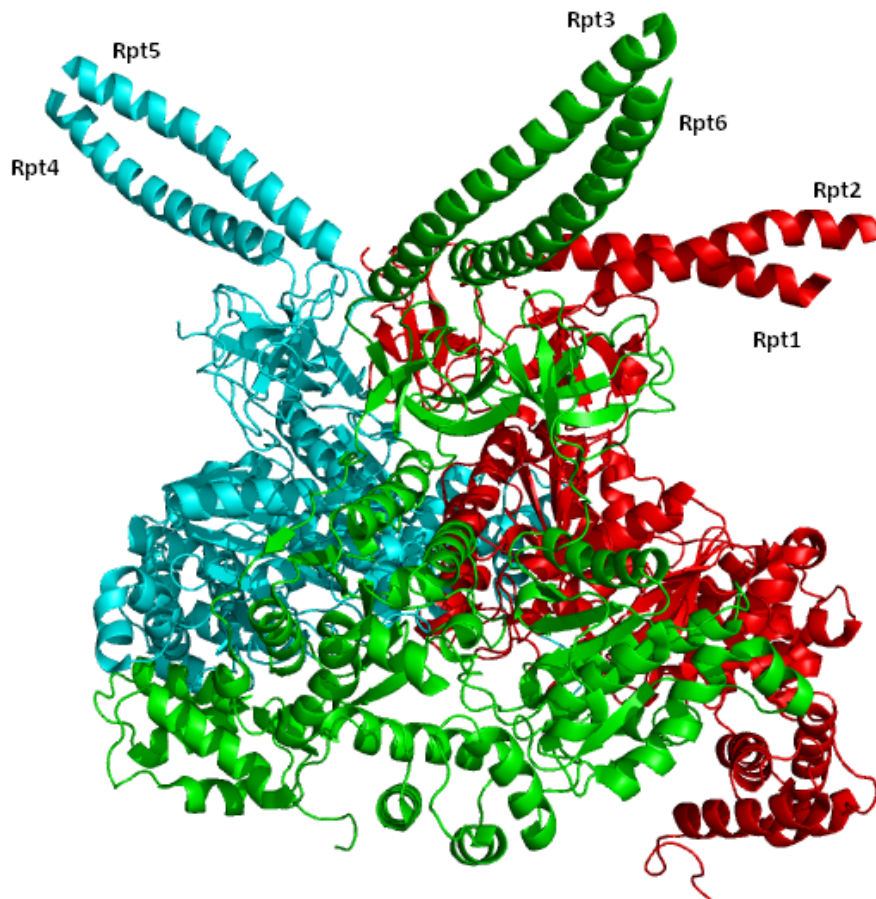
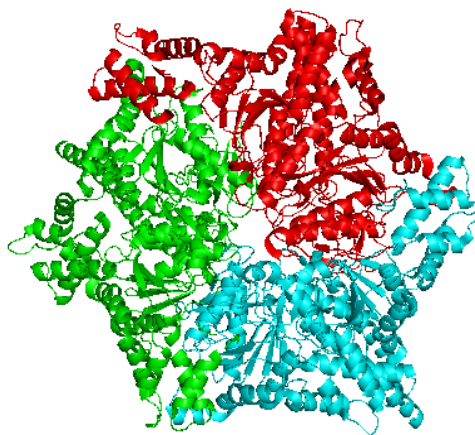
2.3.1 26S proteasom a regulační komplex

Degradace proteinů prostřednictvím ubikvitin-proteasomového systému je jedním z důležitých mechanismů kontroly buněčného cyklu, apoptosy, buněčné signalizace a dalších procesů [22,23]. Proteasom je unikátní intracelulární proteolytický aparát složený ze dvou komplexních útvarů zvaných 19S regulační partikule a 20S proteolytické jádro. Regulační partikule se uplatňuje v rozpoznávání substrátů, jejich rozbalování a translokaci do jádra 20S proteasomu, kde dochází k vlastnímu proteolytickému štěpení [23]. Klíčem k hlubšímu poznání těchto procesů je tedy především struktura a funkce jednotlivých podjednotek obou komplexů. Krystalická struktura 20S proteasomu je známá už desítky let a potvrzuje jeho stavbu ze dvou vnějších α -heptamerů a dvou vnitřních β -heptamerů kruhů. Vnitřní kruhy vytvářejí centrální kanál, v němž jsou umístěny katalytické zbytky [23,24]. Pokusy o získání krystalické struktury regulačního komplexu často končily neúspěchem až do roku 2009, kdy byla získána skupinou Zhang et al. struktura jeho archeálního homologu, komplexu PAN (z angl. **P**roteasome-**A**ctivating **N**ucleotidase) [25]. Na jejím základě byl nedávno získán kompletní model kvasinkového proteasomu s užitím techniky kryoelektronové mikroskopie [26].

Z tohoto modelu pochází především podrobná organizace regulačního komplexu, který tvoří vstupní bránu z obou stran proteolytického jádra a jehož součástí je i diskutovaný protein SUG1, resp. jeho kvasinkový homolog, Rpt-6 [26]. Sekvenční homologie mezi lidským SUG1 a kvasinkovým homologem činí téměř 74 % [22].

Základna tohoto komplexu je tvořena podjednotkami s ATPasovou funkcí (Rpt 1-6) a podjednotkami bez ATPasové funkce (Rpn 1, 2 a 13). Rpt 1-6 vytváří heterohexamer sestavený z trojice heterodimerů. Interakce mezi podjednotkami v rámci heterodimeru jsou zprostředkovány jejich N-terminálními helixy, které vytváří „coiled-coil“ strukturu a jejich C-konce s ATPasovou doménou (AAA doménou - z angl. ATPase family Associated with a variety of cellular Activities) jsou uspořádány do kruhu (viz obr. 2.4, str. 20). U N-koncových 50 aminokyselin je predikována jejich neuspořádaná struktura jako u jejich bakteriálních analogů [26]. Struktura Rpt podjednotek obsahuje tři konzervované úseky, jejichž mutace v kritických místech vedou k mnohým poruchám ve funkčním uspořádání proteasomu. Jedná se o motiv Walker A s vazebným místem ATP, motiv Walker B (sekvence IIFIDEI) a C-terminální motiv HbYX¹. Mutace Walker A motivu v místě lysinu vedou ke snížení schopnosti vazby ATP, přičemž úplná ztráta této funkce byla zaznamenána u podjednotky Rpt-6. Vazba nukleotidu je klíčová pro uspořádání proteasomu do funkčního celku. Naproti tomu mutace motivu Walker B způsobuje kompletní ztrátu ATPasové aktivity celého heterohexameru [27]. Hydrolyza ATP indukuje změnu konformace konzervovaných segmentů směřujících dovnitř tvořeného póru, což usnadňuje denaturaci struktury substrátů a jejich translokaci do jádra 20S proteasomu [28]. Proto je překvapením, že tato ztráta schopnosti hydrolyzy ATP neměla významný vliv na degradační schopnosti proteasomu [27]. Při studiu archeálního proteasomu však bylo prokázáno, že hydrolyza ATP je nezbytná pouze pro denaturaci globulárních proteinů a vlastní proces translokace je zprostředkován difúzí skrze ATPasový komplex do 20S jádra bez jakýchkoliv energetických nároků. Hnací silou tohoto děje je pouze vazba ATP komplexem PAN, který v tomto aktivním stavu může pevněji vázat linearizovaný řetězec a tím difúzi usnadnit [29]. HbYX motiv umístěný v C-terminální části podjednotek Rpt2 a Rpt5 plní důležitou funkci při otvírání vstupu do proteolytického jádra vyvoláním konformačních změn ve struktuře α -podjednotek 20S proteasomu [30]. Jednou z dalších domnělých funkcí AAA-ATPasového heterohexameru je schopnost rozeznávat sekundární degradační signály (degrony) a bránit tak nekontrolované degradaci [31].

¹ HbYX motiv – trojice tří aminokyselinových zbytků: hydrofobní aminokyselina - tyrosin - X (značí libovolnou aminokyselinu)

A**B**

Obr. 2.4 *Strukturní uspořádání Rpt podjednotek AAA-ATPasového heterohexameru S. cerevisiae získané z kryolektronové mikroskopie. (PDB 4B4T, řetězce H, I, J, K, L, M)* Struktura byla modelována podle atomové struktury archeálního regulačního komplexu PAN. **A** – Každý heterodimer **Rpt4/Rpt5**, **Rpt3/Rpt6** a **Rpt1/Rpt2** je značen jednotnou barvou. U dimeru Rpt1/2 lze dobře spatřit „coiled-coil“ strukturní motiv vyznačující se překříženými helixy mezi nimiž dochází k interakci. **B** – Pohled skrze hexamerní kruh tvořený AAA-ATPasovými doménami podjednotek Rpt [26]. Vytvořeno v programu PyMOL.

V těsné blízkosti ústí heterohexamery, který tvoří přechod do proteolytického kanálu, je vtěsnán heterodimer Rpn8/Rpn11, jehož organizace v rámci komplexu byla doposud neznámá. Díky těmto znalostem byly lépe objasněny i děje probíhající v této oblasti. Podjednotka Rpn11 se podílí na ATP-dependentní deubikvitinylaci substrátů, která je vzápětí následována rozbalením jejich struktury prostřednictvím ATPas [26].

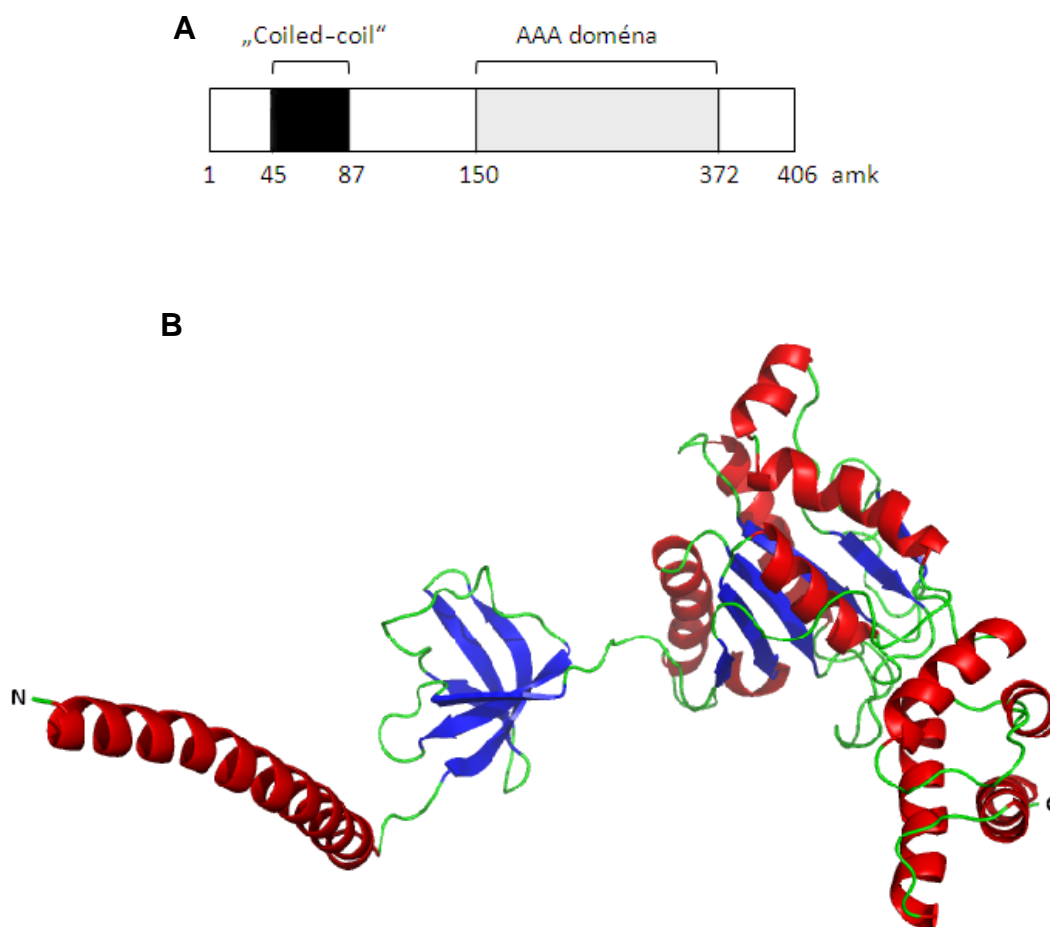
Ubikvitinové receptory Rpn10 a Rpn13 rozpoznávající polyubikvitinované substráty jsou lokalizovány na samotném vrchu proteasomu, z čehož plyne jejich pozdní vznik v rámci evoluce regulačního komplexu [31]. Zbylé ne-ATPasové podjednotky Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn9 a Rpn12 tvoří jakýsi poklop proteasomu, který zakrývá AAA-ATPasový heterohexamer [26,31].

Archeální proteasom jako evoluční prekurzor 26S proteasomu sdílí mnoho těchto strukturálních rysů. Vzájemné rozdíly plynou především z primární struktury jednotlivých podjednotek. Zatímco u 26S proteasomu jsou subkomplexy tvořeny heterooligomerními strukturami s vysokou sekvenční homologií, u archeí jsou to většinou dokonalé homooligomery [25]. Další rozdíly jsou patrné v uspořádání archeálního 20S komplexu v jeho uzavřeném stavu, který umožňuje snadný průchod menších peptidů [29]. Přestože protein PAN sdílí nejvyšší míru homologie s podjednotkou Rpt2, všechny důležité úseky objasňující jeho funkční úlohu jsou zachovány i u ostatních podjednotek eukaryotického heterohexamery [26,29]. Velkou strukturální podobnost především v úsecích AAA domény sdílí i s lidskou ATPasou SUG1 (Příloha B).

2.3.2 Struktura a funkce proteinu SUG1

Protein SUG1 se neúčastní jen procesů spojených s degradací jeho interakčních partnerů, ale zasahuje i do neproteolytických dějů založených na regulaci funkce mnoha transkripčních faktorů či jaderných receptorů (receptory retinové kyseliny (RAR), estrogení receptory, thyroïdní receptory) [32,33,34]. Tento protein sdílí konzervované úseky s ATP-dependentními DNA/RNA helikasami, a proto lze předpokládat, že může hrát významnou roli v metabolismu specifických mRNA, které jsou dokonce schopny podnítit jeho ATPasovou aktivitu [35,36]. Ve spojení s 19S komplexem se SUG1 významně podílí na elongaci transkripce, jelikož při jeho inaktivaci dochází k signifikantnímu poklesu mRNA transkriptů nebo k tvorbě jejich nefunkčních zkrácených úseků [37]. Aktivace transkripce genů pomocí jaderných receptorů v některých případech vyžaduje kromě daného ligandu další koaktivátory. Tyto látky ve spolupráci s dalšími bílkoviny napomáhají modifikovat chromatin a cíleně shromáždit RNA polymerasu II s potřebnými transkripčními faktory v promotorové oblasti [38].

SRC-3 (z angl. **S**teroid **R**eceptor **C**oactivator), koaktivátor receptoru RAR α , je degradován prostřednictvím interakce se SUG1, čímž je modulována transkripce odpovídajících genů. Pokud je SUG1 exprimován ve zvýšeném množství, kompetuje se SRC-3 o vazbu s AF-2 vazebnou doménou receptoru (z angl. **A**ctivation **F**unction-2) a tím transkripci inhibuje. SUG1 tedy může svou funkcí efektivně regulovat expresi cílových genů pro tento receptor a zároveň i plně blokovat jeho degradaci, která je expresí těchto genů vyvolána. Cílené umlčení genu SUG1 má také dopad na buněčnou diferenciaci NB-4 promyelocytů v podobě snížené exprese některých diferenciačních markerů [34].



Obr. 2.5 A – Schematická struktura lidského SUG1 s vyznačenou „coiled-coil“ oblastí a AAA doménou. V oblasti 190-197 aminokyselin je umístěn konzervovaný Walker A motiv GPPGTGKT [26,40]. **B** – Model struktury kvasničného SUG1 tvořeného čtyřmi doménami získaný z kryoelektronové mikroskopie. (PDB 4B4T, řetězec J) Prvky sekundární struktury jsou zvýrazněny barevně: β -struktura, α -helix, neuspořádaná struktura [26]. Vytvořeno v programu PyMOL.

Mezi interakční partnery SUG1 určené pro proteasomální degradaci lze řadit i myosin třídy VIII B, jehož biologické funkce nejsou dostatečně prostudované. Je možné, že se však jedná o potencionální produkt tumor supresorového genu, jehož zvýšená exprese potlačuje buněčný růst u maligních onemocnění [39].

Jak je patrné z mnoha studií, přímé interakce s těmito ligandy se účastní především AAA doména s kruciální funkcí vazebného místa pro ATP. Tato doména patří mezidruhově mezi vysoce konzervované úseky. Naopak N-terminální „coiled-coil“ doména se uplatňuje v protein-proteinových interakcích a je zodpovědná za jeho oligomerizaci (viz obr. 2.5 A a B, str. 22) [32,33]. Z krystalografických studií lidského homologu SUG1 bylo získáno strukturní uspořádání posledních 78 aminokyselin C-terminální domény [41].

Zatím není jasné, zda se SUG1 účastní interakce s ligandy ve volné formě nebo pouze jako součást komplexu [33]. Rpt6 (SUG1) a Rpt4 podjednotky komplexu 19S se přímo podílí na destabilizaci komplexu aktivátoru Gal4 s DNA skrze interakci s jeho aktivační doménou. K funkční interakci však dochází pouze separací celého subkomplexu od 20S proteolytického jádra [42].

Jedním z jeho dalších významných regulačních zásahů je např. degradace faktoru Sp1 v případě, kdy je organismus vystaven stresu vyvolaného nedostatkem glukózy. Pokud však do reakce vstupuje mutantní SUG1 obsahující buď samotnou N-terminální nebo C-terminální část, je vyvolán opačný efekt inhibice degradace tohoto transkripčního faktoru. Z toho lze usoudit, že oligomerizace (patrně dimerizace) v jeho N-terminálních úsecích sekvence je důležitým předpokladem pro zcela funkční interakci s příslušnými ligandy [32]. V nedávné době byla jeho aktivita také spojena s regulací apoptosy v savčích buňkách. Interakce této ATPasy s ubikvitinovaným faktorem I α f (z angl. **I**nterleukin-1 β -**c**onvertingenzyme-**p**rotease-**a**ctivating **f**actor) aktivuje kaspasu 8 a tvorbu vysokomolekulárních agregátů v cytosolu, které v důsledku vyvolávají buněčnou smrt [40].

Z funkčního hlediska tohoto proteinu nás však nejvíce zajímá jeho úloha při regulaci signalizace probíhající ve fotoreceptorech a dalších tkáních prostřednictvím interakce s fosducinem. SUG1 vázal s nejvyšší afinitou isoformy fosducinu PhLOPs a PhLPs (z angl. **P**hosducin-**L**ike **O**rphan **P**roteins a **P**hosducin-**L**ike **P**roteins) [5,43]. Obě skupiny těchto proteinů vykazují výraznou sekvenční podobnost s fosducinem, ale jsou tvořeny jeho odlišnými úseky. Na základě velké strukturní podobnosti mezi PhLP a fosducinem se odhaduje, že se jedná o regulátory G-proteinové signalizace ve tkáních mimo sítnici [18]. Isoformy z řady PhLOP nejsou schopny interakce s G β γ [44].

Nicméně jedna z těchto isoform PhLOP-1, která postrádá prvních 52 aminokyselin sekvence fosducinu, vázala SUG1 s vyšší afinitou než ostatní isoformy fosducinu.

Tyto výsledky naznačují, že vazby se SUG1 se účastní předně C-terminální doména fosducinu, ale s nutnou spoluprací některých úseků N-terminální domény. Jelikož SUG1 ovlivňuje funkci a zprostředkovává degradaci mnoha regulátorů transkripce, nelze vyloučit, že fosducin a jeho isoformy jsou také potencionálními účastníky tohoto procesu [5]. Skupina Barhite et al. dále prokázala, že při interakci s PhLP, dochází k jeho předchozí polyubikvitinylaci, která je předpokladem pro proteasomální degradaci. V těchto studiích však ještě panuje velká míra nejasností, kterou je nutno odhalit a potvrdit, že se jedná o zcela biologicky relevantní interakci [43].

2.4 CRX

CRX (z angl. Cone Rod Homeobox) je členem rozsáhlé rodiny transkripčních faktorů Otd/Otx (z angl. Orthodenticle nebo Orthodenticle homeobox) [45]. Myši OTX1 a OTX2 sdílí 86-88% homologii s CRX v oblasti homeodomény vázající DNA [46]. Jeho přítomnost byla zaznamenána především ve fotoreceptorech sítnice a šišince, kde se účastní regulace specifických genů s DNA vazebnými motivy TAATCC/A a TAATC/T v jejich promotorové oblasti [46,47].²

Mezi produkty exprese těchto genů ve fotoreceptorech patří např. opsin, β -fosfodiesterasa a arrestin [45]. Mutace genu kódujícího CRX jsou spojovány i s mnoha patologickými změnami v buňkách sítnice, souhrnně označovaných jako dystrofie. Nefunkční alely tohoto faktoru jsou příčinou nedokonalého vývoje vnějších segmentů tyčinek a snížené produkce místních proteinů, včetně nezastupitelného rhodopsinu. Všechny tyto děje mohou vést ke kompletní ztrátě vnějšího segmentu a následné smrti buněk [48].

Fylogenetickým prekurzorem savčích pinealocytů byly pineální fotoreceptorové buňky a proto se vyznačují i podobným fenotypem jako světločivné buňky sítnice. V pinealocytech je jeho funkce spojována s regulací exprese specifické noční ATPasy a enzymů serotonin N-acetyltransferasy, hydroxyindol-O-methyltransferasy, které se účastní biosyntézy melatoninu. Ke zvýšené expresi těchto proteinů dochází v noci (ve tmě), zatímco úroveň mRNA faktoru CRX se během cirkadiálního rytmu téměř nemění.

² TAATCC/A - sítnice; TAATC/T - epifyza

Jelikož je transkripce těchto genů iniciována zvýšením hladiny cAMP, je velmi pravděpodobné, že je podmíněna součinností více faktorů, nukleárních receptorů pro cAMP a CRX [47]. Funkce CRX je pak regulována až na úrovni postranlačních modifikací [4]. Nefunkční CRX v myši epifyze je důvodem významných rozdílů v expresi jednotlivých proteinů cirkadiálního rytmu ve srovnání s plně funkčním fenotypem tohoto faktoru [49]. Mnohonásobně zvýšená exprese tohoto faktoru u rakovinných buněk retinoblastomu a pineálního parenchymu naznačuje, že se jedná i o potencionální nádorový marker [50].

Tento transkripční faktor je v souladu s jeho funkcí převážně lokalizován v buněčném jádře a pouze malé množství bylo detekováno v cytosolu. Jeho distribuce v těchto buněčných kompartmentech se mění v závislosti na tom, zda jsou fotoreceptory adaptované na světlo či tmu. Na světle se jeho cytosolická koncentrace mírně zvyšuje [4].

Do interakce s fosducinem se patrně zapojuje N-terminální část dlouhá 178 aminokyselin, která zahrnuje homeodoménu. Na základě dostupných informací o jejich vzájemném působení byl navržen model interakce fosducinu s oběma ligandy, CRX a SUG1 (viz obr. 1.1, str. 12). Fosducin musí nejprve podstoupit částečnou proteolytickou degradaci skrze interakci se SUG1 za vzniku C-koncového oligopeptidu, který v této formě může vstoupit do jádra a vázat faktor CRX. Jelikož při této vazbě nedochází ke strukturním změnám v rámci DNA vazebné domény CRX, lze se domnívat, že výsledná inhibice transkripce je důsledek selhání interakce mezi CRX a důležitými koaktivátory pro ucelení celého transkripčního iniciačního komplexu. Nutnost primární proteolytické degradace fosducinu naznačuje, že jeho N-terminální část obsahuje sekvence, které striktně určují jeho buněčnou lokalizaci v cytosolu a brání tak jeho přesunu do jádra. Při odstranění C-koncových aminokyselin fosducinu se jeho afinita k CRX značně snížila [4].

Proteolytická degradace není žádným ojedinělým prostředkem likvidace nežádoucích účastníků signálních procesů. Dalším příkladem je již zmiňovaný enzym N-acetyltransferasa, který podléhá proteolýze v pinealocytech u subjektů adaptovaných na tmu při jejich náhlém vystavení světlu. Fyziologickým podnětem pro spuštění tohoto procesu je pokles intracelulárního množství cAMP [51].

Bližší poznání těchto vazebných partnerů fosducinu odkrylo jeho další funkce, které jsou patrně nezávislé na jeho regulační roli v G-proteinové signalizaci. Jedná se zejména o aktivní účast fosducinu a jeho isoformů při regulaci transkripce u kvasinek a v savčích buňkách.

Transaktivační funkce je spojena s aktivitou posledních 40 aminokyselin fosducinu, která jsou v celé struktuře maskovány a odkryty až jeho proteasomální degradací. Tato studie pomohla lépe objasnit funkce isoform PhLOP, které se převážně vyskytují v jádře [52].

2.5 Bakteriální exprese a purifikace rekombinantních proteinů

Jednotlivé přístupy k expresi a purifikaci proteinů závisí na míře dostupných informací o chování daného proteinu *in vitro*. Jelikož proteiny nelze vyrábět přímo chemickou syntézou jako běžné polymery, musíme využít této schopnosti u živých organismů. Prokaryotní expresní systémy představují vůbec nejběžnější a nejlevnější systém pro výrobu rekombinantních proteinů a vysoký výtěžek exprimovaného proteinu lze získat v relativně krátkém časovém období (cca 24 hodin). Samozřejmě má ale tento systém i řadu nevýhod a omezení, jako např. velikost produkovaných proteinů či absence složitějších posttranslačních modifikací [53]. Obecná strategie exprese rekombinantních proteinů v bakteriích je založena na transformaci bakterií vhodným expresním plasmidem, které jsou selektovány podle jejich antibiotikové rezistence a pěstovány v kultivačním médiu po dosažení adekvátní hustoty buněčné kultury. Indukcí exprese je vyvolána produkce cílového proteinu, který je dále izolován z bakteriální směsi proteinů prostřednictvím purifikačních metod. V rámci těchto postupů existuje mnoho parametrů, které lze libovolně měnit a jejich různými kombinacemi může být dosaženo optimálních výsledků.

2.5.1 Výběr expresního plasmidu

Již volba expresního plasmidu může zásadně ovlivnit schopnost produkce proteinu v bakteriích. Mezi nejdůležitější a nezbytné sekvence plasmidu patří *ori* místo (počátek replikace), promotor, operátor, Shine-Dalgarnova sekvence (ribosomální vazebné místo), terminátor, gen kódující represor, selekční marker a klonovací místo. Klonovací místo zahrnuje velké množství rozpoznávacích sekvencí pro restriční endonukleasy, které poté specificky vyštěpují daný klonovaný úsek [54]. Plasmidy se mezi sebou liší v sekvencích označovaných jako fúzní značky, které napomáhají purifikaci proteinů v několika směrech: (i) jednokroková izolace exprimovaného proteinu ze směsi všech bakteriálních proteinů; (ii) zvyšování stability proteinu a jeho rozpustnosti; (iii) minimální dopad na terciární strukturu proteinu; (iv) snadné odstranění fúzního partnera pro získání nativního proteinu [55]. Nejjednodušší a nejvíce využívanou fúzní sekvencí je histidinová kotva (6×His).

Izolace takových proteinů vyžaduje vysokou iontovou sílu pro zvýšení rozpustnosti a nízkou koncentraci imidazolu (0,8mM) v promývacím pufru pro odstranění nespecifických interakcí ostatních bakteriálních proteinů. Prostředí imidazolu je i nežádoucí pro další experimenty v oblasti NMR či krystalografii. V jiných případech může být protein izolován ve fúzi s větším dobře rozpustným proteinem, např. glutathion-S-transferasou nebo malým a vysoce hydrofilním proteinem G_B1 (B1 doména proteinu G ze streptokoka [55,56]. Malá velikost tohoto proteinu umožňuje podrobit ihned fúzní protein NMR spektroskopické analýze a stanovit tak jeho strukturní stav nebo studovat interakce s příslušnými ligandy [57,58]. Efektivní exprese těchto fúzních proteinů však nemusí být ještě zárukou podobného chování u nativního proteinu.

Mezi další kritéria hodná úvahy patří typ promotoru, kterým je exprese řízena. Exprese proteinu prostřednictvím vysoce účinné T7 RNA polymerasy patří k obvyklým přístupům pro zajištění vysokého výtěžku fúzního proteinu (až 50 % podíl celkového množství bakteriálních proteinů). Pro zamezení předčasné výroby proteinu pomocí T7 expresního systému je transkripce genu T7 polymerasy řízena lacUV5 promotorem s operátorovou sekvencí pro represor. Lac operátor je přítomný i v expresním plasmidu, čímž je plně zablokovaná syntéza proteinu našeho zájmu až do okamžiku inhibice represoru přidavkem isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) [59]. V některých případech je vhodné zvolit pozvolnější způsob exprese prostřednictvím *E.coli* RNA polymerasy, kdy je produkce proteinu řízena přímo lacUV5 promotorem nebo jejich hybridní účinnější formou (Ptrp a Ptac). Transkripce genu může být důsledkem zkrácení vzdálenosti mezi dvěma rozpoznávacími oblastmi promotoru zvýšena až 11 \times ve srovnání s PLacUV5 [60]. Existují i plasmidy, kde je exprese proteinu řízena T7 promotorem, ale není inducibilní. Tento způsob vychází ze známého mechanismu exprese lac operonů, kdy koncentrace glukózy v kultivačních médiích převyšuje množství laktózy. V takovém případě lze dosáhnout pomalé a efektivní exprese s vysokým výtěžkem při vyšší teplotě kultivace [61]. Příkladem takového plasmidu je pST39, který navíc umožňuje expresi několika genů najednou a může tak usnadnit tvorbu multimerních komplexů složených z více proteinů [62].

2.5.2 Expresní kmen bakterií a kultivační podmínky

Kultivační podmínky a vhodný expresní kmen bakterií může také posílit míru výroby proteinů. Pěstování bakterií je prováděno při 37°C nejčastěji v LB médiích, ve kterých musí být striktně dodržována koncentrace jednotlivých složek, aby nedošlo k opačnému efektu inhibice buněčného růstu [53].

Při indukci exprese proteinu je nutné tuto teplotu snížit, jinak by bylo téměř nemožné získat protein v solubilní formě. Ve většině případů je teplota snižována na 25°C, ale některé bakteriální kmeny umožňují jejich kultivaci při teplotách nižších než 13 °C. Nízká teplota má sice za následek snížení výtěžku, ale zvyšuje pravděpodobnost získání cílového proteinu v rozpustné a čisté formě [56, 63].

Mezi často využívané bakteriální expresní kmeny patří BL21(DE3) a Rosetta(DE3). Každá aminokyselina je kódována více než jedním kodonem a každý organismus preferuje pouze některé z nich. Pokud je exprese eukaryotních proteinů v BL21 doprovázena neúspěchem, je vhodné vyzkoušet kmen Rosetta s obsahem doplňkového plasmidu pRARE kódujícího transferové RNA, které jsou v bakteriích užívány sporadicky. Kultivace tohoto kmenu bakterií vyžaduje přítomnost dalšího antibiotika, chloramfenikolu [64]. Kompetentní buňky Arctic Express, které vyžadují speciální podmínky kultivace včetně rozdílného složení médií, byly upraveny pro expresi proteinů při nízké teplotě. V tomto systému jsou koexprimovány chaperoniny Cpn10 a Cpn60 odolné vůči nízkým teplotám, které napomáhají správnému sbalování proteinu do nativního stavu a zvýšení výtěžku [63]. Každý expresní kmen bakterií vyžaduje také odlišnou dobu kultivace pro získání nejpříznivějšího výtěžku [53].

2.5.3 Další prostředky k dosažení lepších výsledků při purifikaci

Přestože byly splněny veškeré předchozí podmínky pro zajištění efektivní exprese fúzních proteinů, stále se může projevit jejich nízká stabilita a agregace v dalších etapách jejich purifikace. Tvorba agregátů a s tím spojená ztráta biologické aktivity bývá nejčastějším problémem při výrobě proteinu. Nejčastějšími příčinami agregace je vystavení hydrofobních skupin na povrchu, interakce mezi náboji a oxidace cysteinů [65]. Každý fúzní protein vyžaduje při purifikaci jiné složení pufru, které lze obměňovat a doplňovat dalšími účinnými prostředky pro dosažení nejlepších výsledků.

Jedním z přístupů pro prevenci agregace je např. stabilizace nativních intramolekulárních proteinových interakcí přidávkem různých kosmotropních činidel, jako např. síranu amonného. Dále je možné zvýšit rozpustnost proteinů pomocí redukčních činidel β -merkaptoethanolu nebo dithiothreitolu, které brání tvorbě nežádoucích disulfidických můstků. Důležité je zvolit vhodnou koncentraci těchto činidel. Nepřiměřeně vysoká koncentrace chaotropních činidel ($MgCl_2$, NaBr, urea) může vyvolat denaturaci proteinů a kosmotropy mohou zapříčinit jejich precipitaci [65].

V některých případech se protein nachází pouze v nerozpustné formě inkluzních tělísek [59]. Zvýšenou rozpustnost takových proteinů může ovlivnit přítomnost močoviny nebo guanidin hydrochloridu, která je však doprovázena jejich denaturací [55]. Postup renaturace však nezaručuje, že se protein bude nacházet ve svém nativním stavu a vykazovat plnou biologickou aktivitu [59].

Při studiu membránových receptorů, je vhodné při purifikaci použít detergenty, které zabraňují jejich oligomerizaci, zlepšují rozpustnost a napomáhají tvorbě velmi fixního strukturního stavu. Chaperony v živém systému však napomáhají tvorbě specifického konformačního stavu, který vykazuje mnohem vyšší vazebnou aktivitu k příslušným ligandům než jeho protějšek získaný renaturací *in vitro* [66].

3 CÍL PRÁCE

➤ **Vyvinutí a optimalizace expresního a purifikačního protokolu proteinu SUG1**

- Příprava expresních konstruktů lidského proteinu SUG1 v expresních plasmidech pET-29b a pRSFDuet-1
- Test exprese připravených konstruktů v expresních kmenech bakterií BL21(DE3) nebo Rosetta (DE3)
- Exprese a purifikace fúzních proteinů SUG1
 - s GST na N-konci SUG1
(expresní konstrukt SUG1/pGEX-4T-1)
 - s 6×His na C-konci SUG1
(expresní konstrukty SUG1/pET-29ba SUG/pST39)
 - s 6×His a G_B1 proteinem na N-konci SUG1
(expresní konstrukt SUG1/pRSFDuet-1)

➤ **Základní biofyzikální charakterizace lidského SUG1**

- Stanovení vnější struktury částic a jejich velikosti měřením rozptylu světla, ověření stability proteinu, srovnání jeho chování *in vitro* s jeho protějšky z jiných druhů

4 METODY A MATERIÁL

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

1,4- dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Německo
β-merkptoethanol (βME)	Sigma-Aldrich, USA
agarosa GTQ	Carl Roth GmbH, Německo
ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
bis-akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
bromfenolová modř	Carl Roth GmbH, Německo
Coomassie Brilliant blue R 250	LKB Bromma, Švédsko
dihydrát ethylendiamintetraoctanu disodného (Na ₂ -EDTA· 2H ₂ O)	Lachema, s.r.o, Česká republika
DNA oligonukleotidy	Generi Biotech, s.r.o., Česká republika
dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth GmbH, Německo
ethanol	PENTA - Ing. Petr Švec, Česká republika
fenylmethylsufonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH, Německo
formaldehyd	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
GelRed	New England BioLabs, USA
Gene Ruler 1 kB DNAladder	Fermentas, Kanada
glutathion (redukovaný)	Sigma-Aldrich, USA
glycerol	PENTA - Ing. Petr Švec, Česká republika
glycin	Carl Roth GmbH, Německo
hexahydrát síranu nikelnatého (NiSO ₄ · 6H ₂ O)	PENTA - Ing. Petr Švec, Česká republika
hydroxid sodný	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
chloramfenikol	Sigma-Aldrich, USA
imidazol	Carl Roth GmbH, Německo
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	EMD Biosciences, Inc., Německo

kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
isopropylalkohol	Genomed, Německo
kyselina boritá	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
kyselina chlorovodíková	PENTA - Ing. Petr Švec, Česká republika
kyselina octová	PENTA - Ing. Petr Švec, Česká republika
Loading-Dye	New England BioLabs, USA
Luria-Bertani (LB) agar	Carl Roth GmbH, Německo
Luria-Bertani (LB) médium	Carl Roth GmbH, Německo
lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
methanol	PENTA - Ing. Petr Švec, Česká republika
mix deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP)	Thermo Scientific, USA
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
PCR Master Mix	Thermo Scientific, USA
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, USA
Phusion High-Fidelity DNA polymerase	New England BioLabs, USA
Precision Plus ProteinDual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, USA
pufr BamHI	Fermentas, Kanada
pufr O	Fermentas, Kanada
pufr pro PfuUltra HF DNA polymerase	Stratagene, USA
pufr HF pro Phusion HF DNA polymerase	New England BioLabs, USA
pufr Rapid ligation buffer	Thermo Scientific, Litva
restrikční enzymy	Fermentas, Kanada
T4 DNA ligase	Fermentas, Kanada
thrombin	Sigma-Aldrich, USA
Tergitol (70 % NP-40)	Sigma-Aldrich, USA
tetraethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Německo
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Německo

4.1.2 Přístroje

3505 pH Meter	Nova Capital Ltd, UK
horizontální elektroforéza	Sigma-Aldrich, USA
centrifuge 5418	Eppendorf, Německo
elektrický vařič	Eta, Česká republika
HPLC-AKTA	Amersham Biosciences, Švédsko

laboratorní váhy HF-200g	And, USA
Sigma 8K Floorstanding Refrigerated Centrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Německo
peristaltická pumpa	IDEX Health&Science SA, Švýcarsko
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies, USA
Sonicator 3000	Misonix, USA
Termoblok	Grant, UK
termocykler Mastercycler Personal	Eppendorf, Německo
termostat BT 120M	Laboratorní přístroje, Česká republika
transiluminátor UVT-14M	Herolab GmbH, Německo
třepačka Gallenkamp Orbital Incubator	Gemini BV, Holandsko
třepačka Multitron	Infors AG, Švýcarsko
vodní lázeň	Memmert GmbH, Německo
vertikální elektroforéza	Bio-Rad Laboratories, USA
vortex RX ³	Velp Scientifica, Itálie
zdroj napětí pro elektroforézu	Consort E143, Belgie
zařízení pro měření rozptylu světla	ALV GmbH, Německo

4.1.3 Ostatní materiál

automatické pipety	Eppendorf, Německo
dialyzační membrána (typ 27/32)	Carl Roth GmbH, Německo
Escherichia coli BL21(DE3)	Stratagene, USA
Escherichia coli DH5α (TOP10)	Stratagene, USA
Escherichia coli Rosetta (DE3)	Stratagene, USA
filtry Spartan 13/0,45 RC	GE Healthcare, USA
GeneJET Gel extraction kit	Thermo Scientific, Litva
GeneJET PCR purification kit	Thermo Scientific, Litva
GeneJET Plasmid Miniprep kit	Thermo Scientific, Litva
GlutathioneSephrose4 Fast Flow	Amersham Biosciences, Švédsko
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
kolona Hiload 26/60 Superdex 200 pg	GEHealthcare, USA
kolona Superdex 200 (10/300 GL)	GEHealthcare, USA
kolona pro afinitní chromatografii	Bio-Rad Laboratories, USA
koncentrátory Amicon Ultra	EMD Millipore, USA

křemenné kyvety	Lightpath Optical Ltd., UK
mikrozkumavky	Eppendorf, Německo
nylon mebrane filters 0,45 µm	GE Healthcare, USA
plasmid pET-29b(+)	Novagen, USA
plasmid pRSFDuet-1	dar od Dr. Evžena Bouří, NIH, USA
stříkačky	Chirana T. Injecta, a.s., Slovensko
plastové zkumavky	Carl Roth GmbH, Německo

4.2 Příprava expresních konstruktů

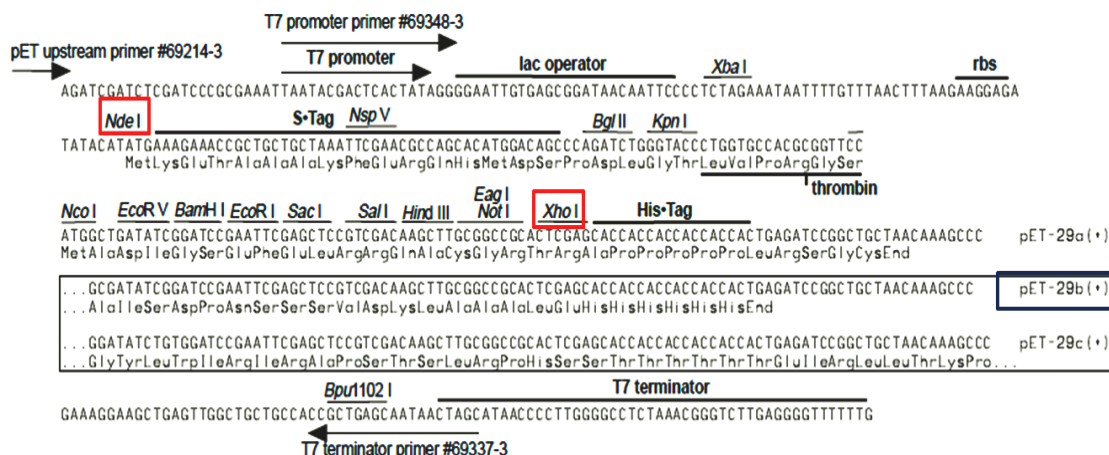
4.2.1 Plasmidy

Plasmid je kruhová molekula dvoušroubovicové DNA schopná autonomní replikace. V molekulární biologii se jedná o hojně používaný vektor pro přípravu expresních konstruktů a produkci proteinů v bakteriích. Pro vložení genu do určitého plasmidu je nutné zvolit vhodná restrikční místa, přičemž při jejich volbě jsou zvažovány především dva parametry. Prvním z nich je skutečnost, že nedochází ke štěpení sekvence genu uvnitř řetězce a dalším požadavkem jsou shodné reakční podmínky (např. použití stejného pufru, ve kterém oba enzymy prokazují dostatečnou aktivitu). Vhodné je též vybrat enzymy, které po štěpení netvoří tzv. tupé konce, kvůli možné nižší účinnosti následné ligace štěpeného produktu PCR a plasmidu.

Pro integraci genu proteinu SUG1 do plasmidové DNA byly vybrány plasmidy pET29-b a pRSFDuet-1. Oba vektory obsahují selekční znak, který zajišťuje jejich rezistenci vůči kanamycinu. Po vložení cizí DNA proteinu do vektoru pET-29b (viz obr. 4.1, str. 35) je produktem exprese fúzní protein s afinitní kotvou v podobě motivu šesti histidinů v řadě (6×His) na C-konci proteinu, který však nelze odstranit. Dále lze u tohoto plasmidu využít schopnosti exprimovat fúzní proteiny značené tzv. S-tagem. Jedná se o 15 aminokyselin dlouhý oligopeptid odvozený od ribonukleasy A, který díky vysokému obsahu polárních a nabitých aminokyselin zvyšuje rozpustnost produkovaného proteinu. Pro plasmid pET-29b byla zvolena dvě vhodná restrikční místa pro endonukleasy NdeI a XhoI:

NdeI: 5'-CATATG-3'

XhoI: 5'-CTCGAG-3'



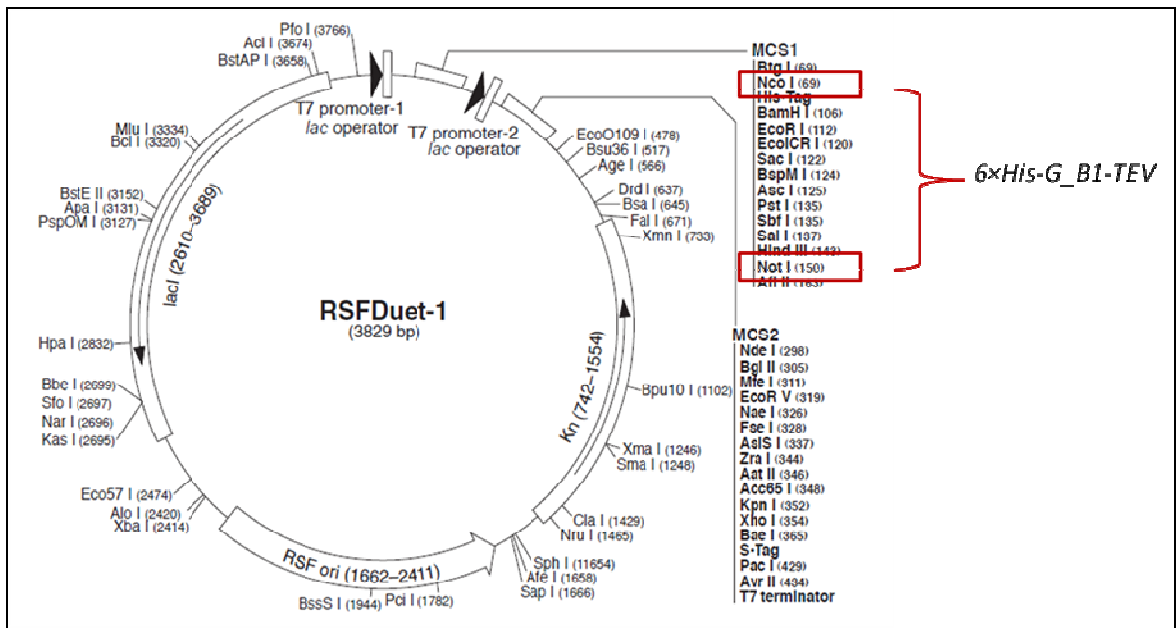
Obr. 4.1 Klonovací místo plasmidu pET-29a-c (+) s vyznačenými restrikčními místy pro vnesení cDNA sekvence *SUG1* [67].

Vektor pRSFDuet-1 (viz obr. 4.2, str. 36) byl upraven tak, že k N-konci produkovaného proteinu je připojen His-tagem značený protein G_B1, který výrazně zvyšuje rozpustnost a stabilitu fúzního proteinu při jeho expresi a purifikaci.³ Mezi proteinem a G_B1 je umístěno štěpné místo pro TEV- proteasu. Jako vhodné restrikční enzymy u tohoto plasmidu byly zvoleny BamHI a NotI, které štěpí sekvence:

BamHI: 5'-GGATCC-3'

NotI: 5'-GCGGCCGC-3'

³ G_B1 protein – viz 2.5.1



Sekvence 6×His-G_{B1}-TEV:

ATGAACAGCAGCCATCACCATCATCACCACATGCAGTACAAGCTTATCCCTGAACGGTAAAACCCTG
 AAAGGTGAAACCACCACCGAAGCTGTTCGACGCTGCTACCGCGGAAAAAGTTTTCAAACAGTACGCT
 AACGACAACGGTGTGTGACGGTGAATGGACCTACGACGACGCTACCAAACCTTCACGGTAACCGAA
 AATAATAACAACAATAACAACAACAATGAAAACCTGTATTTTTCAGGGCGCCATGGGATCCTGC
 AGGCGGCCGC

Obr. 4.2 Mapa plasmidu *pRSFDuet-1* a sekvence upravené verze 6×His-G_{B1}-TEV/*pRSFDuet-1* v *NcoI*+*NotI* místě. *NcoI* bylo odstraněno a vloženo na C konec, dále bylo vneseno na C-konec štěpné místo pro TEV proteasu a celý protein označen na N-konci histidinovou kotvou (6×His). Prvky sekvence jsou rozlišeny barevně: histidinová kotva, sekvence G_{B1} proteinu, linker, štěpné místo pro TEV proteasu, klonovací místo s restrikními místy pro enzymy *NcoI*, *BamHI*, *PstI* a *NotI*. Mapa plasmidu byla převzata a upravena z [68].

4.2.2 Vnesení plasmidové DNA do bakterií metodou tepelného šoku

Jedním z hlavních metodických postupů pro vnesení plasmidové DNA do bakterií za účelem její přípravy je bakteriální transformace. Jedná se o typ horizontálního přenosu volných molekul DNA bez přímého kontaktu mezi buňkami [69]. V praxi k transformaci dochází zpravidla užitím metody tepelného šoku, kdy jsou kompetentní buňky bakterií po určité době vystaveny teplotnímu šoku, což způsobí vznik trhlin v buněčném povrchu a buňky jsou schopné přijmout exogenní DNA. Pro klonování byl použit kmen bakterií *E. coli* DH5 α -TOP10.

Ke 45 μ l kompetentních buněk *E. coli* (kmen DH5 α -TOP10, expresní kmen BL21(DE3), Rosetta(DE3)) chlazených na ledu bylo přidáno 0,5 μ l plasmidové DNA. Následovala inkubace na ledu po dobu 20 minut a dále vystavení tepelnému šoku, kdy byla směs vložena do termolázně o teplotě 42 °C po dobu 45 sekund. Poté byla směs znovu umístěna do ledové lázně na 1 až 2 minuty a k ní přidán 1 ml LB média bez antibiotika. Buněčná kultura byla inkubována při 37 °C 45 minut.

4.2.3 Kultivace bakterií na LB-agaru

Buněčná suspenze z předchozí inkubace byla centrifugována na mikrocentrifuze Eppendorf 5418 (max. 18 \times 3,75g) při 3000 ot/min po dobu 2 minut a následně odstraněna větší část supernatantu. Ve zbytku média byla peleta buněk resuspendována, nanesena na agarové misky s příslušným antibiotikem a kultivována přes noc při 37 °C. Antibiotikovou rezistenci vybraných expresních plasmidů shrnuje tab. 4.1.

Tab. 4.1 Antibiotiková rezistence vybraných expresních plasmidů

expresní plasmid	antibiotiková rezistence
pET-29b, pRSFDuet-1	kanamycin
pGEX-4T-1, pST39	ampicilin

4.2.4 Příprava miniprepů

Do skleněných zkumavek bylo odměřeno 5 ml sterilního LB média a přidáno 5 μ l zásobního roztoku antibiotika (viz tab. 4.2, str. 38). Tato LB média byla očkována přes noc inkubovanou buněčnou kulturou na agarových miskách. Připravené miniprepy byly inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C a 200 ot/min.

Tab. 4.2 *Koncentrace zásobních roztoků antibiotik a jejich konečná koncentrace v kultivačních médiích*

antibiotikum	koncentrace zásobního roztoku	konečná koncentrace
kanamycin	30 mg/ml	30 µg/ml
ampicilin	100 mg/ml	100 µg/ml
chloramfenikol	34 mg/ml	34 µg/ml

4.2.5 Minipreparace plasmidové DNA

Přes noc inkubovaná inokula bylo nutné nejprve mírně homogenizovat, aby se část sedimentovaných bakterií přenesla do celé suspenze. Miniprepy byly postupně přeneseny do mikrozkušavek a centrifugovány na mikrocentrifuze (Eppendorf 5418) při 4000 ot/min vždy po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl vždy odstraněn supernatant, aby byla získána pouze čistá peleta bakteriálních buněk. Následovala vlastní izolace DNA pomocí speciálního kitu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Litva), která vždy zahrnuje několik kroků dle uvedeného protokolu. V první fázi byla peleta resuspendována v 250 µl resuspendačního roztoku, do kterého je při prvotní adjustaci kitu nutné přidat RNasu A. Dále bylo přidáno 250 µl lyzačního roztoku a směs důkladně promíchána bez použití vortexu, aby nedošlo k nežádoucímu uvolnění chromozomální DNA z buněk. Výsledkem je viskózní suspenze. V poslední fázi bylo přidáno 350 µl neutralizačního roztoku, kdy bylo nutné směs ihned promíchat několikanásobným převrácením mikrozkušavky. Pro odstranění buněčného odpadu a chromozomální DNA byla směs centrifugována (Eppendorf 5418) cca 5 minut při 13000 ot/min. Supernatant, který obsahuje uvolněnou plasmidovou DNA, byl přenesen na GeneJET kolonu, přičemž je nutné se vyhnout odebrání části bílého precipitátu. Následovala centrifugace při stejné rychlosti, ale pouze po dobu 1 minuty. Protečený roztok byl odstraněn a kolona znovu vložena do sběrné zkumavky. Na kolonu bylo dále pipetováno 500 µl promývacího roztoku, který byl odstraněn další centrifugací za stejných podmínek. Krok promývání byl opakován a kolona pak byla centrifugována další 1 min pro odstranění možných zbytků ethanolu. Pro eluci byla kolona přenesena do čisté mikrozkušavky a na membránu bylo pipetováno 50 µl elučního pufru nebo ohřáté (60°C) sterilní destilované vody (množství elučního pufru či vody lze měnit v závislosti na tom, jak koncentrovaný roztok DNA požadujeme; neměl by být však nižší než 30 µl, aby nedošlo ke ztrátám navázané DNA).

Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 2 minut a centrifugace další 2 minuty. Získaný eluát obsahoval purifikovanou plasmidovou DNA.

4.2.6 Amplifikace genu lidského SUG1

K namnožení sekvence DNA určitého genu nebo jeho úseku se používá metoda zvaná polymerasová řetězová reakce (**P**olymerase **C**hain **R**eaction = PCR). Touto technikou lze získat miliardy kopií jakékoliv sekvence DNA v krátkém časovém horizontu, cca 2 hodin. Výhodou této metody je, že postačuje znát pouze začátek a konec amplifikovaného úseku, aby bylo možné navrhnout primery, podle kterých pak DNA polymerasa syntetizuje nově vznikající vlákna. Metoda je tedy založená na principu replikace DNA v živých buňkách [9].

Prakticky se jedná o opakující se cyklus sestavený z několika kroků, při nichž dochází k teplotním změnám ve stanovených časových intervalech. Stručná charakteristika jednotlivých fází cyklu je uvedena u metodiky amplifikace SUG1.

PCR má řadu aplikací, ale prvotně se využívá při klonování úseků DNA nebo RNA. Prvním krokem při tomto procesu je výběr vhodného vektoru, do kterého má být daný gen vložen, v tomto případě bakteriální plasmid pET-29b a pRSFDuet-1. Dalším krokem je tedy již zmíněný návrh primerů, krátkých oligonukleotidů, které jsou komplementární k opačným koncům připravovaného úseku a tvoří jeho hranice. Při jejich návrhu je nutné respektovat několik požadavků, z nichž nejdůležitější jsou:

- 1) daný pár primerů by měl mít podobnou teplotu tání
- 2) nesmí tvořit stabilní dimery či vlásenky v oblasti použitých teplot

Pro kontrolu všech těchto parametrů existuje mnoho internetových aplikací. V tomto případě byl používán Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com>)

Primer, který začíná jako 5'-konec příslušné sekvence, se označuje jako kódující (FW) Druhý primer, který je komplementární k 3'-konci sekvence, se nazývá jako antikódující (REV). Zároveň je nutné, aby tyto oligonukleotidy obsahovaly odpovídající restriční místo, popř. stop kodon. Na základě nukleotidové sekvence SUG1 (Příloha A) byly pro vložení tohoto genu do dvou různých plasmidů navrženy čtyři oligonukleotidy (viz tab. 4.3, str. 39).

Tab. 4.3 Oligonukleotidy pro amplifikaci genu lidského *SUG1* pro jeho vnesení do plasmidu *pET-29b* a *pRSFDuet-1*. Podtržením jsou vyznačena restriční místa.

oligonukleotidy	Sekvence 5' → 3'
SUG1pET-29b FW	AGTTACGAT <u>CATATGGCGCTTGACGGACCAGAGCAGATG</u> GAG
SUG1pET-29b REV	TAGACT <u>CTCGAGCTTCCATAAATTTCTTGATGGACATGTTTTTCTC</u>
SUG1pRSFDuet-1 FW	AATTATAGTTAC <u>GATCCATGGCGCTTGACGGACCAGAGCAGATGGAG</u>
SUG1pRSFDuet-1 REV	AGCTGCAT <u>GCGGCCGCTACTTCCATAAATTTCTTGATGGACATGTTTTTCTC</u>

Oligonukleotidy jsou dodávány v lyofilizované podobě a v příložených instrukcích je vždy uvedeno ředění na požadovanou koncentraci 0,1 mmol/dm³. Z těchto zásobních roztoků byly dalším ředěním (1:19) připraveny roztoky o koncentraci 5 μmol/dm³ v celkovém objemu 200 μl.

Výsledná reakční směs pro provedení PCR obsahovala templát DNA (rekombinantní plasmid *SUG1/pQCXIP*), primery, soubor deoxyribonukleosid trifosfátů (mix dNTP, Thermo Scientific, USA), pufr a termofilní DNA polymerasu. Pro zaklonování genu *SUG1* do plasmidu *pET-29b* byla pro amplifikaci *SUG1* použita Pfu Ultra High Fidelity (HF) DNA polymerasa (Stratagene, USA) a při klonování do *pRSFDuet-1* Phusion HF DNA polymerasa (New England BioLabs, USA). Protokoly pro přípravu reakční směsi a podmínky PCR pro obě použité polymerasy se liší a jsou uvedeny níže.

1) Protokol pro amplifikaci genu *SUG1* pro jeho vnesení do plasmidu *pET-29b*

Tab. 4.4 Složení PCR reakční směsi v přítomnosti Pfu Ultra HF DNA polymerasy v objemu 50 μl

látko	odměřený objem	konečná koncentrace
sterilní destilovaná voda	37 μl	
10 × Pfu Ultra pufr	5 μl	1×
25mM mix dNTP	1 μl	500 μmol/dm ³
5μM primer <i>SUG1pET-29b</i> FW	2 μl	0,2 μmol/dm ³
5μM primer <i>SUG1pET-29b</i> REV	2 μl	0,2 μmol/dm ³
10× zředěný roztok templátové DNA	2 μl	< 250 ng
Pfu Ultra HF DNA polymerasa	1 μl	2,5U/50 μl PCR

Směs pro PCR (viz tab 4.4, str. 40) byla namíchána do tenkostěnných mikrozkušavek, přičemž bylo nezbytné přidat DNA polymerasu až v posledním kroku, těsně před zahájením PCR, aby se zabránilo nesespecifickým reakcím při laboratorní teplotě. Pro správný průběh bylo dále nutné zajistit, aby veškerá kapalina byla usazená na dně mikrozkušavky a proto byla případně podrobena krátkodobé centrifugaci. Zkušavka byla následně vložena do termocyklu Mastercycler (Eppendorf, Německo), kde byly nastaveny následující podmínky reakčního cyklu

1. Iniciační denaturace	95 °C	2 min
2. Denaturace	95 °C	30 s
3. Nasedání („annealing“) primerů	55 °C	30 s
4. Elongace	72 °C	2 min
5. Finální elongace	72 °C	10 min
6. Úschova v termocyklu	4 °C	

Cyklus kroků 2-4 se 25× opakoval.

Jedinou proměnnou při PCR s užitím určité DNA polymerasy je teplota nasedání primerů, která kolísá mezi 45-65 °C v závislosti na dané sekvenci. Dobrým měřítkem pro prvotní volbu teploty „annealingu“ je získaná teplota tání primerů (T_m), která se pohybuje pouze několik málo stupňů nad zvolenou teplotou.

2) Protokol pro amplifikaci genu SUG1 pro jeho vnesení do plasmidu pRSFDuet-1

V případě přípravy insertu SUG1 pro jeho vložení do plasmidu pRSFDuet-1 bylo postupováno stejným způsobem s výjimkou použití jiné DNA polymerasy, která pro svou správnou aktivitu vyžaduje odlišné podmínky.

Tab. 4.5 Složení PCR reakční směsi v přítomnosti Phusion HF DNA polymerasy v objemu 50 μ l

látka	odměřený objem	konečná koncentrace
sterilní destilovaná voda	27,5 μ l	
5 \times Phusion HF pufr	10 μ l	1 \times
10mM mix dNTP*	1 μ l	200 μ mol/dm ³
5 μ M primer SUG1pRSFDuet-1 FW	5 μ l	0,5 μ mol/dm ³
5 μ M primer SUG1pRSFDuet-1 REV	5 μ l	0,5 μ mol/dm ³
10 \times zředěný roztok templátové DNA	1 μ l	< 250 ng
Phusion HF DNA polymerasa	0,5 μ l	1U/50 μ l PCR

*připraveny ředěním zásobního 25 mM roztoku dNTP

Reakční směs (viz tab. 4.5) v mikrozkuhavce byla podrobena reakci v termocykleru při těchto podmínkách:

1.	98 °C	2 min	
2.	98 °C	10 s	} 25 \times
3.	45 °C	30 s	
4.	72 °C	90 s	
5.	72 °C	10 min	
6.	4 °C		

4.2.7 Horizontální agarosová elektroforéza DNA

Po vykonání PCR byly vzorky reakční směsi podrobny elektroforetické separaci v agarosovém gelu. Při tomto procesu dochází k dělení nabitých molekul DNA na základě jejich pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli, kdy menší molekuly putují dále než větší.

Tab. 4.6 Složení 1% (w/v) agarosového gelu

látka	odměřené množství
agarosa	0,6 g
Gel Red ⁴	0,4 µl
1× TBE pufr	60 ml

Složení 10×TBE pufru (pH = 8): 890mM Tris-base; 890mM kyselina boritá; 20mM Na₂-EDTA·2H₂O

Polymerace agarosového gelu o daném složení (viz tab. 4.6) trvala cca 0,5 hodiny. Po uplynulé době byl gel přenesen do aparatury pro elektroforézu, kterou bylo nutné naplnit 1× TBE pufr (viz výše) tak, aby byl celý gel ponořen. Do první vzorkové jamky byl nanášen standard Gene Ruler 1 kB DNA Ladder (Fermentas, Kanada), který obsahuje fragmenty DNA o známé velikosti a do dalších pak vzorky PCR reakční směsi. Tyto vzorky byly vždy připraveny smísením 7 µl sterilní destilované vody, 3 µl PCR směsi a 3 µl nanášecího barviva Loading-Dye (New England BioLabs, USA). Elektroforéza probíhala při napětí 100V. Gel byl vizualizován v UV transiluminátoru UVT-14 M (Herolab GmbH, Německo).

4.2.8 Purifikace produktu PCR

Po ověření výsledku PCR prostřednictvím horizontální agarosové elektroforézy je nutné získanou DNA purifikovat. K tomuto účelu existují komerčně dostupné kity. V tomto případě byl použit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Litva) a bylo postupováno přesně dle přiloženého protokolu. Podle množství PCR směsi byl přidán stejný objem DNA vazebného pufru v poměru 1:1, směs promíchána převrácením mikrozkušavky a přenesena na GeneJET kolonu. Následovala centrifugace na centrifuze Eppendorf 5418 při 13000 ot/min po dobu 1 minuty. Protečený roztok byl odstraněn a kolona navracena do jímací zkušavky. V dalším kroku bylo nanášeno na kolonu 700 µl promývacího pufru a ten byl odstraněn další centrifugací při stejných podmínkách. Kvůli možným přebytkům ethanolu byla prázdná kolona podrobena další centrifugaci. V závěru byla kolona přenesena do čisté mikrozkušavky a na membránu pipetováno 50 µl elučního pufru, popř. ohřáté (60°C) sterilní destilované vody. Čistý eluát produktu PCR byl získán v závěrečném centrifugačním kroku.

⁴fluorescenční interkalační barvivo užívané k detekci nukleových kyselin

4.2.9 Štěpení produktu PCR a plasmidu

Pro začlenění cizího genu do molekuly plasmidu je nutné obě sekvence štěpit stejnými restrikčními endonukleasami.

1) Štěpení plasmidu pET-29b a amplifikované sekvence DNA proteinu SUG1 pro její vnesení do tohoto plasmidu

Pro štěpení byly použity restrikční endonukleasy NdeI a XhoI v prostředí pufru O (Fermentas, Kanada). V tomto pufru enzym XhoI vykazuje minimálně 50 % účinnost štěpení, a proto bylo nutné jeho množství ve směsi dvojnásobně navýšit. Zároveň však musí být splněn požadavek, aby celkové množství enzymů nepřesahovalo 10 % celkového objemu reakční směsi.

Reakční směs pro štěpení plasmidu pET-29b (viz tab. 4.7) i odpovídajícího produktu PCR (viz tab. 4.8) byla inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynulé době bylo k reakční směsi štěpeného plasmidu přidáno 3,5 µl nanášecího barviva LD a dále byla rozdělena do dvou mikrozkuvek po 8 µl. Takto připravené vzorky byly nanášeny na agarosový gel pro provedení preparativní horizontální agarosové elektroforézy (viz 4.2.7, str. 42).

Tab. 4.7 Složení reakční směsi pro štěpení plasmidu pET-29b

látko	odměřený objem
plasmidová DNA	5 µl
sterilní voda	5 µl
pufr O	1,3 µl
enzym NdeI	0,4 µl
enzym XhoI	0,8 µl

Tab. 4.8 Složení reakční směsi pro štěpení PCR produktu SUG1 pro plasmid pET-29b

látko	odměřený objem
purifikovaný produkt PCR	10 µl
pufr O	1,3 µl
enzym NdeI	0,4 µl
enzym XhoI	0,8 µl

Složení pufru 1×O: 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5); 10mM MgCl₂; 100mM NaCl; 0,1 mg/ml BSA (dostupné na www.thermoscientific.com)

Kvůli možným větším ztrátám při izolaci z gelu byl štěpený produkt PCR purifikován pomocí GeneJET PCR Purification Kit (viz 4.2.8, str. 43). Pro eluci bylo použito 50 µl ohřáté sterilní destilované vody.

2) Štěpení plasmidu pRSFDuet-1 a amplifikované sekvence DNA proteinu SUG1 pro její vnesení do tohoto plasmidu

Při štěpení tohoto plasmidu a odpovídajícího produktu PCR byly použity restrikční endonukleasy BamHI a NotI v prostředí pufru BamHI (Fermentas, Kanada), který byl při této kombinaci enzymů vybrán jako nejvíc vhodný. Nižší účinnost štěpení enzymu NotI v prostředí tohoto pufru bylo nutné kompenzovat jeho vyšším množstvím v reakční směsi.

Tab. 4.9 *Složení reakční směsi pro štěpení plasmidu pRSFDuet-1*

látka	odměřený objem
plasmidová DNA	10 µl
sterilní voda	10 µl
pufr BamHI	2,6 µl
enzym BamHI	0,8 µl
enzym NotI	1,2 µl

Tab. 4.10 *Složení reakční směsi pro štěpení PCR produktu SUG1 pro plasmid pRSFDuet-1*

látka	odměřený objem
purifikovaný produkt PCR	20 µl
pufr BamHI	2,2 µl
enzym BamHI	0,6 µl
enzym NotI	1,2 µl

Složení pufru 1× BamHI: 10mM Tris-HCl (pH = 8); 5mM MgCl₂; 100mM KCl; 0,02% Triton X-100; 0,1 mg/ml BSA (www.thermoscientific.com)

Reakční směs štěpeného produktu PCR (viz tab. 4.10, str. 45) byla inkubována při 37 °C přes noc a další den byla štěpená DNA izolována přes kolonu (GeneJET PCR Purification Kit, viz 4.2.8, str. 43) Pro eluci bylo použito 40 µl elučního pufru. Plasmidová DNA byla štěpena při stejné teplotě po dobu 1 hodiny. Po této době bylo ke směsi s plasmidovou DNA (viz tab. 4.9, str. 45) přidáno 7,4 µl vzorkovacího barviva Loading Dye. Směs byla rozdělena do 4 mikrozkušavek po 8 µl a podrobena horizontální agarosové elektroforéze jako v předchozím případě.

4.2.10 Gelová extrakce a izolace plasmidové DNA

Po provedení horizontální agarosové elektroforézy následovala izolace plasmidové DNA. Izolace byla provedena prostřednictvím GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Litva) dle postupu v příloženém návodu. Gel byl přenesen na transiluminátor, kde byly vizualizovány zóny štěpeného plasmidu, které byly následně vyříznuty, tak aby se minimalizoval objem okolního agarosového gelu. Kousky gelu byly přeneseny do předem zvažných mikrozkušavek a poté znovu zvaženy. K danému množství gelu byl přidán stejný objem vazebného pufru v poměru 1:1 (w:v). Směs byla inkubována v termobloku při 50 °C po dobu 10 až 15 min dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy. Roztok byl přenesen na GeneJET kolonu, která byla centrifugována při 13000 ot/min (Eppendorf 5418) po dobu 1 minuty. Protečený roztok byl odstraněn a kolona navrácena do sběrné zkumavky. Na kolonu bylo nanášeno 700 µl promývacího pufru, který byl odstraněn další centrifugací za stejných podmínek. Pro odstranění zbylého roztoku následoval ještě jeden centrifugační krok. Pro eluci byla kolona přenesena do čisté mikrozkušavky a na membránu bylo pipetováno 50 µl elučního pufru. Eluát štěpené plasmidové DNA byl získán finální centrifugací při stejných podmínkách.

4.2.11 Ligace

Při klonování bývá ligace DNA častým problematickým krokem. V tomto procesu dochází ke spojení štěpených sekvencí plasmidové DNA a sekvence genu, který má být do plasmidu začleněn. Jako vedlejší produkt této reakce však vzniká i samotný plasmid a proto je nutné zajistit, aby v ligační směsi obsah DNA daného genu výrazně převyšoval množství plasmidu. Vlastní ligace je opět založena na pochodech probíhajících v živém organismu, kde se daného procesu při replikaci účastní enzym DNA ligasa.

Tento enzym katalyzuje spojení mezi 3'- koncem štěpeného řetězce a 5'- konce dalšího řetězce tvorbou fosfodiesterové vazby. Spojení dvouvláknových řetězců štěpených restrikcími endonukleasami, které vytváří lepivé konce, je posíleno tvorbou vodíkových vazeb mezi komplementárními úseky.

Směs, která obsahovala štěpenou sekvenci plasmidu a amplifikovanou sekvenci genu, pufr pro T4- DNA ligasu (Rapid ligation Buffer - Thermo Scientific, Litva) a enzym T4-DNA ligasu (Fermentas, Kanada), byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 0,5 až 1 hodiny (při špatném průběhu ligace možno inkubaci prodloužit přes noc či směs umístit do termostatu na 1 hodinu při 37 °C). Po uplynulé době byla veškerá směs vnesena do kompetentních buněk E.Coli DH5 α -TOP10 (viz 4.2.2, str. 37). Následovalo nanesení na agarové misky s kanamycinem a kultivace bakterií přes noc (viz 4.2.3, str. 37). Složení ligačních směsí je shrnuto v tab. 4.11 a 4.12.

Tab. 4.11 Složení směsi pro ligaci plasmidu pET-29b a sekvence DNA proteinu SUG1

látka	odměřený objem
5 \times Rapid ligation buffer	2 μ l
štěpený SUG1 pro plasmid pET-29b	7 μ l
štěpený plasmid pET-29b	2 μ l
T4- DNA ligasa (5U/ μ l)	0,5 μ l

Tab. 4.12 Složení směsi pro ligaci plasmidu pRSFDuet-1 a sekvence DNA proteinu SUG1

látka	odměřený objem
5 \times Rapid ligation buffer	2 μ l
štěpený SUG1 pro plasmid pRSFDuet-1	7 μ l
štěpený plasmid pRSFDuet-1	1 μ l
T4-DNA ligasa (5U/ μ l)	0,5 μ l

4.2.12 PCR z kolonií

Zda došlo k ligaci úspěšně a plasmid nese žádanou sekvenci DNA je ověřeno pomocí metody zvané PCR z kolonií (angl. Colony PCR) Podle počtu narostlých kolonií na agarové misce byly do tenkostěnných zkumavek namíchány směsi pro provedení PCR reakce (viz tab. 4.13, str. 48).

Tab. 4.13 Složení směsi pro provedení PCR z kolonií

látka	odměřený objem
sterilní destilovaná voda	8 μ l
5 μ M primer SUG1 (pET-29b resp. pRSFDuet-1) FW	1 μ l
5 μ M primer SUG1(pET-29b resp. pRSFDuet-1) REV	1 μ l
MASTER MIX PCR (s obsahem Taq polymerasy)	10 μ l

Do takto připravené směsi byla pomocí plastové špičky pro pipetování přenesena vybraná bakteriální kolonie s obsahem rekombinantního nebo původního plasmidu a tudíž bylo špičku nutné uschovat pro další použití. Reakční směs byla dále podrobena reakci PCR v termocykleru, kde byl nastaven následující program:

1.	95 °C	10 min	
2.	95 °C	30 s	} 25 ×
3.	55 °C resp. 45 °C	30 s	
4.	72 °C	2 min	
5.	72 °C	10 min	
6.	4 °C		

Teplota nasedání primerů je tedy vždy totožná s teplotami zvolenými při amplifikaci samotného genu SUG1 (viz 4.2.6, str. 39).

Výsledky PCR byly kontrolovány prostřednictvím horizontální agarosové elektroforézy. Vzorky na elektroforézu byly připraveny smísením 4 μ l sterilní destilované vody, 5 μ l směsi PCR a 3 μ l LD (viz 4.2.7, str. 42). Po jejím provedení byly vybrány kolonie, které obsahovaly žádaný rekombinantní plasmid nesoucí gen proteinu SUG1. Kolonie byly kultivovány přes noc při teplotě 37°C v miniprepu a další den následovala izolace DNA rekombinantního plasmidu. (viz 4.2.4 a 4.2.5, str. 37 – 38) Touto izolací byl získán rekombinantní plasmid SUG1/pET-29b resp. SUG1/pRSFDuet-1.

4.2.13 Sekvence DNA

Prostřednictvím Sangerovy metody sekvenace lze určit pořadí nukleotidů v řetězci DNA a v tomto případě slouží k ověření správnosti vnesené sekvence DNA u připravených expresních konstruktů. Tato sofistikovaná technika je založena na činnosti DNA polymerasy a existenci dideoxyribonukleosid trifosfátů (ddNTP: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). DNA polymerasa syntetizuje nové kopie sekvenovaného templátu připojováním 5'- deoxyribonukleosid trifosfátu (dNTP) k 3'-hydroxylu posledního zařazeného nukleotidu za vzniku fosfodiesterové vazby. Pokud je do řetězce zakomponován ddNTP, který 3'- hydroxyl postrádá, syntéza DNA končí. Výsledkem této reakce jsou různě dlouhé fragmenty DNA, komplementární k sekvenovanému úseku a všechny končící daným ddNTP. Celá sekvenace zahrnuje soubor čtyř paralelních reakcí, kdy v každé z nich se vyskytuje pouze jeden druh ddNTP. V reakční směsi musí být vždy obsažena templátová DNA, sekvenační primer, DNA polymerasa, soubor dNTP a malé množství jednoho ddNTP. Produkty těchto reakcí jsou pak souběžně vedle sebe podrobeny elektroforetické separaci v polyakrylamidovém gelu na základě velikosti přítomných DNA fragmentů. Ze znalosti v jakém sloupci jsou obsaženy fragmenty končící daným nukleotidem lze pak sekvenci čísti od zdola nahoru, tedy od nejmenšího k největšímu vzniklému fragmentu DNA, který odpovídá celému syntetizovanému úseku. Pro detekci analyzovaných fragmentů je potřebné radioaktivní (^{32}P) nebo fluorescenční značení sekvenačního primeru či jednoho z dNTP [9]. V dnešní době je nejčastěji používána automatizovaná Sangerova metoda, při níž se po reakci jednotlivé reakční směsi smíchají (každá směs pro daný ddNTP obsahuje jinak fluorescenčně značený primer) a jsou separovány pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí na konci kapiláry.

Vzorky pro sekvenční analýzu byly zaslány do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK, Viničná 7. Do tenkostěnných mikrozkumavek pro PCR byly namíchaný směsi o složení, které odpovídalo požadavkům této laboratoře pro provedení analýzy (viz tab. 4.14 a tab. 4.15, str. 50).

Tab. 4.14 Složení vzorků pro sekvenaci expresního konstruktu *SUG1/pET-29b*

látka	odměřený objem
sterilní destilovaná voda	11 μl
eluát plasmidové DNA <i>SUG1/pET-29b</i>	2 μl
„T7 promotor“ nebo „T7 terminator“ primer	1 μl

Tab. 4.15 Složení vzorků pro sekvenaci expresního konstruktů *SUG1/pRSFDuet-1*

látka	odměřený objem
sterilní destilovaná voda	8 μ l
eluát plasmidové DNA <i>SUG1/pRSFDuet-1</i>	5 μ l
„G_B1 seq“ nebo „T7 terminator“ primer	1 μ l

Univerzální primery „T7 promotor“ a „T7 terminator“ nebylo nutné do směsi přidávat, jelikož jsou k dispozici v laboratoři, kde byla sekvenace prováděna. Sekvenační primer „G_B1 seq“ byl navržen uvnitř sekvence G_B1 proteinu na N-konci pro kontrolu správného průběhu ligace ve zvoleném restrikčním místě BamHI na N-konci. Volba sekvenačního primeru v oblasti T7 promotoru u vektoru *pRSFDuet-1* nebyla možná, jelikož obsahuje tyto promotory dva a výsledný chromatogram pak obsahuje směs obou produktů sekvenování. Zásobní roztok primeru „G_B1 seq“ ($c = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$) byl naředěn do 100 μ l v poměru 1:24 a do výsledné sekvenační směsi byl pipetován uvedený 1 μ l.

Správný průběh ligace, kontrola čtecího rámce, poloha restrikčních míst a možný výskyt mutací v získané sekvenci byly analyzovány v programu Chromas a pomocí internetové aplikace BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

4.3 Exprese a purifikace proteinu SUG1

4.3.1 Expresní konstrukty SUG1

Pro výrobu SUG1 byly testovány celkem čtyři expresní konstrukty, SUG1 vnesený do plasmidu *pET-29b*, *pRSFDuet-1*, *pGEX-4T-1* a *pST39*. Charakteristika a příprava konstruktů SUG1/*PET-29b* a SUG1/*pRSFDuet-1* byla jedním z cílů této diplomové práce a je uvedena v oddíle 4.2 (str. 34). Produktem těchto konstruktů jsou proteiny SUG1-6 \times His a 6 \times His-G_B1-SUG1 (viz 4.2.1, str. 34). Poslední dva konstrukty, SUG1/*pGEX-4T-1* a SUG1/*pST39* byly připraveny v rámci bakalářské práce Bc. Kateřiny Kolářkové [70]. Produktem prvního z nich je SUG1 s připojenou glutathion-S-transferasou (GST) na N-konci proteinu (GST-SUG1). Pojítka mezi nimi tvoří štěpné místo pro thrombin. Plasmid *pGEX-4T-1* obsahuje rezistenci vůči ampicilinu. Transkripce genů řízena příliš silným promotorem (např. T7 promotor spojen s indukcí skrze lac operátor) a vedoucí k nadměrné produkci proteinu nemusí být vždy správným přístupem.

Z toho důvodu byl SUG1 klonován do vektoru pST39, kde je jeho produkce řízena pomocí tzv. „leakage“ exprese. Tento plasmid udílí bakteriím schopnost růstu v prostředí ampicilinu a produktem genové exprese je fúzní protein s C-terminální histidinovou kotvou.

Příprava různých fúzních proteinů vyžaduje odlišné podmínky exprese a purifikace, a proto jsou v této části pro větší přehlednost uvedeny pouze obecné společné postupy. Bližší specifikace jsou uvedeny v kap. 5 Výsledky.

4.3.2 Expresní testy

Expresní testy jsou častokrát efektivním nástrojem pro ověření funkce připravených sekvenovaných expresních konstruktů. Jejich podstatou je vnesení rekombinantního plasmidu do expresního kmenu bakterií a sledování produkce proteinu v čase, která je vyvolána přidáním induktoru exprese IPTG. Tato látka nahrazuje 1,6-allolaktosu, která je přirozeným induktorem při expresi genů pod kontrolou lac promotoru. Jelikož byly testy prováděny při teplotě 37°C, lze při správné funkci konstruktů (exprese řízena T7 promotorem) s velkou pravděpodobností očekávat i nadměrnou produkci proteinu a tvorbu nerozpustných inkluzních tělísek.

Sekvenovaný expresní konstrukt SUG1/pET-29b resp. SUG1/pRSFDuet-1 byl vnesen do expresního kmenu bakterií BL21(DE3) nebo Rosetta(DE3) (viz 4.2.2, str. 37) a buňky nanoseny na agarové misky s kanamycinem (viz 4.2.3, str. 37). Další den byly z těchto buněčných kultur připraveny miniprepy (viz 4.2.4, str. 37), přičemž kultivace buněk Rosetta vyžaduje přítomnost dalšího antibiotika chloramfenikolu – miniprepy obsahovaly navíc 5 µl zásobního roztoku chloramfenikolu. Miniprepy byly inkubovány přes noc na třepačce při 200 ot/min a 37 °C. Třetí den bylo do zkumavek stejným způsobem odměřeno 5 ml LB média s antibiotikem o stejné koncentraci a přidán 1 ml staré kultury. Tyto čerstvé miniprepy byly inkubovány na třepačce při 37 °C po dobu 2 hodin. Po dvou hodinách byl z miniprepu odebrán vzorek o objemu 20 µl. Do miniprepu bylo přidáno 15 µl 0,2M roztoku IPTG do konečné koncentrace 0,5 mmol/dm³. Buněčná suspenze byla kultivována po dobu dalších dvou hodin, kdy byl odebrán další vzorek o stejném objemu. Takto byly odebírány vzorky v časových intervalech dvou hodin od 0 hod (vzorek před indukcí exprese prostřednictvím IPTG) do 4 až 6 hodin po indukcí. Poslední vzorek byl odebrán po 16-ti hodinové inkubaci druhý den ráno.

4.3.3 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) je značně využívaná separační metoda, při které dochází k dělení molekul na základě jejich elektroforetické pohyblivosti a tedy jejich molekulové hmotnosti. Sodium dodecylsulfát se řadí mezi povrchově aktivní látky, které proteinovou strukturu denaturují a udílejí jeho molekule jednotný záporný náboj. Záporně nabitě molekuly proteinů, které jsou vystaveny působení elektrického pole tedy migrují od katody k anodě. Proti hnací elektrické síle působí viskozitní síla, která vzniká důsledkem pohybu těchto částic a je přímo úměrná jejich hydrodynamickému poloměru.

Tato metoda je využívána k detekci daného proteinu, dále pro stanovení čistoty a výtěžku při zvolených podmínkách exprese a ověření stability proteinu v průběhu purifikace. Podle velikosti proteinu, který je touto metodou detekován lze připravit gel s různou pórovitostí, která závisí na obsahu akrylamidu/bis-akrylamidu. Pro studium proteinu SUG1 byly používány 12% popř. 10% gely. Složení pufrů pro přípravu gelů a dalších roztoků potřebných pro SDS-PAGE je uvedeno v tab. 4.16 – 4.24 (str. 52 – 54)

Tab. 4.16 Složení 4×pufru pro separační gel

látka	odměřený objem
2M Tris-HCl, pH 8,8	75 ml
10% SDS (w/v)	4 ml
destilovaná voda	do 100 ml

Tab. 4.17 Složení 4× pufru pro zaváděcí gel

látka	odměřený objem
1M Tris-HCl, pH 6,8	50 ml
10% SDS (w/v)	4 ml
destilovaná voda	do 100 ml

Tab. 4.18 Složení 10× pufru pro elektroforézu (před použitím nutno 10× naředit)

látka	odměřené množství
Tris-base	30 g
SDS	10 g
glycin	144 g
destilovaná voda	do 1 l

Tab. 4.19 Složení směsi akrylamidu a bis-akrylamidu

látka	odměřené množství
akrylamid	29,2 g
bis-akrylamid	0,8 g
destilovaná voda	do 100 ml

Tab. 4.20 Složení odbarvovacího roztoku

látka	odměřený objem
methanol	100 ml
konc. kyselina octová	100 ml
destilovaná voda	do 1 l

Tab. 4.21 Složení barvicího roztoku

látka	odměřené množství
methanol	450 ml
konc. kyselina octová	100 ml
Coomassie Blue R 250	1 g
destilovaná voda	do 1 l

Tab. 4.22 Složení 5× pufru pro přípravu vzorku (vzorkovací pufr)

látka	odměřený objem
1M Tris-HCl, pH 6,8	0,6 ml
50% glycerol (w/v)	5 ml
10% SDS	2 ml
2- merkaptoethanol	0,5 ml
1% bromfenolová modř	1 ml
destilovaná voda	do 10 ml

Tab. 4.23 Složení separačního gelu pro SDS-PAGE

	10% gel	12% gel
látka	odměřený objem	odměřený objem
akrylamid/bis-akrylamid	2,5 ml	3 ml
4× pufr pro separační gel (+10% SDS)	2 ml	2 ml
destilovaná voda	3 ml	2,6 ml
10% persulfát amonný (APS)	45 µl	45 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tab. 4.24 Složení zaváděcího gelu pro SDS-PAGE

látka	odměřený objem
akrylamid/bis-akrylamid	0,5 ml
4 × pufr pro zaváděcí gel (+ 10% SDS)	1 ml
destilovaná voda	2,25 ml
10% persulfát amonný (APS)	45 µl
TEMED	5 µl

Polymerace gelů trvala 30 až 45 minut. Všechny vzorky o objemu 20 µl byly smíchány s 5 µl 5 × vzorkovacího pufru pro SDS-PAGE elektroforézu a povařeny v termobloku při teplotě 100 °C cca po dobu 3 minut. Jako standard molekulových vah byl použit Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories, USA). SDS elektroforéza probíhala při napětí 200 V přibližně 45 minut. Výsledky gelové elektroforézy byly vizualizovány pomocí barvení gelu Coomassie Brilliant blue R250. Gel byl ponořen do barvicího roztoku a krátce povařen. Pro nejvyšší efektivitu barvení byl gel v roztoku ponechán po dobu 20 minut. Poté následovala jeho výměna za roztok odbarvovací a opětovné povaření pro urychlení procesu.

4.3.4 Kultivace bakterií v 1l LB média

Výroba většího množství proteinu vyžaduje velkoobjemovou kultivaci bakterií. Sekvenovaná DNA rekombinantního plasmidu byla vnesena do expresního kmenu bakterií BL21(DE3) nebo Rosetta(DE3) (viz 4.2.2, str. 37) a buněčná suspenze nanášena na agarové misky s příslušným antibiotikem (viz 4.2.3, str. 37). Dalšího dne byly připraveny miniprepy, které byly inkubovány přes noc při 37 °C (viz 4.2.4, str. 37). Miniprep s bakteriální kulturou byl přenesen do LB média o objemu 1 L, do kterého byl přidán 1 ml zásobního roztoku patřičného antibiotika (viz tab. 4.25). Kultury v Erlenmayerových baňkách byly inkubovány ve třepačce (Multitron, Infors AG, Švýcarsko) při teplotě 37 °C a 210 ot/min. V pravidelných časových intervalech byl kontrolován růst bakterií měřením optické hustoty při 600 nm na spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA). Blankem bylo samotné LB-médium. Při dosažení hodnoty optické denzity 0,6 byla indukována exprese proteinu přidáním 1 ml 0,5M roztoku IPTG do konečné koncentrace 0,5 mmol/dm³ (u vektoru pST39 byl protein produkován snížením teploty na 30 °C) a bakterie pěstovány dalších 12 až 16 hodin při snížené teplotě.

Tab. 4.25 Antibiotika užitá pro kultivaci daného kmenu bakterií při expresi fúzních proteinů *SUG1*

expresní konstrukt	kmen bakterií	antibiotika užitá při kultivaci
SUG1/pET-29b	Rosetta(DE3)	kanamycin + chloramfenikol
SUG1/pRSFDuet-1	BL21(DE3)	kanamycin
SUG1/pGEX-4T-1	Rosetta(DE3)	ampicilin + chloramfenikol
SUG1/pST39	BL21(DE3)	ampicilin

4.3.5 Sonikace

Bakteriální suspenze, které obsahovaly exprimovaný protein byly centrifugovány na centrifuze Sigma 8K (Sigma Laborzentrifugen, Německo – max. $6 \times 1800g$) při 3000 ot/min při 4 °C a po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a pelety uchovávané na ledu resuspendovány v lyzačním pufru (100 ml na 3l buněčné suspenze – viz tab. 4.26). Následovala inkubace při 4 °C s lysozymem o konečné koncentraci 100 $\mu g/ml$ po dobu 15 minut. Dále byl ke směsi buněk přidán 1 ml 0,1M roztoku PMSF (inhibitor proteas) do konečné koncentrace 1 $mmol/dm^3$. Bakterie v roztoku byly sonikovány při výkonu 54 W po dobu čistého času 15 minut. Expozice ultrazvukovému impulsu trvala vždy 3 sekundy v časovém rozestupu 17 sekund. Po tomto procesu bylo dosaženo lýze buněk a uvolnění buněčného obsahu do okolního roztoku. Sonikát byl centrifugován po dobu 40 min při 13500 ot/min) a 4°C (centrifuga Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Německo – max. 15000 ot/min). Po centrifugaci byl odebrán vzorek pelety pro případ, že by byl exprimovaný protein přítomen v inkluzních tělískách a následně vzorek supernatantu s obsahem všech rozpustných bakteriálních proteinů. Tyto vzorky byly pak separovány pomocí SDS-PAGE.

Tab. 4.26 Složení lyzačního pufru pro purifikaci fúzních proteinů *SUG1*

fúzní protein	složení pufru
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pET-29b) ⁵	1× PBS; 1M NaCl; 4mM β -ME; 2mM imidazol; 0,05% NP-40
6×His-G_B1-SUG1	1× PBS; 1M NaCl; 4mM β -ME; 2mM imidazol; 0,05% NP-40
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pST39)	1× PBS; 1M NaCl; 4mM β -ME; 2mM imidazol
GST-SUG1	2× PBS; 1mM EDTA (pH = 8); 10mM DTT

Složení 10 × PBS pufru (pH upraveno na 7,4): 1,37M NaCl; 27mM KCl; 100mM Na_2HPO_4 ; 18mM KH_2PO_4

⁵ expresní konstrukty a odpovídající fúzní proteiny (viz. 4.2.1 a 4.3.1)

4.3.6 Afinitní chromatografie

Prvním krokem purifikace proteinů byla jejich izolace ze směsi všech proteinů bakterií vzniklé sonikací. Pro tyto účely byla vyvinuta tzv. afinitní chromatografie. Její podstatou je vazba rekombinantního proteinu prostřednictvím fúzní značky na polymerní nosič na koloně a jeho následná eluce přidávkem kompetičního činidla. Pro izolaci výše uvedených rekombinantních proteinů byly aplikovány dva typy afinitní chromatografie – niklová chelatační chromatografie a GST afinitní chromatografie.

Niklová chelatační chromatografie

Kolona obsahující sepharosu s navázanými zbytky nitrilotrioctové kyseliny je promyta síranem nikelnatým, přičemž dojde k imobilizaci iontů Ni^{2+} na matici. Ionty niklu poté mohou prostřednictvím donor-akceptorové vazby interagovat s imidazolovými kruhy a tedy vychytávat proteiny značené His-tagem. Následuje promývání pufrům s vyšší iontovou silou k zabránění nespecifických interakcí. V posledním kroku je kolona promyta pufrům o vysoké koncentraci imidazolu, což vede k eluci cílového proteinu.

Na kolonu bylo naneseno 3 ml Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA), která byla postupně promyta přibližně 10 ml destilované vody, poté 30 ml 0,1M síranu nikelnatého (vazba Ni^{2+}), dále znovu vodou a nakonec 10 ml nanášecího pufru (angl. loading buffer). Po nabití kolony byla sepharosa v malém množství nanášecího pufru (viz tab. 4.27, str. 58) resuspendována a přenesena do kádinky obsahující získanou směs proteinů. Směs byla inkubována a mírně míchána při 4 °C po dobu 30 minut, aby došlo k účinnému navázání His-tagem značeného proteinu. Po inkubaci byla směs přenesena do dvou 50 ml plastových zkumavek a promývána vsádkovou metodou – opětovná centrifugace směsi při 4°C a 1600 ot/min (centrifuga Eppendorf 5804R, Německo – max. 5000 ot/min) po dobu 1 minuty a odlití supernatantu až do spotřebování 350 až 400 ml promývacího pufru (viz níže). Sepharosa v malém množství zbylého promývacího roztoku byla nanesena na kolonu. Zbytek tohoto roztoku byl odmýván s použitím peristaltické pumpy. Následovala eluce (pouze gravitací) navázaného proteinu 15 až 20 ml elučního pufru (viz níže) do mikrozkušavek chlazených na ledu. Bylo odebráno 10 až 13 frakcí o objemu 1,5 ml. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz 4.3.3, str. 52) a ty, které obsahovaly nejvyšší obsah proteinu s nejvyšší čistotou, byly použity pro další etapu purifikace. Sepharosa byla regenerována roztokem 50mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,5M NaCl.

Tab. 4.27 Složení nanášecího pufru pro purifikaci fúzních proteinů SUG1 s histidinovou kotvou 6×His

fúzní protein	složení pufru
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pET-29b)	1× PBS; 0,5M NaCl; 2mM β-ME; 1mM imidazol; 0,01% NP-40
6×His-G_B1-SUG1	1× PBS; 0,5M NaCl; 2mM β-ME; 1mM imidazol; 0,05% NP-40
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pST39)	1× PBS; 0,5M NaCl; 2mM β-ME; 1mM imidazol

Složení elučního pufru: 100 ml nanášecího pufru a přídavek 4,07 g imidazolu na konečnou koncentraci 0,6 mol/dm³, úprava na pH = 8 přídavkem 35% HCl

Složení promývacího pufru: 10% eluční pufr (35 ml elučního pufru doplněno do 350 ml nanášecím pufrům)

Složení 10× PBS pufru viz str. 56

GST afinitní chromatografie

Kolona plněna sepharosou obsahující jako imobilizovaný ligand redukovaný L-glutathion je schopna vázat s vysokou afinitou proteiny s připojenou glutathion-S-transferasou (GST). Podmínkou efektivity vazby je nedenedaturující prostředí a aktivita glutathion-S-transferasy. Překážkou při expresi a purifikaci s tímto fúzním partnerem může být nežádoucí tvorba stabilních dimerů GST a potencionální větší sklon k tvorbě agregátů. Vázaný protein je pak eluován roztokem s vysokou koncentrací redukovaného glutathionu (musí být připraven velmi čerstvý), který je vázán na sepharosu za tvorby oxidovaného glutathionu. Při opakovaném použití sepharosy je nutné regeneraci provést roztokem s vysokou iontovou silou, nejlépe 5M NaCl. Touto metodou byl purifikován fúzní protein SUG1 s N-terminální glutathion-S-transferasou (GST-SUG1).

Na kolonu bylo nanášeno 3 ml Glutathione Sepharose4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Švédsko), která byla nejprve promyta destilovanou vodou a pak 15 ml promývacího pufru. Ve zbytku tohoto pufru byla sepharosa resuspendována a přenesena k získané směsi proteinů a inkubována při 4°C po dobu 30 minut.

Následně byla směs s matricí přenesena na kolonu a proplachována přes peristaltickou pumpu 400 ml promývacího pufru (viz níže). Následovala eluce žádaného proteinu pomocí čerstvě připraveného pufru (15 ml) s přidavkem glutathionu (viz níže) a eluát byl jímán do mikrozkrumavek umístěných v ledové lázni. Frakce byly studovány elektroforetickou separací za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS.

Složení promývacího pufru: 20mM Tris (pH = 7,5); 0,5M NaCl; 1mM Na₂-EDTA·2H₂O (pH = 8); 10mM DTT; 10% (w/v) glycerol

Složení elučního pufru: 60 ml promývacího pufru a přidavek 0,184 g L-glutathionu na konečnou koncentraci 10 mmol/dm³, úprava na pH = 8

4.3.7 Dialýza

V případě niklové chelatační chromatografie se po eluci daný protein nachází v prostředí o vysoké koncentraci imidazolu, který protein destabilizuje a proto je nutné ho z roztoku odstranit. Při dialýze dochází k průchodu nízkomolekulárních látek přes membránu dle koncentračního gradientu. Tuto metodu lze použít i v případě, kdy je dosud neznámý purifikovaný protein vystaven reakčnímu prostředí s vysokou iontovou silou, které zvyšuje jeho rozpustnost a stabilitu při purifikaci, k přechodu do podmínek, které simulují stav *in vivo* (cca 150mM NaCl, fyziologické pH 7,4). Chování proteinu v takových podmínkách je pro jeho budoucí studium rozhodující. Tímto způsobem můžeme zjistit stabilitu proteinu před provedením dalšího purifikačního kroku, kterým je gelová permeační chromatografie.

Frakce, které byly vybrány po niklové chelatační chromatografii byly sloučeny a dialyzovány přes noc při 4 °C přes semipermeabilní membránu s limitní propustností částic o relativní molekulové hmotnosti 14000. Složení dialyzačního pufru je uvedeno v tabulce 4.28.

Purifikace proteinu SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pST39) byla provedena v rámci jednoho dne, tedy s absencí dialyzačního kroku. Protein byl eluován 7,5 ml elučního pufru (viz 4.3.6, str. 57) a jímán do 20 ml pufru pro gelovou permeační chromatografii, která byla vykonána vzápětí.

Tab. 4.28 Složení dialyzačního pufru při purifikaci fúzních proteinů *SUG1* s histidinovou kotvou 6×His

fúzní protein	složení pufru
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pET-29b)	20mM Tris (pH = 8); 500mM NaCl; 5mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (pH = 8); 2mM β-ME; 10% (w/v) glycerol
6×His-G_B1-SUG1	20mM Tris (pH = 7,5); 300mM NaCl; 5mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (pH = 8); 2mM β-ME; 10% (w/v) glycerol; 0,01% NP-40

4.3.8 Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm, kdy dochází k absorpci záření způsobenou přítomnými aromatickými aminokyselinami (tedy Tyr, Phe, Trp). Pro změření absorpčního pozadí byl použit pufr, ve kterém se protein nacházel. Závislost koncentrace na absorbanci vzorku vychází z Lambert-Beerova zákona, který je dán vztahem

$$A = \epsilon_{\lambda} c l, \quad (1)$$

kde ϵ_{λ} je molární absorpční koeficient při dané vlnové délce (v [dm³·mol⁻¹·cm⁻¹]), c je molární koncentrace proteinu (v [mol·dm⁻³]) a l představuje délku optické dráhy (v [cm]).

Platnost tohoto zákona je dodržena pro velmi zředěné roztoky a proto ho lze aplikovat v rozmezí absorbance 0,2 až 0,8. Pro výpočet je dále nutné znát hodnotu molárního absorpčního koeficientu dané látky, která byla zjištěna pomocí internetové aplikace ProtParam (www.expasy.org)

4.3.9 Štěpení fúzního proteinu proteasou

Fúze proteinu s jinými subjekty patří k základním přístupům při expresi a purifikaci proteinů z důvodu jejich izolace při afinitní chromatografii a zvýšení jejich stability a rozpustnosti v průběhu purifikace. Pro bližší charakterizaci proteinu je však výhodné tohoto partnera odstranit a zjistit chování samotného proteinu.

Jelikož u konstruktů SUG1 v plasmidech pET-29b či pST39 není možné histidinovou kotvu odstranit, jedná se v tomto případě pouze o varianty SUG1 s GST či sekvencí G_B1 na N-konci studovaného proteinu. Pro budoucí studium nativního proteinu SUG1 byla použita jeho varianta ve spojení s proteinem G_B1. V první řadě bylo nutné zjistit, zda nedochází k narušení stability proteinu SUG1 při odštěpení tohoto fúzního partnera a kinetiku štěpení.

Ke 100 μ l vzorku proteinu 6 \times His-G_B1-SUG1 o koncentraci 0,66 mg/ml bylo přidáno 2,1 μ l TEV proteasy (specifická aktivita 250 U/mg proteinu, 1 U = 0,125 μ l). Kinetika štěpení byla pozorována paralelně při 4 °C a 30°C a vzorky směsi o objemu 15 μ l byly odebírány v dvouhodinových intervalech po dobu 8 hodin. Poslední vzorek byl odebrán dalšího dne ráno. Výsledky štěpení byly studovány pomocí SDS-PAGE.

4.3.10 Gelová permeační chromatografie (SEC)

V další fázi purifikace proteinů byla vykonána gelová permeační chromatografie (angl. Size-Exclusion Chromatography - SEC). Tato metoda slouží k oddělení veškerých nečistot obsažených ve vzorku proteinu po předchozím provedení afinitní chromatografie, při které často dochází k mnohým nespecifickým interakcím. Matricí chromatografické kolony je dextran vázaný na zesíťovanou agarosu o různé velikosti pórů, která je promývána mobilní fází, nejčastěji pufrém. Výběr této náplně je volen primárně podle velikosti studovaného proteinu. Jednotlivé složky směsi jsou pak separovány na základě jejich velikosti, kdy menší částice jsou zadržovány na koloně déle než ty větší. Tato retence je způsobena opakovaným průchodem menších částic póry gelu. Naopak částice s velkým hydrodynamickým poloměrem, které nejsou schopny prostupovat těmito póry, jsou eluovány z kolony jako první a eluční objem této frakce je nazýván jako mrtvý objem kolony. Touto metodou je možné oddělit ve směsi případné agregáty studovaného proteinu. Dalšími volenými parametry je objem kolony, kterou protein putuje. Kolony s větším objemem mají větší rozlišovací schopnost a tedy lepší dělící kapacitu.

Gelová permeační chromatografie byla provedena na přístroji HPLC-AKTA (Amersham Biosciences, Švédsko). Pro purifikaci daných proteinů byly užity kolony Hiload 26/60 Superdex 200 prep grade nebo Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA). Před nástřikem na kolonu bylo nutné protein koncentrovat na určitý objem (nejvyšší možný 2 ml) pomocí koncentrátoru Amicon Ultra (EMD Millipore, USA).

Použitý typ koncentrátoru byl vybaven ultrafiltrační membránou s limitní propustností částic o relativní molekulové hmotnosti 10000. Koncentrování proteinu bylo prováděno centrifugací (Eppendorf 5804 R) při 2500 až 3500 ot/min a teplotě 4°C.

Následně byl roztok proteinu přefiltrován přes filtr Spartan s velikostí pórů 0,45 µm a vzorek byl aplikován na chromatografickou kolonu. Na základě získaného chromatogramu byly vybrány frakce pro analýzu prostřednictvím SDS-PAGE. Složení jednotlivých pufrů je uvedeno v tabulce 4.29.

Tab. 4.29 Složení pufrů pro gelovou permeační chromatografii fúzních proteinů *SUG1*

fúzní protein	složení pufru
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pET-29b)	20mM Tris (pH = 8); 0,5M NaCl; 1mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (pH = 8); 2mM DTT; 10% (w/v) glycerol
6×His-G_B1-SUG1⁶	20mM Tris (pH = 7,5); 300mM NaCl; 1mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (pH = 8); 2mM DTT; 0,01% NP-40; 10% (w/v) glycerol
SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pST39)	20mM Tris (pH = 8); 300mM NaCl; 1mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (pH = 8); 2mM DTT; 10% (w/v) glycerol
GST-SUG1	20mM Tris (pH = 7,5); 150mM NaCl; 1 mM Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (pH = 8); 1mM DTT; 10% (w/v) glycerol

4.4 Biofyzikální charakterizace SUG1

4.4.1 Rozptyl světla

Měření rozptylu světla se řadí mezi hojně využívané metody ke studiu vnější struktury makromolekul a jejich dynamiky v roztocích. Při průchodu elektromagnetického záření vzorkem, elektrická vlna interaguje s elektrony a indukuje v molekulách oscilující dipólové momenty, které jsou zdrojem rozptýleného záření.

⁶ stejné složení pufru bylo použito i při purifikaci proteinu SUG1 po odštěpení fúzního partnera

Rozptyl pozorujeme pouze v případě, kdy dochází ke konstruktivní interferenci rozptýlených vln, tedy v ne zcela homogenním prostředí [70].

1) Statický rozptyl světla

V roztocích lze rozptyl světla popsat pomocí vlnového vektoru \mathbf{q} (jedná se o rozdíl vlnových vektorů dopadajícího a rozptýleného paprsku), který je popsán matematickým vztahem

$$q = \frac{4\pi n_D}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (2)$$

kde n_D je index lomu rozpouštědla, λ představuje vlnovou délku dopadajícího záření ve vakuu a θ rozptylový úhel mezi dopadajícím paprskem a směrem pozorování [72].

Při statickém rozptylu světla se sleduje pouze časově zprůměrovaná intenzita rozptýleného záření, jejíž velikost v daném rozptylovém úhlu vyjadřuje tzv. Rayleighův poměr R_θ

$$R_\theta = \frac{I}{I_0} \frac{r^2}{\sin^2 \phi}, \quad (3)$$

kde r představuje vzdálenost detektoru od vzorku, I je intenzita rozptýleného světla vztahená na jednotkový objem vzorku a I_0 je intenzita dopadajícího záření (primárního paprsku). Úhel mezi rovinou polarizace dopadajícího záření a rovinou dopadajícího a rozptýleného paprsku je značen ϕ , který je však při typickém experimentálním uspořádání roven 90° [71].

Popis intenzity rozptylu pomocí Rayleighova poměru předpokládá, že částice se vyskytují v nekonečně zředěném roztoku a vzájemně spolu neinteragují. Částice zkoumaných rozměrů však nelze považovat za bodové zdroje rozptylu a proto byl zaveden strukturální faktor \mathbf{P}_θ popisující vnitřní strukturu částice, která sama přispívá k celkovému rozptylu interferencí rozptylovaných vln z jejích různých částí. Teoreticky nás zajímá intenzita rozptylu ve směru primárního paprsku pod úhlem 0° , který není ovlivněn intramolekulárním rozptylem ani u větších částic.

Jelikož je však rozptyl v tomto směru utlumen mnohem intenzivnějším primárním paprskem o stejné vlnové délce, musí být zjištěn pomocí extrapolace [71,73].

Intenzita rozptylu závisící na hmotnostní koncentraci proteinu c_p v roztoku vede ke složitějšímu tvaru Rayleighova poměru [71]

$$R_{\theta} = K P_{\theta} c_p \overline{M}_w, \quad (4)$$

v němž je zahrnuta optická konstanta K

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda^4 N_A} n_{D,0}^2 \left(\frac{\partial n_D}{\partial c_p} \right), \quad (5)$$

kde N_A je Avogadrova konstanta a $\partial n_D / \partial c_p$ je tzv. inkrement indexu lomu, vyjadřující závislost indexu lomu na koncentraci disperzních částic [72].

Po dalších úpravách výše uvedených vztahů a jejich spojením získáváme tzv. Zimmovu rovnici pro neideální chování roztoku

$$\frac{K c_p}{R_{\theta}} = \frac{1}{\overline{M}_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 c_p, \quad (6)$$

kde R_g představuje gyrační poloměr částice a \overline{M}_w hmotnostní střed molekulové hmotnosti a faktor A_2 je tzv. druhý viriální koeficient osmotického tlaku. Ze získaných dat měření statického rozptylu světla lze vynést Zimmův diagram. Ze směrnice lineární závislosti na q lze extrapolací na nulovou hodnotu koncentrace určit z-ově vážený kvadrát gyračního poloměru částic. Pro přesné stanovení molekulové hmotnosti částic je nutná znalost inkrementu indexu lomu [71,72,73].

2) Dynamický rozptyl světla

Pro charakterizaci velikosti a stanovení difúzního koeficientu resp. hydrodynamického poloměru částic roztoku proteinu SUG1 byla použita technika měření dynamického rozptylu světla neboli tzv. fotonová korelační spektroskopie. Metoda je založená na měření časové závislosti intenzity rozptylu v roztoku, která se dále vyhodnocuje ve formě autokorelační funkce.

Tato funkce představuje souvztažnost mezi intenzitou rozptýleného záření v čase t a intenzitou v čase $(t + \tau)$ a matematicky je dána vztahem

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (7)$$

Z funkce $g(\tau)$ je možné pomocí inverzní Laplaceovy transformace získat distribuční funkci relaxačních časů $A(\tau_R)$

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta \left[\int_0^\infty A(t_R) \exp(-\tau/\tau_R) dt_R \right] \quad (8)$$

kde β je tzv. koherenční faktor popisující zachování koherence záření v detekčním objemu.

Dále je možné převést funkci relaxačních časů na distribuci hydrodynamických poloměrů $\tau A(\tau)$ na základě platnosti následujících vztahů

$$D = 1/(\tau_R q^2) \quad (9)$$

Difúzní koeficient je popsán Stokesovou-Einsteinovou rovnicí

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_H}, \quad (10)$$

kde f je frikční koeficient, přímo úměrný viskozitnímu koeficientu rozpouštědla η_0 a hydrodynamickému poloměru R_H studovaných částic [72].

Pro stanovení z-ově váženého hydrodynamického poloměru je nutné uvažovat pravý difúzní koeficient D_z . Ten lze získat ze závislosti zdánlivého difúzního koeficientu D_{app} na rozptylovém vektoru q jeho extrapolací na $q = 0$

$$D_{app} = D_z(1 + CR_g^2 q^2), \quad (11)$$

kde C představuje konstantu závislou na polydisperzitě vzorku i tvaru částic [72].

Roztok proteinu SUG1 o objemu 800 μ l a koncentraci 0,6 mg/ml byl přefiltrován přes filtr Spartan a přenesen do měřicí kyvety. Následně byly v softwaru měřicího přístroje firmy ALV nastaveny parametry měření, rozmezí úhlů dopadu od 30° do 150° v intervalech 10° se snímáním každého úhlu 10 sekund. Dopadající záření bylo generováno helium-neonovým laserem o vlnové délce červeného světla 632,8 nm. Autokorelační funkce byly proměřeny pro vzorky o koncentraci 0,6; 0,3 a 0,2 mg/ml. Roztoky o nižší koncentraci byly připraveny ředěním v kyvetě odpovídajícím pufrem. Z této koncentrační závislosti byl dále vynesena Zimmův a Berryho diagram. Transformací autokorelační funkce pro nejvyšší měřenou koncentraci a úhel dopadu 90 ° byla získána data pro výnos distribuce hydrodynamických poloměrů. Měření bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Štěpánkem, Ph.D. (Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, PŘF UK).

Složení pufru pro měření DLS: 20mM Tris (pH = 7,5); 300mM NaCl; 1mM EDTA (pH = 8); 2mM DTT; 0,01% NP-40; 10% (w/v) glycerol

4.4.2 Měření stability proteinu

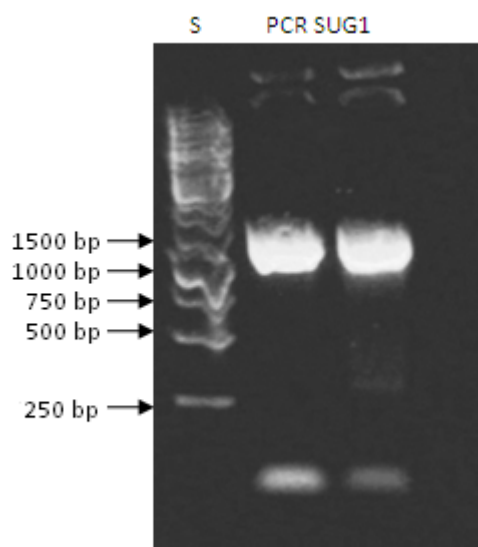
Vzorek proteinu SUG1 o objemu 200 μ l byl ponechán v lednici při teplotě 18 °C po dobu 10 dnů. V časovém odstupu dvou dnů byl vždy odebrán vzorek o objemu 15 μ l a smísen se 4 μ l vzorkovacího pufru pro následné provedení SDS-PAGE elektroforézy.

5 VÝSLEDKY

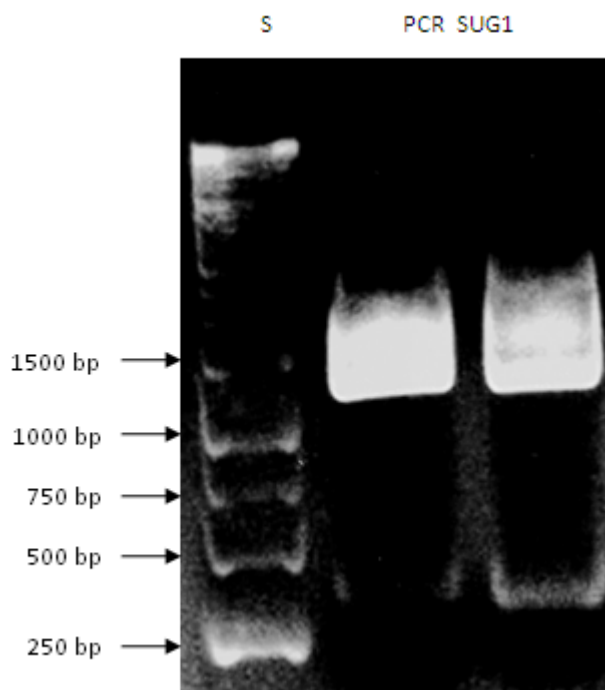
5.1 Příprava expresních konstruktů

5.1.1 Amplifikace genu lidského SUG1

cDNA proteinu SUG1 byla připravena prostřednictvím polymerasové řetězové reakce. Pro tuto reakci byl jako templát použit rekombinantní plasmid SUG1/pQCXIP a syntetické oligonukleotidy navržené pro vnesení do dvou různých plasmidů pET-29b a pRSFDuet-1. Průběh PCR byl kontrolován provedením horizontální agarosové elektroforézy, jejíž výsledky v obou případech prokazatelně potvrzují výskyt cílového produktu amplifikace SUG1 (viz obr. 5.1 a obr. 5.2, str. 68). Vzorky pro elektroforézu byly připraveny smísením 7 μ l sterilní destilované vody, 3 μ l PCR směsi a 3 μ l nanášecího barviva Loading-Dye (LD).



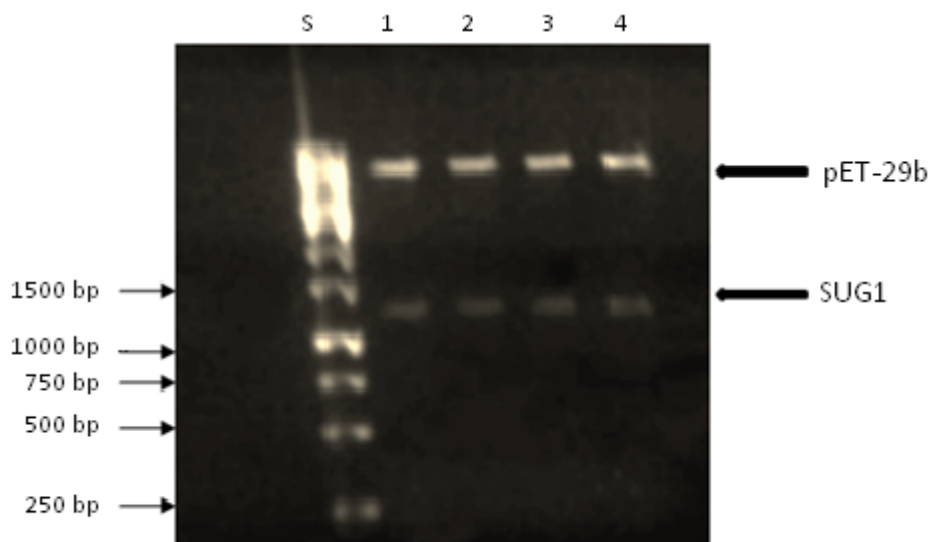
Obr. 5.1 Vizualizovaný 1% (w/v) agarosový gel po elektroforetické analýze produktů PCR amplifikace genu proteinu SUG1 pro jeho vnesení do plasmidu pET-29b. Do první dráhy (S) byl nanesen standard obsahující DNA fragmenty známých velikostí. Do dalších dvou drah byly nanášeny vzorky z paralelně provedených reakcí PCR. Zóny migrace SUG1 odpovídají velikosti cca 1200 bp.



Obr. 5.2 Vizualizovaný 1% (w/v) agarosový gel po elektroforetické analýze produktů PCR amplifikace genu proteinu *SUG1* pro jeho vnesení do plasmidu *pRSFDuet-1*. Do první dráhy (S) byl nanesen standard obsahující DNA fragmenty známých velikostí. Do dalších dvou drah byly nanášeny vzorky z paralelně provedených reakcí PCR. Zóny migrace *SUG1* odpovídají velikosti cca 1200 bp.

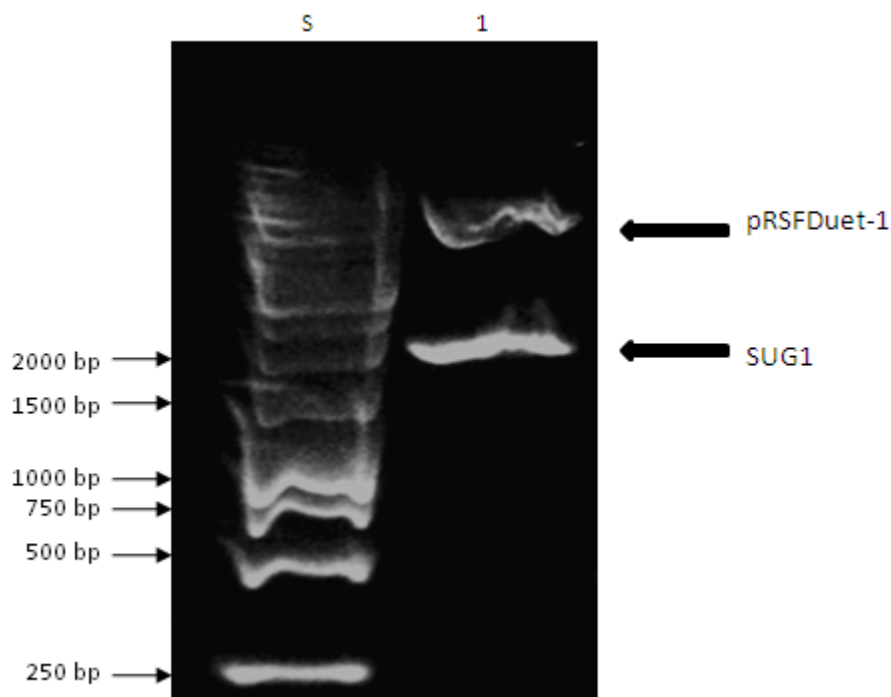
5.1.2 Ligace a kontrola expresních konstruktů

Po štěpení DNA plasmidu a připravené cDNA proteinu *SUG1* restrikčními enzymy následovala jejich ligace. Správný průběh ligace byl kontrolován provedením PCR a vzorky výsledné reakční směsi separovány pomocí horizontální agarosové elektroforézy (data nejsou prezentována) pro ověření přítomnosti sekvence cDNA proteinu *SUG1*. V závěru byla přítomnost sekvence DNA proteinu *SUG1* zkontrolována štěpením připravených konstruktů restrikčními enzymy. Vybrané vzorky byly odeslány do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK, Viničná 7, kde byla provedena analýza sekvence. Výsledky sekvenace byly analyzovány v programech Chromas a internetové aplikaci BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, kde byla ověřena shoda vnesené sekvence s cDNA genu lidské isoformy 1 proteinu *SUG1*. Veškeré protokoly přípravy rekombinatních plasmidů jsou uvedeny v oddíle 4.2.



Obr. 5.3 Vizualizovaný 1% (w/v) agarosový gel po elektroforetické analýze produktů štěpení expresního konstruktů *SUG1/pET-29b* endonukleasami *NdeI* a *XhoI*. Do první dráhy (S) byl nanesen standard obsahující DNA fragmenty známých velikostí. Do dalších drah zleva byly nanášeny vzorky směsi štěpení rekombinantního plasmidu. Směs vždy obsahovala 0,5 μ l izolované DNA; 1,3 μ l pufru O; 0,5 μ l enzymu *XhoI*; 0,3 μ l *NdeI* a byla doplněna do 10,5 μ l destilovanou vodou. Pro elektroforetickou separaci štěpené DNA byla do směsi přidána 2 μ l barviva LD. Vrchní zóny migrace odpovídají štěpenému plasmidu a spodní vyštěpenému úseku cDNA *SUG1* o velikosti cca 1200 bp.

Z obr. 5.3 a 5.4 (viz str. 70) je patrné, že po provedení PCR byly vybrány kolonie s obsahem žádaného rekombinantního plasmidu, neboť po jejich štěpení restrikními endonukleasami byl získán fragment odpovídající přibližně velikosti cDNA proteinu *SUG1*. Při štěpení rekombinantního plasmidu *pRSFDuet-1* (obr. 5.4) se výrazně změnila mobilita cDNA *SUG1* patrně v důsledku nedokonalého štěpení sekvence. Správný průběh ligace a obsah genu *SUG1* byl však následně potvrzen výsledky sekvenční analýzy obou expresních konstruktů.



Obr. 5.4 Vizualizovaný 1% (w/v) agarosový gel po elektroforetické analýze produktů štěpení expresního konstruktů *SUG1/pRSFDuet-1* endonukleasami *BamHI* a *NotI*. Do první dráhy (S) byl nanesen standard obsahující DNA fragmenty známých velikostí. Do další dráhy byl nanesen vzorek směsi štěpení rekombinantního plasmidu. Směs obsahovala 0,5 μ l izolované DNA; 1,3 μ l pufru *BamHI*; 0,6 μ l enzymu *NotI*; 0,3 μ l *BamHI* a byla doplněna do 10,5 μ l destilovanou vodou. Pro elektroforetickou separaci štěpené DNA byly do směsi přidány 2 μ l barviva LD. Vrchní zóna migrace odpovídá štěpenému plasmidu a spodní vyštěpenému úseku cDNA *SUG1*.

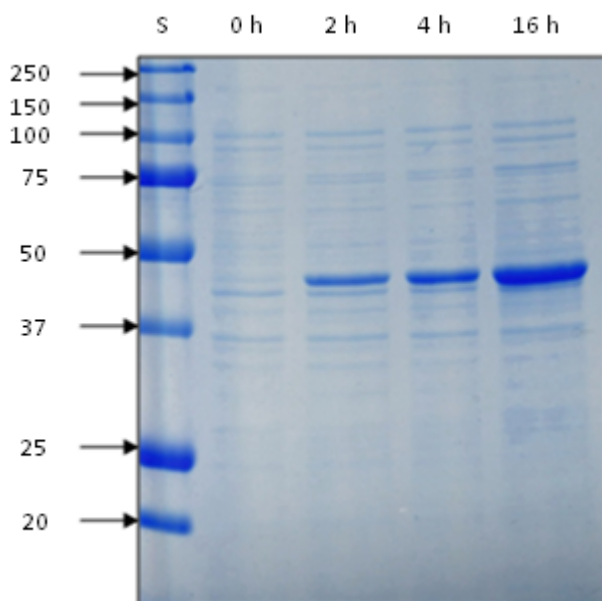
5.2 Exprese a purifikace proteinu *SUG1*

V této části jsou představeny výsledky purifikace fúzních proteinů *SUG1* za rozdílných podmínek, jejichž cílem bylo nalezení systému, ve kterém se purifikovaný protein bude nacházet ve stabilní rozpustné formě s minimálním výskytem nečistot. V první fázi byly provedeny expresní testy expresních konstruktů, které byly připraveny v rámci této diplomové práce. Postup exprese a purifikace těchto fúzních proteinů zahrnoval kultivaci bakterií v LB-médiích, sonikaci bakterií, izolaci proteinů provedením afinitní chromatografie a jejich purifikaci pomocí gelové permeační chromatografie.

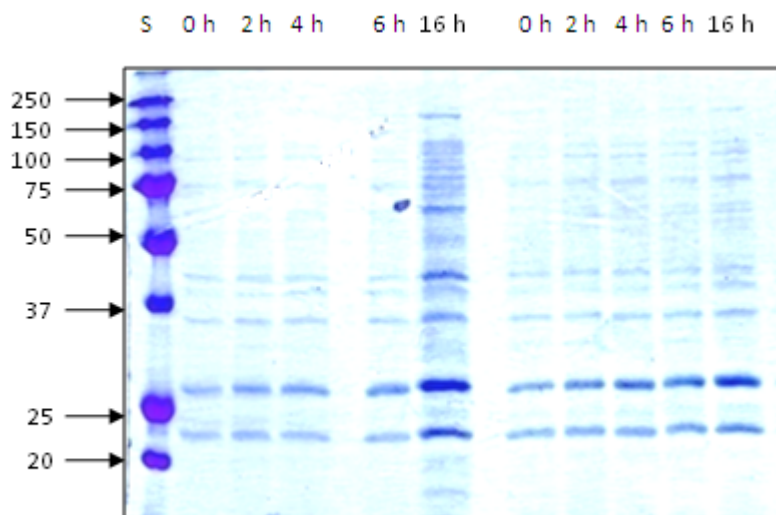
U purifikace His-tagových proteinů byla provedena dialýza. Veškeré postupy jsou uvedeny v oddíle 4.3.

5.2.1 Expresní testy při 37 °C

Jedním z cílů této diplomové práce bylo připravit dva expresní konstrukty: SUG1/pET-29b, který umožňuje získat fúzní protein SUG1 značený C-terminálním His-tagem (SUG1-6×His) a SUG1/pRSFDuet-1, jehož expresním produktem je protein SUG1 značený na N-konci proteinem G_B1 (6×His-G_B1-SUG1). K ověření funkce těchto konstruktů a schopnosti produkce cílových proteinů v bakteriích byly provedeny expresní testy (viz 4.3.2, str. 51). V rámci těchto testů byly bakterie obsahující rekombinantní plasmidovou DNA inkubovány při 37 °C po dobu dvou hodin s následnou indukcí exprese prostřednictvím IPTG. V jednotlivých časových intervalech exprese cílového proteinu byly odebrány vzorky buněčné suspenze, které byly pak podrobeny separaci na SDS-PAGE. Relativní molekulová hmotnost fúzních proteinů byla stanovena pomocí internetové aplikace ProtParam (www.expasy.org)



Obr. 5.5 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel s výsledky expresních testů konstruktu SUG1/pET-29b. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Druhá dráha zleva obsahuje vzorek kultury před indukcí. V dalších dráhách jsou přítomny vzorky po indukci exprese proteinu SUG1-6×His a inkubaci kultury po dobu 2, 4 a cca 16 hodin. Celkový objem vzorku činil 25 µl (20 µl kultury + 5 µl vzorkovacího puftru). Zóny migrace tohoto proteinu odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 47000.



Obr. 5.6 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel s výsledky expresních testů konstruktů *SUG1/pRSFDuet-1*. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Druhá dráha zleva obsahuje vzorek kultury před indukcí. V dalších dráhách jsou přítomny vzorky po indukci exprese proteinu 6×His-G_{B1}-SUG1 a inkubaci kultury po dobu 2, 4, 6 a cca 16 hodin. Dalších 5 drah představuje paralelní provedení testu ze vzorku jiné kolonie. Celkový objem vzorku činil 25 μl (20 μl kultury + 5 μl vzorkovacího pufru). Zóny migrace tohoto proteinu odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 55000.

Z obr. 5.5 (viz str. 71) je zřejmé, že po indukci exprese proteinu SUG1-6×His bylo dosaženo jeho výrazné produkce. Dále z výsledků vyplývá časová závislost inkubace na míru jeho tvorby.

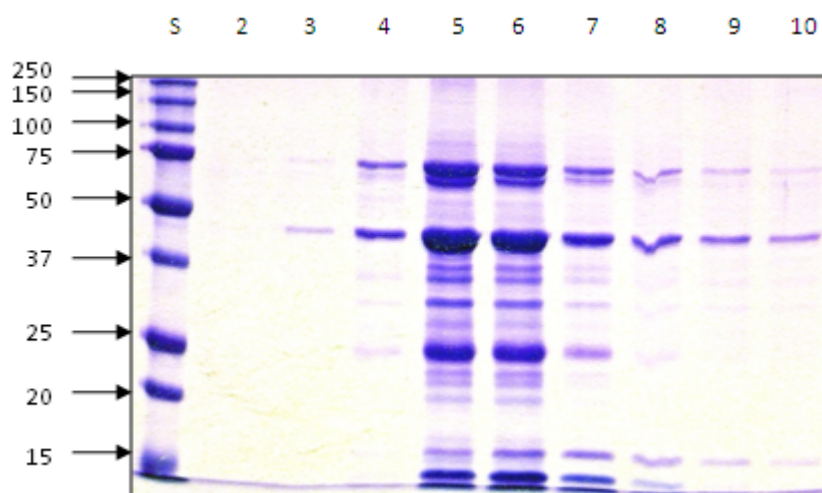
Z obr. 5.6 je zjevné, že expresní testy konstruktů *SUG1/pRSFDuet-1* nepotvrdily expresi cílového proteinu. Jedním z důvodů, proč nebyla pozorována produkce rekombinantního proteinu, může být jeho velmi slabá exprese v testovaných podmínkách.

5.2.2 Purifikace proteinu SUG1-6×His (konstrukt SUG1/pET-29b)

Exprese proteinu SUG1-6×His zahrnovala inkubaci bakterií přes noc ve 3l LB-média při teplotě 12 °C. Bakteriální kultury byly následně resuspendovány v lyzačním pufru a sonikovány po dobu 15 minut.

1) Niklová chelatační chromatografie

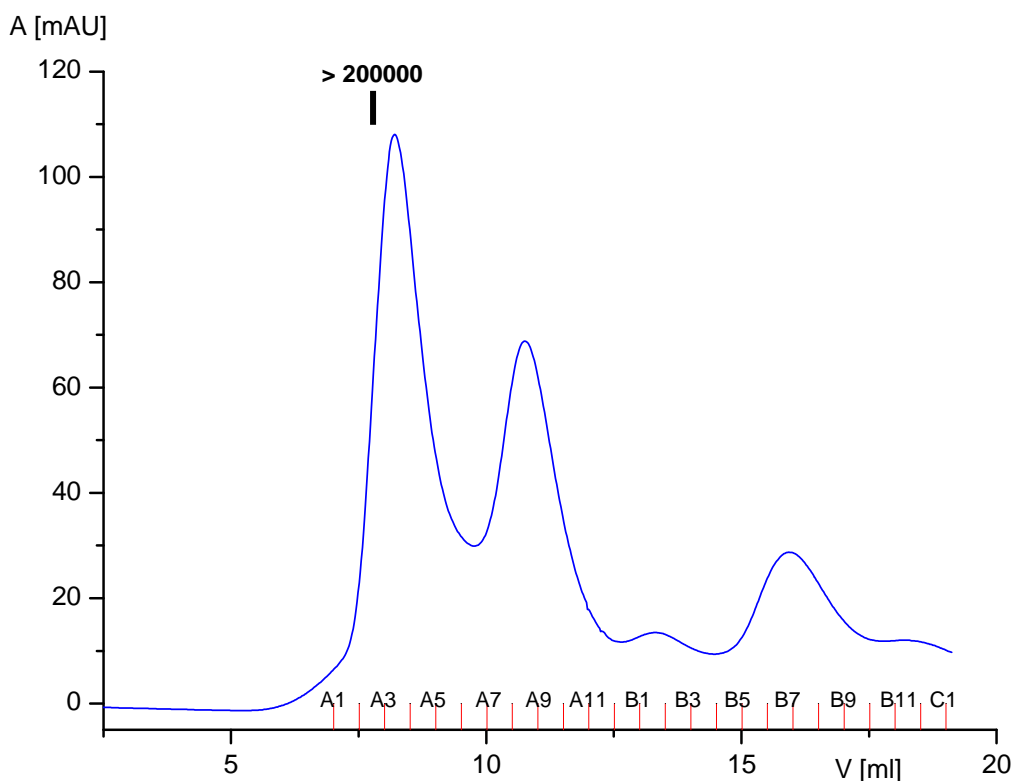
Při eluci bylo jímáno celkem 13 frakcí o objemu 1,5 ml do mikrozkušavek. Z nich byly odebrány vzorky pro jejich analýzu na SDS-PAGE (obr. 5.7) Na základě této analýzy byly vybrány frakce 4 až 8 pro jejich následnou dialýzu přes noc. Vysoký obsah nečistot ve vzorku patrný z obr. 5.7 bylo nutné odstranit v další fázi purifikace při gelové permeační chromatografii.



Obr. 5.7 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při niklové chelatační chromatografii. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly naneseny vzorky frakcí 2 až 10 o celkovém objemu 20 μ l (15 μ l vzorku frakce + 5 μ l vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu SUG1-6 \times His odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 47000.

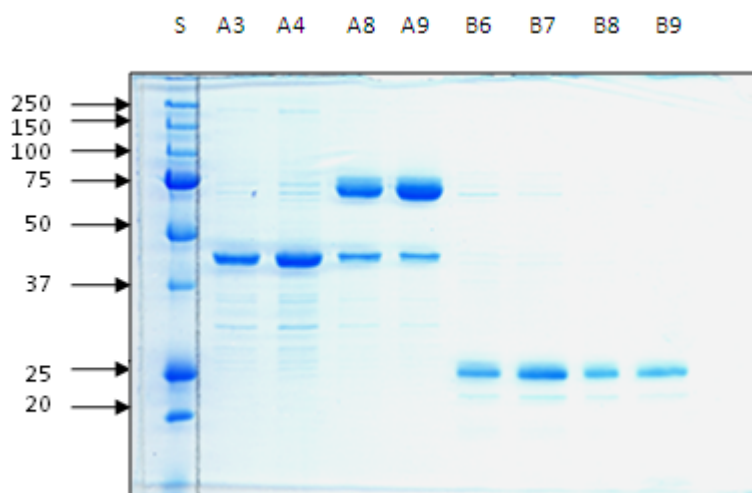
2) Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie proteinu SUG1-6 \times His byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 GL. Během eluce byly jímány frakce po 0,5 ml. Ze získaného chromatogramu (viz obr. 5.8, str. 74), soustavy několika píků byly vybrány frakce A3, A4, A8, A9, a B6 až B9 pro analýzu na SDS-PAGE (viz obr. 5.9, str. 75).



Obr. 5.8 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii proteinu SUG1-6×His na koloně Superdex 200 10/300 GL. Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při 280 nm na elučním objemu. Červeně jsou značeny pozice frakcí jímáných při eluci. Dále je vyznačena pozice mrtvého objemu kolony, kde jsou eluovány částice o relativní molekulové hmotnosti větší než 200000.

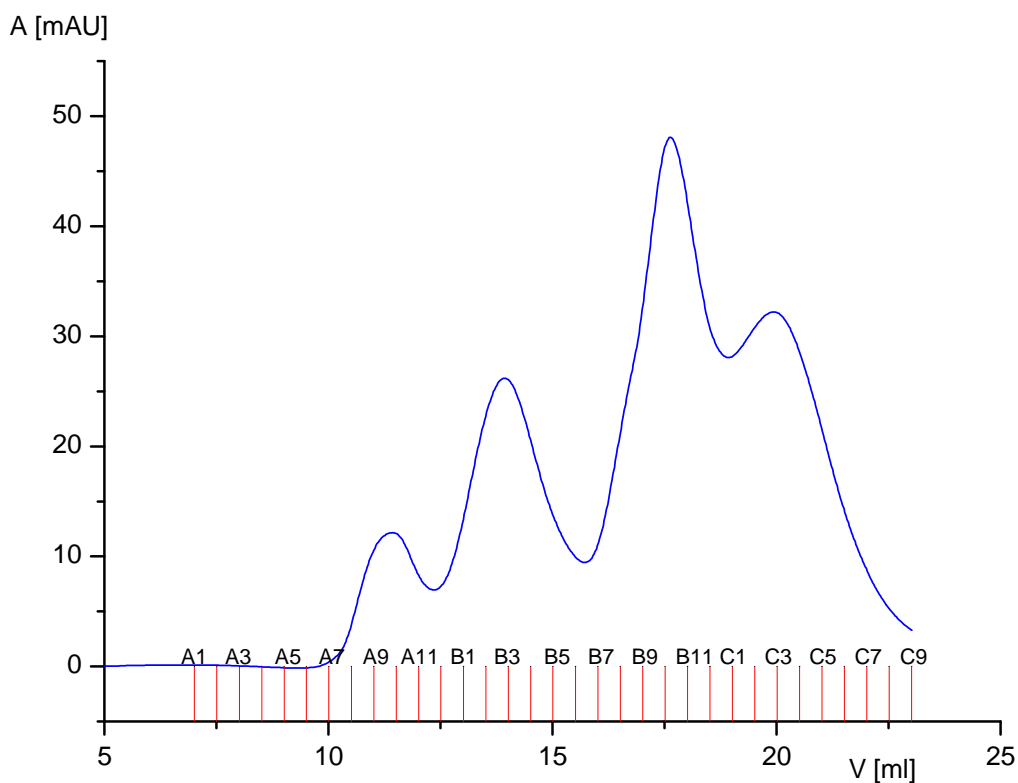
Z obr. 5.9 (viz str. 75) je patrné, že v prvních dvou drahách je obsažen protein SUG1-6×His a nachází se ve velmi čisté formě ve srovnání s prvním krokem purifikace při niklové chelatační chromatografii (viz obr. 5.7, str. 73). Tyto frakce byly jímány ve velmi krátkých retenčních časech poukazující na mnohem větší velikost částic (relativní molekulová hmotnost > 200000) spojenou s agregací proteinu či jeho uspořádané oligomerizací (obr. 5.8)



Obr. 5.9 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při gelové permeační chromatografii proteinu SUG1-6×His. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly naneseny vzorky frakcí A3, A4, A8, A9 a B6 až B9 o celkovém objemu 20 µl (15 µl vzorku frakce + 5 µl vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu SUG1-6×His odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 47000.

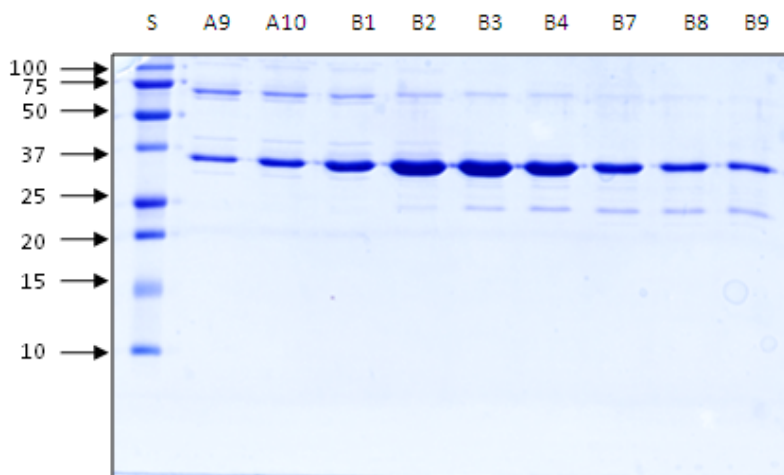
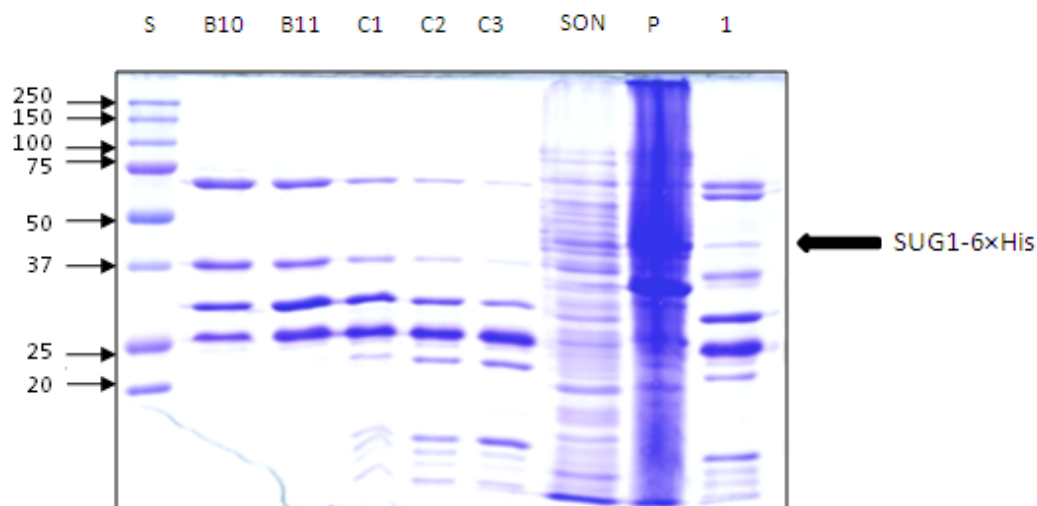
5.2.3 Purifikace proteinu SUG1-6×His (kontrukt SUG1/pST39)

Tato varianta proteinu SUG1 byla produkována pomocí tzv. „leakage“ exprese zahrnující kultivaci bakterií ve 3l LB-média při teplotě 30 °C přes noc. Bakteriální kultury byly resuspendovány v odpovídajícím lyzačním pufru a sonikovány 15 minut. Při niklové chelatační chromatografii byl protein eluován 7,5 ml elučního pufru do 20 ml pufru pro gelovou permeační chromatografii, která byla následně vykonána na koloně Superdex 200 10/300 GL. Byly odebírány frakce A1 až C9 po 0,5 ml (viz obr. 5.10, str. 76) a jejich obsah analyzován pomocí SDS-PAGE (viz obr. 5.11, str. 77).



Obr. 5.10 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii proteinu *SUG1-6×His* na koloně *Superdex 200 10/300 GL*. Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při 280 nm na elučním objemu. Červeně jsou značeny pozice frakcí jímaných při eluci.

Z obr. 5.11 (viz str. 77), který představuje elektroforetickou analýzu frakcí z gelové permeační chromatografie je zřejmé, že žádná z frakcí neobsahovala očekávaný fúzní protein. Jeho přítomnost byla v malé míře zaznamenána ve vzorku sonikátu i resuspendované pelety. Tyto nepříznivé výsledky purifikace tohoto proteinu lze přičíst jeho nízké produkci při tzv. „leakage“ expresi ve srovnání s inducibilní expresí proteinů. Tento faktor společně s jeho produkcí při teplotě 30 °C vysvětluje přední výskyt proteinu v nesolubilní frakci a zároveň vysokou kontaminaci ostatními bakteriálními proteiny *E. coli*.

A**B**

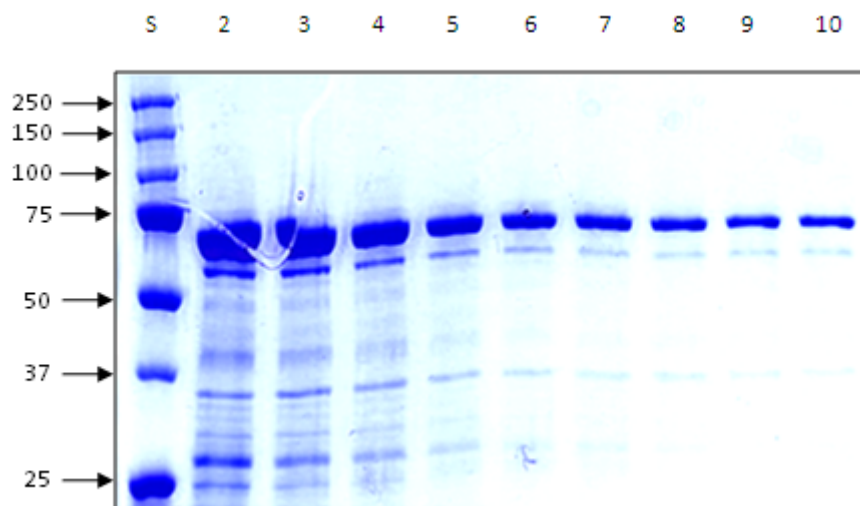
Obr. 5.11 Vizualizované 12% SDS-PAGE gely po elektroforetické analýze frakcí získaných při gelové permeační chromatografii proteinu SUG1-6×His. Do první dráhy byl vždy nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). **A** – Do dalších drah zleva byly postupně naneseny vzorky frakcí A9, A10, B1 až B4, B7 až B9. **B** – Do dalších drah zleva byly naneseny frakce B10, B11 a C1 až C3 o celkovém objemu 20 µl (16 µl vzorku frakce + 4 µl vzorkovacího pufru). Do posledních třech jamek byl nanesen vzorek sonikátu (SON), vzorek resuspendované pelety po sonikaci (P) a vzorek po koncentrování proteinu (1). Zóny migrace proteinu SUG1-6×His odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 47000.

5.2.4 Purifikace proteinu GST-SUG1

Expresce proteinu GST-SUG1 vyžadovala kultivaci bakteriálních kultur ve 4l LB-média při 15 °C přes noc. Bakteriální pelety byly resuspendovány v lyzačním pufru a sonikovány 15 minut.

1) GST afinitní chromatografie

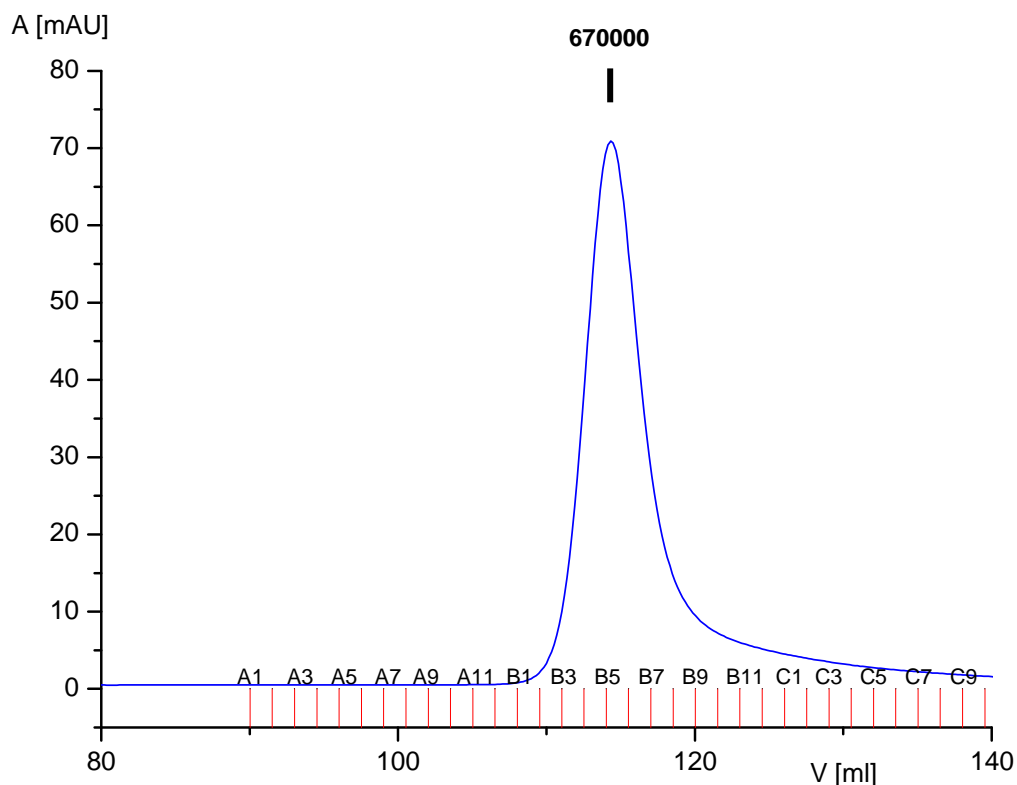
Během eluce byly frakce o objemu 1,5 ml jímány do mikrozkušavek a jejich složení zjišťováno provedením SDS-PAGE. Výsledky této analýzy z obr. 5.12 potvrdily hojnou expresi cílového proteinu s relativně malým podílem nečistot. Pro další purifikační krok byly sloučeny frakce s nejvyšším obsahem proteinu, tedy 2 až 8.



Obr. 5.12 Vizualizovaný 10% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při niklové chelatační chromatografii. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly naneseny vzorky frakcí 2 až 10 o celkovém objemu 20 μ l (15 μ l vzorku frakce + 5 μ l vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu GST-SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 75000.

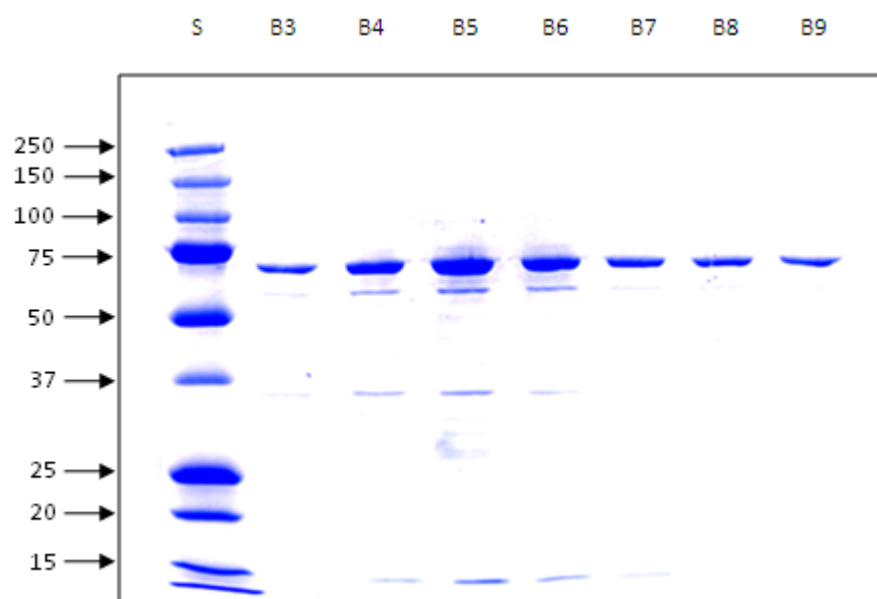
2) Gelová permeační chromatografie

Chromatografie byla prováděna na koloně s vyšší rozlišovací schopností, Hiload 26/60 Superdex 200 pg. V tomto případě nástřikový objem vzorku činil 2 ml. Při eluci byly jímány frakce A1 až C10 o objemu 1,5 ml do mikrozkušavek (viz obr. 5.13, str. 79). Pro analýzu na SDS-PAGE byly použity frakce B3 až B9 (viz obr. 5.14, str. 80).



Obr. 5.13 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii proteinu GST-SUG1 na koloně Hiload 26/60 Superdex 200 pg. Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při 280 nm na elučním objemu. Červeně jsou značeny pozice frakcí jímaných při eluci. Dále je vyznačena pozice mrtvého objemu kolony.

Z obr. 5.14 (viz str. 80) je patrné, že složení jímaných frakcí odpovídalo proteinu GST-SUG1 s výrazným zlepšením jeho čistoty, ale zároveň mnohem nižším výtěžkem ve srovnání s jeho izolací v předchozím purifikačním kroku (viz obr. 5.12, str. 78). Míra čistoty je však relativní vzhledem k purifikaci na koloně s vysokou rozlišovací schopností, kdy dochází ke značnému ředění vzorku. Z chromatografického záznamu na obr. 5.13 je zřejmé, že nedošlo k jeho izolaci ve formě monomeru, ale byl opět eluován pouze ve vysokomolekulární frakci jako v případě purifikace proteinu SUG1-6×His (viz obr. 5.8, str. 74). U tohoto typu purifikace lze navíc předpokládat, že proteinovou agregaci podpořila tvorba stabilních dimerů mezi fúzními partnery GST.



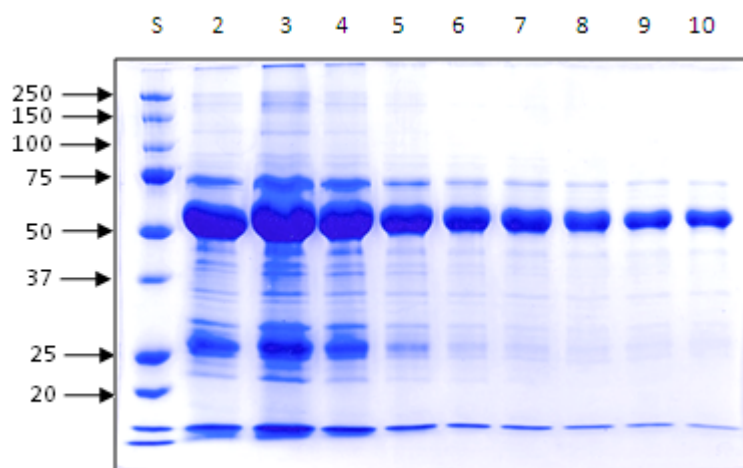
Obr. 5.14 Vizualizovaný 10% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při gelové permeační chromatografii proteinu GST-SUG1. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly nanášeny postupně frakce B3 až B9 o celkovém objemu 20 μ l (15 μ l vzorku frakce + 5 μ l vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu GST-SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 75000.

5.2.5 Purifikace proteinu 6 \times His-G_B1-SUG1

Protein byl exprimován při teplotě 15 $^{\circ}$ C v průběhu cca 16 hodin v 5l kultivačního LB-média. Následovala resuspendace bakteriálních kultur v lyzačním pufru a jejich sonikace po dobu 17 minut.

1) Niklová chelatační chromatografie

Při eluci byl protein jímán po 1,5 ml do 13 mikrozkušavek pro následnou analýzu frakcí na SDS-PAGE (viz obr. 5.15, str. 81). Tato analýza potvrdila přítomnost purifikovaného proteinu a všechny frakce (2 až 10) byly sloučeny a podrobeny dialýze.



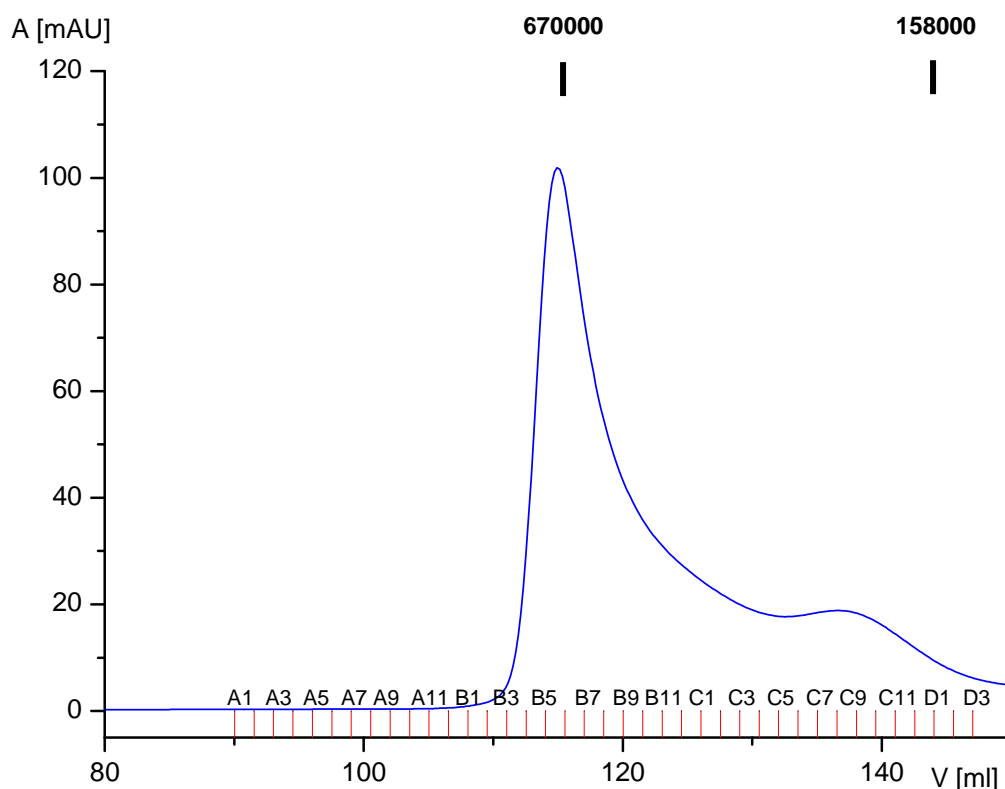
Obr. 5.15 Vizualizovaný 10% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při niklové chelatační chromatografii. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly postupně naneseny vzorky frakcí 2 až 10 o celkovém objemu 20 μ l (15 μ l vzorku frakce + 5 μ l vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu 6xHis-G_B1-SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 55000.

2) Gelová permeační chromatografie

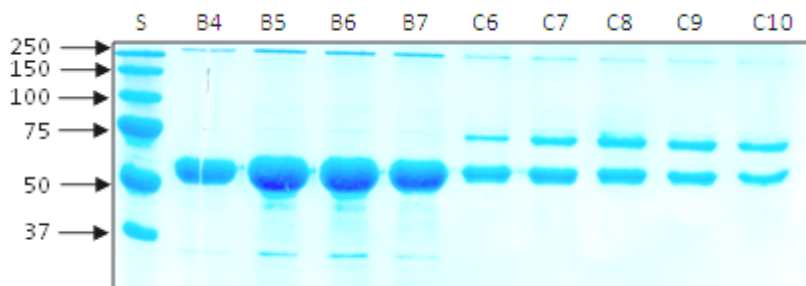
Protein byl purifikován chromatografickou separací na koloně Hiload 26/60 Superdex 200 pg. Při eluci byly jímány frakce A1 až D3 o objemu 1,5 ml (obr. 5.16). Vybrané frakce z řady B (B4 až B7) a C (C6 až C10) byly analyzovány provedením SDS-PAGE (obr. 5.17).

Z obr 5.17 (viz str. 83) je patrný vysoký obsah proteinu 6xHis-G_B1-SUG1 ve frakcích B, které byly sloučeny pro další fáze purifikace proteinu SUG1. Při purifikaci se podařilo oddělit především kontaminantu putující v zóně relativní molekulové hmotnosti 75000, přítomnou ve směsi po niklové chelatační chromatografii (obr. 5.15). Opět byla potvrzena tvorba vysokomolekulárních částic v průběhu gelové permeační chromatografie (viz obr. 5.16, str. 82). Ze všech předchozích purifikací lze shledat purifikaci proteinu 6xHis-G_B1-SUG1 za nejpříznivější, jak z hlediska vysokého výtěžku tak i jeho čistoty. Většího množství proteinu bylo dosaženo především po přidavku neiontového surfaktantu NP-40 do všech pufrů při jeho izolaci a purifikaci. Navíc je zde umožněno štěpení fúzního partnera pro charakterizaci nativního proteinu SUG1.

V internetové aplikaci ProtParam (www.expasy.org) byla zjištěna na základě znalosti primární struktury hodnota absorpčního koeficientu tohoto fúzního proteinu užitá pro výpočet jeho koncentrace ve vzorku ($\epsilon = 0,495 \text{ l/g}$). Z naměřené hodnoty absorbance vzorku při 280 nm byla dále zjištěna přibližná proteinová koncentrace 0,66 mg/ml.



Obr. 5.16 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii proteinu 6×His-G_B1- SUG1 na koloně Hiloal 26/60 Superdex 200 pg. Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při 280 nm na elučním objemu. Červeně jsou značeny pozice frakcí jímáných při eluci. Dále jsou vyznačeny pozice elučního objemu částic o dané relativní molekulové hmotnosti.



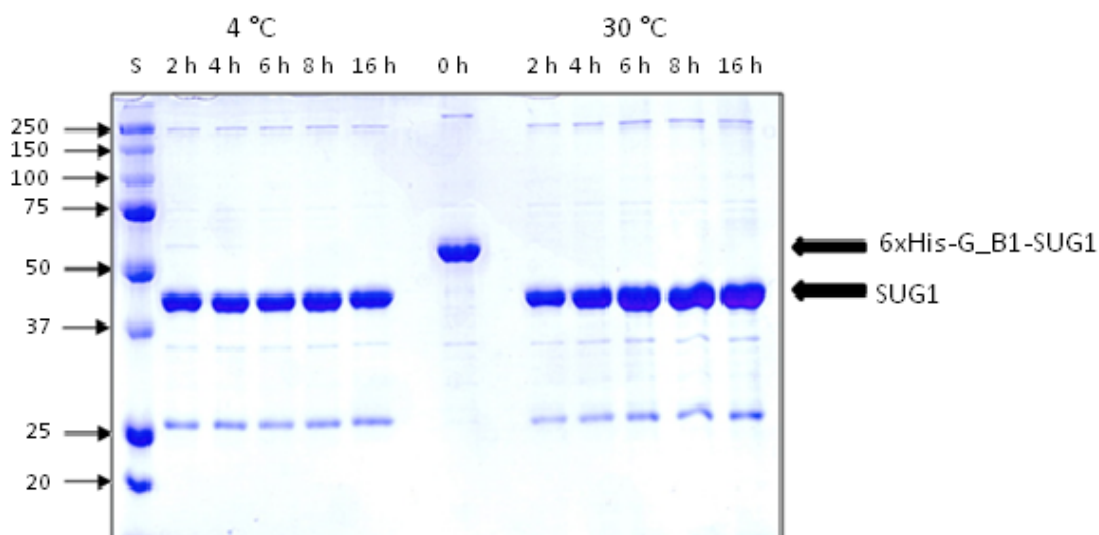
Obr. 5.17 Vizualizovaný 10% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při gelové permeační chromatografii proteinu 6×His-G_B1-SUG1. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly nanášeny postupně frakce B4 až B7 a C6 až C10 o celkovém objemu 15 μ l (12 μ l vzorku frakce + 3 μ l vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu 6×His-G_B1-SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 55000.

5.2.6 Purifikace proteinu SUG1

1) Štěpení proteinu 6×His-G_B1-SUG1 TEV proteasou

Z celkového objemu frakce s obsahem purifikovaného proteinu 6×His-G_B1-SUG1 bylo odebráno 200 μ l pro sledování kinetiky štěpení fúzního partnera 6×His-G_B1 při 30 °C a 4 °C. (viz 4.3.9, str. 60). Z obr. 5.18 (viz str. 84) je patrné, že protein 6×His-G_B1-SUG1 byl velmi dobře přístupný protease, jelikož už po dvou hodinách inkubace se téměř veškerý protein nacházel ve formě bez fúzního partnera. V průběhu štěpení nebyly zaznamenány náznaky precipitace.

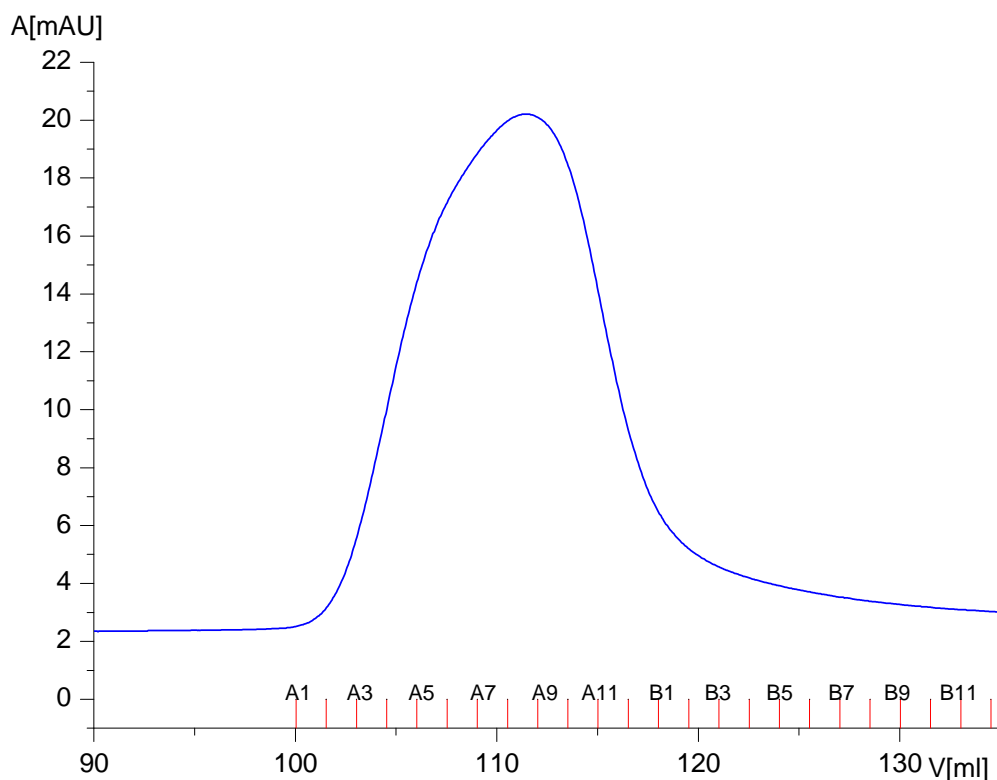
Na základě těchto výsledků bylo ke zbylým 7 ml proteinu o koncentraci 0,66 mg/ml přidáno 144 μ l TEV proteasy pro jeho štěpení při 4 °C po dobu 16 hodin.



Obr. 5.18 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze produktů štěpení proteinu 6xHis-G_{B1}-SUG1 TEV proteasou. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah (2 až 6 zleva) byly postupně nanášeny vzorky směsi štěpeného proteinu při teplotě 4 °C v průběhu její inkubace v časovém horizontu 2, 4, 6, 8 hodin a 16 hodin. Sedmá dráha obsahuje vzorek směsi před přidavkem TEV proteasy. Do drah 8 až 12 byly nanášeny vzorky směsi štěpeného proteinu při 30 °C odebírané v totožných časových intervalech. Celkový objem vzorků činil 20 µl (15 µl vzorku směsi štěpeného proteinu + 5 µl vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 46000.

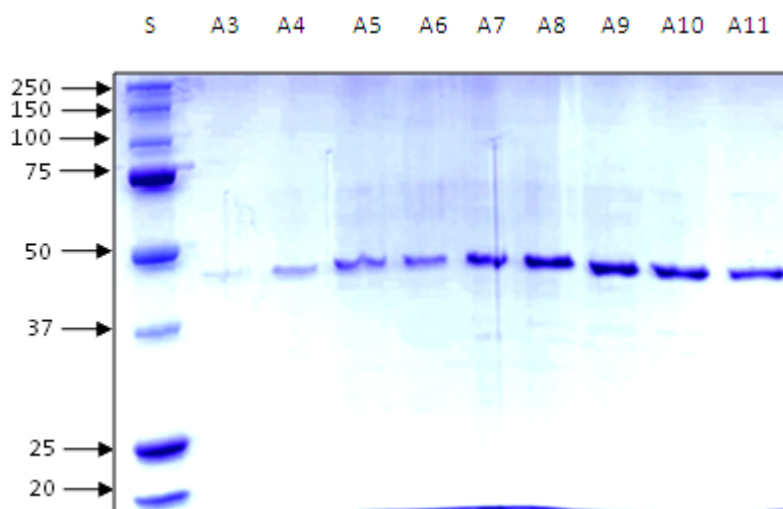
2) Gelová permeační chromatografie

Štěpený protein byl následně purifikován na koloně Hiload 26/60 Superdex 200 pg (viz obr. 5.19, str. 85). Při eluci byly jímány frakce A1 až B12 o objemu 1,5 ml. Obsah proteinu SUG1 ve frakcích A3 až A11 byl potvrzen jejich elektroforetickou analýzou (viz obr. 5.20, str. 86). Všechny tyto frakce byly následně sloučeny.



Obr. 5.19 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii proteinu *SUG1* na koloně *Hiload 26/60 Superdex 200 pg*. Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při 280 nm na elučním objemu. Červeně jsou značeny pozice frakcí jímaných při eluci.

Z obr. 5.20 (viz str. 86) vyplývá, že došlo k účinnému odštěpení fúzního partnera 6×His-G_B1 a izolaci proteinu *SUG1*. Při jeho purifikaci však došlo k jeho velkým ztrátám, jak je patrné ze srovnání s předchozí purifikací fúzního proteinu 6×His-G_B1-*SUG1* (viz obr. 5.16, str. 82 a 5.17, str. 83). Proto je nutné při purifikaci minimalizovat dobu mezi jednotlivými kroky. Protein byl eluován na mrtvém objemu kolony jako v předchozích purifikacích, která prokazuje tvorbu vysokomolekulárních částic, které jsou velmi stabilní. Po změření absorbance vzorku při 280 nm byla koncentrace tohoto proteinu příliš nízká pro jeho další studium, a proto byl koncentrován do nižšího objemu o přibližné koncentraci 0,62 mg/ml. ($\epsilon = 0,349$ l/g).



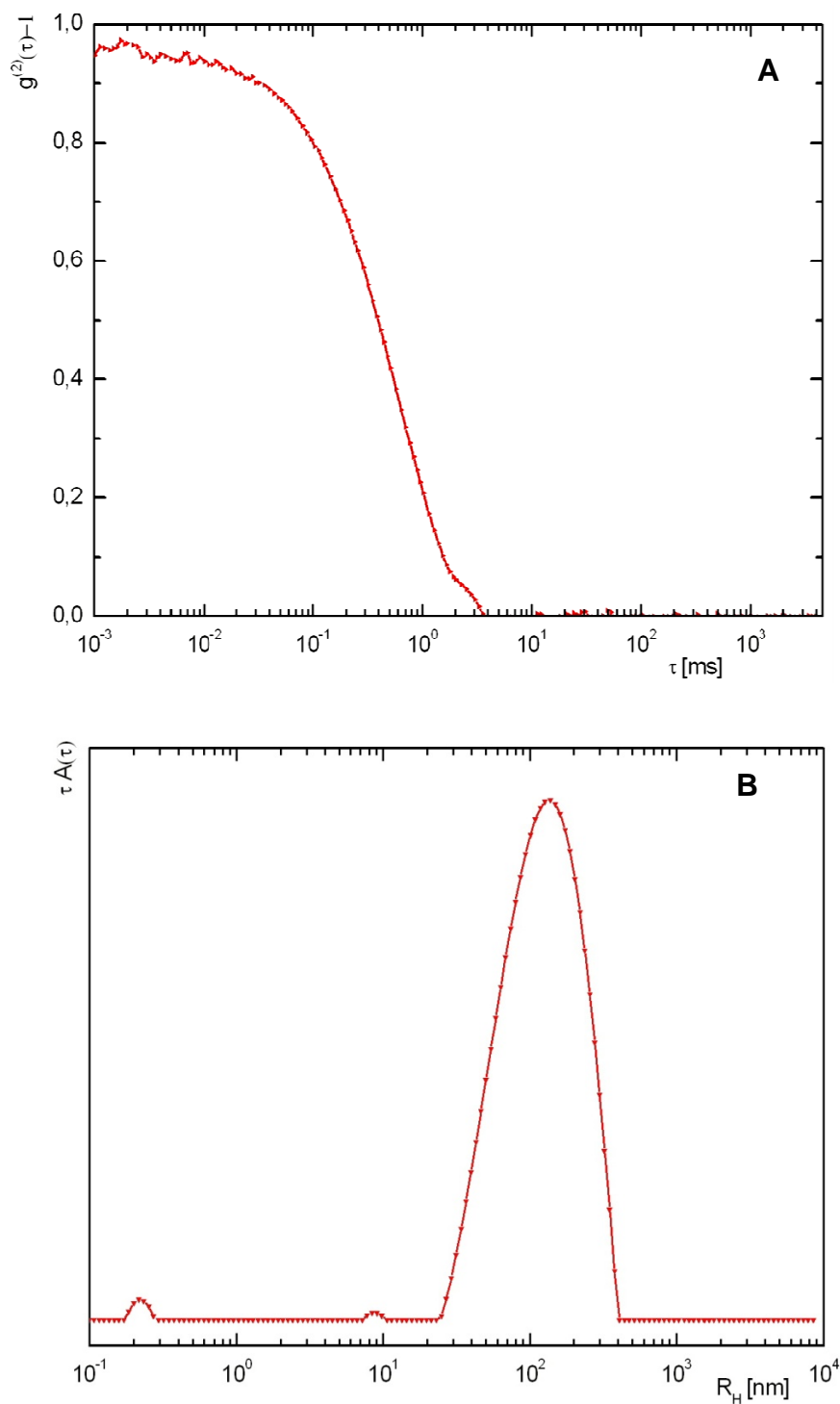
Obr. 5.20 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze frakcí získaných při gelové permeční chromatografii proteinu SUG1. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly nanášeny postupně frakce A3 až A11 o celkovém objemu 20 μ l (15 μ l vzorku frakce + 5 μ l vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 46000.

5.3 Biofyzikální charakterizace proteinu SUG1

5.3.1 Měření rozptylu světla

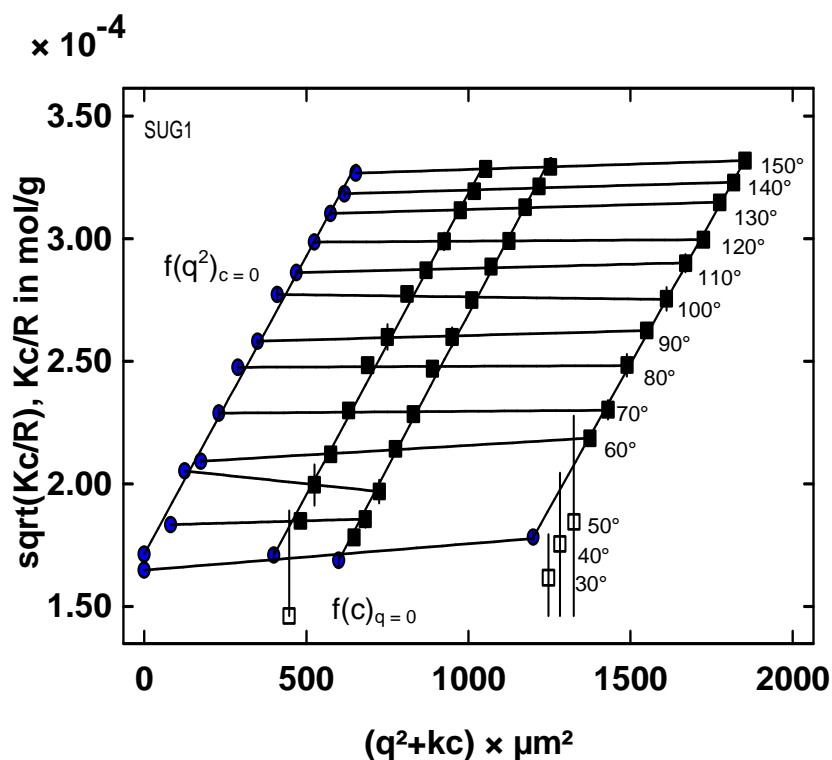
Výstupem měření dynamického rozptylu světla je autokorelační funkce (viz obr. 5.21 A, str. 87), která byla pomocí algoritmu Contin převedena na distribuci hydrodynamických poloměrů částic v roztoku (obr. 5.21 B). Ze statického měření rozptylu byla získána závislost intenzity rozptylu na úhlu rozptylu a dané koncentraci proteinu SUG1 (0,6 mg/ml, 0,3 mg/ml a 0,2 mg/ml), z níž byl vynesena Zimmův diagram (viz obr. 5.22, str. 88). Získaná hodnota molekulové hmotnosti nebyla s přesností stanovena kvůli neznalosti inkrementu indexu lomu. Z analýzy kumulantů byla získána přibližná hodnota hydrodynamického poloměru disperzních částic 111 nm, což koresponduje s chováním proteinu v průběhu purifikace všech čtyř fúzních variant proteinu SUG1.

Výsledky těchto měření potvrdily, že se nejedná o typické agregáty, ale o definovaně uspořádané a velmi stabilní oligomery.



Obr. 5.21 A – Autokorelační funkce získaná při měření DLS proteinu SUG1 o koncentraci 0,6 mg/ml a pod úhlem rozptylu 90° . **B** – Distribuce hydrodynamických poloměrů vypočtená z autokorelační funkce $g^{(2)}(\tau)$.

Z výpočtu poměru hodnot gyračního a hydrodynamického poloměru ($\rho = R_g/R_H$) částic byla získána hodnota 0,76, která odpovídá téměř sférickému tvaru ($\rho = 0,75$). Bylo nutné uvážit, zda malý pík v oblasti 10 nm (obr. 5.21 B, viz str. 87) neodpovídá dalšímu oligomernímu stavu tohoto proteinu, který je možná zastoupen i v nezanedbatelném množství, ale při gelové permeační chromatografii nebylo dosaženo jejich vzájemné separace. Tato hypotéza byla však vyvrácena výsledky měření statického rozptylu světla. Přítomnost těchto částic by se projevila především při měření intenzity pod většími úhly rozptylu a jistým odchýlením od výsledných lineárních závislostí ve výnosu Zimmova diagramu. Obr. 5.22 však vypovídá o značné monodisperzitě vzorku.

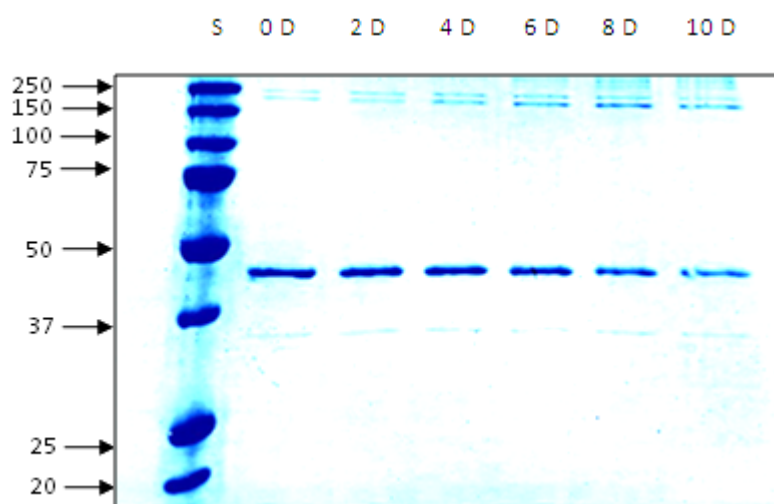


Obr. 5.22 Zimmův diagram získaný z naměřených dat statického rozptylu světla roztoku proteinu SUG1 o koncentraci 0,6, 0,3 a 0,2 mg/ml pod úhly rozptylu 30° až 150° v rozmezí 10°. Směrnice závislosti Kc/R na q extrapolované k $c = 0$ poskytuje hodnotu gyračního poloměru. (Tento obrázek byl vytvořen pomocí softwarové aplikace k měřicímu přístroji ALV)

Tvorba vysokomolekulárních částic byla prokázána i pomocí analytické ultracentrifugace, která však neumožnila určit sedimentační koeficienty a proto nejsou získaná data prezentována.

5.3.2 Měření stability proteinu při 18 °C

Protein SUG1 byl uložen v termostatu po dobu deseti dnů, kde byl vystaven teplotě 18 °C pro sledování jeho stability. V dvoudenních intervalech byly odebrány vzorky proteinu o objemu 15 µl pro jejich následnou analýzu pomocí SDS-PAGE.



Obr. 5.23 Vizualizovaný 12% SDS-PAGE gel po elektroforetické analýze vzorků proteinu SUG1 uchovávaného při 18°C. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Do dalších drah zleva byly postupně nanášeny vzorky proteinu SUG1, uchovaném při teplotě 18 °C v časovém odstupu 0, 2, 4, 6, 8 až 10 dnů. Celkový objem vzorků činil 20 µl (15µl vzorku frakce + 5µl vzorkovacího pufru). Zóny migrace proteinu SUG1 odpovídají jeho relativní molekulové hmotnosti cca 46000.

Z obr. 5.23 je zřejmé, že protein vykazuje velmi dobrou stabilitu s pomalou kinetikou jeho degradace i při jeho dlouhodobém vystavení teplotě 18 °C. V roztoku nebyly patrné známky precipitace až do osmého dne pozorování.

6 DISKUZE

Předmětem studia této diplomové práce je protein SUG1, který je integrální součástí regulačního komplexu 26S proteasomu a podílí se na mnoha buněčných procesech spojených s degradací jejich účastníků nebo regulací jejich funkce [32,33,34]. Nepříliš známým mechanismem se účastní regulace G-proteinové signalizace ve fotoreceptorech na základě interakce s fosducinem, který je takto cíleně proteolyticky degradován [5,43]. Je možné, že je tento děj spjatý s působením fosducinu jako potenciálního transkripčního faktoru [52].

Pro bližší studium těchto interakcí bylo nezbytné nalézt optimální podmínky pro výrobu lidského SUG1 *in vitro*. Za tímto účelem byly exprimovány a purifikovány tři fúzní varianty (čtyři expresní konstrukty) tohoto proteinu - SUG1-6×His, 6×His-G_B1-SUG1 a GST-SUG1. Podmínky purifikace vyžadovaly v některých případech dlouhodobou optimalizaci pro zvýšení výtěžku a čistoty proteinu. Přestože výsledkem všech provedených purifikací (kromě testování konstruktu SUG1/pST39) byla tvorba vysokomolekulárních částic, nejvíce uspokojivé výsledky týkající se kvality a výtěžku proteinu byly pozorovány při purifikaci proteinu SUG1 ve fúzi s proteinem G_B1, který mohl být následně štěpen pro studium nativního stavu proteinu. Tento výsledek je vnímán pozitivně už jen z důvodu, že předchozí purifikace tohoto proteinu byly prováděny za denaturujících podmínek [5,36]. Tvorba vysokomolekulárních a definovaně uspořádaných sférických oligomerů byla potvrzena i měřením rozptylu světla, přičemž oligomerizace tohoto proteinu je patrně důležitá i pro jeho funkční aktivitu a je zprostředkována N-terminálními helixy obsahující „coiled-coil“ doménu [32,40]. Z dosavadních studií navíc vyplývá, že do interakce s ligandy vstupuje SUG1 v rámci celého regulačního komplexu po jeho separaci od 20S proteolytického jádra [42]. Přestože přesná struktura nalezených částic nebyla stanovena, vše nasvědčuje tomu, že jeho N-terminální domény jsou uspořádány u povrchu rozsáhlého komplexu, z důvodu velmi dobré přístupnosti TEV proteasy při štěpení G_B1 proteinu.

Dále bylo toto chování porovnáno s jeho již dobře prostudovaným archeálním homologem proteinem PAN. Při purifikaci tohoto proteinu byla také zaznamenána tvorba vysokomolekulárních oligomerů (patrně dodekamerů), ale předpokládá se, že funkci zastává pouze ve formě hexameru [29]. Obtížné získání krystalografické struktury tohoto proteinu bylo připisováno obsahu mnoha flexibilních úseků, a proto byl tento protein podroben limitované proteolýze.

Z těchto výsledků vyšlo najevo, že oligomerizace je spojena především s neuspořádanou strukturou prvních několika desítek aminokyselin [25]. Schopnost tvorby oligomerů zanikla po jeho rozdělení do dvou subkomplexů, což by mohlo být užitečné i při studiu SUG1. Jednalo by se především o přípravu expresního konstruktů proteinu SUG1, který bude postrádat počáteční neuspořádané strukturální prvky a jeho studium bude v budoucnu prioritou. Na základě predikce sekundární struktury a vysoké homologie v primární struktuře s proteinem PAN (Příloha B) by byl SUG1 rozdělen do dvou částí, které představují oddělenou N-terminální a AAA-ATPasovou doménu. Otázkou je, zda separací těchto domén, nedojde ke kompletní ztrátě biologické aktivity, která zabrání studiu jeho interakcí s fosducinem.

Kromě proteinu SUG1 je do této dráhy zapojen ještě transkripční faktor CRX, jehož funkce je regulována interakcí s C-terminální částí fosducinu [4]. Účinky těchto vazebných partnerů fosducinu jsou spojeny s jeho potencionální rolí při regulaci transkripce specifických genů v sítnici a jiných tkáních, která částečně objasňuje i úlohu ostatních isoform fosducinu [52].

7 ZÁVĚR

- Byly připraveny expresní konstrukty proteinu SUG1 v plasmidu pET-29b a pRSFDuet-1, jejichž produkty jsou proteiny SUG1-6×His a 6×His-G_B1-SUG1
- Byly provedeny testy exprese těchto proteinů v bakteriích Rosetta(DE3) a BL21(DE3), které potvrdily vysokou produkci proteinu pouze v případě exprese konstruktů SUG1/pET-29b
- Byly exprimovány a purifikovány tři fúzní varianty proteinu SUG1 (SUG1-6×His, 6×His-G_B1-SUG1 a GST-SUG1) čtyř expresních konstruktů za různých podmínek purifikace. Kromě konstruktů SUG1/pST39 byla zaznamenána produkce cílového proteinu, který se po provedení gelové permeační chromatografie vždy nacházel ve vysokomolekulární frakci. Pro další studium byl vybrán protein 6×His-G_B1-SUG1 především z důvodu možného odstranění fúzního partnera.
- Vnější struktura tvořených částic byla charakterizována měřením dynamického i statického rozptylu světla, přičemž získaná data predikovala jejich definované uspořádání a sférický tvar. Měření statického rozptylu poukázalo i na značnou monodisperzitu vzorku.
- Protein SUG1 je dostatečně stabilní při vystavení teplotě 18°C v časovém horizontu deseti dnů.
- Podobné chování tohoto proteinu bylo zaznamenáno i u archeálního homologu proteinu PAN. Na základě jeho struktury budou připraveny další expresní konstrukty zkrácených verzí proteinu SUG1, při jejichž produkci by mohla být tato nadměrná oligomerizace efektivně potlačena.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] Obsil, T.; Obsilova, V.: Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 663–672 (2011)
- [2] Pozuelo Rubio, M.; Geraghty, K. M.; Wong, B. H.; Wood, N. T.; Campbell, D. G.; Morrice, N.; Mackintosh, C.: 14-3-3 affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem. J.* **379**, 395–408 (2004)
- [3] Thulin, C. D.; Savage, J. R.; McLaughlin, J. N.; Truscott, S. M.; Old, W. M.; Ahn, N. G.; Resing, K. A.; Hamm, H. E.; Bitensky, M. W.; Willardson, B. M.: Modulation of the G protein regulator phosducin by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *J. Biol. Chem.* **276**, 23805–23815 (2001)
- [4] Zhu, X.; Craft, C. M.: Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5216–5226 (2000)
- [5] Zhu, X.; Craft, C.: Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S proteasomal subunit, SUG1. *Mol. Vis.* **4**, 13 (1998)
- [6] Beetz, N.; Harrison, M. D.; Brede, M.; Zong, X.; Urbanski, M. J.; Sietmann, A.; Kaufling, J.; Lorkowski, S.; Barrot, M.; Seeliger, M. W.; Vieira-Coelho, M. A.; Hamet, P.; Gaudet, D.; Seda, O.; Tremblay, J.; Kotchen, T. A.; Kaldunski, M.; Nüsing, R.; Szabo, B.; Jacob, H. J.; Cowley, A. W. Jr.; Biel, M.; Stoll, M.; Lohse, M. J.; Broeckel, U.; Hein, L.: Phosducin influences sympathetic activity and prevents stress-induced hypertension in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3597–3612 (2009)
- [7] Palatini, P.; Ceolotto, G.; Ragazzo, F.; Mos, L.; Santonastaso, M.; Zanata, G.; Saladini, F.; Casiglia, E.: Phosducin rs12402521 polymorphism predicts development of hypertension in young subjects with overweight or obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **23**, 323–329 (2013)
- [8] Chabre, M.; Deterre, P.: Molecular mechanism of visual transduction. *Eur. J. Biochem.* **179**, 255–266 (1989)
- [9] Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Základy buněčné biologie*. 2.vyd. Ústí nad Labem, Espero Publishing 1998
- [10] Hamm, H. E.: The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 669–672 (1998)

- [11] Skiba, N. P.; Bae, H.; Hamm, H. E.: Mapping of effector binding sites of transducin alpha-subunit using G alpha t/G alpha i1 chimeras. *J. Biol. Chem.* **271**, 413–424 (1996)
- [12] Isayama, T.; Zimmerman, A. L.; Makino, C. L.:
The molecular design of visual transduction. Dostupné z URL:
 <<http://www.biophysics.org/portals/1/pdfs/education/Phototransduction.pdf>>
 [cit. 17. 3. 2013]
- [13] Allen, J. P.: *Biophysical chemistry*. UK, Blackwell Publishing 2008, s. 395
- [14] Gaudet, R.; Bohm, A.; Sigler, P. B.: Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin. *Cell.* **87**, 577–588 (1996)
- [15] Lee, B. Y.; Thulin, C. D.; Willardson, B. M.: Site-specific phosphorylation of phosducin in intact retina. Dynamics of phosphorylation and effects on G protein beta gamma dimer binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 54008–54017 (2004)
- [16] Hawes, B. E.; Touhara, K.; Kurose, H.; Lefkowitz, R. J.; Inglese, J.: Determination of the G beta gamma-binding domain of phosducin. A regulatable modulator of G beta gamma signaling. *J. Biol. Chem.* **269**, 29825–29830 (1994)
- [17] Xu, J.; Wu, D.; Slepak, V. Z.; Simon, M. I.: The N terminus of phosducin is involved in binding of beta gamma subunits of G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**, 2086–2090 (1995)
- [18] Thibault, C.; Sganga, M. W.; Miles, M. F.: Interaction of phosducin-like protein with G protein betagamma subunits. *J. Biol. Chem.* **272**, 12253–12256 (1997)
- [19] Belcastro, M.; Song, H.; Sinha, S.; Song, C.; Mathers, P. H.; Sokolov, M.: Phosphorylation of phosducin accelerates rod recovery from transducin translocation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 3084–3091 (2012)
- [20] Gaudet, R.; Savage, J. R.; McLaughlin, J. N.; Willardson, B. M.; Sigler, P. B.: A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin. *Mol. Cell* **3**, 649–660 (1999)
- [21] Rezacikova, L.; Kacirova, M.; Sulc, M.; Herman, P.; Vecer, J.; Stepanek, M.; Obsilova, V.; Obsil, T.: Structural modulation of phosducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *Biophys. J.* **103**, 1960–1969 (2012)
- [22] Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Fu, H.; Larsen, C. N.; Coux, O.; Wefes, I.; Pfeifer, G.; Cjeka, Z.; Vierstra, R.; Baumeister, W.; Fried, V.; Finley, D.: Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 21–28 (1999)

- [23] Tanaka K.: The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **85**,12–36 (2009)
- [24] Groll, M.; Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D.; Huber, R.: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463–471 (1997)
- [25] Zhang, F.; Hu, M.; Tian, G.; Zhang, P.; Finley, D.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y.: Structural insights into the regulatory particle of the proteasome from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Mol. Cell* **34**, 473–484 (2009)
- [26] Beck, F.; Unverdorben, P.; Bohn, S.; Schweitzer, A.; Pfeifer, G.; Sakata, E.; Nickell, S.; Plitzko, J. M.; Villa, E.; Baumeister, W.; Förster, F.: Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **109**, 14870–14875 (2012)
- [27] Lee, S. H.; Moon, J. H.; Yoon, S. K.; Yoon, J. B.: Stable incorporation of ATPase subunits into 19 S regulatory particle of human proteasome requires nucleotide binding and C-terminal tails. *J. Biol. Chem.* **287**, 9269–9279 (2012)
- [28] Wang, J.; Song, J. J.; Franklin, M. C.; Kamtekar, S.; Im, Y. J.; Rho, S. H.; Seong, I. S.; Lee, C. S.; Chung, C. H.; Eom, S. H.: Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure* **9**, 177–184 (2001)
- [29] Smith, D. M.; Kafri, G.; Cheng, Y.; Ng, D.; Walz, T.; Goldberg, A. L.: ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol. Cell* **20**, 687–698 (2005)
- [30] Yu, Y.; Smith, D. M.; Kim, H. M.; Rodriguez, V.; Goldberg, A. L.; Cheng, Y.: Interactions of PAN's C-termini with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome-ATPase interactions. *EMBO J.* **29**, 692–702 (2010)
- [31] Lasker, K.; Förster, F.; Bohn, S.; Walzthoeni, T.; Villa, E.; Unverdorben, P.; Beck, F.; Aebersold, R.; Sali, A.; Baumeister, W.: Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **109**, 1380–1387 (2012)
- [32] Su, K.; Yang, X.; Roos, M. D.; Paterson, A. J.; Kudlow, J. E.: Human Sug1/p45 is involved in the proteasome-dependent degradation of Sp1. *Biochem. J.* **348**, 281–289 (2000)

- [33] vom Baur, E.; Zechel, C.; Heery, D.; Heine, M. J.; Garnier, J. M.; Vivat, V.; Le Douarin, B.; Gronemeyer, H.; Chambon, P.; Losson, R.: Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* **15**, 110–124 (1996)
- [34] Ferry, C.; Gianni, M.; Lalevée, S.; Bruck, N.; Plassat, J. L.; Raska, I. Jr.; Garattini, E.; Rochette-Egly, C.: SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes via its interaction with SRC-3. *J. Biol. Chem.* **284**, 8127–8135 (2009)
- [35] Makino, Y.; Yogosawa, S.; Kanemaki, M.; Yoshida, T.; Yamano, K.; Kishimoto, T.; Moncollin, V.; Egly, J. M.; Muramatsu, M.; Tamura, T.: Structures of the rat proteasomal ATPases: determination of highly conserved structural motifs and rules for their spacing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 1049–1054 (1996)
- [36] Makino, Y.; Yamano, K.; Kanemaki, M.; Morikawa, K.; Kishimoto, T.; Shimbara, N.; Tanaka, K.; Tamura, T.: SUG1, a component of the 26 S proteasome, is an ATPase stimulated by specific RNAs. *J. Biol. Chem.* **272**, 23201–23205 (1997)
- [37] Ferdous, A.; Gonzalez, F.; Sun, L.; Kodadek, T.; Johnston, S. A.: The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **7**, 981–991(2001)
- [38] Dilworth, F. J.; Chambon, P.: Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* **20**, 3047–3054 (2001)
- [39] Inoue, T.; Kon, T.; Ajima, R.; Ohkura, R.; Tani, M.; Yokota, J.; Sutoh, K.: MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 829–834 (2006)
- [40] Kumar, Y.; Radha, V.; Swarup, G.: Interaction with Sug1 enables Ipad ubiquitination leading to caspase 8 activation and cell death. *Biochem. J.* **427**, 91–104 (2010)
- [41] Seetharaman, J.; Su, M.; Wang, D.; Janjua, H.; Cunningham, K.; Owens, L.; Xiao, R.; Liu, J.; C. Baran, M.; Acton, T. B.; Montelione, G. T.; Hunt, J. F.; Tong, L.: Crystal Structure of a domain of 26S proteasome regulatory subunit 8 from homo sapiens. Northeast Structural Genomics Consortium target id HR3102A. To be published. (PDB 3KW6)
- [42] Archer, C. T.; Burdine, L.; Liu, B.; Ferdous, A.; Johnston, S. A.; Kodadek, T.: Physical and functional interactions of monoubiquitylated transactivators with the proteasome. *J. Biol. Chem.* **283**, 21789–21798 (2008)

- [43] Barhite, S.; Thibault, C.; Miles, M. F.: Phosducin-like protein (PhLP), a regulator of G beta gamma function, interacts with the proteasomal protein SUG1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1402**, 95–101 (1998)
- [44] Craft, C. M.; Xu, J.; Slepak, V. Z.; Zhan-Poe, X.; Zhu, X.; Brown, B.; Lolley, R. N.: PhLPs and PhLOPs in the phosducin family of G beta gamma binding proteins. *Biochemistry* **37**, 15758–15772 (1998)
- [45] Chen, S.; Wang, Q. L.; Nie, Z.; Sun, H.; Lennon, G.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Zack, D. J.: Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**, 1017–1030 (1997)
- [46] Furukawa, T.; Morrow, E. M.; Cepko, C. L.: Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91**, 531–541 (1997)
- [47] Li, X.; Chen, S.; Wang, Q.; Zack, D. J.; Snyder, S. H.; Borjigin, J.: A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 1876–1881 (1998)
- [48] Freund, C. L.; Gregory-Evans, C. Y.; Furukawa, T.; Papaioannou, M.; Looser, J.; Ploder, L.; Bellingham, J.; Ng, D.; Herbrick, J. A.; Duncan, A.; Scherer, S. W.; Tsui, L. C.; Loutradis-Anagnostou, A.; Jacobson, S. G.; Cepko, C. L.; Bhattacharya, S. S.; McInnes, R. R.: Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* **91**, 543–555 (1997)
- [49] Rovsing, L.; Rath, M. F.; Lund-Andersen, C.; Klein, D. C.; Møller, M.: A neuroanatomical and physiological study of the non-image forming visual system of the cone-rod homeobox gene (Crx) knock out mouse. *Brain Res.* **1343**, 54–65 (2010)
- [50] Santagata, S.; Maire, C. L.; Idbaih, A.; Geffers, L.; Correll, M.; Holton, K.; Quackenbush, J.; Ligon, K. L.: CRX is a diagnostic marker of retinal and pineal lineage tumors. *PLoS One* **4**, e7932 (2009)
- [51] Gastel, J. A.; Roseboom, P. H.; Rinaldi, P. A.; Weller, J. L.; Klein, D. C.: Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* **279**, 1358 – 1366 (1998)
- [52] Zhu, X.; Craft, C. M.: The carboxyl terminal domain of phosducin functions as a transcriptional activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 504–509 (2000)
- [53] Lee, S. Y.: High cell-density culture of Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* **14**, 98–105 (1996)

- [54] Makrides, S. C.: Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512–538(1996)
- [55] Terpe, K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523–533 (2003)
- [56] Harper, S.; Speicher, D. W. : Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **52**, 6.6.1–6.6.26 (2008)
- [57] Huth, J. R.; Bewley, C. A.; Jackson, B. M.; Hinnebusch, A. G.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.: Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR. *Protein Sci.* **6**, 2359–2364 (1997)
- [58] Cheng, Y.; Patel, D. J.: An efficient system for small protein expression and refolding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 401–405(2004)
- [59] Baneyx, F.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411–421(1999)
- [60] de Boer, H. A.; Comstock, L. J.; Vasser, M.: The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **80**, 21–25 (1983)
- [61] Studier, F. W.: Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression Purif.* **41**, 207–234 (2005)
- [62] Tan, S.: A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* **21**, 224–234 (2001)
- [63] Manuál ArcticExpress competent cells and ArcticExpress (DE3) competent cells. Agilent Technologies. Dostupné z URL: http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/230191_A.pdf [cit. 12. 4. 2013]
- [64] Novy, R.; Drott, D.; Yaeger, K.; Mierendorf, R.: Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *inNovations.* **12**, 1–3 (2001)
- [65] Bondos, S. E.; Bicknell, A.: Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal. Biochem.* **316**, 223–231(2003)
- [66] McLaughlin, S. H.; Jackson, S. E.: Folding and stability of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Protein Sci.* **11**, 1926–1936(2002)
- [67] Polylinker plasmidu pET-29b. Dostupné z URL: <http://www.synthesisgene.com> [cit. 12. 3. 2013]
- [68] Mapa plasmidu pRSFDuet-1. Dostupné z URL: <http://www.merckmillipore.cz> [cit. 12. 3. 2013]
- [69] Rosypal, S. a kolektiv autorů: *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia 2003, s. 632

- [70] Koláčková, K. *Příprava expresních konstruktů interakčních partnerů fosducinu*. Praha, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Biochemie
- [71] Atkins, P.; De Paula, J.: Laser light scattering. In: *Atkins' physical chemistry*. 8th ed. USA and Canada, W. H. Freeman and Company 2006, s. 657–660
- [72] Schärfl, W: *Light scattering from Polymer solutions and Nanoparticle Dispersions*. Heidelberg, Springer 2007.
- [73] Indian Academy of Sciences: *Light scattering*. Dostupné z URL:
<http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/LightScat.pdf>
[cit. 20.3.2013]

Příloha A

Sekvence nukleotidů cDNA a sekvence aminokyselin isoformy 1 lidského SUG1

Počátek čtecího rámce a jeho konec je označen žlutým zvýrazněním

(databáze NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov)

```
gtcttcagggtcccaatcctccgcttccgcgcttgccgccaagacggctcggatgccggc
V F R S Q S S A S A L A R Q D G S D A G
ggctctctgctgaagagagaagatggcgcttgacggaccagagcagatggagctggaggag
G L C - R E K M A L D G P E Q M E L E E
gggaaggcaggcagcggactccgccaatattatctgtccaagattgaagaactccagctg
G K A G S G L R Q Y Y L S K I E E L Q L
attgtgaatgataagagccaaaacctccggaggctgcaggcacagaggaacgaactaaat
I V N D K S Q N L R R L Q A Q R N E L N
gctaaagtccgctattgctggaggagctacagctgctgcaggagcagggctcctatgtg
A K V R L L R E E L Q L L Q E Q G S Y V
ggggaagtagtccgggccatggataagaagaaagtgttggtcaaggtacatcctgaaggt
G E V V R A M D K K K V L V K V H P E G
aaatttgtttagactggacaaaaacattgacatcaatgatgtgacaccaattgccgg
K F V V D V D K N I D I N D V T P N C R
gtggctctaaggaatgacagctacactctgcacaagatcctgcccacaaggtagacca
V A L R N D S Y T L H K I L P N K V D P
ttagtgtcactgatgatgggtggagaaagtaccagattcaacttatgagatgattgggtgga
L V S L M M V E K V P D S T Y E M I G G
ctggacaaacagatcaaggagatcaaagaagtgatcgagctgcctgttaagcatcctgag
L D K Q I K E I K E V I E L P V K H P E
ctcttcgaagcactgggcattgctcagcccaagggagtgtgctgtatggacctccaggc
L F E A L G I A Q P K G V L L Y G P P G
actgggaagacactgttggcccggtgtggctcatcatcaggactgtacctttattcgt
T G K T L L A R A V A H H T D C T F I R
gtctctggctctgaactggtacagaaattcataggggaaggggcaagaatggtgagggag
V S G S E L V Q K F I G E G A R M V R E
ctgtttgtcatggcacgggaacatgctccatctatcatcttcatggacgaaatcgactcc
L F V M A R E H A P S I I F M D E I D S
atcggctcctcgcggctggaggggggttctggaggggacagtgaagtgcagcgcacgatg
I G S S R L E G G S G G D S E V Q R T M
ctggagttgctcaaccagctcgacggctttgaggccaccaagaacatcaaggttatcatg
L E L L N Q L D G F E A T K N I K V I M
gctactaataggattgatatcctggactcggcactgcttcgcccagggcgattgacaga
A T N R I D I L D S A L L R P G R I D R
aaaattgaattcccccccccaatgaggaggcccggtggacatthttgaagattcattct
K I E F P P P N E E A R L D I L K I H S
cggaagatgaacctgaccgggggatcaacctgagaaaaattgctgagctcatgccagga
R K M N L T R G I N L R K I A E L M P G
gcatcaggggctgaagtgaagggcggtgtgcacagaagctggcatgtatgccctgagagaa
A S G A E V K G V C T E A G M Y A L R E
cggcgagtccatgtcactcaggaggactttgagatggcagtagccaagggtcatgcagaag
R R V H V T Q E D F E M A V A K V M Q K
gacagtgagaaaaacatgtccatcaagaaattatggaagtgaagtggacagcctttgtgtg
D S E K N M S I K K L W K - V D S L C V
tatctctccaataaagctctgtgggccaagtcctctaggaaaaaaaaaaaaa
Y L S N K A L W A K S S R K K K K
```


Počet aminokyselin : 406

Relativní molekulová hmotnost: 45626

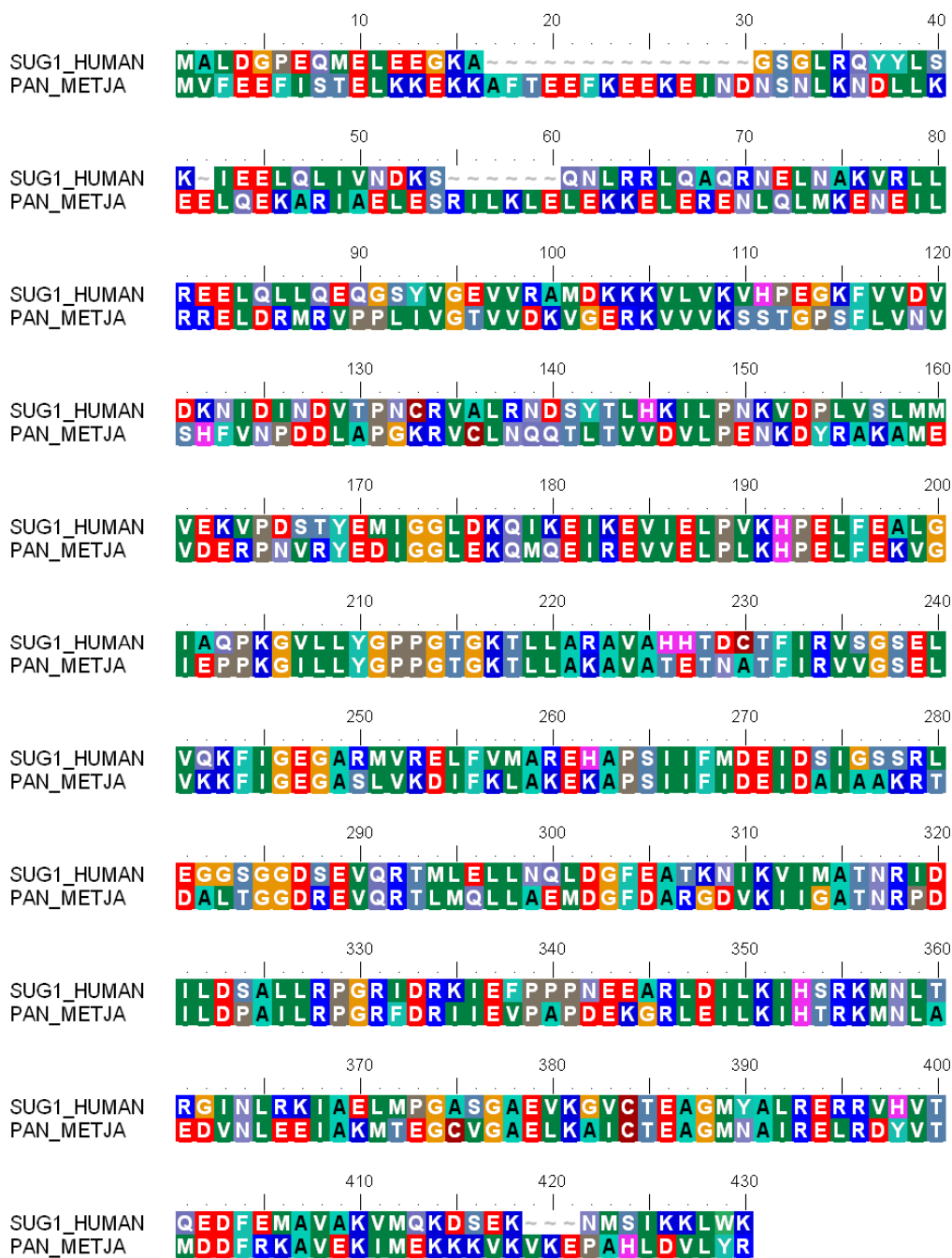
Teoretická hodnota pI: 7,11

Extinční koeficient: 0,349 l/g

Hodnoty získány pomocí nástroje ProtParam (www.expasy.org)

Příloha B

Porovnání primární struktury lidského SUG1 a archeálního homologního proteinu PAN (Methanocaldococcus Jannaschii). Alignment byla získán pomocí internetového nástroje ClustalW a upraven v programu BioEdit Sequence Alignment Editor. Shodné a podobné aminokyseliny jsou v obou sekvencích zvýrazněny jednotnou barvou.



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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka