UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Kateřina Jarosilová

Příprava thioredoxinu a thioredoxin-vazebné domény proteinkinasy ASK1 pro strukturní studie

Preparation of thioredoxin and thioredoxin-binding domain of protein kinase ASK1 for structural studies

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a všechny použité informační zdroje a literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne .....

.....

Kateřina Jarosilová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za jeho odborné rady, vstřícnost a ochotu při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. a ostatním členům laboratoře za jejich podporu a praktické rady při práci v laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich podporu v průběhu celého studia.

ABSTRAKT

Všechny živé organismy jsou v průběhu života vystaveny rozličným formám stresu. Možná právě proto se vyvinul evolučně velmi dobře konzervovaný systém MAPK (z anglického *mitogen-activated protein kinase*) signálních kaskád regulující buněčnou odpověď na stres. Tyto signální dráhy se skládají ze tří následujících tříd proteinkinas MAP3K, MAP2K a MAPK. Z MAPK je poté signál přenášen na další proteinkinasy nebo transkripční faktory.

Proteinkinasa ASK1 (z anglického *apoptosis signal-regulating kinase 1*) je členem MAPK dráhy, konkrétně se řadí do třídy MAP3K, tedy mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa. Lidská ASK1 je protein složený z 1374 aminokyselin uspořádaných do několika domén a sekvenčních motivů. Třemi hlavními doménami jsou N-terminální coil-coiled doména (NCC), serin/threoninová kinasová doména a C-terminální coil-coiled doména (CCC). Dále bylo v sekvenci charakterizováno několik míst, která jsou zodpovědná za interakci ASK1 s jejími vazebnými partnery. Aktivita ASK1 je totiž regulována různými faktory, mezi něž patří inhibitory thioredoxin a 14-3-3 proteiny. Naopak faktory TRAF (z anglického *TNF receptor associated factor*) proteinkinasu aktivují.

Cílem této práce byla příprava šesti variant expresních konstruktů N-terminálního úseku sekvence lidské ASK1, který by měl být zodpovědný za tvorbu komplexu ASK1 s thioredoxinem. C konce sekvence proteinu byly vybírány tak, aby nedošlo k poškození předpokládané sekundární struktury. Dále byl připraven nový expresní konstrukt thioredoxinu (konkrétně sekvence lidského thioredoxinu s bodovou mutací zabraňující tvorbě dimerů označované C73S, kdy je cystein 73 změněn na serin), umožňující po purifikaci fúzního proteinu odštěpit purifikační histidinovou kotvu a získat tak téměř nativní formu proteinu.

ABSTRACT

All living organisms are exposed to various forms of stress during their lifetime. This is probably the reason why an evolutionally well conserved the mitogen-activated protein kinase (MAPK) system of signaling cascades was formed to regulate cellular stress response. Those signaling pathways consist of three consecutive classes of protein kinases: MAP3K, MAP2K and MAPK. The signal is then transmitted from MAPK to another protein kinases and transcription factors.

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is a member of MAPK pathway, more specifically is classified as a member of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase family (MAP3K). Human ASK1 consists of 1374 amino acids which are folded into several domains and sequence motives. The N-terminal coil-coiled domain (NCC), the serine/threonine kinase domain and the C-terminal coil-coiled domain (CCC) are three main domains. In addition, several regions responsible for the interaction between ASK1 and their binding partners have also been identified. The activity of ASK1 is regulated by various factors including thioredoxin and the 14-3-3 proteins, which function as inhibitors, and TNF receptor associated factors (TRAFs), which function as activators.

The aim of this study was the preparation of six different expression constructs of the N-terminal sequence of human ASK1. This fragment should be responsible for the formation of the complex between ASK1 and thioredoxin. The C-terminus of the sequence was selected very carefully with the effort not to disrupt the predicted secondary structure elements. Then a new expression construct of the thioredoxin containing a single point mutation C73S which prevents the formation of dimers was prepared. This construct also allows the cleavage of the His-tag after the purification of the fusion protein to obtain nearly native form of the protein.

(In Czech)

OBSAH

ABSTRAKT 4
ABSTRACT 5
SEZNAM ZKRATEK 8
1 PŘEHLED LITERATURY 10
1.1 Apoptosa 10
1.1.1 Morfologie 11
1.2 Proteinkinasy 11
1.2.1 MAPK kaskáda 12
1.3 ASK1 13
1.3.1 Struktura ASK1 14
1.3.2 Regulace ASK1 16
1.4 Thioredoxin 18
1.4.1 Struktura a funkce 19
2 CÍLE PRÁCE 21
3 MATERIÁL A METODY 22
3.1 Materiál 22
3.1.1 Chemikálie a enzymy 22
3.1.2 Další materiál 23
3.1.3 Přístroje 24
3.2 Příprava konstruktu pro expresi thioredoxinu 25
3.2.1 Sekvence thioredoxinu 25
3.2.2 Expresní vektor 25
3.2.3 Média pro kultivaci bakterií 25
3.2.3.1 Příprava LB média 26
3.2.3.2 Příprava LB agarových misek 26
3.2.4 Horizontální přenos genetické informace 27
3.2.5 Isolace plasmidové DNA 28
3.2.6 Linearizace plasmidové DNA 29
3.2.6.1 Elektroforéza 30
3.2.6.2 Extrakce DNA z agarosového gelu 31
3.2.7 PCR 31
3.2.8 Ligace thioredoxinu do plasmidu pET-15b 34

3.2.8.1 PCR s koloniemi bakterií ... 36
3.2.8.2 Kultivace bakterií s transformovaným plasmidem a isolace DNA ... 37
3.2.9 Mutace štěpného místa ... 38
3.2.9.1 PCR vnášející mutaci ... 40
3.2.9.2 Transformace buněk ... 41
3.2.9.3 Kultivace bakterií a isolace plasmidové DNA ... 41
3.2.10 Glycerolové zásobní roztoky ... 42
3.2.11 Kontrola exprese rekombinantního proteinu ... 43
3.2.11.1 SDS-PAGE elektroforéza ... 43
3.3 Příprava konstruktů pro expresi ASK1 ... 47
3.3.1 ASK1 v expresním vektoru pRSFDuet-1 ... 47
3.3.2 Příprava expresních konstruktů ASK1 kinasy ... 47
3.3.2.1 Transformace původních konstruktů do kompetentních buněk DH5α ... 48
3.3.2.2 Isolace plasmidové DNA ... 48
3.3.3 Cílené mutace prováděné pomocí PCR reakce ... 49
3.3.3.1 Navržení oligonukleotidů pro PCR reakci ... 49
3.3.3.2 PCR ... 50
3.3.3.3 Transformace a isolace plasmidové DNA ... 51
3.3.4 Zásobní glycerolové roztoky připravených konstruktů ASK1 ... 52
3.3.5 Kontrola exprese fúzního proteinu ... 53
4 VÝSLEDKY ... 54
4.1 Příprava plasmidu pET-15b s vloženou sekvencí pro thioredoxin (C73S mutace) ... 54
4.1.1 Příprava dvojitě štěpeného plasmidu pET-15b ... 54
4.1.2 Ligace thioredoxinu do plasmidu pET-15b ... 56
4.1.3 Mutace štěpného místa ... 58
4.1.4 Test exprese thioredoxinu ... 59
4.2 Příprava expresních konstruktů ASK1 o různých délkách ... 60
4.2.1 Test exprese šesti konstruktů ASK1 ... 62
5 DISKUZE ... 64
6 ZÁVĚR ... 66
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY ... 67
PŘÍLOHY ... 69

SEZNAM ZKRATEK

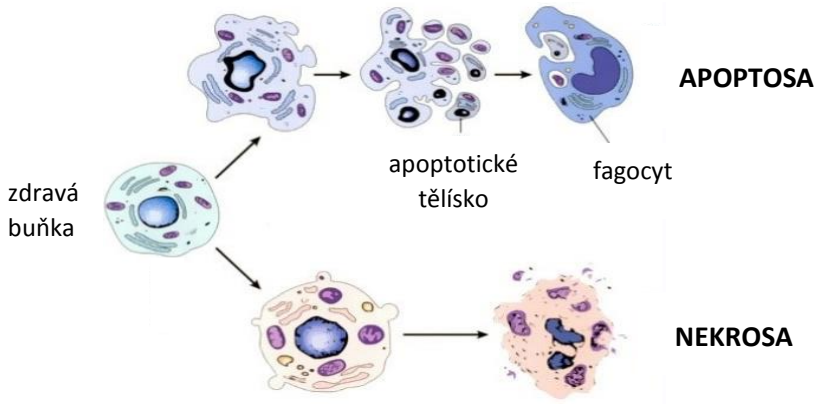
ALS	amyotrofická laterální skleróza
Amp	ampicilin
APS	ammonium persulfát
ASK1	z anglického *apoptosis signal-regulating kinase 1*
ASK^{46-251}	N-terminální úsek aminokyselin 46 – 251 sekvence lidské ASK1
ASK^{46-267}	N-terminální úsek aminokyselin 46 – 267 sekvence lidské ASK1
ASK^{46-287}	N-terminální úsek aminokyselin 46 – 287 sekvence lidské ASK1
ASK^{88-251}	N-terminální úsek aminokyselin 88 – 251 sekvence lidské ASK1
ASK^{88-267}	N-terminální úsek aminokyselin 88 – 267 sekvence lidské ASK1
ASK^{88-287}	N-terminální úsek aminokyselin 88 – 287 sekvence lidské ASK1
BL21(DE3)	kmen bakterie *E. coli*
bp	páry bází (z anglického *base pair*s)
CCC	C-terminální coil-coiled doména
DH5α	kmen bakterie *E. coli*
DISC	z anglického *death-inducing signaling komplex*
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z anglického *deoxyribonucleic acid*)
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z anglického *ethylendiaminetetraacetic acid*)
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	z anglického *extracellular signal-regulating kinase*
FADD	z anglického *Fass-associated death domain*
FKBP	z anglického *FK506 binding protein*
GB1	B1 doména G proteinu
GLS	z anglického *gel loading solution*
hsp72	z anglického *heat shock protein 72*
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
JNK	z anglického *c-Jun N-terminal kinase*
LB médium	z anglického *lysogeny broth*; médium vhodné pro kultivaci *E. coli*
LPS	lipopolysacharid

MAPK	z anglického *mitogen-activated proteinkinase*
mRNA	z anglického *messenger RNA*
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCC	N-terminální coil-coiled doména
NMR	nukleární magnetická rezonance
Nrx	nukleoredoxin
PCR	z anglického *polymerase chain reaction*
PCRp	produkt PCR reakce
PP5	z anglického *protein serin/threonin fosfatasa 5*
RNA	ribonukleová kyselina (z anglického *ribonucleic acid*)
ROS	z anglického *reactive oxygen species*
RPM	z anglického *revolutions per minute*
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TBE	Tris/borát/EDTA
TEMED	tetramethylendiamid
TEV	z anglického *tabacco etch virus*
TLR4	z anglického *Toll-like receptor 4*
TNF	z anglického *tumor necrosis factor*
TRAF	z anglického *TNF receptor associated factor*
Trx	thioredoxin
Trx C73S	sekvence thioredoxinu s bodovou mutací C73S
TrxR	thioredoxin reduktasa
UPR	z anglického *unfolded protein response*

1 PŘEHLED LITERATURY

1.1 Apoptosa

Apoptosa neboli programovaná buněčná smrt obvykle vyžadující genovou expresi, která je často v buňkách potlačována, je přirozenou součástí vývoje organismu. Spolu s mitosou, která má vlastně přesně opačnou funkci než apoptosa, se podílí na regulaci počtu buněk tkání u živočichů. Z dosavadních pozorování se zdá, že apoptosa je jakousi odpovědí na rychlou proliferaci buněk. Fyziologicky se uplatňuje při embryogenesi, kdy například u člověka dochází k odumírání buněk mezi tvořícími se prsty, dále během metamorfosy (resorpce ocasu u žab) nebo také při zajištění výměny starých buněk ve zdravých tkáních, kde musí být v rovnováze vznik a zánik buněk. Apoptosou může být odstraněno velké množství buněk, aniž by došlo k výraznějšímu narušení tkáně či vzniku zánětu. Navíc některé buněčné komponenty rozpadající se buňky mohou být znovu využity. Stejně tak může dojít k apoptose, pokud buňka postrádá tzv. signál pro přežití (z anglického *survival factor*), nebo je naopak indukována vazbou ligandu na receptor na povrchu buňky. Z vnějších vlivů pak apoptosu vyvolává ozáření γ paprsky, protinádorové léky nebo teratogeny. Apoptosa je však také přímou součástí nádorových procesů, kdy dochází k degradaci orgánů nádorovými buňkami. Rychlost šíření nádoru je pak dána rovnováhou mezi apoptosou a mitosou [1, 2]. Rozdíl mezi apoptosou a nekrosou je jasně znázorněn na obrázku 1.1.



Obr. 1.1: *Porovnání průběhu apoptosy a nekrosy.*
Při nekrose dochází k prasknutí buňky a vylití jejího obsahu do okolní tkáně, což vyvolá zánět. Apoptosa naopak vede k šetrnému odstranění buňky bez poškození okolní tkáně. Upraveno dle [3].

Pokud buňka podléhá nekrose, dochází vlivem zvýšení osmotického tlaku k nekontrolovanému zvětšování objemu buňky, což vede až k prasknutí membrány a vylití buněčného obsahu do okolí. Naproti tomu apoptosa je charakteristická řízenou tvorbou váčků, které jsou bezpečně odstraněny bez poškození okolní tkáně.

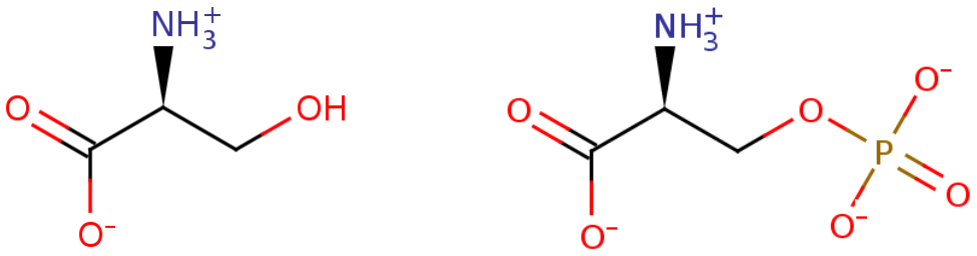
1.1.1 Morfologie

Apoptosa se projevuje dvěma oddělenými fázemi strukturních změn. Nejprve dojde k vytvoření apoptotických tělísek, které jsou následně fagocytovány a degradovány jinými buňkami. Různé typy buněk vykazují podobné strukturální rysy apoptosy. Vždy dochází k významné kondenzaci jaderného chromatinu i cytoplasmy (pravděpodobně způsobena vytlačováním vody ven z buňky), fragmentaci jádra a postupnému odškrcování různě velkých váčků tvořících se na membráně. Jednotlivá apoptotická tělíska tak mohou obsahovat i téměř všechen jaderný chromatin nebo celé neporušené organely. Vznikající větší tělíska pak často tvoří shluky v extracelulárním prostoru, zatímco menší tělíska se mohou rozptýlit od místa svého původu, některá se mohou dostat až do cév. Přestože jsou apoptotická tělíska předurčena ke zničení, jsou pravděpodobně stále schopna metabolické aktivity. Tělíska jsou však patrně velice záhy fagocytována v důsledku změny vlastností povrchu membrány a následně podstupují procesy uvnitř fagosomu. Proto není úplně jasné, jak dlouho by byla tělíska schopná vydržet neporušená v extracelulárním prostoru. Ve fagosomu dochází k rozrušení membrán tělísek i membrán organel v tělískách uzavřených, čímž ztrácí svou metabolickou aktivitu, nejsou totiž nejspíše uvnitř fagosomu schopna udržet chemickou homeostázu. Fúzí fagosomů s primárními lysozomy jsou za vzniku sekundárních lysozomů následně do degradace tělísek zapojeny i lysozomální enzymy. Celý proces vytvoření a degradace apoptotických tělísek může trvat méně než 24 hodin [2].

1.2 Proteinkinasy

Reverzibilní fosforylací proteinů, jež je nejrozšířenější posttranslační modifikací, je řízena řada základních procesů probíhajících v buňce. V lidském genomu je kódováno kolem tisíce proteinkinas a asi pět set proteinfosfatas, jejichž společným úkolem je regulovat biologickou aktivitu proteinů, jejich lokalizaci do určitého buněčného kompartmentu či jejich interakci s dalšími proteiny [4]. Nejčastěji je fosfát připojen esterovou vazbou na protein

přes serinové (obr. 1.2), threoninové nebo tyrosinové zbytky (nenabité polární aminokyseliny). Může však dojít i k fosforylaci kladně nabitých polárních aminokyselin histidinu, argininu či lysinu za vzniku fosfoamidů. Dále mohou vznikat acylfosfáty (fosforylace asparagové nebo glutamové kyseliny) či thiofosfáty (fosforylace cysteinu) [5].



Obr. 1.2: *Serin a fosfoserin.*
Adice fosfátové skupiny na aminokyselinový zbytek může mít zásadní vliv na strukturu a následně i funkci fosforylovaného proteinu. Fosfát je přenášen z ATP na cílový protein reakcí katalyzovanou proteinkinasami. Obráceným procesem je pak defosforylace, která je katalyzována fosfatasami. Převzato z [6].

Mezi proteinkinasy patří například receptory růstových faktorů a cytokinů nacházející se na povrchu buňky. Vlivem vazby ligandu na receptor dochází k autofosforylaci daného receptoru, což má za následek navázání dalších proteinů na jeho cytosolární část. Takto je signál přenesen do buňky, kde dále postupuje rozličnými signálními drahami. Jednou z nich je tzv. MAPK kaskáda, která je popsána v následujícím odstavci [4].

1.2.1 MAPK kaskáda

V průběhu života jsou všechny živé organismy vystaveny různým variantám stresu. Evolučně konzervovaným signálním systémem, který reguluje buněčnou odpověď na stres, je MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dráha. Tato signální dráha je velice důležitá pro řadu buněčných funkcí, avšak její mechanismus není zatím zcela odhalen a pochopen [7]. Předpokládá se, že MAPK kaskáda ve svém důsledku reguluje transkripci a translaci. Přenáší tedy signál z extracelulárního prostoru až do jádra buňky [8].

Základem každé MAPK signální dráhy je kaskáda tří následujících tříd proteinkinas, které fosforylují specifické seriny nebo threoniny cílových proteinů [9]. Signální kaskáda začíná kinasou ze třídy MAP3K. MAP3K regulována různými podněty aktivuje fosforylací kinasu

třídy MAP2K, která dále fosforyluje (a tím pádem aktivuje) MAPK. MAPK může svou kinasovou aktivitou následně regulovat další proteinkinasy a transkripční faktory [7].

U savců byly doposud hlouběji prostudovány pouze tři kaskády členů MAPK rodiny, a to ERK (*extracellular signal-regulating kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) a p38 MAPK. Zatímco ERK kinasy odpovídající na cytokiny a růstové faktory jsou spojeny s mitogenní signalizací a tedy růstem a diferenciací, JNK a p38 MAP kinasy jsou aktivovány vlivem vnějších či vnitřních stresových podnětů, které mohou být jak chemické, tak fyzikální povahy. Mezi tyto podněty patří například UV záření, osmotický šok nebo prozánětlivé cytokiny. Kupříkladu nadměrná tvorba ROS (z anglického *reactive oxygen species*) přispívá k výraznému poškození důležitých složek buňky a ztrátě jejich funkce, což vede k apoptose nebo nekrose [8]. Aktivace JNK/p38 signálních drah však může mít i jiný biologický účinek, než vyvolání apoptosy, záleží ale na typu buňky a jejím okolí [10].

1.3 ASK1

ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) patří mezi MAP3K a je aktivována jako odpověď na různé formy stresu. Lidská ASK1 je složena z 1374 aminokyselin a její terciární strukturu tvoří tři domény – serin/threonin kinasová doména v prostřední části peptidového řetězce, N-terminální coil-coiled doména (*NCC*) a C-terminální coil-coiled doména (*CCC*) [7]. Vzájemnou interakcí dvou CCC domén vytváří ASK1 homooligomery, na které jsou v neaktivním stavu navázány proteiny thioredoxin, 14-3-3 a pravděpodobně další zatím neznámé faktory [9]. Tento komplex se nazývá ASK1 signalosom. Vlivem stresu dojde k asociaci faktorů TRAF (*TNF receptor associated factor*) na ASK1 signalosom, což vyvolá aktivaci celé signální dráhy. Konkrétně je pro aktivaci ASK1 klíčová trans-autofosforylace Thr838, nacházejícího se v kinasové doméně [7].

ASK1, která je zapojena do p38 i JNK dráhy, může být aktivována kupříkladu ligandy receptorů smrti, nedostatkem růstových faktorů nebo některými léky proti rakovině [8]. Dále je ASK1 indukována podněty jako ROS, lipopolysacharidy, stres ER (endoplazmatické retikulum) nebo zvýšenou hladinou vápníku v buňce [9]. Zároveň se ASK1 účastní iniciace apoptosy závislé na uvolnění cytochromu c z mitochondrie a následné aktivaci caspas 3 a 9 [8]. Se zapojením ASK1 ve všech těchto signalizačních drah souvisí její podíl při rozvoji neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba, dále se předpokládá spojitost

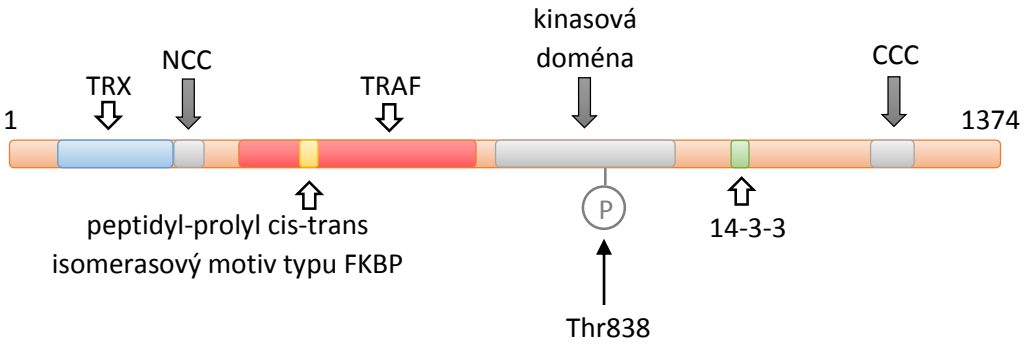
s Parkinsonovou a polyglutaminovou chorobou a také amyotrofickou laterální sklerózou (ALS) [9].

1.3.1 Struktura ASK1

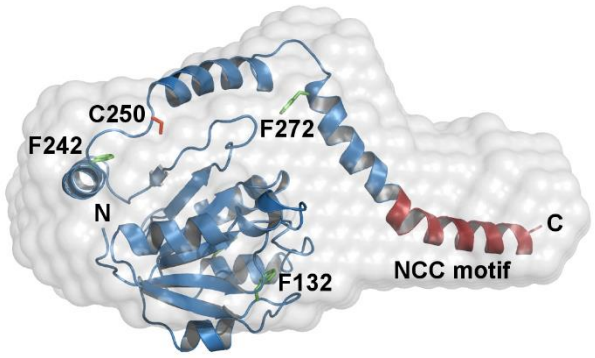
Protein ASK1 o velikosti 170 kDa obsahuje tři hlavní domény, a to inhibiční N-terminální doménu, vnitřní serin/threoninovou kinasovou doménu a regulační C-terminální doménu. Dále se na N-konci peptidového řetězce nachází peptidyl-prolyl cis-trans isomerasový motiv typu FKBP (*FK506 binding protein*), jehož funkce zatím není známa. Na C-konci sekvence byla identifikována vazebná místa pro glutaredoxin, hsp72 (*heat shock protein 72*) nebo 14-3-3 proteiny. N-konec ASK1 kinasy interaguje s thioredoxinem [8, 11].

Aktivní či neaktivní stav ASK1 je dán fosforylací Thr838 v tzv. aktivační smyčce kinasové domény. Neaktivní homooligomer kinasy svázán přes CCC domény je stabilizován vazbou negativního regulátoru (tedy represoru) thioredoxinu na N-konci a 14-3-3 proteinu na C-konci (konkrétně na fosfoserin v poloze 966). Po oddisociování těchto inhibitorů je umožněna interakce NCC domén, což vede k aktivaci ASK1 autofosforylací aminokyselinového zbytku Thr838. K této interakci napomáhají i TRAF faktory vázající se na střední část proteinu. Regulací zpětnou vazbou může být Thr838 defosforylován PP5 (*protein serin/threonin fosfatasa 5*), čímž je ASK1 opět inaktivována. Stejně jako thioredoxin i Hsp72 zabraňuje oligomerizaci N-terminálních domén ASK1 a tím její aktivaci. Podobně je ASK1 udržována v inaktivním stavu interakcí s Hsp90 a Akt (protein kinasou B), která ji fosforyluje na Ser83 [8, 11]. Také bylo prokázáno, že pokud byla proteinu úplně odstraněna N-terminální oblast (delece aminokyselin 1-649), pak se ASK1 stala konstitutivně aktivní kinasou – vykazovala mnohem vyšší bazální aktivitu než neupravovaná ASK1 (s kompletní sekvencí 1375 aminokyselin) [12].

V primární struktuře bylo tedy označeno několik oblastí zodpovědných za interakce s různými regulačními faktory (obr. 1.3, str. 15). Doposud však byla definována přesná terciární struktura pouze u kinasové domény ASK1, která již byla vykrystalizována a charakterizována (viz Bunkoczi et al., [13]). Studie thioredoxin-vazebné domény ASK1 vedly k vytvoření modelu předpokládané struktury této domény na základě různých experimentů i in silico predikcí (obr. 1.4, str. 15) [14].



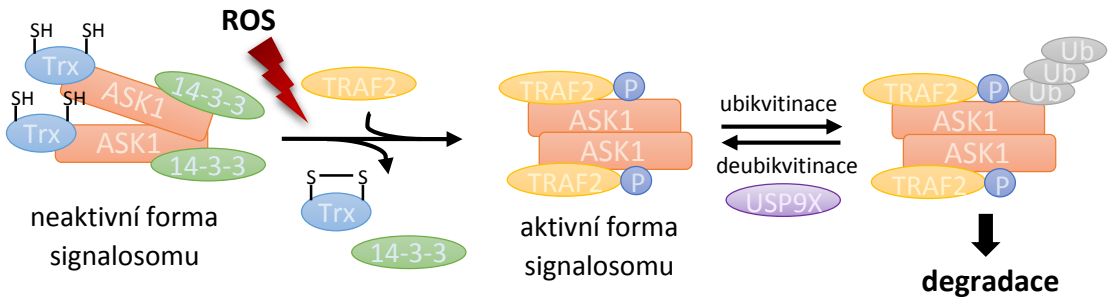
Obr. 1.3: *Schéma domén a vazebných míst proteinkinasy ASK1.*
Uvedené schéma ukazuje, které domény, motivy a vazebná místa byla v aminokyselinové sekvenci ASK1 identifikována. Doposud jsou popsány u myší ASK1 tři domény a to NCC (297-324), kinasová doména (687-945) a CCC (1239-1295). Dále byl definován FKBP motiv a jsou předpokládána dvě vazebná místa, v oblasti aminokyselin 46-277 pro thioredoxin a v oblasti 384-655 pro TRAF faktory. V obrázku je označen aminokyselinový zbytek Thr838, jehož fosforylace vede k aktivaci ASK1. Upraveno dle [9] a [15].



Obr. 1.4: *Predikovaná struktura thioredoxin-vazebné domény ASK1.*
Teoretický model úseku aminokyselin 88-302, tedy oblast odpovídající předpokládané thioredoxin-vazebné doméně ASK1, získaný tzv. ab initio modelováním pomocí programu Robetta. Převzato z [14].

1.3.2 Regulace ASK1

První z možných forem stresu vyvolávající buněčnou odpověď jsou kyslíkové radikály vytvářené aerobním metabolismem nebo UV zářením. Tomuto stresu jsou vystaveny všechny aerobní organismy. Thioredoxin se na N-terminální oblast ASK1 váže v redukovaném stavu, oxidačním stresem však přechází do oxidovaného stavu a dochází k jeho disociaci z ASK1 signalosomu. Protein 14-3-3 je na ASK1 navázán přes fosforylovaný serin, který je ale působením oxidačního stresu defosforylován, což opět vyvolá disociaci regulačního proteinu ze signalosomu. K aktivaci ASK1 kromě oddisociování negativních regulačních faktorů thioredoxinu a 14-3-3 přispívají také pozitivně regulující faktory, tedy aktivátory. Aktivační funkce skupiny TRAF faktorů spočívá v podpoře vzájemné interakce NCC obou ASK1 v signalosomu, což je příčinou následné autofosforylace ASK1. Aktivovaná ASK1 může být odbourávána ubikvitin-proteasomovým systémem. ASK1 označená ubikvitinem je transportována do proteasomu a degradována. Proti tomuto procesu působí USP9X – peptidasa, která se může navázat na ASK1 a deubikvitinovat ji [7]. Mechanismus je přehledně shrnut na obr. 1.5.



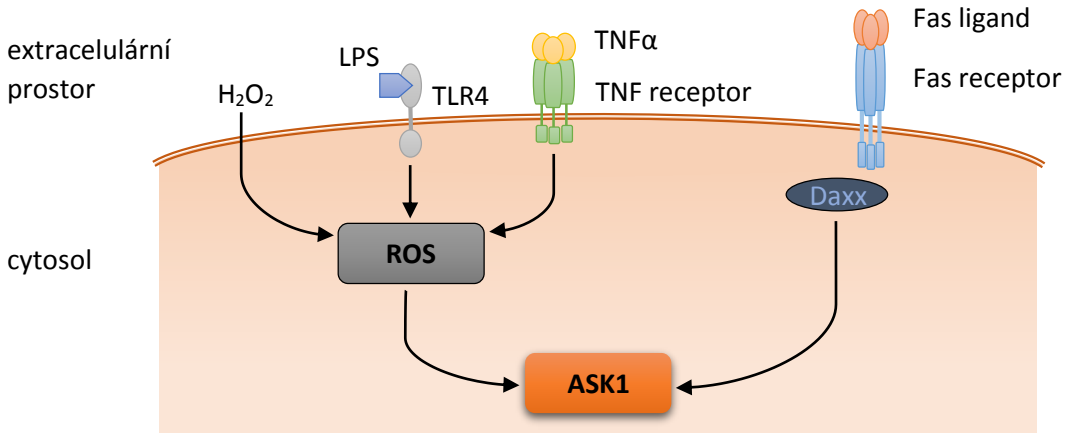
Obr. 1.5: *Schéma předpokládaného mechanismu aktivace ASK1 signalosomu.*
V neaktivním stavu je na dimer ASK1 navázán redukovaný thioredoxin a protein 14-3-3. Vlivem oxidačního stresu dojde k oddisociování obou faktorů, interakci N koncových domén ASK1 a vazbě TRAF faktorů na signalosom. Tento komplex může být deaktivován transportem do proteasomu. Upraveno dle [7].

Oxidační stres, přesněji tvorba kyslíkových radikálů, hraje také významnou roli v TNFα (*tumor necrosis factor α*) signální dráze spojené s receptory smrti. Navázání TNF faktoru na odpovídající receptor vyvolá stresovou odpověď aktivací ASK1 signálního komplexu obsahujícího faktor TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), který se ale na signalosom může navázat až po disociaci inhibitorů thioredoxinu a 14-3-3. Druhým z receptorů smrti je Fas receptor, který po vazbě Fas ligandu může aktivovat dvě různé signální dráhy [7]. Jedna vede mimo AKS1 signalosom a zahrnuje protein FADD (*Fass-associated death domain*) a caspasu 8 v signálním komplexu zvaném DISC (*death-inducing signaling komplex*), druhá přes Daxx protein aktivuje ASK1 a následně JNK signální kaskádu, což však nevede k apoptose [8].

Podobně jako receptory smrti funguje i receptor TLR4 (*Toll-like receptor 4*), jehož ligandem jsou lipopolysacharidy (*LPS*). Ty se nacházejí na povrchu gramnegativních bakterií. Imunitní odpovědí organismu na bakteriální infekci je produkce protizánětlivých cytokinů, která je spojena se signalizační dráhou ASK1 [7].

Dalším dějem, kde je dokázán vliv ASK1, je regulace buněčného objemu. Vlivem hypertonického prostředí dochází k smršťování buňky, což je regulováno aktivním transportem iontů do buňky vedoucí díky osmóze k zvětšení objemu buňky zvýšeným příjmem vody. V apoptických buňkách je však kvůli aktivní ASK1 tato odpověď inhibována a dochází ke smršťování dokonce už v prostředí isotonickém [7].

Jinými procesy, kterých se prokazatelně účastní ASK1, jsou odpovědi na stres způsobený hypoxií a ischemií, dále na stres endoplazmatického retikula vyvolaný špatně sbalenými či nesbalenými proteiny v lumen ER [7]. Do tzv. UPR odpovědi (z anglického *unfolded protein response*) jsou zapojeny transmembránové proteiny ER, jejichž aktivací je snížen přísun nově vznikajících proteinů do ER. Pokud ani toto opatření nezabrání stresu ER, je přes kaskádu zahrnující TRAF2 a ASK1 spuštěna apoptosa. Tento mechanismus má souvislost například s Huntingtonovou chorobou, při níž dochází ke vzniku polyglutaminových sekvencí uvnitř proteinů. PolyQ úseky způsobují vznik intracelulárních nerozpustných agregátů a tím způsobují stres ER [8]. ASK1 také vyvolává apoptosu při virové infekci, jak bylo dokázáno v případě chřipkového viru. Je dokonce zapojena i v signální dráze obsahující ionty Ca^{2+} jako druhého posla [7]. Schéma některých z uvedených signálních drah je ukázáno na obr. 1.6 (str. 18).

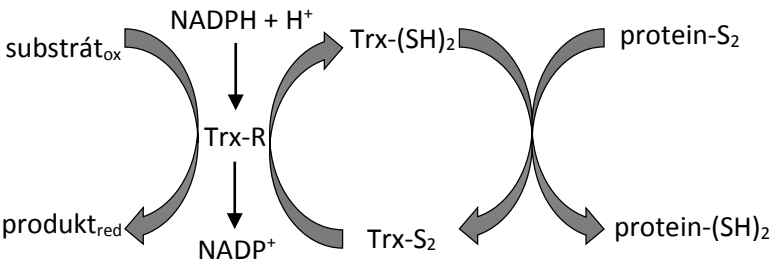


Obr. 1.6: *Zjednodušené schéma některých signálních drah vedoucí k aktivaci ASK1.*
Signální dráhy, v nichž je ASK1 zapojena, vedou z extracelulárního prostoru, proto musí být signál nejprve přenesen přes membránu. Dále signál postupuje různými kaskádami až na ASK1, která ve svém důsledku ovlivňuje například některé transkripční faktory. Upraveno dle [7].

1.4 Thioredoxin

Jedná se o všudypřítomný redox-regulační protein se dvěma cysteinovými zbytky v aktivním místu, přítomný ve všech druzích od Archebakterií po člověka [8, 9]. Thioredoxin má celou škálu různých funkcí, z nichž však nejzásadnější je jeho schopnost měnit oxidační stav proteinu reverzibilní oxidací thiolových skupin cysteinů vytvořením disulfidických můstků [16]. Dále je součástí procesů opravy a syntesy DNA nebo apoptosy [17].

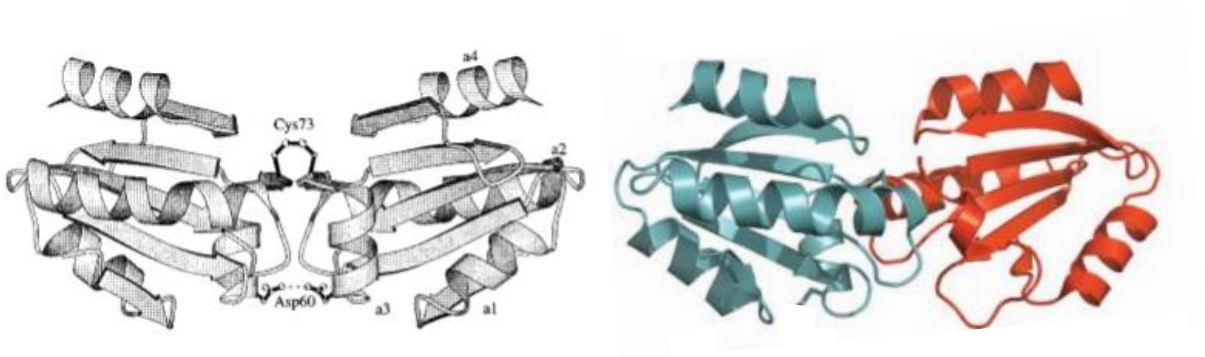
Thioredoxin spolu s NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a thioredoxin reduktasou (*TrxR*) tvoří tzv. thioredoxinový antioxidační systém, který regulací rovnováhy oxidované a redukované formy proteinu napomáhá zvládnutí oxidačního stresu (viz schéma na obr. 1.7, str. 19). Glutathionový systém je pak druhým základním thiolovým antioxidačním systémem v savčí buňce [16]. Vlivem oxidačního stresu přechází thioredoxin z redukované formy Trx-$(SH)_2$ na formu oxidovanou Trx-S_2. Kromě cytosolární formy označované jako Trx1, existuje ještě forma mitochondriální (Trx2) a podobný protein nacházející se v jádře (nukleoredoxin, Nrx) [9].



Obr. 1.7: *Schéma thioredoxinového redoxního systému.*
Redukovaný thioredoxin dále v textu popsaným mechanismem redukuje disulfidický můstek cílového proteinu, přičemž se sám stává oxidovaným. Vzniklý thioredoxin s disulfidickým můstkem je pak zpět redukován thioredoxin reduktasou (Trx-R) a NADPH + H^+. Kromě thioredoxinu může tato reduktasa redukovat i jiné substráty. Upraveno dle [18].

1.4.1 Struktura a funkce

Thioredoxin je 12 kDa protein s konzervovanou sekvencí oxidačně-redukčního aktivního místa Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys (tzv. CXXC motiv), který je schopný katalyzovat změnu stavu proteinu z disulfidické formy na dithiolovou [12, 16, 17]. Sám v oxidované formě obsahuje intramolekulární disulfidický můstek mezi Cys32 a Cys35 [8]. Z pohledu sekundární struktury tvoří jakési jádro proteinu pět β-listů, které jsou obklopeny čtyřmi α-helixy (obr. 1.8). Cytosolární Trx na rozdíl od mitochondriálního obsahuje navíc 3 cysteiny mimo aktivní místo, které jsou například zapojeny do NO signalizace [16].



Obr. 1.8: *Porovnání různých publikovaných struktur thioredoxinu 1.*
Na levé straně obrázku je ukázán homodimer lidského thioredoxinu spojený disulfidickou vazbou mezi aminokyselinovými zbytky Cys73 obou jednotek. Tato krystalová struktura přirozeně se vyskytující formy proteinu byla publikována v roce 1991. Napravo je krystalová struktura oxidované formy dvojitého mutantu C69S/C73S publikovaná v roce 2010. Upraveno dle [19] a [20].

Aktivní místo nacházející se mezi druhým β-listem a druhým α-helixem je exponováno na povrch proteinu a je jakýmsi konzervovaným motivem složení úseku proteinu, který se kromě thioredoxinu nachází i v dalších enzymech s podobnou funkcí [21]. Cys32 je však pouze v redukovaném stavu (tedy thiol-formě) přístupný solventu. Mechanismus redukce proteinu obsahující disulfidický můstek thioredoxinem zahrnuje nukleofilní atak thiolátem Cys32, čímž dojde k vytvoření tzv. smíšeného disulfidu (thioredoxin je spojen s cílovým proteinem pomocí disulfidického můstku). Následně je tento intermediát atakován thiolovou skupinou Cys35, což vede k tvorbě oxidovaného thioredoxinu (s disulfidickým můstkem mezi cysteiny 32 a 35) a požadované redukci cílového proteinu. Aktivita thioredoxinu je regulována mnoha faktory, mezi něž patří například vliv okolních aminokyselin poblíž aktivního místa nebo acidobazické katalýzy [17].

2 CÍLE PRÁCE

- Připravit expresní konstrukt lidského thioredoxinu 1:
    - vložit gen pro lidský thioredoxin (C73S mutace) do plasmidu pET-15b
    - upravit štěpné místo umožňující odstranění histidinové kotvy pomocí TEV proteasy
    - ověřit expresi proteinu v bakteriích *E. coli* kmene BL21(DE3)

- Připravit expresní konstrukty různě dlouhých variant thioredoxin-vazebné domény lidské proteinkinasy ASK1:
    - pomocí cílené mutagenese připravit 6 konstruktů N-terminálního úseku ASK1
    - ověřit exprese proteinů v bakteriích *E. coli* kmene BL21(DE3)

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie a enzymy

β-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
agarosa GTQ	Carl Roth GmbH, Německo
akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
bacto trypton (pepton)	Carl Roth GmbH, Německo
bacto yeast extract (kvasničný extrakt)	Carl Roth GmbH, Německo
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·$2H_2O$)	LACH-NER, s.r.o, Česká republika
dodecylsíran sodný (SDS)	Carl Roth GmbH, Německo
ethanol	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
glycerol	PENTA- Ing. Petr Švec, Česká republika
glycin	Carl Roth GmbH, Německo
chlorid sodný	Carl Roth GmbH, Německo
isopropylalkohol	Genomed, Německo
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	EMD Biosciences, Inc., Německo
kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
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
LB agar	Carl Roth GmbH, Německo
methanol	PENTA – Ing. Petr Švec, Česká republika
mix deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP)	Thermo Scientific, USA
N, N, N‘, N‘-tetraethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Německo

PCR Master Mix	Thermo Scientific, USA
persulfát amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
pufr pro BamHI	Fermentas, Kanada
pufr pro PfuUltra DNA polymerasu	Agilent Technologies, Inc., USA
Rapid Ligation Buffer	Fermentas, Kanada
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Německo

3.1.2 Další materiál

BamHI	Fermentas, Kanada
DNA oligonukleotidy	Generi Biotech s.r.o., Česká republika
Escherichia coli, kmen BL21(DE3)	Stratagene, USA
Escherichia coli, kmen DH5α	Stratagene, USA
gel loading solution	New England BioLabs, USA
GelRed Nucleic Acid Stain	New England BioLabs, USA
Gene Ruler 1 kb DNA ladder	Fermentas, Kanada
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, USA
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid Biotech Ltd., Taiwan
laboratorní sklo	Simax, Česká republika
MassRuler Low Range DNA ladder	Fermentas, Kanada
mikrostříkačka Hamilton	HAMILTON Bonaduz AG, Švýcarsko
mikrozkumavky	Eppendorf, Německo
NdeI	Fermentas, Kanada
PfuUltra DNA polymerasa	Agilent Technologies, Inc., USA
plasmid pET-15b	Novagen, USA
plasmid pQE-30 + Trx	obdrženo od školitele
plasmid pRSFDuet-1 + ASK1	obdrženo od školitele
Precision Plus Protein™ Standards (Dual-color, BIO-RAD)	Bio-Rad Laboratories, USA
T4 DNA ligasa	Fermentas, Kanada

3.1.3 Přístroje

autokláv	Systec GmbH, Německo
automatické pipety	Eppendorf AG, Německo
centrifuga 5415 D	Eppendorf AG, Německo
centrifuga 5418	Eppendorf AG, Německo
elektrický vařič	Eta, Česká republika
horizontální elektroforéza	Carl Roth GmbH, Německo
iluminátor UVT-14M	Herolab GmbH, Německo
laboratorní váhy	KERN & SOHN GmbH, Německo
orbitální inkubátor TH 15	Edmund Bühler GmbH, Německo
termoblok	Grant, UK
termocykler Mastercycler Personal	Eppendorf, Německo
termostat	Melag Brutschrank Incubat, Německo
vertikální elektroforéza	Bio-Rad Laboratories, USA
vodní lázeň	Memmert GmbH, Německo
vortex Rx^3	VELP Scientifica, Itálie
zdroj napětí pro elektroforézu	Sigma-Aldrich, USA

3.2 Příprava konstruktu pro expresi thioredoxinu

3.2.1 Sekvence thioredoxinu

Výchozí sekvence DNA thioredoxinu obsahovala jednu bodovou mutaci, jednalo se o tzv. C73S mutaci thioredoxinu (kompletní sekvence v příloze A, str. 71). Tato jediná mutace zajišťuje, že syntetizovaný protein ve vysokých koncentracích nevytváří dimery, přesto jeho funkce i struktura zůstávají zachovány [19, 20].

3.2.2 Expresní vektor

Expresní vektor neboli plasmid je malá kruhová dvouvláknová molekula DNA nesoucí genetickou informaci, která je schopná samostatné replikace nezávisle na chromosomální DNA hostitelské buňky. Toho je v laboratorních podmínkách využíváno k vnesení určitého fragmentu DNA začleněného v plasmidu do bakterie či kvasinky a následné indukci exprese kódovaného proteinu. U bakterií hrají plasmidy významnou roli, protože mohou být nositeli určité doplňkové vlastnosti zvýhodňující svého hostitele, například rezistenci vůči antibiotiku.

DNA sekvence proteinu se nacházela v plasmidu pQE-30 (mapa plasmidu na obr. P1, str. 69), ze kterého bylo potřeba sekvenci přenést do plasmidu pET-15b (mapa plasmidu na obr. P2, str. 70). Plasmid pET-15b je vhodný pro bakteriální expresi, obsahuje totiž T7 promotor (pro specifickou transkripci DNA T7 polymerasou), 6× His-kotvu (sekvence šesti následujících histidinových zbytků usnadňující purifikaci proteinu pomocí niklové chelatační chromatografie), thrombinové štěpné místo (umožňující odštěpení zmíněné arteficiální purifikační kotvy), dále tři restrikční místa BamHI, XhoI a NdeI (dovolující vnést do plasmidu daný inzert) a gen zajišťující rezistenci na antibiotikum, konkrétně vůči ampicilinu (Amp).

3.2.3 Média pro kultivaci bakterií

Ke kultivaci bakterií, do nichž byl vložen plasmid, jsou využívány dva druhy živných médií. Je-li požadavkem pouze namnožení dané kultury, bez selekce jednotlivých kolonií, jsou bakterie pěstovány v tekutém médiu. Pokud je však nutné získat bakteriální kolonii vzniklou z jediné buňky (například v případě vnášení mutací), pak jsou ke kultivaci využita tuhá média,

nejčastěji na Petriho miskách. Pro oba případy byla v této práci využita LB (z anglického *lysogen broth*) směs.

3.2.3.1 Příprava LB média

2,5 g LB média (obsahující kvasničný extrakt, NaCl a trypton v hmotnostním poměru 1:2:2) bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody a automatickou pipetou rozděleno po 5 ml do skleněných zkumavek. Uzavřené zkumavky s LB médiem byly vysterilizovány v autoklávu (15 min, 121 °C; poté ochlazení na 80 °C) a následně skladovány při 4 °C. Připravené vzorky LB média o objemu 5 ml s příslušným antibiotikem (někdy i naočkovanou bakteriální kulturou) jsou nazývány miniprepy.

3.2.3.2 Příprava LB agarových misek

4 g LB agaru (složení uvedeno v tabulce 3.1) bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody a v Erlenmayerově baňce uzavřené buničinou vysterilizováno v autoklávu (15 min, 121 °C; poté ochlazení na 80 °C) a následně skladováno při 4°C. Před přípravou agarových misek byl ztuhlý vysterilizovaný agar rozehřát ve vodní lázni. Po zchladnutí baňky asi na 50 °C bylo do roztoku přidáno 100 µl zásobního roztoku ampicilinu tak, že jeho výsledná koncentrace byla 100 µg/ml. Roztok byl nejprve opatrně promíchán, aniž by se vytvořily bublinky a následně rozlit do sterilních Petriho misek (přibližně 25 ml roztoku LB agaru na jednu Petriho misku). Misky se ztuhlým agarem byly uschovány dnem vzhůru při 4 °C.

Tab. 3.1: *Složení směsi pro přípravu 100 ml LB agaru.*
LB agar je ideální živné médium pro kultivaci bakterií. Kvasničný extrakt je zdrojem vitamínů, stopových prvků a různých organických sloučenin. NaCl poskytuje sodíkové ionty důležité pro osmotickou rovnováhu a transport. Trypton je směsí peptidů sloužící jako zdroj aminokyselin. Agar je polysacharid zajišťující tuhost celé směsi.

Látka	Množství [g]
kvasničný extrakt	0,5
NaCl	1
trypton	1
agar	1,5

3.2.4 Horizontální přenos genetické informace

Přenos požadované DNA do bakteriální buňky je zajištěn procesem zvaným transformace. Jedná se o horizontální přenos genetické informace, v laboratoři prováděný způsobem tzv. teplotního šoku (z anglického *heat shock*). Pro tento proces jsou využívány speciálně upravené bakterie *E. coli* (tzv. kompetentní buňky), které snadněji přijímají vkládané plasmidy. Teplotním šokem dojde k mírnému rozrušení buněčné membrány a buňka je tak schopna přijmout cizorodou DNA nacházející se v jejím okolí.

Část bakterií byla transformována plasmidem pQE-30 obsahující sekvenci thioredoxinu, druhá část bakterií plasmidem pET-15b bez jakéhokoli přidaného inzertu. Transformace byla provedena simultánně a následující kroky se tak vztahují ke vkládání obou plasmidů do bakterie.

Kompetentní buňky bakterie *E. coli* kmene DH5α, jsou dlouhodobě uchovávány při -80 °C a před použitím je nutné je pomalu rozmrazit v ledové lázni. Ke 40 µl kompetentních buněk byl přidán 1 µl plasmidu (dlouhodobě uchováván při -20 °C). Směs byla následně inkubována 15 min na ledové lázni (0 °C), poté byla ponořena do vodní lázně o teplotě 45 °C přesně na 45 s a dále opět inkubována po dobu 2 min na ledové lázni. Do směsi bylo přidáno 0,5 ml LB média (bez antibiotika) předehřátého na 42°C. Směs byla poté inkubována v orbitálním inkubátoru 45 min při 37 °C a 200 ot/min (v anglickém textu označováno RPM, tedy *revolutions per minute*). Následně byla směs asepticky přenesena na Petriho misku (nahřátou v inkubátoru na 37 °C) a rozprostřena rovnoměrně po celé ploše LB agaru. Tento krok byl prováděn u zapáleného kahanu kvůli sterilizaci okolí pracovního místa, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků bakteriemi přirozeně se vyskytujícími v pracovním prostředí. Po částečném zapuštění směsi do agaru byla miska převrácena dnem vzhůru a inkubována v termostatu při 37 °C přibližně 16 hod.

Před další krokem bylo připraveno 8 zkumavek se sterilizovaným LB médiem, přičemž do každé zkumavky byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml. Tím byla zajištěna následná selekce bakterií s vloženým vektorem, neboť transformací získaly rezistenci vůči tomuto antibiotiku. Z Petriho misky obsahující bakterie s plasmidem pET-15b bylo vybráno pět kolonií, které byly jednotlivě asepticky přeneseny do zkumavek s médiem. Z druhé misky s vektorem pQE-30 s thioredoxinem byly odebrány tři kolonie. Celý tento proces opět probíhal

v prostředí sterilizovaném plamenem. Zkumavky byly poté inkubovány po dobu 16 hod v orbitálním inkubátoru při teplotě 37 °C a 200 ot/min.

3.2.5 Isolace plasmidové DNA

Při isolaci plasmidové DNA z bakterií byla využita komerční purifikační sada GeneJET Plasmid Miniprep Kit, přičemž byl dodržován předepsaný postup výrobce (pouze byl použit nižší objem elučního roztoku, aby byl získán koncentrovanější vzorek). Postup bude opět popsán pro jedinou zkumavku, platí však pro všech osm vzorků.

Obsah zkumavky byl postupně centrifugován v mikrozkumavce po dobu 1 min a 13 000 ot/min. Po každém stočení byl supernatant odlit a nad peletu bakteriálních buněk byl přidán zbylý vzorek ze zkumavky. K výsledné peletě vzniklé centrifugováním celého obsahu zkumavky bylo přidáno 250 µl resuspendačního pufru a bakterie byly kompletně resuspendovány pomocí vortexu. Ke směsi bylo dále přidáno 250 µl lyzačního pufru a 350 µl neutralizačního pufru a poté důkladně promíseno opakovaným převrácením mikrozkumavky dnem vzhůru. Následně byla směs centrifugována (5 min, 13 000 ot/min) kvůli oddělení chromosomální DNA a zbytků lyzovaných buněk. Supernatant byl přenesen do speciální GeneJET kolony s filtrem vložené do mikrozkumavky a opět centrifugován (1 min, 13 000 ot/min). Po odstranění přefiltrované kapaliny bylo na kolonu naneseno 500 µl promývacího pufru. Roztok byl znovu centrifugován (1 min, 13 000 ot/min) a kapalina prošlá přes filtr opět odstraněna. Celý promývací krok byl ještě jednou zopakován. Poté byla kolona centrifugována 1 min při 13 000 ot/min pro úplné odstranění promývacího roztoku obsahující ethanol. Na závěr bylo opatrně na střed kolony naneseno 40 µl elučního pufru, který byl nejprve inkubován 2 min při laboratorní teplotě a následně 2 min centrifugován při 13 000 ot/min do sterilní mikrozkumavky, čímž došlo k eluci plasmidové DNA. Mikrozkumavka s isolovanou DNA byla řádně označena a uschována při teplotě -20 °C.

3.2.6 Linearizace plasmidové DNA

Pro vložení inzertu do plasmidu je nejprve nutno kruhovou DNA rozštěpit. K tomu se využívají příslušné restrikční endonukleasy, jejichž specifická štěpná místa se nacházejí v sekvenci plasmidu. V případě plasmidu pET-15b byly vybrány restrikční enzymy BamHI a NdeI. Plasmid pQE-30 s thioredoxinem byl pouze pro kontrolu štěpen restrikčním enzymem BamHI.

Příprava vzorků zahrnovala tři různé způsoby štěpení. Ve dvou směsích byl k 8 µl plasmidu (pET-15b i pQE-30) přidán 1 µl pufru pro enzym BamHI a 1 µl enzymu BamHI. Třetím požadavkem byla příprava dvojitě štěpeného plasmidu pET-15b, kdy bylo k 105 µl plasmidové DNA přidáno 13 µl BamHI pufru, 5 µl enzymu BamHI a 5 µl enzymu NdeI (tabulka 3.2). Všechny tři připravené směsi byly následně inkubovány 16 hod ve 37 °C a poté uloženy do 4 °C.

Tab. 3.2: *Příprava vzorků pro štěpení plasmidů.*
Plasmid pET-15b musel být linearizován dvěma restrikčními endonukleasami, aby mezi restrikční místa mohl být vložen požadovaný inzert (vzorek č. 3). Další dvě štěpení (vzorky č. 1 a 2) nebyla pro pokračování experimentu nezbytná, byla provedena pouze pro porovnání.

Vzorek	Látka	Objem [µl]
1	plasmid pET-15b	8
	pufr pro BamHI	1
	BamHI	1
2	plasmid pQE-30 + Trx	8
	pufr pro BamHI	1
	BamHI	1
3	plasmid pET-15b	105
	pufr pro BamHI	13
	BamHI	5
	NdeI	5

3.2.6.1 Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, rozdělující nabité molekuly podle rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Molekuly DNA, záporně nabité díky fosfátovým skupinám, se pohybují směrem k anodě. V případě dělení nukleových kyselin se používá horizontální agarosový gel. Podle množství rozpuštěné agarosy v pufru vzniká různě hustý gel, obecně však menší fragmenty DNA putují v gelu rychleji než velké.

Pro elektroforézu byl připraven 1% agarosový gel (ten je vhodný pro separaci fragmentů lineární DNA o délce od 500 do 10 000 párů bází, zkráceně *bp*), smícháním 0,7 g agarosy s 70 ml 1× koncentrovaného TBE (zkratka pro Tris/borát/EDTA) pufru (pH 8,0) v Erlenmayerově baňce (složení pufru je uvedeno v tabulce 3.3). Tato směs byla pomalu ohřívána v mikrovlnné troubě, dokud se agarosa úplně nerozpustila. Označení 1× koncentrovaný označuje, že pufr není nutné ve výsledné směsi nijak ředit, aby mohl plnit svou úlohu. Do tekuté směsi byl přidán a lehce vmíchán 1 μl barviva (GelRed Nucleic Acid Stain, ředění 100 000×), které po vazbě na DNA a vystavení UV záření oranžově fluoreskuje. Směs byla nalita do vaničky pro výrobu elektroforetických gelů a byla ponechána při laboratorní teplotě až do ztuhnutí, kdy se gel stane z horizontálního pohledu neprůhledný.

Tab. 3.3: *Složení 1× TBE pufru (pH 8,0) používaného pro přípravu agarosových gelů.*
Díky slabě bazickému prostředí pufru je DNA deprotonizována, díky čemuž zůstává rozpustná ve vodě. EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) je chelatační činidlo vyvazující zejména ionty Mg^{2+} (důležitý kofaktor nukleas), čímž brání enzymatické degradaci nukleových kyselin.

Látka	Koncentrace ve směsi [mM]
Tris-HCl	100
kyselina boritá	90
EDTA	1

Gel byl poté umístěn do nádoby určené pro elektroforézu a zalit 1× TBE pufrem. Před nanesením vzorků na gel k nim bylo přidáno odpovídající množství 6× koncentrovaného GLS (z anglického *gel loading solution*), který obsahuje barviva putující s fragmenty DNA o velikosti 4 000 bp a 400 bp umožňující sledovat rychlost migrace. Jako standard migrace byla využita komerční směs fragmentů DNA s definovanou délkou od 10 kbp do 250 bp (GeneRuler

1kb DNA ladder). Elektroforéza probíhala 1 hod při napětí 74 V. Výsledek byl zkontrolován na transiluminátoru, zároveň byly z gelu co nejtěsněji vyříznuty migrační zóny dvojitě štěpeného plasmidu pET-15b a uloženy do 4 °C.

3.2.6.2 Extrakce DNA z agarosového gelu

Pro isolaci plasmidové DNA z gelu byla využita komerčně dostupná sada GeneJET Gel Extraction Kit. Postupováno bylo podle návodu výrobce, jediná změna nastala opět v posledním kroku, totiž eluci isolované DNA.

Části agarosového gelu obsahující štěpený plasmid pET-15b byly v mikrozkumavkách smíseny s vazebným roztokem a to v poměru 1:1 (hmotnost : objem; například ke 100 mg gelu je nutné přidat 100 µl roztoku). Tato směs byla 10 min inkubována při 50 °C v termobloku až do úplného rozpuštění gelu. Poté byl roztok přenesen na speciální kolonu umístěnou v mikrozkumavce, která byla součástí extrakční sady. Směs byla centrifugována (1 min, 13 000 ot/min) a přefiltrovaná kapalina odstraněna. Následně bylo na kolonu naneseno 700 µl promývacího roztoku, zcentrifugovaná kapalina odstraněna a kolona znovu centrifugována 1 min při otáčkách 13 000 ot/min. Kolona s 40 µl elučního roztoku naneseným opatrně na střed byla přenesena do čisté mikrozkumavky a stočena na centrifuze (1 min, 13 000 ot/min). Isolovaná DNA byla následně použita pro ligační reakci.

3.2.7 PCR

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR (z anglického *polymerase chain reaction*) je in vitro metoda, při níž dochází k rychlému namnožení neboli amplifikaci úseku DNA. Reakční směs pro PCR musí obsahovat templátovou DNA (i.), která slouží jako matrice pro DNA polymerasu při vytváření kopií fragmentu; dále již zmíněnou DNA polymerasu (ii.); krátké úseky DNA, tzv. primery (iii.), na něž může polymerása nasedat, aby mohla začít syntetizovat nové vlákno; směs deoxyribonukleotidtrifosfátů (označovaných dNTP), tedy dATP, dCTP, dGTP, dTTP (iv.), ze kterých je sestavováno nově vznikající vlákno; dále pufr (v.) napomáhající vytvořit ideální prostředí pro použitou DNA polymerasu a nakonec sterilní vodu (vi.). DNA polymerasa je schopna připojovat deoxyribonukleotidy pouze na 3‘ konec již vytvořeného vlákna, tedy ve směru od 5‘ konce k 3‘ konci syntetizovaného vlákna. Proto je nutné do směsi

přidat dva primery, aby byla zajištěna syntéza přesně definovaného fragmentu ohraničeného právě danými oligonukleotidy.

Proces PCR se skládá ze tří kroků, které jsou mnohokrát opakovány. Každý cyklus začíná denaturací dvoušroubovice DNA, která je zajištěna ohřátím směsi na 95 °C po dobu 30 s. Následuje snížení teploty nejčastěji do rozmezí 50-60 °C, aby bylo umožněno nasednutí primerů na matrici. Tato tzv. annealovací teplota (z anglického *annealing temperature*) pro hybridizaci primeru s templátovou DNA závisí na délce a složení oligonukleotidu, její hodnotu je možné získat využitím různých algoritmů a sami výrobci používají hned několik z nich. Posledním krokem cyklu je zvýšení teploty směsi na teplotní optimum aktivity DNA polymerasy (pohybuje se přibližně mezi 70 °C až 80 °C), která poté nasyntetizuje nové vlákno podle templátu. Rychlost syntézy nového vlákna se pohybuje okolo 1 kbp za minutu.

Pro úspěšné provedení reakce je tedy nejprve nutné navrhnout správné sekvence oligonukleotodů, které následně poslouží jako primery pro DNA polymerázu. V tomto případě primery musely kromě částí sekvence thioredoxinu obsahovat navíc krátký úsek komplementární k oblasti štěpných míst v plasmidu pET-15b, do kterého byl produkt PCR reakce později ligován. Před tím však musel být produkt PCR naštěpen příslušnými restrikčními endonukleasami, které pro svou funkci vyžadují určitý počet nukleotidů od specifického štěpného místa. Sekvence navržených primerů byly tedy následující (obr. 3.1).

TRXFL_UP

5'*cgc ggc agc cat atg gtg aag cag atc gag agc aag act gct ttt c* 3'

TRXFL_DOWN

5'*c agc cgg atc ctc tca gac taa ttc att aat ggt ggc ttc aag ctt* 3'

Obr. 3.1: *Sekvence oligonukleotidů pro PCR reakci.*
V sekvencích jsou barevně vyznačena štěpící místa restrikčních endonukleas NdeI (modře) a BamHI (růžově). Podtržené sekvence jsou části kódující počáteční a koncový úsek thioredoxinu.

Oligonukleotidy byly objednány od firmy Generi Biotech a připraveny k použití rozpuštěním v deionizované vodě podle pokynů výrobce do výsledné koncentrace 0,1 mM. Složení reakčních směsí a průběh PCR reakce jsou uvedeny v tabulkách 3.4 a 3.5. Oligonukleotidy byly ještě před přidáním do reakční směsi 10× zředěny deionizovanou vodou. Zásobní roztok pufru pro DNA polymerasu je 10× koncentrovanější, než je vyžadováno pro reakci, pokud je tedy ke směsi přidán v poměru 1:9, je tak získána jeho optimální koncentrace. DNA polymerasa se do směsi přidává vždy jako poslední, těsně před spuštěním reakce.

Tab. 3.4: *Složení PCR směsí o objemu 50 µl.*
Namíchány byly dvě podobné směsi pro PCR reakci, které se lišily koncentrací roztoku směsi dNTP. Alternativní hodnota uvedená v závorkách se vztahuje ke druhé ze dvou směsí. Každá směs byla připravena dvakrát, výsledkem tedy byly čtyři PCR směsi.

Látka	Objem [µl]
plasmid pQE-30 + Trx	2
oligonukleotid TRXFL_UP	2,5
oligonukleotid TRXFL_DOWN	2,5
10× pufr pro DNA polymerasu	5
1,6 mM (10 mM) dNTP	3,5 (1)
deionizovaná voda	33,5 (36)
DNA polymerasa PfuUltra	1

Tab. 3.5: *PCR reakce.*
Kroky 2. – 4. byly třicetkrát opakovány. Do PCR programu je zařazen 5. krok, kterým je DNA polymerase umožněno dosyntetizovat všechna vlákna. Po ukončení reakce je přístrojem udržována teplota 4 °C.

Krok	Teplota	Čas
1.	95 °C	2 min
2.	95 °C	30 s
3.	55 °C	1 min
4.	72 °C	1 min
5.	72 °C	10 min
6.	4 °C	do vypnutí programu

Po ukončení programu bylo z každé PCR směsi odebráno 5 µl vzorku pro zkontrolování úspěšnosti reakce pomocí elektroforézy v 1,5% agarosovém gelu. Zbytek PCR produktů byl přečištěn pomocí komerční sady GeneJET PCR Purification Kit. Obě směsi obsahující 1,6 mM dNTP byly nejprve sloučeny, stejně tak i směsi obsahující 10 mM dNTP. Poté bylo postupováno podle pokynů výrobce purifikační sady. Postup je opět popsán pouze pro jedinou PCR směs, týká se však obou. Pokud není napsáno jinak, centrifugace probíhala po dobu 1 min a otáčkách 13 000 ot/min.

Ke směsi byl v poměru 1:1 přidán vazebný roztok (to znamená, že ke 100 µl PCR směsi je potřeba přidat 100 µl roztoku). Vzniklý roztok byl poté důkladně promíchán, přenesen do GeneJET purifikační kolony a následně centrifugován. Kapalina prošlá filtrem byla odstraněna a na kolonu bylo naneseno 500 µl promývacího roztoku, který byl opět centrifugován a kapalina prošlá filtrem opět odstraněna. Kolona byla poté znovu centrifugována, aby byl úplně odstraněn všechen zbylý promývací roztok. Do středu kolony bylo opatrně naneseno 50 µl deionizované vody, která byla centrifugována do řádně označené sterilní mikrozkumavky. Obě frakce lišící se pouze koncentrací dNTP v PCR směsi byly sloučeny do jediné mikrozkumavky označené PCRp.

3.2.8 Ligace thioredoxinu do plasmidu pET-15b

Při vkládání určitého inzertu do žádaného plasmidu musí být vytvořeny nové kovalentní vazby na tzv. kohezních koncích dvouvláknových úseků DNA (jedno z vláken přesahuje o jednotky nukleotidů, které jsou komplementární k přesahu druhého připojovaného vlákna). K tomuto účelu se využívá nejčastěji T4 DNA ligasa isolovaná z *E. coli* napadené T4 fágem.

Nejprve byl připraven úsek s požadovanými kohezními konci kódující thioredoxin tak, že byl produkt PCR reakce (PCRp) naštěpen dvěma restrikčními endonukleasami, jejichž specifická štěpná místa se vyskytují i v plasmidu pET-15b (složení směsi pro štěpení DNA uvedeno v tabulce 3.6, str. 35).

Tab. 3.6: *Složení směsi pro štěpení produktu PCR.*
Při PCR reakci byla do sekvence ohraničující thioredoxin vložena dvě štěpná místa, proto bylo možné následně vytvořit kohezní konce potřebné pro ligaci.

Látka	Objem [µl]
produkt PCR (Trx)	10
deionizovaná voda	7,4
pufr pro BamHI	2
BamHI	0,3
NdeI	0,3

Směs byla poté inkubována 16 hod při 37 °C a následně uschována ve 4 °C. Štěpená DNA byla purifikována stejným způsobem jako po PCR (odstavec 3.2.7), tedy s využitím sady GeneJET PCR Purification Kit. Tentokrát byl však na rozdíl od postupu popisovaného v předchozím odstavci pro eluci využit doporučený eluční pufr. Výsledkem purifikace tak bylo 30 µl lineární DNA kódující thioredoxin s kohezními konci.

Část této DNA byla ihned využita při ligaci sekvence thioredoxinu do plasmidu. Složení ligační směsi je popsáno v tabulce 3.7.

Tab. 3.7: *Složení ligační směsi.*
DNA kódující thioredoxin, která byla amplifikována při PCR reakci, byla vložena do plasmidu pET-15b pomocí T4 DNA ligasy. Reakce probíhala hodinu při laboratorní teplotě.

Látka	Objem [µl]
produkt PCR (Trx) s kohezními konci	10
5× Rapid Ligation Buffer	4
linearizovaný pET-15b	3
deionizovaná voda	2
T4 DNA ligasa	1

Po smíchání všech komponentů byla směs hodinu ponechána při laboratorní teplotě a poté transformována do kompetentních buněk DH5α. Při práci bylo postupováno podobně, jako je popsáno v odstavci 3.2.4. Kompetentní buňky skladované v -80 °C byly pomalu rozmraženy na ledové lázni. Následně k nim byla přidána ligační směs, pak byly ponechány

dalších 10 min v ledové lázni, poté na 45 s ponořeny do vodní lázně o teplotě 42 °C a následně znovu inkubovány v ledové lázni po dobu 1 min. Ke směsi bylo přidáno 300 µl LB média a s ním byla inkubována 20 min ve 37 °C. V plamenem vysterilizovaném prostředí byl veškerý obsah mikrozkumavky přenesen a rovnoměrně rozprostřen na ampicilinovou agarovou misku, která byla poté dnem vzhůru 16 hod inkubována při teplotě 37 °C. Miska s narostlými koloniemi bakterií byla uložena do 4 °C.

3.2.8.1 PCR s koloniemi bakterií

PCR s koloniemi bakterií (z anglického *colony PCR*) je užitečnou technikou, jak lze zjistit, zda byl inzert úspěšně vnesen do plasmidu. Za tímto účelem byla připravena PCR směs pro 12 reakcí. Složení směsi pro jednu kolonii (tedy jednu PCR reakci) je uvedeno v tabulce 3.8.

Tab. 3.8: *Složení směsi pro jedinou PCR reakci s koloniemi bakterií.*
Směs PCR Master Mix (MM) byla složena z Taq polymerasy (0,05 U/µl) a jejího pufru, všech dNTP (0,4 mM) a $MgCl_2$ (4 mM). Oligonukleotidy ze zásobních roztoků o koncentraci 100 µM byly před použitím 10× naředěny.

Látka	Objem [µl]
PCR MM	10
deionizovaná voda	9
oligonukleotid TRXFL_UP	0,5
oligonukleotid TRXFL_DOWN	0,5

Připravená směs byla rozdělena po 20 µl do 12 mikrozkumavek pro PCR a do každé byla špičkou přenesena vždy jediná kolonie z LB agaru po ligaci. Jednotlivé špičky byly označeny a uschovány pro následné použití. Použitý PCR program je uveden v tabulce 3.9 na straně 37.

Tab. 3.9: *PCR reakce.*
Kroky 2. – 4. byly třicetkrát opakovány. 5. krok umožňuje DNA polymerase dokončit syntézu započatých vláken. Po ukončení reakce byla přístrojem udržována teplota 4 °C.

Krok	Teplota	Čas
1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	30 s
3.	55 °C	30 s
4.	72 °C	1 min
5.	72 °C	10 min
6.	4 °C	do vypnutí programu

Výsledek PCR reakce byl zkontrolován elektroforézou v 1,5% gelu, který je uveden a komentován v kapitole Výsledky (obr. 4.3, str. 56). Jako standard byla při elektroforéze využita komerční směs fragmentů DNA s definovanou délkou od 1 031 bp do 80 bp (MassRuler Low Range DNA ladder). Elektroforéza probíhala 1 hod při konstantním napětí 80 V.

3.2.8.2 Kultivace bakterií s transformovaným plasmidem a isolace DNA

Z 12 testovaných byly vybrány tři kolonie (konkrétně č. 4, 8 a 10), které byly následně kultivovány v LB médiu. Do tzv. miniprepů (zkumavky s 5 ml sterilního LB média a ampicilinem o výsledné koncentraci 100 μg/ml) byly vloženy označené špičky, které byly použity při odebírání příslušných kolonií pro PCR. Na nich uchycené bakterie byly v LB médiu inkubovány 16 hod v orbitálním inkubátoru (37 °C, 200 ot/min). Pro isolaci plasmidové DNA byla použita sada GeneJET Plasmid Miniprep Kit, postup byl přitom obdobný tomu, který je popsán v odstavci 3.2.5. Pouze elační pufr byl pro získání vyššího výtěžku před použitím ohřát na teplotu 70 °C.

Buněčná kultura byla centrifugována a získaná peleta rozpuštěna v 250 μl resuspendačního pufru, poté bylo do mikrozkumavky přidáno 250 μl lyzačního pufru a 350 μl neutralizačního pufru. Směs byla promíchána několikanásobným převrácením mikrozkumavky a centrifugována. Supernatant byl přenesen do GeneJET kolony a centrifugován přes filtr, dále bylo na kolonu naneseno 500 μl promývacího roztoku, který byl následnou centrifugací z kolony

důsledně odstraněn. Plasmidová DNA byla z kolony uvolněna nanesením 40 µl ohřátého elučního pufru a centrifugací do sterilní mikrozkumavky.

Z každého přečištěného vzorku byl odebrán kontrolní vzorek, který byl štěpen restrikčními endonukleasami BamHI a NdeI a vizualizován na 1,5% agarosovém gelu po elektroforéze, který je možno najít v kapitole Výsledky (obr. 4.4, str. 57). Pro štěpení byla vytvořena směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 3.10.

Tab. 3.10: *Štěpení přečištěných plasmidů s inzertem.*
Každá směs byla inkubována 1 hod na termobloku při teplotě 37 °C. Poté byly všechny vzorky smíchány s příslušným množstvím 6× GLS naneseny na agarosový gel pro elektroforézu, která probíhala po dobu 1 hod při konstantním napětí 80 V.

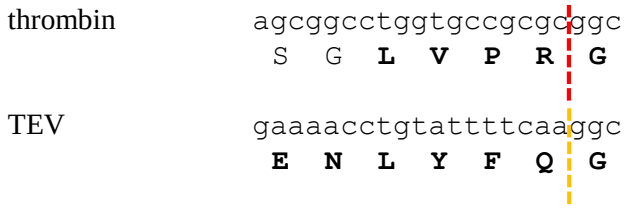
Látka	Objem [µl]
deionizovaná voda	7
isolovaný plasmid	1
pufr pro BamHI	1
BamHI	0,5
NdeI	0,5

Po vyhodnocení provedené elektroforézy byly vzorky isolované plasmidové DNA z kolonie č. 8 a 10 odeslány na sekvenční analýzu do Laboratoře sekvenace DNA, Viničná 7, Praha 2. Výsledky analýzy jsou uvedeny v kapitole Přílohy (obr. P3a, str. 72; obr. P3b, str. 73).

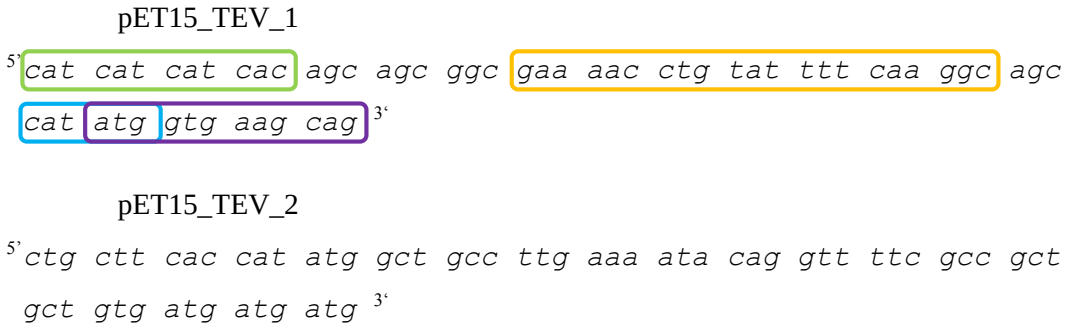
3.2.9 Mutace štěpného místa

V původním konstruktu bylo obsaženo štěpné místo pro thrombin, díky němuž lze po purifikaci proteinu odštěpit uměle vloženou sekvenci šesti histidinových zbytků. Toto místo bylo potřeba změnit na štěpné místo pro TEV proteasu. Použití této cysteinové proteasy má několik výhod, kromě jiného i možnost ji připravit v laboratoři, čímž se stává mnohem levnější než použití thrombinu. Ten je navíc isolován z lidské krevní plazmy a práce s ním je tedy řazena do kategorie biohazardu.

Sekvence TEV místa byla navržena tak, aby se nukleotidy co nejvíce shodovaly s původními v thrombinovém místě. Tím měla být zajištěna vyšší pravděpodobnost úspěšně proběhlé reakce. Sekvence nukleotidů i aminokyselin obou štěpných míst je uvedena na následujícím obrázku (obr. 3.2). Podle uvedené sekvence byly navrženy oligonukleotidy následně použité v PCR reakci pro mutaci štěpného místa (obr. 3.3).



Obr. 3.2: *Sekvence štěpných míst pro thrombin a TEV.*
Štěpená vazba mezi aminokyselinami je vyznačena přerušovanou čarou. Zvýrazněné aminokyseliny jsou specifickou sekvencí pro jednotlivé proteasy.



Obr. 3.3: *Sekvence oligonukleotidů pro PCR reakci.*
Oba oligonukleotidy kódují stejný úsek na obou vláknech, jejich sekvence jsou tedy komplementární. V oligonukleotidu č. 1 je označen úsek odpovídající části sekvenci 6x His-kotvy (zeleně), následovaný TEV štěpným místem (oranžově), místem pro NdeI (modře) a nakonec několik nukleotidů z počátku sekvence thioredoxinu (fialově).

Před objednáním navrhnutých oligonukleotidů byl použit program OligoAnalyzer, který umožňuje predikovat tvorbu vlásenek dané jednovláknové DNA nebo teplotu tání (rozpadu hybridizované dvoušroubovice).

3.2.9.1 PCR vnášející mutaci

Pro nahrazení určitého úseku DNA lze využít PCR reakci, kdy je místo, které je potřeba změnit, obsaženo v přidávaných oligonukleotidech. Tím pádem už tento úsek není přepisován z původní DNA a mutace je tedy přesně definována navrženými primery. Složení použité PCR směsi pro vnesení TEV místa i program jsou uvedeny v následujících tabulkách 3.11 a 3.12. Experiment byl zdvojen, takže zároveň byly prováděny dvě shodné reakce.

Tab. 3.11: *Směs pro PCR reakci mutace thrombinového štěpného místa.*
Oligonukleotidy byly nejprve podle pokynů výrobce rozpuštěny v deionizované vodě na koncentraci 100 µM a poté před použitím ještě 10× zředěny. DNA polymerasa PfuUltra je poměrně přesná (deklarovaná chybovost je asi 1 chyba na 1 milion párů bází) a PCR produkty by tedy měly obsahovat minimální množství chyb.

Látka	Objem [µl]
plasmid z kolonie č. 8	1
oligonukleotid pET15_TEV_1	1
oligonukleotid pET15_TEV_2	1
10× pufr pro DNA polymerasu	5
10 mM dNTP	1
deionizovaná voda	40
DNA polymerasa PfuUltra	1

Tab. 3.12: *PCR program pro mutaci thrombinového štěpného místa.*
Krok 4. a 5. byly prováděny v teplotním optimu DNA polymerasy PfuUltra, které je 68 °C a protože bylo nutné v jednom cyklu amplifikovat celý plasmid, byl i krok 4. prodloužen na 12 min. Cyklus (tedy kroky 2. – 4.) byl dvacetkrát opakován.

Krok	Teplota	Čas
1.	95 °C	2 min
2.	95 °C	30 s
3.	55 °C	1 min
4.	68 °C	12 min
5.	68 °C	12 min
6.	4 °C	do vypnutí programu

Po reakci byla směs 30 min inkubována s DpnI při teplotě 37 °C. DpnI je restrikční enzym, který štěpí methylovanou DNA. Tím je zajištěno, že je selektivně zničena templátová DNA, protože při PCR reakci vzniká pouze nemethylovaná DNA. Výsledek PCR reakce byl zkontrolován elektroforézou. Pokud by reakce neproběhla, tak by na výsledném gelu nebyla vidět téměř žádná DNA, neboť výchozí množství bylo velmi malé. Teprve po několika cyklech reakce vznikne dobře detekovatelné množství DNA.

3.2.9.2 Transformace buněk

Upravený plasmid s TEV štěpným místem vytvořený reakcí PCR byl transformován do kompetentních buněk postupem podobným popsanému v odstavci 3.2.4. K 30 µl kompetentních buněk DH5α byly přidány 3 µl PCR produktu. Tato směs byla 20 min inkubována na ledu, následně byl proveden teplotní šok (45 s ve vodní lázni o teplotě 42 °C) a poté opět inkubována 2 min v ledové lázni. Po přidání 300 µl LB média ohřátého na 42 °C byla směs 30 min inkubována na orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min. Bakterie byly asepticky přeneseny na LB agarové misky s ampicilinem, které byly následně inkubovány 16 hod ve 37 °C.

3.2.9.3 Kultivace bakterií a isolace plasmidové DNA

5 vybraných narostlých bakteriálních kolonií, které podle očekávání měly obsahovat mutovaný plasmid, z každé agarové misky bylo asepticky přeneseno do miniprepů (5 ml sterilního LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml) a inkubovány 16 hod při 37 °C a 200 ot/min na orbitálním inkubátoru. Následně byla plasmidová DNA isolována použitím komerční sady High-Speed Plasmid Mini Kit. Nejprve byla postupně centrifugována každá bakteriální kultura do vlastní mikrozkumavky a supernatant byl průběžně odstraňován (v tomto postupu centrifugace probíhala vždy při otáčkách 13 000 ot/min). Poté byla peleta resuspendována ve 200 µl PD1 pufru, po přidání 200 µl PD2 pufru byla směs opatrně promíchána několikanásobným převrácením mikrozkumavky dnem vzhůru a ponechána 2 min stát při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo následně přidáno 300 µl PD3 pufru, opět byla řádně promíchána a poté centrifugována 3 min. Supernatant byl přemístěn do PD kolony, jež byla součástí sady, a 30 s centrifugován do mikrozkumavky o objemu 2 ml. Prošlá kapalina byla odstraněna a na kolonu byl přidán W1 pufr o objemu 400 µl. Po centrifugaci po dobu 30 s byla

prošlá kapalina odstraněna a na kolonu bylo přidáno 600 µl promývacího pufru a znovu 30 s centrifugováno. Po odstranění kapaliny bylo následnou centrifugací po dobu 3 min zajištěno úplné odstranění promývacího pufru z kolony. Poté byla kolona přenesena do nové mikrozkumavky, na její střed bylo naneseno 50 µl elučního pufru předehřátého na 60 °C a byla ponechána 2 min stát při laboratorní teplotě. Plasmidová DNA byla z kolony uvolněna centrifugací, která trvala 2 min.

Vzorky isolovaných DNA byly odeslány na sekvenční analýzu do Střediska sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, Praha 4. Po důkladné kontrole byly dále používány konstrukty isolované ze dvou různých kolonií (výsledky sekvenční analýzy zobrazované v programu FinchTV uvedeny v kapitole Přílohy, obr. P4a, str. 74 a obr. P4b, str. 75).

3.2.10 Glycerolové zásobní roztoky

Pro další práci se zhotovenými konstrukty bylo potřeba si vytvořit zásobu požadované DNA. Plasmidy byly tedy nejprve transformovány do kompetentních buněk BL21(DE3) již výše popsaným postupem (odstavec 3.2.4). 50 µl kompetentních buněk bylo smícháno 1,5 µl plasmidové DNA a inkubováno 20 min v ledové lázni. Následně byla směs ponořena na 45 s do vodní lázně o teplotě 42 °C a poté opět inkubována na ledové lázni po dobu 2 min. Po přidání 300 µl LB média byla směs umístěna na 1 hod při 37 °C a 200 ot/min do orbitálního inkubátoru a poté asepticky nanesena na LB agarové misky s ampicilinem, které byly 16 hod inkubovány v 37 °C. Takovouto transformací čisté DNA vždy vznikají na miskách jakési plaky bakterií, nikoli jednotlivé kolonie. Při očkování miniprepů pak není nutné nabrat jedinou kolonii a je možné do jednoho miniprepu přenést více kolonií. Z každého konstruktu byly připraveny dva miniprepy s bakteriální kulturou, které byly následně inkubovány v orbitálním inkubátoru 16 hod při 37 °C a 200 ot/min.

Narostlé bakteriální kultury ve zkumavkách byly homogenizovány na vortexu a z každé kultury bylo odebráno 700 µl do sterilní mikrozkumavky, ke kterým bylo přidáno 300 µl sterilního glycerolu. Směs byla na vortexu řádně promíchána a uložena do -80 °C.

3.2.11 Kontrola exprese rekombinantního proteinu

Část zbylé bakteriální kultury z přípravy glycerolových zásobních roztoků byla použita pro ověření exprese vneseného proteinu obou používaných konstruktů. 1 ml bakteriální kultury byl přidán do 5 ml LB média s přidaným ampicilinem o výsledné koncentraci 100 μg/ml a směs byla inkubována na orbitálním inkubátoru 1 hod při 37 °C a třepání 200 ot/min. Poté byl odebrán vzorek 20 μl (čas 0), který byl uschován do 4 °C, a ke zbylé směsi přidáno 6 μl 0,5 M IPTG. Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) je nehydrolyzovatelný analog metabolitu laktosy, který je používán pro indukci lac operonu, který se nachází v plasmidu transformovaném do bakterií. Směs byla inkubována na orbitálním inkubátoru po dobu 23 hod při 37 °C a 200 ot/min a průběžně byly odebírány vzorky přibližně v čase po 5, 16 a 23 hodinách od indukce.

3.2.11.1 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza, neboli elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného, je elektromigrační separační metoda používaná pro dělení proteinů podle jejich pohyblivosti v polyakrylamidovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli, která závisí zejména na délce polypeptidového řetězce. Proteiny jsou v prostředí anionogenního tenzidu dodecylsíranu sodného (SDS) denaturovány a získávají záporný náboj úměrný jejich molekulární hmotnosti. K úplnému rozrušení sekundární struktury napomáhá i zahřátí vzorků před nanesením na gel.

Složení směsí pro přípravu dvou 15% gelů jsou uvedena v následujících tabulkách (separační gel – tab. 3.13, str. 44, zaváděcí gel – tab. 3.14, str. 44). Gel pro SDS-PAGE se skládá z gelu separačního, kde dochází k samotné separaci proteinů podle velikosti, a nad ním umístěného zaváděcího gelu, ve kterém dochází k izotachoforéze. Vzorek, který by obsahoval směs různě dlouhých fragmentů polypeptidových řetězců, tak doputuje na rozhraní gelů v úzké migrační zóně a teprve v separačním gelu se začne dělit podle pohyblivosti jednotlivých fragmentů. Při přípravě gelu pro SDS-PAGE je vhodné separační gel převrstvit několika kapkami isopropanolu, který zajistí rovnou hladinu tuhnoucího gelu. Nad ztuhlý separační gel je poté nanesen gel zaváděcí.

Tab. 3.13: *Separační gel pro SDS-PAGE.*
K polymeraci akrylamidu dochází po přídavku ammonium persulfátu (APS), který zajišťuje vznik radikálů, a tetramethylendiamidu (TEMED), který pomáhá stabilizovat polymerizační reakci. Při přípravě je nutné pracovat v rukavicích, neboť jedna z komponent je toxická.

Látka	Objem [µl]
deionizovaná voda	2 880
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); SDS	3 000
acrylamid 30%/bis-acrylamid 0,8%	6 000
10% APS	100
TEMED	12

Tab. 3.14: *Zaváděcí gel pro SDS-PAGE.*
Izotachoforézy je docíleno odlišným pH, při kterém má nejpomaleji se pohybující molekula záporný náboj. Po změně pH z 6,8 v zaváděcím gelu na 8,8 v gelu separačním ztrácí ona molekula náboj, čímž ztratí i svou funkci terminačního iontu a proteiny začnou migrovat podle své pohyblivosti.

Látka	Objem [µl]
deionizovaná voda	2 563
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8); SDS	1 042
acrylamid 30%/bis-acrylamid 0,8%	558
10% APS	30
TEMED	6

Ke vzorkům z expresního testu o objemu 20 µl bylo přidáno 5 µl 5× koncentrovaného pufru pro SDS (složení uvedeno v tabulce 3.15, str. 45) a poté byly proteiny kompletně zdenaturovány zahřátím na 90 °C na termobloku po dobu 1 min.

Tab. 3.15: *Složení SDS-PAGE vzorkovacího pufru.*
Složení směsi pro přípravu 10 ml 5× koncentrovaného pufru přidávaného ke vzorkům proteinů v poměru 1:4. Glycerol svou vyšší hustotou zajišťuje pokles vzorku na dno jamky. β-merkaptoethanol vytváří redukční prostředí, ve kterém nejsou v proteinech vytvářeny disulfidické můstky.

Látka	Objem [ml]
50% glycerol	5
10% SDS	2
10% bromfenolová modř	1
deionizovaná voda	0,9
1 M Tris-HCl	0,6
β-merkaptoethanol	0,5

Gel byl umístěn do aparatury pro SDS elektroforézu a zalit 1× SDS pufrem (složený z 50 mM Tris-HCl o pH 8,3, 385 mM glycinu a 0,1% SDS). Jednotlivé jamky zaváděcího gelu byly propláchnuty pufrem pomocí mikrostříkačky Hamilton. Standardem putování proteinů byl Precision Plus Protein Standards (Dual-color, BIO-RAD), směs proteinů o velikosti od 10 do 250 kDa.

Elektroforéza probíhala při napětí 200 V až do doputování bromfenolové modři přidávané ke vzorkům na spodní okraj gelu. Poté byl gel přenesen do tzv. barvícího roztoku, jehož složení je uvedeno v tabulce 3.16 (str. 46). Barvení bylo urychleno zahřátím roztoku na teplotu těsně pod bod varu. Po nabarvení byl gel přenesen do roztoku odbarvovacího (složení uvedeno v tabulce 3.17, str. 46) a opět zahřát, následně byl gel přenesen do nového odbarvovacího roztoku, kde byl ponechán 24 hod.

Tab. 3.16: *Složení barvícího roztoku pro gely po SDS-PAGE elektroforéze.*
Uvedeno je složení směsi pro přípravu roztoku, který je třeba doplnit deionizovanou vodou na objem 1 l. Ledová kyselina octová je označením pro čistou bezvodou kyselinu octovou. Modré barvivo Coomassie se váže na proteiny a tím umožňuje vizualizovat jednotlivé migrační zóny v polyakrylamidovém gelu.

Látka	Hmotnost, objem
methanol	450 ml
ledová kyselina octová	100 ml
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g

Tab. 3.17: *Složení odbarvovacího roztoku pro gely po SDS-PAGE elektroforéze.*
Složení směsi pro přípravu roztoku doplněného deionizovanou vodou na objem 1 l. Odbarvovací roztok vymývá modré barvivo z oblastí gelu, které neobsahují proteiny.

Látka	Objem
methanol	100 ml
ledová kyselina octová	100 ml

3.3 Příprava konstruktů pro expresi ASK1

3.3.1 ASK1 v expresním vektoru pRSFDuet-1

Obdržené výchozí konstrukty obsahovaly sekvenci N-terminální části lidského proteinu ASK1 v rozsahu aminokyselin 46-302, resp. 88-302 v plasmidu pRSFDuet-1. Sekvence v plasmidu předcházející samotnému proteinu ASK1 obsahovala histidinovou kotvu (6× His pro usnadnění purifikace) a dále GB1 protein (tedy B1 doménu G proteinu), který napomáhá zvýšit rozpustnost translatovaného fúzního proteinu, neboť fragment ASK1 kinasy není sám o sobě dobře rozpustný. Dále deset asparaginových zbytků (můstek zajišťující flexibilní spojení a zároveň zabraňující sterickým kontaktům mezi proteinem ASK1 a GB1 proteinem) následované štěpným místem pro TEV proteasu (umožňující po purifikaci odštěpit arteficiální GB1 a histidinovou kotvu) a několik specifických míst pro restrikční endonukleasy. V daném plasmidu je také kódována oblast poskytující hostitelské bakterii rezistenci vůči antibiotiku kanamycin. (mapa plasmidu na obr. P5, str. 76)

3.3.2 Příprava expresních konstruktů ASK1 kinasy

Cílem práce bylo připravit šest nových expresních konstruktů lidské ASK1 kinasy (kompletní sekvence v příloze B, str. 77), které by následně mohly být využity při krystalizaci thioredoxin-vazebné domény proteinkinasy ASK1 v komplexu s thioredoxinem. Podle struktury navržené na základě předchozích studií ([14]; více probíráno v kapitole Diskuze) měly být připraveny konstrukty, v nichž by byl bodovou mutací vložen stop kodón na místa aminokyselinových zbytků P252, S268 a T288. Predikce sekundární struktury získaná v programu PSIpred je uvedena v kapitole Přílohy na obr. P6, str. 81. Výsledkem experimentu tedy byly konstrukty N-terminálních úseků lidského proteinu ASK1, konkrétně $ASK^{46\text{-}251}$, $ASK^{46\text{-}267}$, $ASK^{46\text{-}277}$, $ASK^{88\text{-}251}$, $ASK^{88\text{-}267}$ a $ASK^{88\text{-}277}$ v expresním vektoru pRSFDuet-1.

3.3.2.1 Transformace původních konstruktů do kompetentních buněk DH5α

Vnesení plasmidu do bakteriálních buněk probíhalo podobně jako transformace popsaná v odstavci 3.2.4. Současně byly prováděny dvě transformace a to kratšího i delšího konstruktu.

Ke 45 µl kompetentních buněk DH5α byl přidán 1 µl konstruktu ASK1 (46-302, resp. 88-302) a směs byla inkubována 15 min na ledové lázni (0 °C). Poté byl proveden teplotní šok ponořením směsi na dobu 45 s do vodní lázně o teplotě 42 °C následovaný inkubací na ledové lázni trvající 2 min. Po přidání 450 µl LB média o teplotě 42 °C byla směs 1 hod inkubována na orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min a poté asepticky přenesena a rovnoměrně rozprostřena na LB agarové misce obsahující kanamycin o koncentraci 30 µg/ml. Po zapuštění směsi do agaru byla miska otočena dnem vzhůru a v této poloze inkubována 16 hod ve 37 °C.

Z každé misky byly vybrány tři bakteriální kolonie, které byly jednotlivě přeneseny do 5 ml sterilního LB média s přidaným kanamycinem o výsledné koncentraci 30 µg/ml. Kolonie byly následně kultivovány 16 hod v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min.

3.3.2.2 Isolace plasmidové DNA

Pro isolaci plasmidové DNA s původními konstrukty ASK1 byla využita komerčně dostupná sada High-Speed Plasmid Mini Kit. Při práci bylo postupováno podle návodu výrobce, který je detailně popsán v odstavci 3.2.9.3. Bakteriální kultury byly centrifugovány a následně byla paleta resuspendována v 200 µl PD1 pufru. Dále bylo přidáno 200 µl pufr PD2, směs byla důkladně promíchána a 2 min inkubována při laboratorní teplotě. Po přidání 300 µl PD3 pufru byla směs centrifugována a supernatant byl přemístěn do PD kolony a centrifugován do mikrozkumavky. Kolona byla promyta 400 µl W1 pufru a 600 µl promývacího pufru a plasmidová DNA byla z kolony uvolněna do sterilní mikrozkumavky nanesením 50 µl elučního pufru a následnou centrifugací. Takto byla isolována plasmidová DNA obsahující sekvenci fragmentu ASK1 (46-302 a 88-302), v obou případech ze tří různých bakteriálních kolonií.

3.3.3 Cílené mutace prováděné pomocí PCR reakce

Metoda PCR může být kromě amplifikace DNA využita také při vnášení mutací. Navrhovány jsou pak primery, které nahradí původní DNA v místě mutace. V reakci se replikuje kompletní plasmid, zůstává však lineární. Po jeho transformaci do bakterie dojde k uzavření kruhu.

3.3.3.1 Navržení oligonukleotidů pro PCR reakci

Pro PCR reakci, jejímž cílem byla změna vybraných tripletů nukleotidů kódujících aminokyseliny na tzv. stop kodóny, byly navrženy tři páry oligonukleotidů. Každý z nich obsahoval v prostřední části sekvenci nukleotidů `tag` (resp. `cta`) ohraničenou z každé strany přibližně 15 dalšími nukleotidy odpovídající sekvenci v původním konstruktu.

Na obrázku 3.4 je uvedena sekvence nukleotidů a odpovídajících aminokyselin pouze C-koncové části výchozích konstruktů ASK1 kinasy (kompletní sekvence lidské ASK1 je uvedena v kapitole Přílohy, příloha B, str. 77). Sekvence navrhovaných oligonukleotidů jsou pak uvedeny na obrázku 3.5 (str.50).

```
aacttcgagctgcttcttggacccatctgcttacctcttgtggatcgttttattcaactt
 N   F   E   L   L   L   G   P   I   C   L   P   L   V   D   R   F   I   Q   L   260

ttgaaggtggcacaagcaagttctagccagtacttccgggaatctatactcaatgacatc
 L   K   V   A   Q   A   S   S   S   Q   Y   F   R   E   S   I   L   N   D   I   280

aggaaagctcgtaatttatacactggtaaagaattggcagctgagttggcaagaattcgg
 R   K   A   R   N   L   Y   T   G   K   E   L   A   A   E   L   A   R   I   R   300
```

Obr. 3.4: *C-terminální úsek sekvence výchozího konstruktu lidské ASK1.*
Výchozí konstrukt obsahoval sekvenci ASK1 končící na aminokyselinovém zbytku 302. Zde je zobrazena pouze část celé sekvence. Červeně jsou zvýrazněny trojice nukleotidů zaměňované za triplety pro stop kodóny.

ASK1_P252_UP	5'*gga ccc atc tgc tta tag ctt gtg gat cgt ttt* 3'
ASK1_P252_DOWN	5'*aaa acg atc cac aag cta taa gca gat ggg tcc* 3'
ASK1_S268_UP	5'*gtg gca caa gca agt tag agc cag tac ttc cgg* 3'
ASK1_S268_DOWN	5'*ccg gaa gta ctg gct cta act tgc ttg tgc cac* 3'
ASK1_T288_UP	5'*gct cgt aat tta tac tag ggt aaa gaa ttg gc* 3'
ASK1_T288_DOWN	5'*gc caa ttc ttt acc cta gta taa att acg agc* 3'

Obr. 3.5: *Sekvence oligonukleotidů pro PCR reakci.*
Sekvence původního konstruktu byla pomocí cílené mutagenese změněna na třech konkrétních místech. V sekvencích oligonukleotidů jsou barevně podtržena místa vkládaného tripletu pro stop kodón.

3.3.3.2 PCR

Oba výchozí konstrukty byly mutovány na třech různých místech, bylo tedy prováděno šest PCR reakcí zároveň. V reakci byly využity expresní konstrukty isolované z kompetentních buněk (viz odstavec 3.3.2.2). Složení PCR směsi a použitý program jsou uvedeny v následujících tabulkách 3.18 a 3.19 (str. 51).

Tab. 3.18: *PCR směs pro vnesení stop kodónu do aminokyselinové sekvence ASK1 kinasy.*
Pro mutaci byla opět využita spolehlivější DNA polymerasa PfuUltra. Podle požadované mutace byly použity odpovídající oligonukleotidy, zde obecně označeny ASK1_UP a ASK1_DOWN.

Látka	Objem [µl]
plasmidová DNA	1
oligonukleotid ASK1_UP	1
oligonukleotid ASK1_DOWN	1
10× pufr pro DNA polymerasu	5
10 mM dNTP	1
deionizovaná voda	40
DNA polymerasa PfuUltra	1

Tab. 3.19: *PCR program.*
Kroky 2. – 4. byly dvacetkrát opakovány. Na rozdíl od předchozích experimentů byla teplota nasedání oligonukleotidů snížena na 51 °C.

Krok	Teplota	Čas
1.	95 °C	2 min
2.	95 °C	30 s
3.	51 °C	1 min
4.	68 °C	5 min
5.	68 °C	10 min
6.	4 °C	do vypnutí programu

Zda byla PCR reakce úspěšná bylo zkontrolováno elektroforézou v 1% agarosovém gelu.

3.3.3.3 Transformace a isolace plasmidové DNA

Produkty PCR reakce byly transformovány do bakterií *E. coli* kmene DH5α (viz odstavec 3.2.9.2). 3 µl směsi po PCR byly přidány ke 30 µl kompetentních buněk a směs byla inkubována 20 min v ledové lázni, na 45 s ponořena do vodní lázně o teplotě 42 °C a následně opět inkubována na ledové lázni 2 min. Po přidání 300 µl LB média ohřátého na 42 °C byla směs inkubována 30 min v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min a poté asepticky přenesena na LB agarové misky s koncentrací kanamycinu 30 µg/ml. Misky byly v převrácené poloze inkubovány 16 hod ve 37 °C.

Z každé misky byly vybrány tři bakteriální kolonie, které byly vždy asepticky přeneseny do 5 ml LB média obsahujícího kanamycin o výsledné koncentraci 30 µg/ml a inkubovány 16 hod v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min.

K isolaci plasmidové DNA z narostlých bakteriálních kultur byla použita sada High-Speed Plasmid Mini Kit, předepsaný postup výrobce je popsán v odstavci 3.2.9.3. Každá bakteriální kultura byla centrifugována do mikrozkumavky a postupně byl odstraňován supernatant. Výsledná peleta byla resuspendována ve 200 µl PD1 pufru. Směs byla po přidání 200 µl PD2 pufru lehce promíchána a následně 2 min inkubována při laboratorní teplotě. Po přidání 300 µl PD3 pufru byla směs opět promíchána a poté 3 min centrifugována.

Supernatant byl přenesen do PD kolony, přes kterou byl 30 s centrifugován. Kolona byla centrifugací po dobu 30 s promyta 400 µl W1 pufru a následně 600 µl promývacího pufru. Pro úplné odstranění promývacího pufru byla kolona ještě dodatečně 3 min centrifugována a poté přemístěna do sterilní mikrozkumavky, do které byla v elučním kroku (inkubace 50 µl elučního pufru o teplotě 60 °C na kolonce následovaná centrifugací po dobu 2 min) uvolněna plasmidová DNA.

Vzorky isolované plasmidové DNA byly odeslány na sekvenční analýzu do Laboratoře sekvenace DNA, Viničná 7, Praha 2. Výsledky analýzy jsou uvedeny v kapitole Přílohy (obr. P7a – P7f, str. 82 – 87).

3.3.4 Zásobní glycerolové roztoky připravených konstruktů ASK1

Připravené a isolované plasmidy pRSFDuet-1 s inzertní sekvencí thioredoxin-vazebné domény ASK1 o různých délkách byly osekvenovány a nadále bylo v experimentu pokračováno s šesti požadovanými konstrukty (ASK^{46-251}, ASK^{46-267}, ASK^{46-277}, ASK^{88-251}, ASK^{88-267} a ASK^{88-277}). Pro usnadnění další práce byly vytvořeny glycerolové zásobní roztoky z každého expresního konstruktu.

1,5 µl plasmidové DNA bylo přidáno k 50 µl kompetentních buněk BL21(DE3) a směs byla 15 min inkubována v ledové lázni, poté byla přenesena do vodní lázně o teplotě 42 °C na dobu 45 s a následně na 2 min zpět do ledové lázně. Po přidání 500 µl LB média o teplotě 42 °C byla směs inkubována 50 min v orbitálním inkubátoru při teplotě 37 °C a 200 ot/min. Takto připravené směsi byly jednotlivě přidány vždy k 5 ml LB média obsahující kanamycin o výsledné koncentraci 30 µg/ml a byly 16 hod inkubovány v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min. Z každé narostlé kultury bylo odebráno 700 µl, ke kterým bylo přidáno 300 µl sterilního glycerolu. Důkladně promíchané roztoky byly uchovány v -80 °C.

3.3.5 Kontrola exprese fúzního proteinu

Před přípravou proteinu ASK1 z většího množství bakteriální kultury byla nejprve ověřena jeho exprese. Do 5 ml LB média s přidaným kanamycinem byl přenesen vždy 1 ml bakteriální kultury nevyužité při přípravě glycerolových zásobních roztoků. Tato směs byla 90 min inkubována v orbitálním inkubátoru ve 37 °C při 200 ot/min. Poté byl z každé kultury odebrán první vzorek (objem 20 μl) a zbytek kultury byl indukován 6 μl 0,5 M IPTG. Směsi byly poté inkubovány po dobu 23 hod v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 ot/min. V několikahodinových intervalech byly z bakteriálních kultur odebírány vzorky, které byly následně použity pro SDS-PAGE elektroforézu (viz kapitola Výsledky, obr. 4.8 – 4.10, str. 62 – 63).

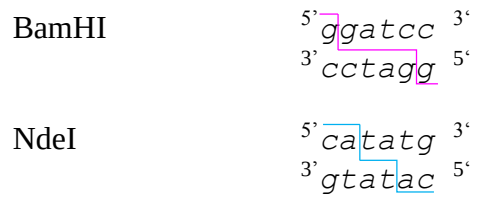
4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava plasmidu pET-15b s vloženou sekvencí pro thioredoxin (C73S mutace)

Z obdrženého plasmidu pQE-30 byl thioredoxin přenesen do expresního plasmidu pET-15b s TEV štěpným místem pro odstranění fúzní histidinové kotvy. V tomto experimentu bylo využito mnoho metod molekulární biologie včetně PCR reakce či transformace genetické informace do bakterií.

4.1.1 Příprava dvojitě štěpeného plasmidu pET-15b

Expresní vektor pET-15b byl nejprve rozštěpen na dvou specifických místech, aby do něj následně mohla být vložena sekvence pro thiredoxin. Pro štěpení byly použity restrikční endonukleasy BamHI a NdeI (obr. 4.1). Tyto restrikční enzymy při štěpení dvouvláknové DNA vytváří tzv. kohezní konce, které jsou využívány při připojování nové úseku DNA do rozštěpeného plasmidu (procesu nazývaného ligace).

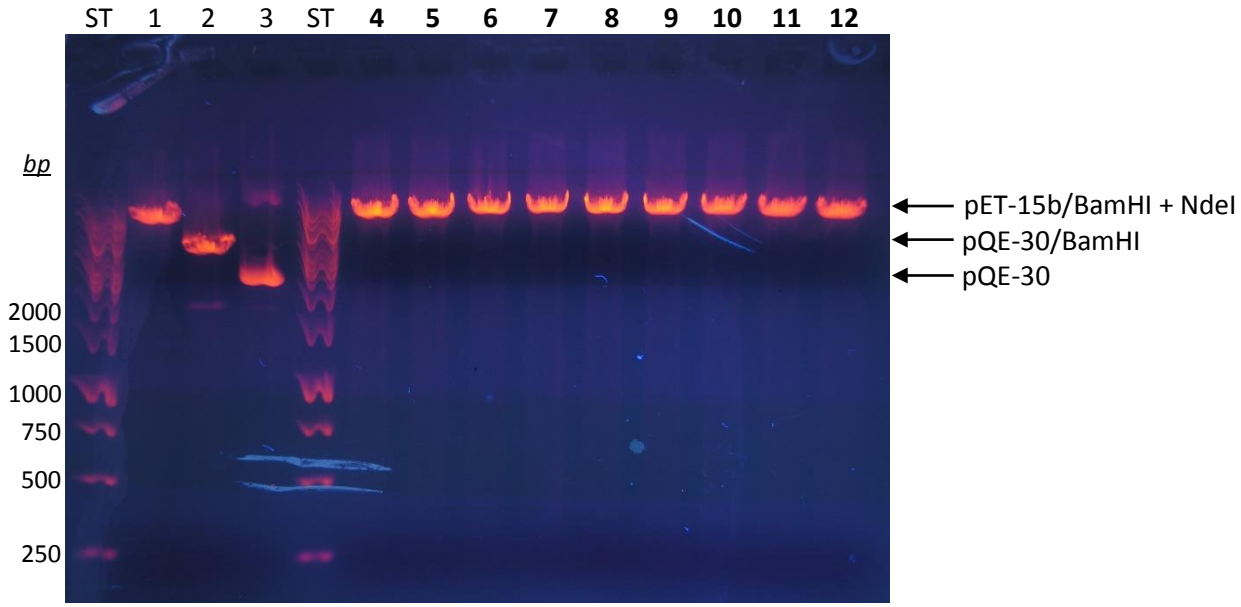


***Obr. 4.1**: Specifická štěpná místa restrikčních endonukleas BamHI a NdeI.*
V uvedených specifických restrikčních místech použitých endonukleas jsou vyznačena místa štěpení řetězců. Z obrázku je naprosto zřejmý vznik kohezních konců po rozštěpení řetězců.

Pro kontrolu, zda štěpení proběhlo v pořádku, a zároveň separaci požadovaného fragmentu DNA od residuálních částí plasmidu byla provedena horizontální agarosová elektroforéza. Na obrázku 4.2 (str. 55) je patrná různá rychlost migrace v závislosti na délce úseku DNA, kdy menší fragmenty DNA putují póry agarosového gelu rychleji směrem k anodě než fragmenty velké. Z rozdílné rychlost migrace stejně velkého úseku DNA v drahách označených číslem 2 a 3 lze předpokládat, že pohyblivost fragmentů DNA při elektroforéze závisí i na tvorbě nadšroubovicové struktury (tzv. superhelixu).

Standardem rychlosti migrace DNA byla směs GeneRuler 1kb DNA Ladder obsahující fragmenty o velikosti od 10 kbp do 250 bp, kterého byly na gel nanášeny 2 µl. Cílem prováděné elektroforézy bylo oddělení plasmidu od malých vyštěpených fragmentů, které gelem putují daleko rychleji. Elektroforéza proto byla ukončena dřív, než mohlo dojít k úplnému rozdělení větších fragmentů standardu.

Separace DNA pomocí elektroforézy probíhala v 1% agarosovém gelu, na který byly nanášeny vzorky připravené dále popsaným postupem. K 10 µl štěpených plasmidů (na obrázku označen číslem 1 a 2) byly vždy přidány 2 µl 6× koncentrovaného GLS. K 6 µl neštěpeného plasmidu pQE-30 (č. 3) byly přidány 4 µl deionizované vody a 2 µl 6× GLS. Ke 128 µl dvojitě štěpeného plasmidu pET-15b bylo přidáno 30 µl 6× GLS; tento vzorek byl při nanášení na gel rovnoměrně rozdělen do devíti jednotlivých vzorků (č. 4-12).

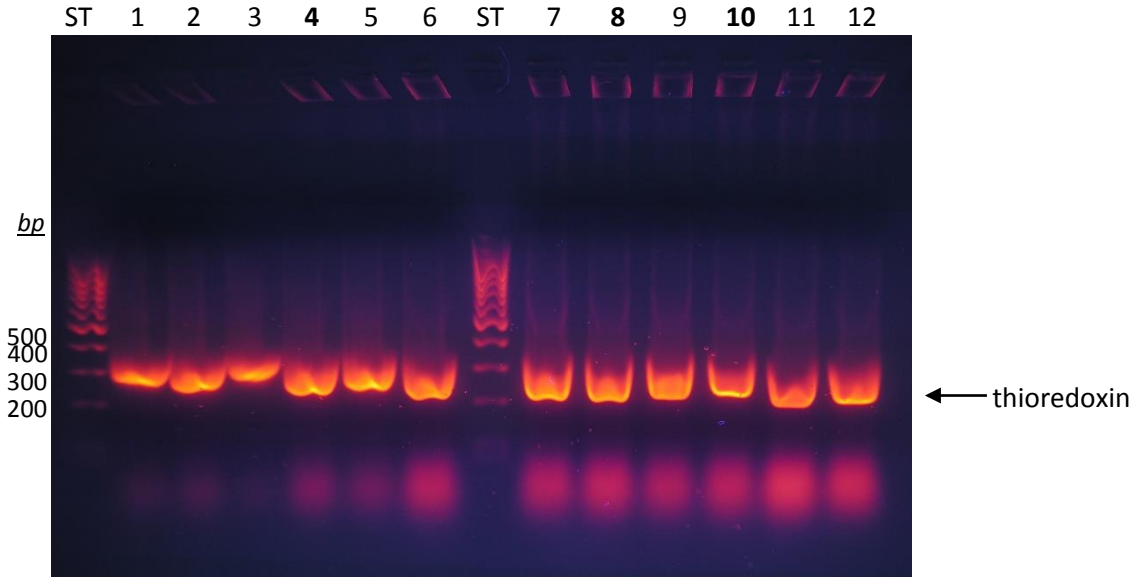


***Obr. 4.2**: Agarosový gel se vzorky plasmidů pQE-30 a pET-15b po elektroforéze.*
Do levé části agarosového gelu byly naneseny kontrolní vzorky a to v pořadí standard (ST), pET-15b štěpený BamHI (1), pQE-30 štěpený BamHI (2) a neštěpený pQE-30 (3). Zbytek gelu byl využit pro oddělení linearizovaného plasmidu pET-15b (4-12) od menších fragmentů vzniklých štěpením. Velikost plasmidu pET-15b je přibližně 5,7 kbp. Plasmid pQE-30 včetně inzertu je složen asi z 3,7 kbp. Elektroforéza probíhala 1 hod při napětí 74 V.

4.1.2 Ligace thioredoxinu do plasmidu pET-15b

Gen kódující thioredoxin byl vložen do plasmidu pET-15b, kterým byly následně transformovány kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5α. Pro kontrolu, zda byla transformace úspěšná, byla provedena PCR s koloniemi bakterií. Pokud by vybraná kolonie bakterií neobsahovala požadovaný plasmid s inzertem, podle něhož byly pro PCR reakci navrženy primery, žádná reakce by neproběhla. Tím pádem by daný úsek DNA nebyl namnožen a na agarosovém gelu po elektroforéze by kvůli nedetekovatelnému množství původní plasmidové DNA nebyla znatelná migrační zóna.

Pro elektroforézu byl připraven 1,5% agarosový gel. Možnost určení rychlosti migrace zajišťovala směs definovaných fragmentů DNA o velikosti 80 až 1 031 bp (MassRuler Low Range DNA Ladder), které byly na gel nanášeny 2 µl. Smícháním 20 µl produktu PCR reakce se 4 µl 6× koncentrovaného GLS byly připraveny vzorky, ze kterých bylo na gel naneseno vždy 12 µl (obr. 4.3).

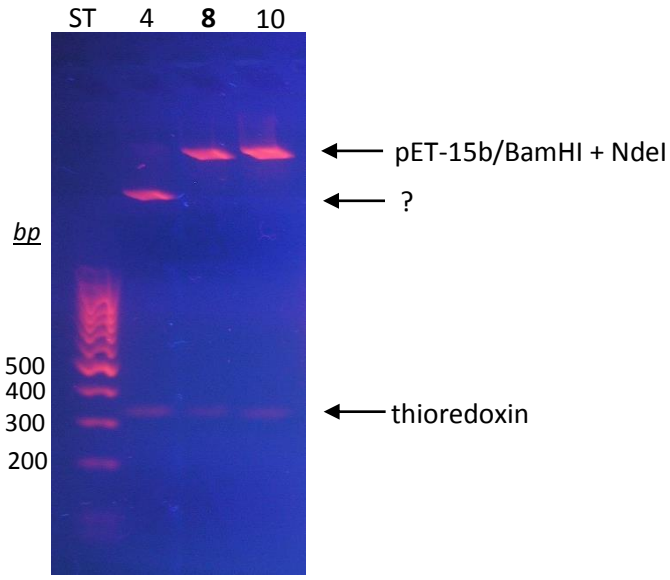


Obr. 4.3: *Agarosový gel po elektroforéze se vzorky z PCR reakce s koloniemi bakterií.*
Produkty PCR reakce dvanácti vybraných bakteriálních kolonií (1-12) byly spolu se standardem (ST) naneseny na agarosový gel. Předpokládaným produktem PCR reakce byl fragment DNA o velikosti 343 bp. Elektroforéza probíhala 1 hod při konstantním napětí 80 V.

K dalšímu kroku přípravy expresního konstruktu thioredoxinu byly na základě výsledků elektroforézy vybrány kolonie č. 4, 8 a 10. Tyto kolonie byly kultivovány v kapalném médiu, aby mohlo být následně isolováno dostatečné množství plasmidové DNA.

Úspěšnost celého experimentu ligace byla zkontrolována naštěpením isolovaných plasmidů restrikčními endonukleasami BamHI a NdeI a následnou elektroforézou. Na výsledném gelu byly očekávány dvě migrační zóny, z nichž jedna by měla odpovídat thioredoxinu a druhá lineárnímu plasmidu pET-15b. (obr. 4.4)

Na 1,5% agarosový gel byly naneseny 2 µl standardu (MassRuler Low Range DNA Ladder) a vzorky složené z 10 µl směsi DNA po štěpení a 2 µl 6× koncentrovaného GLS.



Obr. 4.4: *Plasmidy pET-15b s thioredoxinem isolované z vybraných bakteriálních kolonií a štěpené dvěma restrikčními endonukleasami.*

U testovaných kolonií č. 4, 8 i 10 bylo možné po štěpení na výsledném gelu pozorovat migrační zónu fragmentu DNA odpovídajícímu thioredoxinu. Zóna náležící lineárnímu plasmidu však v případě kolonie č. 4 putovala jinak než zbylé dvě, a proto tato DNA nebyla nadále v experimentu využívána. Elektroforéza probíhala 1 hod při napětí 80 V.

4.1.3 Mutace štěpného místa

Nakonec bylo do plasmidu pET-15b v sekvenci předcházející úseku kódující thioredoxin cílenou mutagenesí vloženo specifické místo pro TEV proteasu. Tímto krokem byla dokončena příprava nového expresního konstruktu.

Inzertní sekvence DNA kódující thioredoxinu s C73S mutací byla ligována do plasmidu pET-15b mezi místa pro restrikční endonukleasy BamHI a NdeI. V plasmidu se dále před sekvencí proteinu nacházel úsek kódující šest po sobě následujících histidinových zbytků. Výsledkem exprese genu je tak fúzní protein, jehož 6× His-kotva usnadňuje jeho následnou purifikaci pomocí niklové chelatační chromatografie. Mezi polyhistidinovým úsekem a samotným thioredoxinem byla navíc zařazena specifická sekvence pro TEV proteasu, díky čemuž je možné po purifikaci proteinu arteficiální úsek odštěpit a získat tak téměř nativní sekvenci (část sekvence konstruktu na obr. 4.5).

```
atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcgaaaacctgtattttcaaggc
 M   G   S   S   H   H   H   H   H   H   S   S   G   E   N   L   Y   F   Q   G

agccatatggtgaagcagatcgagagcaagactgcttttcaggaagccttggac
 S   H   M   V   K   Q   I   E   S   K   T   A   F   Q   E   A   L   D
```

Obr. 4.5: *N-terminální úsek fúzního proteinu.*
Schéma znázorňuje pouze N-terminální úsek fúzního proteinu celkově se skládajícího ze 127 aminokyselin. V sekvenci je vyznačeno několik významných úseků a to 6× His-kotva (zeleně), specifická sekvence pro TEV proteasu (oranžově), místo pro restrikční endonukleasu NdeI (modře) a N-terminální úsek sekvence thioredoxinu (fialově).

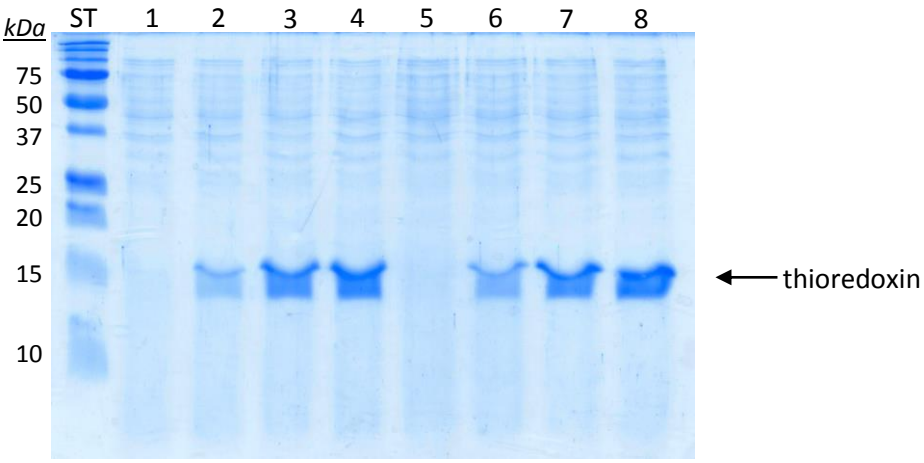
Připravený plasmid pET-15b nesoucí požadované vložené sekvence byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* kmene BL21(DE3) metodou nazývanou teplotní šok, jež usnadňuje vstup cizorodé DNA do speciálně za tímto účelem upravených buněk (viz odstavec 3.2.4).

4.1.4 Test exprese thioredoxinu

Exprese fúzního proteinu vloženého do plasmidu musí být v bakteriální buňce indukována. Před genem pro daný protein se totiž nachází sekvence T7 promotoru, jež je specifická pouze pro RNA polymerasu z T7 bakteriofága, ale není rozpoznávána klasickou RNA polymerasou *E. coli*.

Do genomu některých kmenů *E. coli* (nesoucí pak označení DE3) byl uměle vnesen gen pro T7 polymerasu. Tomuto genu předchází lac promotor, na který je před indukcí navázán represorový protein. Represor se ze sekvence uvolní v momentě, kdy v důsledku vazby laktosy (nebo jejího analogu IPTG) dojde ke konformační změně proteinu. Poté může endogenní RNA polymerasa *E. coli* zahájit transkripci genu pro T7 polymerasu, která je vzápětí i translatována. Vytvořená T7 polymerasa následně nasedá na sekvenci T7 promotoru nacházející se v transformovaném plasmidu a začíná transkripce žádaného genu.

Test exprese thioredoxinu byl prováděn v *E.coli* kmene BL21(DE3). Bakteriální kultura byla nejprve přenesena do čerstvého LB média, kde byla následně indukována. Vzorky byly odebírány v průběhu následujících 23 hod a poté byla provedena SDS-PAGE elektroforéza. Na 15% polyakrylamidový gel byly nanášeny vzorky, které byly připraveny smícháním 20 µl vzorku odebraného z indukované bakteriální kultury s 5 µl pufru pro SDS. Ještě před nanesením byly vzorky úplně denaturovány inkubací v 90 °C po dobu 1 min. 10 µl standardní směsi proteinů o velikosti od 10 do 250 kDa (Precision Plus Protein Standards; Dual-color, BIO-RAD) posloužilo jako měřítko rychlosti migrace zón. Elektroforéza probíhala 1,5 hod při konstantním napětí 200 V (obr. 4.6, str. 60). Migrační zóny byly zviditelněny inkubací v barvícím roztoku obsahující Coomassie brilliant blue R250 (viz tabulka 3.16, str. 46).



Obr. 4.6: *Výsledek expresního testu fúzního proteinu thioredoxinu.*
Exprese byla testována u připravených konstruktů získaných ze dvou různých kolonií bakterií *E. coli* kmene DH5α (1. kolonie: 1-4, 2. kolonie: 5-8). První vzorek byl odebrán těsně před indukcí (1 a 5), další po 4 hod 50 min (2 a 6), 16 hod 5 min (3 a 7) a poslední po 23 hod (4 a 8). Z gelu je naprosto zřejmý nárůst množství thioredoxinu po indukci dále rostoucí s časem.

Tímto testem bylo prokázáno, že bakterie *E. coli* kmene BL21(DE3) transformované plasmidem s vytvořeným expresním konstruktem po indukci pomocí IPTG produkují požadovaný fúzní protein.

4.2 Příprava expresních konstruktů ASK1 o různých délkách

Obdržená sekvence thioredoxin-vazebné domény proteinkinasy ASK1 v plasmidu pRSFDuet-1 byla cílenou mutagenesí pozměněna tak, že při translaci odpovídající mRNA (z anglického *messenger RNA*) vznikaly proteiny s kratší sekvencí, než byla původní.

Na začátku se přitom vycházelo ze dvou konstruktů vazebné domény ASK1. Jeden kódoval 257 aminokyselin z přirozeně se vyskytující ASK1, druhý expresní produkt pouze 215 aminokyselin. Oba tyto konstrukty byly specificky zkráceny na C-konci o 15 až 51 aminokyselinových zbytků (viz odstavec 3.3.2). Před úsekem vazebné domény ASK1 bylo kódováno několik oblastí včetně GB1 proteinu a histidinové kotvy, takže výsledkem exprese byl fúzní protein.

Parametry vznikajících fúzních proteinů byly vypočteny v programu ProtParam, zejména se jednalo o molekulovou hmotnost, která byla nutná ke správnému přiřazení migrační zóny odpovídající danému proteinu po expresním testu. Zjištěné parametry jsou uvedeny v tabulce 4.1 (str. 61).

Tab. 4.1: *Parametry fúzních proteinů kódovaných v inzertu plasmidu pRSFDuet-1.*
Z údajů získaných v programu ProtParam byl zapsán pouze počet aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci a molekulová hmotnost proteinu.

Označení konstruktu	Počet aminokyselin	Molekulová hmotnost	Sekvence úseku ASK1
ASK^{46-251}	293	32,1 kDa	L46 – L251
ASK^{46-267}	309	33,8 kDa	L46 – S267
ASK^{46-287}	329	36,3 kDa	L46 – Y287
ASK^{88-251}	251	28,2 kDa	S88 – L251
ASK^{88-267}	267	30,0 kDa	S88 – S267
ASK^{88-287}	287	32,4 kDa	S88 – Y287

Dále je na obrázku 4.7 uvedena úplná sekvence aminokyselin fúzních proteinů získaných transkripcí a následnou translací inzertní sekvence vložené do plasmidu pRSFDuet-1 v bakteriích *E. coli* kmene BL21(DE3).

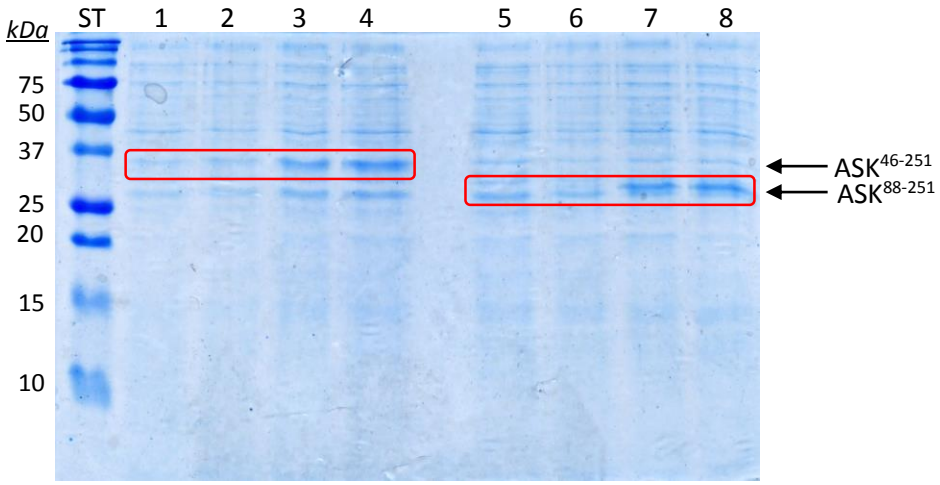
MNSSHHHHHH MQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD
GEWTYDDATK TFTVTENNNN NNNNNNENLY FQGAMGS**LPP PPPGSFWNVE**
SAAAPGIGCP AATSSSSATR GRGSSVGGGS RRTTVAYVIN EASQGQLVVA
ESEALQSLRE ACETVGATLE TLHFGKLDFG ETTVLDRFYN ADIAVVEMSD
AFRQPSLFYH LGVRESFSMA NNIILYCDTN SDSLQSLKEI ICQKNTMCTG
NYTFVPYMIT PHNKVYCCDS SFMKGLTELM QPNFELLLGP ICLPLVDRFI
QLLKVAQASS SQYFRESILN DIRKARNLY

Obr. 4.7: *Sekvence aminokyselin fúzního proteinu ASK1.*
Fúzní protein se skládal z histidinové kotvy (zeleně), GB1 proteinu (červeně), sekvence deseti asparaginových zbytků (modře), TEV štěpného místa (oranžově) a různě dlouhých variant thioredoxin-vazebné domény proteinkinasy ASK1 (**tučně**). Začátek sekvence ASK1 byl buď L46, nebo S88 (**podtrženy**). Sekvence proteinu končila aminokyselinovými zbytky L251, S267 nebo Y287 (šedě).

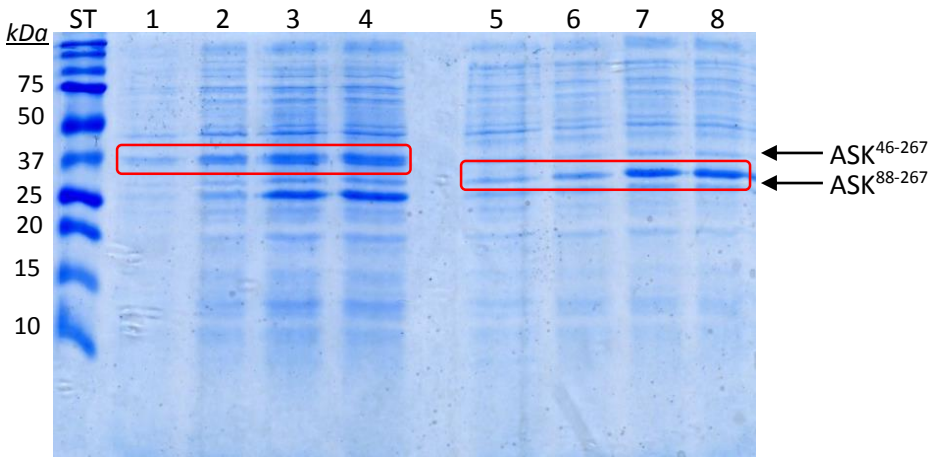
4.2.1 Test exprese šesti konstruktů ASK1

Stejně jako v případě thioredoxinu byla exprese proteinů testována v *E. coli* kmene BL21(DE3). Vzorky byly odebírány těsně před indukcí a poté po 5, 18 a 23 hod. Ke každému odebranému vzorku o objemu 20 µl bylo přidáno 5 µl pufru pro SDS a tato směs byla 1 min inkubována při teplotě 90 °C pro kompletní denaturaci. Standardu migrace (Precision Plus Protein Standards; Dual-color, BIO-RAD) bylo na 15% polyakrylamidový gel nanášeno 12 µl. Elektroforéza probíhala 1,5 hod při konstantním napětí 180 V (obr. 4.8 – 4.10, str. 62 – 63). Migrační zóny byly zviditelněny inkubací v barvícím roztoku obsahující Coomassie brilliant blue R250 (viz tabulka 3.16, str. 46).

Výsledek tohoto testu ukazuje, že po indukci bakterie syntetizovaly požadovaný fúzní protein.

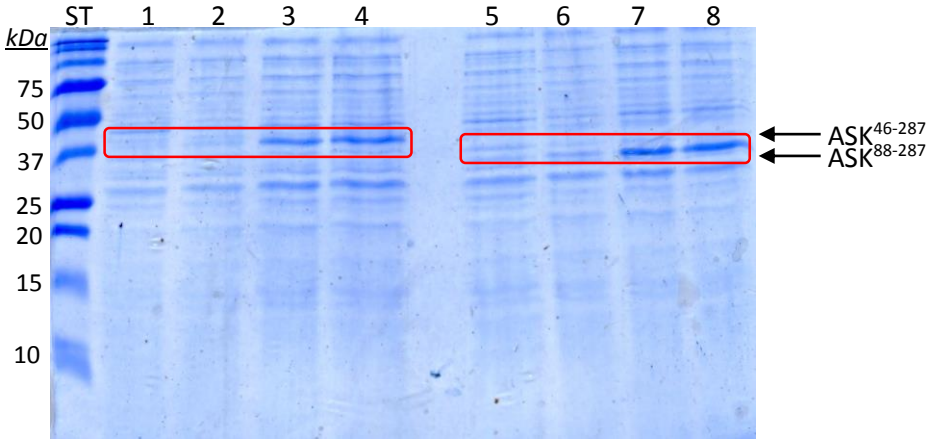


Obr. 4.8: *Expresní test konstruktů ASK$^{46-251}$ a ASK$^{88-251}$.*
Z gelu je zřejmé, jak se po indukci zvyšuje množství produkovaného fúzního proteinu ASK$^{46-251}$ (1-4) a ASK$^{88-251}$ (5-8) s časem. Vzorky byly odebírány těsně před indukcí (1 a 5), po 5 hod (2 a 6), po 18 hod (3 a 7) a nakonec po 23 hod (4 a 8) od indukce.



Obr. 4.9: *Expresní test konstruktů ASK$^{46-267}$ a ASK$^{88-267}$.*

Test exprese konstruktů ASK$^{46-267}$ (1-4) a ASK$^{88-267}$ (5-8) prokázal, že po indukci narůstá množství produkovaného proteinu. Vzorky byly odebírány před indukcí (1 a 5), následně po 5 hod od indukce (2 a 6), po 18 hod (3 a 7) a 23 hod (4 a 8).



Obr. 4.10: *Expresní test konstruktů ASK$^{46-287}$ a ASK$^{88-287}$.*

Exprese konstruktů ASK$^{46-287}$ (1-4) a ASK$^{88-287}$ (5-8) se znatelně zvyšuje po indukci se vzrůstajícím časem. Odběr vzorků byl proveden před indukcí (1 a 5), po 5 hod (2 a 6), po 18 hod (3 a 7) a 23 hod (4 a 8) od indukce.

5 DISKUZE

Proteinkinasa ASK1 zařazovaná do třídy MAP3K (tedy *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), někdy také označována jako MAP3K5, je důležitým členem MAPK signální dráhy. Zapojena je především do buněčné odpovědi na různé formy stresu, jakým je například oxidační stres. Tím pádem se stává také zásadním faktorem při vzniku rakoviny či kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění.

Aktivita ASK1 kinasy je ovlivňována mnoha regulačními prvky, mezi pozitivní modulátory (tedy aktivátory) patří skupina TRAF faktorů, naopak inhibitory (negativními modulátory) jsou proteiny thioredoxin, glutaredoxin a 14-3-3.

Tato práce byla zaměřena na přípravu expresních konstruktů thioredoxinu a thioredoxin-vazebné domény proteinkinasy ASK1 pro strukturní studie. Cílem tedy bylo připravit konstrukty pro expresy proteinů, které by bylo možné vykrystalizovat. V takovém případě je vyžadováno, aby protein měl co nejkompaktnější strukturu s co nejméně flexibilními úseky, díky čemuž by měl snadněji vytvářet krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Zároveň se však protein musí dobře exprimovat, musí být rozpustný a nesmí tvořit agregáty. Proto bylo připraveno několik variant expresních konstruktů, aby bylo možné najít optimální úsek proteinu.

V sekvenci lidské ASK1 však zatím nebylo přesně definováno místo interagující s thioredoxinem, podle předchozích experimentů s různými delečními mutanty (viz [15]) bylo odhaleno, že vazebné místo thioredoxinu se nachází na N-terminální části sekvence ASK1, přibližně v úseku aminokyselin 46-277. Další výzkum (viz [14]) dokonce přinesl predikci struktury vazebného místa, ta zatím však nebyla potvrzena dalšími strukturními studiemi (rentgenová krystalografie nebo NMR – nukleární magnetická rezonance). Z této predikce se však přesto vycházelo při navrhování nových expresních konstruktů, kdy je výhodné, jestliže zkrácením sekvence zkoumané oblasti není narušena sekundární struktura α-helixu nebo β-skládaného listu. Sekvence je tedy vždy pokud možno ukončována v oblasti smyčky nebo úseku bez definované sekundární struktury. S tímto vědomím bylo navrženo a následně připraveno šest různých konstruktů thioredoxin-vazebné domény ASK1, lišící se jak na N konci, tak i na C konci sekvence.

Zmíněných šest variant expresních konstruktů lidské proteinkinasy ASK1 bylo připraveno cílenou mutagenesí pomocí metody PCR. Na třech různých místech v sekvenci DNA tak byla provedena záměna tripletu nukleotidů kódující určitou aminokyselinu za terminační triplet, čímž byl zkrácen úsek přepisovaný do proteinu. Sekvenční analýzou připravených konstruktů bylo zkontrolováno, zda při mutagenesi došlo pouze k potřebným změnám vybraných tripletů a neobjevily se nežádoucí náhodné mutace v celém úseku, který kóduje fúzní protein. Vybrané expresní konstrukty byly transformovány do bakterií *E. coli* kmene DH5α, kde byla otestována jejich exprese, a následně do kmene BL21(DE3) pro vytvoření zásobních glycerolových roztoků.

Jedním z inhibitorů kinasy ASK1 je již výše zmiňovaný thioredoxin. Dalším cílem této práce byla proto příprava expresního konstruktu lidského thioredoxinu 1, tedy cytosolární formy. Thioredoxin se řadí mezi dobře prozkoumané proteiny se známou strukturou vyřešenou krystalografickými i NMR studiemi. Úkolem tak bylo pouze přenesení kódující sekvence DNA do požadovaného expresního vektoru následované vnesením TEV štěpného místa před sekvenci kódující thioredoxin využitím metody PCR a následné ligace lineárních úseků DNA. V původním konstruktu se před sekvencí thioredoxinu nacházelo thrombinové štěpné místo. Thrombin má však nižší specifitu než TEV proteasa. Navíc je thrombin isolován z lidské krevní plazmy a práce s ním je tedy řazena do kategorie biohazardu. Další výhodou TEV je i možnost připravit tuto proteasu v laboratoři, čímž se stává mnohem levnější než použití komerčně dostupného thrombinu.

Připravený konstrukt byl následně transformován do bakterií *E. coli* kmene DH5α, pro kontrolu exprese fúzního proteinu, a poté do kmene BL21(DE3) pro vytvoření zásobních glycerolových roztoků.

6 ZÁVĚR

- Byl připraven expresní konstrukt lidského thioredoxinu 1 v plasmidu pET-15b obsahující N-terminální histidinovou kotvu odštěpitelnou TEV proteasou.
    - Funkčnost konstruktu byla ověřena testem exprese.

- Bylo připraveno šest různých expresních konstruktů thioredoxin-vazebné domény lidské proteinkinasy ASK1 (ASK^{46-251}, ASK^{46-267}, ASK^{46-277}, ASK^{88-251}, ASK^{88-267} a ASK^{88-277}).
    - Funkčnost konstruktů byla ověřena testem exprese.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

[1] Nagata, S.: *Curr. Bio.*, 6, 1241-1243 (1996)

[2] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.: *Br. J. Cancer*, 26, 239-257 (1972)

[3] Apoptosa, nekrosa: http://es.slideshare.net/ayquinax/necrosis-y-apoptosis (2.5.2015)

[4] Cohen, P.: *Trends Biochem. Sci.*, 25, 596-601 (2000)

[5] Cieśla, J., Frączyk, T., Rode, W.: *Acta Biochim. Pol.*, 58, 137-148 (2011)

[6] Serin, fosfoserin: http://www.swisssidechain.ch/browse/family/table.php?family=serine (2.5.2015)

[7] Shiizaki, S., Naguro, I., Ichijo, H.: *Adv. Biol. Regul.*, 53, 135-144 (2012)

[8] Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H.: *J. Biochem.*, 136, 261-265 (2004)

[9] Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H.: *Semin. Cancer Biol.*, 16, 427-435 (2006)

[10] Ichijo, H.: *Oncogene*, 18, 6087-6093 (1999)

[11] Zhang, R., Luo, D., Miao, R., Bai, L., Ge, Q., Sessa, W.C., Min, W.: *Oncogene*, 24, 3954-3963 (2005)

[12] Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H.: *EMBO J.*, 17, 2596-2606 (1998)

[13] Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S.A., Zhang, H., Min, W., Turk, B.E., Knapp, S.: *Structure*, 15, 1215-1226 (2007)

[14] Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezabkova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T.: *J. Biol. Chem.*, 289, 24463-24474 (2014)

[15] Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., Ichijo, H.: *Mol. Cell Biol.*, 27, 8152-8163 (2007)

[16] Lu, J., Holmgren, A.: *Free Radic. Biol. Med.*, 66, 75-87 (2014)

[17] Cheng, Z., Zhang, J., Ballou, D.P., Williams, C.H. Jr.: *Chem. Rev.*, 111, 5768-5783 (2011)

[18] Arnér, E.S.J., Holmgren, A.: *Eur. J. Biochem.*, 267, 6102-6109 (2000)

[19] Andersen, J.F., Sanders, D.A.R., Gasdaska, J.R., Weichsel, A., Powis, G., Montfort, W.R.: *Biochemistry*, 36, 13979-13988 (1997)

[20] Weischel, A., Kem, M., Montfort, W.R.: *Protein Sci.*, 19, 1801-1806 (2010)

[21] Holmgren, A.: *Structure*, 3, 239-243 (1995)

[22] Vector pQE-30: http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pQE_vectors/pQE-30_map.pdf (3.5.2015)

[23] Addgene Vector Database, vector pET-15b: https://www.addgene.org/vector-database/2543/ (3.5.2015)

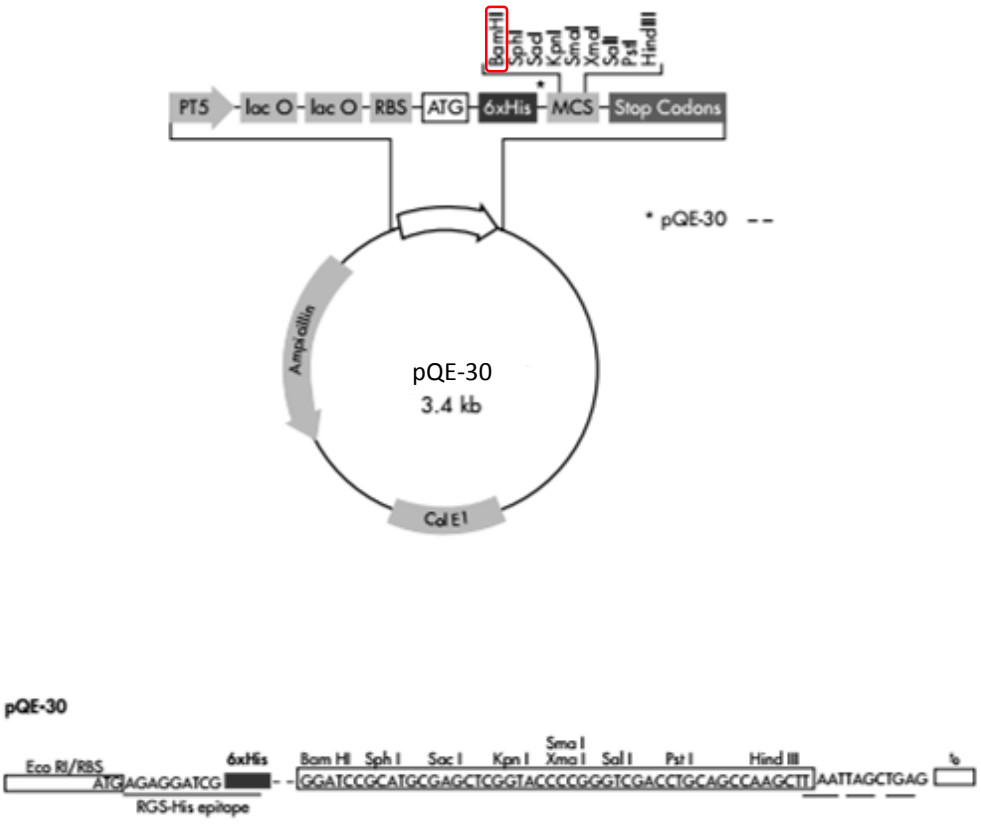
[24] Database UniProt: http://www.uniprot.org/ (10.9.2014)

[25] Vector pRSFuet-1: http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pRSF_vectors/pRSFDuet-1_map.pdf (20.5.2015)

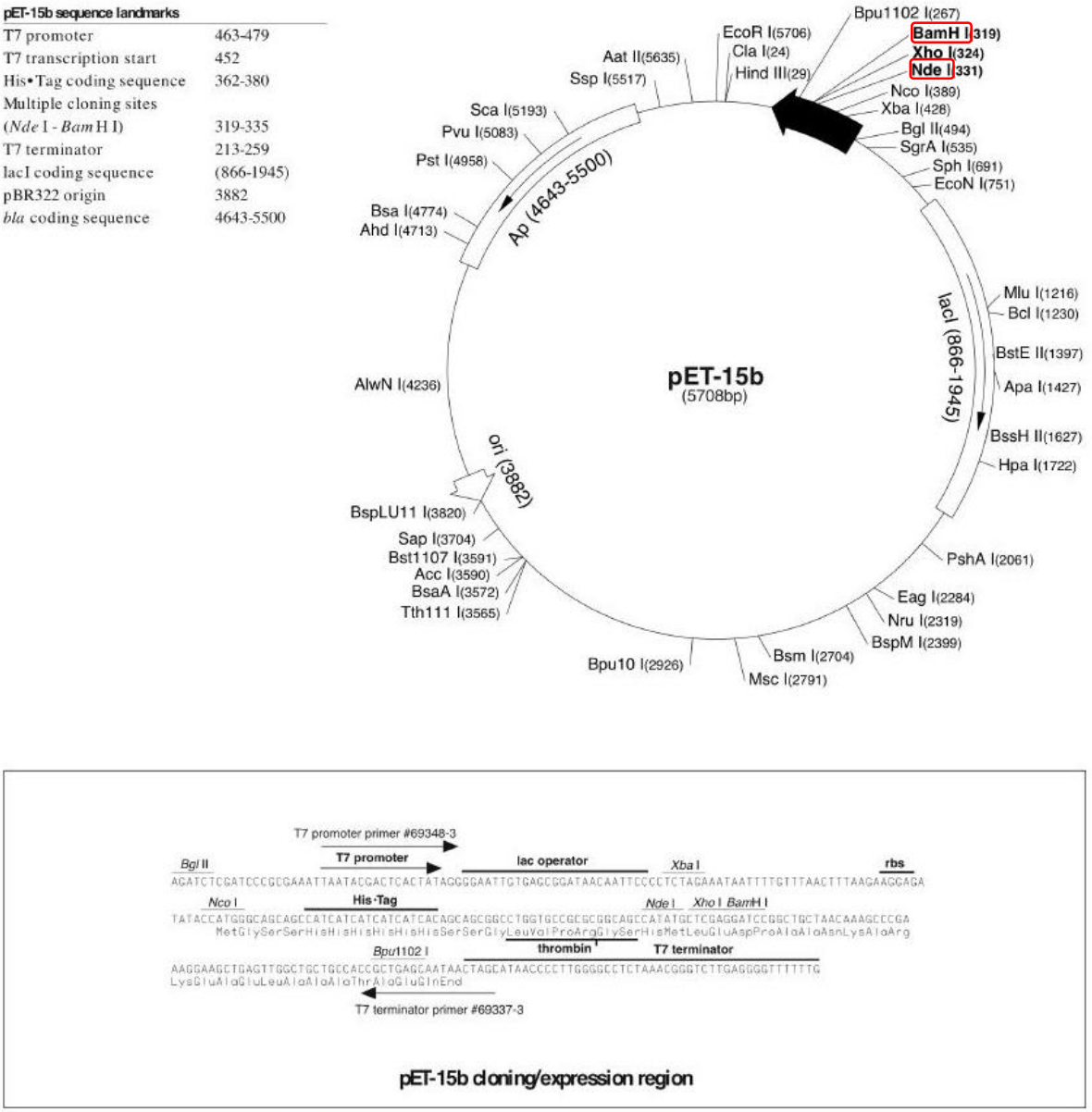
[26] Predikce sekundární struktury programem PSIpred: http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/27f1b1dc-f554-11e4-8d2e-00163e110593 (8.5.2015)

PŘÍLOHY

Positions of elements in bases	pQE-30
Vector size (bp)	3461
Start of numbering at *Xho*I (CTCGAG)	1–6
T5 promoter/lac operator element	7–87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127–144
Multiple cloning site	145–192
Lambda t_0 transcriptional termination region	208–302
rrnB T1 transcriptional termination region	1064–1162
ColE1 origin of replication	1638
β-lactamase coding sequence	3256–2396



Obr. P1: *Plasmid pQE-30.*
Mapa plasmidu pQE-30, ve kterém se nacházela sekvence kódující thioredoxin. Zvýrazněno je restrikční místo použité pro linearizaci plasmidu. Obrázek byl přejat z webových stránek německého výzkumného centra Helmholtz Zentrum München. Upraveno dle [22].



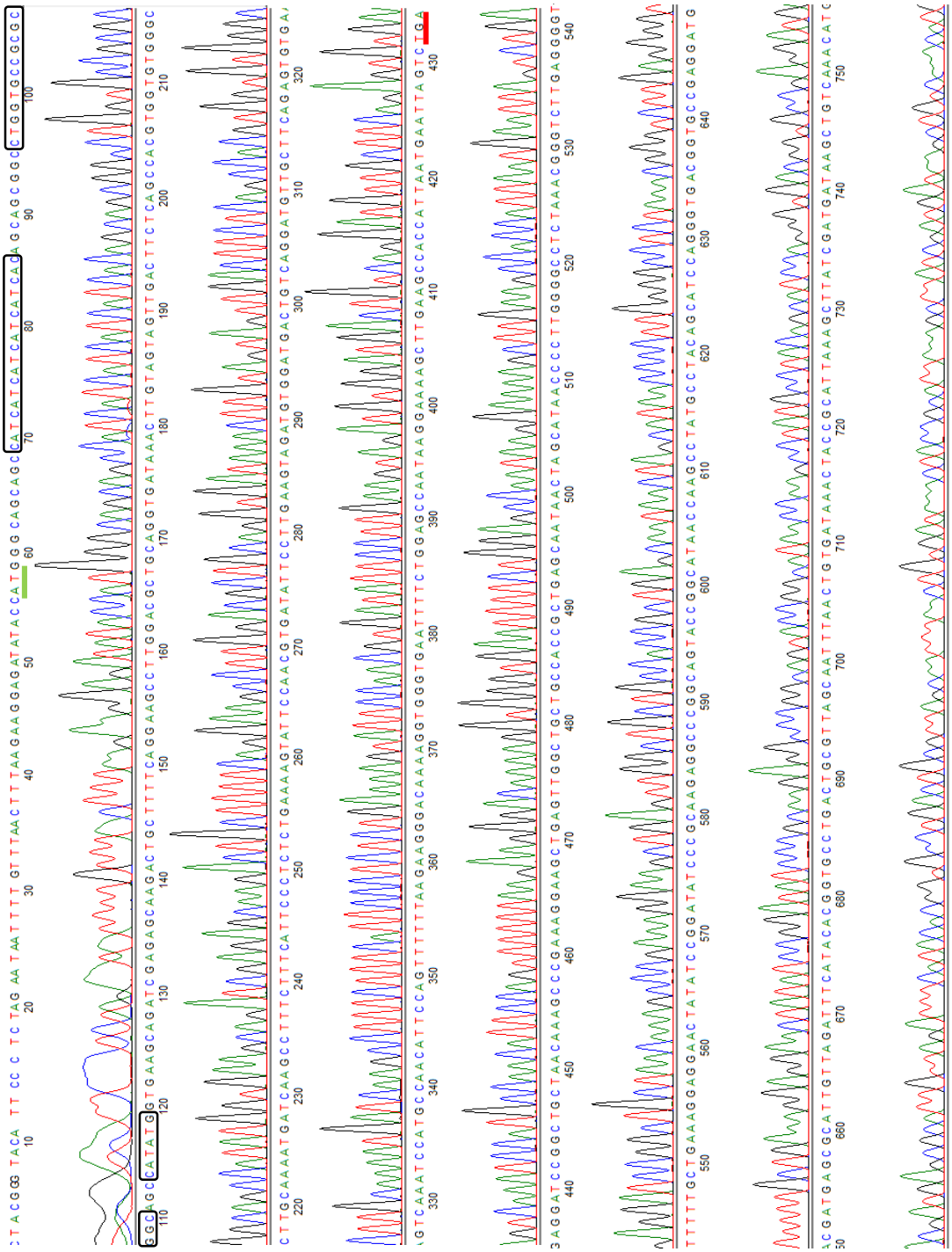
Obr. P2: *Plasmid pET-15b.*

Mapa plasmidu pET-15b s vyznačenými restrikčními místy, mezi něž byla vložena sekvence pro thioredoxin. Obrázek je výstupem z databáze vektorů neziskové organizace Addgene. Upraveno dle [23].

Příloha A: *Sekvence thioredoxinu (C73S mutant).*

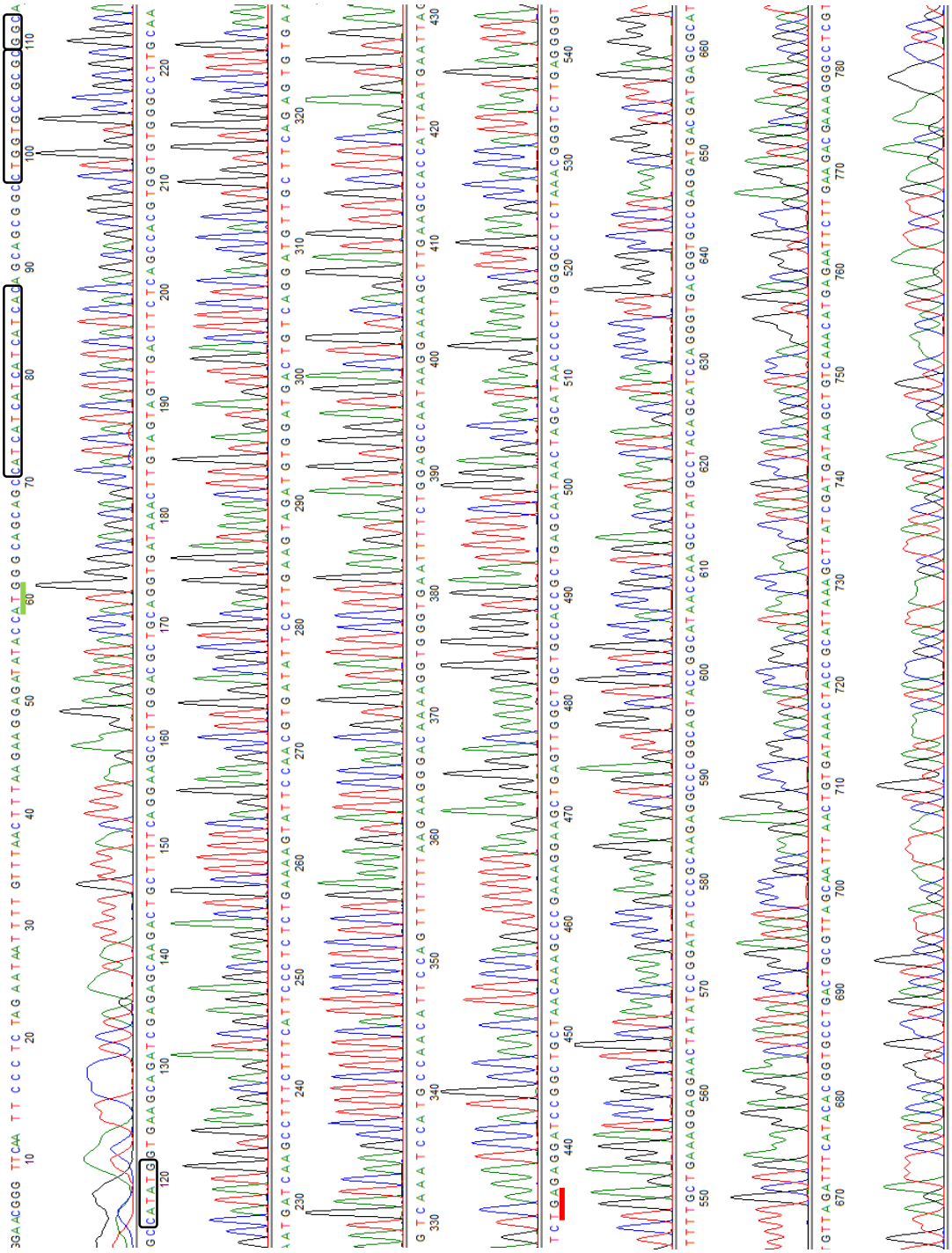
Zvýrazněn je S73, který nahrazuje přirozený C73. Tato mutace zabraňuje tvorbě dimerů thioredoxinu. Upraveno dle [24].

```
atggtgaagcagatcgagagcaagactgcttttcaggaagccttggacgctgcaggtgat
 M  V  K  Q  I  E  S  K  T  A  F  Q  E  A  L  D  A  A  G  D   20

aaacttgtagtagttgacttctcagccacgtggtgtgggccttgcaaaatgatcaagcct
 K  L  V  V  V  D  F  S  A  T  W  C  G  P  C  K  M  I  K  P   40

ttctttcattccctctctgaaaagtattccaacgtgatattccttgaagtagatgtggat
 F  F  H  S  L  S  E  K  Y  S  N  V  I  F  L  E  V  D  V  D   60

gactgtcaggatgttgcttcagagtgtgaagtcaaatccatgccaacattccagttttt
 D  C  Q  D  V  A  S  E  C  E  V  K  S  M  P  T  F  Q  F  F   80

aagaagggacaaaaggtgggtgaattttctggagccaataaggaaaagcttgaagccacc
 K  K  G  Q  K  V  G  E  F  S  G  A  N  K  E  K  L  E  A  T  100

attaatgaattagtctga
 I  N  E  L  V  -
```



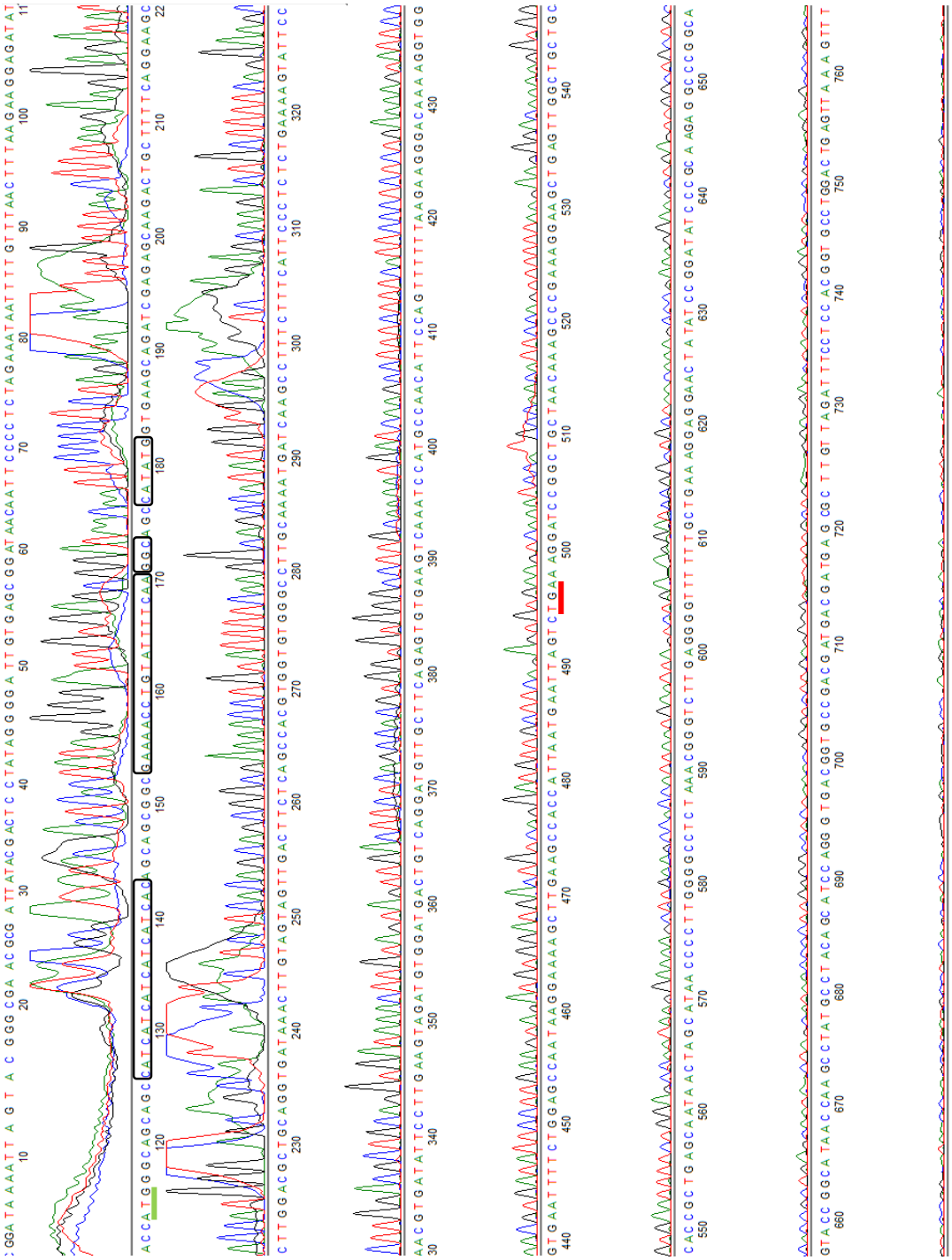
Obr. P3a: *Výsledky sekvenční analýzy po ligaci thioredoxinu do plasmidu pET-15b (kolonie č. 8).*

V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: histidinová kotva (69-86), thrombinové štěpné místo (96-110), restrikční místo NdeI (114-119), thioredoxin (117-431). Zeleně je podtržen triplet start kodónu sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, červeně je podtržen stop kodón. Do proteinu je tak přepsán úsek 57-431.



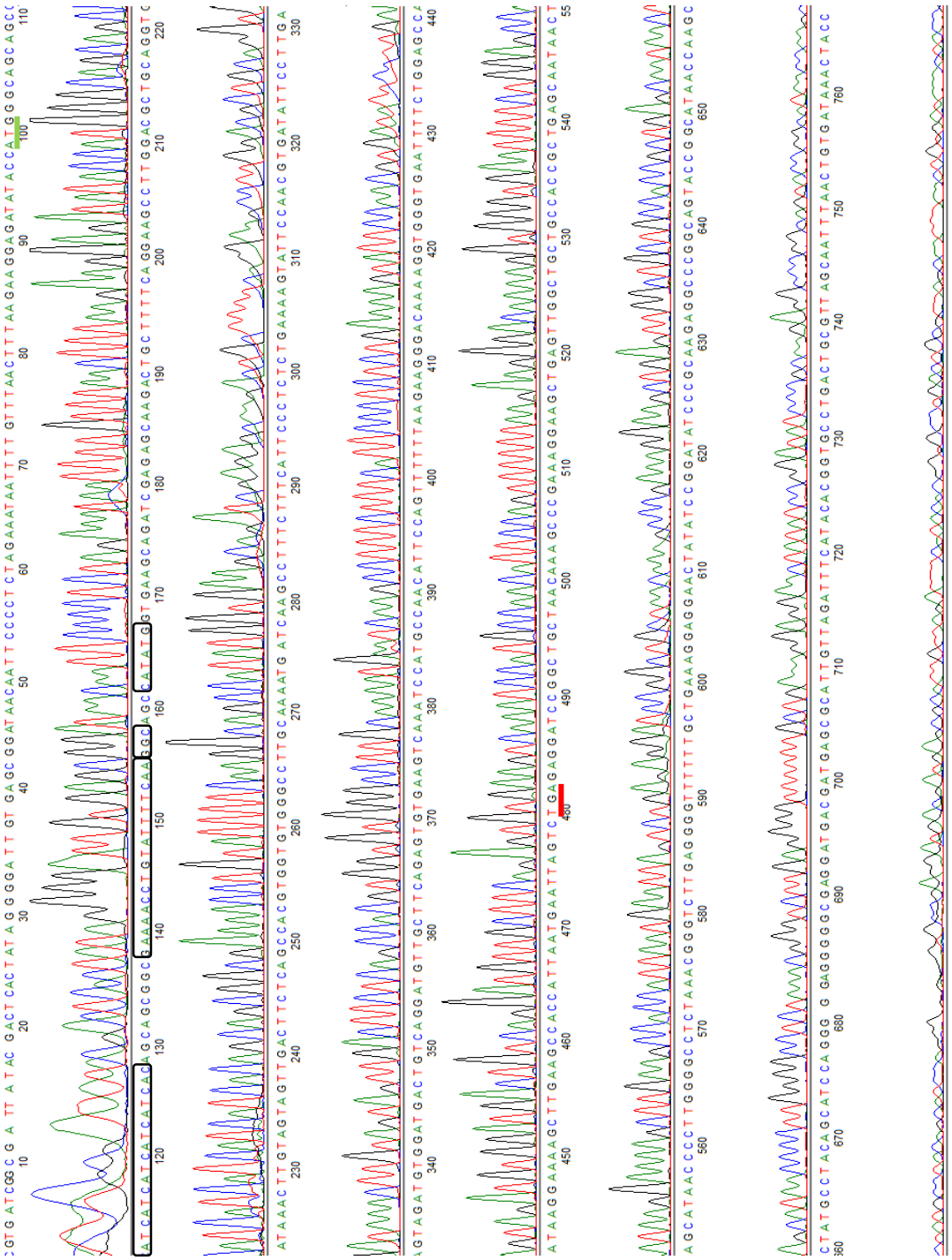
Obr. P3b: *Výsledky sekvenční analýzy po ligaci thioredoxinu do plasmidu pET-15b (kolonie č. 10).*

V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: histidinová kotva (71-88), thrombinové štěpné místo (98-112), restrikční místo NdeI (116-121), thioredoxin (119-433). Zeleně je podtržen triplet start kodónu sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, červeně je podtržen stop kodón. Do proteinu je tak přepsán úsek 59-433.

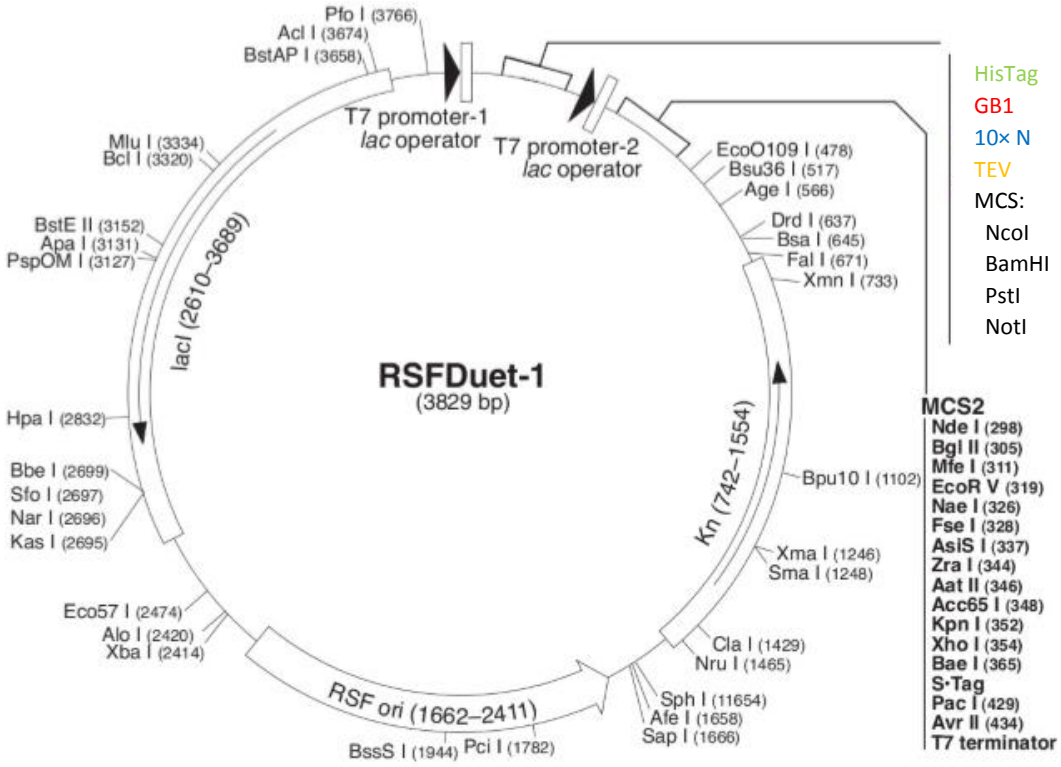


Obr. P4a: *Výsledky sekvenční analýzy mutace štěpného místa TEV (1. kolonie).*

V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: histidinová kotva (126-143), TEV štěpné místo (153-173), restrikční místo NdeI (177-182), thioredoxin (180-494). Zeleně je podtržen triplet start kodónu sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, červeně je podtržen stop kodón. Do proteinu je tak přepsán úsek 114-494.



Obr. P4b: *Výsledky sekvenční analýzy mutace štěpného místa TEV (2. kolonie).*
V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: histidinová kotva (111-128), TEV štěpné místo (138-158), restrikční místo NdeI (162-167), thioredoxin (165-479). Zeleně je podtržen triplet start kodónu sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, červeně je podtržen stop kodón. Do proteinu je tak přepsán úsek 99-479.



Obr. P5: *Plasmid pRSFDuet-1*.
Mapa plasmidu pRSFDuet-1, v němž byla vložena sekvence N-terminálního úseku ASK1. Upraveno dle [25].

Příloha B: *Sekvence ASK1.*

Zkoumaná oblast proteinu (úsek aminokyselin 46 – 287) je označena tučně. Kompletní sekvence lidské ASK1 je složena z 1374 aminokyselin. Upraveno dle [24].

atgagcacggaggcggacgagggcatcactttctctgtgccacccttcgccccctcgggc
M S T E A D E G I T F S V P P F A P S G 20

ttctgcaccatccccgagggcggcatctgcaggaggggaggagcggcggcggtgggcgag
F C T I P E G G I C R R G G A A A V G E 40

ggcgaggagcaccag**ctgccaccgccgccgccgggcagcttctggaacgtggagagcgcc**
G E E H Q **L P P P P P G S F W N V E S A** 60

gctgcccctggcatcggttgtccggcggccacctcctcgagcagtgccacccgaggccgg
A A P G I G C P A A T S S S S A T R G R 80

ggcagctctgttggcgggggcagccgacggaccacggtggcatatgtgatcaacgaagcg
G S S V G G G S R R T T V A Y V I N E A 100

agccaagggcaactggtggtggccgagagcgaggccctgcagagcttgcgggaggcgtgc
S Q G Q L V V A E S E A L Q S L R E A C 120

gagacagtgggcgccaccctggaaaccctgcattttgggaaactcgactttggagaaacc
E T V G A T L E T L H F G K L D F G E T 140

accgtgctggaccgcttttacaatgcagatattgcggtggtggagatgagcgatgccttc
T V L D R F Y N A D I A V V E M S D A F 160

cggcagccgtccttgttttaccaccttggggtgagagaaagtttcagcatggccaacaac
R Q P S L F Y H L G V R E S F S M A N N 180

atcatcctctactgtgatactaactcggactctctgcagtcactgaaggaaataatttgc
I I L Y C D T N S D S L Q S L K E I I C 200

cagaagaatactatgtgcactgggaactacacctttgttccttacatgataactccacat
Q K N T M C T G N Y T F V P Y M I T P H 220

aacaaagtctactgctgtgacagcagcttcatgaaggggttgacagagctcatgcaaccg
N K V Y C C D S S F M K G L T E L M Q P 240

aacttcgagctgcttcttggacccatctgcttacctcttgtggatcgttttattcaactt
N F E L L L G P I C L P L V D R F I Q L 260

ttgaaggtggcacaagcaagttctagccagtacttccgggaatctatactcaatgacatc
L K V A Q A S S S Q Y F R E S I L N D I 280

aggaaagctcgtaatttatacactggtaaagaattggcagctgagttggcaagaattcgg
R K A R N L Y T G K E L A A E L A R I R 300

cagcgagtagataatatcgaagtcttgacagcagatattgtcataaatctgttactttcc
Q R V D N I E V L T A D I V I N L L L S 320

```
tacagagatatccaggactatgattctattgtgaagctggtagagactttagaaaaactg
 Y  R  D  I  Q  D  Y  D  S  I  V  K  L  V  E  T  L  E  K  L  340

ccaacctttgatttggcctcccatcaccatgtgaagtttcattatgcatttgcactgaat
 P  T  F  D  L  A  S  H  H  H  V  K  F  H  Y  A  F  A  L  N  360

aggagaaatctccctggtgacagagcaaaagctcttgatattatgattcccatggtgcaa
 R  R  N  L  P  G  D  R  A  K  A  L  D  I  M  I  P  M  V  Q  380

agcgaaggacaagttgcttcagatatgtattgcctagttggtcgaatctacaaagatatg
 S  E  G  Q  V  A  S  D  M  Y  C  L  V  G  R  I  Y  K  D  M  400

tttttggactctaatttcacggacactgaaagcagagaccatggagcttcttggttcaaa
 F  L  D  S  N  F  T  D  T  E  S  R  D  H  G  A  S  W  F  K  420

aaggcatttgaatctgagccaacactacagtcaggaattaattatgcggtcctcctcctg
 K  A  F  E  S  E  P  T  L  Q  S  G  I  N  Y  A  V  L  L  L  440

gcagctggacaccagtttgaatcttcctttgagctccggaaagttggggtgaagctaagt
 A  A  G  H  Q  F  E  S  S  F  E  L  R  K  V  G  V  K  L  S  460

agtcttcttggtaaaaagggaaacttggaaaaactccagagctactgggaagttggattt
 S  L  L  G  K  K  G  N  L  E  K  L  Q  S  Y  W  E  V  G  F  480

tttctgggggccagcgtcctagccaatgaccacatgagagtcattcaagcatctgaaaag
 F  L  G  A  S  V  L  A  N  D  H  M  R  V  I  Q  A  S  E  K  500

ctttttaaactgaagacaccagcatggtacctcaagtctattgtagagacaattttaata
 L  F  K  L  K  T  P  A  W  Y  L  K  S  I  V  E  T  I  L  I  520

tataagcattttgtgaaactgaccacagaacagcctgtggccaagcaagaacttgtggac
 Y  K  H  F  V  K  L  T  T  E  Q  P  V  A  K  Q  E  L  V  D  540

ttttggatggatttcctggtcgaggccacaaagacagatgttactgtggttaggtttcca
 F  W  M  D  F  L  V  E  A  T  K  T  D  V  T  V  V  R  F  P  560

gtattaatattagaaccaaccaaaatctatcaaccttcttatttgtctatcaacaatgaa
 V  L  I  L  E  P  T  K  I  Y  Q  P  S  Y  L  S  I  N  N  E  580

gttgaggaaaagacaatctctatttggcacgtgcttcctgatgacaagaaaggtatacat
 V  E  E  K  T  I  S  I  W  H  V  L  P  D  D  K  K  G  I  H  600

gagtggaattttagtgcctcttctgtcaggggagtgagtatttctaaatttgaagaaaga
 E  W  N  F  S  A  S  S  V  R  G  V  S  I  S  K  F  E  E  R  620

tgctgctttctttatgtgcttcacaattctgatgatttccaaatctatttctgtacagaa
 C  C  F  L  Y  V  L  H  N  S  D  D  F  Q  I  Y  F  C  T  E  640

cttcattgtaaaaagtttttgagatggtgaacaccattaccgaagagaaggggagaagc
 L  H  C  K  K  F  F  E  M  V  N  T  I  T  E  E  K  G  R  S  660

acagaggaaggagactgtgaaagtgacttgctggagtatgactatgaatatgatgaaaat
 T  E  E  G  D  C  E  S  D  L  L  E  Y  D  Y  E  Y  D  E  N  680
```

ggtgacagagtcgttttaggaaaaggcacttatgggatagtctacgcaggtcgggacttg
G D R V V L G K G T Y G I V Y A G R D L 700

agcaaccaagtcagaattgctattaaggaaatcccagagagagacagcagatactctcag
S N Q V R I A I K E I P E R D S R Y S Q 720

cccctgcatgaagaaatagcattgcataaacacctgaagcacaaaaatattgtccagtat
P L H E E I A L H K H L K H K N I V Q Y 740

ctgggctctttcagtgagaatggtttcattaaaatcttcatggagcaggtccctggagga
L G S F S E N G F I K I F M E Q V P G G 760

agtctttctgctctccttcgttccaaatggggtccattaaaagacaatgagcaaacaatt
S L S A L L R S K W G P L K D N E Q T I 780

ggcttttatacaaagcaaatactggaaggattaaaatatctccatgacaatcagatagtt
G F Y T K Q I L E G L K Y L H D N Q I V 800

caccgggacataaagggtgacaatgtgttgattaatacctacagtggtgttctcaagatc
H R D I K G D N V L I N T Y S G V L K I 820

tctgacttcggaacatcaaagaggcttgctggcataaacccctgtactgaaacttttact
S D F G T S K R L A G I N P C T E T F T 840

ggtaccctccagtatatggcaccagaaataatagataaaggaccaagaggctacggaaaa
G T L Q Y M A P E I I D K G P R G Y G K 860

gcagcagacatctggtctctgggctgtacaatcattgaaatggccacaggaaaaccccca
A A D I W S L G C T I I E M A T G K P P 880

ttttatgaactgggagaaccacaagcagctatgttcaaggtgggaatgtttaaagtccac
F Y E L G E P Q A A M F K V G M F K V H 900

cctgagatcccagagtccatgtctgcagaggccaaggcattcatactgaaatgttttgaa
P E I P E S M S A E A K A F I L K C F E 920

ccagatcctgacaagagagcctgtgctaacgacttgcttgttgatgagttttaaaagtt
P D P D K R A C A N D L L V D E F L K V 940

tcaagcaaaaagaaaaagacacaacctaagctttcagctctttcagctggatcaaatgaa
S S K K K K T Q P K L S A L S A G S N E 960

tatctcaggagtatatccttgccggtacctgtgctggtggaggacaccagcagcagcagt
Y L R S I S L P V P V L V E D T S S S S 980

gagtacggctcagtttcacccgacacggagttgaaagtggacccctctctctttcaaaaca
E Y G S V S P D T E L K V D P F S F K T 1000

agagccaagtcctgcggagaaagagatgtcaagggaattcggacactctttttgggcatt
R A K S C G E R D V K G I R T L F L G I 1020

ccagatgagaattttgaagatcacagtgctcctccttcccctgaagaaaaagattctgga
P D E N F E D H S A P P S P E E K D S G 1040

ttcttcatgctgaggaaggacagtgagaggcgagctacccttcacaggatcctgacggaa
F F M L R K D S E R R A T L H R I L T E 1060

gaccaagacaaaattgtgagaaacctaatggaatctttagctcaggggctgaagaaccg
D Q D K I V R N L M E S L A Q G A E E P 1080

aaactaaaatgggaacacatcacaaccctcattgcaagcctcagagaatttgtgagatcc
K L K W E H I T T L I A S L R E F V R S 1100

actgaccgaaaaatcatagccaccacactgtcaaagctgaaactggagctggacttcgac
T D R K I I A T T L S K L K L E L D F D 1120

agccatggcattagccaagtccaggtggtactctttggttttcaagatgctgtcaataaa
S H G I S Q V Q V V L F G F Q D A V N K 1140

gttcttcggaatcataacatcaagccgcactggatgtttgccttagacagtatcattcgg
V L R N H N I K P H W M F A L D S I I R 1160

aaggcggtacagacagccattaccatcctggttccagaactaaggccacatttcagcctt
K A V Q T A I T I L V P E L R P H F S L 1180

gcatctgagagtgatactgctgatcaagaagacttggatgtagaagatgaccatgaggaa
A S E S D T A D Q E D L D V E D D H E E 1200

cagccttcaaatcaaactgtccgaagacctcaggctgtcattgaagatgctgtggctacc
Q P S N Q T V R R P Q A V I E D A V A T 1220

tcaggcgtgagcacgctcagttctactgtgtctcatgattcccagagtgctcaccggtca
S G V S T L S S T V S H D S Q S A H R S 1240

ctgaatgtacagcttggaaggatgaaaatagaaaccaatagattactggaagaattggtt
L N V Q L G R M K I E T N R L L E E L V 1260

cggaaagagaaagaattacaagcactccttcatcgagctattgaagaaaaagaccaagaa
R K E K E L Q A L L H R A I E E K D Q E 1280

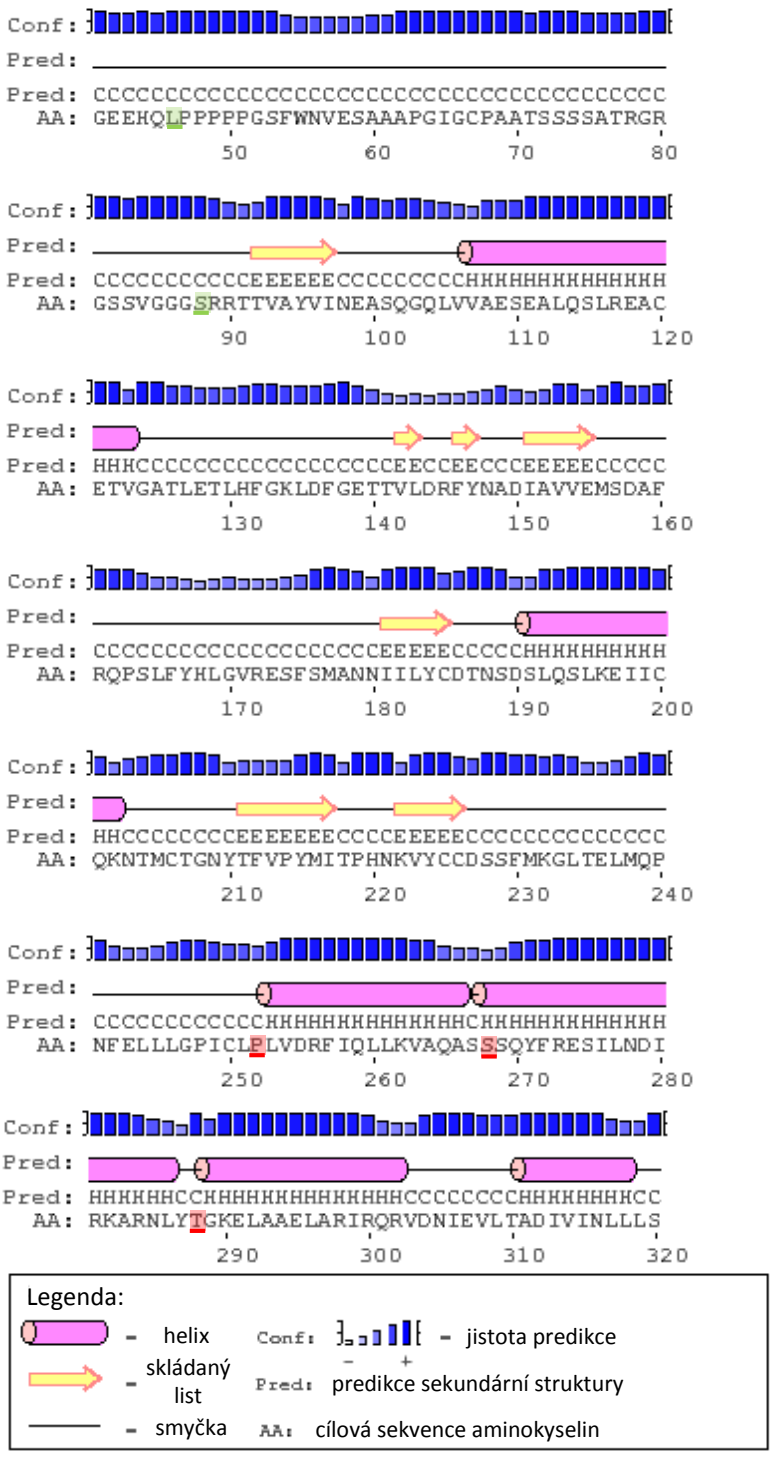
attaaacacctgaagcttaagtcccaacccatagaaattcctgaattgcctgtatttcat
I K H L K L K S Q P I E I P E L P V F H 1300

ctaaattcttctggcacaaatactgaagattctgaacttaccgactggctgagagtgaat
L N S S G T N T E D S E L T D W L R V N 1320

ggagctgatgaagacactataagccggttttggctgaagattatacactattggatgtt
G A D E D T I S R F L A E D Y T L L D V 1340

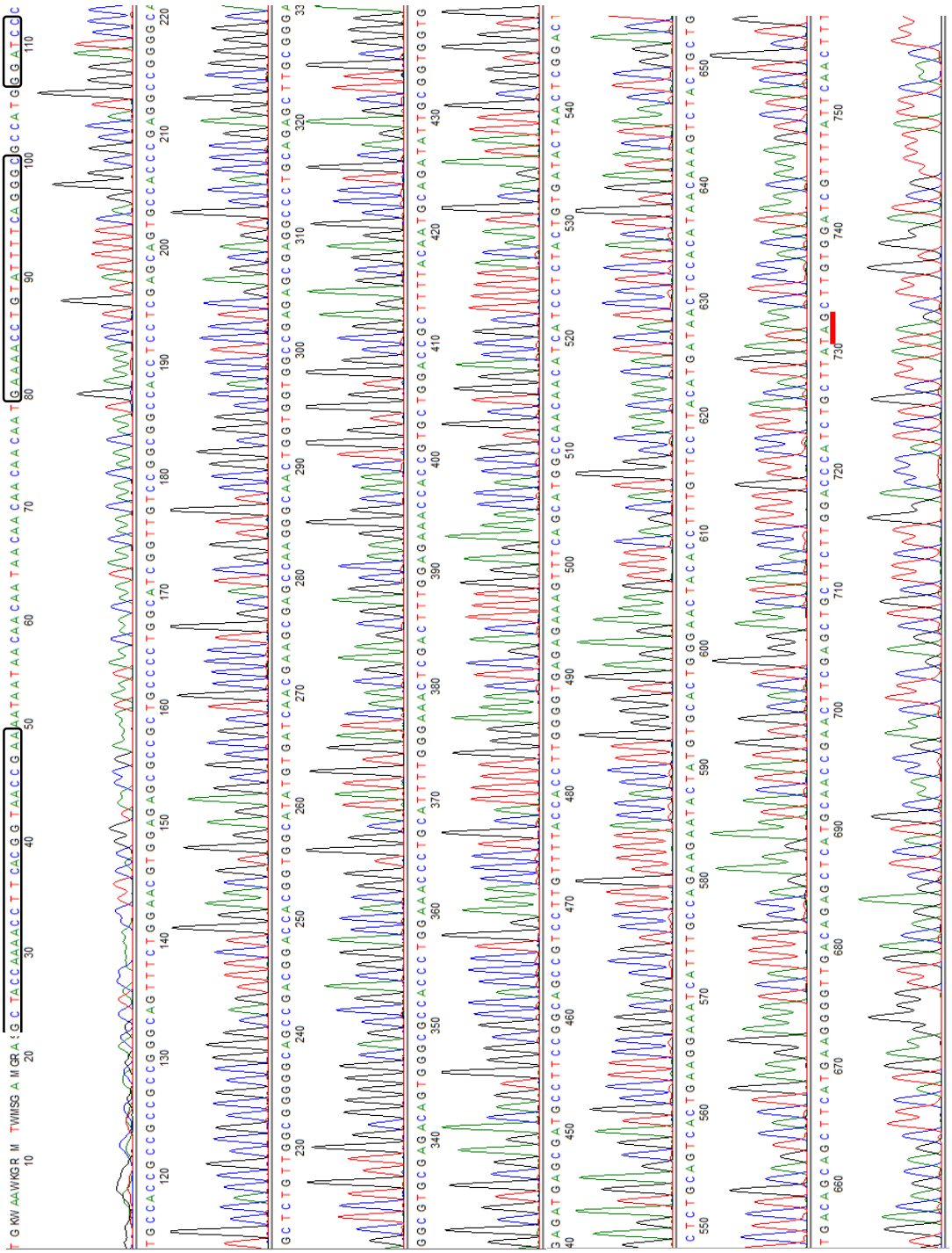
ctctactatgttacacgtgatgacttaaaatgcttgagactaaggggagggatgctgtgc
L Y Y V T R D D L K C L R L R G G M L C 1360

acactgtggaaggctatcattgactttcgaaacaaacagacttga
T L W K A I I D F R N K Q T -



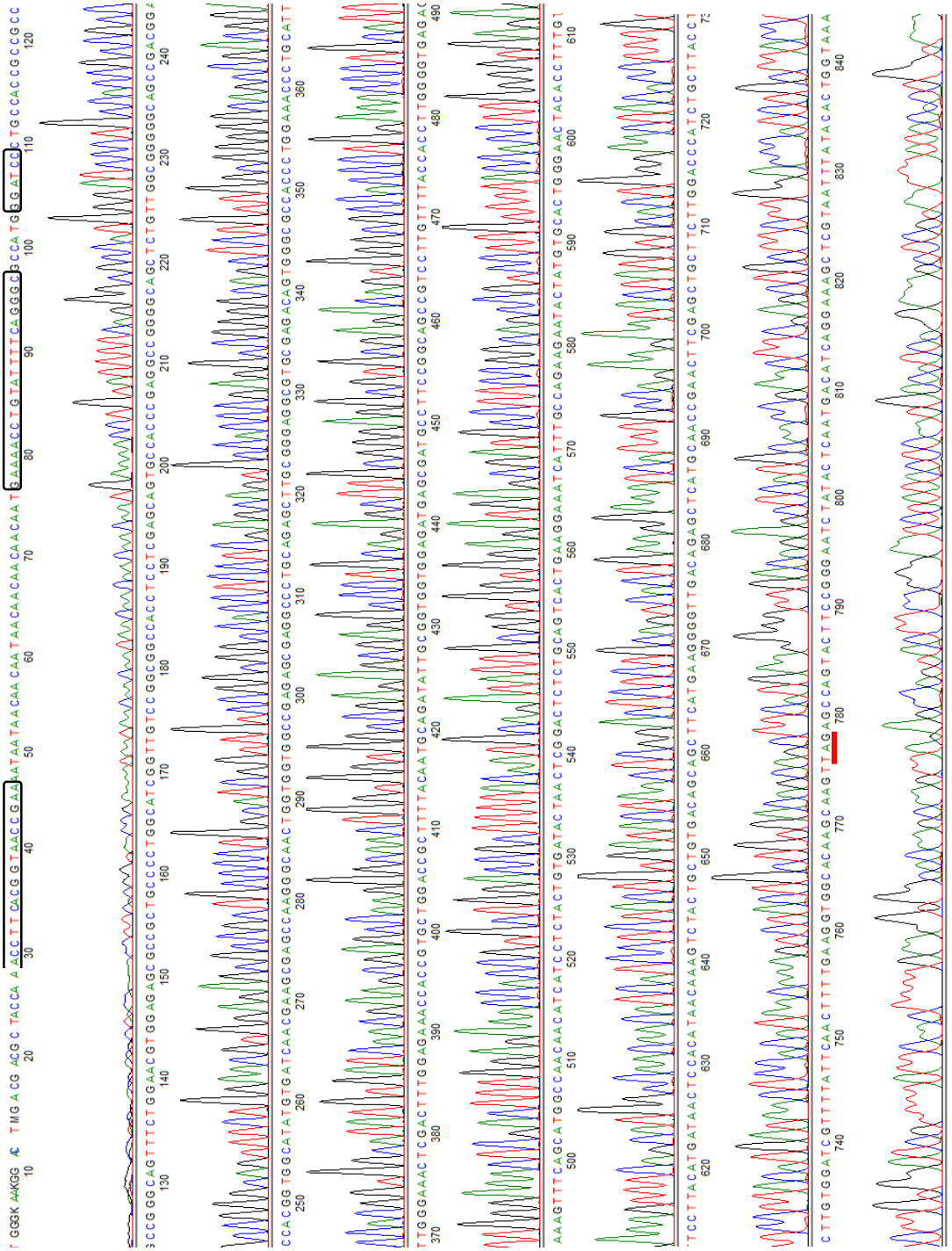
Obr. P6: *Predikce sekundární struktury zkoumaného úseku lidské ASK1.*

K predikci sekundární struktury úseku ASK1 v rozsahu aminokyselin 41-320 byl použit program PSIpred. Zeleně jsou vyznačeny aminokyseliny, jimiž začíná sekvence ASK1 v připravovaných expresních konstruktech. Červeně jsou označeny aminokyseliny, jejichž triplety byly v kódující DNA nahrazeny stop kodóny. Upraveno dle [26].

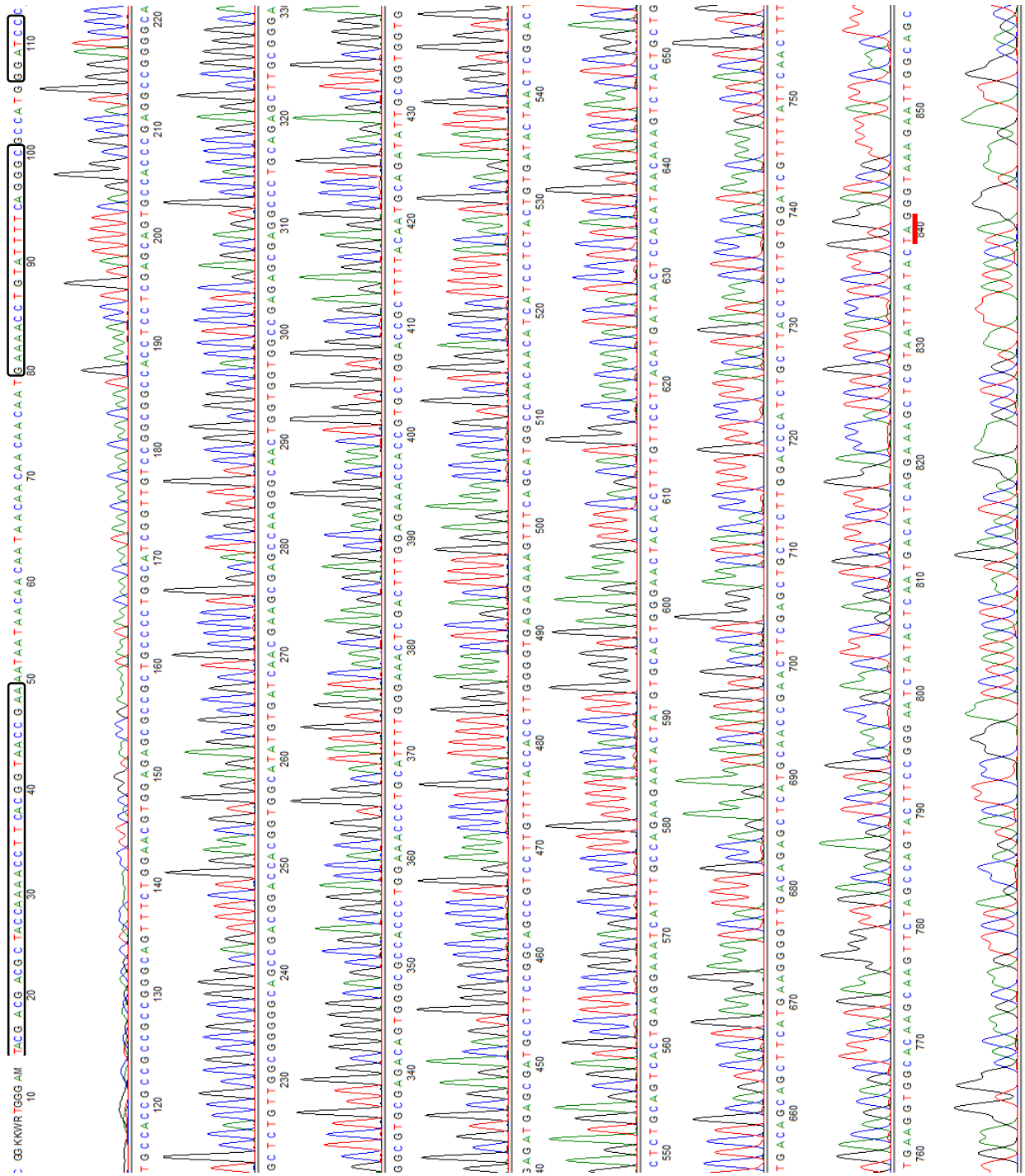


Obr. P7a: *Výsledky sekvenční analýzy zkrácených konstruktů ASK1 (ASK$^{46-251}$).*

V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: C koncová část sekvence GB1 proteinu (23-49), TEV štěpné místo (80-100), restrikční místo BamHI (107-112). Červeně je podtržen stop kodón sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, do proteinu je tak přepsán úsek začínající mimo sekvenovanou oblast po nukleotid 730.

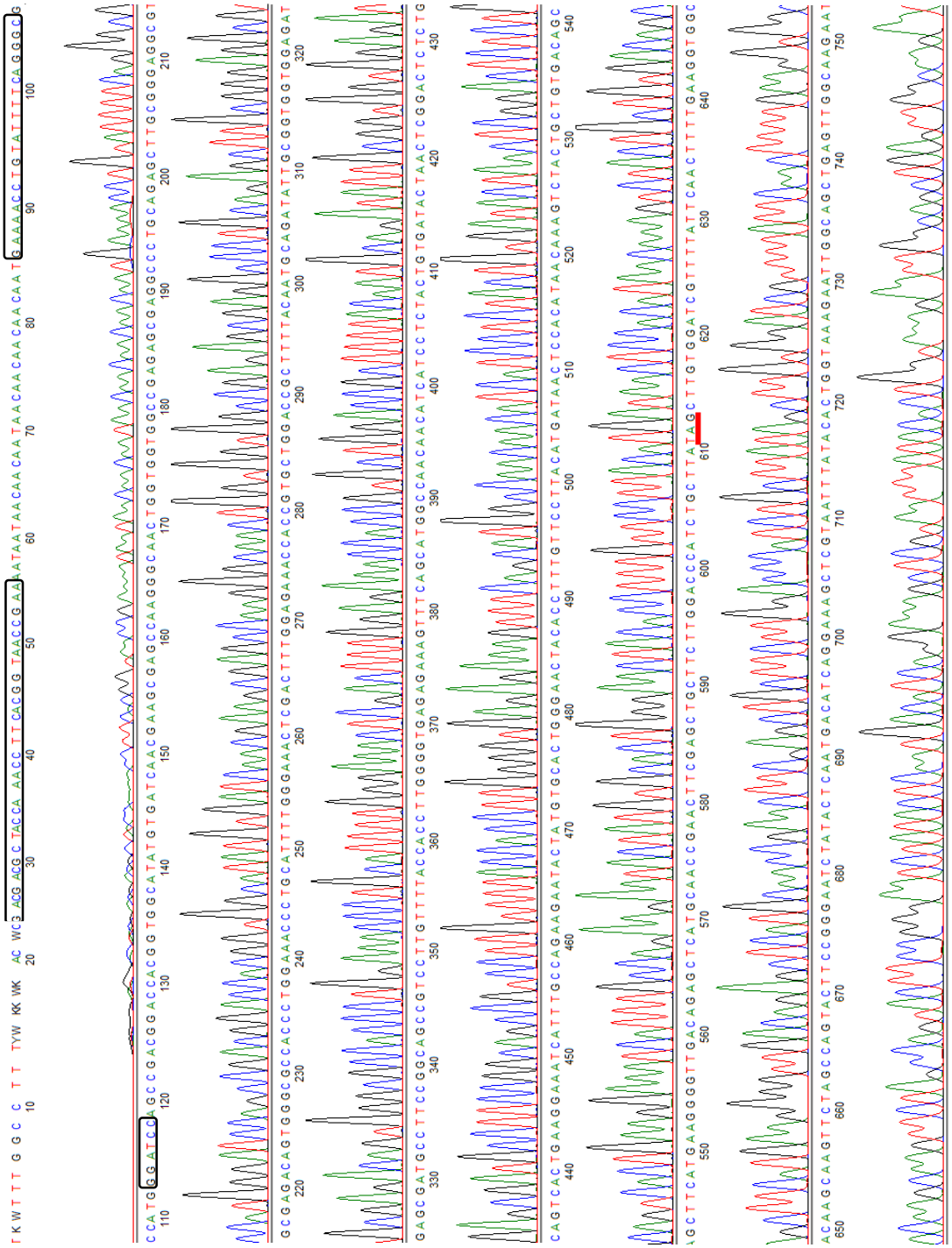


Obr. P7b: *Výsledky sekvenční analýzy zkrácených konstruktů ASK1 (ASK$^{46-267}$).*
V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: C koncová část sekvence GB1 proteinu (29-46), TEV štěpné místo (77-97), restrikční místo BamHI (104-109). Červeně je podtržen stop kodón sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, do proteinu je tak přepsán úsek začínající mimo sekvenovanou oblast po nukleotid 775.

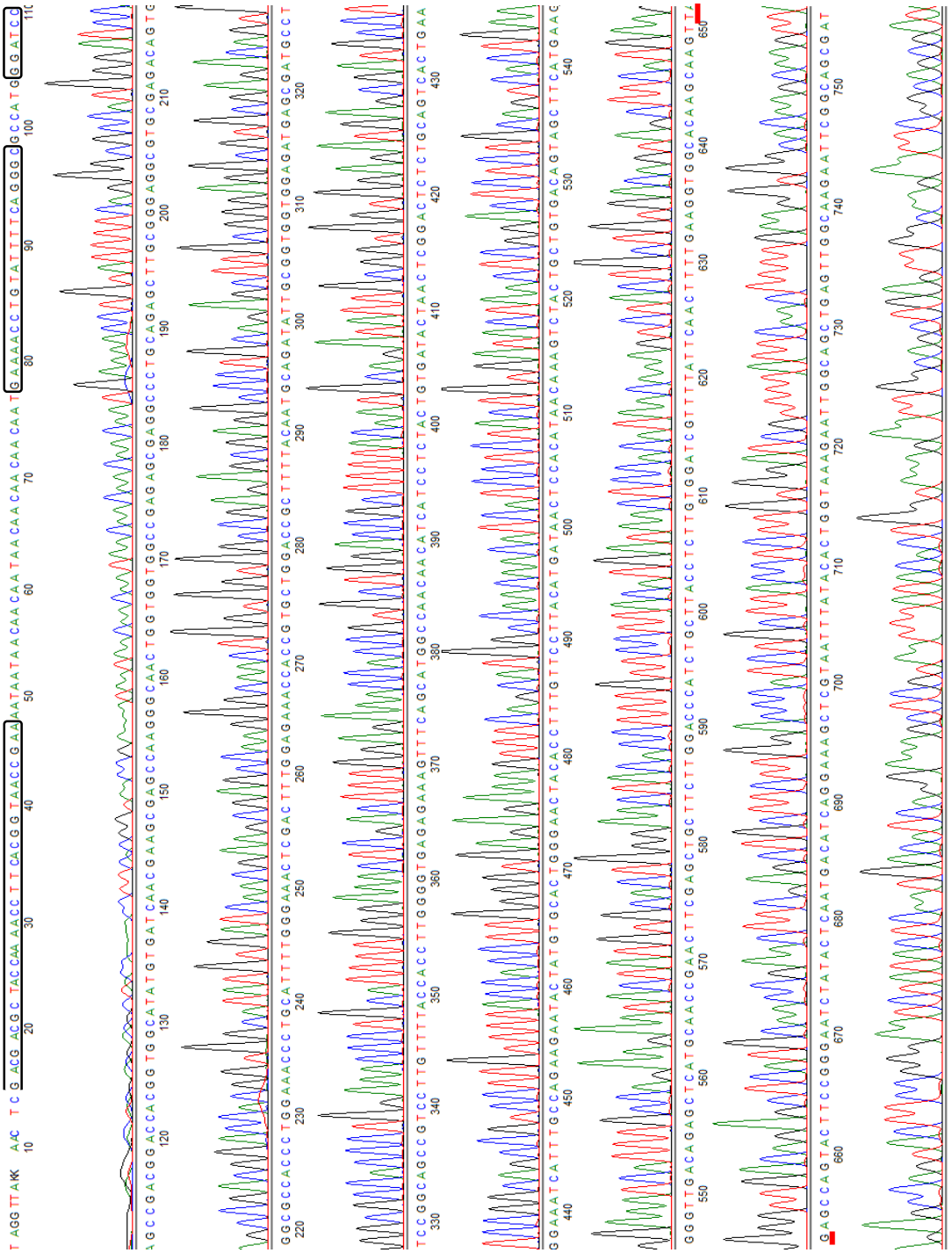


Obr. P7c: *Výsledky sekvenční analýzy zkrácených konstruktů ASK1 (ASK$^{46-287}$).*

V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: C koncová část sekvence GB1 proteinu (14-49), TEV štěpné místo (80-100), restrikční místo BamHI (107-112). Červeně je podtržen stop kodón sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, do proteinu je tak přepsán úsek začínající mimo sekvenovanou oblast po nukleotid 838.

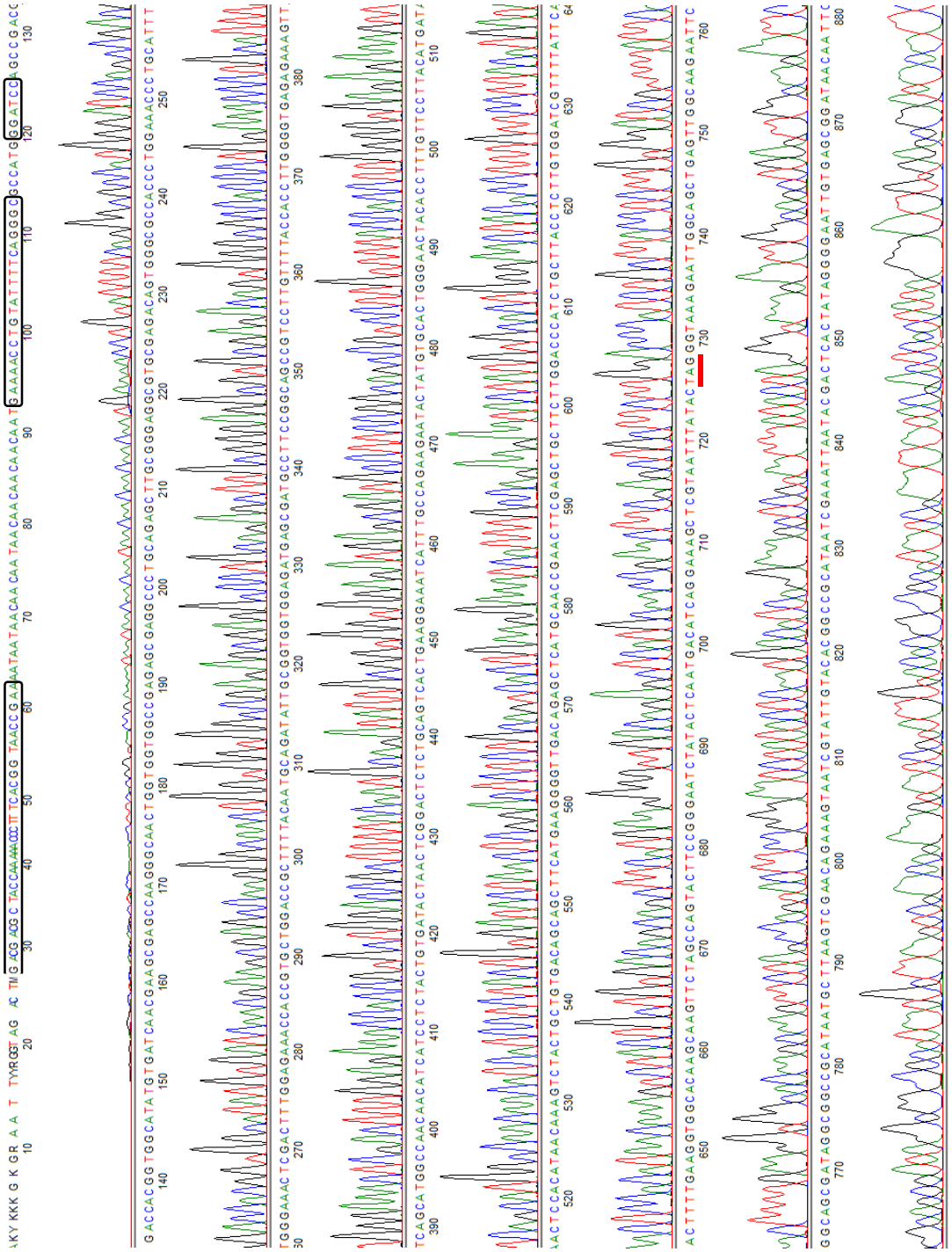


Obr. P7d: *Výsledky sekvenční analýzy zkrácených konstruktů ASK1 (ASK$^{88-251}$).*
V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: C koncová část sekvence GB1 proteinu (24-55), TEV štěpné místo (86-106), restrikční místo BamHI (113-118). Červeně je podtržen stop kodón sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, do proteinu je tak přepsán úsek začínající mimo sekvenovanou oblast po nukleotid 610.



Obr. P7e: *Výsledky sekvenční analýzy zkrácených konstruktů ASK1 (ASK$^{88-267}$).*

V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: C koncová část sekvence GB1 proteinu (15-47), TEV štěpné místo (78-98), restrikční místo BamHI (105-110). Červeně je podtržen stop kodón sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, do proteinu je tak přepsán úsek začínající mimo sekvenovanou oblast po nukleotid 650.



Obr. P7f: *Výsledky sekvenční analýzy zkrácených konstruktů ASK1 (ASK$^{88-287}$).*
V chromatogramu jsou označeny důležité úseky sekvence získané analýzou: C koncová část sekvence GB1 proteinu (27-62), TEV štěpné místo (93-113), restrikční místo BamHI (120-125). Červeně je podtržen stop kodón sekvence fúzního proteinu v transkribované mRNA, do proteinu je tak přepsán úsek začínající mimo sekvenovanou oblast po nukleotid 725.

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

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka