

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Klinická a toxikologická analýza



Peter Mihalčín

Príprava plazmidu, expresia a pilotná izolácia proteínu MafK – interakčného partnera hemového senzoru Bach1

Preparation of a plasmid, its expression and preliminary isolation of MafK protein – the interacting partner of heme sensor Bach1

Bakalárska práca

Vedúci bakalárskej práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2017.

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcel poďakovať mojej školiteľke, doc. RNDr. Markéte Martínkovej, Ph.D. za zadanie zaujímavej témy, odborné vedenie, cenné rady a čas strávený pri spracovaní mojej bakalárskej práce. Veľká vďaka patrí aj Mgr. Veronike Fojtíkovej za pomoc a čas strávený pri riešení experimentálnej časti tejto bakalárskej práce, množstvo cenných rád a vytvorenie priateľského pracovného prostredia.

Abstrakt

Senzorové proteíny detekujúce hem sú skupina hemoproteínov, ktorým slúži hem ako signálna molekula. Asociácia alebo disociácia hemu a hem-detekujúceho sensorového proteínu má vplyv na reguláciu mnohých fyziologických procesov riadených týmito proteínmi. Príkladom je regulácia enzýmovej aktivity alebo génovej expsie.

Predkladaná bakalárska práca sa zaoberá hemovým sensorovým proteínom Bach1 a jeho interakčným partnerom, transkripčným faktorom MafK. Bach1 patrí do skupiny transkripčných faktorov s represívnymi účinkami. Cieľovými génmi, ktoré Bach1 reguluje, sú gény enzýmu hemoxygenáza, ktorá riadi degradáciu voľného hemu v bunkách. Bach1 interaguje s nadbytkom voľného hemu v bunke. Táto interakcia inaktivuje represívny účinok Bach1 a v konečnom dôsledku je v prípade nadbytku voľného hemu hemoxygenáza exprimovaná. V medziach fyziologickej koncentrácie hemu v bunkách proteín Bach1 s hemom neinteraguje a väzbou na regulačné oblasti cieľových génov inhibuje ich expresiu. Bach1 sa dokáže viazať na DNA iba v kooperácii so svojim interakčným partnerom, transkripčným faktorom MafK.

Teoretickú časť tejto bakalárskej práce tvorí zhrnutie doterajších poznatkov o transkripčných faktoroch Bach1, MafK, ich vzájomnej interakcii a väzbe na DNA ako aj neodmysliteľný vplyv hemu na ich spoločnú funkciu. Experimentálna časť tejto práce je zameraná na transkripčný faktor MafK. Prvým cieľom bola príprava vhodného plazmidu s génom kódujúcim MafK s histidínovou kotvou, jeho amplifikácia a izolácia. Ďalším cieľom bola expresia proteínu MafK v prokaryotickom systéme a jeho pilotná izolácia. Bolo získané malé množstvo proteínu MafK a jeho totožnosť bola overená imunochemickou metódou, použitím protilátok proti histidínovej kotve. Posledným cieľom bola základná charakterizácia získaného preparátu obsahujúceho proteín MafK. Na základe priebehu experimentov a získaných výsledkov bola navrhnutá optimalizácia izolačného postupu.

Kľúčové slová: hem, hem-obsahujúce sensorové proteíny, prokaryotická expresia, izolácia proteínu

Abstract

Heme-sensing proteins are heme proteins to which heme serves as a signalling molecule. Association or dissociation of heme moiety and heme-sensing proteins influences various physiological functions, such as enzyme activity or gene expression regulated by these heme-sensing proteins.

The main object of this thesis is heme-sensing protein Bach1 and its interaction partner, transcription factor MafK. Bach1 refers to the group of transcription factors involved in repression of gene expression. The target genes of Bach1 regulation are hemeoxygenase genes. Hemeoxygenase controls the excess free heme degradation. Due to the excess of free heme in the cell, Bach1-heme interaction inactivates Bach1 controlled repression of hemeoxygenase resulting in the free heme degradation. In the state of physiological free heme concentration, Bach1-heme interaction does not occur and activated Bach1 represses the hemeoxygenase expression via binding to the target gene enhancers. Bach1 is incapable of making efficient Bach1-DNA bonding by itself, therefore the transcription factor MafK is essential. Protein MafK modulates the Bach1-DNA binding by making the heterodimer formation Bach1-MafK, which binds to DNA.

The first aim of this thesis is to summarize the recent knowledge about transcriptional factors Bach1 and MafK, their interaction, DNA binding activity and heme influence on their function, published in scientific journals. Experimental part of this thesis focuses on the transcription factor MafK. The first aim of the experimental part was to prepare the suitable plasmid involving MafK gene with His-tag, amplify this plasmid and isolate it. The second aim was the expression of transcription factor MafK in a prokaryotic system followed by the preliminary isolation of this protein. The small amount of MafK protein was isolated and its authenticity was verified by the immunochemical method using antibodies against His-tag. The last step of the experimental part refers to the preliminary characterization of isolated MafK protein prepare. On the ground of experimental process and achieved results, we proposed the isolation process optimalization.

Key words: heme, heme-containing sensor proteins, prokaryotic expression, protein isolation

Obsah

Obsah	6
Zoznam skratiek a symbolov	8
1 Teoretický úvod	8
1.1 Charakteristika a rozdelenie hemoproteínov.....	11
1.2 Hemové sensorové proteíny.....	13
1.2.1 Sensorové proteíny detekujúce hem.....	13
1.3 Metabolizmus hemu a jeho regulácia.....	17
1.3.1 Biosyntéza a degradácia hemu.....	17
1.3.2 Malé proteíny svalovoaponeurotického fibrosarkómu (sMaf proteíny), MARE a regulácia génovej expresie.....	19
1.3.3 MafK a úloha sMaf proteínov in vivo.....	22
1.3.4 Bach1.....	23
1.3.4.1 Štruktúra Bach1.....	23
1.3.4.2 CP motívy Bach1.....	24
1.3.4.3 Bach1 a metabolizmus hemu.....	25
1.3.4.4 Vplyv redoxných podmienok a fosforylácie na Bach1.....	26
1.3.4.5 Regulácia expresie Bach1.....	26
1.3.4.6 Funkcie a potenciálne oblasti pôsobenia Bach1 v organizme.....	27
1.4 Teoretický úvod k použitým metódam.....	28
1.4.1 Transformácia buniek E. coli BL-21 (DE3) a E. coli DH5 α	28
1.4.2 Sekvenačná analýza.....	29
1.4.3 Prenos génu a produkcia plazmidu komerčnou metódou spájajúcej klonovacej reakcie „InFusion“.....	29
1.4.4 Príprava linearizovaného vektoru restričným štiepením.....	30
1.4.5 Agarózová elektroforéza.....	30
1.4.6 Indukcia expresie génu pre MafK v transformovaných bunkách E. coli BL-21 (DE3)..	30
1.4.7 Afinity chromatografia v procese izolácie proteínu MafK z buniek E. coli BL-21 (DE3)	31
1.4.8 Gélová chromatografia.....	31
1.4.9 Polyakrylamidová elektroforéza v prostredí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	31
1.4.10 Western blot.....	32
1.4.11 Stanovenie koncentrácie proteínu metódou s použitím kyseliny bicinchoninovej (BCA)	32
1.4.12 UV/VIS spektroskopia.....	33
2 Ciele bakalárskej práce	34

3 Prístroje, materiál a metódy	35
3.1 Použité prístroje.....	35
3.2 Použitý materiál a chemikálie	36
3.3 Použité metódy	40
3.3.1 Príprava plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag na transformáciu buniek E.coli DH5α	40
3.3.2 Transformácia buniek E. coli BL-21 (DE3) a E. coli DH5α.....	40
3.3.3 Izolácia plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag alebo pET-21c(+)/MafK-His-tag	41
3.3.4 Sekvenácia génu MafK	42
3.3.5 Prenesenie génu pre MafK z vektoru pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag do vektoru pET-21c(+) s histidínovou kotvou tzv. His-tag komerčnou metódou InFusion.....	43
3.3.6 Spektrometrické stanovenie koncentrácie plazmidovej DNA na spektrometri DeNovix DS-11	45
3.3.7 Expresia proteínu MafK v bunkách E. coli BL-21 (DE3).....	45
3.3.8 Izolácia proteínu MafK z buniek E. coli BL-21 (DE3).....	47
3.3.9 Polyakrylamidová elektroforéza v prostredí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	48
3.3.10 Western blot	50
3.3.11 Stanovenie celkovej koncentrácie proteínu v preparáte obsahujúcom proteín MafK metódou BCA.....	52
3.3.13 UV/VIS spektroskopia	53
4 Výsledky	54
4.1 Príprava vhodného vektoru pre expresiu proteínu MafK.....	54
4.2 Expresia proteínu MafK	58
4.3 Izolácia proteínu MafK z buniek E. coli BL-21 (DE3).....	60
4.4 Charakterizácia preparátu s proteínom MafK	66
5. Diskusia	68
6. Záver	74
Zoznam použitých zdrojov	75

Zoznam skratiek a symbolov

A260	absorbancia pri vlnovej dĺžke 260 nm
A280	absorbancia pri vlnovej dĺžke 280 nm
A _{260/280}	pomer absorbancie preparátu pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm
AfGcHK	histidín kináza s globínovou štruktúrou sensorovej domény, izolovaná z <i>Anaeromyxobacter</i> sp., kmeň FW 109-5 (kyslíkový senzor)
ALAS	enzým aminolevulát syntáza
AP-1	transkripčný faktor aktivačný proteín 1
APS	persíran amónny
ARE/EpRE	element antioxidačnej/elektrofilnej odpovedi
Bach1	transkripčný faktor homológ BTB domény a CNC 1, z anglického „BTB domain and CNC homologue 1“ resp. „broad complex, tramtrack, bric-a-brac and cap'n'collar homologue 1“
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BIS	N,N-metylén-bis-akrylamid
bp	páry báz
BTB/POZ	doména proteínov typu BTB, z anglického „broad-complex, tramtrack and brick a brack“ resp. „Pox virus and Zinc finger“
bZIP	základná doména leucínového zipsu, ktorá sprostredkúva dimerizáciu bZIP proteínov a väzbu na DNA, z anglického „basic leucine zipper domain“
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
CLS	cytoplazmatický lokalizačný signál
C-MARE	MARE obsahujúci cAMP-odpovedajúci element
CNC	rodina proteínov typu CNC, z anglického „cap'n'collar“
CP motív	sekvencia dvoch za sebou nasledujúcich aminokyselín cysteín a prolín
Crm1	jadrový exportér typu Crm1

CsMBE	CNC-sMaf väzbový element
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dsDNA	dvojvláknová DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etyléndiamíntetraoctová kyselina
eIF2 α	eukaryotický iniciačný faktor 2 α
FLAG-tag	oktapeptidová kotva s aminokyselinovou sekvenciou DYKDDDDK
GATA	motív s nukleotidovou sekvenciou GATA pre väzbu regulačných GATA faktorov
Hap1	kyslík detekujúci proteín, regulujúci expresiu génov v kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HCEK	hematopoetická a srdcová enhancerová sekvencia pre MafK
His-tag	histidínová kotva
HO	enzým hemoxygenáza
HRI	hemom regulovaný inhibítor
HRM	hem regulačný motív
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
k _{off}	disociačná konštanta
k _{on}	asociačná konštanta
LB agar	Luria-Bertani agar
LB medium	Luria-Bertani médium
MafF	proteín svalovoaponeurotického fibrosarkómu F
MafG	proteín svalovoaponeurotického fibrosarkómu G
MafK	proteín svalovoaponeurotického fibrosarkómu K
MARE	nukleotidová sekvencia Maf rozoznávajúceho elementu, z anglického „Maf recognition element“
miRNA	mikroRNA
mRNA	mediátorová RNA

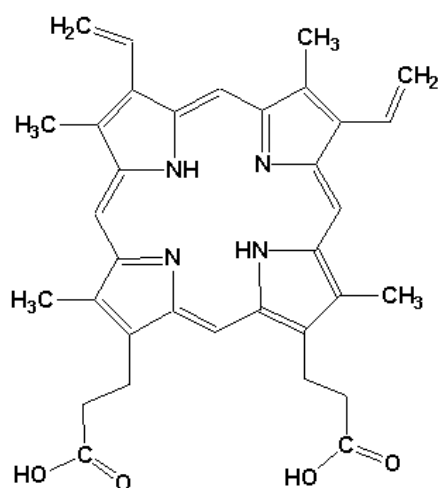
NBT	nitro blue tetrazolium
NES	jadrový signál exportu
NF-E2 p45	jadrový erytroidný faktor-2 p45
NPAS	neuronálny PAS proteín
Nrf	NF-E2 p45 príbuzné faktory
OD ₆₀₀	optická denzita pri 600 nm
PAS	štruktúrny motív priestorového usporiadania proteínu, akronym odvodený z anglických názvov troch proteínov, v ktorých sa tento štruktúrny motív vyskytuje: „ <i>Drosophila</i> period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein“
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PMSF	fenylmetánsulfonyl fluorid
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	počet otáčok za minútu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovom géli v prostredí dodecylsulfátu sodného
sMaf	malé proteíny svalovoaponeurotického fibrosarkómu
TAE pufor	Tris-acetát-EDTA pufor
TB médium	Terrific Broth médium
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletán-1,2-diamín
T-MARE	MARE obsahujúci AP-1 väzbové miesto
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometán

1 Teoretický úvod

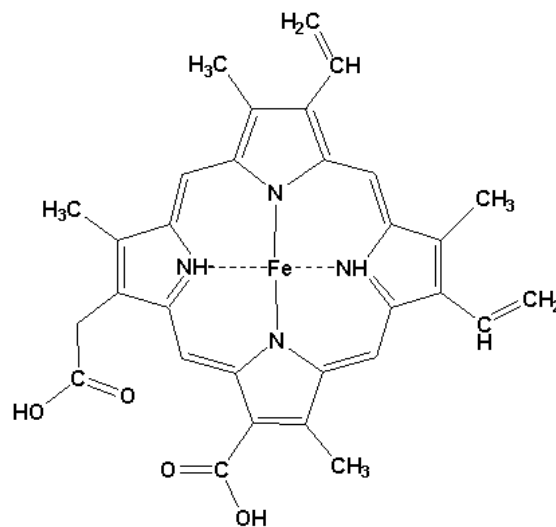
1.1 Charakteristika a rozdelenie hemoproteínov

Hemoproteíny patria do skupiny metaloproteínov, obsahujúcich hem ako prostetickú skupinu.¹ Hem je jeden z najdôležitejších kofaktorov nevyhnutných pre správnu funkciu proteínov a enzýmov.² Základ štruktúry hemu tvorí porfín, zložený zo štyroch pyrolových kruhov spojených metylenovými mostíkmi v α -polohách. Substitúciou porfínu v β -polohách vznikajú izoméry nazývané porfyríny. Izomér protoporfyrín IX, ktorý je základom štruktúry hemu a jeho komplexotvornej funkcie, obsahuje štyri metylové, dva propionátové a dva vinylové substituenty.³ Heterocyklus porfyrínov je slabá dvojsýtina kyselina. V alkalickom prostredí tvorí soli náhradou oboch pyrolových atómov vodíku za ión kovu. Koordinácia iónu ťažkého kovu je stabilizovaná chelatačným vplyvom voľných elektrónových párov zvyšných dvoch atómov dusíku pyrolového jadra. Najvyššiu stabilitu vykazujú komplexy porfyrínov s iónmi železa.¹ Tvorbou komplexu protoporfyrínu IX s centrálne viazaným iónom železa vzniká ferroporfyrín IX, označovaný termínom hem.³ V procese syntézy hemu je za tvorbu komplexu protoporfyrínu IX s iónom železa zodpovedný enzým ferrochelatáza.⁴ Protoporfyrín IX a hem sú zobrazené na obrázku č.1.

A



B



Obrázok č.1: Štruktúra protoporfyrínu IX (A) a hemu (B).⁵

Medzi najstabilnejšie komplexy železa patria oktaedrické hexakomplexy.¹ Centrálny ión železa tvorí šesť koordinačne kovalentných väzieb s ligandami. Štyri väzby tvorí s atómami dusíkov pyrolových jadier, ktoré sú označované ako ekvatoriálne ligandy. Zvyšné dve väzby môže tvoriť s axiálnymi ligandami. Môže sa jednať o postranné reťazce aminokyselín ako

napríklad cysteín, metionín, dusík imidazolového jadra histidínu alebo malé molekuly plynov O_2 , CO , NO či H_2S .^{1,6} Schopnosť koordinácie postranných reťazcov aminokyselín ako axiálnych ligandov je podstatou väzby hemu na apoproteín a vznik hemoproteínu. K tvorbe tejto väzby prispieva okrem iného aj hydrofilný charakter propionových substituentov pyrolových jadier, hydrofóbna povaha porfyrinového cyklu, metylových, vinylových substituentov a ich interakcie s príslušnými oblasťami apoproteínu.¹

Katión železa sa v komplexe vyskytuje v dvojmočnej forme Fe^{2+} , pričom je takýto komplex označovaný termínom hem. Názov hemín je používaný pre oxidovaný komplex s trojmočnou formou Fe^{3+} .^{1,3} Zmena oxidačného stavu má značný vplyv na afinitu ku konkrétnym ligandom a tým dáva za vznik vysokej funkčnej variabilite hemoproteínov.

Rozdelenie hemoproteínov podľa funkcie:

1. Proteíny transportu a uskladnenia plyných molekúl, najčastejšie kyslíku. Patria sem napríklad hemoglobín a myoglobín. Hem je situovaný medzi helixom F a E globulárnej bielkoviny, pričom polárne propionátové reťazce smerujú k polárnemu povrchu bielkoviny a nepolárne časti hemu do nepolárneho vnútra. Ión železa je štyrmi väzbami koordinovaný s dusíkmi makrocycly protoporfyrínu IX a dvomi väzbami s axiálnymi ligandami. Prvým ligandom je proximálny histidín F8 a druhým je molekula plynu. Hlavnou plynou molekulou transportovanou hemoglobínom a skladovanou myoglobínom je kyslík. Za určitých podmienok môže dochádzať k väzbe oxidu uhoľnatého namiesto kyslíku, najmä v prípade otravy. Oxid uhoľnatý sa viaže na hem asi 200-krát silnejšie než kyslík. Dôležitú úlohu pre správnu väzbu kyslíka zastupuje distálny histidín E7. Nie je priamo koordinovaný s iónom železa, ale stericky ovplyvňuje dostupnosť koordinačného miesta pre plynú molekulu. Tento vplyv vytvára vhodné podmienky pre väzbu kyslíka a zamedzuje prístupu oxidu uhoľnatého.^{1,4}

2. Skupina hemoproteínov nazývaných cytochrómy zabezpečuje prenos elektrónov. Typickým príkladom je cytochróm c dýchacieho reťazca. Cytochrómy sú delené do skupín s označením a, b, c, d, f, o podľa ich absorpčného maxima v UV-VIS oblasti. Štrukturálne rozdiely medzi nimi spočívajú v rozličnej substitúcii postranných reťazcov porfyrínu, type väzby hemu na apoproteín a oxidačnom stave centrálného iónu železa. Zmena oxidačného stavu centrálného atómu železa, Fe^{2+} a Fe^{3+} , je podstatou prenosu elektrónov.⁷

3. Hemové enzýmy katalyzujú oxidačno-redukčné reakcie, v rámci ktorých dochádza k aktivácii molekuly kyslíka a jeho inkorporácii do molekuly substrátu. Patrí sem rodina cytochrómov P450, ktoré katalyzujú oxidačné procesy mnohých organických substrátov a ich metabolitov. Sú neoddeliteľnou súčasťou metabolizmu xenobiotík, detoxifikácie pesticídov či

syntézy steroidných látok. Ďalšími príkladmi hemových enzýmov sú kataláza alebo peroxidáza. Tieto enzýmy sa účastnia reakcií s peroxidom vodíka ako substrátom.^{1,7,8}

4. Vyššie uvedené tri kategórie klasických hemoproteínov využívajú hem ako funkčné a katalytické centrum. Táto skutočnosť neplatí pre štvrtú skupinu označovanú termínom hemové senzorové proteíny. Hem okrem priamej účasti na reakciách môže plniť funkciu signálnej resp. regulačnej oblasti proteínu a to dvomi rôznymi spôsobmi. Prvým je signalizácia prostredníctvom koordinácie plyných molekúl na molekulu hemu. V druhom prípade slúži samotný hem ako signálna molekula. Oba varianty signálu majú za následok ovplyvnenie funkčnej oblasti hemoproteínu a tým reguláciu mnohých fyziologických procesov baktérií či eukaryotov.²

1.2 Hemové senzorové proteíny

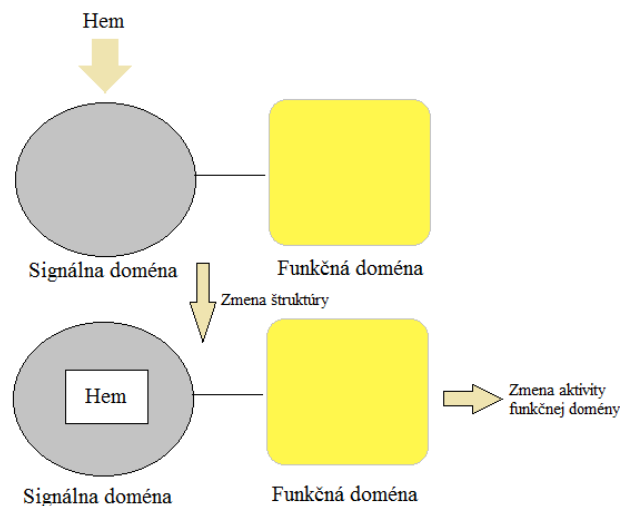
Hemové senzorové proteíny delíme do dvoch kategórii. Senzorové proteíny detekujúce hem (hem-detekujúce proteíny) a senzorové proteíny detekujúce plyné molekuly. Ich spoločnou črtou je prítomnosť najmenej dvoch domén: signálnej a funkčnej. Signálna doména zabezpečuje väzbu hemu s rôznou mierou afinity u jednotlivých podskupín hemových senzorových proteínov. Táto skutočnosť výrazne ovplyvňuje a podmieňuje mechanizmus intramolekulárneho prenosu signálu a aktivitu funkčnej domény daného senzorového hemoproteínu.⁹

1.2.1 Senzorové proteíny detekujúce hem

Biosyntéza hemu je lokalizovaná vnútri mitochondrií a v cytoplazme erytroidných buniek kostnej drene a hepatocytov.¹⁰ Je realizovaná prostredníctvom kaskády enzýmov počínajúc aminolevulát syntázou, ktorá katalyzuje syntézu kyseliny δ -aminolevulovej z glycinu a sukcinyl-CoA. Proces syntézy končí enzýmom ferrochelatáza, ktorá katalyzuje inkorporáciu iónu železa do protoporfyrínu IX za vzniku hemu (viď kapitola 1.3.1).^{10,11} Hem je následne transportovaný do cieľovej oblasti, kde plní úlohu kofaktoru hemoproteínov či úlohu signálnej molekuly. Syntéza hemu je za normálnych podmienok prísne regulovaná z dôvodu vysokej toxicity voľného hemu v bunkách. Železo voľného hemu spôsobuje Fentonovú reakciu, ktorej produktom sú vysoko reaktívne hydroxylové radikály. Dôsledkom regulácie je udržiavanie úzkeho koncentračného rozpätia hemu v bunkách, čo je kľúčové pre správnu funkciu senzorových proteínov detekujúcich hem.¹¹ Týmto proteínom slúži hem ako signálna molekula.

Asociácia/disociácia hemu na/zo signálnej domény proteínu reguluje rozličné fyziologické procesy typu transkripcia, väzba na DNA, degradácia proteínov alebo regulácia

kináz.² Hem, ako prvý signál, je asociovaný so signálnou doménou, čím dôjde k štrukturálnej zmene tejto domény. Jej zmena následne ovplyvní funkčnú doménu a jej zmenu štruktúry. Výsledkom je spustenie regulačného mechanizmu, ktorý funkčná doména riadi alebo sa ho zúčastňuje. Funkčná doména je často sama o sebe transkripčným faktorom alebo enzýmom, ktorý priamo realizuje finálnu aktivitu.⁹ Mechanizmus regulácie hem-detekujúcich proteínov je zobrazený na obrázku č.2.



Obrázok č.2: Mechanizmus regulácie sensorových proteínov detekujúcich hem

Molekula hemu sa viaže na signálnu doménu, čo má za následok zmenu štruktúry signálnej domény. Zmena štruktúry signálnej domény spôsobí štrukturálnu zmenu funkčnej domény. Táto zmena je signál pre začiatok regulačných mechanizmov riadených funkčnou doménou.

Senzorové proteíny detekujúce hem majú niekoľko špecifických vlastností:

1. Tiolátová skupina cysteínu ako väzbové miesto hemu:

Signálna doména hemových sensorových proteínov obsahuje väzbové miesto pre hem. Podľa súčasných štúdií obsahuje väčšina sensorových proteínov detekujúcich hem v jeho väzbovom mieste zvyšky aminokyseliny cysteín.² Koordinácia tiolátu cysteínu ako axiálneho ligandu s iónom železa hemu v stave Fe^{3+} je výhodná vzhľadom na fakt, že sa jedná o slabú interakciu.⁹ Tá je pre sensorové proteíny detekujúce hem žiadúca vďaka schopnosti ľahkej asociácie či disociácie hemu. Zaručuje to dostatočnú citlivosť a odozvu proteínu na aktuálnu koncentráciu hemu v prostredí bunky.

2. Výmena ligandov hemu vplyvom zmeny redoxného stavu systému:

Zaujímavou vlastnosťou sensorových proteínov detekujúcich hem je výrazný vplyv oxidačno-redukčného stavu iónu železa na väzbu hemu. Existujú proteíny, u ktorých dôjde zmenou oxidačného stavu železa hemu z Fe^{3+} na Fe^{2+} k zrušeniu väzby s thiolátom cysteínu a nahradeniu iným axiálnym ligandom ako napríklad zvyškom aminokyseliny histidín. Slabšie nabitý ión Fe^{2+} vykazuje slabšiu interakciu so záporne nabitým thiolátom cysteínu než Fe^{3+} . Dôsledkom je jednoduchšia disociácia Fe^{2+} z cysteínu a náhrada za iný ligand. Táto zmena môže mať negatívny dopad na funkčnú doménu a jej správnu činnosť, resp. môže zapríčiniť úplnú zmenu jej funkčného zamerania.⁹

3. Motív cysteín-prolín (CP motív):

Zhang a Guarente ako prví vo svojom výskume proteínu kľúčového pre reguláciu expresie génov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v závislosti na kyslíku (Hap1) poukázali na zaujímavú spoločnú charakteristiku mnohých sensorových proteínov detekujúcich hem. Jedná sa o hem regulačný motív (HRM) tvorený aminokyselinami Cys-Pro, tzv. CP motív.¹² Tento motív je častým väzbovým miestom hemu na signálnej doméne. Tiolát cysteínu je axiálnym ligandom hemu a v sekvencii aminokyselín sa vedľa neho často nachádza aminokyselina prolín. Na základe spektroskopických štúdií bola zistená dôležitá úloha prolínu v koordinácii cysteínu a železa hemu. Podľa niektorých výskumov sa javí, že prolín stereochemicky znižuje flexibilitu postranného reťazca cysteínu čím ho stabilizuje a umožňuje väzbu tiolátu s hemom alebo napomáha tejto väzbe vysunutím postranného reťazca z povrchu proteínu.⁹ Zároveň sa javí, že prítomnosť prolínu zamedzuje pevnej väzbe hemu a cysteínu.⁹ Túto teóriu potvrdzujú pokusy s proteínmi obsahujúcimi HRM motívy. Rôzne proteíny obsahujú rôzny počet CP motívov. Proteín Hap1 obsahuje týchto motívov celkom sedem. Hap1 je transkripčný faktor kvasiniek riadiaci expresiu génov kaskády prenosu elektrónov a respirácie v závislosti na dostupnosti kyslíka.¹² Hem aktivuje Hap1 väzbou na jeden zo siedmich CP motívov. Táto skutočnosť bola zistená na základe postupnej mutácie jednotlivých motívov. Väzba hem-Hap1 bola narušená mutáciou motívu HRM7, čo poukazuje na skutočnosť, že iba tento jeden sa účastní väzby. Ďalšími príkladmi proteínov s rôznym počtom HRM sú hemom regulovaný inhibítor (HRI) obsahujúci dva motívy alebo Bach1 (z anglického „broad complex, tramtrack, bric-a-brac and cap'n'collar homologue 1“) so šiestimi.¹² U mnohých proteínov je počet motívov zapojených do interakcie s hemom nejasný. Význam CP motívu taktiež podporuje fakt, že mnohé proteíny nesenzorového charakteru majú cysteín ako axiálny ligand hemu, pričom táto väzba nadobúda odlišné parametre a vyššiu stabilitu ako väzba CP motív-hem.⁹

4. Rýchla disociácia hemu:

Nízka vzájomná afinita Fe^{3+} hemu a cysteínu podmieňuje nízku stabilitu ich väzby.² Porovnaním asociačných a disociačných konštánt sensorových proteínov detekujúcich hem (HRI a izolovaná PAS-A doména proteínu NPAS) a klasických hemoproteínov (ľudský hemoglobín) boli zistené nasledujúce fakty (viď tabuľka č.1).⁹ Asociačné konštanty oboch skupín sa výrazne nelíšia, zatiaľ čo disociačné konštanty až o niekoľko rádov. Hem-detekujúce proteíny tak ako klasické hemoproteíny sa asociujú s hemom až pri jeho zvýšenej intracelulárnej koncentrácii, vďaka čomu nie je ich funkcia ovplyvnená nízkou hladinou hemu za normálnych podmienok. Odlišné disociačné konštanty HRI resp. NPAS a hemoglobínu poukazujú na odlišnú afinitu proteínu k hemu. Rádovo vyššia disociačná konštanta HRI koreluje s nižšou afinitou k hemu.² Obe konštanty vyjadrujú vlastnosti hem-detekujúcich proteínov, vďaka ktorým plnia funkciu veľmi citlivých regulačných systémov.

Názov proteínu	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
HRI	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^{-3}$
PAS-A doména proteínu NPAS	$3,3 \times 10^7$	$5,3 \times 10^{-3}$
Ľudský hemoglobín	$2,9 \times 10^7$	$7,1 \times 10^{-6}$

Tabuľka č.1: Porovnanie asociačných a disociačných konštánt vyjadrujúcich mieru afinity proteínu HRI, PAS-A domény proteínu NPAS a ľudského hemoglobínu k hemu.

k_{on} – asociačná konštanta; k_{off} – disociačná konštanta

5. Flexibilita štruktúry, konkrétny príklad hem-detekujúceho proteínu-HRI:

Bolo poukázané na skutočnosť, že hem-detekujúce proteíny majú typicky flexibilnú štruktúru v porovnaní s klasickými hemoproteínmi globínového typu.^{9,13} Príkladom sensorového proteínu detekujúceho hem s flexibilnou štruktúrou je HRI, taktiež nazývaný hemom regulovaná eukaryotický iniciačný faktor 2α (eIF2 α) kináza.⁹

Pre eukaryotické bunky vystavené stresovým podmienkam ako napríklad UV žiarenie, úbytok aminokyselín, akumulácia denaturovaných proteínov či vírusová infekcia, je nevyhnutné prispôbiť mnohé procesy na prežitie za týchto podmienok. Jedným z dôležitých procesov je proteosyntéza a jej obmedzenie.¹⁴ Ako odpoveď na stresové podmienky túto funkciu plní napríklad rodina kináz eIF2 α . Zahŕňa štyri eIF2 α kinázy, medzi ktoré patrí HRI. HRI reguluje syntézu globínových reťazcov v retikulocytoch na úrovni translácie, kedy fosforyluje zvyšok aminokyseliny Ser51 eIF2 α .¹⁵ Každá zo štyroch eIF2 α kináz disponuje rovnakým mechanizmom pôsobenia funkčnej domény, no HRI je jediná regulovaná koncentráciou hemu

v bunke.¹⁵ Vzhľadom na toxicitu voľného hemu a pre správnu syntézu hemoglobínu je potrebné udržiavať množstvo hemu a syntetizovaných globínových reťazcov v retikulocytoch v pomere 1:1.² HRI reguluje túto dynamickú rovnováhu. HRI sa skladá zo signálnej a funkčnej kinázovej domény.¹⁵ Na základe pokusov s HRI, boli zistené zaujímavé skutočnosti o povahe štruktúry HRI a jeho axiálnych ligandoch pre hem. Pokusmi s izolovanými doménami HRI, ktoré boli použité ako samostatné jednotky, bolo zistené, že v prítomnosti hemu obe domény interagujú práve prostredníctvom hemu. Z toho vyplýva, že štruktúra HRI sa v závislosti na asociácii/disociácii hemu flexibilne mení a zároveň signálna doména HRI nie je považovaná za typickú signálnu doménu samostatne koordinujúcu s hemom. Axiálnym ligandom hemu na signálnej doméne je pravdepodobne His119 alebo His120.¹⁵ HRI obsahuje dva známe CP motívy, Cys409-Pro410 a Cys550-Pro551.¹⁵ Experimenty s mutovanými CP motívmi ukázali, že iba jeden z motívov sa účastní interakcie s hemom a bola potvrdená dôležitosť prítomnosti aminokyseliny prolín pre správnu koordináciu cysteín-hem. V tomto prípade sa pravdepodobne jedná o motív Cys409-Pro410 na funkčnej doméne HRI. HRI je za normálnych podmienok alebo za podmienok nadbytočnej koncentrácie hemu inaktivovaná koordináciou hemom.¹⁶ V prípade zníženej koncentrácie hemu v bunke hem disociuje čím dochádza k štrukturálnej zmene HRI a jej autofosforylácii. To zároveň chráni HRI pred nežiadúcou agregáciou.¹⁵ Podľa niektorých výskumov autofosforylácia aminokyseliny Thr485 zabezpečuje kinázovú aktivitu HRI, ktorá následne fosforyluje Ser51 eIF2 α a tým potláča transláciu mRNA α a β globínových reťazcov.¹⁷

1.3 Metabolizmus hemu a jeho regulácia

Hem je esenciálna molekula, ktorá plní hlavnú úlohu ako prostetická skupina mnohých klasických hemoproteínov v reakciách zahŕňajúcich molekulárny kyslík, prenos elektrónov či biatomárne molekuly plynov.¹⁸ Hem zároveň plní veľmi dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie u prokaryotov, kvasiniek a bolo poukázané na možnosť regulácie génov u eukaryotov.^{12,19-21} Túto funkciu zastáva hem najmä ako ligand transkripčných faktorov a regulačných proteínov zo skupiny hem-detekujúcich proteínov. Jedným z mnohých proteínov tohto typu je Bach1, cicavčí transkripčný represor, negatívne regulovaný prostredníctvom hemu.²²

1.3.1 Biosyntéza a degradácia hemu

Biosyntéza hemu je komplexný proces riadený kaskádou ôsmich enzýmov. Počiatočným substrátom sú aminokyselina glycín a sukcinyl-CoA, ktorého zdroj je citrátový

cyklus. Z toho vyplýva, že citrátový cyklus svojou aktivitou ovplyvňuje syntézu hemu.¹¹ Kondenzáciou glycínu a sukcinyl-CoA katalyzovanou enzýmom aminolevulát syntáza (ALAS) v mitochondrii vzniká δ -aminolevulová kyselina, ktorá je exportovaná do cytoplazmy.

ALAS má dve základné izoformy ALAS1 a ALAS2 kódované odlišnými génmi. ALAS1 má gén umiestnený na chromozóme 3 a je exprimovaná v mnohých neerytroidných tkanivách, za účelom syntézy bazálneho množstva hemu potrebného v bunkách. Gén pre ALAS2 je umiestnený na chromozóme X a ALAS2 je exprimovaná špecificky a vo veľkom množstve v erytroidných bunkách.^{23,24}

Oba izoenzýmy ALAS sú importované do mitochondrií, aby plnili svoju funkciu v biosyntéze hemu. Import ALAS1 je spätne regulovaný množstvom nasyntetizovaného hemu. Hem inhibuje vstup ALAS1 do mitochondrií prostredníctvom HRM (CP motív) v N-koncovkej signálnej oblasti rozhodujúcej o importe ALAS1. Táto inhibícia zabezpečuje úzke koncentračné rozmedzie hemu v bunkách, kde nie je veľké množstvo hemu žiaduce. Import ALAS2 do mitochondrií na rozdiel od ALAS1 nie je inhibovaný prostredníctvom hemu, vďaka čomu je hem v erytroidných bunkách syntetizovaný v dostatočnej miere na pokrytie nárokov syntézy hemoglobínu.^{11,24}

Z kyseliny δ -aminolevulovej po transporte z mitochondrie do cytoplazmy kaskádou štyroch enzýmov vzniká koproporfyrínogen III, ktorý je prenesený naspäť do mitochondrie.²³ Tam je niekoľkými krokmi dokončená syntéza hemu. Posledný krok inkorporácie iónu železa do protoporfyrínu IX katalyzuje enzým ferrochelatáza.²³ Hem je následne distribuovaný do cieľových oblastí a využitý na potrebné účely (viď kapitola 1.2.2) alebo v prípade nadmerného množstva degradovaný v cytoplazme.

Degradácia hemu pochádzajúceho z nadmernej syntézy, ale aj z katabolických procesov hemoproteínov je dôležitá z dôvodu jeho vysokej toxicity (viď kapitola 1.2.2). Hem je unikátna molekula, ktorá reguláciou expresie rôznych génov ovplyvňuje nie len svoju syntézu, ale aj vlastnú degradáciu. Základom degradácie je enzým hemoxygenáza (HO). Vyskytuje sa v dvoch izoformách HO-1 a HO-2.²⁵ Zvýšená koncentrácia hemu v bunkách indukuje expresiu génu pre HO-1 čoho dôsledkom je zvýšená miera degradácie hemu.²⁶ Obdobne stimulujú produkciu HO-1 faktory spôsobujúce zápalové procesy ako cytokiny, ťažké kovy, oxidanty či teplotný šok.¹⁸ HO-2 je v porovnaní s HO-1 nezávisle exprimovaná a účastní sa regulácie bazálnej úrovne hemu v bunkách.²⁶

Hemoxygenázový systém je limitujúcim faktorom degradácie hemu. HO oxidatívne degraduje hem za účasti troch molekúl O_2 na molekulu CO, tri molekuly H_2O , ión železa

a biliverdín, ktorý je ďalej redukovaný na bilirubín.^{18,27} Poss a Tonegawa uviedli, že HO-1 je enzým pôsobiaci ako antioxidantný obranný systém, vďaka tomu, že degraduje toxický hem na *in vivo* antioxidantne pôsobiace molekuly CO a biliverdín, resp. bilirubín. Zároveň doplnili, že HO-1 je pre vyšších eukaryotov nevyhnutný z hľadiska správneho metabolizmu železa ako aj pre schopnosť vysporiadať sa s rozličnými aspektami stresu na bunkovej úrovni.²⁸

Molekulárny mechanizmus regulácie génovej expzie HO-1 je nejasný. Podľa detailných analýz ľudských a myších HO-1 génov bolo zistené, že sú indukované prostredníctvom dvoch enhancerových oblastí (z anglického „enhancers“) E1 a E2 nachádzajúcich sa pred HO-1 génom. E1 aj E2 obsahujú viaceré elementy stresovej odpovede (z anglického „stress responsive elements“), ktoré zodpovedajú sekvencii Maf (vid' kapitolu 1.3.2) rozoznávajúceho elementu (z anglického „Maf recognition element“-MARE).¹⁸

1.3.2 Malé proteíny svalovoaponeurotického fibrosarkómu (sMaf proteíny), MARE a regulácia génovej expzie

MARE je DNA sekvencia regulačnej oblasti rozličných génov, ktoré sa účastnia metabolizmu hemu. Patria sem napríklad gény zodpovedné za odpoveď na oxidačný stres, gény globínov, HO-1 alebo gény pre ALAS.²⁹ Základom tejto regulácie je väzba niektorého zo skupiny sMaf proteínov na MARE regulačnej oblasti formou homodiméru alebo heterodiméru, ktorý tvoria s rozličnými väzbovými partnermi.

sMaf proteíny sú malé transkripčné faktory o veľkosti približne 160 aminokyselín tj. cca 18 kDa. sMaf proteíny spolu s veľkými Maf proteínmi tvoria rodinu Maf proteínov. Skupinu sMaf proteínov tvoria tri homologické proteíny MafF, MafG a MafK.³⁰ Časť nižšie uvedeného textu je zameraná na všeobecnú charakteristiku sMaf proteínov, MafK a ich interakcie s MARE.

Základnou črtou sMaf proteínov je prítomnosť niekoľkých špecifických oblastí a motívov v rámci ich štruktúry. Prvý dôležitý motív je tzv. základný región, zodpovedný za väzbu sMaf na DNA.³⁰ Časť základného regiónu tvorí jadrový lokalizačný signál, vďaka ktorému je umožnený transport sMaf proteínu do jadra bunky.³¹ Druhý podstatný motív je leucínový zips. Tieto dva motívy, základný región a leucínový zips, sú situované blízko seba a sú prítomné u všetkých transkripčných faktorov s tzv. základnou doménou leucínového zipsu (z anglického „basic leucine zipper domain“, bZIP).³⁰ Transkripčné faktory typu-bZIP tvoria superrodinu proteínov so spoločným evolučným základom a patria sem okrem rodiny Maf proteínov aj rodina aktivačného proteínu 1 (AP-1), tzv. CNC rodina proteínov (z anglického „cap'n'collar“), Bach proteíny a ďalšie z celkového počtu 19 rodín typu-bZIP objavených u

stavovcov.^{11,32} Tretím motívom sMaf je rozšírená homologická oblasť nepriamo stabilizujúca väzbu základného regiónu sMaf proteínov na DNA.^{33,34}

MTTNPKPNKALKVKKEAGENAPVLSDELVSMSVRELNQHLRGLTKEEVTRLKQRR
RTLKNRGYAASCRIKRVTQKEELERQVELQOEVEKLARENSSMRLELDALRSKYEA
LQTFARTVARGPVTPTKVATTSVITIVKSAELSSTSPVPSAAS

Obrázok č.3: Sekvencia aminokyselín proteínu MafK s vyznačením dôležitých oblastí a motívov

Podčiarknutá sekvencia zodpovedá bZIP doméne. DDELVSMSVRELNQHLRGLTKEEV je sekvencia rozšírenej homologickej oblasti. RLKQRRRTLKNRGYAASCRIKRVTQK je sekvencia základného regiónu, ktorý zahŕňa jadrový lokalizačný signal. LERQVELQOEVEKL je sekvencia leucínového zipsu.

Dôležitá vlastnosť vyplývajúca z prítomnosti leucínového zipsu v štruktúre rodiny Maf proteínov je schopnosť tvoriť diméry. Leucínový zips je štruktúrny motív, ktorý vo svojej sekvencii obsahuje leucín ako každú siedmu aminokyselinu. Zvýšená frekvencia výskytu leucínu v sekvencii aminokyselín na α -helixoch proteínov, ktoré tvoria dimér, umožňuje ich vzájomnú interakciu. V mieste stretu leucínových oblastí paralelných α -helixov vzniká mierne ľavotočivý špirálovitý útvar, ktorým sa navzájom viažu.³⁵

Maf proteín môže tvoriť dimér s odlišným, ale aj s identickým homológom skupiny Maf proteínov.³⁶ Veľké Maf proteíny majú po dimerizácii s ďalším veľkým Maf proteínom funkciu aktivátora transkripcie pretože obsahujú transaktivačnú doménu. Na rozdiel od nich sMaf túto doménu nemajú a ich funkciou vo forme sMaf-sMaf dimérov je výhradne represia transkripcie daných génov.³⁴ sMaf proteíny taktiež tvoria heterodiméry s transkripčnými faktormi typu bZIP. Príkladom je rodina CNC proteínov kam patrí významný jadrový erytroidný faktor-2 p45 (NF-E2 p45) tvoriaci heterodimér s proteínom MafK. NF-E2 p45 je zodpovedný za stimuláciu transkripcie v procese expresie β -globínových génov v erytrocytoch väzbou na lokus kontrolnú oblasť (z anglického „locus control region“).¹¹ NF-E2 p45 príbuzné faktory (Nrf) Nrf1, Nrf2, Nrf3 stimulujú transkripciu vo forme heterodimérov s sMaf proteínmi v neerytroidných bunkách.¹¹ Druhým príkladom bZIP rodiny tvoriacej heterodiméry s sMaf sú Bach proteíny (Bach1, Bach2), ktoré v tejto forme pôsobia ako transkripčné represory.³⁴ CNC proteíny a Bach proteíny nie sú schopné samostatnej väzby na DNA preto sú sMaf proteíny ich nevyhnutní väzboví partneri.³⁰

Ako je uvedené na začiatku tejto kapitoly, väzba sMaf na DNA je uskutočnená prostredníctvom MARE. Prvou konkrétnou formou MARE je MARE obsahujúci AP-1 väzbové miesto (TPA-odpovedajúci element) vo svojom strede (T-MARE). T-MARE je palindromická

sekvencia nukleotidov (TGCTGACTCAGCA), ktorá je spoločným motívom pre väzbu sMaf-sMaf dimérov. Zaujímavosťou tejto nukleotidovej sekvencie je zhoda jej prostrednej časti (TGACTCA) s motívom, ktorý využívajú na väzbu s DNA transkripčné faktory rodiny AP-1. Práve preto je táto krátka sekvencia siedmich nukleotidov nazývaná AP-1 väzbové miesto. Dôležitým zistením v prípade väzby proteínov rodiny Maf na DNA je, že ich základný región nerozoznáva iba AP-1 väzbové miesto ako AP-1 proteíny, ale aj príslušné dvojice nukleotidov GC (GC boxy) na oboch stranách AP-1 väzbového miesta (TGCTGACTCAGCA).³⁰ Kritickým faktorom rozoznania GC boxov je zvyšok aminokyseliny Tyr64 základného regiónu Maf.³⁷ Tyr64 podľa kryštalografických analýz nevykazuje priamu interakciu s GC boxami, ale ovplyvňuje orientáciu aminokyselinových zvyškov Arg57 a Asn61 zodpovedných za rozpoznanie GC boxov. Arg57 a Asn61 nie sú špecificky prítomné iba u Maf proteínov, avšak Tyr64 áno a u iných bZIP faktorov býva nahradený aminokyselinou alanín.^{30,34}

Druhou formou MARE, ktorá je však doposiaľ značne nepreštudovaná, je MARE obsahujúci cAMP-odpovedajúci element (C-MARE). C-MARE je taktiež palindromická sekvencia nukleotidov (TGCTGACGTCAGCA) schopná väzby sMaf. cAMP-odpovedajúci element tvorí prostrednú časť sekvencie C-MARE (TGACGTCA).³⁶

Väzba odlišných dimérov sMaf, než sú diméry sMaf-sMaf, na MARE génov nie je v celku identická. V minulosti bola zistená prítomnosť rôznych väzbových motívov pre odlišné sMaf heterodiméry radených k MARE. Príkladom je pôvodne uvedený väzbový motív NF-E2 p45-sMaf (RTGASTCAGCR) alebo element antioxidačnej/elektrofilnej odpovedi (ARE/EpRE). ARE/EpRE (RTGACNNNGC) sa vyskytuje v regulačnej oblasti génov aktivovaných napríklad Nrf2-sMaf heterodimérom, ktoré kódujú antioxidačné enzýmy a enzýmy aktívne v procese metabolizmu xenobiotík.^{30,38}

Súčasná analýza DNA väzbových miest Nrf2-, NF-E2 p45- a Bach1-sMaf heterodimérov zároveň odhalila spoločný charakteristický väzbový motív (RTGACTCAGCA).³⁹⁻⁴¹ Spoločnou črtou je prítomnosť AP-1 väzbového miesta (TGACTCA) v strede s príslušnými sekvenciami R (A alebo G) na jednej a GC boxom na druhej strane.³⁰ AP-1 väzbové miesto a príslušná sekvencia R redukujú schopnosť väzby sMaf.³⁷ Avšak CNC-sMaf heterodimér je schopný väzby na tento DNA motív, vďaka CNC, ktorý rozoznáva R oblasť a vďaka sMaf, ktorý rozoznáva GC box z druhej strany AP-1 väzbového miesta.³⁰ Predtým bolo navrhnuté, že sa CNC-sMaf heterodimér prednostne viaže na CNC-sMaf väzbový element (CsMBE) so sekvenciou RTGA(C/G)NNNGC, čo znamená, že CsMBE nie je klasickým elementom MARE, na ktorý sa prednostne viažu sMaf-sMaf diméry.^{30,42} Na vzdory tejto teórii

niektoré Nrf2-sMaf (CNC-sMaf) väzbové miesta obsahujú GC box po oboch stranách AP-1 väzbového miesta, čo umožňuje väzbu sMaf-sMaf dimérov.⁴² Tento fakt poukazuje na vysokú variabilitu nukleotidovej sekvencie MARE. Zároveň z tohto dôvodu prevláda domnienka, že CNC-sMaf heterodiméry aj sMaf-sMaf diméry sa môžu účastniť regulácie transkripcie génov prostredníctvom identických väzbových miest.³⁰ Túto teóriu potvrdzujú niektoré štúdie poukazujúce na možnosť prechodu medzi CNC-sMaf heterodimérmí a sMaf-sMaf dimérmí.^{43,44} Z vyššie uvedenej teórie vyplýva, že expresia rozličných génov môže byť regulovaná kompetitívne, t.j. súťažením aktivátorov a represorov o identické väzbové miesta regulačných sekvencií. Príkladom je gén pre HO-1, dynamicky regulovaný aktivátorom Nrf2 a represorom Bach1 v súčinnosti s sMaf proteínmi.¹⁸

1.3.3 MafK a úloha sMaf proteínov in vivo

MafK spolu s MafG a MafF patrí do skupiny sMaf proteínov. Všetky tri sú veľkou mierou exprimované vo vývojovom štádiu hematopoetických buniek rôznych tkanív, pričom každý z nich disponuje špecifickým genetickým zápisom. Expresia MafK je vysoká v srdci, kostrovom svalstve či placente, MafG je exprimovaný výrazne v kostrovom svalstve, mierne v srdci a mozgu, zatiaľ čo MafF je exprimovaný najmä v pľúcach.^{45,46} Spoločným základom genetického zápisu týchto sMaf proteínov u človeka a myši je, že zahŕňa tri exony. Podľa doposiaľ publikovaných skutočností sa javí, že všetky myšie sMaf majú viaceré exóny slúžiace ako prvý exón.⁴⁶⁻⁴⁸

Myši gén pre MafK pozostáva z dvoch doposiaľ identifikovaných prvých exonov a druhého a tretieho exonu. Distálny prvý exon je využívaný vo vysokej miere v rozličných tkanivách, no proximálny prvý exon je špecifický a dôležitý pre nervové tkanivo a jeho vývoj.^{47,49} Za tretím exonom sa nachádza tzv. hematopoetická a srdcová enhancerová sekvencia pre MafK (HCEK), cez ktorú je riadená expresia MafK v hematopoetických bunkách a srdcovom tkanive. HCEK je DNA sekvencia obsahujúca GATA motívy pre väzbu regulačných GATA faktorov. Boli identifikované štyri GATA motívy v rámci HCEK, avšak iba dva z nich sú potrebné pre väzbu GATA faktorov. Faktory GATA sa tkanivovo špecificky viažu na GATA motívy, GATA-1 v hematopoetických bunkách a GATA-4/-6 v srdcovom tkanive.⁵⁰

sMaf proteíny plnia svoju funkciu v súčinnosti s CNC proteínmi v rozličných procesoch. Mnohé testy a experimenty charakteru mutácie génov sMaf či CNC, vykonávané na myšiach za účelom lepšieho pochopenia funkcie sMaf a CNC proteínov, poukazujú na variabilitu ich pôsobenia. Príkladom sú tieto funkcie: ako je uvedené v kapitole 1.3.2, sMaf

proteíny, hlavne MafK v heterodimernej forme s NF-E2 p45 pôsobí ako stimulant expresie β -globínových génov. Zároveň MafK a MafG s NF-E2 p45 zohrávajú dôležitú úlohu pri diferenciácii megakaryocytov.³⁰ Nrf1-sMaf heterodimér aktivuje gény týkajúce sa proteazómu.⁵¹ Nrf2-sMaf heterodimér je dôležitým aktivátorom génov odpovedi na oxidatívny stres, vplyvy elektrofilných látok a génov rôznych enzýmov zodpovedných za metabolizmus xenobiotík. Nrf2-sMaf aktivuje tieto gény väzbou na časť ich regulačnej sekvencie ARE, patriacu medzi MARE.³⁹ Za nestresových podmienok je Nrf2 polyubiquitinylovaný E3 ligázovým komplexom, ktorý k Nrf2 pripája ubiquitín, vďaka ktorému je potom Nrf2 rozpoznávaný proteazómovým systémom a následne degradovaný.⁵² V situácii, kedy je bunka vystavená stresovým podmienkam je Nrf2 importovaný do jadra, dimerizovaný s sMaf proteínom a takto naviazaný na ARE.³⁸ V tejto forme reguluje gény zodpovedné za ochranu bunky pred oxidatívnym stresom.⁵² Konkrétnym príkladom cieľového pôsobenia Nrf2-sMaf je gén HO-1. Nrf2-sMaf ako aktivátor a Bach1-sMaf ako represor kompetitívne regulujú expresiu HO-1 väzbou na MARE. Väzba oboch transkripčných faktorov na MARE je závislá na koncentrácii voľného hemu v bunke.

Neodmysliteľný poznatok mnohých výskumov je, že strata funkcie sMaf-CNC heterodimérov či sMaf-sMaf dimérov môže viesť k závažným poruchám a ochoreniam ako šedý zákal, nervová degradácia, trombocytopenia, vysoká úmrtnosť embryí a mladých jedincov, poruchy diferenciácie a ďalšie.³⁰

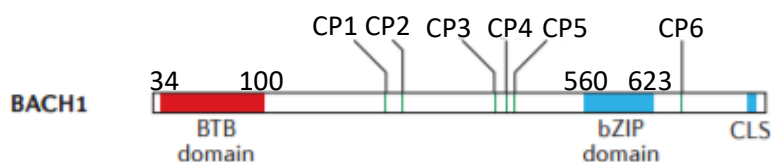
1.3.4 Bach1

Bach1 je prvý preukázaný hemom regulovaný cicavčí transkripčný faktor.²⁹ Bach1 a Bach2 tvoria rodinu Bach proteínov evolučne príbuzných s CNC proteínmi čoho znakom je prítomnosť bZIP domény.¹¹ Hlavnou úlohou Bach1 v súčinnosti s sMaf proteínmi, najmä MafK, je funkcia represívneho transkripčného faktora. Túto úlohu plní v heterodimernej forme Bach1-sMaf, väzbou na MARE regulačných oblastí rôznych génov, obdobne ako stimulačné transkripčné faktory typu-bZIP: NF-E2 p45 či Nrf2 (viď kapitola 1.3.2 a 1.3.3).

1.3.4.1 Štruktúra Bach1

Bach1 je proteín s veľkosťou 739 aminokyselín, tj. cca 81,4 kDa.⁵³ Základom štruktúry Bach1 sú minimálne dve funkčné domény.²⁹ Prvou je BTB/POZ (z anglického „broad-complex, tramtrack and brick a brack“ resp. „Pox virus and Zinc finger“) doména umiestnená na N-konci v rozsahu aminokyselín 34 až 100 (viď obrázok č.4). BTB/POZ doména sprostredkúva interakciu dvoch proteínov za tvorby homodiméru alebo viacerých proteínov v zložitejšej

vzájomnej asociácii.^{53,54} Druhou doménou je vyššie uvedená bZIP doména, zodpovedná za tvorbu diméru sMaf-Bach1 a jeho väzbu na DNA (viď kapitola 1.3.2, odsek č.4). bZIP doména Bach1 je situovaná v pozícii aminokyselín 560 až 623 (viď obrázok č.4).⁵³ Základný región bZIP domény slúži okrem iného aj ako jadrový lokalizačný signál/sekvencia.¹¹ C-koncová oblasť Bach1 zahŕňa malý cytoplazmatický lokalizačný signál (CLS), na ktorom závisí export Bach1 do cytoplazmy. CLS je závislý na jadrovom exportéri nazývanom Crm1, na základe čoho je CLS považovaný za jadrový signál exportu, bežne označovaný ako NES.^{55,56} Druhá sekvencia typu NES sa nachádza v oblasti vyššie od základného regiónu Bach1, pričom zahŕňa dva CP motívy (CP3 a CP4). Prostredníctvom CP3 a CP4 je NES-riadený export Bach1 regulovaný hemom.⁵⁶



Obrázok č.4: Schéma charakteristických štruktúrnych oblastí a motívov transkripčného faktoru Bach1.

Červená oblasť označuje BTB/POZ doménu v rozmedzí aminokyselín 34 až 100. Modrá oblasť v rozmedzí aminokyselín 560 až 623 znázorňuje bZIP doménu. Modrá oblasť s označením CLS znázorňuje cytoplazmatický lokalizačný signál.

1.3.4.2 CP motívy Bach1

Podľa doterajších výskumov zahŕňa hemoproteín Bach1 šesť CP motívov. Jedným z prístupov, ktorý bol použitý na objasnenie interakcie Bach1-hem bola expresia dvoch fragmentov Bach1 v rozmedzí aminokyselín 174-415 resp. 417-739 a ich fúzia s glutation S-transferázou. Tieto fúzne proteíny boli inkubované s hemom a na základe analýzy bolo zistené, že C-koncová frakcia 417-739 vykazovala vysokú afinitu k hemu, porovnateľnú s celkovou afinitou k hemu, ktorú vykazoval celý proteín Bach1.²⁹ Druhá frakcia fúzneho proteínu sa nevyznačovala afinitou k hemu.²⁹ Ako bolo zistené, sekvencia 417-739 obsahuje štyri CP motívy. Dva CP motívy sa taktiež nachádzajú v rámci sekvencie 174-415. CP motívy v sekvencii Bach1 sú teda umiestnené v smere od N-konca k C-koncu nasledovne: dva CP motívy CP1 a CP2 sú umiestnené za N-koncovou BTB/POZ doménou, CP3; 4; 5 pred bZIP doménou a CP6 sa nachádza za bZIP doménou (viď obrázok č.4). Pre objasnenie, ktoré CP motívy sa účastnia interakcie Bach1-hem boli vykonané experimenty s postupnou zámennou niekoľkých cysteínov motívov CP3-6 alanínom. Zámena jednotlivých cysteínov neovplyvnila väzbu Bach1-hem, no zámena troch susedných motívov CP3-5 výrazne znížila schopnosť Bach1 viazať hem. Zámena všetkých štyroch motívov CP3-6 spôsobila úplné zrušenie väzby

Bach1-hem. Z týchto skutočností sa javí, že za interakciu Bach1-hem sú zodpovedné všetky štyri motívy CP3-6 situované v okolí bZIP domény.²⁹ Vyššie uvedená sekvencia typu NES obsahuje dva CP motívy (CP3 a CP4). Prostredníctvom CP3 a CP4 je NES-riadený export Bach1 regulovaný hemom.²⁹ Na druhú stranu, experimenty využívajúce ⁵⁵Fe-značený hemín naznačujú, že Bach1 obsahuje iba jedno väzbové miesto pre hem (na 1 mol Bach1 sa viaže asi 1,3 mol hemínu).²⁹ Na vysvetlení týchto rozdielov sa naďalej intenzívne pracuje, avšak presný mechanizmus interakcie Bach1 s hemom doposiaľ nebol objasnený.

1.3.4.3 Bach1 a metabolizmus hemu

Bach1 ako senzorový proteín detekujúci hem, zohráva významnú úlohu v metabolizme hemu. Vysoká koncentrácia hemu v bunkách je nežiadúca a nebezpečná (kapitola 1.2.2), čomu bráni hemoxygenasový systém (kapitola 1.3.1). Hemoxygenázový systém, degradujúci prebytok hemu v bunke, musí byť regulovaný vhodným mechanizmom, aby koncentrácia hemu v bunke bola udržateľná na nízkej, avšak dostatočnej hladine pre základné potreby bunky. Práve súčasťou tohto doposiaľ nie úplne objasneného mechanizmu je aj hemom negatívne regulovaný Bach1.^{18,29} Ako je uvedené v kapitole 1.3.1, gény HO-1 sú indukované prostredníctvom MARE dvoch enhancerových oblastí E1 a E2. Na základe predpokladu kompetitívnej regulácie génov HO-1 induktormi a represormi bol skúmaný vplyv hemu na väzbu represorového diméru Bach1-MafK na E1 a E2 génov HO-1.

Už skoršie experimenty s použitím časti β -globínovej lokus kontrolnej oblasti obsahujúcej MARE veľa napovedali o vplyve hemu na väzbu Bach1-MafK na MARE DNA. V týchto experimentoch bola časť β -globínovej lokus kontrolnej oblasti obsahujúcej MARE inkubovaná s Bach1 a MafK. Z výsledkov vyplynul vznik väzby Bach1-MafK s MARE a MafK-MafK s MARE. Následným prídavkom hemu bola pozorovaná odlišná skutočnosť. Väzba Bach1-MafK s MARE bola inhibovaná zatiaľ čo väzba homodiméru MafK s MARE nebola hemom ovplyvnená.²⁹ Experimenty s Bach1, ktorému chýbala sekvencia BTB/POZ domény, odhalili, že táto doména nemá vplyv na väzbu Bach1-MafK na MARE.²⁹

Analýza väzby Bach1-MafK na E1 a E2 génov HO-1 bola vykonaná s použitím expresného plazmidu obsahujúceho časť DNA sekvencie HO-1, ktorá bola v minulosti opakovane úspešne použitá na expresiu HO-1. Expresiou Bach1 v prítomnosti vyššie uvedeného plazmidu s E1 a E2 HO-1 bola preukázaná inhibícia expresie HO-1.¹⁸ Zároveň ako dôkaz regulácie expresie HO-1 cez E1 a E2 bol expresný plazmid upravený tak, aby neobsahoval vždy aspoň E1/E2 alebo ani jeden z nich. Vynechanie E1 aj E2 zároveň, spôsobilo nižšiu citlivosť génov HO-1 na prítomnosť Bach1 čo poukazuje na potrebu oboch E na

reguláciu expresie HO-1 prostredníctvom Bach1.¹⁸ Následným pozorovaním vplyvu prídavku hemu bolo potvrdené, že hem inhibuje pôsobenie Bach1-MafK, čiže zamedzuje kooperatívnej represii génovej expresie.¹⁸ Na záver bol vykonaný experiment s represorom Bach1 a induktorom Nrf2, ktoré pravdepodobne kompetitívne regulujú expresiu HO-1. Nrf2 v neprítomnosti Bach1 indukoval expresiu HO-1, no v prítomnosti nadbytku Bach1, pôsobiaceho antagonisticky bola expresia potlačená.¹⁸ Následné prídanie hemu však potlačilo represívne pôsobenie Bach1 a opäť Nrf2 indukovalo expresiu HO-1. Z týchto skutočností vyplýva, že Bach1 resp. Bach1 v kooperácii s MafK je hemovým sensorovým proteínom, ktorý plní funkciu represora expresie HO-1 a je negatívne regulovaný hemom.¹⁸

1.3.4.4 Vplyv redoxných podmienok a fosforylácie na Bach1

Vzhľadom na vplyv redoxných podmienok resp. oxidatívneho stresu na metabolizmus hemu je možné očakávať vplyv redoxných podmienok na funkciu hemom regulovaného Bach1. Ióny kadmia aktivujú funkciu C-koncového CLS, ktorý sprostredkúva export Bach1 z jadra závislý na Crm1.⁵⁵ Bach1 tým pádom nemôže plniť funkciu represora expresie cieľových génov. Zároveň je zvýšená aktivita induktorov génov odpovede na oxidatívny stres ako je napríklad aktivátor Nrf2.¹¹

Výskum ľudských keratinocytov ukázal, že Bach1 je inaktivovaný aj v prítomnosti nízkej koncentrácie arzenitých iónov zodpovedných okrem iného aj za oxidatívny stres, v dôsledku čoho je exprimovaná HO-1.⁵⁷ Dva vyššie uvedené príklady ukazujú, že zmena redoxných podmienok má vplyv na aktivitu a lokalizáciu Bach1 v bunke.

Ďalším aspektom majúcim vplyv na aktivitu a umiestnenie Bach1 sa javí byť fosforylácia.

Kaspar a Jaiswal vo svojej práci uviedli, že fosforylácia reguluje export Bach1 z jadra bunky.⁵⁸ Aminokyselina tyrozín 486 proteínu Bach1 je fosforylovaná ako odpoveď na antioxidant terc-butylhydrochinón nutný pre export Bach1 z jadra. Tyrozín 486 sa nachádza vedľa hemom regulovaného NES Bach1, ktorý zahŕňa CP3 a CP4 motívy.⁵⁸

1.3.4.5 Regulácia expresie Bach1

Expresia Bach1 je regulovaná mnohými faktormi. Bach1 je na rozdiel od Bach2 prítomný v mnohých tkanivách a je exprimovaný v širokej škále rozličných buniek.¹¹ Jedným faktorom podmieňujúcim expresiu Bach1 je, v mnohých tkanivách prítomný, transkripčný faktor proteín špecifikácie 1 (z anglického „specifity protein 1“). Ďalším faktorom je samotný Bach1, ktorý pravdepodobne zvyšuje mieru expresie seba samého väzbou na MARE

umiestnený nižšie od vlastného promotora.⁵⁹ Mechanizmus tohto pôsobenia však ostáva predmetom ďalšieho výskumu a je zdrojom mnohých nejasností. Aktivátor expresie HO-1 Nrf2 je tiež jedným z faktorov, ktorý indukuje expresiu Bach1. Nrf2 indukciou expresie antagonisticky pôsobiaceho Bach1 pre seba vytvára dráhu negatívnej spätnej väzby.⁶⁰ Dôležitou súčasťou regulácie expresie génov Bach1 je účasť mikroRNA (miRNA). miRNA s označením let-7 potláča expresiu Bach1 s cieľom sprostredkovania metastázovej odpovede buniek rakoviny prs. Súčasne let-7 indukuje expresiu HO-1 tým, že redukuje mRNA Bach1.^{61,62}

1.3.4.6 Funkcie a potenciálne oblasti pôsobenia Bach1 v organizme

Známe ciele pôsobenia Bach1, ako je uvedené v tejto práci vyššie, sú gény HO-1 a β -globínové gény. Bach1 sa vzhľadom na svoju prítomnosť v rozličných typoch tkanív javí ako vhodný objekt výskumu účasti na rôznych fyziologických i patologických dejoch. Výskum rozličných typov buniek geneticky modifikovaných myši poukázal na nasledujúce potenciálne oblasti pôsobenia Bach1.

Makrofágy sú dôležitou súčasťou imunitného systému a metabolizmu železa. Hemolýzou uvoľnený hemoglobín resp. hem ako potenciálne zdroje voľného iónu železa, sú vychytávané haptoglobínom či hemopexínom, ktoré môžu byť následne pohltené makrofágmi. Jedná sa o jeden z mechanizmov, ktorým bunka predchádza vzniku oxidatívneho stresu spôsobeného voľným hemom a najmä iónmi železa. Bach1 v tejto súvislosti pôsobí ako represor tzv. Spi-c génu, ktorý kóduje transkripčný faktor nevyhnutný pre správnu diferenciáciu makrofágov účastných na metabolizme železa.^{11,63}

Dôležitú úlohu Bach1 v regulácii imunitného systému potvrdzuje aj výskum myšieho modelu ľudskej sklerózy multiplex. Makrofágy, dendritické bunky a B-lymfocyty zohrávajú významnú úlohu v imunitnom systéme ako tzv. antigén-prezentujúce bunky. Tie sprostredkujú rozoznanie cudzieho antigénu a následnú imunitnú odpoveď. Hovoríme o tzv. získanej imunite, avšak antigén-prezentujúce bunky hrajú dôležitú úlohu aj v citlivosti a odpovedi organizmu na antigény telu vlastné. Bach1-deficitné myši v myšacom modeli ľudskej sklerózy multiplex vykazovali čiastočnú ochranu pred vznikom ochorenia skleróza multiplex.¹¹ Model sklerózy multiplex sprevádza u myši porucha funkcie T-lymfocytov. Deficit Bach1 a HO-1 v týchto myšiach nemali priamy vplyv na funkciu T-lymfocytov, ale javili sa ako príčina poruchy vývoja makrofágov a makrofágových prekursorov dendritických buniek nevyhnutných pre imunitnú odpoveď.¹¹ Výsledkom experimentov bol okrem iného aj nesprávny vývoj osteoklastov. Z výsledkov výskumu sa dráha Bach1/HO-1 javí ako podstatná

súčasť regulačného mechanizmu vo vývoji antigén-prezentujúcich buniek a osteoklastov v spojení s makrofágmi účastnými na metabolizme železa.^{11,64}

V oblasti srdcovo-cievneho systému niekoľko experimentov s Bach1 a apoproteín E-deficientnými myšami ukázalo, že v neprítomnosti Bach1 za nadprodukcie HO-1 bol potlačený vznik aterosklerózy.¹¹ Zároveň ďalší model skúmania Bach1-deficientných myši poukazuje na redukciiu ischemického ochorenia myokardu.¹¹

Respiračný trakt cicavcov je prispôsobený príjmu kyslíka v určitom koncentračnom rozmedzí. Prísun kyslíka v množstve vyššom než je 50-60% dýchaného vzduchu spôsobuje tvorbu voľných radikálov poškodzujúcich pľúcny epitel a endoteliálne bunky. Účinku voľných radikálov môže byť čiastočne zamedzené zvýšenou aktivitou HO-1. Preto Bach1-deficientné myši s vyššou mierou expresie HO-1 v experimentoch vykazovali dlhšiu dobu prežitia v toxických koncentráciách kyslíka v dýchanom vzduchu než klasické myši s Bach1. Tieto experimenty sú podporené faktom, že za hypoxických podmienok je Bach1 transkripčne indukovaný za účelom represie tvorby HO-1.¹¹

Výskum myši ako modelových organizmov s určitými ochoreniami a súčasným deficitom Bach1 predbežne poukazujú na Bach1 ako sľubný terapeutický objekt. Z vyššie uvedených experimentov a mnohých ďalších (výskum Bach1 a ochorenie pokožky, pohybového ústrojenstva, tráviaceho traktu) vyplýva, že Bach1-deficitné organizmy trpia menším poškodením tkanív resp. u nich dochádza k redukcii alebo spomaleniu priebehu daných ochorení.¹¹ Zároveň sa vyššia produkcia HO-1 javí ako možný ochranný faktor.¹¹ Tieto skutočnosti je potrebné považovať za potenciálne oblasti ďalšieho výskumu, keďže doterajší výskum jednoznačne nepotvrdil konkrétne mechanizmy uvedených procesov a priebeh ochorení. Na druhú stranu výsledky experimentov môžu byť spochybnené aj vzhľadom na možný vplyv iných nefyziologických procesov prebiehajúcich v modelových organizmoch, ktoré nemuseli byť identifikované bežnými zdravotnými kontrolami.¹¹

1.4 Teoretický úvod k použitým metódam

1.4.1 Transformácia buniek

Transformácia, transdukcia a konjugácia sú základné spôsoby horizontálneho prenosu genetického materiálu baktérii. Transformácia, ktorú prvýkrát pozoroval v roku 1928 Frederick Griffith, je dnes základom mnohých rekombinantných techník.⁶⁵ Podstatou je príjem plazmidovej DNA kompetentnou bunkou z okolitého prostredia. Kompetentná bunka je bunka schopná prijať DNA z okolitého prostredia vďaka modifikácii bunkovej steny. Kompetencia

bunky môže byť navodená rôznymi spôsobmi. Príkladom je použitie chloridu vápenatého alebo pôsobenie elektrického poľa metódou elektroporácie.⁶⁶ Zmiešaním kompetentných buniek s DNA a inkubáciou na ľade s následnou inkubáciou pri 42 °C dochádza k teplotnému šoku, ktorý napomáha DNA priľnúť k povrchu buniek s následným vstupom do nich. Okrem využitia teplotného šoku je možné použiť špeciálne upravené kompetentné bunky, ktorým na transformáciu postačuje kontakt s vhodným plazmidom.

1.4.2 Sekvenačná analýza

Sekvenačná analýza je dôležitou metódou určenia nukleotidovej sekvencie DNA. Existuje niekoľko variantov sekvenácie. Jednou z najpoužívanejších variantov je Sangerová alebo tzv. dideoxy-sekvenácia. Princíp Sangerovej sekvenácie je nasledovný: do štyroch skúmaviek sú pipetované zložky potrebné pre sekvenáciu, teda sekvenovaná DNA, navrhnutý značený „primer“ pre sekvenované vlákno DNA, DNA polymeráza, všetky štyri typy deoxynukleotidtrifosfátov (dNTP) a vždy jeden typ dideoxynukleotidtrifosfátu (ddNTP). ddNTP je dNTP s chýbajúcou hydroxylovou skupinou na treťom uhlíku ribózy. Na začiatku sekvenácie značený „primer“ dosadá na zodpovedajúcu sekvenciu nukleotidov DNA reťazca. DNA polymeráza následne riadi syntézu komplementárneho reťazca. Po pripojení určitého ddNTP dochádza k prerušeniu syntézy reťazca, pretože ďalšie dNTP sa nemajú z dôvodu chýbajúcej hydroxylovej skupiny na ddNTP ako viazať. Týmto vznikajú v príslušnej skúmavke rôzne dlhé fragmenty zakončené vždy daným ddNTP. Analýzou týchto fragmentov zo všetkých štyroch skúmaviek pomocou elektroforézy a jej vyhodnotením po vizualizácii je stanovená sekvencia nukleotidov DNA.⁶⁵

1.4.3 Prenos génu a produkcia plazmidu komerčnou metódou spájacej klonovacej reakcie „InFusion“

Spájacia klonovacia reakcia „InFusion“ je komerčná metóda, pri ktorej je klonovaná DNA sekvencia začlenená do linearizovaného vektoru. Výsledkom je kruhový plazmid s inkorporovanou klonovanou DNA sekvenciou. „InFusion“ klonovanie sa vykonáva pomocou komerčne dostupnej sady roztokov (napríklad Quick Fusion Cloning Kit). Samotnej „InFusion“ reakcii predchádza namnoženie klonovanej DNA sekvencie pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a linearizácia plazmidového vektoru restriktčným štiepením.⁶⁷

PCR je vysoko efektívna metóda amplifikácie DNA. Dvojvlákno DNA je denaturované a rozvolnené vlákna slúžia ako templáty pre syntézu dcérskych vlákien. Syntéza začína nasadnutím špeciálne navrhnutého „primeru“, ktorého predlžovaním je pomocou DNA

polymerázy a zodpovedajúcich dNTP syntetizované k templátu komplementárne vlákno. Týmto spôsobom je pôvodná DNA v každom cykle PCR zdvojená, pričom novonasyntetizované aj pôvodné vlákna potom v ďalších cykloch slúžia ako templát. Vďaka PCR s vhodne navrhnutými „primermi“ a amplifikačným programom je možné získať za hodinu rádovo až 10^6 kópii pôvodnej DNA.⁶⁵

1.4.4 Príprava linearizovaného vektoru restriktčným štiepením

Restriktčná analýza je metóda analýzy DNA. Využíva enzýmy tzv. restriktčné endonukleázy, ktoré štiepia sekvenciu nukleotidov DNA na špecifických miestach. Restriktčné endonukleázy sú enzýmy pôvodne izolované z baktérii, v ktorých plnia obrannú funkciu pred cudzorodou DNA, ktorú štiepia a inaktivujú.⁶⁵

1.4.5 Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza je často využívaná metóda analýzy DNA. Elektroforéza využíva princíp odlišnej pohyblivosti nabitých molekúl v elektrickom poli. V tomto prípade je DNA s ionizovanými fosfátovými skupinami záporne nabitá a v elektrickom poli putuje smerom ku kladne nabitaj anóde. Agarózový gél zabezpečuje separáciu molekúl rôznej molekulovej hmotnosti, ktoré nadobúdajú v géli rôznu mobilitu. Väčšie molekuly vyššej molekulovej hmotnosti putujú gélom pomalšie než malé a na ich dostatočnú separáciu je vhodný gél nižšej koncentrácie a vyššej porozity. Pre väčšie molekuly okolo 50 a viac kDa je používaný štandardne 1% gél, pre menšie molekuly sú používané viacpercentné gély.⁶⁵

1.4.6 Indukcia expresie génu pre MafK v transformovaných bunkách *E. coli* BL-21

(DE3)

Gén proteínu MafK má v plazmidovom vektore pET-21c(+) tzv. T7 promotor (vid' mapa pET-21c(+) kapitola 3.2). Promotor je nukleotidová sekvencia, ktorú rozoznáva, pre transkripciu nevyhnutná, RNA polymeráza a spolu s iniciačnými faktormi začína proces expresie génu.⁶⁸ Keďže génu proteínu MafK predchádza vyššie uvedený T7 promotor, je na transkripciu potrebná T7 RNA polymeráza. Výhodou buniek *E. coli* BL-21 (DE3) je, že v rámci svojho genómu zahŕňajú gén pre T7 RNA polymerázu. Tá je pod kontrolou *lac* operonu. *Lac* operon je v neprítomnosti induktoru (laktósa alebo IPTG) blokovaný *lac* represorom. V prítomnosti induktoru je *lac* operon aktivovaný a jemu podliehajúci gén pre T7 RNA polymerázu exprimovaný.⁶⁸ T7 RNA polymeráza potom nasadne na T7 promotor a riadi expresiu cieľového génu.

1.4.7 Afinitná chromatografia v procese izolácie proteínu MafK z buniek *E. coli* BL-21 (DE3)

Afinitná chromatografia je metóda často používaná na separáciu určitého komponentu zmesi látok na základe afinity k separačnému médiu. V tomto prípade je ako separačné resp. afinitné médium na izoláciu proteínu MafK použité médium Talon Metal Affinity Resin (ďalej len Talon). Talon pozostáva z živcových častíc s imobilizovanými iónmi kobaltu (Co^{2+}) na ich povrchu. Ióny kobaltu efektívne viažu imidazolové zvyšky aminokyseliny histidín.⁶⁹ Na izoláciu proteínov sa často používajú špecifické sekvencie aminokyselín (tzv. kotvy) zahrnuté na N- alebo C- konci proteínu. Jedným druhom kotvy je práve šesť za sebou nasledujúcich aminokyselín histidín, tzv. histidínová kotva alebo His-tag. His-tag vykazuje vysokú afinitu k médiu Talon. Afinitnou väzbou Talonu a proteínu s histidínovou kotvou je možné proteín zadržať na kolóne, prečistiť od nečistôt a reziduálnych látok a na koniec eluovať v relatívne čistej forme elučným pufrom obsahujúcim imidazol, ktorý vytesní imidazolové skupiny histidínovej kotvy proteínu z Talonu.

1.4.8 Gélová chromatografia

Chromatografia je separačná metóda, využívajúca rôznu distribúciu látok medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Gélová chromatografia využíva princíp separácie molekúl na základe veľkosti. Chromatografická kolóna je naplnená stacionárnou fázou, ktorá v tomto prípade pozostáva z gélu o definovanej veľkosti pórov. Molekuly sú v póroch gélu zadržiavané v závislosti na ich veľkosti. Menšie molekuly prenikajú hlbšie do pórov a sú na kolóne viac zadržiavané ako veľké molekuly. Separované molekuly eluujú z kolóny v poradí od najväčších po najmenšie v závislosti na separačnej schopnosti použitej náplne kolóny. Eluujúce zložky môžu byť následne detekované napríklad prostredníctvom spektrometrického, vodivostného a ďalších typov detektoru. Na základe detekcie je možné po separácii rozoznať rozmedzie elučného objemu požadovanej separovanej zložky a odobrať frakcie eluátu obsahujúce túto zložku.

1.4.9 Polyakrylamidová elektroforéza v prostredí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je metóda využívaná najmä na analýzu a delenie proteínov, ale aj malých fragmentov DNA. SDS je detergent, ktorý tvorí s proteínmi pevnú väzbu a pridáva im jednotný záporný náboj. V elektrickom poli elektroforetickej aparatúry sa potom proteíny delia na základe odlišnej molekulovej hmotnosti. Polyakrylamidový gél pozostáva z niekoľkých zložiek. Hlavnými zložkami sú akrylamid a N,N-metylén-bis-akrylamid. Gél vzniká ich

polymeráciou, ktorá je zabezpečená pridaním zložiek persíran amónny (APS) a N,N,N',N'-tetrametyletán-1,2-diamín (TEMED). APS produkuje voľné kyslíkové radikály zodpovedné za polymeráciu. TEMED slúži ako stabilizátor voľných radikálov.^{3,65} V SDS-PAGE sa štandardne používajú dva gély rôznej porozity. Hlavný separačný gél má obvykle výrazne vyšší celkový podiel polyakrylamidu. Druhý, zaostrovací gél, ktorý slúži na dávkovanie vzoriek a zarovnanie ich línie pred migráciou do separačného gélu obsahuje nižší podiel polyakrylamidu a vzorky ním putujú rýchlejšie.

Výsledok na géli je zvyčajne vizualizovaný pomocou farbenia proteínov. Jedna z najznámejších techník je farbenie proteínov farbou Coomassie Brilliant Blue R-250 v kyslom prostredí. Po nafarbení proteínov je prebytočná farba z gélu odstránená premývaním gélu v roztoku kyseliny.³

1.4.10 Western blot

Western blot patrí do skupiny molekulárných hybridizačných techník. Táto modifikácia Southern blotu slúži na vizualizáciu a detekciu určitého proteínu v pozadí zmesi proteínov. Počiatočným krokom je separácia proteínov pomocou SDS-PAGE elektroforézy alebo isoelektrickou fokusáciou. Separované proteíny sú v druhom kroku prenesené na membránu, na ktorej je potom konkrétny proteín detekovaný použitím imunometódy.

Membrána na Western blot najčastejšie pozostáva z nitrocelulózy alebo polyvinylidifluoridu. Nitrocelulóza vykazuje vysokú väzbovú kapacitu pre proteíny aj DNA. Väzba nitrocelulózy a proteínu je nekovalentného, ale ireverzibilného charakteru. Prenos separovaných proteínov z gélu na membránu je vykonávaný kapilárnym alebo častejšie elektroforetickým princípom. Voľné miesta membrány, kde nie sú viazané prenesené proteíny sú z pravidla blokované naviazaním štandardného proteínu. Následne je detekcia konkrétneho proteínu vykonaná pomocou značených protilátok. Protilátky môžu byť značené spôsobmi ako fluorescenčná značka s následnou detekciou pod fluorescenčným mikroskopom. Ďalšou variantou využitia protilátok je použitie protilátok s naviazaným enzýmom. Pridaním špecifického substrátu pre daný enzým potom vzniká detekovateľný farebný komplex, ktorého intenzita je úmerná množstvu detekovaného proteínu.⁶⁸

1.4.11 Stanovenie koncentrácie proteínu metódou s použitím kyseliny bicinchoninovej (BCA)

Metóda s použitím BCA patrí medzi metódy stanovenia celkovej koncentrácie proteínu vo vzorke. Jedná sa o kombináciu princípu biuretovej reakcie a kolorimetrickej detekcie jej

produktu. Prvým krokom je redukcia meďnatých iónov na meďné interakciou s peptidovými väzbami proteínu v zásaditom prostredí. Druhým krokom je vysoko citlivá kolorimetrická detekcia meďných iónov v komplexe s kyselinou bicinchoninovou v pomere 1:2. Tento komplex sa prejavuje fialovým sfarbením a jeho intenzita je detekovaná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 562 nm. Intenzita zafarbenia komplexu je priamo úmerná koncentrácii proteínu vo vzorke. Celková koncentrácia proteínu vo vzorke je stanovená na základe kalibračnej závislosti vytvorenej pomocou štandardných roztokov o definovanej koncentrácii hovädzieho sérového albumínu.

1.4.12 UV/VIS spektroskopia

UV/VIS spektroskopia je analytická metóda využívaná na kvantitatívnu i kvalitatívnu analýzu látok v roztokoch. Princípom je absorpcia elektromagnetického žiarenia molekulami látok v roztoku v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm. Látky absorbujúce žiarenie vlnovej dĺžky nižšej než 380 nm, teda v UV oblasti sú látky bezfarebné a látky absorbujúce žiarenie v rozsahu vlnových dĺžok 380 až 770 nm sa javia ako látky farebné, teda okom viditeľné (oblasť VIS). V kvantitatívnej analýze prostredníctvom UV/VIS spektroskopie sa uplatňuje Lambert-Beerov zákon, kedy je absorbanca preparátu (A) priamo úmerná koncentrácii (c), pri definovanej dĺžke absorbujúceho prostredia (l) a molárnom absorpčnom koeficiente charakteristickom pre absorbujúcu látku (ϵ).

$$A = \epsilon \times c \times l$$

V rámci kvalitatívnej analýzy je na spektrofotometri premerané celé UV/VIS spektrum v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm. Toto spektrum je špecifické pre rôzne látky a je jednou z identifikačných charakteristík daných látok.

2 Ciele bakalárskej práce

Pre predkladanú bakalársku prácu boli stanovené nasledujúce ciele:

1. Prvým cieľom tejto bakalárskej práce bolo zhrnutie doterajších poznatkov o senzоровom proteíne, ktorý detekuje hem, Bach1 a jeho interakčnom partnerovi, transkripčnom faktore MafK.
2. Druhým cieľom bola amplifikácia a izolácia plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag v bunkách *Escherichia coli* DH5 α s následným stanovením koncentrácie a čistoty izolovaného plazmidu.
3. Dôležitým cieľom bol návrh vhodného plazmidu na expresiu génu kódujúceho proteín MafK v bunkách *E. coli* BL-21 (DE3).
4. Ďalšou úlohou tejto bakalárskej práce bolo vykonať expresiu a pilotnú izoláciu proteínu MafK z prokaryotického systému buniek *E. coli* BL-21 (DE3).
5. Záverečný cieľ tejto bakalárskej práce bol charakterizovať získaný preparát s obsahom proteínu MafK a zhodnotiť vhodnosť použitej izolačnej metódy.

3 Prístroje, materiál a metódy

3.1 Použité prístroje

Analytické váhy:	HM-200, A&D Instruments LTD
Autokláv:	Varioklav 400E, H+P Labortechnik
Bezdotykový kahan:	Gasprofi2 SCS, VLD-TEC
Centrifúgy:	5451 R, Eppendorf Allegro X-22R, Beckman Coulter Stolová minicentrifúga Gilson, GmC Lab Ultracentrifúga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter K70D, MLW
Chromatografická kolóna:	Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare
Elektroforetická aparátúra:	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad MiniVE Vertical Electrophoresis System, GE Healthcare
HPLC systém:	ÄKTAbasic system, Amersham
Inkubátory:	EVA-LS1-MT-S, VLM Mini Rocker MR-1, BioSan ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp Raven 2 Incubator, LTE
Laboratórne trepačky:	G-25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific SHO-2D, Witeg Multitron Pro, INFORS HT
Laboratórne váhy:	440-35N, KERN EK600H, A&D Instruments LTD
Laminárny box:	BIO 126, Labox
Magnetická miešačka:	KMO2 basic, IKA
Termocyklér:	FTGENE2D Tech-gene, Techne
Spektrofotometer:	DS-11 Spectrophotometer, DeNovix Sunrise™, TECAN Trading AG
Transiluminátor:	Dark Reader, Clare Chemical Research
Ultrazvukový homogenizátor:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Aparátúra na Western blot:	Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad
Zdroj pre elektroforézu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham

3.2 Použitý materiál a chemikálie

Agilent Technologies, USA:

- Quick Fusion Cloning Kit: 5-krát koncentrovaný pufo Fusion Buffer, enzým Fusion Enzyme

Biorad, USA:

- Persíran amónny (APS), Precision Plus Protein™ Unstained Standard, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Clontech, USA:

- TALON Metal Affinity Resin

Fluka, Švajčiarsko:

- Akrylamid, dodecylsulfát sodný (SDS), fenylmetánsulfonyl (PMSF), lysozym, N,N-metylén-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris), 2-merkaptóetanol

INVITROGEN, USA:

- SYBR SAFE™ DNA gel stain

LACHEMA BRNO, ČR:

- Brómfenolová modrá, chlorid sodný (NaCl), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA)

Lach-Ner, ČR:

- Glycerol, kyselina octová

New England BioLabs, USA:

- Pufo HF Phusion, Phusion HF DNA polymerasa, pufo CutSmart (50 mM octan draselný, 20 mM Tris-acetát, 10 mM octan horečnatý, 100 µg/ml BSA, pH 7,9), restričné endonukleázy NdeI a XhoI, 2-Log DNA Ladder, Loading Dye Purple 6x (2,5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,08% SDS, 0,02% Dye 1, 0,0008% Dye 2, pH 8,0)
- Monarch DNA Gel Extraction Kit: rozpúšťací pufo Monarch Gel Dissolving Buffer, premývací pufo Monarch DNA Wash Buffer (s prídavkom 20 ml etanolu na 5 ml pufru), extrakčné kolónky Monarch Cleanup Columns, elučný pufo Monarch DNA Elution Buffer

OXOID LTD, Anglicko:

- Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract

Penta, ČR:

- Hydrogenfosforečnan didraselný (K_2HPO_4), glycín

Promega, USA:

- 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (BCIP), nitro blue tetrazolium (NBT)

QIAGEN, USA:

- QIAprep Spin Miniprep Kit (250): Pufor P1 (resuspendačný pufor s obsahom nedefinovanej RNázy), Pufor P2 (lyzačný pufor), Pufor N3 (neutralizačný pufor), Pufor PE (premyvaci pufor s prídavkom 220 ml etanolu na 275 ml pufu PE), Pufor EB (elučný pufor), QIAprep Spin Columns (kolónky na izoláciu DNA)

SERVA Electrophoresis, Nemecko:

- Ampicilín, N,N,N',N'-tetrametyletán-1,2-diamín (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250

SIGMA, USA:

- Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), Luria-Bertani Agar, Luria-Bertani Broth

Stratagen, USA:

- Bakteriálne kmene *E. coli* BL-21 (DE3) a *E. coli* DH5 α

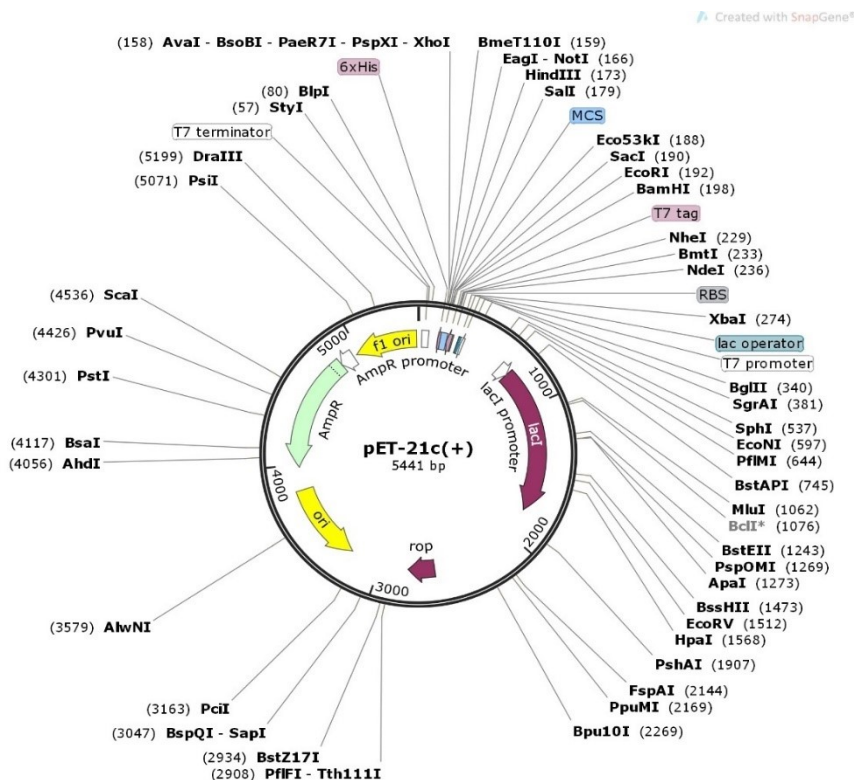
Thermo Scientific, USA:

- Pierce BCA Protein Assay Kit: BCA Reagent A (uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bicinchoninová, vínan sodný v 0,1 M hydroxide sodnom); BCA Reagent B (4% síran meďnatý), Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml: 10 x 1 ml ampula obsahujúca hovädzí sérový albumín o koncentrácii 2 mg/ml v 0,9% fyziologickom roztoku a 0,05% azide sodnom)

Plazmid pET-21c(+):

Plazmid pET-21c(+) pozostáva z 5441 párov báz (bp). Obsahuje 861 bp veľký gén rezistencie voči antibiotikám ako ampicilín či karbenicilín. Zároveň obsahuje T7 promotor a T7 terminátor. Sú to sekvencie počiatku a konca pôsobenia T7 RNA polymerázy. Gén pre T7 RNA polymerázu je do baktérie *E. coli* vnesený prostredníctvom bakteriofága T7 a je pod kontrolou *lac* operonu. T7 RNA polymerasa je vysoko účinná polymerasa, vďaka ktorej sú gény umiestnené za T7 promotorom intenzívne exprimované. To je využité aj v prípade expresie génu kódujúceho proteín MafK (viď kapitola 3.3.8). Dôležitá súčasť plazmidu pET-21c(+) je *lac* operon a jeho *lac* operátor, na ktorý je v neprítomnosti induktora (laktosa, IPTG) viazaný *lac* respresor, brániaci transkripcii génu pre T7 RNA polymerasu v *E. coli*.⁷⁰

Po prídavku induktora je gén pre T7 RNA polymerasu exprimovaný a T7 RNA polymerasa riadi expresiu génov za T7 promotorom.



Obr. č.5: Mapa plazmidu pET-21c(+) zobrazená softvérom SnapGene Viewer 3.3.3⁷⁰

Na mape plazmidu pET-21c(+) sú číslom 158 resp. 236 znázornené miesta štiepenia restriknými endonukleasami XhoI resp. NdeI. Fialový rámček s označením 6xHis znázorňuje histidínovú kotvu. Priesvitný rámček T7 promoter znázorňuje T7 promotor, na ktorý nasadá T7 RNA polymerasa v procese transkripcie. Zelená šípka s označením AmpR znázorňuje gén rezistencie voči ampicilínu.

Príprava LB agaru

Navážka 2,5 g Luria Agar bola rozpustená v 100 ml destilovanej vody. Rozpustený Luria-Bertani Agar bol prevedený do zásobnej fľaše a sterilizovaný.

Príprava LB média

Navážka 4,0 g Luria-Bertani Broth bola rozpustená v 100 ml destilovanej vody. Rozpustený Luria-Bertani Broth bol prevedený do zásobnej fľaše a sterilizovaný.

Príprava antibiotika ampicilín

Navážka 200 mg ampicilínu bola rozpustená v 2 ml destilovanej vody. Rozpustené antibiotikum bolo prefiltrované pomocou injekčnej striekačky cez membránový filter s veľkosťou pórov 0,2 µm do sterilnej skúmavky Eppendorf.

Príprava TB média

Navážka 48 g Bacto Tryptone a 96 g Bacto Yeast Extract bola rozpustená v 3,6 l destilovanej vody. Tento objem bol rozdelený do 8 Erlenmayerových baniek po 450 ml. Banky boli uzatvorené kovovou fóliou a sterilizované. Navážky 9,2 g KH_2PO_4 a 50 g K_2HPO_4 boli rozpustené v 300 ml destilovanej vody. Tento roztok bol prefiltrovaný cez filtračný papier do zásobnej fľaše. Po prídavku 32 ml 50% glycerolu bola zásobná fľaša uzatvorená a sterilizovaná. Po sterilizácii bolo do každej Erlenmayerovej fľaše pridaných 50 ml roztokov fosfátov a glycerolu.

Príprava 0,5 M IPTG

Navážka 1,192 g IPTG bola rozpustená v 10 ml destilovanej vody. Rozpustené IPTG bolo pomocou injekčnej striekačky prefiltrované cez membránový filter s veľkosťou pórov 0,2 μm do sterilnej skúmavky.

Sterilizácia médií

Pripravené médiá boli sterilizované nasýtenou vodnou parou pri teplote 121°C po dobu 20 minút (Varioklav 400E, H+P Labortechnik).

Sekvencia tzv. „primerov“ (krátkych syntetických oligonukleotidov komplementárnych ku vybranej nukleotidovej sekvencii) pre PCR amplifikáciu génu MafK:

„Primery“ pre PCR amplifikáciu génu MafK boli špeciálne navrhnuté podľa protokolu pre komerčnú metódu „InFusion“ klonovania, ktorej výsledkom bolo zavedenie klonovaného génu MafK do vektoru pET-21c(+) s histidínovou kotvou. Červenou farbou označená časť sekvencie je vždy 15 báz homologických s koncovou sekvenciou vlákna plazmidu ako si pre pozitívny výsledok vyžaduje metóda „InFusion“. Čiernou farbou písaná a podčiarknutá je sekvencia komplementárna k replikovanému vláknu génu MafK.

Primer pre vedúce vlákno génu MafK:

5- AAGGAGATATACATATGACGACTAATCCCAAGCCCAAC-3 (21 báz, zastúpenie GC 52,4%, Teplota nasadania „primerov“ $T_m=64,6^\circ\text{C}$)

Primer pre komplementárne vlákno génu MafK:

5- GGTGGTGGTGCTCGAGGGAGGCGGCTGAGAAGGGTAC-3 (21 báz, zastúpenie GC 66,7%, Teplota nasadania „primerov“ $T_m=67,8^\circ\text{C}$)

3.3 Použité metódy

3.3.1 Príprava plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag na transformáciu buniek *E.coli* DH5 α

Zo spolupracujúceho japonského laboratória profesora Kazukiho Igarashiho (Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan) bol prijatý plazmid pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag s inkorporovaným génom pre transkripčný faktor MafK. Plazmid bol prijatý na filtračnom papieri, na ktorý bol nanosený v objeme 10 μ l. Filtračný papier bol vákuovo zabalený. Cieľom prípravy plazmidu pre transformáciu buniek *E.coli* DH5 α bolo jeho prevedenie z filtračného papiera do kvapálneho média. Celý proces bol vykonaný v laminárnom boxe (BIO 126, Labox). Filtračný papier bol pomocou sterilizovaných nožníc odbalený, malý kúsok papiera s plazmidom odstrihnutý a sterilnou pinzetou prenesený do sterilnej skúmavky. Následne bolo do skúmavky napipetovaných 50 μ l pufro s označením EB. Jedná sa o pufor komerčného pôvodu a nedefinovaného zloženia, ktorý je súčasťou sady roztokov, tzv. kitu (QIAprep Spin Miniprep kit 250) od spoločnosti QIAGEN. Pufor EB je využívaný ako elučný pufor v procese izolácie namnoženého plazmidu z transformovaných buniek (viď kapitola 3.3.3). Skúmavka obsahujúca pufor EB a plazmid imobilizovaný na filtračnom papieri bola vložená do inkubátora (EVALS1-MT-S, VLM) temperovaného na 40°C a inkubovaná po dobu dvoch hodín. Týmto spôsobom bol plazmid prevedený z filtračného papiera do pufro EB.

3.3.2 Transformácia buniek *E. coli* BL-21 (DE3) a *E. coli* DH5 α

Prvým krokom transformácie kompetentných buniek, *E. coli* DH5 α resp. BL-21 (DE3), bola príprava selektívneho kultivačného média, 1,5% LB agaru (viď kapitola 3.2), na platne. Sterilný LB agar bol rozpustený pomocou zahrievania v mikrovlnnej rúre. Po miernom ochladení bol prenesený do laminárneho boxu, kde bol vykonaný nasledujúci postup. Rozpustený LB agar bol v objeme 20 ml prevedený do 50 ml sterilnej skúmavky Falcon. Do 20 ml LB agaru bolo napipetovaných 20 μ l antibiotika ampicilín s koncentráciou 100 mg/ml (príprava viď kapitola 3.2). Obsah skúmavky Falcon bol premiešaný a na dve sterilné Petriho misky bolo aplikovaných po 10 ml LB agaru s ampicilínom. Ampicilín v kultivačnom médiu slúži ako selektívna zložka, dovoľujúca kultiváciu buniek rezistentných voči ampicilínu. Bunky získavajú rezistenciu voči určitému antibiotiku napríklad procesom transformácie, kedy je nositeľom rezistencie plazmid prijatý z prostredia. Petriho misky obsahujúce LB agar boli

ponechané v laminárnom boxe na vodorovnej ploche za laboratórnej teploty až do vychladnutia agaru.

Bunky *E. coli* boli rozmrazené v nádobe s vodou a ľadom. Potom boli premiestnené do laminárneho boxu (BIO 126, Labox), kde pokračoval postup práce nasledovne. Boli pripravené dve sterilné mikroskúmavky Eppendorf. Do oboch bolo napipetovaných 30 µl príslušných buniek *E. coli* a do jednej bolo pridaných 5 µl plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag alebo pET-21c(+)/MafK-His-tag. Obsah mikroskúmavky bez plazmidu slúžil ako negatívna kontrola. Mikroskúmavky boli uzavreté a po dobu 10 minút inkubované na ľade.

Následne boli mikroskúmavky premiestnené do laminárneho boxu, kde bolo do každej pipetovaných 200 µl LB média (príprava viď kapitola 3.2). Po premiešaní bol celý obsah skúmaviek prevedený na jednotlivé agarové platne a rozotrený po celej ploche. Po vsiaknutí suspenzie do agaru boli platne uzatvorené parafilmom, otočené dnom nahor a umiestnené do inkubátoru (Raven 2 Incubator, LTE) s prednastavenou teplotou 37°C. Platne boli inkubované po dobu 18 hodín. Potom bola platňa s plazmidom porovnaná s platňou obsahujúcou negatívnu kontrolu bez plazmidu a bola umiestnená do chladničky, pripravená na ďalšie použitie.

3.3.3 Izolácia plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag alebo pET-21c(+)/MafK-His-tag

Agarová platňa obsahujúca kolónie transformovaných buniek *E. coli* DH5α (viď kapitola 3.3.2) bola umiestnená do laminárneho boxu. Do pripravenej skúmavky Falcon bolo prevedených 10 ml LB média a napipetovaných 10 µl antibiotika ampicilín s koncentráciou 100 mg/ml. Pomocou sterilného špáradla a pinzety bola z agaru vybraná stredne veľká kolónia transformovaných buniek a bola prenesená do pripraveného LB média s ampicilínom. Skúmavka s obsahom bola uzavretá a umiestnená do laboratórnej trepačky (G-25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific), kde bola za podmienok 37°C a 220 RPM inkubovaná po dobu 18 hodín. Kultivácia bola ukončená centrifugáciou (Allegro X-22R, Beckman Coulter) za podmienok 22°C, 4500 RPM po dobu 10 minút.

Po ukončení centrifugácie bolo médium nad usadenými bunkami zo skúmavky odstránené. Izolácia plazmidu z palety buniek pokračovala za pomoci kitu spoločnosti QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep kit 250). Bunky boli resuspendované v 250 µl pufru P1 zo súpravy QIAprep Spin Miniprep kit 250. Resuspendácia bola vykonaná opatrným premiešavaním pufru P1 s usadenými bunkami pomocou pipety. Resuspendované bunky boli pipetované do vopred pripravenej sterilnej mikroskúmavky Eppendorf. Ďalším krokom bolo pridanie 250 µl pufru P2 zo súpravy QIAprep Spin Miniprep kit 250 k resuspendovaným bunkám. Skúmavkou bolo šesťkrát opatrne otočené, suspenzia bola premiešaná a ponechaná

pôsobeníu pufru P2 po dobu 5 minút. Následne bolo pridaných 350 µl neutralizačného pufru N3 zo súpravy QIAprep Spin Miniprep kit 250. Suspenzia bola intenzívne premiešaná pričom boli zreteľne viditeľné zrazeniny zvyškov bunkových štruktúr. Za účelom oddelenia zrazenín od supernatantu obsahujúceho DNA bola vykonaná centrifugácia (5451 R, Eppendorf). Za podmienok 13 000 RPM po dobu 10 minút boli centrifugáciou zrazeniny usadené na dno mikroskúmavky a supernatant obsahujúci plazmidovú DNA bol pipetou prevedený na membránu izolačnej kolónky QIAprep Spin Column zo súpravy QIAprep Spin Miniprep kit 250. Kolónka bola umiestnená v mikroskúmavke do centrifúgy na 1 minútu pri 13 000 RPM. Médium tak bolo prepustené cez membránu a DNA zachytená na membráne. Potom bolo na membránu aplikovaných 750 µl pufru PE zo súpravy QIAprep Spin Miniprep kit 250, obsahujúceho etanol na prečistenie zachytenej DNA. Opäť bola vykonaná centrifugácia, dvakrát po dobu 1 minúty pri otáčkach 13 000 RPM. Tým bol odstránený reziduálny etanol s nečistotami a DNA bola pripravená na posledný krok izolácie. Na membránu bolo aplikovaných 50 µl elučného pufru EB zo súpravy QIAprep Spin Miniprep kit 250. Takto bola membrána ponechaná po dobu 1 minúty a následne vykonanou centrifugáciou pri 13 000 RPM 1 minútu bola prevedená vyizolovaná plazmidová DNA do sterilnej mikroskúmavky Eppendorf.

3.3.4 Sekvenácia génu MafK

Vzorky plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag resp. pET-21c(+)/MafK-His-tag boli pripravené na sekvenáciu génu MafK, vykonanú v externom laboratóriu (OMICs Genomika, BIOCEV), ktoré má k dispozícii komerčne dostupné „primery“ pre sekvenáciu génov vložených v pET plazmidoch. Do mikroskúmaviek Eppendorf bolo pipetovaných 5 µl plazmidu a 2 µl sterilnej destilovanej vody. Takto boli pripravené tri duplikáty vzoriek. Jeden duplikát zahŕňal dve mikroskúmavky s identickou vzorkou, jednou na sekvenáciu vedúceho vlákna DNA a druhou na sekvenáciu komplementárneho vlákna. Vzorky boli odoslané do laboratória a výsledky sekvenácie boli vyhodnotené prostredníctvom počítačového softvéru Seq Scanner Software 2 od spoločnosti Applied Biosystems. Získaná nukleotidová sekvencia génu kódujúceho MafK bola prostredníctvom internetovej domény <http://translate-protein.com/> preložená do poradia aminokyselín tvoriacich proteín MafK. Získaná sekvencia aminokyselín proteínu MafK bola porovnaná so sekvenciou aminokyselín myšieho MafK uvedenou v databáze proteínov <http://www.uniprot.org/> (viď Obrázok č.6 resp. 8). Porovnanie bolo vykonané prostredníctvom internetovej domény <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

3.3.5 Prenesenie génu pre MafK z vektoru pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag do vektoru pET-21c(+) s histidínovou kotvou tzv. His-tag komerčnou metódou „InFusion“

„InFusion“ klonovanie bolo použité na zavedenie histidínovej kotvy na koniec génu MafK inkorporáciou PCR namnoženého génu MafK do linearizovaného vektora pET-21c(+) obsahujúceho His-tag.

Najskôr boli pripravené všetky komponenty polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Do mikroskúmavky Eppendorf bolo pipetovaných 32,5 μl sterilnej destilovanej vody, 10 μl 5-krát koncentrovaného pufru HF Phusion (New England BioLabs, USA), 1 μl média obsahujúceho štyri typy dNTP a ióny Mg^{2+} , po 2,5 μl „primerov“ pre obe vlákna (navrhnuté „primery“ vid' kapitola 3.2) a 0,5 μl Phusion HF DNA polymerázy (New England BioLabs, USA). Mikroskúmavka bola uzatvorená a vložená do termocykléru (FTGENE2D Tech-gene, Techne). Následne boli nastavené parametre amplifikačného programu. Prvý krok PCR, denaturácia DNA bola nastavená na dobu 1 minúta pri teplote 96 °C. Druhý krok zahŕňal 10 sekúnd pri teplote 96°C a následné ochladenie na teplotu 64°C po dobu 20 sekúnd pre nasadenie „primerov“. Nasledovala syntéza komplementárneho vlákna pri 70°C po dobu 70 sekúnd ako koniec jedného cyklu. Počet cyklov bol nastavený na 35 cyklov. Po poslednom cykle bola finálna fáza nastavená na 8 minút pri 72°C s konečným chladením na 4°C.

Linearizovaný vektor, do ktorého bol neskôr začlenený klonovaný gén MafK, bol pripravený restriktčným štiepením. Do mikroskúmavky Eppendorf bolo pipetovaných 17 μl plazmidového vektora pET-21c(+)/AfGcHK-His-tag, 2 μl 10-krát koncentrovaného pufru CutSmart (zloženie vid' kapitola 3.2) a po 0,5 μl restriktčnej endonukleázy NdeI a XhoI. Zmes bola inkubovaná pri teplote 37°C po dobu 1 hodiny. Produkty restriktčného štiepenia a produkt PCR reakcie boli analyzované a vyhodnotené pomocou agarózovej elektroforézy.

Agarózová elektroforéza produktov PCR a restriktčnej analýzy bola vykonaná nasledovne. Prvý krok bola príprava roztoku 1% agarózy navážením 0,4 g agarózy a jej rozpustením v 40 ml TAE pufru (0,04 M Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,2). Rozpustenie bolo urýchlené zahrievaním v mikrovlnnej rúre a občasným miešaním. Do rozpustenej a ochladenej agarózy boli napipetované 4 μl 10 000-krát koncentrovaného farbiva SYBR SAFE™ DNA gel stain. Po premiešaní bola agaróza prenesená do aparatury, kde bol následne vložený hrebeň na vytvorenie dávkovacích jamiek. Po vychladnutí gélu bola vanička s gélom premiestnená do elektroforetickej aparatury. Aparatúra bola následne naplnená pufrom TAE.

Do mikroskúmaviek Eppendorf boli pripravené vzorky a marker na elektroforézu. Marker bol pripravený napipetovaním 1 μl štandardu 2-Log DNA Ladder, 1 μl 6-krát

koncentrovaného farbiva Loading Dye, 4 μ l destilovanej vody a dávkovaný na jamku gélu v objeme 6 μ l. Vzorka štiepeného plazmidu pET-21c(+)/AfGcHK-His-tag bola pripravená napipetovaním 20 μ l štiepiacej zmesi a 4 μ l 6-krát koncentrovaného farbiva Loading Dye. Vzorka produktu PCR bola pripravená napipetovaním 20 μ l štiepiacej zmesi a 4 μ l 6-krát koncentrovaného farbiva Loading Dye. Vzorka produktu PCR bola pripravená v pôvodnej koncentrácii aj 10-krát zriedená. Okrem markeru boli všetky vzorky dávkované do jamiek gélu v objeme 24 μ l. Elektroforéza prebiehala po dobu 30 minút s vloženým napätím 110 V. Agarózový gél bol potom premiestnený na transiluminátor (Dark Reader, Clare Chemical Research) a vyhodnotený.

Izolácia DNA sekvencie MafK a linearizovaného vektoru z agarózového gélu bola vykonaná podľa nasledujúceho postupu. Boli pripravené a odvážené dve sterilné mikroskúmavky Eppendorf. Z výsledného agarózového gélu boli pomocou skalpela postupne vyrezané pruhy zodpovedajúce DNA sekvencii MafK v pôvodnej koncentrácii a linearizovanému vektoru pET-21c(+) (viď Obrázok č.7. kapitola 4.1). Vyrezané segmenty gélu boli premiestnené do vyššie uvedených skúmaviek Eppendorf. Skúmavky boli opäť zvážené a z rozdielu hmotností naplnených a prázdnych skúmaviek bola zistená hmotnosť agarózového gélu. Vzhľadom k tejto hmotnosti bolo do skúmavky so sekvenciou génu pre MafK pipetovaných 358 μ l pufru Monarch Gel Dissolving Buffer zo súpravy Monarch DNA Gel Extraction Kit a do skúmavky s linearizovaným plazmidom pET-21c(+) 715 μ l toho istého pufru. Skúmavky boli umiestnené do inkubátoru (EVA-LS1-MT-S, VLM) s prednastavenou teplotou 50°C a za občasného miešania bola agaróza rozpustená. Obsah skúmaviek bol pipetou prevedný na membránu extrakčných kolóniek Monarch DNA Cleanup Columns zo súpravy Monarch DNA Gel Extraction Kit. Nasledovala centrifugácia 1 minútu pri 13 000 RPM (5451 R, Eppendorf). Na membráne zachytená DNA bola dvakrát premytá 200 μ l 5-krát koncentrovaného premývacieho pufru Monarch DNA Wash Buffer zo súpravy Monarch DNA Gel Extraction Kit s 1 minútovou centrifugáciou pri 13 000 RPM. Potom bola každá kolónka umiestnená do sterilnej mikroskúmavky. Na membránu bolo aplikovaných 6 μ l elučného pufru Monarch DNA Elution Buffer zo súpravy Monarch DNA Gel Extraction Kit, ktorý pôsobil 1 minútu a následne bola DNA vymytá z membrány prostredníctvom centrifugácie pri 13 000 RPM 1 minútu. Koncentrácia a čistota získanej plazmidovej DNA pET-21c(+)/MafK-His-tag bola stanovená pomocou spektrofotometra DeNovix DS-11 (viď kapitola 3.3.6). Získané koncentráty boli následne použité v tzv. „InFusion“ klonovacej reakcii.

Na záver bola vykonaná tzv. InFusion klonovacia reakcia použitím súpravy Quick Fusion Cloning Kit (Agilent Technologies, USA). Do mikroskúmavky Eppendorf bolo pipetovaných 1,2 µl koncentráту linearizovaného vektoru pET-21c(+), 0,2 µl koncentrátu DNA sekvencie génu MafK, 2 µl 5-krát koncentrovaného pufru Fusion Buffer, 1 µl enzýmu Fusion Enzyme a 5,6 µl sterilnej destilovanej vody. Obsah skúmavky bol inkubovaný pri teplote 37°C po dobu 30 minút. Výsledný produkt „InFusion“ reakcie, plazmid pET-21c(+)/MafK-His-tag bol amplifikovaný v bunkách *E. coli* DH5α (viď kapitola 3.3.2), izolovaný (viď kapitola 3.3.3) a podrobený sekvenácii (viď kapitola 3.3.4) na overenie správnosti sekvencie génu MafK a úspešného zavedenia histidínovej kotvy His-tag. Koncentrácia a čistota získanej plazmidovej DNA pET-21c(+)/MafK-His-tag bola stanovená pomocou spektrofotometra DeNovix DS-11 (viď kapitola 3.3.6).

3.3.6 Spektrometrické stanovenie koncentrácie plazmidovej DNA na spektrofotometri DeNovix DS-11

Pre stanovenie koncentrácie a čistoty plazmidovej DNA v roztoku bola využitá metóda „dsDNA“ v mikroobjeme na prístroji DeNovix DS-11. Koncentráciu plazmidovej DNA v roztoku určuje prístroj na základe merania absorbancie pri 260 nm podľa vzťahu:

$$c = \frac{A \cdot CF}{l},$$

kde c je koncentrácia plazmidovej DNA v roztoku v jednotkách $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, A je absorbancia pri 260 nm, CF je prepočítavací faktor v jednotkách $\text{ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (pre dvojreťazcovú DNA bola výrobcom stanovená hodnota tohto faktoru $CF = 50 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a l je šírka absorpčného prostredia v jednotkách cm. Hodnota absorbancie $A_{260}=1$ pri $l=1$ je úmerná koncentrácii DNA 50 ng/µl. Čistota plazmidovej DNA je vyjadrená ako pomer absorbancie preparátu pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm ($A_{260/280}$). $A_{260/280}$ v intervale 1,6 až 2,0 indikuje čistú DNA bez kontaminácie proteínmi.

Ako „blank“ bola použitá deionizovaná voda. Boli aplikované 2 µl „blanku“ a následne rovnaké množstvo vzorky pET-21c(+)/MafK-His-tag resp. pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag a premeraná koncentrácia a čistota plazmidovej DNA.

3.3.7 Expresia proteínu MafK v bunkách *E. coli* BL-21 (DE3)

Bunky *E. coli* BL-21 (DE3) boli transformované s plazmidom pET-21c(+)/MafK-His-tag, postupom uvedeným v kapitole 3.3.2. Potom bola v laminárnom boxe (BIO 126, Labox) pripravená skúmavka Falcon, do ktorej bolo napipetovaných 5 ml LB média a 5 µl ampicilínu

v koncentrácii 100 mg/ml. Z agarovej platne s kolóniami transformovaných buniek *E. coli* BL-21 (DE3) bola vybraná stredne veľká kolónia a prostredníctvom sterilného špáradla a pinzety bola prenesená do média v skúmavke. Táto jednobunková kolónia v médiu bola inkubovaná v laboratórnej trepačke (G-25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) pri podmienkach 37°C, 220 RPM, 18 hodín. Média potrebné na kultiváciu boli pripravené podľa popisu v kapitole 3.2.

Podľa popisu v kapitole 3.2 boli pripravené 4 l TB média a rozdelené po 0,5 l do 8 Erlenmayerových baniek s objemom 2 l. Erlenmayerové banky boli uzatvorené hrubou vrstvou kovovej fólie a sterilizované v prístroji autoklav (Varioklav 400E, H+P Labortechnik). Po sterilizácii bolo za aseptických podmienok do každej banky napipetovaných 500 µl ampicilínu s koncentraciou 100 mg/ml. Obsah baniek bol zľahka premiešaný. Do TB média s ampicilínom bolo napipetovaných 500 µl suspenzie jednobunkovej kolónie transformovaných buniek v LB médiu ako je uvedené v odstavci vyššie. Banky s daným obsahom boli inkubované v laboratórnej trepačke (Multitron Pro, INFORS HT) pri podmienkach 37°C, 180 RPM. Čas inkubácie bol závislý na meraní optickej denzity OD₆₀₀ (DeNovix DS-11) buniek *E. coli* v médiu. Pre ďalší postup a možnosť úspešnej indukcie expresie proteínu v bunkách bolo potrebné, aby optická denzita OD₆₀₀ nadobudla hodnotu v intervale 0,6 až 1,2. Tento interval nebol dosiahnutý pretože neprebehlo spoľahlivé meranie optickej denzity. Príčinou bola rýchla sedimentácia buniek v médiu a nemožnosť odberu reprezentatívnej vzorky. Prvotná kultivácia buniek v TB médiu bola ukončená po 5,5 hodinách, ktoré boli pri iných experimentoch expresie proteínov v bunkách *E. coli* BL-21 (DE3) v našom laboratóriu dostatočujúce na nárast optickej denzity do požadovaného intervalu hodnôt. Táto fáza kultivácie bola dokončená zmenou podmienok inkubácie na 15°C a 120 RPM po dobu 1 hodiny. Po uplynutí tejto doby a ukončení inkubácie bolo odobraných 50 µl média s bunkami. Odobraný objem slúžil ako vzorka na SDS-PAGE elektroforézu, pomocou ktorej bola neskôr overená účinnosť expresie porovnaním vzorky média pred indukciou a po vykonaní indukcie expresie génu pre proteín MafK.

Expresia génu pre MafK bola indukovaná pridaním 100 µl 0,5 M IPTG (príprava vid' kapitola 3.2) do baniek s médiom a bunkami po ukončení kultivácie. Banky boli umiestnené do laboratórnej trepačky (Multitron Pro, INFORS HT) a expresia prebiehala po dobu 17 hodín pri teplote 15°C a 150 RPM. Expresia génu kódujúceho proteín MafK bola ukončená centrifugáciou (K70D, MLW) 45 minút pri teplote 4°C a 3000 RPM. Pred centrifugáciou bolo odobraných 50 µl vzorky média s bunkami po indukcii, neskôr použitých na SDS-PAGE

elektroforézu. Usadené bunky boli po centrifugácii odvážené, hmotnosť zaznamenaná a uskladnené v skúmavke Falcon pri -80°C v mraziacom boxe, pripravené na ďalšie použitie.

3.3.8 Izolácia proteínu MafK z buniek *E. coli* BL-21 (DE3)

Bunky s proteínom MafK boli za laboratórnej teploty rozmrazené. K bunkám v skúmavke Falcon bolo pridaných 25 ml resuspendačného pufru (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,2 mg/ml lysozym, pH 8,0). Skúmavkou bolo opatrne otáčané čím boli bunky v pufri resuspendované. Potom bola suspenzia prevedená do kadičky s magnetickým miešadlom. Kadička bola umiestnená v nádobe s ľadom na magnetickú miešačku (KMO2 basic, IKA). Do suspenzie v kadičke bola čiastočne ponorená ultrazvuková sonda (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Metódou ultrazvukovej sonikácie boli narušené štruktúry buniek za účelom uvoľnenia ich obsahu vrátane proteínu MafK. Sonikácia bola vykonaná pri amplitúde 55% v 6 cykloch po 1 minúte sonikácie s 45 sekundovou prestávkou. Potom bola suspenzia prevedená do dvoch ultracentrifugačných kyviet a nasledovala centrifugácia (Ultracentrifúga OptimaTM LE-80K, Beckman Coulter) 1 hodinu pri teplote 4°C a 55 000 RPM. Z oboch fáz, supernatantu aj usadeniny zvyškov buniek boli odobrané 50 μl vzorky na polyakrylamidovú SDS elektroforézu. Supernatant bol prevedený do čistej plastovej nádoby a proces izolácie pokračoval afinitnou chromatografiou.

3 ml média Talon v roztoku etanolu boli centrifugované pri 4°C a 750 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Etanol bol odstránený sponad usadeného Talonu a bolo pridaných 6 ml pufru A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0) na ekvilibráciu Talonu. Bola zopakovaná centrifugácia a odstránenie pufru A. Následne boli pridané 3 ml nového pufru A, v ktorom bol Talon premiešaný. Do plastovej nádoby so supernatantom obsahujúcim proteín MafK s histidínovou kotvou boli pridané 3 ml média Talon v pufri A. Obsah nádoby bol premiešaný, nádoba bola uzavretá parafilmom a umiestnená na inkubátor, kde bola inkubovaná 1 hodinu pri teplote 4°C za stáleho miešania (Mini Rocker MR-1, BioSan). Počas inkubácie bola na stojan pripravená čistá chromatografická kolónka s fritou a bola premytá približne 100 ml destilovanej vody. Po ukončení inkubácie bol celý obsah plastovej nádoby obsahujúcej Talon a supernatant s proteínom MafK prevedený na fritu chromatografickej kolónky. Kvapalná zložka zmesi bola prepustená cez kolónku a bola odobraná vzorka na polyakrylamidovú SDS elektroforézu. Následne bolo plastovým kvapkadlom aplikovaných 50 ml pufru A, ktorým bol Talon premytý. Z eluovaného pufru A bola odobraná vzorka na polyakrylamidovú SDS elektroforézu. Potom bolo na Talon aplikovaných 15 ml elučného pufru (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 200 mM Imidazol pH 8,0). Eluát bol odobraný do 15 ml

skúmavky Falcon v plnom objeme. Z eluátu bola odobraná vzorka na polyakrylamidovú SDS elektroforézu.

Eluát bol prevedený zo skúmavky Falcon do skúmavky Milipore. Skúmavka Milipore slúži na zakoncentrovanie proteínu pomocou membrány o definovanej porozite. V tomto prípade bola použitá skúmavka s membránou schopnou zadržať proteíny molekulej hmotnosti vyššej než 10 kDa. Eluát v skúmavke Milipore bol postupným centrifugovaním (Allegro X-22R, Beckman Coulter) pri podmienkach 4°C, 4000 RPM, 2 minúty, zakoncentrovaný na výsledný objem približne 500 µl. 50 µl koncentrátu bolo odobraných ako vzorka na polyakrylamidovú SDS elektroforézu. Ďalej nasledovala metóda gélovej chromatografie.

Chromatografická separácia bola vykonaná na chromatografickej kolóne Superdex 200 Increase 10/300 GL od spoločnosti GE Healthcare so spektrometrickou detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm. Prvým cieľom bolo odstránenie reziduálneho imidazolu zo zakoncentrovaného preparátu proteínu MafK. Zároveň bolo cieľom odseparovať monomér MafK od prípadných multiméryných foriem či komplexov.

Cez dávkovač bolo do chromatografickej aparatúry (ÄKTAbasic system, Amersham) nadávkovaných 250 µl koncentrátu MafK z afinitnej chromatografie. Separácia bola vykonaná za prietoku mobilnej fázy (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) 0,7 ml/min a tlaku 1,8 MPa. Spektrometrická detekcia a z nej vyplývajúci absorpčný profil separovaných zložiek eluátu poskytuje možnosť odobratia frakcií eluátu v správnom elučnom objeme s požadovanou zložkou absorbujúcou žiarenie v tomto prípade pri vlnovej dĺžke 280 nm. Ako bolo neskôr zistené proteín MafK absorbuje žiarenie pri vlnovej dĺžke 280 nm minimálne. Počas analýzy boli preto odobrané frakcie s objemom 400 µl v širokom rozsahu elučného objemu 12,88 až 25,68 ml. Zo všetkých odobraných frakcií boli odobrané vzorky na polyakrylamidovú SDS elektroforézu s cieľom určiť, ktoré frakcie obsahujú proteín MafK.

3.3.9 Polyakrylamidová elektroforéza v prostredí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Do aparatúry na prípravu gélu boli tesne oproti sebe umiestnené a priprevnené dve sklá. Do kadičky bol pripravený roztok pre vznik 12% polyakrylamidového gélu napipetovaním a premiešaním 4,5 ml pufri A (0,375 M Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,8), 3,0 ml polymeračného roztoku A (30% akrylamid, 0,8% BIS v pufri A), 7,5 µl TEMED-u a 75 µl 100 mg/ml persíranu amónneho. Po premiešaní bol roztok dávkovaný pipetou do priestoru medzi sklami. Roztok bol prevrstvený destilovanou vodou a ponechaný polymerovať približne 30 až 45 minút. Po vytvorení gélu bola voda odstránená a zvyšné kvapky odsaté pomocou filtračného papiera.

Následne bol do čistej kadičky pripravený roztok pre vznik 4% zaostrovacieho gélu napipetovaním a premiešaním 2,6 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 6,8), 400 µl polymeračného roztoku B (30% akrylamid, 0,8% BIS v pufri B), 3,0 µl TEMED-u a 60 µl 100 mg/ml persíranu amónneho. Po premiešaní bol roztok okamžite pipetou navrstvený na vzniknutý separačný gél až po vrchný okraj skiel. Do roztoku bol vložený hrebeň na vytvorenie dávkovacích jamiek. Po vytvorení zaostrovacieho gélu boli sklá s gémi premiestnené do elektroforetickej aparatury (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad). Prostredie aparatury bolo naplnené elektródovým pufrom (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycín, 0,1% SDS, pH 8,3). Hrebeň zo zaostrovacieho gélu bol odstránený. Vzorky a marker boli pripravené a dávkované do jamiek podľa nižšie uvedenej tabuľky (vid' tabuľka č.2). Pred dávkovaním boli vzorky zahriate v inkubátore (EVA-LS1-MT-S, VLM) na teplotu 100°C po dobu 5 minút. Dávkovanie bolo vykonané za pomoci striekačky typu Hamilton. Následne bola aparatura uzatvorená a pripojená ku zdroju elektrického napätia. Elektroforéza bola spustená pri vloženom napätí 200 V a trvala 70 minút.

Po ukončení elektroforézy bola aparatura odpojená od zdroja napätia a sklá s gélom premiestnené na Petriho misku. Zaostrovací gél bol odstránený a separačný gél bol premiestnený do čistej Petriho misky, kde bol inkubovaný s farbiacim roztokom (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% etanol, 9,2% kyselina octová). Gél bol farbený za stáleho miešania (SHO-2D, Witeg) po dobu dvoch hodín. Potom bol farbiaci roztok odstránený a gél bol inkubovaný s odfarbovacím roztokom (25% etanol, 10% kyselina octová), ktorý bol v priebehu nasledujúcich štyroch hodín dvakrát vymenený za nový. Po dostatočnom odfarbení gélu od prebytočnej farby bol gél uskladnený v Petriho miske v destilovanej vode. Gél bol následne vyhodnotený.

Číslo vzorky	Objem vzorky (μl)	Objem destilovanej vody (μl)	Objem 4x konc. redukujúceho pufri (μl)	Dávkovací objem (μl)
1	10	-	-	10
2	10	5	5	5
3	5	10	5	5
4	5	10	5	5
5	5	10	5	5
6	15	-	5	5
7	15	-	5	5
8	15	-	5	5
9	15	-	5	5
10	15	-	5	5

Tabuľka č.2: Príprava vzoriek a dávkovacie objemy pre SDS-PAGE elektroforézu

Zloženie 4-krát koncentrovaného redukujúceho pufri: 0,25 M Tris-HCl, 8% SDS, 40% glycerol, 20% 2-merkaptoetanol, 0,012% brómfenolová modrá, pH 6,8

Vzorka č.1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards

Vzorka č.2: Vzorka pred indukciou expresie génu MafK (pred pridaním IPTG)

Vzorka č.3: Vzorka po indukcií expresie génu MafK (po pridaní IPTG)

Vzorka č.4: Vzorka sedimentu expresných buniek E. coli BL-21 (DE3)

Vzorka č.5: Vzorka supernatantu izolovaného z expresných buniek E. coli BL-21 (DE3)

Vzorka č.6: Vzorka supernatantu, ktorý neinteragoval s afinitným nosičom Talon

Vzorka č.7: Vzorka pufri A, ktorým bola premytá afinitná kolónka

Vzorka č.8: Vzorka eluátu z afinitnej chromatografie

Vzorka č.9: Vzorka zakoncentrovaného preparátu s proteínom MafK

Vzorka č.10: Vzorky frakcií č. 1 až 11 odobraných z gélovej chromatografie

3.3.10 Western blot

Na detekciu proteínu MafK, resp. jeho histidínovej kotvy bola využitá metóda Western blot s SDS elektroforézou. Proteíny vo vzorkách (príprava vzoriek vid' tabuľka č.3) boli separované polyakrylamidovou SDS elektroforézou na dvoch géloch (postup vid' kapitola 3.3.9). Medzičasom bolo pripravených 40 kusov filtračného papiera o rozmeroch 10,5 x 7 cm a dva kusy nitrocelulózovej membrány o rozmeroch 8,5 x 5 cm. Na anódy blotovacej aparatury boli položené dve osobitné vrstvy po 10 filtračných papierov namočených v prenosovom pufri (celkový objem 500 ml, 7,2 g glycín, 1,5 g Tris, 10% metanol, pH 8,3). Na tieto vrstvy boli položené nitrocelulózové membrány a na ne polyakrylamidové gély. Navrch boli položené ďalšie 2 osobitné vrstvy po 10 filtračných papierov namočených v prenosovom pufri. Aparatúra

bola skompletizovaná pripojením katód navrch navrstvených materiálov a vložení elektród do prístroja na Western blot (Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad). Elektroforetický prenos proteínov z gélu bol uskutočnený za vloženeho napätia 25 V v čase 15 minút. Následne boli membrány prenesené do Petriho misiek s prídavkom 1% roztoku hovädzieho sérového albumínu v TBS pufri (1 g BSA rozpustený v 100 ml TBS pufri) a takto boli blokován voľné miesta membrány po dobu 20 minút. Potom bol TBS pufo s hovädzím sérovým albumínom odstránený a membrány 2-krát opláchnuté pufrom TBS-TWEEN 20-TRITON X100 (celkový objem 1 l, 29,22 g NaCl, 2,42 g Tris, 2 ml TRITON X100, 0,5 ml TWEEN 20, 0,65 g NaN₃, pH 7,5) a 1-krát pufrom TBS (celkový objem 1 l, 8,76 g NaCl, 1,21 g Tris, 0,65 g NaN₃, pH 7,5). Každý oplach trval 5 minút. 2 µl myších monoklonálnych protilátok proti histidínovej kotve proteínu (His-tag proteínu MafK) boli zriedené v 10 ml 1% roztoku hovädzieho sérového albumínu v TBS pufri pre každú membránu, aplikované na membránu a spolu inkubované po dobu 1 hodiny. Potom bol vykonaný oplach membrán ako po blokovaní jej voľných miest. Následne boli zriedené 2 µl kozích polyklonálnych protilátok značených alkalickou fosfatásou, proti myšim monoklonálnym protilátkam v 10 ml roztoku 10 % sušeného odtučneného mlieka v TBS pufri pre každú membránu. Kozie protilátky boli inkubované s oboma membránami po dobu 1 hodiny. Následne bol vykonaný 3-krát 5 minútový oplach membrán TBS pufrom. Do 10 ml AP pufri (celkový objem 500 ml, 150 mM NaCl, 100 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, pH 9) bolo pipetovaných 66 µl nitro blue tetrazolium a 33 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu, objem bol premiešaný a aplikovaný na membránu. Takto boli membrány inkubované po dobu 5 minút. Membrány boli potom uskladnené v destilovanej vode a vyhodnotené.

Číslo vzorky	Objem vzorky (μl)	Objem destilovanej vody (μl)	Objem 4x konc. redukujúceho pufri (μl)	Dávkovací objem (μl)
1	8	-	-	8
2	5	-	-	5
3	10	5	5	5
4	5	10	5	5
5	0,4	29,6	10	5
6	5	10	5	5
7	15	-	5	5
8	15	-	5	5
9	15	-	5	5
10	15	-	5	5
11	15	-	5	5

Tabuľka č.3: Príprava vzoriek a dávkovacie objemy pre SDS-PAGE s následnou metódou Western blot

Vzorka č.1: Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Vzorka č.2: Štandard-globínová doména proteínu AfGcHK (19kDa)

Vzorka č.3: Vzorka pred indukciou expresie génu MafK (pred pridaním IPTG)

Vzorka č.4: Vzorka po indukcií expresie génu MafK (po pridaní IPTG)

Vzorka č.5: Vzorka sedimentu expresných buniek E. coli BL-21 (DE3)

Vzorka č.6: Vzorka supernatantu izolovaného z expresných buniek E. coli BL-21 (DE3)

Vzorka č.7: Vzorka supernatantu, ktorý neinteragoval s afinitným nosičom

Vzorka č.8: Vzorka pufri A, ktorým bola premytá afinitná kolónka

Vzorka č.9: Vzorka eluátu z afinitnej chromatografie

Vzorka č.10: Vzorka koncentrátu obsahujúceho proteín MafK

Vzorka č.11: Vzorky frakcií č. 1 až 11 odobraných z gélovej chromatografie

3.3.11 Stanovenie celkovej koncentrácie proteínu v preparáte obsahujúcom proteín

MafK metódou BCA

Na stanovenie celkovej koncentrácie proteínu v preparáte obsahujúcom proteín MafK bola použitá sada roztokov a štandardu Pierce BCA Protein Assay Kit od spoločnosti Thermo Scientific. Stanovenie bolo vykonané na 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke. Do osobitných jamiek bolo napipetovaných 10 μl roztoku štandardu hovädzieho sérového albumínu o koncentráciách: 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 mg/ml. Štandardy boli pipetované v duplikátoch s rovnakou koncentráciou vždy do dvoch za sebou nasledujúcich jamiek. Napokon bolo do troch za sebou nasledujúcich jamiek napipetovaných po 10 μl preparátu s obsahom proteínu MafK. Do skúmavky Falcon bolo napipetovaných 5,39 ml činidla BCA

Reagent A (hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný, bicinchoninová kyselina (BCA), vinan sodný, 0.1 mol.⁻¹ hydroxid sodný) a 107,8 µl činidla BCA Reagent B (4% síran meďnatý). Obsah skúmavky bol premiešaný a do jamiek obsahujúcich príslušné štandardy a preparát s proteínom MafK bolo pipetovaných 320 µl tejto zmesi. Mikrotitračná doštička bola následne umiestnená do spektrofotometra (SunriseTM, TECAN Trading AG) a bola meraná absorbanca vzniknutého farebného komplexu pri vlnovej dĺžke 562 nm. Na základe absorbanie vzniknutého farebného komplexu v štandardných roztokoch hovädzieho sérového albumínu prístroj vykonal zostrojenie kalibračnej závislosti. Vyplývajúc z kalibračnej závislosti a absorbanie komplexu vzniknutého v preparáte bola získaná hodnota celkovej koncentrácie proteínu v preparáte s obsahom proteínu MafK.

3.3.13 UV/VIS spektroskopia

Koncentrovaný preparát obsahujúci proteín MafK získaný z afinitnej chromatografie bol 10-krát nariedený a 2 µl aplikované do spektrofotometra DeNovix DS-11. Na prístroji DeNovix DS-11 bolo použitím metódy UV/VIS v mikroobjeme premerané UV/VIS spektrum preparátu obsahujúceho proteín MafK (vid' kapitola 4.4, Obrázok č.13).

4 Výsledky

4.1 Príprava vhodného vektoru pre expresiu proteínu MafK

Na produkciu a následnú izoláciu transkripčného faktoru MafK bolo potrebné namnoženie plazmidu pET-21c(+) obsahujúceho gén kódujúci MafK. Plazmid pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag nám bol zaslaný z japonského laboratória profesora Kazukiho Igarashiho (Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan) imobilizovaný na filtračnom papieri. Plazmid bol prevedený do pufračného média podľa postupu v kapitole 3.3.1 a namnožený v bunkách *E. coli* DH5 α (viď kapitola 3.3.2). Transformácia buniek *E. coli* DH5 α s plazmidom pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag na selektívnom kultivačnom médiu LB agar s ampicilínom prebehla úspešne čo sa prejavilo vznikom veľkého množstva kolónii transformovaných buniek (dáta nie sú ukázané). Veľmi dôležitým zistením v tomto kroku práce bola absencia kolónii netransformovaných buniek *E. coli* DH5 α na agarovom médiu obsahujúcom ampicilín v Petriho miskách (dáta nie sú ukázané). Metódou selekcie jednobunkovej kolónie bola stredne veľká kolónia prenesená do kultivačného LB média s ampicilínom. V LB médiu boli bunky kolónie namnožené a zo získanej kultúry bola izolovaná plazmidová DNA (pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag). Izolácia bola vykonaná pomocou izolačnej sady spoločnosti QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit (250)) podľa postupu z kapitoly 3.3.3. Izoláciou bolo získaných 50 μ l plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag v elučnom pufri EB. Na spektrofotometri DS-11 DeNovix bola zmeraná koncentrácia a miera čistoty ($A_{260/280}$) plazmidovej DNA v izolovanom preparáte. Koncentrácia činila hodnotu 149 ng/ μ l a čistota $A_{260/280}=1,98$.

Za účelom overenia prítomnosti a správnosti nukleotidovej sekvencie génu kódujúceho MafK bola vykonaná sekvenačná analýza namnoženého plazmidu. Vzorky plazmidu na sekvenačnú analýzu boli pripravené podľa postupu v podkapitole 3.3.4 a odoslané na sekvenáciu v externom laboratóriu (OMICS Genomika, BIOCEV). Z vyhodnotenia výsledkov (postup viď kapitola 3.3.4) vyplynulo, že sekvencia aminokyselín proteínu MafK, ktorý bol kódovaný génom vloženým vo vektore pET-21c(+) izolovanom z filtračného papiera (viď Obrázok č.6 - dolný riadok) a sekvencia aminokyselín myšieho MafK podľa databázy UniProt (viď Obrázok č.6 - horný riadok) neboli zhodné v počiatočnej oblasti. Gén MafK v sekvenovanom preparáte zahŕňal vloženú sekvenciu nukleotidov, ktorá sa po preložení do poradia aminokyselín proteínu prejavila ako oktapeptid DYKDDDDK na N-konci proteínu MafK. Bolo zistené, že sa jedná o oktapeptid slúžiaci ako proteínová kotva nazývaná FLAG-tag. FLAG-tag ako mnohé iné proteínové kotvy sú zavádzané do proteínov za účelom

jednoduchej detekcie a vizualizácie proteínu. Nesmierne významná je úloha proteínovej kotvy aj v procese izolácie produkovaného proteínu. Keďže je jedným z cieľov tejto práce produkcia a izolácia proteínu MafK prítomnosť značenia FLAG-tag je dôležitá. Vzhľadom na finančnú náročnosť a neskúsenosť práce s proteínmi značenými FLAG-tag v našom laboratóriu bolo prístupné k pokusu preniesť gén pre MafK z vektoru pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag do vektoru pET-21c(+) s histidínovou kotvou (His-tag).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|Q61827|MAFK_MOUSE      -----M--TTNPKPNKALKVKVKEAGENAPVLSDELVSMSVRELNQHLRGLTKEEVTRL
Frame                      MDYKDDDDKTTNPKPNKALKVKVKEAGENAPVLSDELVSMSVRELNQHLRGLTKEEVTRL
                             *****

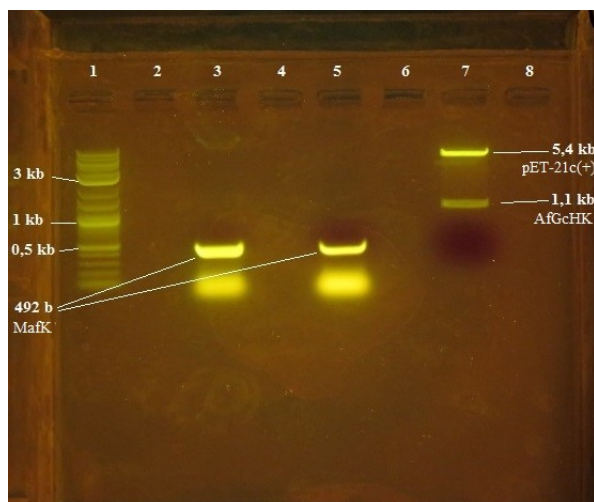
sp|Q61827|MAFK_MOUSE      KQRRRTLKNRGYAASCRIKRVTKQEELERQVVELQQEVEKLARENSSMRLELDALRSKYE
Frame                      KQRRRTLKNRGYAASCRIKRVTKQEELERQVVELQQEVEKLARENSSMRLELDALRSKYE
                             *****

sp|Q61827|MAFK_MOUSE      ALQTFARTVARGPVTPTKVATTSVITIVKSAELSSTSVPPFSAAS
Frame                      ALQTFARTVARGPVTPTKVATTSVITIVKSAELSSTSVPPFSAAS
                             *****

```

Obrázok č.6: Porovnanie sekvencie aminokyselín proteínu MafK-FLAG-tag, ktorý bol kódovaný génom vloženým vo vektore pET-21c(+), izolovanom z filtračného papiera (dolný riadok) a sekvencie aminokyselín myšieho MafK podľa databázy UniProt (horný riadok). Červeným rámcikom je znázornená sekvencia oktapeptidu kotvy FLAG-tag.

Prenesenie génu pre MafK z vektoru pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag do vektoru pET-21c(+) s histidínovou kotvou (His-tag) spočívalo v nasledujúcich krokoch: v namnožení génu kódujúceho MafK pomocou PCR, v získaní linearizovaného vektoru pET-21c(+) restričným štiepením plazmidu pET-21c(+)/AfGcHK-His-tag endonukleázami NdeI, XhoI a vo finálnej spájajúcej klonovacej reakcii „InFusion“ (viď kapitola 3.3.5). Štiepený plazmid pET-21c(+)/AfGcHK-His-tag bol na získanie linearizovaného vektoru použitý preto, lebo je dlhodobo využívaný v našom laboratóriu na expresiu proteínu histidinkinázy s globínovou štruktúrou senzorovej domény (AfGcHK) a má overenú nukleotidovú sekvenciu. Na PCR génu kódujúceho MafK boli navrhnuté špeciálne „primery“, ktorých sekvencia je zobrazená v kapitole 3.2. Produkty PCR a produkty restričného štiepenia boli úspešne separované agarózovou elektroforézou (viď obrázok č.7).



Obrázok č.7: Gél agarózovej elektroforézy produktov PCR a produktov restričného štiepenia
Dĺžka fragmentov je vyjadrená ako počet dusíkatých báz (b) resp. kilobáz (kb).

Dráha č.1: Marker 2-Log DNA Ladder

Dráha č.3: Vzorka génu *MafK* získaného pomocou PCR (*MafK* 492 b)

Dráha č.5: 10-krát zriedená vzorka génu *MafK* získaného pomocou PCR (*MafK* 492 b)

Dráha č.7: Vzorka *pET-21c(+)/AfGcHK-His-tag* po restričnom štiepení *NdeI*, *XhoI* (*pET-21c(+)* 5,4 kb, *AfGcHK* 1,1 kb)

Gén kódujúci *MafK* a vektor *pET-21c(+)* boli vyextrahované z agarózového gélu pomocou extrakčnej sady Monarch DNA Gel Extraction Kit (postup vid' podkapitola 3.3.5). Bol získaný extrakt génu *MafK* o koncentrácii 70 ng/μl a extrakt linearizovaného *pET-21c(+)* o koncentrácii 46 ng/μl. Spájacia klonovacia reakcia (tzv. „InFusion reakcia“) za predpokladaného vzniku plazmidu *pET-21c(+)/MafK-His-tag* bola vykonaná pomocou sady Quick Fusion Cloning Kit. Postup práce je uvedený v kapitole 3.3.5. Výsledkom bol produkt „InFusion“ reakcie s objemom 6 μl.

Získaný produkt „InFusion“ reakcie s predpokladaným obsahom *pET-21c(+)/MafK-His-tag* bol opätovne použitý na transformáciu buniek *E. coli* DH5α postupom z kapitoly 3.3.2. Transformácia buniek *E. coli* DH5α s plazmidom *pET21c(+)/MafK-His-tag* na selektívnom kultivačnom médiu LB agar s ampicilínom prebehla úspešne čo sa prejavilo vznikom kolónii transformovaných buniek (dáta nie sú ukázané). Velmi dôležitým zistením v tomto kroku práce bola absencia kolónii netransformovaných buniek *E. coli* DH5α na agarovom médiu obsahujúcom ampicilín v Petriho miskách (dáta nie sú ukázané). Plazmid bol namnožený zo štyroch vybraných kolónii transformovaných buniek. Namnožený plazmid bol izolovaný z buniek *E. coli* DH5α postupom z kapitoly 3.3.3. Izoláciou boli získané štyri preparáty plazmidu *pET-21c(+)/MafK-His-tag* s objemom 50 μl. Na spektrofotometri DS-11 DeNovix

bola zameraná absorbanca preparátu a stanovená koncentrácia plazmidovej DNA a jej čistota ($A_{260/280}$) v preparátoch (postup vid' kapitola 3.3.6). Koncentrácia DNA a jej čistota v preparátoch bola nasledujúca: 171 ng/ μ l, $A_{260/280}=2,02$; 119 ng/ μ l, $A_{260/280}=1,97$; 109 ng/ μ l, $A_{260/280}=1,92$; 107 ng/ μ l, $A_{260/280}=2,06$. Z $A_{260/280}$ vyplýva, že sa jedná o hraničné hodnoty a je nutné počítať s potenciálnou kontamináciou preparátov reziduálnymi proteínmi. Celkové množstvo vyzolovaného plazmidu v jednotlivých 50 μ l preparátoch bolo 8,55 μ g; 5,95 μ g; 5,45 μ g a 5,35 μ g.

Bolo potrebné overiť či klonovanie „InFusion“ prebehlo správne a či plazmid obsahuje gén kódujúci MafK v správnej nukleotidovej sekvencii so zakončením sekvenciou histidínovej kotvy. Vzorky plazmidu na sekvenačnú analýzu boli pripravené podľa postupu v kapitole 3.3.4 a zaslané na sekvenáciu do externého laboratória (OMICS Genomika, BIOCEV). Výsledky sekvenačnej analýzy boli vyhodnotené postupom z podkapitoly 3.3.4 a porovnané s databázou UniProt (<http://www.uniprot.org/>) rovnakým spôsobom ako v prípade sekvenácie génu kódujúceho MafK v plazmide pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag. Porovnanie nukleotidovej sekvencie génu MafK v pET-21c(+)/MafK-His-tag preloženej do poradia aminokyselín a sekvencie aminokyselín myšieho MafK podľa databázy UniProt je uvedené na obrázku č.8. Z porovnania vyplýva, že aminokyselinová sekvencia, ktorú kódoval gén pre MafK vložený do vektoru pET-21c(+), ktorý bol pripravený metódou spájacej klonovacej reakcie (tzv. „In Fusion“) (vid' Obrázok č.8 - dolný riadok) a aminokyselinová sekvencia myšieho proteínu MafK podľa databázy UniProt (vid' Obrázok č.8 - horný riadok) sú zhodné s malým rozdielom, že aminokyselinová sekvencia kódovaná génom vloženým vo vektore pET-21c(+) obsahuje navyše na C-konci požadovanú histidínovú kotvu. Klonovanie „InFusion“ teda prebehlo podľa očakávania. Gén kódujúci MafK bol úspešne prevedený do vektoru pET-21c(+) obsahujúceho sekvenciu histidínovej kotvy na C-konci a bez značenia FLAG-tag na N-konci. Na obrázku č. 8 je možné vidieť zaradenie dvoch aminokyselín, leucínu a kyseliny glutamovej pred histidínovú kotvu. Ich nukleotidová sekvencia je CTCGAG. Táto sekvencia je miestom pôsobenia restriktívnej endonukleázy XhoI. Prítomnosť restriktívneho miesta XhoI je taktiež pozitívnym výsledkom „InFusion“ reakcie nakoľko špecificky navrhnuté „primery“ (vid' kapitola 3.2) pre PCR boli prispôbené na zavedenie miesta XhoI pred nukleotidovú sekvenciu kódujúcu His-tag. Z výsledkov sekvenačnej analýzy plazmidu vyplýva, že bol namnožený a izolovaný plazmid pET-21c(+)/MafK-His-tag so správnou nukleotidovou sekvenciou génu MafK a preto mohol byť ďalej použitý na expresiu a izoláciu daného proteínu.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|Q61827|MAFK_MOUSE      MTTNPKPNKALKVKKEAGENAPVLSDELVSMSVRELNQHLRGLTKEEVTRLKQRRRTLK
Frame                    MTTNPKPNKALKVKKEAGENAPVLSDELVSMSVRELNQHLRGLTKEEVTRLKQRRRTLK
*****

sp|Q61827|MAFK_MOUSE      NRGYAASCRIKRVTQKEELERQRVELQQEVEKLARENSSMRLELDALRSKYEALQTFART
Frame                    NRGYAASCRIKRVTQKEELERQRVELQQEVEKLARENSSMRLELDALRSKYEALQTFART
*****

sp|Q61827|MAFK_MOUSE      VARGPVTPTKVATTSVITIVKSAELSSTSVPFSAAS--
Frame                    VARGPVTPTKVATTSVITIVKSAELSSTSVPFSAASLEHHHHHH
*****

```

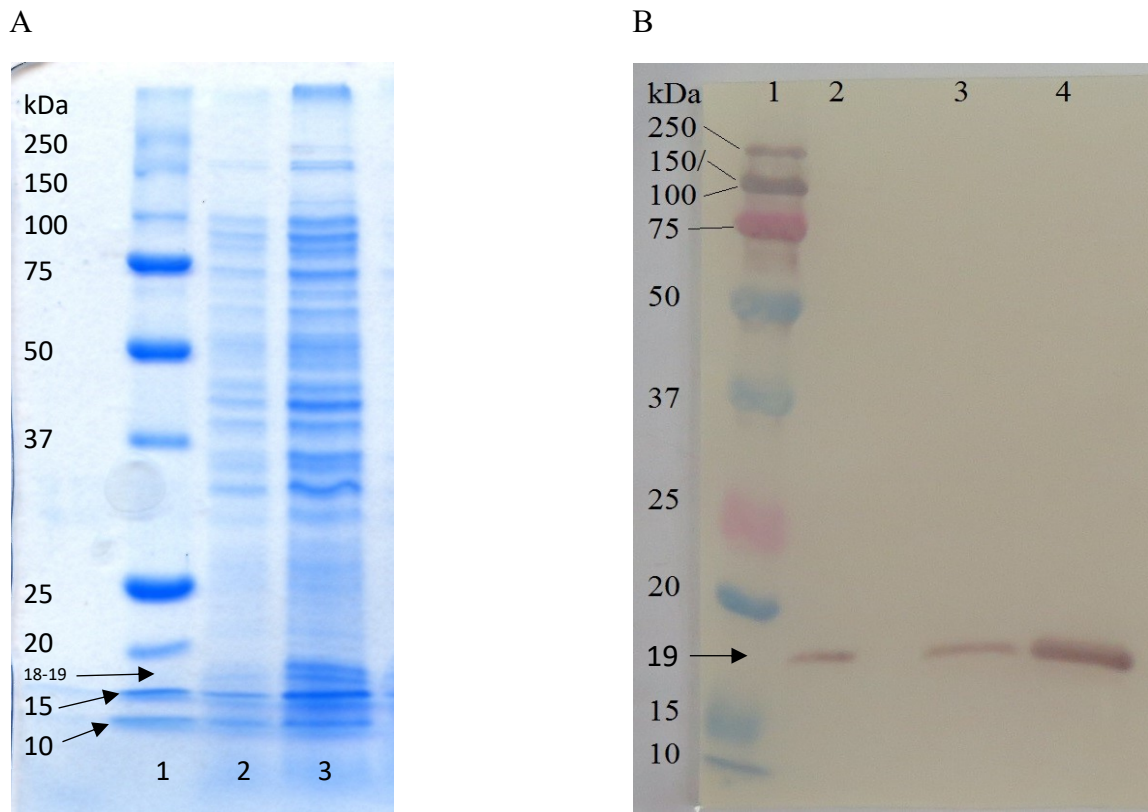
Obrázok č.8: Porovnanie aminokyselinovej sekvenencie proteínu MafK-His-tag, kódovanej génom vloženým vo vektore pET-21c(+) pripravenom metódou spájacej klonovacej reakcie (tzv. „In Fusion“) (dolný riadok), s aminokyselinovou sekvenciou myšieho proteínu MafK podľa databázy UniProt (horný riadok).

Červeným rámečkom je znázornená kotva His-tag.

4.2 Expresia proteínu MafK

Na expresiu proteínu MafK bol použitý preparát plazmidu pET-21c(+)/MafK-His-tag s najvyššou nameranou koncentráciou DNA teda 171 ng/μl (viď predchádzajúca kapitola). Bunky *E. coli* BL-21 (DE3) boli transformované s týmto plazmidom podľa postupu z kapitoly 3.3.2. Procesom kultivácie jednobunkovej kolónie (viď kapitola 3.3.7) v LB médiu s ampicilínom boli namnožené transformované bunky vybranej kolónie a vďaka ampicilínu vyselektované od prípadných netransformovaných buniek. Transformované bunky v LB médiu boli prenesené do TB média s ampicilínom, kde boli inkubované za definovaných podmienok (viď kapitola 3.3.7) aby boli namnožené na potrebné množstvo pre optimálnu produkciu proteínu MafK po indukcii expresie jeho génu. Množstvo bakteriálnych buniek bolo kontrolované meraním optickej denzity pri 600 nm (OD₆₀₀). Optimálne množstvo buniek v TB médiu zodpovedá hodnote OD₆₀₀ 0,6 až 1,2. Tento interval nebol dosiahnutý pretože neprebehlo spoľahlivé meranie optickej denzity. Príčinou bola rýchla sedimentácia buniek v médiu a nemožnosť odberu reprezentatívnej vzorky. Prvotná kultivácia buniek v TB médiu bola ukončená po 5,5 hodinách, ktoré boli pri iných experimentoch expresie proteínov v bunkách *E. coli* BL-21 (DE3) v našom laboratóriu dostačujúce na nárast optickej denzity do požadovaného intervalu hodnôt. Po ukončení prvej fázy kultivácie bola vykonaná indukcia expresie génu kódujúceho proteín MafK. Indukcia bola vykonaná pridaním 100 μl 0,5 M IPTG. Proces expresie bol ukončený centrifugáciou, zvážením získaných buniek čím bola zistená ich hmotnosť a ich uskladnením (postup indukcie viď kapitola 3.3.7). Z celkového objemu 4 l TB média bolo vyprodukovaných celkom 15,3 g buniek *E. coli* BL-21 (DE3) obsahujúcich exprimovaný proteín MafK. Pred indukciou a po indukcii expresie génu MafK boli odobrané

vzorky na SDS elektroforetickú analýzu. Cieľom bola kontrola úspešnosti a miery expresie po indukcii (vid' obrázok č.9 A).



Obrázok č.9 (A): Kontrola expresie proteínu MafK pomocou polyakrylamidovej SDS elektroforézy.

Vzorky boli pripravené a dávkané podľa Tabuľky č.2 v kapitole 3.3.9.

Dráha č.1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards

Dráha č.2: Vzorka pred indukciou expresie proteínu MafK

Dráha č.3: Vzorka po indukcii expresie proteínu MafK (18,6 kDa) pomocou IPTG

Oblasť výskytu proteínov o veľkosti 18 až 19 kDa je vyznačená šípkou.

(B): Overenie prítomnosti proteínu MafK metódou Western blot s monoklonálnymi myšimi protilátkami proti His-tag.

Vzorky na SDS elektroforézu predchádzajúcu Western blot boli pripravené a dávkané podľa Tabuľky č.3 v kapitole 3.3.10.

Dráha č.1: Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Dráha č.2: Štandard-globínová doména proteínu AfGcHK-His-tag (19kDa)

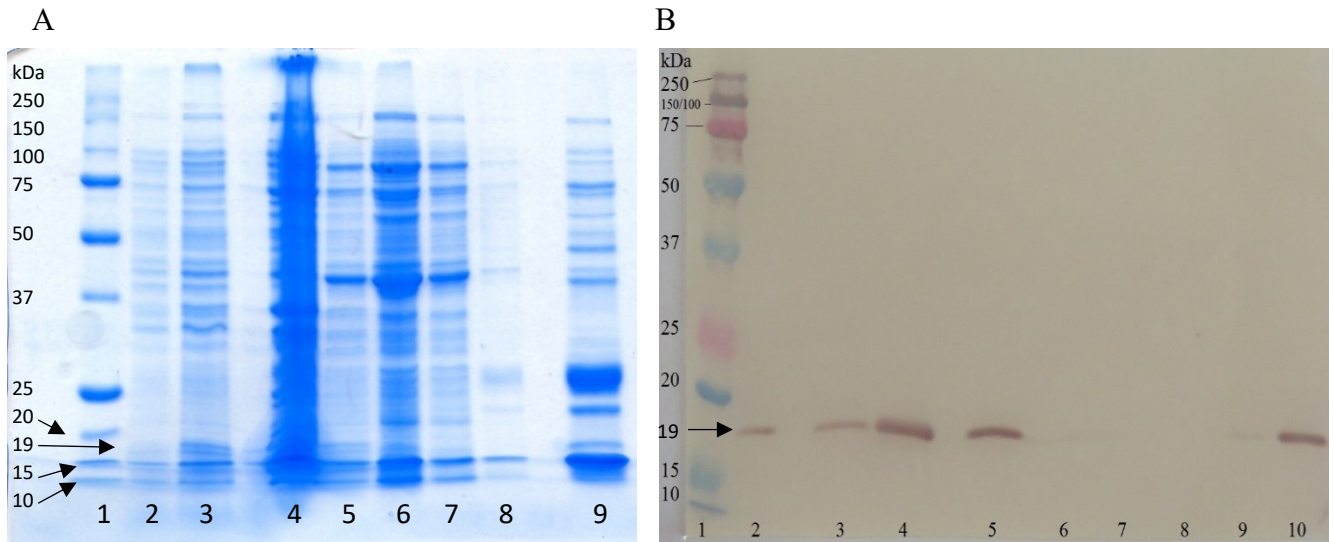
Dráha č.3: Vzorka pred indukciou expresie proteínu MafK

Dráha č.4: Vzorka po indukcii expresie proteínu MafK (18,6 kDa) pomocou IPTG

Výsledok SDS elektroforézy ukazuje, že indukcia expresie bola úspešná, keďže sa v dráhe č.3 na obrázku č.9 A, ktorá zodpovedá analýze vzorky buniek po indukcii expresie MafK proteínu pomocou IPTG vyskytuje línia pravdepodobne zodpovedajúca molekulovej hmotnosti proteínu MafK. Tento výsledok bol potvrdený pomocou Western blotu. Obrázok č.9 B ukazuje, že v dráhe č.4 vzorky po indukcii expresie sa vyskytuje výrazná línia proteínu a táto línia je výraznejšia než v dráhe č.3, kde je analyzovaná vzorka pred indukciou IPTG. Keďže boli proteíny na nitrocelulózovej membráne detekované pomocou myších monoklonálnych protilátok proti značeniu His-tag (postup vid' kapitola 3.3.10) výrazná línia proteínu v dráhe č.4 je pravdepodobne MafK. K tomuto výsledku smeruje aj porovnanie úrovne línie detekovaného proteínu (MafK-18,6 kDa) v dráhe č.4 so štandardom v dráhe č.2 s veľkosťou 19 kDa.

4.3 Izolácia proteínu MafK z buniek *E. coli* BL-21 (DE3)

Bola vykonaná izolácia proteínu MafK z buniek *E. coli* BL-21 (DE3) postupom uvedeným v kapitole 3.3.8. Základnými krokmi izolácie proteínu z buniek boli: resuspendácia buniek, sonikačné rozrušenie štruktúr buniek, afinitná chromatografia a gélová chromatografia. Počas izolácie boli v rôznych krokoch odoberané vzorky, ktoré boli analyzované pomocou SDS elektroforézy (vid' obrázok č.10 A) a metódy Western blot (vid' obrázok č.10 B).



Obrázok č.10 (A): PAGE-SDS elektroforéza vzorky výsledného zakoncentrovaného preparátu MafK po afinitnej chromatografii a vzoriek odoberaných v priebehu expresie a izolácie proteínu MafK

Príprava vzoriek na elektroforézu a dávkovacie objemy sú uvedené v tabuľke č.2 kapitola 3.3.9.

Dráha č.1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards

Dráha č.2: Vzorka pred indukciou expresie MafK

Dráha č.3: Vzorka po indukcii expresie MafK

Dráha č.4: Vzorka zvyškov štruktúr buniek *E. coli* BL-21 (DE3) po sonikácii a centrifugácii

Dráha č.5: Supernatant obsahujúci sonikáciou uvoľnený vnútorný obsah buniek *E. coli* BL-21 (DE3) po expresii

Dráha č.6: Supernatant obsahujúci zložky nezachytené na afinitnom nosiči Talon

Dráha č.7: Pufor A, ktorým bol premytý afinitný nosič Talon s naviazaným proteínom MafK

Dráha č.8: Preparát proteínu MafK z afinitnej chromatografie pred zakoncentrovaním

Dráha č.9: Zakoncentrovaný finálny preparát proteínu MafK

(B): Western blot vzorky výsledného zakoncentrovaného preparátu MafK po afinitnej chromatografii a vzoriek odoberaných v priebehu expresie a izolácie proteínu MafK

Vzorky na SDS elektroforézu predchádzajúcu Western blot boli pripravené a dávkované podľa tabuľky č.3 v kapitole 3.3.10.

Dráha č.1: Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Dráha č.2: Štandard-globínová doména proteínu AfGcHK-His-tag (19kDa)

Dráha č.3: Vzorka pred indukciou expresie MafK

Dráha č.4: Vzorka po indukcii expresie MafK

Dráha č.5: Vzorka zvyškov štruktúr buniek *E. coli* BL-21 (DE3) po sonikácii a centrifugácii

Dráha č.6: Supernatant obsahujúci sonikáciou uvoľnený vnútorný obsah buniek *E. coli* BL-21 (DE3) po expresii

Dráha č.7: Supernatant obsahujúci zložky nezachytené na afinitnom nosiči Talon

Dráha č.8: Pufor A, ktorým bol premytý afinitný nosič Talon s naviazaným proteínom MafK

Dráha č.9: Preparát proteínu MafK z afinitnej chromatografie pred zakoncentrovaním

Dráha č.10: Zakoncentrovaný finálny preparát proteínu MafK

Prítomnosť MafK v preparáte získanom z afinitnej chromatografie bola overená pomocou polyakrylamidovej SDS elektroforézy a metódy Western blot (postup vid' kapitoly 3.3.9 a 3.3.10). Spolu s výsledným preparátom bol analyzovaný priebeh expresie a izolácie proteínu MafK, použitím priebežne odoberaných vzoriek (vid' Obrázok č.10).

Na obrázku č.10 A bola do dráhy č.4 nanosená vzorka zvyškov štruktúr buniek *E. coli* BL-21 (DE3) po sonikácii a centrifugácii. Sonikáciou a centrifugovaním bolo dosiahnuté prevedenie väčšiny obsahu buniek vrátane produkovaného proteínu MafK do kvapálneho média nad usadeninou zvyškov rozbitých štruktúr buniek. Z výsledku na géli SDS-PAGE je zrejmé, že táto vzorka bola nanosená na gél vo veľmi vysokej koncentrácii a obsahovala množstvo nerozpustených a nehomogénnych štruktúr. Veľké množstvo týchto štruktúr bolo proteínovej povahy a preto je zafarbená celá dráha, na ktorej nie je možné rozlíšiť jednotlivé proteíny. Na obrázku č.10 B v dráhe č.5 membrány po Western blote bola po použití tej istej, no zriedenej vzorky protilátkami detekovaná línia, ktorá svojou molekulovou hmotnosťou a prítomnosťou histidínovej kotvy môže zodpovedať proteínu MafK. Z toho vyplýva, že určité množstvo detekovaného proteínu nebolo prevedené do supernatantu.

Vzorka supernatantu získaného po sonikácii a centrifugácii bola nanosená na dráhu č.5 gélu SDS-PAGE (obrázok č.10 A) resp. prenesená na membránu Western blotom (obrázok č.10 B, dráha č.6). Na géli SDS-PAGE je v dráhe č.5 viditeľná slabá línia v oblasti molekulovej hmotnosti 18-19 kDa pravdepodobne zodpovedajúca proteínu MafK. Táto skutočnosť nebola Western blotom potvrdená ani vyvrátená (obrázok č.10 B, dráha č.6). Na nitrocelulózovej membráne nie je výrazne viditeľná línia detekovaného MafK avšak z dôvodu nízkej koncentrácie prejavujúcej sa málo výrazným pruhom na géli SDS-PAGE je možné, že nedošlo k preneseniu proteínu na membránu. Dráha gélu SDS-PAGE č.6 (obr. č.10 A) resp. č.7 na membráne (obrázok č.10 B) obsahovala vzorku supernatantu po aplikácii na afinitný nosič Talon a zahŕňala zložky, ktoré na Talone neboli zachytené. Z pohľadu na obe dráhy je zrejmé, že MafK sa v tejto vzorke nevyskytoval a bol zachytený Talonom. Vzorka pufru A, ktorým bol v objeme 50 ml premytý Talon s naviazaným proteínom MafK bola nanosená na dráhu č.7 gélu SDS-PAGE (obrázok č.10 A) resp. prenesená na dráhu č.8 membrány Western blotu (obrázok č.10 B). Z oboch dráh je možné vylúčiť prítomnosť proteínu MafK. Dráha č.8 gélu SDS-PAGE (obr. č.10 A) resp. č.9 na membráne (obrázok č.10 B) obsahovala vzorku eluátu z afinitného nosiča. Eluát bol získaný použitím elučného pufru s obsahom 200 mM imidazolu. Z gélu SDS-PAGE nebolo možné potvrdiť prítomnosť proteínu MafK (obrázok č.10 A, dráha č.8). Na membráne po Western blote bola detekovaná veľmi málo viditeľná línia proteínu s histidínovou

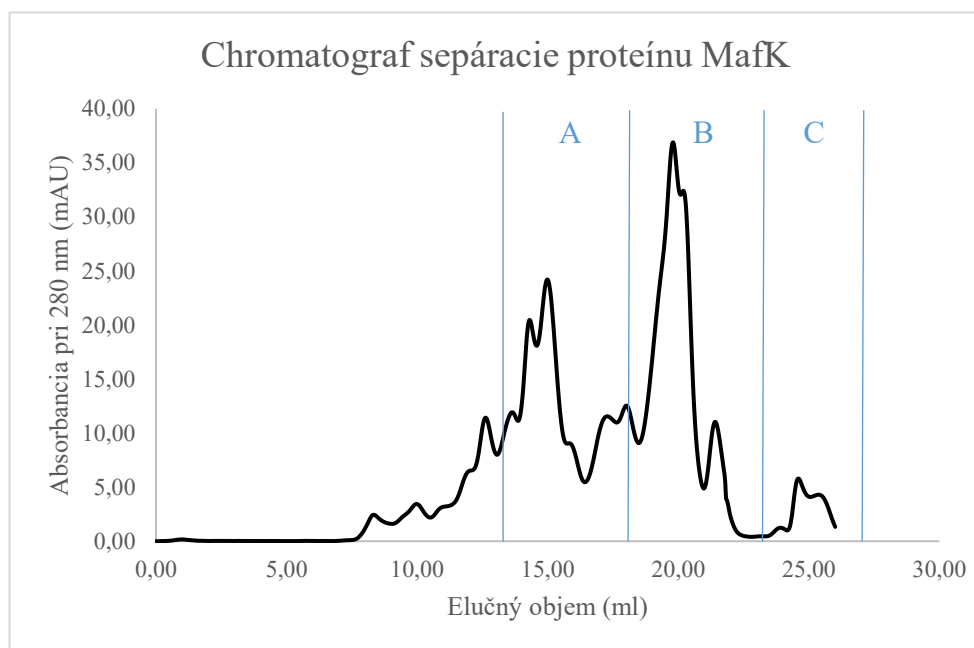
kotvou (obrázok č.10 B, dráha č.9). Preto bol eluát zakoncentrovaný na objem približne 500 μ l a po príprave bola jeho vzorka nanesená na dráhu č.9 na géli (obrázok č.10 A) resp. prenesená na membránu - dráha č.10 (obrázok č.10 B). Detekovaná línia na membráne v dráhe č.10 (obrázok č.10 B) potvrdila prítomnosť MafK vo výslednom preparáte avšak z polyakrylamidovej SDS elektroforézy možno usúdiť, že preparát obsahoval veľké množstvo nečistôt.

Gélová chromatografia bola použitá ako štandardná súčasť procesu izolácie proteínu obsahujúceho His-tag v našom laboratóriu. V kroku afinitnej chromatografie predchádzajúcej gélovej chromatografii bol proteín MafK izolovaný pomocou afinitného nosiča Talon prostredníctvom imidazolových skupín histidínov histidínovej kotvy. Z nosiča bol MafK po premytí pufrom A eluovaný elučným pufrom obsahujúcim imidazol v koncentrácii 200 mM. Výsledný eluát s proteínom MafK tak obsahoval reziduálny imidazol, ktorý mal byť odstránený pomocou gélovej chromatografie. Ďalší význam zaradenia tohto kroku do procesu izolácie (okrem odstránenia imidazolu) bolo finálne prečistenie proteínového preparátu a izolácia proteínu len s definovanou molekulovou hmotnosťou. Gélovou chromatografiou so spektrometrickou detekciou pri 280 nm, kedy absorbujú žiarenie hlavne aromatické aminokyseliny (tyrozín, tryptofán) proteínov, je možné prečistiť preparát proteínu od zvyškových balastných proteínov, multiméryných foriem daného proteínu či iných nežiadúcich látok ako je napríklad spomínaný imidazol. Podľa analýzy početného a percentuálneho zastúpenia aminokyselín v proteíne MafK internetovou doménou <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam> obsahuje MafK iba dve aminokyseliny tyrozín a neobsahuje tryptofán (viď obrázok č.11 A). Táto skutočnosť sa zhodovala s minimálnou schopnosťou MafK absorbovať žiarenie vlnovej dĺžky 280 nm. Z tohto dôvodu nebolo možné MafK spektrometricky detekovať (záznam z gélovej chromatografie viď obrázok č.11 B) a odobrať frakcie čistej monomérskej formy MafK po gélovej chromatografii.

A

Number of amino acids: 164		
Molecular weight: 18602.25		
Theoretical pI: 9.99		
Amino acid composition:		
Ala (A)	14	8.5%
Arg (R)	16	9.8%
Asn (N)	6	3.7%
Asp (D)	3	1.8%
Cys (C)	1	0.6%
Gln (Q)	7	4.3%
Glu (E)	17	10.4%
Gly (G)	4	2.4%
His (H)	7	4.3%
Ile (I)	3	1.8%
Leu (L)	17	10.4%
Lys (K)	14	8.5%
Met (M)	3	1.8%
Phe (F)	2	1.2%
Pro (P)	6	3.7%
Ser (S)	14	8.5%
Thr (T)	14	8.5%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	2	1.2%
Val (V)	14	8.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

B

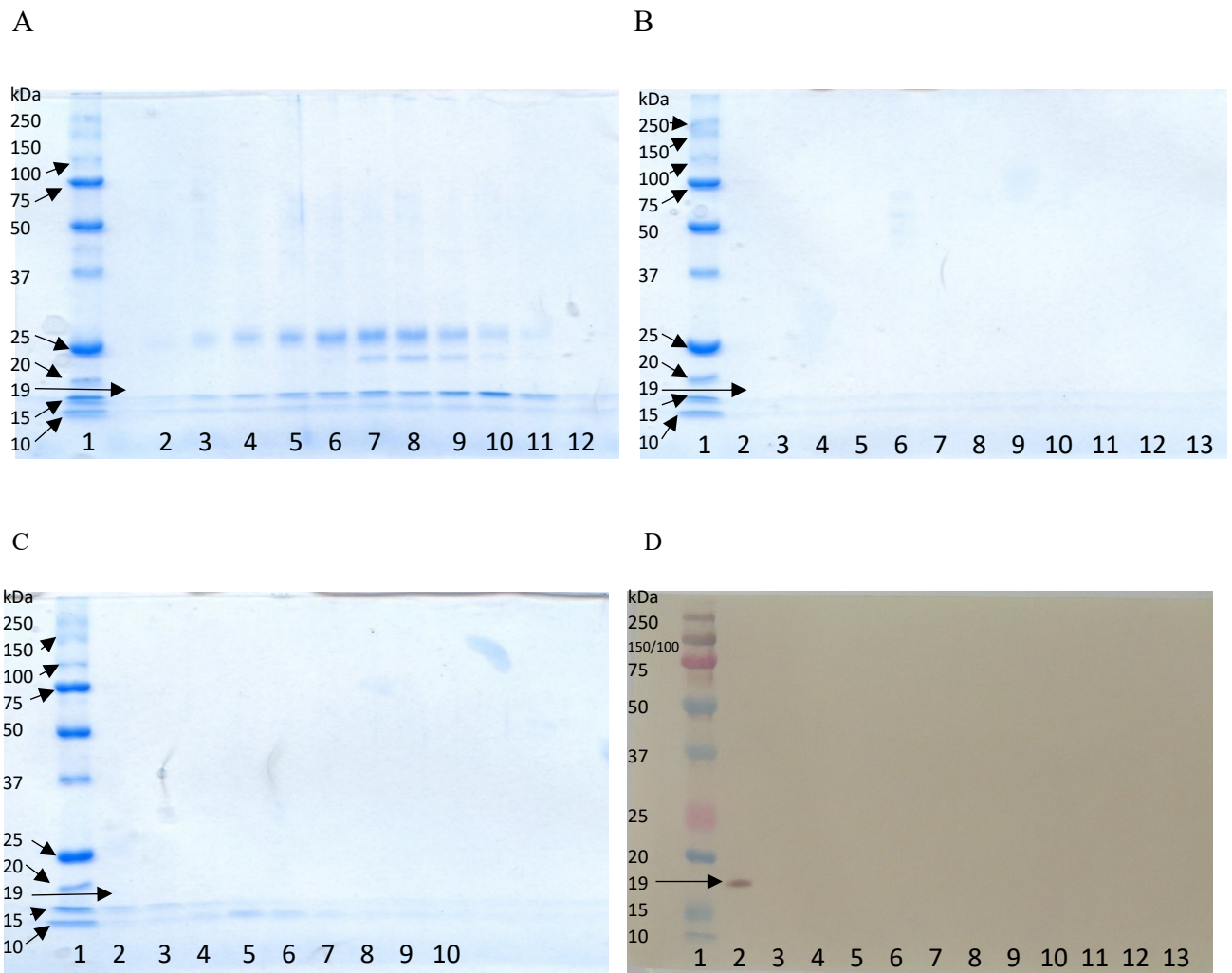


Obrázok č.11 (A): Analýza početného a percentuálneho zastúpenia aminokyselín v proteíne MafK

V červenom rámečku sú označené aminokyseliny tryptofán a tyrozín a ich zastúpenie v proteíne MafK.

(B): Záznam separácie monomérskej formy proteínu MafK gélovou chromatografiou so spektrometrickou detekciou pri 280 nm. Na základe kalibrácie použitej chromatografickej kolóny vykonanej výrobcom, by proteín s molekulovou hmotnosťou cca 18 - 19 kDa (MafK 18,6 kDa) mal byť teoreticky eluovaný v elučnom objeme cca 18 ml. Segmenty v grafe s označením A, B, C zodpovedajú rozsahu frakcií odoberaných z gélovej chromatografie a ich rozdeleniu na jednotlivé gély SDS-PAGE (viď obrázok č.11 (A, B, C)).

Frakcie eluátu gélovej chromatografie boli odoberané po 400 μ l v širokom elučnom rozmedzí 12,88 až 25,68 ml (viď obrázok č.11 B, segmenty A, B, C). Tieto frakcie boli analyzované SDS elektroforézou (postup viď kapitola 3.3.9) s cieľom detekovať monomérsnu formu MafK a zistiť v ktorých frakciách monomér MafK eluoval z chromatografickej kolóny (viď obrázok č.11 B, segmenty A, B, C). Výsledok s pozitívnym dôkazom prítomnosti nedefinovaného proteínu vo frakcii poskytovalo iba počiatkových 11 frakcií (viď obrázok č.12 A). Prítomné neidentifikované proteíny boli analyzované metódou Western blot s cieľom detekovať a vizualizovať His-tag proteínu MafK (viď obrázok č.12 D).



Obrázok č.12: Polyakrylamidová SDS elektroforéza (A, B, C) a Western blot (D) frakcií odobraných po gélovej chromatografii.

Fracie eluované z chromatografickej kolóny boli zbierané v objeme 400 μ l. Celkom bolo odobraných 32 frakcií v rozsahu elučného objemu 12,88 až 25,68 ml. Príprava vzoriek na elektroforézu a dávkovacie objemy sú uvedené v tabuľke č.2 kapitola 3.3.9.

(A): SDS-PAGE počiatkový 11 frakcií z gélovej chromatografie (dráha č.2 až 12). Rozsah elučného objemu 12,88 až 17,28 ml. V dráhe č.1 bol nadávkovaný marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards.

(B): SDS-PAGE frakcií z gélovej chromatografie č.12 až 23 (dráha č.2 až 13). Rozsah elučného objemu 17,28 až 22,08 ml. V dráhe č.1 bol nadávkovaný marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards.

(C): SDS-PAGE frakcií z gélovej chromatografie č.24 až 32 (dráha č.2 až 10). Rozsah elučného objemu 22,08 až 25,68 ml. V dráhe č.1 bol nadávkovaný marker Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards.

(D): Western blot počiatkových 11 frakcií (dráha č.3 až 13) odobraných z gélovej chromatografie.

Dráha č.1: Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Dráha č.2: Štandard-globinová doména proteínu AfGcHK-His-tag (19kDa)

Vzorky na SDS elektroforézu predchádzajúcu Western blot boli pripravené a dávkované podľa tabuľky č.3 v kapitole 3.3.10.

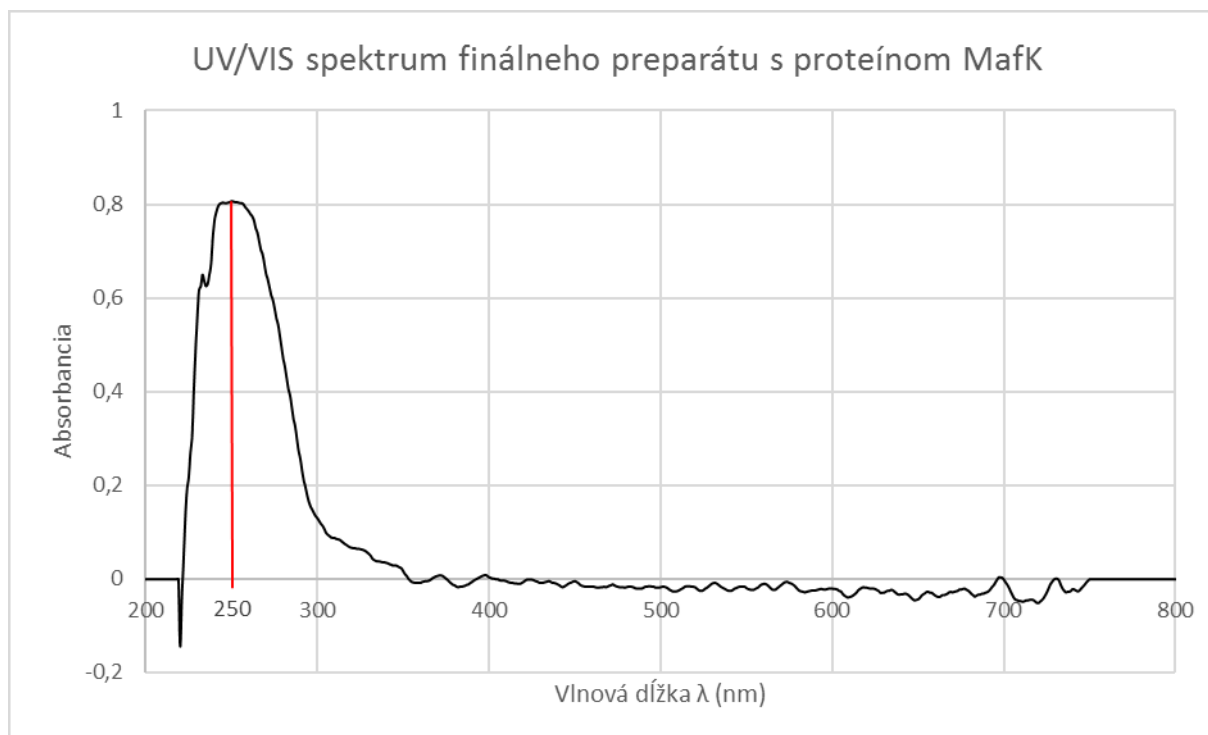
Z výsledku analýzy počiatkových 11 frakcií po gélovej chromatografii metódou Western blot (viď obrázok č.12 D) je zrejmé, že protilátky proti histidínovej kotve nedetkovali za použitých podmienok žiadny proteín s histidínovou kotvou. Za výsledný produkt expresie MafK teda považujeme eluát z afinitnej chromatografie zakonzentrovaný na objem približne 500 μ l (viď kapitola 3.3.8), z ktorého bolo 250 μ l dávkaných na separačnú kolónu gélovej chromatografie. Výsledný objem získaného koncentrovaného preparátu s obsahom MafK bol teda 250 μ l.

4.4 Charakterizácia preparátu s proteínom MafK

Preparát s obsahom proteínu MafK bol charakterizovaný dvomi spôsobmi. Stanovením celkovej koncentrácie proteínu v preparáte a zmeraním UV/VIS spektra.

Celková koncentrácia proteínu v preparáte s proteínom MafK bola stanovená metódou BCA, ktorej princíp je uvedený v kapitole 1.4.11. Stanovenie bolo vykonané pomocou komerčne dostupnej sady činidiel a štandardov hovädzieho sérového albumínu (Pierce BCA Protein Assay Kit). Postup stanovenia je uvedený kapitole 3.3.11. Celková koncentrácia proteínu v preparáte pravdepodobne obsahujúcom proteín MafK činila hodnotu 1,468 mg/ml. Obsah proteínu MafK v preparáte na základe odhadu z SDS elektroforézy (viď obrázok č.10 A) činí približne 5%.

Zmeraním absorbančie preparátu s proteínom MafK v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm bolo získané charakteristické UV/VIS spektrum tohto preparátu (viď obrázok č.13). UV/VIS spektrum bolo merané na spektrofotometri DeNovix DS-11 použitím metódy UV/VIS (viď kapitola 3.3.13).



Obrázok č.13: UV/VIS spektrum finálneho preparátu obsahujúceho proteín MafK. Červená línia označuje absorpčné maximum (250 nm) preparátu obsahujúceho proteín MafK.

5. Diskusia

Základom predkladanej bakalárskej práce je zhrnutie doterajších poznatkov o senzorových proteínoch, ktoré detekujú hem. V rámci tejto oblasti sa práca zaoberá štúdiom senzorového proteínu detekujúceho hem s názvom Bach1 pričom je veľký dôraz kladený na jeho interakčného partnera, proteín MafK. Bach1 patrí medzi represívne transkripčné faktory, ktoré vo svojej aktívnej forme bránia transkripcii cieľových génov čím regulujú ich expresiu.²² V prípade Bach1 sa jedná o reguláciu génu pre enzým hemoxygenáza, ktorý je kľúčový pre degradáciu voľného hemu v bunkách.^{18,29} Pokiaľ je koncentrácia voľného hemu v okolitom prostredí 0,3 až 1 μM a viac, hem začne interagovať s Bach1 a spôsobí tak jeho inaktiváciu, tj. zabráni transkripčnému faktoru Bach1 blokovat' expresiu génu pre hemoxygenázu.²⁹ Tým pádom je gén pre hemoxygenázu exprimovaný a hemoxygenáza riadi degradáciu prebytočného voľného hemu. V prípade fyziologickej koncentrácie voľného hemu v bunke Bach1 s hemom neinteraguje a môže plniť funkciu represora transkripcie génu pre hemoxygenázu. Regulačná funkcia transkripčného faktoru Bach1 sa v súčasných výskumoch ukazuje ako potenciálny faktor vzniku a priebehu mnohých ochorení a z terapeutického hľadiska je dôležitým objektom záujmu. Bach1 je spájaný s mnohými ochoreniami imunitného systému, srdcovo-cievneho systému ako aj respiračného traktu.¹¹ Aby mohla byť modulácia transkripčnej aktivity proteínu Bach1 terapeuticky využitá, je potrebné objasniť presný mechanizmus pôsobenia tohto proteínu s ohľadom na jeho interakciu s hemom a interakčnými partnermi. Presný mechanizmus pôsobenia Bach1 však doposiaľ nebol objasnený a to je jedným z hlavných dôvodov skúmania Bach1 a jeho interakčných partnerov v našom laboratóriu. Pre správnu väzbu Bach1 na regulovaný gén a jeho funkciu je nevyhnutná prítomnosť interakčného partnera MafK.³⁰ Bach1 sám o sebe nie je schopný účinnej väzby na DNA sekvenciu MARE regulačnej oblasti cieľového génu.²² V tejto väzbe mu napomáha transkripčný faktor MafK, ktorý okrem iného pomáha sprostredkovať väzbu na DNA aj iným transkripčným faktorom ako napríklad Nrf2, ktorý pôsobí na gén pre hemoxygenázu ako induktor transkripcie.¹⁸ V súčasnosti bol v našom laboratóriu zameranom na výskum hemových senzorových proteínov započatý výskum transdukcie signálu proteínom Bach1. Pre tento výskum je neodmysliteľné v prvom kroku získať proteíny Bach1 a MafK v čistej forme. Práve na expresiu a pilotnú izoláciu proteínu MafK bola zameraná praktická časť tejto bakalárskej práce.

Od spolupracujúceho laboratória profesora Kazukiho Igarashiho (Graduate School of Medicine, Tohoku University, Department of Biochemistry, 2-1 Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-0872, Japan) sme prijali plazmid obsahujúci gén pre proteín MafK (pET-21c(+)/MafK-

FLAG-tag). Tento plazmid sme amplifikovali pomocou prokaryotického systému buniek *E. coli* DH5 α . Z buniek *E. coli* DH5 α sme vyizolovali plazmid pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag v objeme 50 μ l s koncentráciou 149 ng/ μ l, o čistote $A_{260/280}=1,98$. Hodnota charakterizujúca čistotu získaného plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag $A_{260/280}$ hraničí s hodnotou hornej hranice intervalu definujúceho čistotu plazmidovej DNA. Z toho vyplýva možnosť slabej kontaminácie preparátu plazmidu proteínmi. Pred ďalšou prácou bolo potrebné overiť autentickosť izolovaného plazmidu. V tomto prípade býva bežným postupom restričná analýza plazmidu prostredníctvom enzýmov endonukleáz s následnou agarózovou elektroforézou produktov restričného štiepenia. V našom prípade sme k takému kroku nemohli pristúpiť pretože by bolo potrebné použiť endonukleasy NdeI, XhoI, ale gén kódujúci proteín MafK obsahuje vo svojej nukleotidovej sekvencii restričné miesto zhodné s restričným miestom endonukleázy XhoI. To by spôsobilo nežiadúcu fragmentáciu génu MafK. Preto bol zvolený iný, exaktnejší, no zároveň finančne nákladnejší postup overenia autenticosti daného plazmidu pomocou sekvenačnej analýzy. Izolovaný plazmid pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag bol zaslaný na sekvenačnú analýzu do externého laboratória (OMICS Genomika, BIOCEV). Z vyhodnotenia výsledkov sekvenačnej analýzy vyplynulo, že gén pre proteín MafK neobsahuje žiadnu mutáciu avšak na jeho N-konci je zavedené značenie, konkrétne kotva FLAG. FLAG-tag je jedným z mnohých spôsobov značenia proteínov, ktoré slúžia na ich detekciu alebo izoláciu. Značke FLAG-tag zodpovedá sekvencia ôsmich aminokyselín DYKDDDDK.⁷¹ Výhodou FLAG-tagu je, že vzhľadom k jeho malej veľkosti sa jedná o vysoko špecifickú kotvu, ktorej prítomnosť iba minimálne ovplyvňuje funkciu značeného proteínu. Proteín MafK značený kotvou FLAG-tag bol použitý napríklad v rámci výskumu vplyvu hemu na interakciu Bach1 a MafK.²⁹ Izolácia FLAG-značených proteínov sa v súčasnosti vykonáva použitím komerčných súprav založených na imunoprecipitačnej metóde.⁷² Princípom metódy je využitie monoklonálnych protilátok proti epitopu sekvencie DYKDDDDK, imobilizovaných na pevnom nosiči. Metóda je vysoko špecifická, no zároveň ekonomicky nákladná. Vzhľadom na fakt, že v našom laboratóriu doposiaľ neboli vykonané experimenty s proteínom značeným kotvou FLAG-tag a teda s touto metódou nemáme skúsenosti, rozhodli sme sa vyskúšať či by bolo možné exprimovať a následne izolovať proteín MafK využitím histidínovej kotvy. Použili sme teda plazmid pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag ako zdroj génu pre MafK a preniesli sme ho do iného plazmidu. Nový plazmid bol zvolený tak, aby bolo možné zaviesť na C-koniec proteínu MafK značenie histidínovou kotvou. Histidínová kotva pozostáva zo sekvencie šiestich aminokyselín histidín. Toto značenie bolo zvolené

nakoľko je izolácia takto značeného proteínu ekonomicky menej náročná a v našom laboratóriu s ním bolo v minulosti vykonaných mnoho úspešných experimentov. Príkladom sú experimenty s prokaryotickými proteínmi, napríklad histidínkinázou AfGcHK, ale aj s eukaryotickými proteínmi ako je napríklad hemom regulovaný inhibítor.^{73,74}

Na prenesenie génu pre MafK do nového plazmidu bola použitá tzv. „InFusion reakcia“. Táto reakcia pozostávala z niekoľkých krokov. Prvým krokom bola amplifikácia génu pre MafK polymerázovou reťazovou reakciou. Potom bolo vykonané restričné štiepenie plazmidu pET-21c(+)/AfGcHK obsahujúceho nukleotidovú sekvenciu pre histidínovú kotvu. Restričným štiepením bol úspešne odstránený gén pre proteín AfGcHK a získaný linearizovaný vektor, do ktorého bol neskôr spájacou reakciou „InFusion“ vložený gén pre MafK. Získaný plazmid bol amplifikovaný v prokaryotickom systéme buniek *E. coli* DH5 α a následne vyizolovaný v štyroch preparátoch s objemom 50 μ l v množstve a čistote: 8,55 μ g, $A_{260/280}=2,02$; 5,95 μ g, $A_{260/280}=1,97$; 5,45 μ g, $A_{260/280}=1,92$; 5,35 μ g, $A_{260/280}=2,06$. Z hodnôt charakterizujúcich čistotu plazmidovej DNA $A_{260/280}$ vyplýva, že sa tak ako aj v prípade plazmidu pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag jedná o hraničné hodnoty a je nutné počítať s potenciálnou kontamináciou preparátov reziduálnymi proteínmi. Autenticosť získaného plazmidu bola opätovne overená zaslaním na sekvenačnú analýzu do laboratória OMICS Genomika, BIOCEV. Vyhodnotenie výsledkov potvrdilo správnu sekvenciu génu MafK v novom plazmide a zavedenie histidínovej kotvy. Manipulácia s génom pre MafK bola teda úspešná a bolo možné získaný plazmid pET-21c(+)/MafK-His-tag použiť na expresiu MafK. Proteín MafK bol úspešne exprimovaný v prokaryotickom systéme buniek *E. coli* BL-21 (DE3) (viď obrázok č.9 A). Zo záznamu SDS-PAGE elektroforézy (obrázok č.9 A) je zrejmé, že v oblasti proteínov s molekulovou hmotnosťou 18 až 19 kDa došlo po indukcii expresie pomocou IPTG k viditeľnému nárastu signálu. Na obrázku č.9 B sú analyzované analogické vzorky ako v prípade SDS-PAGE elektroforézy na obrázku č.9 A, ale prenesené metódou Western blot na nitrocelulóзовú membránu s využitím detekcie proteínov protilátkami proti histidínovej kotve. Zo záznamu Western blotu je zrejmé, že expresia bola úspešná. Na membráne je viditeľný nárast signálu detekovaného proteínu s histidínovou kotvou, ktorý má mobilitu podobnú proteínom s molekulovou hmotnosťou cca 19 kDa. Ako štandard bola použitá globínová doména histidínkinázy AfGcHK, ktorá má molekulovú hmotnosť cca 19 kDa a taktiež obsahuje His-tag.⁷⁴ Záznam Western blotu na obrázku č.9 B zahŕňa aj analýzu vzorky pred indukciou expresie, z ktorej vyplynula pozoruhodná skutočnosť. Po indukcii expresie proteínu MafK prostredníctvom IPTG je zrejmé, že intenzita daného proteínu, ktorý má

molekulovú hmotnosť cca 19 kDa a His-tag je výrazne vyššia, avšak v oblasti proteínov s molekulovou hmotnosťou 19 kDa je vidieť slabú líniu detekovaného proteínu aj vo vzorke pred prídavkom IPTG (viď obr. č.9 A dráha č.2 a obr. č.9 B dráha č.3). To svedčí o prítomnosti proteínu s danou molekulovou hmotnosťou ešte pred indukciou expresie. Jednou z príčin prítomnosti proteínu MafK pred indukciou by mohla byť bazálna produkcia proteínu v bunkách. Proteín MafK je cicavčí proteín a bunky *E. coli* by ho teda vo svojom genóme nemali obsahovať. Mohlo by sa tak jednať o produkciu proteínu MafK z použitého plazmidu pET. Tento jav však nie je typický pre plazmidy pET s vloženým génom pre T7 RNA polymerázu, ktorý je pod kontrolou *lac* operonu. Práve táto vlastnosť použitého plazmidu slúži na elimináciu bazálnej produkcie proteínu.⁷⁵ V konečnom dôsledku je málo pravdepodobné, že by v takto konštruovanom plazmide došlo k bazálnej produkcii proteínu avšak táto možnosť nemôže byť na základe nášho doterajšieho výskumu jednoznačne vylúčená. Druhou možnosťou, ktorá by vysvetľovala prítomnosť proteínu s histidínovou kotvou pred indukciou expresie je prítomnosť iného proteínu bohatého na aminokyselinu histidín. Táto úvaha je však taktiež spochybniteľná nakoľko je pravdepodobnosť výskytu proteínu bohatého na histidín s takmer identickou molekulovou hmotnosťou ako má proteín MafK veľmi nízka. Z týchto skutočností vyplýva, že totožnosť a príčina prítomnosti proteínu bohatého na histidín pred indukciou expresie nebola objasnená a jej ozrejmienie bude jedným z ďalších predmetov výskumu proteínu MafK v našom laboratóriu.

Po úspešnej expresii proteínu MafK bola vykonaná jeho izolácia z buniek *E. coli* BL-21 (DE3). Hlavným krokom izolácie bola afinitná chromatografia s použitím afinitného nosiča Talon s viazanými iónmi Co^{2+} . Z Western blotu na obrázku č.10 B dráha č.6 je zrejmé, že vo frakcii supernatantu, z ktorého bol proteín MafK vyviazaný na afinitný nosič Talon nebol detekovaný žiadny nezachytený proteín s histidínovou kotvou. Afinitný nosič Talon sa preto javí ako vhodná a efektívna súčasť procesu izolácie proteínu MafK. Proteín MafK bol z afinitného nosiča Talon eluovaný pomocou pufru s obsahom 200 mM imidazolu. Získaný preparát bol zakoncentrovaný na objem približne 500 μl . Zo záznamu Western blotu na obrázku č.10 B dráha č.10 je zrejmé, že v zakoncentrovanom preparáte bol detekovaný proteín s histidínovou kotvou čo potvrdzuje úspešnosť elučného kroku afinitnej chromatografie. Zároveň však záznam SDS-PAGE elektroforézy na obrázku č.10 A dráha č.9 poukazuje na prítomnosť veľkého množstva nečistôt a reziduálnych proteínov v preparáte. Za účelom odstránenia balastných látok, medzi ktoré patria reziduálne proteíny či imidazol bola v rámci štandardného postupu práce s His-tag značenými proteínmi v našom laboratóriu použitá gélová

chromatografia.⁷⁴ Metódou gélovej chromatografie s vhodným spôsobom detekcie je možné vysoko účinne separovať majoritnú oligomérnu formu proteínu od nežiadúcich zložiek a foriem proteínu v jeho minoritných oligomérnych stavoch.⁷⁶ V našom prípade je obvyklou a jedinou dostupnou metódou spektrometrická forma detekcie pri vlnovej dĺžke 280 nm. Ako je všeobecne známe pri tejto vlnovej dĺžke absorbujú žiarenie najmä aromatické aminokyseliny proteínov, teda tyrozín a tryptofán. Analýza zastúpenia jednotlivých aminokyselín v proteíne MafK (viď obrázok č.11 A) však ukázala, že MafK obsahuje iba dve aminokyseliny tyrozín a žiaden tryptofán. V dôsledku toho proteín MafK absorbuje žiarenie vlnovej dĺžky 280 nm iba minimálne. Záznam z gélovej chromatografie na obrázku č.11 B zodpovedá vyššie uvedeným skutočnostiam a na základe neho je prakticky nemožné určiť elučný objem proteínu MafK. Podľa výsledkov kalibrácie doložených výrobcom použitej kolóny Superdex 200 Increase 10/300 GL od spoločnosti GE Healthcare mal proteín MafK s molekulárnou hmotnosťou 18,6 kDa eluovať z kolóny v elučnom objeme približne 18 ml. Nemožnosť presnej detekcie MafK v eluáte nás prinútilo k odberu frakcii v širokom elučnom rozmedzí 12,88 až 25,68 ml v 400 µl frakciách (viď obrázok č.11, segmenty A, B, C). Elektroforetická analýza SDS-PAGE získaných frakcií na obrázku č.12 A, B, C a následný Western blot na obrázku č.12 D ukázali, že proteín MafK vo frakciách nebol detekovaný a pokiaľ bol vôbec z gélovej chromatografie získaný bolo jeho množstvo príliš malé na to, aby sme ho pomocou použitej metódy v zriedenom roztoku zachytili. Z vyššie uvedených skutočností vyplýva, že gélová chromatografia so spektrometrickou detekciou pri vlnovej dĺžke 280 nm nie je vhodným krokom v procese izolácie proteínu MafK značeného histidínovou kotvou. Preto navrhujeme optimalizáciu izolácie proteínu MafK. Jednou z možností je použitie gélovej chromatografie s odlišnou formou detekcie než je spektrometrická detekcia pri vlnovej dĺžke 280 nm. Ďalšou variantou je odstránenie prebytočného imidazolu pomocou dialýzy alebo zvýšenie čistoty finálneho preparátu použitím metódy vysol'ovania proteínu v počiatocnej fáze izolácie. V neposlednom rade sa ako vhodný spôsob izolácie črtá zavedenie odlišného značenia než je histidínová kotva. Prvou možnosťou je značenie proteínu pomocou tzv. maltózu viazajúceho proteínu (MBP), ktorý je dobre izolovateľný pomocou afinitnej chromatografie založenej na špecifickej interakcii tejto proteínovej značky s maltózou.⁷⁷ Nevýhodou môže byť nepomer molekulových hmotností MBP a MafK, nakoľko je MBP približne dvojnásobne väčší a mohol by mať nežiaduce následky na funkčnosť proteínu MafK. Ďalšou z možných optimalizácií izolácie by mohlo byť využitie imunoprecipitačnej izolácie pomocou pôvodne prítomného značenia FLAG-tag.

Za výsledný produkt izolácie považujeme preparát získaný z afinitnej chromatografie a zakoncentrovaný na výsledný objem 500 μ l. Z tohto objemu bolo 250 μ l použitých na vyššie uvedenú neúspešnú gélovú chromatografiu. Preto bol výsledný zisk preparátu objem 250 μ l. Prítomnosť značenia histidínovou kotvou nám nepomohla získať preparát proteínu MafK s požadovanou čistotou. Vďaka histidínovej kotve sme však boli schopní imunochemicky potvrdiť, že je proteín MafK s vysokou pravdepodobnosťou prítomný vo výslednom preparáte ako je zrejmé zo záznamu Western blotu (obrázok č.10 B dráha č.10). Metódou BCA s využitím hovädzieho sérového albumínu ako štandardu bola stanovená celková koncentrácia proteínov vo finálnom preparáte. Výsledný preparát obsahuje 1,468 mg celkového proteínu v objeme 1 ml. Vzhľadom na záznam SDS-PAGE elektroforézy finálneho preparátu (viď obrázok č.10 A dráha č.9) a porovnanie intenzity línií ostatných proteínov prítomných v preparáte s líniou proteínu MafK bolo odhadnuté, že obsah MafK nepresahuje viac než 5% z celkového obsahu proteínov v preparáte. Preparát s pravdepodobným obsahom proteínu MafK bol na záver charakterizovaný premeraním jeho UV/VIS spektra (viď obrázok č.13), z ktorého vyplýva, že absorpčné maximum zodpovedá vlnovej dĺžke cca 250 nm. Jedná sa o komplexnú zmes balastných proteínov a nie je vylúčené, že spolu s proteínmi boli izolované aj časti nukleových kyselín. Toto nie je prekvapivý fakt, vzhľadom na to, že predmetom nášho záujmu je transkripčný faktor s veľkou afinitou k nukleovým kyselinám.

Predkladaná bakalárska práca popisuje priebeh pilotnej fázy práce za účelom zisku proteínu MafK. V súčasnej dobe prebieha analýza získaného finálneho preparátu metódou hmotnostnej spektrometrie so snahou jednoznačne potvrdiť či vyvrátiť prítomnosť proteínu MafK. Momentálne nie sme schopní jednoznačne potvrdiť prítomnosť MafK vo finálnom preparáte avšak je veľmi nepravdepodobné, že by sa vo finálnom preparáte vyskytol iný proteín než MafK s rovnakou molekulovou hmotnosťou a histidínovou kotvou alebo inou sekvenciou bohatou na histidín. Použitie histidínovej kotvy ako značenie proteínu MafK sa nejaví ako výhodné z hľadiska získaného výt'azku MafK a čistoty finálneho preparátu. Táto značka taktiež nezvýšila absorbanciu pri 280 nm. Na druhej strane bola histidínová kotva výhodná na overenie autenticity preparátu MafK. Preto v budúcnosti pristúpime k experimentom zahŕňajúcim vyššie uvedené optimalizácie so zameraním buď na izoláciu MafK prostredníctvom MBP s následným odstránením MBP špecifickou proteázou a/alebo na izoláciu MafK pomocou kotvy FLAG-tag s využitím imunoprecipitačnej metódy.

6. Záver

Predkladaná bakalárska práca sa zaoberá štúdiom transkripčného faktora MafK, ktorý je interakčným partnerom senzorového proteínu detekujúceho hem, Bach1. Ciele tejto bakalárskej práce boli naplnené, konkrétne boli dosiahnuté nasledujúce výsledky:

1. Na stránkach č.13 až 19 sú zhrnuté doterajšie výsledky vedeckých štúdií týkajúce sa interakčných partnerov, transkripčných faktorov MafK a Bach1.
2. Bol úspešne amplifikovaný a izolovaný plazmid pET-21c(+)/MafK-FLAG-tag. Celkový objem činil 50 μ l s obsahom 7,45 μ g plazmidovej DNA o čistote $A_{260/280}=1,98$. Sekvenačnou analýzou bolo potvrdené, že izolovaný plazmid obsahuje gén kódujúci transkripčný faktor MafK.
3. Z ekonomických dôvodov a z dôvodu chýbajúcich skúseností ohľadom práce s proteínmi, ktoré obsahujú tzv. FLAG kotvu bol pripravený plazmid nesúci gén pre MafK s histidínovou kotvou (pET-21c+)/MafK-His-tag) s cieľom otestovať, či táto stratégia bude v tomto prípade vhodná. Boli získané štyri preparáty plazmidu pET-21c(+)/MafK-His-tag s objemom 50 μ l. Množstvo získaného plazmidu a jeho čistota v jednotlivých preparátoch bola: 8,55 μ g, $A_{260/280}=2,02$; 5,95 μ g, $A_{260/280}=1,97$; 5,45 μ g, $A_{260/280}=1,92$ a 5,35 μ g, $A_{260/280}=2,06$. Autentickosť plazmidu bola potvrdená sekvenačnou analýzou.
4. Bola vykonaná expresia proteínu MafK s histidínovou kotvou v prokaryotickom systéme *E. coli* BL-21 (DE3). Z celkového množstva 4 l TB média bolo získaných 15,3 g buniek *E. coli* BL-21 (DE3) obsahujúcich daný proteín.
5. Potom bolo pristúpené k pilotnej izolácii proteínu MafK s histidínovou kotvou pomocou afinitnej chromatografie. Finálny preparát obsahoval iba malé množstvo proteínu MafK, približne 5% z celkového obsahu proteínov (1,468 mg/ml). Komplikujúcim faktorom izolácie bola nízka absorbancia proteínu MafK pri vlnovej dĺžke 280 nm čo eliminovalo možnosť finálnej purifikácie preparátu pomocou gélovej chromatografie. Preto bola navrhnutá optimalizácia procesu izolácie proteínu MafK.
6. Prítomnosť proteínu MafK v získanom preparáte bola potvrdená metódou Western blot s imunochemickou detekciou pomocou protilátok proti histidínovej kotve proteínu. V čase odovzdania tejto bakalárskej práce na obhajobu bol preparát s obsahom proteínu MafK odoslaný na analýzu metódou hmotnostnej spektrometrie. Na jednoznačnom potvrdení prítomnosti proteínu MafK a optimalizácii jeho izolácie sa naďalej pracuje.

Zoznam použitých zdrojov

1. Šípál Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I.: Biochemie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1992.
2. Igarashi, Jotaro, Kenichi Kitanishi, and Toru Shimizu. "73 Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins." Handbook of Porphyrin Science (Volume 15) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine. 2011. 399-460.
3. Voet D., Voetová J. G.: Biochemie, Victoria Publishing, Praha 1, 1995.
4. Murray R., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova biochemie, 4. vydání, Nakladatelství H + H, Jinočany, 2002.
5. Boyer, Rodney F. "Isolation and spectrophotometric characterization of photosynthetic pigments." Biochemical Education 18.4 (1990): 203-206.
6. Zhang, Li. HEME BIOLOGY: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes. World Scientific, 2011.
7. Liu, J., Chakraborty, S., Hosseinzadeh, P., Yu, Y., Tian, S., Petrik, I., Bhagi, A., and Lu, Y. (2014) Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.* 114, 4366–4469.
8. Chang, C. K., and Dolphin, D. Carbon monoxide binding to pentacoordinate mercaptide-heme complexes: kinetic study on models for cytochrome P-450. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 3338–3342.
9. Igarashi J., Kenichi K., Martinkova M., Murase M., Iizuka A., Shimizu T.: Acta. Chim. Slov., 55, 67-74 (2008).
10. <http://fb.lt.cz/skripta/vi-dychaci-soustava/4-metabolismus-hemoglobinu-a-transport-krevnich-plynu/>, stav zo dňa 9.2.2017.
11. Igarashi, K., and Watanabe-Matsui, M. (2014) Wearing red for signaling: the heme-bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology. *Tohoku J. Exp. Med.* 232, 229–253.
12. Zhang, L., and Guarente, L. (1995) Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14, 313–320.
13. Igarashi J., Murase M., Iizuka A., Pichierri F., Martinkova M., Shimizu T.: J. Biol. Chem., 283, 18782-18791 (2008).

14. Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M., and Shimizu, T. (2008) Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 18782–18791.
15. Chen, J.-J. (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood* 109, 2693–2699.
16. Bauer, B. N., Rafie-Kolpin, M., Lu, L., Han, A., and Chen, J. J. (2001) Multiple autophosphorylation is essential for the formation of the active and stable homodimer of heme-regulated eIF2 α kinase. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 11543–11551.
17. Rafie-Kolpin, M., Han, A.-P., and Chen, J.-J. (2003) Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2 α kinase activity of HRI. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 6536–6544.
18. Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M. M., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2002) Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* 21, 5216–5224.
19. Monson EK, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR (1992) The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4280–4284.
20. Sassa, S., and Nagai, T. (1996) The role of heme in gene expression. *Int. J. Hematol.* 63, 167–178.
21. Qi Z, Hamza I, O'Brian MR (1999) Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13056–13061.
22. Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (1996) Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6083–6095.
23. Chiabrando, D., Mercurio, S., and Tolosano, E. (2014) Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica* 99, 973–983.
24. Munakata, H., Sun, J.-Y., Yoshida, K., Nakatani, T., Honda, E., Hayakawa, S., Furuyama, K., and Hayashi, N. (2004) Role of the heme regulatory motif in the heme-

- mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 233–238.
25. Girvan, H. M., and Munro, A. W. (2013) Heme Sensor Proteins. *J. Biol. Chem.* 288, 13194–13203.
26. Shibahara, S. (2003) The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J. Exp. Med.* 200, 167–186.
27. Baker, H. M., Anderson, B. F., and Baker, E. N. (2003) Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3579–3583.
28. Poss, K. D., and Tonegawa, S. (1997) Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10925–10930.
29. Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., and Igarashi, K. (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* 20, 2835–2843.
30. Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2016) Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene* 586, 197–205.
31. LaCasse, E. C., Lochnan, H. A., Walker, P., and Lefebvre, Y. A. (1993) Identification of binding proteins for nuclear localization signals of the glucocorticoid and thyroid hormone receptors. *Endocrinology* 132, 1017–1025.
32. Yang, Y., and Cvekl, A. (2007) Large Maf Transcription Factors: Cousins of AP-1 Proteins and Important Regulators of Cellular Differentiation. *Einstein J. Biol. Med. EJBM* 23, 2–11.
33. Kusunoki, H., Motohashi, H., Katsuoka, F., Morohashi, A., Yamamoto, M., and Tanaka, T. (2002) Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. *Nat. Struct. Biol.* 9, 252–256.
34. Kurokawa, H., Motohashi, H., Sueno, S., Kimura, M., Takagawa, H., Kanno, Y., Yamamoto, M., and Tanaka, T. (2009) Structural Basis of Alternative DNA Recognition by Maf Transcription Factors. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6232–6244.
35. Seldeen, K. L., McDonald, C. B., Deegan, B. J., Bhat, V., and Farooq, A. (2010) Dissecting the Role of Leucine Zippers in the Binding of bZIP Domains of Jun Transcription Factor to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 1030–1035.

36. Kataoka, K., Igarashi, K., Itoh, K., Fujiwara, K. T., Noda, M., Yamamoto, M., and Nishizawa, M. (1995) Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2180–2190.
37. Kimura, M., Yamamoto, T., Zhang, J., Itoh, K., Kyo, M., Kamiya, T., Aburatani, H., Katsuoka, F., Kurokawa, H., Tanaka, T., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2007) Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf homodimer. *J. Biol. Chem.* *282*, 33681–33690.
38. Reichard, J. F., Motz, G. T., and Puga, A. (2007) Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Res.* *35*, 7074–7086.
39. Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2012) Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10228–10239.
40. Fujita, R., Takayama-Tsujimoto, M., Satoh, H., Gutiérrez, L., Aburatani, H., Fujii, S., Sarai, A., Bresnick, E. H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2013) NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2659–2670.
41. Warnatz, H.-J., Schmidt, D., Manke, T., Piccini, I., Sultan, M., Borodina, T., Balzereit, D., Wruck, W., Soldatov, A., Vingron, M., Lehrach, H., and Yaspo, M.-L. (2011) The BTB and CNC homology 1 (BACH1) target genes are involved in the oxidative stress response and in control of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* *286*, 23521–23532.
42. Otsuki, A., Suzuki, M., Katsuoka, F., Tsuchida, K., Suda, H., Morita, M., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2016) Unique cistrome defined as CsMBE is strictly required for Nrf2-sMaf heterodimer function in cytoprotection. *Free Radic. Biol. Med.* *91*, 45–57.
43. Yang, H., Ko, K., Xia, M., Li, T. W. H., Oh, P., Li, J., and Lu, S. C. (2010) Induction of avian musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins by toxic bile acid inhibits expression of glutathione synthetic enzymes and contributes to cholestatic liver injury in mice. *Hepatology*. *Baltim. Md* *51*, 1291–1301.
44. Motohashi, H., Katsuoka, F., Shavit, J. A., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2000) Positive or negative MARE-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small Maf proteins. *Cell* *103*, 865–875.
45. Toki, T., Itoh, J., Kitazawa, J., Arai, K., Hatakeyama, K., Akasaka, J., Igarashi, K., Nomura, N., Yokoyama, M., Yamamoto, M., and Ito, E. (1997) Human small Maf

- proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene* 14, 1901–1910.
46. Onodera, K., Shavit, J. A., Motohashi, H., Katsuoka, F., Akasaka, J. E., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Characterization of the murine mafF gene. *J. Biol. Chem.* 274, 21162–21169.
47. Motohashi, H., Igarashi, K., Onodera, K., Takahashi, S., Ohtani, H., Nakafuku, M., Nishizawa, M., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1996) Mesodermal- vs. neuronal-specific expression of MafK is elicited by different promoters. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 1, 223–238.
48. Katsuoka, F., Motohashi, H., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2005) Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* 280, 4483–4490.
49. Motohashi, H., Ohta, J., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1998) A core region of the mafK gene IN promoter directs neurone-specific transcription in vivo. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 3, 671–684.
50. Katsuoka, F., Motohashi, H., Onodera, K., Suwabe, N., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2000) One enhancer mediates mafK transcriptional activation in both hematopoietic and cardiac muscle cells. *EMBO J.* 19, 2980–2991.
51. Tsuchiya, Y., Taniguchi, H., Ito, Y., Morita, T., Karim, M. R., Ohtake, N., Fukagai, K., Ito, T., Okamuro, S., Iemura, S.-I., Natsume, T., Nishida, E., and Kobayashi, A. (2013) The casein kinase 2-nrf1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3461–3472.
52. Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 16, 123–140.
53. <http://www.uniprot.org/uniprot/P97302>, stav zo dňa 13.3.2017.
54. Ito, Nobutoshi, et al. “Crystal structure of the Bach1 BTB domain and its regulation of homodimerization.” *Genes to Cells* 14.2 (2009): 167-178. *ResearchGate*.
55. Suzuki, H., Tashiro, S., Sun, J., Doi, H., Satomi, S., and Igarashi, K. (2003) Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* 278, 49246–49253.

56. Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., Ikeda-Saito, M., Yoshida, M., and Igarashi, K. (2004) Heme regulates gene expression by triggering Crml-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* 23, 2544–2553.
57. Reichard, J. F., Sartor, M. A., and Puga, A. (2008) BACH1 Is a Specific Repressor of HMOX1 That Is Inactivated by Arsenite. *J. Biol. Chem.* 283, 22363–22370.
58. Kaspar, J. W., and Jaiswal, A. K. (2010) Antioxidant-induced Phosphorylation of Tyrosine 486 Leads to Rapid Nuclear Export of Bach1 That Allows Nrf2 to Bind to the Antioxidant Response Element and Activate Defensive Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 285, 153–162.
59. Sun, J., Muto, A., Hoshino, H., Kobayashi, A., Nishimura, S., Yamamoto, M., Hayashi, N., Ito, E., and Igarashi, K. (2001) The promoter of mouse transcription repressor bach1 is regulated by Sp1 and trans-activated by Bach1. *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 385–392.
60. Jyrkkänen, H.-K., Kuosmanen, S., Heinäniemi, M., Laitinen, H., Kansanen, E., Mella-Aho, E., Leinonen, H., Ylä-Herttua, S., and Levonen, A.-L. (2011) Novel insights into the regulation of antioxidant-response-element-mediated gene expression by electrophiles: induction of the transcriptional repressor BACH1 by Nrf2. *Biochem. J.* 440, 167–174.
61. Yun, J., Frankenberger, C. A., Kuo, W.-L., Boelens, M. C., Eves, E. M., Cheng, N., Liang, H., Li, W.-H., Ishwaran, H., Minn, A. J., and Rosner, M. R. (2011) Signalling pathway for RKIP and Let-7 regulates and predicts metastatic breast cancer. *EMBO J.* 30, 4500–4514.
62. Hou, W., Tian, Q., Steuerwald, N. M., Schrum, L. W., and Bonkovsky, H. L. (2012) The let-7 microRNA enhances heme oxygenase-1 by suppressing Bach1 and attenuates oxidant injury in human hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 1113–1122.
63. Haldar, M., Kohyama, M., So, A. Y.-L., Kc, W., Wu, X., Briseño, C. G., Satpathy, A. T., Kretzer, N. M., Arase, H., Rajasekaran, N. S., Wang, L., Egawa, T., Igarashi, K., Baltimore, D., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2014) Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* 156, 1223–1234.
64. So, A. Y.-L., Garcia-Flores, Y., Minisandram, A., Martin, A., Taganov, K., Boldin, M., and Baltimore, D. (2012) Regulation of APC development, immune response, and autoimmunity by Bach1/HO-1 pathway in mice. *Blood* 120, 2428–2437.

65. Buckingham, L. (2012) *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. F.A. Davis Company.
66. Preparation of Competent Cell (Calcium Chloride Treatment) (Theory) : Molecular Biology Virtual Lab I : Biotechnology and Biomedical Engineering : Amrita Vishwa Vidyapeetham Virtual Lab.
67. http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Compentent_Cells/Cloning_Resources/FAQs/In-Fusion_Cloning, stav zo dňa 3.5.2017.
68. Lodish, Harvey F. *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Co, 2013.
69. http://www.clontech.com/US/Support/Applications/Tagged_Protein_Purification/TALON_Metal_Affinity_Resin_FAQs, stav zo dňa 3.5.2017.
70. [https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-21c\(+\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-21c(+)/)/, stav zo dňa 5.5.2017.
71. Gerace, E., and Moazed, D. (2015) Affinity Pull-Down of Proteins Using Anti-FLAG M2 Agarose Beads. *Methods Enzymol.* 559, 99–110.
72. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/recombinant-protein-expression/purification-detection/flag-system.html>, stav zo dňa 18.5.2017
73. Miksanova M., Igarashi J., Minami M., Sagami I., Yamauchi S., Kurokawa H., Shimizu T.: *Biochemistry*, 45, 9894-9905 (2006).
74. Fojtikova, V., Stranova, M., Vos, M. H., Liebl, U., Hranicek, J., Kitanishi, K., Shimizu, T., and Martinkova, M. (2015) Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Histidine Kinase, AfGcHK: Effects of the Heme Iron Complex, Response Regulator, and Metal Cations on Autophosphorylation Activity. *Biochemistry (Mosc.)* 54, 5017–5029.
75. Dubendorf, J. W., and Studier, F. W. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219, 45–59.
76. Stranova M, Martinek V, Man P, Fojtikova V, Kavan D, Vaněk O, Shimizu T, Martinkova M (2016) Structural Characterization of the Heme-based Oxygen Sensor, AfGcHK, its Interactions with the Cognate Response Regulator, and their Combined Mechanism of Action in a Bacterial Two-component Signaling System. *Proteins*, 84: 1375-89.
77. Lebediker, M., and Danieli, T. (2011) Purification of proteins fused to maltose-binding protein. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 681, 281–293.