

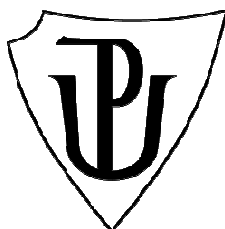
Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Příprava rekombinantní AtIPT7 v expresním systému
Saccharomyces cerevisiae za účelem prenylace enzymu**



Autor:	Jana Dobrušková
Studijní program:	B1701 Fyzika
Studijní obor:	1701R052 Molekulární biofyzika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Markéta Gemrotová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	9. 5. 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Márie Šmehilové, Ph.D., a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých zdrojů.

V Olomouci dne 9. 5. 2012

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Márii Šmehilové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky, strávený čas a pomoc, které mi poskytla během zpracování této bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat prof. Tatsuo Kakimotovi za poskytnutý biologický materiál a Mgr. Markétě Gemrotové, Ph.D., z Laboratoře růstových regulátorů Př UP Olomouc za odborné konzultace ke zpracovávání dané problematiky, za poskytnutý biologický materiál a za pomoc s proměřením aktivit isopentenyltransferas. Všem zaměstnancům katedry biochemie PřF UP Olomouc děkuji za ochotu kdykoliv poradit a pomoci.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu při sepisování této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Jana Dobrušková
Název práce	Příprava rekombinantní AtIPT7 v expresním systému <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za účelem prenylace enzymu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Markéta Gemrotová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Isopentenyltransferasy (IPT) jsou enzymy prvního kroku biosyntézy rostlinných hormonů cytokininů, které katalyzují prenylaci (isopentenylaci) adeninu. IPT jsou podle substrátové specifity děleny na adenylátové a tRNA. Adenylátové IPT (EC 2.5.1.27) katalyzují isopentenylaci AMP, ADP nebo ATP. V genomu <i>Arabidopsis thaliana</i> bylo identifikováno 7 adenylátových IPT (AtIPT1, AtIPT3 až 8), přičemž u těchto IPT slouží jako donor isoprenoidního řetězce dimethylallyl difosfát (DMAPP) a (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP). U AtIPT3 bylo zjištěno, že DMAPP slouží nejenom jako prekurzor pro biosyntézu, ale že farnesyluje samotný enzym na cysteinu 333 což ovlivňuje lokalizaci enzymu na buněčné úrovni. Obdobný aminokyselinový motiv pro prenylaci byl nalezen i u AtIPT7 na pozici 312. Teoretická část této bakalářské práce se soustředí na rešerši dosavadních poznatků v dané problematice. Cílem experimentální části je příprava rekombinantní AtIPT7 v kvasinkovém expresním systému <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za účelem prenylace enzymu.</p>
Klíčová slova	AtIPT7, expresní systém <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , posttranslační modifikace, prenylace, příprava rekombinantního proteinu
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Jana Dobrušková
Title	Preparation of recombinant AtIPT7 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expression system for prenylation of the enzyme
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biophysics
Supervisor	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Markéta Gemrotová, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>Isopentenyltransferases (IPTs) are enzymes involved in the first step of biosynthesis of plant hormones cytokinins. They catalyse prenylation (isopentenylation) of adenine molecule forming the cytokinin. IPTs are divided depending on substrate specificity to adenylate and tRNA isopentenyltransferase types. Adenylate IPTs (EC 2.5.1.27) catalyse isopentenylation of AMP, ADP or ATP. There are 7 adenylate IPTs (AtIPT1, AtIPT3-8) in the <i>Arabidopsis thaliana</i> genome. These isoforms utilize dimethylallyl diphosphate (DMAPP) and (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate (HMBDP) as donors of the isoprenoid side chain. For AtIPT3 was found that DMAPP is not only the precursor for biosynthesis, but moreover that that it farnesylates this enzyme at cysteine 333 what influences a subcellular localisation of the enzyme. A similar prenylation motif was found in AtIPT7 sequence. The experimental part of this work documents preparation of the recombinant AtIPT7 and its mutant variant in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expression system with aim to elucidate the prenylation effect on the enzymes.</p>
Keywords	AtIPT7, expression system <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , posttranslational modification, prenylation, preparation of recombinant protein
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	CÍL PRÁCE	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Posttranslační modifikace proteinů	9
2.1.1	Proteolytické štěpení.....	9
2.1.2	Kovalentní modifikace.....	9
2.2	Prenylace proteinů	11
2.3	Isopentenyltransferasy	13
2.3.1	Biosyntéza cytokininů	13
2.3.2	Charakterizace isopentenyltransferas.....	15
2.3.3	AtIPT3	17
2.3.4	AtIPT7	18
2.4	Příprava rekombinantních proteinů	19
2.4.1	Expresní systémy	20
2.4.2	Exprese rekombinantního proteinu v expresním systému <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
	Expresní vektor pYES2.....	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Přístrojové vybavení	24
3.1.2	Chemikálie.....	25
3.1.3	Použité roztoky	26
3.1.4	Biologický materiál a enzymy	28
3.2	Metody	29
3.2.1	Kultivace bakterií a kvasinek.....	29
3.2.2	Izolace plasmidové DNA z bakterií <i>E. coli</i>	30
3.2.3	Přečištění DNA	30
3.2.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	31
3.2.5	Restrikce DNA.....	31
3.2.6	Agarosová elektroforéza	31
3.2.7	Izolace plasmidové DNA z agarosových gelů	32
3.2.8	Ligace	33
3.2.9	Amplifikace genů pomocí PCR	33

3.2.10	Zaklonování amplifikovaných genů do klonovacích vektorů	36
3.2.11	Sekvenace DNA.....	37
3.2.12	Transformace	37
3.2.13	Exprese AtIPT7 a AtIPT7 ^{C312S} v kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3.2.14	Příprava buněčného lyzátu.....	39
3.2.15	Stanovení celkových proteinů.....	39
3.2.16	Purifikace proteinů.....	40
3.2.17	SDS-PAGE	40
3.2.18	Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	42
3.2.19	Western blot.....	42
3.2.20	Imunodetekce.....	42
3.2.21	Stanovení aktivity enzymů AtIPT7 a AtIPT7 ^{C312S} v buněčném lyzátu	43
3.3	Výsledky	44
3.3.1	Amplifikace genů pro <i>AtIPT7</i> a <i>AtIPT7^{C312S}</i> a jejich zaligování do cílového vektoru pYES2	44
3.3.2	Exprese proteinů AtIPT7 a AtIPT7 ^{C312S}	47
3.3.3	Imunodetekce proteinů AtIPT7 a AtIPT7 ^{C312S}	49
3.3.4	Stanovení aktivity enzymů AtIPT7 a AtIPT7 ^{C312S} v buněčném lyzátu	51
3.4	Diskuze	52
4	ZÁVĚR	54
5	SEZNAM LITERATURY	55
6	SEZNAM ZKRATEK	59

1 Cíl práce

Cílem teoretické části je zpracovat přehled různých posttranslačních modifikací proteinů, zvláště pak o prenylaci proteinů. Dalším cílem je popsat přípravu rekombinantních proteinů a její účel. Posledním cílem je zpracovat rešerši o enzymech zapojených do prenylace proteinů, kterými jsou isopentenyltransferasy, z nichž zde je kladen důraz na již prostudovanou isopentenyltransferasu z *Arabidopsis thaliana* AtIPT3 a v této práci studovanou isopentenyltransferasu AtIPT7 vykazující s AtIPT3 značnou podobnost.

Cílem experimentální části je připravit rekombinantní AtIPT7 a její mutovanou verzi AtIPT7^{C312S} v kvasinkovém expresním systému *Saccharomyces cerevisiae* za účelem prenylace enzymu a následné porovnání vlivu prenylace na aktivitu těchto dvou enzymů. Příprava rekombinantního enzymu zahrnuje řadu dílčích cílů, jako je příprava a klonování genů do patřičných expresních vektorů, ověření připravených konstruktů, transformace do hostitelských buněk, selekce transformantů, exprese rekombinantních proteinů, jejich purifikace a následná detekce se stanovením aktivity.

2 Teoretická část

2.1 Posttranslační modifikace proteinů

K tomu, aby byl nově vzniklý protein aktivní, je třeba, aby po translaci sekvence mRNA do sekvence aminokyselin došlo ke sbalení polypeptidového řetězce do příslušné konformace, k tvorbě případných disulfidových můstků, a pokud se jedná o protein komplexní, musí dojít k asociaci příslušných podjednotek (Voet a Voetová 1995). Spousta proteinů, aby byla aktivní, musí podstoupit různé posttranslační modifikace, jako proteolytické štěpení některé z vazeb nebo kovalentní připojení zbytku některé molekuly. Tyto procesy jsou obvykle enzymaticky řízeny.

2.1.1 Proteolytické štěpení

Proteolytické štěpení je jednou z neznámějších posttranslačních modifikací proteinů. Je dosti pravděpodobné, že většina proteinů je takto modifikována, jelikož většina proteinů podléhá minimálně proteolytickému odštěpení vedoucího methioninového zbytku krátce po opuštění ribozomu (Voet a Voetová 1995). Mnoho proteinů, zapojených do širokého spektra biologických procesů, je aktivních právě až po cílené proteolýze za specifických podmínek.

Dále je spousta proteinů (transmembránové proteiny), které mají být po translaci a sbalení vyloučeny do apoplastu nebo cíleny do různých buněčných kompartmentů, syntetizována s tzv. signálním peptidem, obvykle na N-konci. Tento signální peptid je obvykle tvořen 13 až 36 převážně hydrofobními zbytky. V momentě, kdy signální peptid projde membránou, je specificky odstřižen od zbytku proteinu enzymem označovaným jako signální peptidasa.

2.1.2 Kovalentní modifikace

Kovalentní modifikace polypeptidového řetězce probíhají buď uvnitř řetězce, nebo na N-konci, případně na C-konci (Voet a Voetová 1995). Mezi více než 150 známých modifikací se řadí například acetylace, fosforylace, glykosylace, acylace, ubikvitinace, atd. Pomocí některých kovalentních modifikací jsou k enzymům vázány kofaktory, které zvyšují jejich katalytickou účinnost.

Fosforylace/defosforylace je posttranslační modifikací proteinu zapojenou do reverzibilní aktivace a inaktivace enzymové aktivity v signálních drahách (Pawson 2002). Tato modifikace spočívá ve vazbě fosfátu na aminokyselinu polypeptidového řetězce, která je katalyzována proteinovou kinasou, nebo naopak odštěpením fosfátu z aminokyseliny polypeptidového řetězce

katalyzovaným enzymem fosfatasou. Takto bývají modifikovány aminokyselinové zbytky serinu, threoninu, tyrosinu a histidinu (Ciešla et al. 2011).

Acetylace/deacetylace je svou povahou velmi blízká fosforylaci/defosforylaci (Kouzarides 2000). Acetylace/deacetylace probíhá na serinu umístěném na N-konci proteinu nebo na lysinu umístěném kdekoliv v proteinu. Acetylace lysinu probíhá hlavně u proteinů histonového typu prostřednictvím histon acetyltransferasy, deacetylaci katalyzují histon deacetyltransferasy (Sadoul et al. 2008). Acetyl potřebný k této modifikaci pochází z acetyl-CoA. Takto jsou modifikovány hlavně transkripční faktory, faktory jaderného importu a α -tubulin (Kouzarides 2000). Acetylace má za úkol regulovat funkce jako například vzájemné interakce proteinů, stabilitu proteinu, atd.

Glykosylace je hojnou a dynamickou posttranslační modifikací podobnou fosforylaci, která má regulační funkci (Seo a Lee 2004). Glykosylací se rozumí připojení oligosacharidového zbytku na aminokyselinu polypeptidového řetězce (Murray et al. 2002). Takto mohou vzniknout N-glykoproteiny v případě vazby sacharidového zbytku na N-amidovou vazbu proteinu nebo O-glykoproteiny, kdy se na vazbě podílí OH-skupiny oligosacharidu a aminokyseliny. Podle typu vazby mezi proteinem a oligosacharidem se glykoproteiny dělí do 4 skupin: glykoproteiny s vazbou serin/threonin – N-acetylgalaktosamin, proteoglykany s vazbou serin-xylitol, kolageny, kde je oligosacharid vázán vazbou hydroxylysin-galaktosa, a glykoproteiny s vazbou aspartová kyselina – N-acetylglukosamin.

Ubikvitinací se rozumí připojení jedné nebo více molekul ubikvitinu na proteiny, které jsou určeny k degradaci proteasomem, což je velký komplex známý též pod názvem degradační enzym ubikvitinových konjugátů (Voet a Voetová 1995). Proteiny určené k degradaci jsou buď denaturované, chybně sbalené, nebo obsahují oxidované nebo jinak atypické aminokyseliny a obsahují ve své primární struktuře krátké signální sekvence k ubikvitinaci (Alberts et al. 2005). Degradace proteinů probíhá hydrolýzou peptidových vazeb, která je katalyzovaná proteasami v proteasomu.

Posttranslační modifikací označovanou jako acylace rozumíme modifikaci proteinů pomocí zbytků lipidů (Seo a Lee 2004). Mezi acylace řadíme modifikace jako palmitoylace, kdy je protein modifikován zbytkem kyseliny palmitové, dále myristylace zbytkem kyseliny myristové, prenylace, atd. Všechny tyto posttranslační modifikace hrají svou roli v interakcích proteinů s membránou, ovlivňují jejich enzymové aktivity, atd. O prenylaci proteinů bude blíže pojednáno v dalším textu.

Tabulka 1: Přehled posttranslačních modifikací a jejich vlastností (převzato ze Seo a Lee 2004 a upraveno).

typ posttranslační modifikace	modifikovaný amino-kyselinový zbytek	pozice
acetylace	serin	N-konec
	lysin	kdekoliv
fosforylace	tyrosin, serin, threonin, histidin, kyselina asparagová	kdekoliv
acylace		
farnesylylace	cystein	kdekoliv
palmitoylace	cystein (serin, threonin, lysin)	kdekoliv
glykosylace		
O - vázaná	serin, threonin	kdekoliv
N - vázaná	N-konec	kdekoliv
ubikvitinace	lysin	kdekoliv

2.2 Prenylace proteinů

Pro regulaci, funkčnost a subcelulární lokalizaci proteinů je často potřeba, aby došlo k posttranslační modifikaci proteinu. Mezi tyto posttranslační modifikace se řadí kovalentní připojení specifické molekuly. Jednou z takových modifikací je prenylace.

Prenylace neboli isopentenylace je posttranslační modifikace proteinů spočívající v připojení prenylového zbytku k molekule proteinu, přičemž prenylovým zbytkem může být 15 uhlíkový farnesyl, jehož donorem je farnesyldifosfát, nebo 20 uhlíkový geranylgeranyl, jehož donorem je geranylgeranyldifosfát (Zhang 1996 v Andrews et al. 2010).

Bylo zjištěno, že prenylace má mnohdy klíčovou roli v aktivaci proteinu a že mnoho proteinů zapojených do buněčného dělení, buněčného růstu, do procesu signální transdukce a dalších procesů je prenylováno (Andrews et al. 2010).

Prenylace (isopentenylace) proteinů je enzymaticky řízený proces probíhající v cytoplasmě, na kterém se podílí tři enzymy: farnesyltransferasa (PFT) připojující farnesylový zbytek, geranylgeranyltransferasa typu I (PGGT-I) a geranylgeranyltransferasa typu II (PGGT-II, někdy označovaná jako RAB geranylgeranyltransferasa), které připojují geranylgeranylový zbytek (Andrews et al. 2010).

PFT a PGGT-I jsou heterodimery skládající se ze dvou podjednotek α a β . U *Arabidopsis thaliana* jsou α -podjednotky farnesyltransferasy i geranylgeranyltransferasy typu I kódovány stejným genem *PLP* (PLURIPETALA, Running et al. 2004), β -podjednotky těchto dvou enzymů jsou ale kódovány geny různými – β -podjednotka farnesyltransferasy je kódována genem *ERAI*

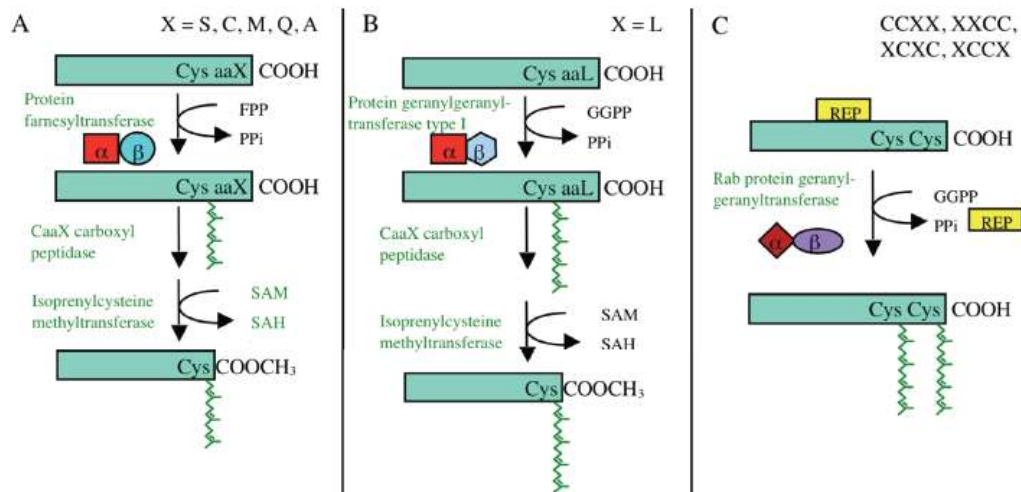
(ENHANCED RESPONSE TO ABA1, Cutler et al. 1996), β -podjednotka geranylgeranyltransferasy je kódována genem *GGB* (GERANYLGERANYLTRANSFERASE BETA, Johnson et al. 2005). Mutantní *eral* rostliny vykazují zvýšenou odezvu na kyselinu abscisovou například formou zvýšené dormance semen (Cutler et al. 1996). Tyto rostliny navíc často vykazují pozměněný fenotyp, kdy mají prodloužený meristém a nadpočet květů, zvláště pak okvětních lístků. Tento fenotyp je ještě více posílen u mutantních *plp* rostlin, které postrádají společnou α -podjednotku farnesyltransferasy a geranylgeranyltransferasy typu I (Running et al. 2004). Z toho lze usuzovat, že geranylgeranyltransferasa typu I by mohla kompenzovat nepřítomnost farnesyltransferasy u mutantních *eral* rostlin.

Yalovsky et al. (1997) ověřili důležitost farnesyloce tím, že farnesyltransferasa z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) je schopná obnovit růst mutantních *ram1 Δ* kvasinek, které postrádají β -podjednotku vlastní farnesyltransferasy, a z důvodu nepřítomnosti aktivní farnesyltransferasy vykazují jen velmi nízkou úroveň buněčného dělení. Při koexpresi LeFTA a LeFTB, tedy obou podjednotek rajčatové farnesyltransferasy zároveň, kdy může dojít k jejich spojení v aktivní farnesyltransferasu, v *ram1 Δ* buňkách došlo k obnovení normální úrovně buněčného dělení, ale při expresi samotné rajčatové β -podjednotky v *ram1 Δ* buňkách se úroveň buněčného dělení nezvýšila, což ukazuje, že rostlinná α -podjednotka a kvasinková β -podjednotka nejsou schopny spojení za tvorby aktivní farnesyltransferasy.

Bylo zjištěno, že prenylace proteinu neprobíhá na zcela libovolném místě, ale že enzymy zapojené do prenylování proteinů vyhledávají specifické aminokyselinové sekvence proteinů označované jako CaaX box (Schafer a Rine 1992). Všechny prenylované proteiny tedy obsahují stejný aminokyselinový motiv CaaX, kde C je cystein, a je jakákoliv alifatická aminokyselina, X je jakákoliv aminokyselina.

Kvasinková nebo savčí farnesyltransferasa vyhledává aminokyselinový CaaX motiv, kde X je aminokyselina serin, methionin, cystein, alanin nebo glutamin (Schafer a Rine 1992). Geranylgeranyltransferasa je specifická pro aminokyselinový CaaX motiv s leucinem, isoleucinem, methioninem případně fenylalaninem na pozici X (Andrews et al. 2010).

Prenylace je obvykle následována další modifikací, kterou je proteolytické odštěpení posledních tří aminokyselin CaaX boxu, tedy aaX, specifickými CaaX proteasami, a následnou methylací isopentenylkarboxylové skupiny, isoprenylcysteinu, na C-konci proteinu katalyzovanou isoprenylcystein methyltransferasami (Bracha et al. 2002, Bracha-Drori et al. 2008). U *Arabidopsis thaliana* jsou CaaX proteasy kódovány dvěma geny, a to *AtSTE24* a *AtRCE1*, jejichž aktivita byla lokalizovaná v endoplasmatickém retikulu (Bracha et al. 2002). Isoprenylcystein methyltransferasy jsou u *Arabidopsis thaliana* kódované geny *AtICMTA* a *AtICMTB*, jejichž subcelulární lokalizace je také v endoplasmatickém retikulu (Bracha-Drori et al. 2008). Demethylace isoprenylcystein methylesterů je katalyzována isoprenylcystein methylesterasou kódovanou *ICME* genem (Deem et al. 2006).



Obrázek 1: Schematické znázornění působení farnesyltransferasy (A) a geranyl-geranyltransferasy typu I a II (B, C) u eukaryot, s následným proteolytickým štěpením a metylací (převzato z Andrews et al. 2010).

2.3 Isopentenyltransferasy

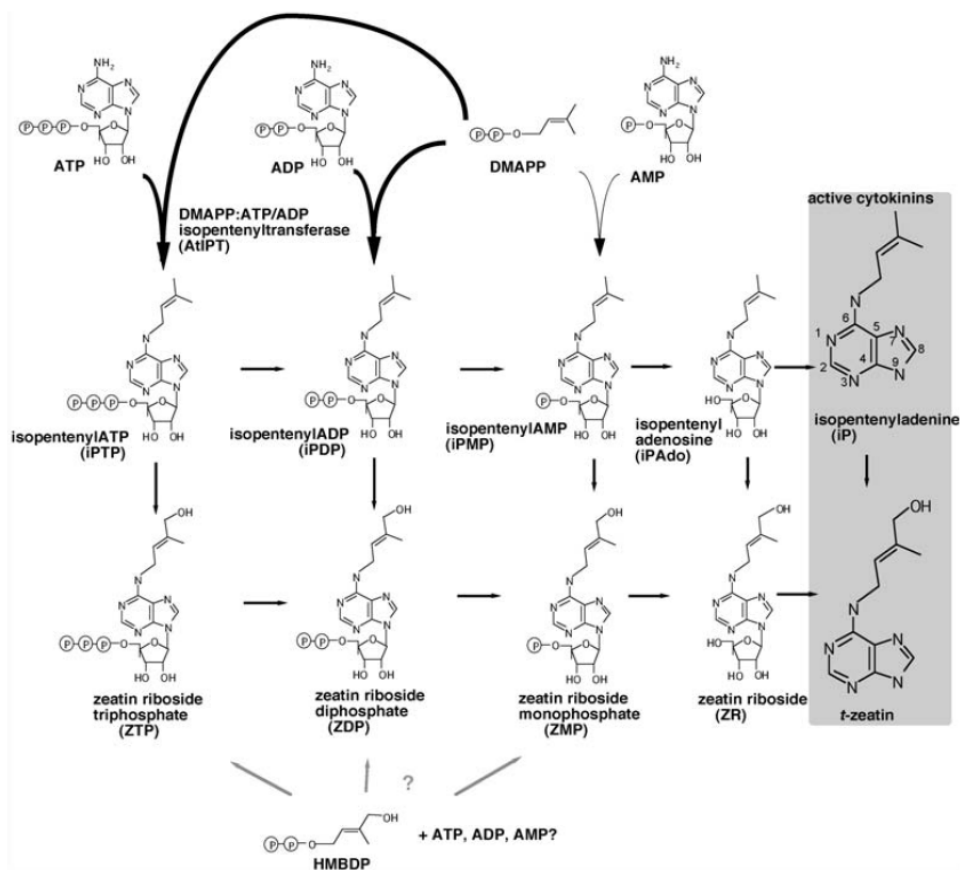
Isopentenyltransferasy jsou enzymy, které se účastní prvního kroku biosyntézy rostlinných hormonů cytokininů. Podle substrátové specifity se isopentenyltransferasy dělí na adenylátové isopentenyltransferasy (EC 2.5.1.27), jejichž substrátem je AMP, ADP nebo ATP a jež katalyzují isopentenylaci adeninu s dimethylallyl difosfátem coby donorem isoprenoidního řetězce, a tRNA isopentenyltransferasy (EC 2.5.1.8), jejichž substrátem je tRNA.

2.3.1 Biosyntéza cytokininů

Cytokiny jsou především rostlinné hormony, které hrají klíčovou roli ve vývoji rostlin. Jedná se o deriváty adeninu s isoprenoidním nebo vzácněji s aromatickým postranním řetězcem. Mezi isoprenoidní cytokiny se řadí cytokiny isopentyladeninového (iP) typu, které mají v postranním řetězci na N⁶ pozici isopentenyl, nebo cytokiny zeatinového typu, které mají na N⁶ pozici postranního řetězce isopentenyl hydroxylovaný. Cytokiny zeatinového typu se vyskytují ve dvou formách a to v *trans* nebo *cis* formě v závislosti na tom, která ze dvou methylových skupin postranního řetězce je hydroxylovaná (Sakakibara et al. 2006).

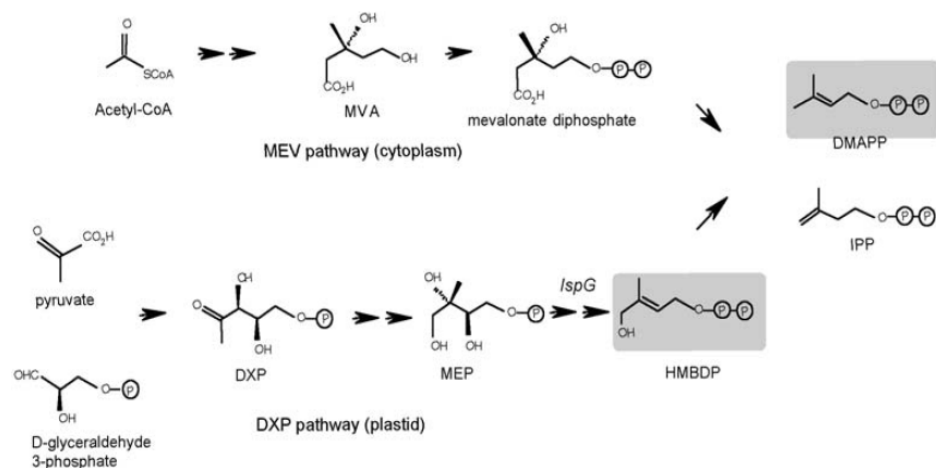
První krok biosyntézy cytokininů je katalyzován rostlinnými isopentenyltransferasami. Bakteriální isopentenyltransferasy přenášejí isopentenyl z dimethylallyl difosfátu (DMAPP) na N⁶

adenosinmonofosfátu (AMP). Oproti tomu rostlinné isopentenyltransferasy katalyzují přenos isopentenylu z DMAPP spíše na adenosindifosfát (ADP) nebo na adenosintrifosfát (ATP). Isopentenylový postranní řetězec bývá hydroxylován za tvorby cytokininů zeatinového typu (Kakimoto 2001, Kakimoto et al. 2003).



Obrázek 2: Schéma biosyntézy cytokininů (převzato z Kakimoto 2003).

Jinou možností tvorby *trans*-zeatinu je přímá adice hydroxylovaného postranního řetězce s donorem postranního řetězce, kterým je (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP) (Astot et al. 2000). Astot et al. (2000) ukázali, že u divokých (wild-type, WT) rostlin *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje dráha nezávislá na iPMP (isopentenyl adenosinmonofosfát), i když iPMP-závislá dráha také hraje důležitou roli. HMBDP je meziproductem deoxyxylulosoové dráhy, jejímž produktem je DMAPP. DMAPP je také produktem mevalonátové dráhy (viz obrázek 3), do které HMBDP nezasahuje.



Obrázek 3: Mevalonátová a deoxyxylulosová dráha. Možné zdroje cytokininů jsou podloženy šedým pozadím (převzato z Kakimoto 2003).

2.3.2 Charakterizace isopentenyltransferas

Isopentenyltransferasy se podle substrátu dělí na adenylátové isopentenyltransferasy, mezi něž se řadí DMAPP:AMP isopentenyltransferasy a DMAPP:ATP/ADP isopentenyltransferasy, a na tRNA isopentenyltransferasy, kam patří DMAPP:tRNA isopentenyltransferasy.

Identifikací genů kódujících různé isopentenyltransferasy v *Arabidopsis thaliana* se zabývali Takei et al. (2001), těchto genů zde bylo identifikováno 8 a byly označeny jako *AtIPT1-8*. Dále se identifikací genů kódujících isopentenyltransferasy u *Arabidopsis thaliana* zabýval Kakimoto (2001), který analyzoval sekvence aminokyselin. Pro isopentenyltransferasy byl identifikován následující aminokyselinový vzor:

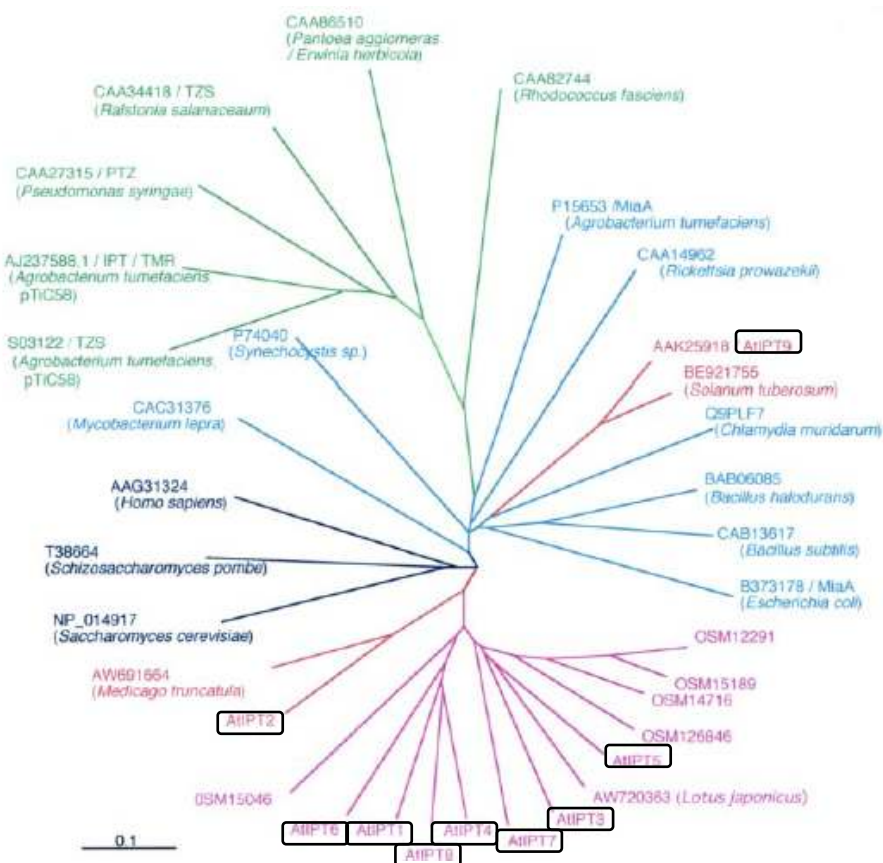


kde x značí jakoukoliv aminokyselinu, [] označuje některou z aminokyselin uvedených v [] a x{m,n} označuje aminokyselinový zbytek od m do n. Pomocí tohoto aminokyselinového vzoru bylo identifikováno 9 homologních genů pro isopentenyltransferasy, které byly označeny v souladu s prací Takei et al. (2001) jako *AtIPT1-9*. *AtIPT6* je ve skutečnosti pseudogenem, jelikož se v tomto genu objevuje nukleotidová delece, která může způsobovat posun čtecího rámce, navíc nebyla detekována exprese tohoto genu pomocí RT-PCR (Kakimoto 2001).

Většina genů pro *AtIPT* byla Takei et al. (2001) zanesena do databáze GenBank coby tRNA isopentenyltransferasy, ale Kakimoto (2001) při porovnání aminokyselinových sekvencí isopentenyltransferas z *Arabidopsis* s jinými nerostlinnými isopentenyltransferasami zjistil, že ne všechny isopentenyltransferasy využívají tRNA coby substrát. Mezi všemi devíti identifikovanými isopentenyltransferasami se tRNA isopentenyltransferasy vyskytují pouze dvě, a to *AtIPT2*

a AtIPT9 (Golovko et al. 2002 v Kakimoto 2003). V bakteriálním expresním systému *E. coli* bylo připraveno osm isopentenyltransferas AtIPT1-8, z nichž všechny kromě AtIPT2 vykazovaly značnou isopentenyltransferasovou aktivitu pro AMP (Takei et al. 2001). Taktéž purifikovaná AtIPT1 vykazovala aktivitu DMAPP:AMP isopentenyltransferasy, ostatní purifikované AtIPT nebylo možné kvůli značné nestabilitě k měření použít (Takei et al. 2001). Kakimoto (2001) exprimoval v bakteriích *E. coli* AtIPT2, AtIPT4 a AtIPT5, přičemž zjistil, že AtIPT2 aktivitu DMAPP:AMP isopentenyltransferasy opravdu nevykazuje. Již tyto dva experimenty naznačují, že většina isopentenyltransferas preferuje coby substrát AMP. Kakimoto (2001) dále pracoval s purifikovanou AtIPT4, u které zjistil, že purifikací ztratila aktivitu DMAPP:AMP isopentenyltransferasy, ale že má jistou aktivitu DMAPP:ATP/ADP isopentenyltransferasy. Dále zjistil, že AtIPT4 nikdy neměla aktivitu DMAPP:tRNA isopentenyltransferasy.

Fylogenetický strom pro isopentenyltransferasy (viz obrázek 4) zahrnuje dvě hlavní větve: větev adenylátových isopentenyltransferas (růžová barva) a větev tRNA isopentenyltransferas (ostatní barvy).



Obrázek 4: Fylogenetický strom pro isopentenyltransferasy (převzato z Kakimoto 2001).

Růžová barva – rostlinné adenylátové IPT, oranžová – rostlinné tRNA IPT, tmavě modrá – nerostlinné tRNA IPT, světle modrá – bakteriální tRNA IPT, zelená – IPT fytopatogenních bakterií. Černými rámečky jsou označeny isopentenyltransferasy z *Arabidopsis thaliana*.

2.3.3 AtIPT3

Jak lze vidět na schématu biosyntézy cytokininů (viz obrázek 2), v prvním kroku biosyntézy dochází k reakci DMAPP s AMP, ADP nebo ATP za tvorby příslušného isopentenyl adenosinfosfátu (iPRP), přičemž iPDP a iPTP jsou následně přeměněny na monofosfát (iPMP). Isopentenylace adenosinfosfátů je, jak je uvedeno již dříve, katalyzována příslušnými isopentenyltransferasami.

Galichet et al. (2008) se zabývali expresí AtIPT3, jejíž exprese AtIPT3 v bakteriích *E. coli* zvyšovala produkci iP a iPMP (Takei et al. 2001). Při prohlédnutí sekvence aminokyselin u AtIPT3 je vidět, že se zde vyskytuje aminokyselinová sekvence CLVA, která odpovídá typickému CaaX boxu, který je rozpoznáván farnesyltransferasami nebo gereanylgeranyltransferasami, takže se dalo předpokládat, že AtIPT3 bývá prenylována (Galichet et al. 2008). Tato hypotéza byla ověřena *in vitro* v reakci AtIPT3 a AtIPT3^{C333S} (cystein zaměněn za serin – motiv SLVA) s proteinovou farnesyltransferasou (PFT) a farnesyldifosfátem (FPP), kdy AtIPT3 byla úspěšně farnesylována, kdežto AtIPT3^{C333S} nikoliv. Dále byla hypotéza potvrzena *in vivo* vytvořením transgenních rostlin *Arabidopsis*, kde byla exprimována AtIPT3 a mutantní AtIPT3^{C333S} pod kontrolou promotoru [35S] mozaikového viru kvěťáku. Transgenní linie byly ověřeny western blotem za použití protilátky anti-AtIPT3, kdy bylo opět zjištěno, že AtIPT3 je úspěšně farnesylována, ale AtIPT3^{C333S} farnesylována není.

Galichet et al. (2008) se dále zabývali tím, jak AtIPT3 a její možná farnesylace ovlivňují hladinu cytokininů. Za tímto účelem byly připraveny rostliny *Arabidopsis* exprimující *AtIPT3* a *AtIPT3*^{C333S} a rostliny, které postrádají funkční IPT, označované jako *eral-1*. Z těchto transgenních rostlin připravili křížence *eral-1AtIPT3*. Analýzou hladiny cytokininů zjistili, že u rostlin exprimujících *AtIPT3* došlo ke zvýšení hladiny cytokininů v porovnání s kontrolními rostlinami. Ke zvýšení hladiny cytokininů došlo i u *eral-1AtIPT3* rostlin, ale ne u *AtIPT3*^{C333S} rostlin. Z toho se dalo usuzovat, že AtIPT3 se zapojuje do biosyntézy cytokininů, ale pouze ve své aktivní, tedy farnesylované, formě. Tento fakt potvrdili expresí AtIPT3 a AtIPT3^{C333S} v kmenech kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CTY716, který neexprimuje aktivní farnesyltransferasu, a SYY705, který exprimuje rajčatovou farnesyltransferasu. Expresí AtIPT3 způsobila zvýšení hladiny iP u obou kmenů na stejné úrovni, ale iPRP byl zvýšen v mnohonásobně větší míře u kmene SYY705 exprimujícího farnesyltransferasu, z čehož plyne, že u tohoto kmene je vytvořeno mnohem více prekurzorů pro tvorbu cytokininů, které jsou vytvořeny isopentenylací adenosinfosfátů prostřednictvím farnesylované isopentenyltransferasy. Expresí AtIPT3^{C333S} u obou kmenů hladiny iP a iPRP nijak neovlivňovala, proto lze říci, že cystein 333 má vliv na katalytickou aktivitu AtIPT3.

Již Yalovsky et al. (1997) zjistili, že farnesylace Ras proteinů prostřednictvím farnesyltransferasy ovlivňuje jejich lokalizaci v membráně, proto je správné se domnívat, že také

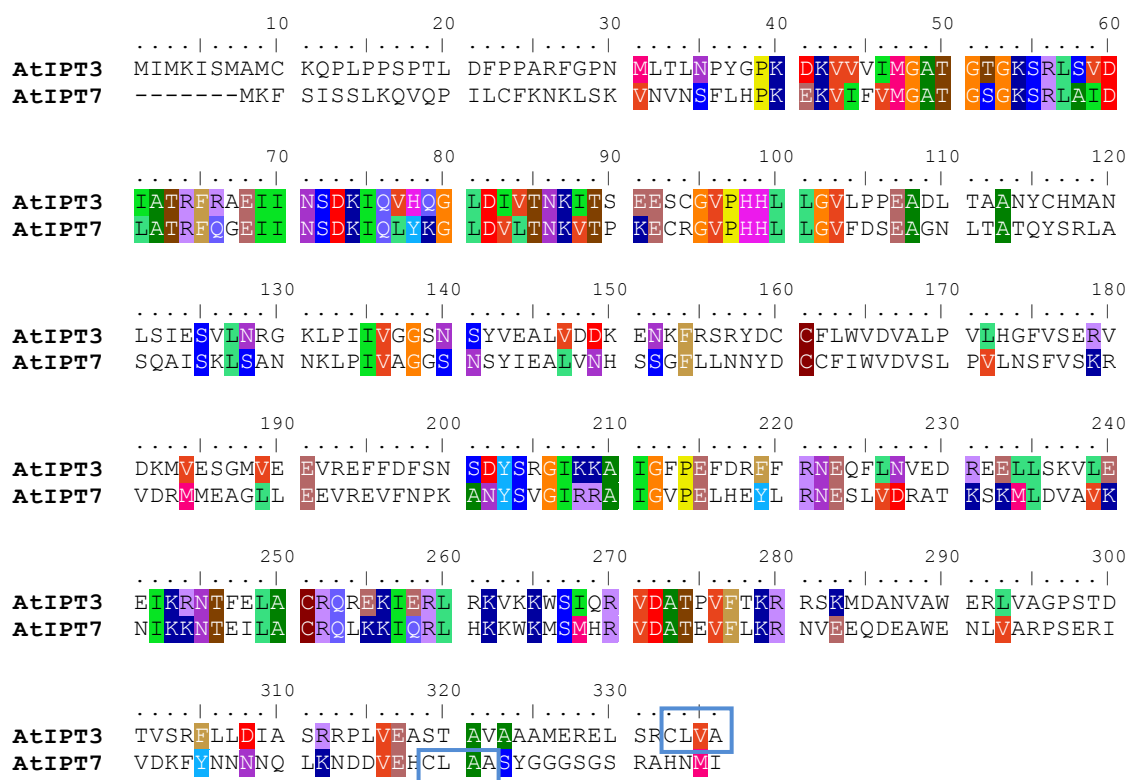
subcelulární lokalizace AtIPT3 je regulována farnesyací (Galichet et al. 2008). U AtIPT3 se předpokládalo, že by mohl být lokalizován v chloroplastu, neboť prvních 55 aminokyselin jeho aminokyselinové sekvence obsahuje signální sekvenci pro chloroplastový tranzitní protein (TP, Kasahara et al. 2004). Proto Galichet et al. (2008) sestavili fúzní proteiny TP-GFP, TP-GFP-AtIPT3, GFP-AtIPT3, TP-GFP-AtIPT3^{C333S} a GFP-AtIPT3^{C333S}, které exprimovali v epidermálních buňkách cibule. Dle předpokladu byl TP-GFP zacílen v chloroplastu. AtIPT3^{C333S} byl v přítomnosti TP zacílen taktéž v chloroplastu, v nepřítomnosti TP byl ale zacílen v cytoplasmě. AtIPT3 byl v obou případech, tzn. v přítomnosti i nepřítomnosti TP, zacílen v cytoplasmě (ve větším množství se ale nacházel i v jádru). Proto došli k závěru, že farnesylace ovlivňuje buněčnou lokalizaci AtIPT3.

2.3.4 AtIPT7

AtIPT7 je isopentenyltransferasa příslušející do stejné větve fylogenetického stromu jako AtIPT3, tedy do větve rostlinných DMAPP:ATP/ADP isopentenyltransferas (viz obrázek 4). Navíc spolu s AtIPT3 a AtIPT5 tvoří AtIPT7 v této větvi podskupinu isopentenyltransferas (Kakimoto 2001), tudíž si jsou fylogeneticky velmi podobné. Porovnání aminokyselinové sekvence AtIPT3 a AtIPT7 dokumentuje obrázek 5.

Bylo zjištěno, že při expresi AtIPT1, 3–8 v bakteriích *E. coli* dochází ke zvýšení hladiny cytokininů (Takei et al. 2001). K nejvýraznějšímu zvýšení hladiny iP došlo právě při expresi AtIPT7, proto se lze domnívat, že AtIPT7 má značný podíl na tvorbě cytokininů stejně jako AtIPT3. Toto potvrzuje skutečnost, že hladina AtIPT1, 3, 5 a 7 je negativně regulovaná cytokininy (Miyawaki et al. 2004). Miyawaki et al. (2006) zjistili, že AtIPT7 společně s AtIPT3 a AtIPT5 jsou nejvíce exprimované geny pro adenylátové isopentenyltransferasy ve vegetativní fázi u rostlin *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že AtIPT3 se ve větší míře nachází ve floému celé rostliny, v kořenech a řapících listů, zatímco AtIPT7 se nachází převážně v prodlužující se části kořenů (Miyawaki et al. 2004, Takei et al. 2004). Všechny tyto části rostliny jsou vegetativními orgány zodpovědnými za růst rostlin, tudíž je logické, že v pletivech těchto orgánů jsou exprimovány isopentenyltransferasy zodpovědné za akumulaci cytokininů.

Při porovnání aminokyselinové sekvence AtIPT3 a AtIPT7 je zřejmé, že AtIPT7 obsahuje, stejně jako AtIPT3, aminokyselinový motiv známý jako CaaX box, je to sekvence CLAA, kde cystein je na pozici 312. Tento motiv předvídá, že AtIPT7 by mohla být úspěšně prenylována, tím by mohla být ovlivněna (zvýšena) její aktivita a to nejen obecně, ale i co se změny v substrátové aktivitě týče.



Obrázek 5: Porovnání proteinových sekvencí AtIPT3 a AtIPT7. Modrým rámečkem zvýrazněny prenylační motivy (CaaX box). Zpracováno v programu BioEdit verze 7.0.9.0. (Hall 1999).

2.4 Příprava rekombinantních proteinů

Rekombinantním proteinem je označován protein, který byl exprimován v jiném než původním organismu. Proteiny se tímto způsobem připravují za účelem studia funkce proteinů, kdy je možno změnit *in vitro* naklonovaný gen a následně jej vrátit do organismu (Alberts et al. 2005). U genu lze změnit kódující sekvenci tak, že vznikne inaktivní protein nebo protein s pozměněnými vlastnostmi, dále je možno pozměnit regulační oblasti genu a tím změnit množství exprimovaného proteinu v buňce nebo navodit expresi proteinu v jiném buněčném typu nebo v jiném vývojovém stádiu. Změny v genech se provádí změnou jedné nebo více aminokyselin pomocí řízené mutagenese. Změnou aminokyselin lze i určit, které části polypeptidového řetězce se podílí na sbalení proteinu, interakci proteinu s ligandem nebo na enzymové aktivitě.

2.4.1 Expresní systémy

Expresní systémy se obecně dělí dle hostitelského organismu na prokaryotní nebo eukaryotní. Nejznámějším prokaryotním expresním systémem je systém, který využívá bakterií *Escherichia coli*. Jedná se o nejjednodušší a vůbec první využitý expresní systém (Blattner et al. 1997). Pomocí tohoto expresního systému lze připravit protein v poměrně krátké době a ve velkém množství, ale bez posttranslačních modifikací, proto bývá protein často nefunkční. K vyřešení tohoto problému se začaly používat eukaryotní expresní systémy jako například expresní systémy využívající hmyzí nebo savčí buňky a v neposlední řadě expresní systém využívající různých kvasinek, kde *Saccharomyces cerevisiae* je nejjednodušším eukaryotním expresním systémem. Pomocí kvasinkového expresního systému je možné dostat protein plně funkční, díky možným posttranslačním modifikacím kvasinkou. Cesta k funkčnímu proteinu je navíc rychlá a levná, a množství proteinu je dostatečné. Vlastnosti vybraných expresních systémů shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled možných posttranslačních modifikací vybraných expresních systémů (převzato z Fernandez et al. 1999).

posttranslační modifikace	<i>E. coli</i>	kvasinky	hmyzí buňky	savčí buňky
skládání proteinů	obvykle nutné dodatečné sbalení	někdy nutné dodatečné sbalení	řádně složené proteiny	řádně složené proteiny
N-glykosylace	-	vysoký obsah manosy	jednoduché, bez sialové kyseliny	komplexní
O-glykosylace	-	+	+	+
fosforylace	-	+	+	+
acetylace	-	+	+	+
acylace	-	+	+	+
γ -karboxylace	-	-	-	+

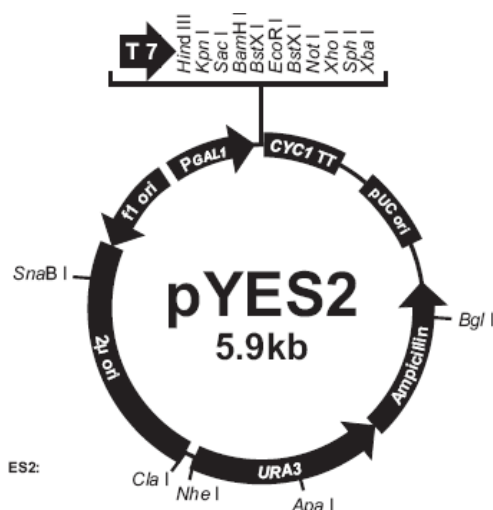
K expresi rekombinantního proteinu je nutné nejprve naklonovat gen pro daný rekombinantní protein. Naklonováním je myšleno namnožení požadovaného úseku DNA v rychle se dělících buňkách (Alberts et al. 2005). K tomuto účelu se nejčastěji využívají bakterie *E. coli*. K udržení cizorodé DNA v bakteriálních buňkách je využit tzv. vektor (nosič), kterým je bakteriální plasmid. Plasmidovým klonovacím vektorem je malá kruhová molekula DNA o 2 – 15 kb (Šmarda et al. 2005). Vhodný plasmidový vektor by měl obsahovat replikační počátek, který umožňuje replikaci plasmidové DNA nezávisle na chromozomu hostitelského organismu, dále by měl obsahovat místa rozpoznávaná restrikční endonukleasou, selekční marker neboli gen pro nějakou rozlišitelnou vlastnost např. gen rezistence vůči antibiotiku (Alberts et al. 2005).

Po naklonování příslušného genu lze přistoupit k jeho expresi v expresním systému. Za tímto účelem se využívá expresních vektorů, což jsou opět plasmidy, které na rozdíl od klonovacích vektorů obsahují navíc silný promotor v blízkosti místa, do kterého je zaklonován příslušný gen, který chceme exprimovat (Šmarda et al. 2005).

2.4.2 Expresse rekombinantního proteinu v expresním systému *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* představují levnou a účinnou variantu pro expresi rekombinantních proteinů, která spojuje výhody prokaryotních a eukaryotních expresních systémů. Výhodami u tohoto expresního systému jsou rychlý buněčný růst, minimální požadavky na růstová média a s tím spojená finanční nenáročnost na kultivaci, velké množství exprimovaného proteinu, možnost exprimovat protein přímo do média v přítomnosti signálního peptidu zodpovědného za sekreci do média označovaného jako α -faktor. Oproti prokaryotním organismům mají kvasinky již vyvinuté orgány odpovědné za posttranslační modifikace proteinů.

Expresní vektor pYES2



Obrázek 6: Schéma expresního vektoru pYES2 (převzato z manuálu pYES2, 2008).

Pro konstitutivní i indukovatelnou expresi rekombinantních proteinů v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* lze použít expresní vektor pYES2 (viz obrázek 6) o velikosti 5,9 kb, který umožňuje jednoduché klonování genu a selekci transformantů na uracilu. Tento vektor se skládá z komponent uvedených v tabulce 3.

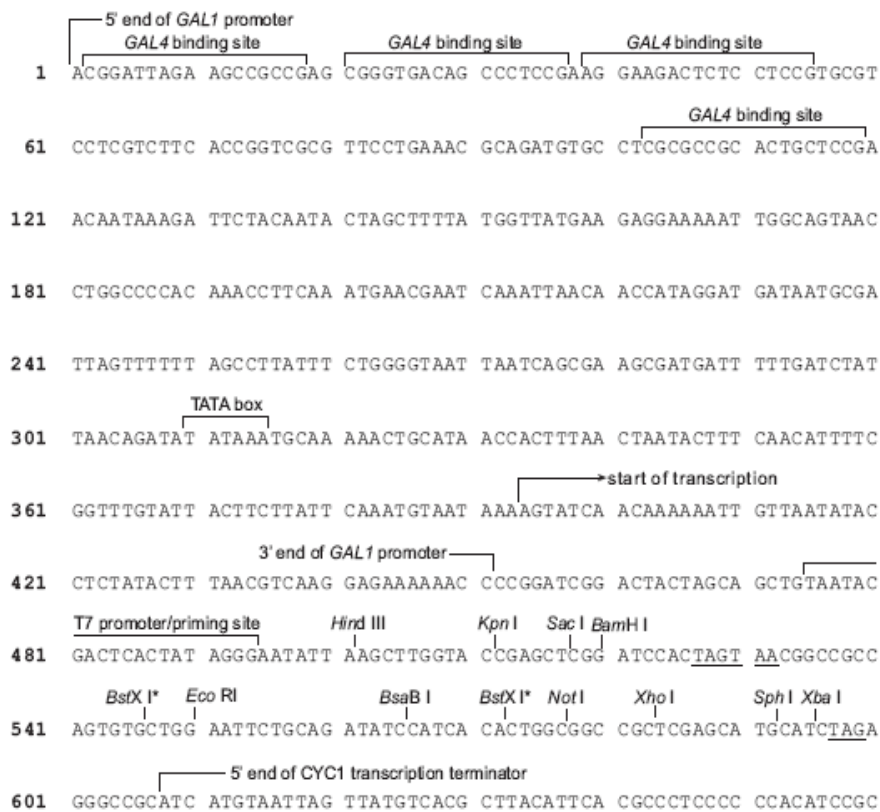
Tabulka 3: Komponenty a jejich úloha v expresním vektoru pYES2 (převzato z manuálu pYES2, 2008).

komponenta	úloha
<i>GAL1</i> promotor	zajišťuje inducibilní expresi genu
T7 promotor	dovoluje in vitro transkripci ve směru a osekvenování genu
mnohočetné klonovací místo	dovoluje inserci genu do pYES2
<i>CYC1</i> signál pro terminaci transkripce	zajišťuje účinnou terminaci a stabilizaci mRNA
pUC počátek	udržení a „high-copy“ replikace v <i>E.coli</i>
gen rezistence k ampicilinu	selektce transformantů v <i>E.coli</i>
<i>URA3</i> gen	selektce transformantů v kvasinkách na uracil-deficitním médiu
2 μ počátek	udržení a „high-copy“ replikace v kvasinkách
f1 počátek	ochrana jednořetězcové DNA

Vektor pYES2 neobsahuje start kodon ATG pro vlastní iniciaci translace, proto je třeba navrhnout insert tak, aby tento startovací kodon obsahoval. Zároveň je třeba insert navrhnout tak, aby končil stop kodonem TAG tak, aby proběhla terminace mRNA na správném místě genu.

Mnohočetné klonovací místo (viz obrázek 7) vektoru pYES2 obsahuje 9 jedinečných restrikčních míst a dvě restrikční místa *BstXI*, pomocí kterých lze do vektoru zaligovat gen našeho zájmu. Vektor dále obsahuje gen *URA3*, jehož pomocí lze selektovat kvasinkové transformanty v médiu, které neobsahuje uracil.

Pro expresi rekombinantních proteinů v expresním vektoru pYES2 se využívá kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1, což je diploidní kmen auxotrofický pro histidin, leucin, tryptofan a uracil, proto dovolují selekci transformantů na médiu bez uracilu.



Obrázek 7: Mnohočetné klonovací místo expresního vektoru pYES2 (převzato z manuálu pYES2, 2008).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Přístrojové vybavení

Potřebné chemikálie byly váženy na analytických vahách model 5034/120 (Nahita – Auxilab, Beriain, Španělsko), popřípadě na digitálních vahách Traveller TA302 (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko). Příprava roztoků probíhala za použití magnetické míchačky RH basic 2 IKAMAG (IKA, Staufen, Německo) a pH metru (Eutech Instruments, Singapur, Singapur), objemy roztoků byly odměřovány pomocí automatických pipet (Eppendorf, Hamburg, Německo). Pro rozsuspendování roztoků a vzorků byl používán vortex VSM-3 (Shelton Scientific, Shelton, CT, USA). Připravené roztoky byly sterilizovány za použití autoklávu HST 5-6-8 (Zirbus, Harz, Německo), termolabilní roztoky byly sterilizovány pomocí filtrů Ophthalsart o velikosti pórů 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Německo). Postupy vyžadující sterilitu byly prováděny v prostoru laminárního boxu Aura Mini (Bio-air, Pero, Itálie). Pro mikroizolaci plasmidové DNA a pro izolaci DNA naštěpané restrikčními endonukleasami z gelů, případně pro ultrafiltrace roztoků a purifikaci proteinů bylo použito chlazené centrifugy Model 5417R (Eppendorf, Hamburg Německo). Chlazené centrifugy Rotanta 460R (Hettich, Tuttlingen, Německo) bylo použito pro centrifugaci kvasinkových kultur. Restrikční analýzy byly inkubovány v inkubátoru CL 135 (Poll Lab, Bielsko-Biala, Polsko), stejný inkubátor byl použit pro kultivace bakterií na pevných médiích. Pro kultivace kvasinek na pevných médiích bylo použito inkubátoru firmy Melag (Berlin, Německo). Kultivace bakterií a kvasinek v tekutých médiích probíhaly v inkubátoru Unimax 1010 (Heidloph, Kelheim, Německo) nebo v orbitálním inkubátoru Model 420 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). PCR byly prováděny pomocí termocycleru T-Gradient (Biometra, Goettingen, Německo). Agarosová elektroforéza probíhala pomocí systémů Agagel mini a Compact S (Biometra, Goettingen, Německo), obarvené agarosové gely byly poté vizualizovány UV transiluminátorem TFP-M/WL (East Port Scientific, Praha, Česká republika) a dokumentovány pomocí systému Alpha DigiDoc RT (East Port Scientific, Praha, Česká republika) s využitím digitálního fotoaparátu (Olympus, Tokyo, Japonsko). Koncentrace DNA byla stanovována pomocí UV/VIS spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent, Santa Clara, CA USA) nebo pomocí UV/VIS spektrofotometru NuDrop (ACTgene, Piscataway, NJ, USA). UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) byl využíván i pro stanovení koncentrace celkových proteinů. SDS-PAGE a western blot probíhaly pomocí systému Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, Hercules, USA). Ultrafiltrace vzorků probíhala pomocí kolonek Vivaspin Diafiltration Spin Filters (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Německo).

K elektroporacím byl používán elektroporátor PEP ECM 399 (BTX, Holliston, MA, USA). Dále bylo používáno běžných laboratorních pomůcek a laboratorního vybavení.

Pro úpravy fotografií byl použit program Picasa™ 3 verze 3.9.0 (Google Inc., Mountain View, CA, USA).

3.1.2 Chemikálie

Růstová média byla vytvořena pomocí agarů (Merck, Darmstadt, Německo, a HiMedia, Mumbai, Indie), adeninu, argininu, lysinu, uracilu, kvasničného extraktu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cysteinu, leucinu, tryptofanu, isoleucinu, prolinu, valinu a tryptofanu (Lachema, Brno, ČR), kyseliny aspartové, methioninu, fenylalaninu a serinu (Roanal, Maďarsko), histidinu a galaktosy (Fluka – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), glukosy a chloridu sodného (Lach-Ner, Neratovice, ČR), peptonu, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosidu (IPTG) a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosidu (X-Gal) (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko), chloridu hořečnatého (Panreac, Barcelona, Španělsko), síranu hořečnatého (Penta, Chrudim, ČR) a yeast nitrogen base (Difco, Detroit, MI, USA).

Pro přípravu roztoků pro izolace plasmidové DNA byly využity následující chemikálie: Tris (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko), kyselina chlorovodíková, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), hydroxid sodný a dodecylsírán sodný (SDS) (Penta, Chrudim, ČR), RNasa (Fermentas, Ontario, Kanada) a octan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

Pufr pro PCR byl připraven pomocí Tris (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko), kyseliny chlorovodíkové a chloridu draselného (Lachema, Brno, ČR), hexahydrátu chloridu hořečnatého a Tritonu X-100 (Panreac, Barcelona, Španělsko).

Roztoky pro agarosovou elektroforézu byly vytvořeny pomocí agarosy (Amresco, Solon, OH, USA), Tris (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko), kyseliny octové (Lachema, Brno, ČR), EDTA a SDS (Penta, Chrudim, ČR), bromfenolové modři (Fluka – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), xylencyanolové FF modři (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a glycerolu (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

Pro lýzu buněk a purifikaci proteinů bylo použito dihydrogenfosforečnanu sodného (Merck, Darmstadt, Německo), EDTA (Penta, Chrudim, ČR), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), glycerolu a chloridu sodného (Lach-Ner, Neratovice, ČR), imidazolu (Carl Roth, Karlsruhe, Německo) a β -merkptoethanolu (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Pro přípravu roztoků pro SDS-PAGE byly použity Tris (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko), glycin, akrylamid a N, N'-metylen-bisakrylamid (bisakrylamid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR), SDS a butanol (Penta, Chrudim, ČR),

persíran amonný, N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED), bromfenolová modř a β-merkptoethanol (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pro barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu byly použity Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ethanol (Penta, Chrudim, ČR) a kyselina octová (Lachema, Brno, ČR). Pro western-blot a imunodetekci byly použity chlorid draselný, chlorid sodný a dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR), hydrogenfosforečnan sodný (Merck, Darmstadt, Německo), kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR), Tween 20 (NeoLab, Heidelberg, Německo), sušené mléko odtučněné Laktino (PML Protein.Mléko.Laktóza, a.s., Nový Bydžov, ČR).

Filmy pro imunodetekci byly vyvolávány pomocí vývojky a ustalovače Kodak (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Všechny ostatní použité chemikálie byly převážně od firem Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Penta (Chrudim, Česká republika).

3.1.3 Použité roztoky

Pufry a média byly autoklávovány po dobu 30 min při 120°C. Termolabilní roztoky (roztoky přidávané po autoklávování) byly sterilizovány za použití filtrů o velikosti pórů 0,2 μm. Pevná média obsahující 2% agar s nízkým obsahem solí byla nalévána na jednorázové Petriho plastové misky o průměru přibližně 10 cm při teplotách 60 - 65°C. Antibiotikum a glukosa byly do pevných médií přidány až po ochlazení médií na 60°C. Antibiotikum, glukosa a galaktosa byly do tekutých médií přidány až v den jejich použití. Připravené misky s pevnými médii byly uchovávány v temnu při 4°C uložené dnem vzhůru po dobu 2 týdnů maximálně.

Roztoky primerů pro PCR byly připraveny rozpuštěním lyofilizovaných primerů v ultra čisté vodě v množství doporučeném výrobcem k získání výsledné koncentrace 100 pmol/μl. Pro získání pracovní koncentrace 10 pmol/μl byly původní roztoky 10x zředěny.

Růstová média

LB-low salt médium:	1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 0,5% NaCl (pH=7,5)
SOC médium:	2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10mM NaCl
po autoklávování:	20 mM Mg ²⁺ (10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄), 20 mM glukosa
YNB médium:	0,67% Yeast Nitrogene Base
	0,01% adenin, Arg, Cys, Leu, Lys, Thr, Trp, (Ura)
	0,005% Asp, His, Ile, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val
po autoklávování:	2% glukosa

Indukční YNB médium: stejně jako YNB médium
 místo 2% glukosy je použito 2% galaktosy

Roztoky pro izolaci plasmidové DNA

Roztok P1: 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA (pH=8,0)
 po autoklávování: 0,1 mg/ml RNasa A

Roztok P2: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Roztok P3: 3 M octan draselný (pH=5,5)

Roztoky pro PCR a agarosovou elektroforézu

10x PCR pufr: 100 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂·6H₂O, 0,1% Triton X-100
 (pH=9,0)

DNA-loading pufr: 0,05% bromfenolová modř, 0,05% xylencyanol FF modř, 1% SDS, 25%
 glycerol

TAE pufr: 70 mM Tris/CH₃COOH, 1 mM EDTA (pH=8,0)

Roztok pro přípravu agarosového gelu: 1% agarosa v TAE pufru

Roztoky pro SDS-PAGE

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin (pH=8,3)

Akrylamid-bisakrylamid: 30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid

Pufr pro dělicí gel: 2,25 M Tris/HCl (pH=9,2)

Pufr pro zaostřovací gel: 0,75 M Tris/HCl (pH=6,8)

SDS-loadovací pufr: 1 % pufr pro zaostřovací gel, 5 % zásobního roztoku bromfenolové
 modře, 10 % SDS, 5% β-merkaptoethanol

Barvicí roztok: 0,0625 g Commassie Brilliant Blue R250, 50 % methanol,
 10 % CH₃COOH

Odbarvovací roztok: 40 % methanol, 10 % CH₃COOH, 50 % H₂O

Roztoky pro lýzu buněk a purifikaci proteinů

Lyzační pufr: 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM PMSF (pH=7,4)

Základní pufr:	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH = 8,0, 300 mM NaCl, 1% glycerol (pH=8,0)
Startovací pufr:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1% glycerol (pH=8,0)
Promývací pufr:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 60 mM imidazol, 1% glycerol (pH=8,0)
Eluční pufr:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, 1% glycerol (pH=8,0)

- Do základního, startovacího, promývacího a elučního pufru byl těsně před upotřebením přidán 100% β-merkптоethanol ve výsledné koncentraci 5 mM.

Roztoky pro western blot a imnuodetekci:

PBS pufr: 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄ (pH=7,4)

PBS-T pufr: 0,05% Tween 20 v PBS pufru

5% mléko v PBS-T pufru

1% mléko v PBS-T pufru s protilátkou Anti-polyHis (ředění 1:2000)

Transferový pufr: 0,2 M Tris, 1,2 M glycin (pH=8,5)

Blotovací pufr: 12,5% transferový pufr, 20% methanol, 50% H₂O

Dále byly použity tyto roztoky: 100 mg/ml ampicilin, 10 mg/ml uracil, 50 mM IPTG, 20 mM X-GAL, 20% glukosa, 20% galaktosa, 1 M sorbitol, 50% glycerol, 100% isopropanol, 70% ethanol, 10% SDS, 100% butanol, 10% persíran amonný, zásobní roztok 1% bromfenolové modře, pufr Tris/HCl pH = 8,0.

Dále byly použity kity firmy Qiagen (Hilden, Německo): QIAGEN PCR Cloning Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit a Ni-NTA Spin Kit.

3.1.4 Biologický materiál a enzymy

Pro pomnožení požadovaných genů byl použit prázdný plasmid pDrive (Qiagen, Hilden, Německo) s rezistencí na ampicilin.

Pro expresi byl použit indukovatelný vektor pYES2 a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Life Technologies, Grand Island, USA). Zdrojem genů *AtIPT7* a *AtIPT7*^{C312S} pro klonování do pYES2 byly vektory pET16b::*AtIPT7* (Prof. Tatsuo Kakimoto, Nara Institute, Japonsko) a pET16b::*AtIPT7*^{C312S} (Mgr. Markéta Gemrotová, PhD., nepublikováno).

Pro kontrolní amplifikaci genů byla použita *Taq* DNA-polymerasa a 10x PCR pufr (Šmehilová 2004). Pro amplifikaci genů byla použita Phusion High-Fidelity DNA-polymerasa s 5x Phusion HF pufrem (Finnzymes, Vantaa, Finsko). Primery pro amplifikaci genů syntetizovala a purifikovala firma Metabion (Martinsried, Německo). Dále byly použity deoxyribonukleotidtrifosfáty dNTP Mix (Fermentas, Ontario, Kanada).

Pro restrikční analýzy byly použity restrikční endonukleasy *EcoRI* (Fermentas, Ontario, Kanada) a *XhoI* TaKaRa (Otsu, Japonsko) za použití *EcoRI* pufru (Fermentas, Ontario, Kanada).

Pro ligace byla použita T4 DNA-ligasa s reakčním pufrem pro T4 DNA-ligasu (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Pro transformace do bakterií byly použity chemicky kompetentní *Escherichia coli* TOP10 a pro selekci bakteriálních transformantů bylo použito antibiotikum Ampicilin (Life Technologies, Grand Island, USA).

Do pufru P1 k izolaci plasmidové DNA byla přidána RNasa A (Qiagen, Hilden, Německo).

Pro agarosovou elektroforézu byl jako standard použit GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas, Ontario, Kanada). Pro SDS-PAGE byl použit jako standard PageRuler Protein Ladder 10 – 200 kDa (Fermentas, Ontario, Kanada).

Pro imunoblotování byla použita PVDF membána (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pro imunodetekci byla použita monoklonální protilátka Anti-polyHis konjugovaná s křenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a chemiluminiscenční substrát pro křenovou peroxidasu SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace bakterií a kvasinek

Pro zabezpečení vysoké sterility přenosu byly všechny inokulace médií bakteriemi a kvasinkami provedeny v prostoru laminárního boxu Aura mini. Inokulace z pevného média na pevné médium probíhalo sterilní kličkou přenesením kolonie na médium a její následné rozetření metodou tzv. křížového roztěru. Inokulace tekutého média kolonií z pevného média probíhala pomocí přenesení kolonie pomocí sterilní kličky do média. Inokulace z tekutého média na pevné médium spočívala v nanesení dostatečného množství kultury následovaném rozetřením tekutého obsahu po povrchu pevného média sterilní hokejkou.

Bakterie *E. coli* TOP10 byly kultivované v tekutém a pevném LB-low salt médiu pod selekčním tlakem antibiotika ampicilinu v koncentraci 100 µg/ml při teplotě 37°C. V tekutém médiu navíc kultivace probíhala za stálého třepání při 130 rpm. Na LB agarové plotny byly před nanesením kultur bakterií rozetřeny IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid) a X-GAL (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranosid) tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 25

μM , respektive $10 \mu\text{M}$. Kultury určené k dlouhodobému skladování byly zamrazeny v 25% glycerolu při 80°C .

Kultivace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* probíhala v tekutém i pevném YNB médiu pod selekčním tlakem uracilu v koncentraci $10 \mu\text{g/ml}$ v temnu při teplotě 30°C . V tekutém médiu navíc kultivace probíhala za stálého třepání při 130 rpm, a to v takovém objemu, aby maximální množství média odpovídalo 1/5 celkového objemu baněk. Kultury určené k dlouhodobému skladování byly zamrazeny v 25% glycerolu při 80°C .

3.2.2 Izolace plasmidové DNA z bakterií *E. coli*

Pro izolaci plasmidové DNA byla využita metoda alkalické denaturace. Bakterie byly pomnoženy ve 2 ml tekutého LB-low salt média obsahujícího antibiotikum ampicilin ve výsledné koncentraci $100 \mu\text{g/ml}$. Kultivace probíhala obvykle 16 hodin při 37°C za stálého třepání při 130 rpm.

Z takto připravené kultury byla přenesena část o objemu 1,5 ml do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky, kultura byla zcentrifugována při 5000 g po dobu 1 minuty. Médium bylo odpipetováno a pelet byl dále vortexem rozsuspendován v 300 μl roztoku P1. Pak bylo přidáno 300 μl roztoku P2, mikrozkušavka byla promíchána několikerým převrácením a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 300 μl roztoku P3, mikrozkušavka byla opět promíchána několikerým převrácením a inkubována 5 až 10 minut na ledu. Po inkubaci byly mikrozkušavky zcentrifugovány při 14000 g po dobu 10 minut při 4°C . Po centrifugaci byl supernatant přenesen do čistých mikrozkušavek, poté bylo k supernatantu přidáno 600 μl 100% isopropanolu. Mikrozkušavky byly následně centrifugovány při 14000 g po dobu 20 minut při 4°C . Supernatant byl odpipetován, pelet byl promyt 500 μl 70% ethanolu vychlazeného na 20°C . Poté byly mikrozkušavky zcentrifugovány při 14000 g po dobu 10 min při 4°C . Supernatant byl důkladně odpipetován a pelet obsahující plasmidovou DNA byl ponechán v laminárním boxu na vysušení po dobu 10 minut. Poté byla vyizolovaná plasmidová DNA rozpuštěna ve 100 μl sterilní vody.

3.2.3 Přečištění DNA

Pro účely sekvenace bylo třeba izolovanou plasmidovou DNA přečistit. K tomuto účelu bylo využito kitu QIAprep Spin Miniprep Kit a postupu uváděného výrobcem. Dále bylo potřeba přečistit DNA fragmenty z agarosových gelů po elektroforéze. Po vyříznutí části agarosového gelu obsahujícího požadovaný fragment DNA sterilním skalpelem, následovala extrakce DNA a její přečištění pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit za použití postupu udaného výrobcem.

3.2.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

K vyhodnocení účinnosti izolace a přečištění plasmidové DNA bylo potřeba stanovit její koncentraci. Koncentrace DNA byla stanovována spektrofotometricky pomocí UV/VIS spektrofotometru Agilent 8453, jehož pomocí byly naměřeny absorbance vzorků v křemenných kyvetách při vlnových délkách 260 a 280 nm. Pro stanovení koncentrace platí vztah, že roztok dvouvláknové DNA o koncentraci 50 µg/µl má při délce kyvety 1 cm absorbanci rovnou 1 s nutností započítat faktor zředění vzorku. Pro rychlejší stanovení koncentrace DNA byl použit UV/VIS spektrofotometr NuDrop, který proměřuje absorbanci vzorků při vlnových délkách 260 a 280 nm a sám rovnou udává koncentraci daného vzorku DNA.

Dále bývá vyhodnocován poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm, tedy poměr A_{260}/A_{280} , přičemž při poměru blízcím se 1,8 je vzorek DNA nejčistější (tzn. bez kontaminujících proteinů).

3.2.5 Restrikce DNA

K vyjmutí požadovaného úseku DNA představující gen našeho zájmu z plasmidu se využívá restrikčních endonukleas, což jsou enzymy rozpoznávající specifické sekvence DNA. Tyto sekvence bývají tvořeny čtyřmi až osmi nukleotidovými páry, které bývají často palindromické. DNA může být restrikčními endonukleasami štěpena za vzniku tzv. tupých nebo lepivých konců, čehož bývá využito při spojování fragmentu DNA insertu s fragmentem DNA vektoru, které vznikly štěpením stejnými endonukleasami, za použití T4 DNA-ligasy (Šmarda et al. 2005).

Restrikce DNA byly prováděny za účelem již zmiňované ligace insertu s vektorem nebo za účelem čistě kontrolním, kdy byla ověřena správnost vytvoření konstruktů.

K námi použitým restrikčním analýzám bylo použito dvou restrikčních endonukleas a to *EcoRI* a *XhoI* při použití *EcoRI* pufru v předepsané koncentraci. Inkubace probíhala v inkubátoru při teplotě 37°C po dobu 2 až 16 hodin v závislosti na koncentraci štípané DNA nebo účelu dané restrikce. Pufr pro tuto restrikci a reakční podmínky byly navrženy pomocí aplikace Double Digest Finder firmy New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) na serveru www.neb.com.

3.2.6 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza je v molekulární biologii a molekulární biofyzice jednou z nejpoužívanějších separačních metod sloužící k vizualizaci, izolaci a analýze nukleových kyselin (Šmarda et al. 2005). Tato metoda využívá pohybu záporně nabitých molekul nukleových kyselin

v elektrickém poli, kde nositeli záporného náboje jsou fosfátové skupiny řetězce nukleových kyselin. K vizualizaci rozdělené DNA v agarosovém gelu se používá ethidium bromid, což je interkalátor, který po vytvoření komplexu s DNA při osvětlení UV světlem fluoreskuje (Voet a Voetová 1995).

Pro naše účely bylo použito roztoku 1% agarosy v 1x TAE pufru. K objemu 50 ml takto připraveného roztoku bylo přidáno 5 μ l ethidium bromidu o koncentraci 5 μ g/ml a roztok byl nalit do předem připravené elektroforetické komůrky, na jeden konec byl vsazen hřebínek pro vytvoření jamek pro nanesení vzorků a gel byl nechán při laboratorní teplotě 20 až 30 minut, dokud úplně nez tuhne. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyjmut tak, aby nedošlo k poškození gelu a vytvořených jamek, elektroforetická komůrka s gelem byla vložena do elektroforetické vany tak, aby jamky ležely v blízkosti katody. Do elektroforetické vany byl nalit elektroodvodný pufr (1x TAE) tak, aby byl gel zcela ponořen. Do jamek vytvořených hřebínkem byly nanесeny vzorky DNA obarvené DNA-loading pufrům. Pro rozlišení velikosti fragmentů byl do jedné jamky nanесen DNA standard o známé velikosti fragmentů. Po přiklopení víka s přívodem napětí byla spuštěna elektroforéza, která probíhala při 120 V po dobu 30 – 45 minut v závislosti na velikosti gelu a předpokládané velikosti fragmentů. Poté byl přívod napětí odpojen a gel byl z elektroforetické komůrky vyjmut. Fragmenty DNA s interkalovaným ethidium bromidem byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru, zaznamenány pomocí digitálního fotoaparátu a počítačově zpracovány programem Alpha DigiDoc RT (East Port Scientific, Praha, Česká republika), díky kterému je možné softwarově odečíst velikost a koncentraci fragmentů DNA.

Veškerá manipulace s agarosovým gelem a vybavením kontaminovaným ethidium bromidem probíhala v místech k tomu určených a s použitím nitrilových rukavic.

3.2.7 Izolace plasmidové DNA z agarosových gelů

Potřebné fragmenty DNA byly z agarosového gelu vyříznuty pomocí sterilních skalpelů při prosvícení gelu transiluminátorem a přeneseny do sterilních mikrozkuvek. Extrakce plasmidové DNA z agarosového gelu pak probíhala pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit postupem předepsaným výrobcem.

Při práci s transiluminátorem, což je zdroj UV světla, je třeba si chránit zrak a pokožku, proto veškerá manipulace probíhala za použití obličejového štítu.

3.2.8 Ligace

Ligace je metoda spojování fragmentů DNA, které mají sekvenčně kompatibilní konce, mezi sebou za využití enzymu ligasy, který katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'-fosfátovou skupinou a 3'-OH skupinou sousedních nukleotidů (Rosypal et al. 2002).

Pro naše účely byla použita T4 DNA-ligasa s pufrům k ní příslušejícím. Reakce byly prováděny v mikrozkuvkách v celkovém objemu 10 μ l, rozpis legační reakce je uveden v tabulce 4. Ligovány byly fragmenty DNA plasmidů s PCR fragmenty genů nebo s geny vyštěpenými z jiných DNA plasmidů v molárním poměru 1:3. Vzorec na výpočet molarity při znalosti velikosti fragmentu je následující:

$$\text{molarita} = \frac{c [\mu\text{g}/\mu\text{l}]}{\text{bp} \cdot 650\text{Da}} \cdot 2(\text{konce}).$$

Inkubace ligačních směsí probíhala při 16°C přibližně 16 hodin. Inaktivace ligasy byla provedena inkubací při 70°C po dobu 10 minut.

Pro ligace byl použit vektor pYES2 obsahující gen *URA3* pro selekci transformantů. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1, do kterých byly transformovány připravené konstrukty, jsou genotypu His⁻, Leu⁻, Trp⁻, Ura⁻, a proto ty kvasinky, do kterých vektor pYES2 nebyl vnesen, nerostou v médiu bez uracilu. Složení reakční směsi pro ligaci do vektoru pYES2 je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro ligaci za použití vektoru pYES2.

složka	objem [μ l]
T4 DNA-ligasa	1,0
pufr pro T4 DNA-ligasu	1,0
plasmid:insert	1:3 (mol:mol)
ddH ₂ O	k doplnění objemu na 5 μ l
celkový objem	5,0

3.2.9 Amplifikace genů pomocí PCR

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda hojně využívaná v molekulární biologii. Pomocí PCR je možné *in vitro* mnohonásobně zmnožit požadovanou molekulu nebo úsek molekuly DNA. Metoda využívá krátkých oligonukleotidů (primerů), které vymezí studovaný úsek vazbou na protilehlé konce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují směrem k sobě (Šmarda et al. 2005). Od místa nasednutí primerů probíhá syntéza nového řetězce DNA. Dále metoda využívá

deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP), které jsou enzymem DNA-polymerasou připojovány k primerům a dále k rostoucímu vlákně nově syntetizovaného řetězce.

Pro kontrolní amplifikace genů byla použita *Taq* DNA-polymerasa, 10x PCR pufr, dNTP, primery, sterilní deionizovaná voda – dle tabulky 5.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR při použití *Taq* DNA-polymerasy.

složka	koncentrace	objem [μl]	výsledná koncentrace
PCR pufr	10x	2,5	1x
dNTP	10 mM	0,5	0,2 mM
primer fw	10 mM	0,5	0,2 mM
primer rev	10 mM	0,5	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA-polymerasa	-	1,0	-
templátová DNA	~10μg/ml	0,5	~5ng
ddH ₂ O	-	19,5	-
celkový objem		25,0	

Pro konečné amplifikace genů byly použity Phusion High-Fidelity DNA-polymerasa, *Taq* DNA-polymerasa, 5x HF pufr, dNTP, primery, sterilní deionizovaná voda – dle tabulky 6.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR při použití Phusion High-Fidelity polymerasy.

U – počet jednotek.

složka	koncentrace	objem [μl]	výsledná koncentrace
HF pufr	5x	2,0	1x
dNTP	10 mM	0,2	0,2 mM
primer fw	10 mM	0,5	0,5 mM
primer rev	10 mM	0,5	0,5 mM
Phusion DNA polymerasa	2U/μl	0,1	0,02U/μl
templátová DNA	~10μg/ml	0,5	~5 ng
ddH ₂ O	-	6,2	-
celkový objem		10,0	

Primery potřebné pro amplifikaci genů (viz tabulka 7) byly navrhovány pomocí softwaru BioEdit verze 7.0.9.0. (Hall 1999) a syntetizovány na zakázku firmou MetaBion (Martinsried, Německo). Primery byly navrhovány s restrikčními místy (označeny kurzívou) rozpoznávanými restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *XhoI* tak, aby bylo možné amplifikovaný gen pomocí těchto míst zaklonovat do cílových vektorů, zároveň tato místa vytváří tzv. lepidivé konce, které snižují možnost výskytu nespecifických ligací. Dále byly navrhovány tak, aby na N-konci genu byla polyhistidinová kotva sestávající z šesti histidinů za sebou (His-tag).

Tabulka 7: Primery použité pro amplifikaci genů *AtIPT7* a *AtIPT7^{C312S}*.

Kurzívou označeny restrikční místa rozpoznávaná restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *XhoI*.

název	nukleotidová sekvence
EcoRI8xHistfw	5'-GAATTCATCATCATCATCATCATCAT-3'
AtIPT7TAGXhoIrev	5'-CTCGAGTCATATCATATTGTGGGCTCTACT-3'

PCR reakce probíhaly v mikrozumavkách o objemu 200 μ l v termocycleru, který byl naprogramován dle tabulek 8 a 9. Víko termocycleru bylo vyhříváno na 102°C proto, aby bylo zabráněno kondenzaci par na víčkách mikrozumavek a tím koncentrování vzorku.

Při PCR s použitím Phusion High-Fidelity DNA-polymerasy bylo do reakční směsi před finální elongací přidáno 0,2 μ l *Taq* DNA-polymerasy, která je schopná vytvořit lepivé konce na amplifikovaném fragmentu DNA, které přecházejí o jeden adenin na 3'-konci a které zajišťují možnost klonování do TA vektorů, např. do pDrive vektoru.

Tabulka 8: Podmínky PCR při použití *Taq* DNA-polymerasy.

Pořadí	proces	teplota [°C]	čas
1.	Počáteční denaturace	95	2 min
2.	Počáteční denaturace při každém cyklu	95	30 s
3.	Nasedání primerů	60	30 s
4.	Elongace	72	1 min
5.	Finální elongace	72	10 min
6.	Ochlazení	10	1 min
kroky 2-4 opakovány 40krát			

Tabulka 9: Podmínky PCR při použití Phusion High-Fidelity DNA-polymerasy.

Pořadí	proces	teplota [°C]	Čas
1.	Počáteční denaturace	98	30 s
2.	Počáteční denaturace při každém cyklu	98	10 s
3.	Nasedání primerů	60	30 s
4.	Elongace	72	40 s
5.	Finální elongace	72	10 min
6.	Ochlazení	10	1 min
kroky 2-4 opakovány 25krát			

3.2.10 Zaklonování amplifikovaných genů do klonovacích vektorů

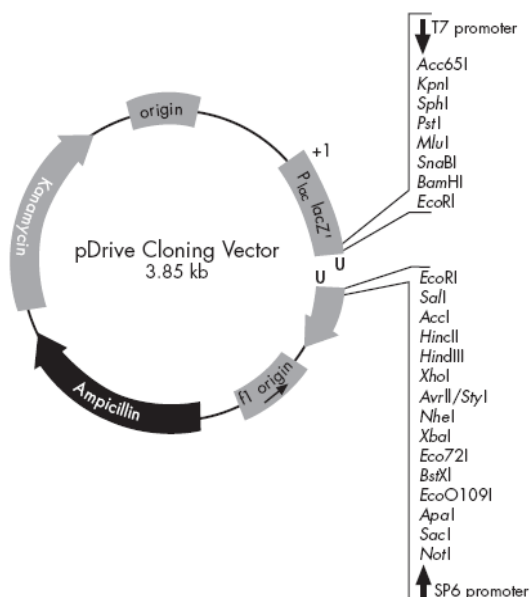
Amplifikované fragmenty DNA byly purifikovány pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit dle postupu uváděného výrobcem a následně zaklonovány do pDrive vektoru dle rozpisu uvedeného v tabulce 10.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro zaklonování genů do pDrive vektoru.

složka	objem [μ l]
PCR produkt	0,8
pDrive vektor	0,2
Ligation Master Mix	1,0
celkový objem	2,0

Vektor pDrive (viz obrázek 8), který má zaklonován gen *lacZ* pro β -galaktosidasu. β -galaktosidasa je enzym, který má schopnost hydrolyzovat X-GAL (analog laktosy) na modrý 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl. Součástí genu *lacZ* je mnohočetné klonovací místo (MCS, multiple cloning site) obsahující sekvence rozpoznávané restrikčními endonukleasami. V tomto místě dochází k zaligování DNA insertu a tím k přerušení genu *lacZ*. Modré kolonie značí nepřerušení genu pro β -galaktosidasu a neúspěšnost transformace. Toto rozlišení se nazývá White/blue screening. Naopak bílé kolonie značí přerušení genu, nefunkční β -galaktosidasu a úspěšnost transformace. IPTG přidávaný do kultivačního média společně s X-GAL má funkci induktoru *lacZ* operonu. Vektor pDrive obsahuje dále gen rezistence vůči antibiotiku ampicilinu, proto bakterie *E. coli* TOP10 využívané pro transformace, které nebyly úspěšně transformovány, v médiu obsahujícím toto antibiotikum neporostou.

Obrázek 8: Schéma klonovacího vektoru pDrive. (Převzato z QIAGEN® PCR Cloning Handbook, April 2001)



3.2.11 Sekvence DNA

Plasmidová DNA izolovaná alkalickou denaturací byla před odesláním na sekvenaci přečištěna pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit a dle postupu uváděného výrobcem. Koncentrace přečištěné plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky, a pokud bylo třeba, byly vzorky DNA naředěny do koncentrace požadované firmou, která sekvenaci prováděla. Sekvence prováděla firma Elisabeth Pharmacon (Brno, Česká republika), vzorky byly sekvenovány pomocí univerzálních primerů. Výsledky sekvenace byly analyzovány na základě porovnání s původní sekvencí pomocí programu BioEdit verze 7.0.9.0. (Hall 1999).

3.2.12 Transformace

Transformací se rozumí vnesení cizorodé DNA do hostitelského organismu (Šmarda et al. 2005). Pro transformace bakterií *Escherichia coli* TOP10 byla použita metoda tepelného šoku, pro transformace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 byla použita účinnější elektroporace.

Transformace bakterií *Escherichia coli* tepelným šokem

1,5 ml mikrozkušavky obsahující 50 μ l chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 byly po vytažení z mrazícího boxu (-80°C) ponechány na ledu, dokud neroztály. Poté bylo k buňkám

připipetováno 1 - 2 μ l směsi po ligaci, celý objem byl opatrně promíchán špičkou pipety, následovala inkubace na ledu po dobu 30 minut. Po inkubaci na ledu následoval tepelný šok, který spočíval v přenesení mikrozkupek do inkubátoru vyhřátého na 42°C, kde byly mikrozkupek inkubovány po dobu 30 sekund. Po tepelném šoku následovala inkubace na ledu po dobu 2 min. Po 2 minutách bylo k buňkám napipetováno 300 μ l SOC média. Poté byly buňky inkubovány po dobu 1 hodiny v inkubátoru vyhřátém na 37°C za stálého třepání při 130 rpm. Po inkubaci byly kultury rozetřeny na Petriho misky s pevným LB-low salt médiem obsahující ampicilin ve výsledné koncentraci 100 μ g/ml. Misky byly následně inkubovány v temnu přes noc při 37°C.

Transformace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* elektroporací

1,5 ml mikrozkupek obsahující 50 μ l elektrokompetentních buněk *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 byly po vytažení z mrazicího boxu (-80°C) ponechány na ledu, dokud neroztály. Zároveň byly na ledu vychlazené elektroporační kyvety, roztok 1 M sorbitolu a 1,5 ml sterilní mikrozkupek sloužící k oddělení poloviny množství elektrokompetentních buněk. Po rozmražení byly elektrokompetentní buňky rozděleny na dva alikvoty a centrifugovány ve vychlazené centrifuze (2°C) po dobu 2 minut při 5000 g, supernatant byl odlit, následně bylo přidáno 1 ml vychlazeného 1 M sorbitolu, ve kterém byly buňky rozsuspendovány. Centrifugace a rozsuspendování byly dvakrát opakovány. Poslední pelet buněk byl rozsuspendován v 80 μ l vychlazeného 1 M sorbitolu. K buňkám bylo přidáno 1 - 2 μ l směsi po ligaci, buňky byly přepipetovány na dno vychlazené elektroporační kyvety, kyvety byly uzavřeny víčkem, osušeny a umístěny do elektroporátoru, kde byl buňkám udělen elektrický impuls o velikosti 1500 kV dlouhý 5 ms. Po elektrickém impulsu byly buňky v elektroporačních kyvetách rozsuspendovány v 300 μ l 1 M sorbitolu pomocí ultraúzké Pasteurovy pipety, následně byly přeneseny do sterilních mikrozkupek a inkubovány 1 hodinu při 30°C za stálého třepání při 250 rpm. Po inkubaci byly kultury rozetřeny sterilní hokejkou na Petriho misky obsahující pevné selekční YNB médium. Misky byly následně inkubovány v temnu při 30°C 2 až 3 dny.

3.2.13 Exprese AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

Expresa v *Saccharomyces cerevisiae* probíhala v neselekčním YNB médiu, proto bylo třeba nejprve vyselektovat pozitivní transformanty. Selektce probíhala pomnožením kvasinkových kolonií ve 2 ml selekčního YNB média přes noc při 30°C za stálého třepání při 130 rpm, poté byla provedena izolace plasmidové DNA alkalickou denaturací následovaná restriční analýzou. Kvasinky nesoucí plasmid pYES2::AtIPT7 nebo pYES2::AtIPT7^{C312S} byly zamrazeny na 80°C v 25% glycerolu.

Expresí AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} v *Saccharomyces cerevisiae* probíhala podle manuálu k expresnímu vektoru pYES2 s menší modifikací postupu. Nejprve byla vytvořena prekultura inokulací 50 ml YNB média 2 μ l kultury pozitivního transformantu. Prekultura byla inkubována při 30°C za stálého třepání při 250 rpm přes noc. Každá prekultura byla vytvořena ve dvou replikátech. Po asi 16hodinové inkubaci bylo změřeno OD₆₀₀, následně byly kultury centrifugovány ve sterilních 50 ml falkonkách při 1500 g po dobu 5 min při 4°C, supernatant byl odlit a buňky byly rozsuspendovány v 1 – 2 ml indukčního YNB média a naředěny do objemu 50 ml v 250 ml Erlenmayerových baňkách. Kultury byly inkubovány při 30°C za stálého třepání při 250 rpm. Buňky byly sbírány po 6 a 24hodinové inkubaci od přidání indukčního média dle zkušeností s expresí v *Saccharomyces cerevisiae* u Werner et al. (2001) a to centrifugací při 1500 g po dobu 5 minut při 4°C, odlití supernatantu a zamražením buněk při 80°C.

3.2.14 Příprava buněčného lyzátu

Protože expresí AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} probíhá uvnitř buněk, je potřeba připravit buněčný lyzát. Lyza buněk probíhala podle manuálu k expresnímu vektoru pYES2 s drobnou modifikací postupu.

K peletu buněk bylo přidáno stejné množství lyzačního pufru a stejné množství skleněných kuliček. Směs byla následně vortexována 30 vteřin s následnou 30 vteřinovou inkubací na ledu. Vortexování a inkubace byly opakovány 10krát pro zajištění lepšího rozbití buněk. Poté byla směs centrifugována na maximální rychlost po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl přenesen do sterilních 1,5 ml mikrozkuhavek a následně zahuštěn ultrafiltrací na objem 50 μ l pomocí kolonek Vivaspin Diafiltration Spin Filters.

3.2.15 Stanovení celkových proteinů

Obsah proteinů byl stanovován Lowryho metodou. Nejprve bylo třeba sestavit kalibrační křivku za využití hovězího sérového albuminu (BSA) o známých koncentracích a zjistit rovnici regrese kalibrační křivky (viz kapitola 3.3 Výsledky). Kalibrační křivka byla sestavena proměřením absorbancí koncentrační řady BSA při vlnové délce 750 nm.

3.2.16 Purifikace proteinů

Purifikace proteinů byla provedena afinitní chromatografií využívající vazbu polyhistidinové kotvy na kationty Ni^{2+} za použití kolonek Ni-NTA Spin Columns z kitu Ni-NTA Spin kit a kompetentního činidla imidazolu.

Nejprve bylo třeba vyměnit lyzační pufr za pufr startovací, to bylo provedeno zahuštěním roztoku proteinů v lyzačním pufru ultrafiltrací pomocí kolonek Vivaspin Diafiltration Spin Filters na co nejmenší objem, promytím zahuštěného roztoku 500 μl základního pufru a opětovným zahuštěním na objem 50 μl . Z toho objemu byla odebrána 1/5 a naředěna do celkového objemu 600 μl startovacím pufrům.

Kolony byly nejprve kalibrovány promytím 600 μl startovacího pufru s centrifugací při 700 g po dobu 2 minut při 4°C. Roztok proteinů ve startovacím pufru byl nanesen na Ni-NTA kolonky, kolony byly následně centrifugovány při 700 g po dobu 2 minut při 4°C. Eluát byl vylit a kolony byly vloženy do čistých mikrozkušavek.

Kolony byly promyty 600 μl startovacího pufru, centrifugovány při 700 g po dobu 2 minut při 4°C. Eluát byl uchován na ledu pro další zpracování a označen jako Flow-through.

Kolony vložené do čistých mikrozkušavek byly následně dvakrát promyty 600 μl promývacího pufru, centrifugovány při 700 g po dobu 2 minut při 4°C. Eluát byl uchováván na ledu pro další zpracování a označen jako Wash.

Proteiny z kolonek byly následně vylučovány do čistých mikrozkušavek přidávkem 2krát 200 μl elučního pufru. Roztok proteinů v elučním pufru byl uchován na ledu a pro další zpracování a označen jako Eluce.

Frakce z purifikace označené jako Flow-through a Eluce byly následně zahuštěny a promyty pufrům Tris/HCl (pH=8,0) ultrafiltrací pomocí kolonek Vivaspin Diafiltration Spin Filters. U těchto vzorků byla následně určena koncentrace proteinů Lowryho metodou.

3.2.17 SDS-PAGE

Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) je nejpoužívanější metodou v biochemii, molekulární biologii a molekulární biofyzice k separaci molekul proteinů působením elektrického pole (Šmarda et al. 2005). Použití SDS zaručuje přítomnost stejně velkého záporného náboje na všech molekulách proteinů a tím závislost rychlosti migrace proteinů v gelu pouze na molekulové hmotnosti daného proteinu. Ke vzorkům bývá přidán β -merkptoethanol zajišťující redukci disulfidových vazeb uvnitř proteinu nebo mezi dvěma molekulami proteinů.

Pro přípravu dvou polyakrylamidových gelů bylo použito rozpisu uvedeného v tabulce 11.

Tabulka 11: Rozpis pro přípravu dvou gelů pro SDS-PAGE.

složka	10% dělicí gel	2% zaostřovací gel
30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid	5,000 ml	1,000 ml
pufř pro dělicí gel	2,500 ml	-
pufř pro zaostřovací gel	-	1,250 ml
H ₂ O	7,260 ml	5,130 ml
10% SDS	0,150 ml	0,075 ml
TEMED	0,015 ml	0,0075 ml
persíran amonný	0,120 ml	0,070 ml

Nejprve byl připraven dělicí gel smícháním roztoku 30% akrylamidu a 0,8% bisakrylamidu, pufru pro dělicí gel, roztoku 10% SDS a vody, polymerace byla odstartována přidáním TEMEDu a 10% persíranu amonného. Po přidavku polymeračních činidel byl roztok napipetován mezi dělicí skla, převrstven 100% butanolem a nechán tuhnout 30 min při pokojové teplotě. Poté byl butanol odstraněn a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou, zbytky vody byly opatrně odsáty pomocí filtračního papíru. Následně byl připraven zaostřovací gel smícháním 30% akrylamidu a 0,8 % bisakrylamidu, pufru pro zaostřovací gel, roztoku 10% SDS a vody, polymerace byla odstartována přidáním TEMEDu a 10% persíranu amonného. Po přidavku polymeračních činidel byl roztok napipetován na dělicí gel. Do zaostřovacího gelu byl hned vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Zaostřovací gel se nechal tuhnout dalších 30 min při pokojové teplotě. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl opatrně vyjmut hřebínek, jamky byly opatrně propláchnuty sterilní deionizovanou vodou a skla s připravenými gely byla upevněna do elektroforetické vany a zalita dělicím puftrem. Jamky byly opět opatrně propláchnuty dělicím puftrem.

Příprava vzorků probíhala podle následujícího postupu. Dle koncentrace byly vzorky naředěny tak, aby celkový obsah proteinu ve vzorku byl 20 µg a celkový objem vzorku byl 20 µl. Naředěné vzorky byly obarveny SDS-loading puftrem v poměru 4:1, zahřáty na 95°C po dobu 10 minut, ochlazeny na ledu a následně stočeny na stolní pikofuze. Takto připravené vzorky byly nanášeny pomocí pipety do jamek. Jako standard byl použit PageRuler Protein Ladder s rozsahem 10 - 200 kDa.

Po nanesení vzorků byla elektroforetická komůrka uzavřena víkem s přívodními kabely a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Pro zakoncentrování vzorků v zaostřovacím gelu byl přiveden proud o velikosti 20 mA po dobu asi 20 minut, po přechodu vzorků do dělicího gelu byla velikost proudu navýšena na 40 mA, separace proteinů v dělicím gelu probíhala po dobu asi 60 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl odpojen zdroj proudu, gely byly vyjmuty. Jeden z gelů byl barven, druhý byl použit pro western blot.

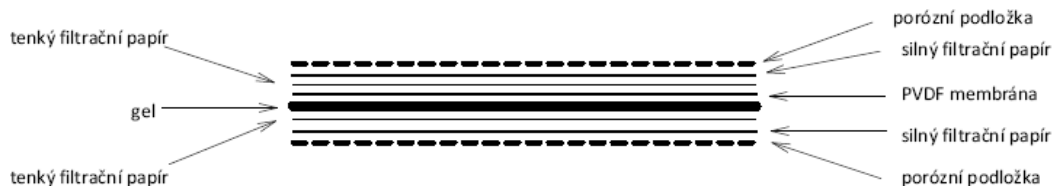
3.2.18 Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu

K vizualizaci separovaných proteinů v gelu byl používán barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R250, do kterého byl gel ponořen a za stálého třepání byl inkubován při pokojové teplotě přes noc. Druhý den byl gel z barvicího roztoku vyjmut a přenesen do odbarvovacího roztoku, kde byl za stálého třepání odbarvován, dokud nedošlo k vizualizaci jednotlivých bandů představujících proteiny. Gel s obarvenými proteiny byl následně vyfotografován digitálním fotoaparátem.

3.2.19 Western blot

Western blot je metoda přenosu proteinů na PVDF membránu za využití elektrického proudu.

PVDF membrána byla pro přenos proteinů aktivována 30sekundovým ponořením do methanolu. Filtrační papíry a porózní podložky byly namočeny do blotovacího pufru. Gel byl položen na PVDF membránu mezi filtrační papíry a porózní podložky v uspořádání, tzv. sandwichi, které vidíme na obrázku 9. Veškeré bubliny byly vytlačeny pomocí sterilní zkumavky tak, aby nedošlo ke zničení gelu nebo membrány.



Obrázek 9: Sandwichové uspořádání western blotu.

Sandwich byl následně umístěn do blotovací komůrky a zalit transferovým pufrům, do komůrky bylo umístěno chladící médium v podobě ledu. Komůrka byla následně uzavřena víkem s přívodními kabely a umístěna do lednice. Přívodní kabely byly připojeny ke zdroji proudu, blotování probíhalo přes noc při 15 V a 45 mA.

3.2.20 Imunodetekce

Pro stanovení účinnosti přenosu byl použitý gel nabarven barvivem Coomassie Brilliant Blue R250 (postup viz výše) a PVDF membrána byla barvena roztokem Amidočerni 10B po dobu

30 sekund, následně byla promývána destilovanou vodou po dobu 2 minut a následně odbarvována v destilované vodě po dobu 30 minut za stálého třepání. Po shledání účinnosti přenosu a vyfotografování membrány, byla membrána odbarvena úplně a využita pro imunodetekci.

Imunodetekce probíhala na základě reakce His-tagovaného proteinu coby antigenu nesoucího polyhistidinovou kotvu s protilátkou Anti-polyHis, která je konjugovaná s křenovou peroxidasou. Křenová peroxidasa přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světla, které detekujeme přiložením světlocitlivého filmu. Takto detekujeme specificky jen ty proteiny, které nesou polyhistidinovou kotvu.

Po odbarvení byla PVDF membrána inkubována 1 hodinu v 50 ml roztoku 5% mléka v PBS pufru za stálého třepání, aby došlo k blokování neobsazených míst proteiny obsaženými v mléce. Následovalo promytí membrán v 50 ml PBS-T pufru, které proběhlo 3krát po dobu 5 minut za stálého třepání. Poté byla membrána 2 hodiny inkubována v 20 ml roztoku 1% mléka v PBS-T s protilátkou Anti-polyHis (ředění 1:2000) opět za stálého třepání. Následovalo promytí v 50 ml PBS-T pufru po dobu 5 minut za stálého třepání, které bylo 3krát opakováno. Po promytí byla membrána položena na oříznutou eurofolii, byl přidán 1 ml roztoku substrátu pro křenovou peroxidasu v příslušném pufru (ředění 1:1), membrána byla přikryta druhou částí eurofolie a přebytek roztoku byl pomocí buničiny vytlačen pryč. Membrána v eurofolii byla vložena do vyvolávací kazety, v temné komoře byl na membránu přiložen světlocitlivý film, který byl následně vyvolán. Vyvolání probíhalo následovně: film byl ponořen po dobu asi 1 minuty do vývojky, opláchnut destilovanou vodou, ponořen do ustalovače na dobu asi 1 minuty a nakonec opláchnut vodou. Osvětlování filmu probíhalo 10 sekund, 5 minut a 10 minut.

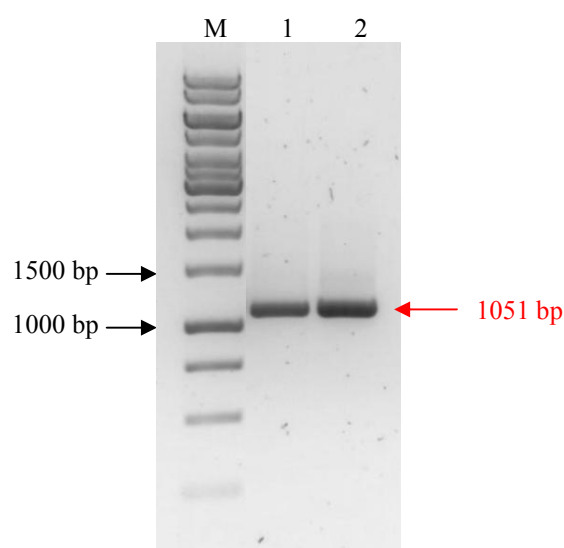
3.2.21 Stanovení aktivity enzymů AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} v buněčném lyzátu

Enzymová aktivita byla stanovována v buněčných lyzátech metodou ELISA konzultantkou Mgr. Markétou Gemrotovou, Ph.D.

3.3 Výsledky

3.3.1 Amplifikace genů pro *AtIPT7* a *AtIPT7^{C312S}* a jejich zaligování do cílového vektoru pYES2

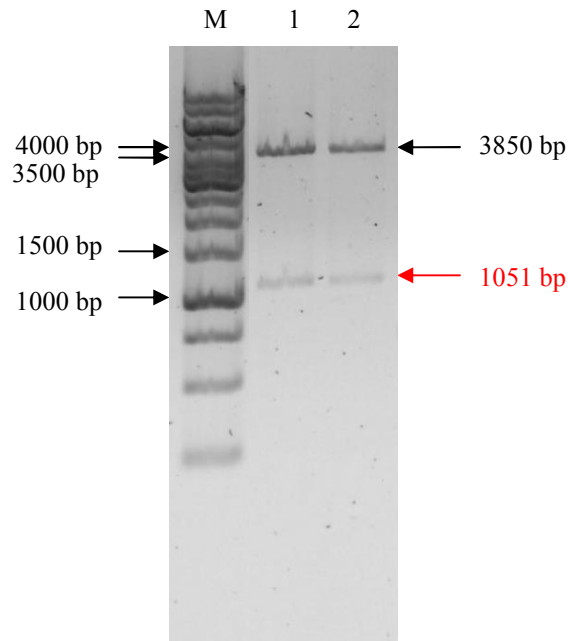
Zdrojem pro amplifikaci genů *AtIPT7* a *AtIPT7^{C312S}* byly vektory pET16b::*AtIPT7* a pET16b::*AtIPT7^{C312S}*. Geny byly amplifikovány polymerasovou řetězovou reakcí při použití primerů EcoRI8xHistfw a AtIPT7TAGXhoIrev. Pro kontrolu amplifikace genů byly amplifikované geny rozděleny v 1% agarosovém gelu, vizualizovány pomocí UV transiluminátoru, fotografie agarosového gelu byly pořízeny pomocí dokumentačního zařízení a upraveny v programu Picasa™ 3.



Obrázek 10: Fotografie agarosového gelu amplifikace genů *AtIPT7* a *AtIPTC^{312S}*.

M – GeneRuler™ 1kb DNA ladder, 1 – *AtIPT7* (1051bp), 2 – *AtIPT7^{C312S}* (1051bp).

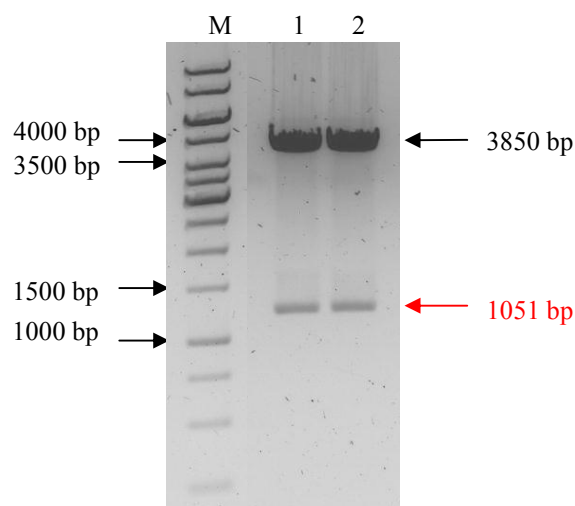
Po ověření úspěšné amplifikace genů byly tyto geny zaklonovány do klonovacího vektoru pDrive a následně tepelným šokem transformovány do bakterií *E. coli*. Na pevných LB low-salt půdách byli selektováni transformanti na ampicilinu pomocí White/blue screening testu. Bílé kolonie bakterií byly pomnoženy v tekutém LB low-salt médiu s ampicilinem. Po inkubaci 1216 hod. byla z kultur izolována plasmidová DNA, která byla ověřena restrikcí restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *XhoI* (viz obrázek 11).



Obrázek 11: Ověření pDrive vektorů na přítomnost insertů AtIPT7 a AtIPT7^{C312S}.

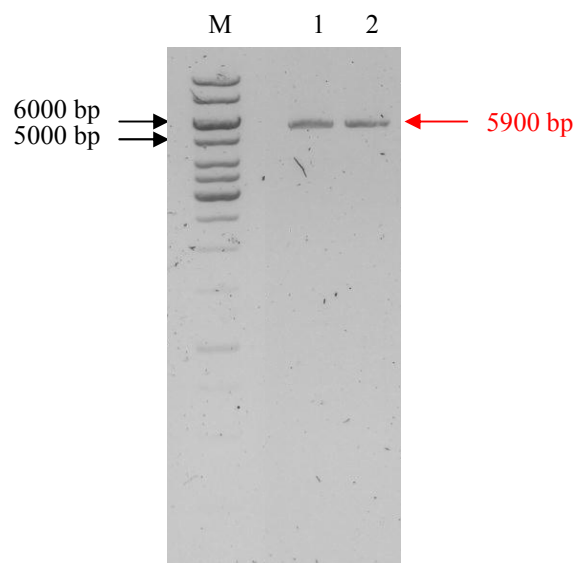
M – GeneRuler™ 1kb DNA ladder, 1 – naštípaný pDrive::AtIPT7, 2 – naštípaný pDrive::AtIPT7^{C312S}. 3850 bp – vyštípnutý pDrive, 1051 bp – vyštípnuté geny.

Klony pozitivní na přítomnost zaligovaného genu byly přečištěny pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit postupem uvedeným výrobcem a část byla poslána na sekvenaci firmě Elisabeth Pharmacon v Brně. Po porovnání obdržené sekvence s očekávanou a ověření shody a nepřítomnosti žádných nežádoucích mutací následovala restrikce vektorů obsahujících geny našeho zájmu (pDrive::AtIPT7, pDrive::AtIPT7^{C312S}) a cílového expresního vektoru (pYES2) restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *XhoI*. Naštípaná plasmidová DNA byla následně rozdělena v 1% agarosovém gelu, vizualizována pomocí UV transiluminátoru a vyfotografována (viz obrázky 12 a 13).



Obrázek 12: Fotografie agarosového gelu restrikce vektorů pDrive::*AtIPT7* a pDrive::*AtIPTC*^{312S} restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *XhoI*.

M – GeneRuler™ 1kb DNA ladder, 1 – naštípaný pDrive::*AtIPT7*, 2 – naštípaný pDrive::*AtIPT7*^{C312S}. 3850 bp – vyštípnutý pDrive, 1051 bp – vyštípnuté geny.



Obrázek 13: Fotografie agarosového gelu restrikce vektoru pYES2 (5900 bp) restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *XhoI*.

M – GeneRuler™ 1kb DNA ladder, 1,2 – naštípaný pYES2.

Fragmenty představující geny *AtIPT7* a *AtIPT7*^{C312S} a cílový expresní vektor pYES2 byly následně vyříznuty pomocí sterilních skalpelů. Plasmidová DNA byla extrahována a přečištěna pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit postupem předepsaným výrobcem. Geny byly následně

zaligovány do expresního vektoru pomocí T4 DNA-ligasy. Po ligaci byly vektory pYES2::*AtIPT7* a pYES2::*AtIPT7*^{C312S} elektroporací transformovány do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které dále rostly na selekčním pevném YNB médiu.

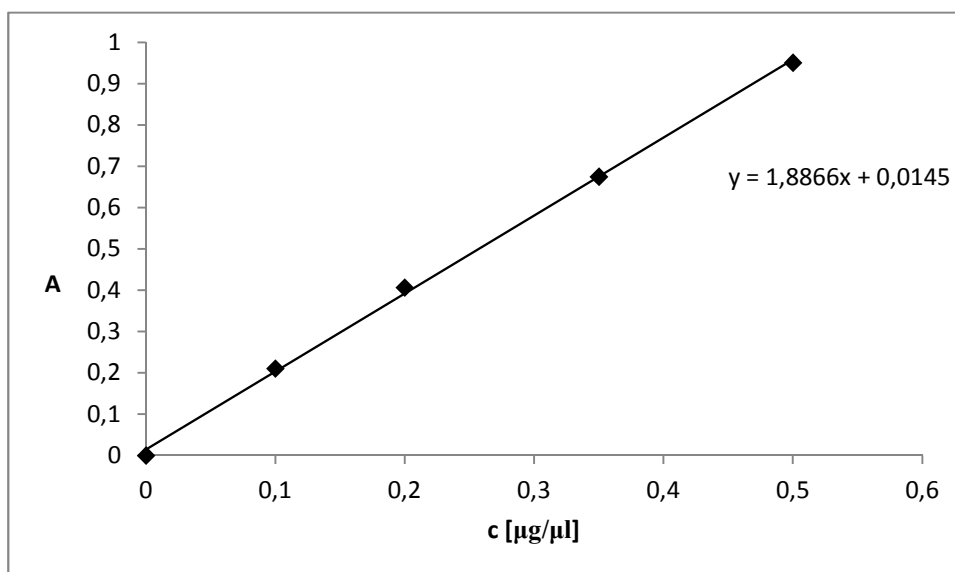
Jednotlivé kolonie kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byly pomnoženy v tekutém selekčním YNB médiu a po ověření přítomnosti příslušného vektoru nosícího gen izolací plasmidové DNA a restrikcí restrikčními endonukleasami byly pomnoženy ve větším objemu pro expresi proteinu.

3.3.2 Expres proteinů *AtIPT7* a *AtIPT7*^{C312S}

Expres proteinů probíhala v indukčním YNB médiu, přičemž byly sbírány dva alikvoty pomnožených kvasinek po 6 a 24 hodinách ve dvou replikátech – jeden odpovídající OD₆₀₀ = 0,4 a druhý odpovídající OD₆₀₀ = 2 při startu exprese. Zároveň byly kultivovány kontroly – pozitivní odpovídající vektoru pYES::*AtIPT7* a negativní odpovídající prázdnému vektoru pYES2. Z kultury pYES2::*AtIPT7*^{C312S} se startovním OD₆₀₀ = 2 kultivované přes noc, kultury pYES2::*AtIPT7* a kultury pYES2 byly následně izolovány proteiny, které byly přečištěny afinitní chromatografií, zahuštěny a byla stanovena jejich koncentrace.

Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou bylo třeba proměřit absorbance koncentrační řady roztoků BSA a určit kalibrační rovnici, z jejíž znalosti lze spočítat koncentraci proteinů v roztoku při znalosti absorbance daného roztoku.



Obrázek 14: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace proteinů.

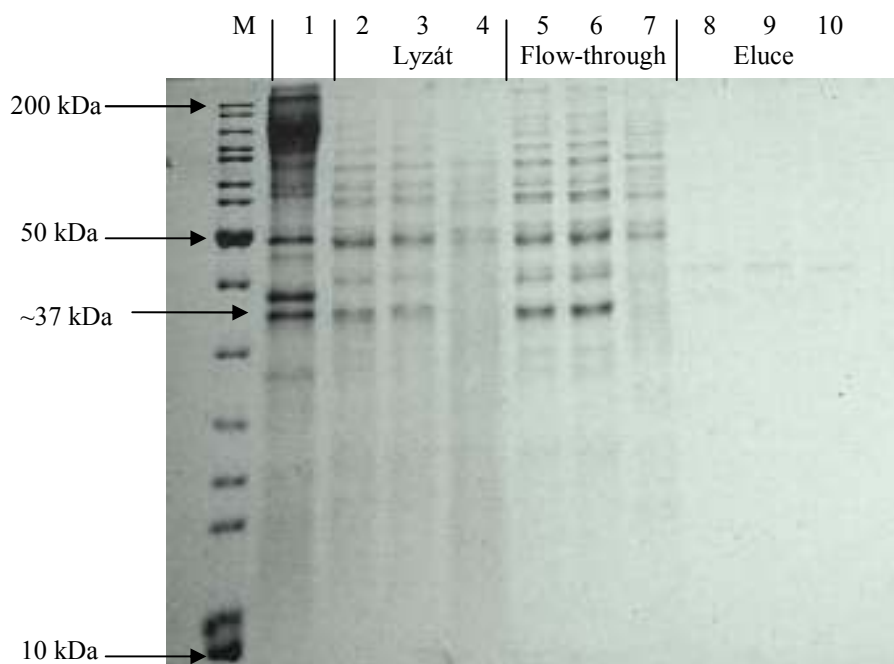
Tabulka 12: Stanovení koncentrace proteinů.

	faktor ředění	A ₇₅₀	c [μg/μl]
pYES2	100	0,2240	0,11
AtIPT7	100	0,2547	0,13
AtIPT7C ^{312S}	100	0,1290	0,06
pYES2	10	0,9091	0,47
AtIPT7	10	0,7861	0,41
AtIPT7C ^{312S}	10	0,5605	0,29

SDS-PAGE

Proteiny byly rozděleny pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy a vizualizovány barvením barvivem Coomassie Brilliant Blue. Pro imunodetekci byly proteiny přeneseny na PVDF membránu metodou western blot a detekovány pomocí protilátky Anti-polyHis. Proteiny přenesené na membránu byly vizualizovány barvením amidočerní (viz obrázek 16).

Na obrázku 15 je vyobrazena fotografie gelu s rozdělenými proteiny. V jamce 1 se nachází buněčný lyzát z *Pichia pastoris* s rekombinantním proteinem značeným His-tag coby pozitivní kontrola. V jamkách 24 je buněčný lyzát obsahující všechny proteiny po expresi, v jamkách 57 jsou proteiny, které se nezachytily na Ni-NTA kolonách, tedy proteiny bez His-tag. V posledních jamkách 810, se nachází purifikované proteiny, které obsahují větší množství histidinu. Velikost těchto purifikovaných proteinů je přibližně 40 kDa, přitom velikost AtIPT7 by měla být přibližně 37 kDa.



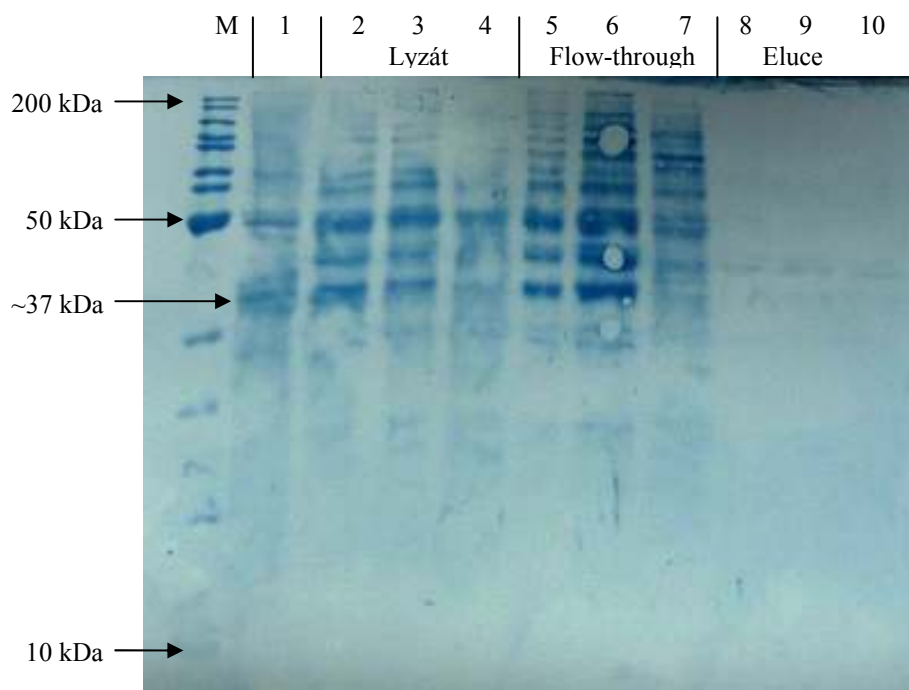
Obrázek 15: Fotografie polyakrylamidového gelu s rozdělenými a nabarvenými proteiny.

M – PageRuller Protein Ladder 10-200 kDa, 1 – pozitivní kontrola (lyzát z *Pichia pastoris* s rekombinantním proteinem značeným His-tag); 2, 5, 8 – negativní kontrola exprimující pouze prázdný plasmid pYES2; 3, 6, 9 – AtIPT7; 4, 7, 10 – AtIPT7^{C312S}. 10 µg proteinu na jamku.

3.3.3 Imunodetekce proteinů AtIPT7 a AtIPT7^{C312S}

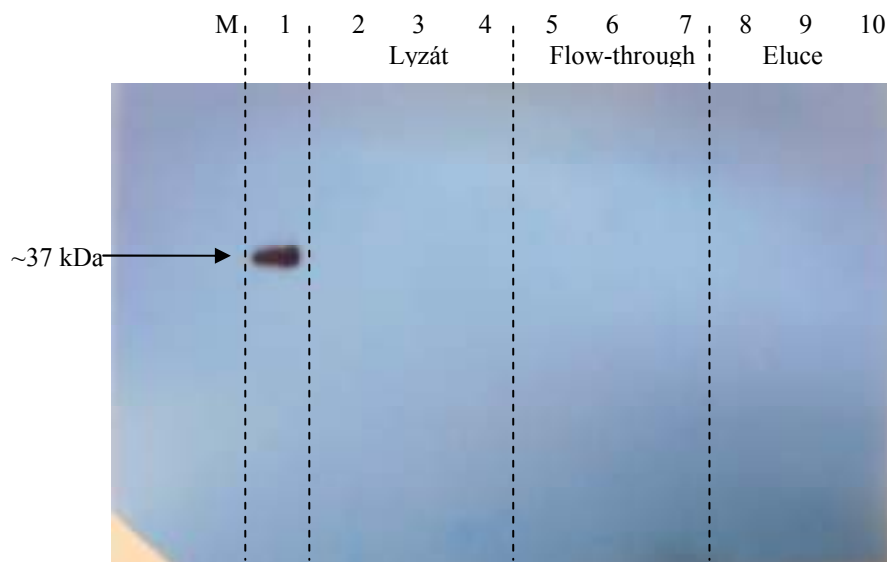
Imunodetekce proteinů probíhala pomocí protilátky Anti-polyHis, pomocí které je možno detekovat protein značený polyhistidinovou kotvou (His-tag) sestávající z osmi histidinů za sebou u rekombinantních proteinů. Navázání protilátky na protein nesoucí His-tag bylo detekováno přidáním substrátu pro křenovou peroxidasu, se kterou je protilátka Anti-polyHis konjugovaná, na PVDF membránu s přenesenými proteiny (fotografie PVDF membrány s přenesenými proteiny je vyobrazena na obrázku 16). Substrát pro křenovou peroxidasu je následně přeměněn na nestabilní produkt stabilizující se vysvícením kvanta světla. Toto světlo bylo následně detekováno přiložením světlocitlivého filmu (viz obrázek 18).

Jak lze vidět na obrázku 17, světelný signál se nachází pouze u pozitivní kontroly (~37 kDa), zatímco u ostatních vzorků nikoliv. Světelný signál by se měl projevit i u posledních tří vzorků, tedy u vzorků v jamkách 8 - 10, které představují proteiny zachycené na Ni-NTA kolony, tedy proteiny obsahující His-tag.



Obrázek 16: Fotografie PVDF membrány s přenesenými proteiny obarvenými amidočerní.

M – PageRuller Protein Ladder 10-200 kDa, 1 – pozitivní kontrola (lyzát z *Pichia pastoris* s rekombinantním proteinem značeným His-tag); 2, 5, 8 – negativní kontrola exprimující pouze prázdný plasmid pYES2; 3, 6, 9 – AtIPT7; 4, 7, 10 – AtIPT7^{C312S}; 10 µg proteinu na jamku.



Obrázek 17: Fotografie filmu po imunodetekci s Anti-polyHis protilátkou 1:2000.

M – PageRuller Protein Ladder 10-200 kDa, 1 – pozitivní kontrola (lyzát z *Pichia pastoris* s rekombinantním proteinem značeným His-tag); 2, 5, 8 – negativní kontrola exprimující pouze prázdný plasmid pYES2; 3, 6, 9 – AtIPT7; 4, 7, 10 – AtIPT7^{C312S}.

3.3.4 Stanovení aktivity enzymů AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} v buněčném lyzátu

Enzymová aktivita byla stanovena v buněčných lyzátech pomocí metody ELISA jako přírůstek obsahu iPRP, tedy isopentenylovaného adenosin fosfátu, Dr. Markétou Gemrotovou. Substrátem této reakce byl dimethylallyl difosfát (DMAPP) za přítomnosti ATP. Výsledky tohoto měření však nebyly dostatečně průkazné, neboť aktivita obou rekombinantních enzymů AtIPT7 i AtIPT7^{C312S} byla jen stěží odlišitelná od pozadí aktivity negativní kontroly (pYES2) v tomto stanovení. Výsledky z tohoto měření proto nejsou zahrnuty do této práce.

3.4 Diskuze

V rámci experimentální části se podařilo úspěšně naklonovat geny pro AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} do expresních vektorů pro expresi rekombinačních proteinů v expresním systému *Saccharomyces cerevisiae*. Amplifikace genů probíhala pomocí polymerasové řetězové reakce za použití speciálních primerů, které zajišťují tvorbu tzv. lepivých konců na obou koncích amplifikovaných fragmentů. Tyto lepivé konce umožňují snadnou a vysoce specifickou ligaci do cílového vektoru. Primery byly dále navrženy tak, že jejich pomocí byla na N-konec fragmentů nasyntetizována tzv. histidinová kotva pro snadnou purifikaci proteinů na niklových kolonách. Fragmenty odpovídající genům našeho zájmu měly odpovídající velikost 1051 bp. Po zaligování fragmentů do klonovacího vektoru pDrive a po jeho následné transformaci do bakterií *E. coli* byly pomocí White/blue screeningu a restričními analýzami vyselektováni pozitivní transformanti, kteří byli použiti pro další klonování. Po izolaci fragmentů genů, jejich zaligování do cílového expresního vektoru pYES2 a po jeho transformaci do cílového expresního systému *Saccharomyces cerevisiae* byli vyselektováni pozitivní transformanti, kteří byli použiti pro expresi daných proteinů.

Exprimované proteiny byly z buněk lyzovány, zahuštěny pomocí ultrafiltrace při použití kolonek Vivaspín Diafiltration Spin Filters, přečištěny afinitní chromatografií na niklových kolonách, rozděleny pomocí SDS-PAGE a detekovány obarvením barvivem Commassie Brilliant Blue. Velikost purifikovaných proteinů však neodpovídala velikosti AtIPT7.

Proteiny z polyakrylamidového gel byly následně přeneseny western blotem na PVDF membránu, která byla použita pro imunodetekci His-tagovaných proteinů. Detekce proteinů probíhala za použití protilátky Anti-polyHis konjugované s křenovou peroxidasou a substrátu pro křenovou peroxidasu. Světelný signál vznikl pouze u pozitivní kontroly, kterou byl buněčný lyzát z *Pichia pastoris* obsahující rekombinantní protein značený His-tag. Signál naopak nevznikal u purifikovaných proteinů, které byly taktéž značeny His-tag. Rekombinantní proteiny v buněčném lyzátu byly proměřeny v ELISA testu pro ověření jejich isopentenyltransferasové aktivity, ale ta nebyla dostatečně odlišitelná od negativní kontroly.

Neschopnost detekce protilátkou a měřením isopentenyltransferasové aktivity rekombinantních proteinů AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} mohl být způsoben jejich nízkou mírou expresí. Proto by bylo vhodné vyzkoušet exprimovat tyto proteiny ve větším objemu kvasinkových kultur a po purifikaci vzorky proteinů zahustit na co nejmenší objem a pracovat dále s takto upravenými vzorky.

Dalším faktorem, který mohl ovlivnit expresi proteinů, mohl být špatně zvolený zdroj uhlíku v kultivačním YNB médiu. Výrobce expresního vektoru pYES2 a expresního systému *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 doporučuje použít jako zdroj uhlíku glukosu nebo rafinosu.

Během popsané exprese bylo použito YNB médium obsahující glukosu. Proto by bylo dobré experiment zopakovat s médiem s obsahem rafinosy.

Expresi proteinů taktéž mohly ovlivnit špatně zvolené kultivační podmínky, které mohly způsobit špatné sbalení proteinů. V našem případě se nejspíše jednalo o vysokou teplotu při expresi proteinů, která činila 30°C, neboť Takei et al. (2001) i Kakimoto (2001) exprimovali isopentenyltransferasy v *E. coli* při teplotách 25°C, resp. 20°C. Nižší teplota zaručuje lepší sbalení proteinů.

Posledním důvodem nemožnosti detekovat námi vytvořené isopentenyltransferasy mohla být jejich postupná degradace během experimentu. Takei et al. (2001) uvádí, že v jeho experimentu všechny isopentenyltransferasy, kromě AtIPT1, po purifikaci ztratily svou isopentenyltransferasovou aktivitu v zásadní míře.

Pro úspěšnou expresi AtIPT7 a AtIPT7^{C312S} by proto bylo vhodné celý experiment zopakovat se zaměřením na optimalizaci exprese a s měřením isopentenyltransferasové aktivity s purifikovanými proteiny, což s ohledem na nedostatek času již nebylo možné.

4 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byl zpracován přehled některých posttranslačních modifikací, které jsou důležité pro správnou funkci proteinů. Dále byla zpracována problematika přípravy rekombinantních proteinů, které jsou připravovány převážně za účelem studia funkcí těchto proteinů. Dále byla zpracována literární rešerše o isopentenyltransferasách, což jsou enzymy prvního kroku biosyntézy cytokininů, rešerše pak byla zvláště zaměřena na IPT3 z *Arabidopsis thaliana*, u které bylo zjištěno, že je farnesylována na cysteinu 333, který je součástí CaaX boxu, což ovlivňuje lokalizaci tohoto enzymu na buněčné úrovni. Poslední část literární rešerše je zaměřena na AtIPT7, u níž byl objeven obdobný aminokyselinový motiv na cysteinu 312. Proto byla v experimentální části v expresním systému *Saccharomyces cerevisiae* připravena rekombinantní AtIPT7 a její mutovaná verze AtIPT7^{C312S}, u které by nemělo docházet k prenylaci. U takto připravených rekombinantních enzymů mělo být ověřeno, zda u nich k prenylaci dochází, či nikoliv. K ověření prenylace však nedošlo z důvodů příliš nízké míry exprese obou proteinů v použitém expresním systému. Optimalizace exprese a charakterizace těchto rekombinantních enzymů z pohledu prenylace bude řešena v rámci mé diplomové práce.

5 Seznam literatury

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vydání, Espero Publishing s.r.o., Ústí nad Labem

Andrews M, Huizinga DH, Crowell DN (2010) The CaaX specificities of *Arabidopsis* protein prenyltransferases explain *eral* and *ggb* phenotypes, *BMC Plant Biol* 10, 118-128

Astot C, Doležal K, Nordström A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua NH, Sandberg (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway, *PNAS* 97, 14778-14783

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glassner JD, Rode CK, Myehew GF, Gregor J, Davis NV, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Maw B, Shac Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* 277, 1453-1474

Bracha K, Lavy M, Yalovsky S (2002) The *Arabidopsis* AtSTE24 Is a CAAX Protease with Broad Substrate Specificity, *J Biol Chem* 277, 29856-29864

Bracha-Drori K, Shichrur K, Lubetzky TC, Yalovsky S (2008) Functional Analysis of *Arabidopsis* Postprenylation CaaX Processing Enzymes and Their Function in Subcellular Targeting, *J Plant Physiol* 148, 119-131

Cieśla J, Frączyk T, Rode W (2011) Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed, *Acta Biochim Pol* 58, 137-147

Cutler S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S, McCourt P (1996) A protein farnesyltransferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, *Science* 273, 1239-1241

Deem AK, Bultema RL, Crowell DN (2006) Prenylcysteine methyltransferase in *Arabidopsis thaliana*, *Gene* 380, 159-166

Fernandez JM, Hoeffler JP, eds (1999) *Gene Expression Systems: Using nature for the art of expression*, Academia Press, San Diego, USA

- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W (2008) Farnesylation Direct AtIPT3 Subcellular Localization and Modulates Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis, *J Plant Physiol* 146, 1155-1164
- Golovko A, Sitbon F, Tillberg E, Nicander B (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol* 49, 161-169
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98
- Johnson CD, Chary SN, Chernoff EA, Zeng Q, Running MP, Crowell DN (2005) Protein Geranylgeranyltransferase I Is Involved in Specific Aspects of Abscisic Acid and Auxin Signaling in Arabidopsis, *J Plant Physiol* 139, 722-733
- Kakimoto T (2001) Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases, *Plant Cell Physiol* 42, 677-685
- Kakimoto T (2003) Biosynthesis of cytokinins, *J Plant Res* 116, 223-239
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H (2004) Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in Arabidopsis, *J Biol Chem* 279, 14049-14054
- Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19, 1176-1179
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate, *Plant J* 37, 128-138
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis, *PNAS* 103, 16598-16603
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2002) Harperova Biochemie, pp. 655-667, 4. vydání, nakladatelství H&H, Praha, Česká republika
- Pawson T (2002) Regulation and Targets of receptor tyrosine kinases, *Eur J Cancer* 38, S3-S10

Rosypal S, Doškař J, Petržík K, Růžičková V (2002) Úvod do molekulární biologie 4. díl, pp. 1085-1140, Grafex Blansko, Brno

Running MP, Lavy M, Sternberg H, Galichet A, Gruissem W, Hake S, Ori N, Yalovsky S (2004) Enlarged meristems and delayed growth in *plp* mutants results from lack of CaaX prenyltransferases, PNAS 101, 7815-7820

Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin S (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases, Biochimie 90, 306-312

Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation, Annu Rev Plant Biol 57, 431-449

Schafer WR, Rine J (1992) Protein Prenylation: Genes, Enzymes, Targets, and Functions, Annu Rev Genet 30, 209-237

Seo J, Lee KJ (2003) Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches, J Biochem Mol Biol 37, 35-44

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2005) Metody molekulární biologie, 1. vydání, Vydavatelství MU, Brno-Kraví Hora, Česká republika

Šmehilová M (2004) Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v *Escherichia coli*, Bakalářská práce, Katedra biochemie, UP Olomouc

Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001) Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferases, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*, J Biol Chem 276, 26405-26410

Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara T (2004) *AtIPT3* is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in *Arabidopsis*, Plant Cell Physiol 45, 1053-1062

Voet D, Voetová JG (1995) Biochemie, Victoria Publishing a.s., Praha, Česká republika

Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin, PNAS 98, 10487-10492

Yalovsky S, Treublood CE, Callan KL, Narita JO, Jenkins SM, Rine J, Grussem W (1997) Plant Farnesyltransferase Can Restore Yeast Ras Signaling and Mating, Mol Cell Biol 17, 1986-1994

Zhang FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences, Annu Rev Biochem 65, 241-269

Manuál QIAGEN[®] PCR Cloning Handbook, April 2008. www.qiagen.com

Manuál k expresnímu vektoru pYES2, 2008, verze K, Life Technologies, Grand Island, USA.
www.invitrogen.com

New England Biolabs www.neb.cz

6 Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová (z angl. abscisic acid)
ADP	adenosin difosfát
AMP	adenosin monofosfát
AtIPT	isopentenyltransferasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtIPT</i>	gen kódující isopentenyltransferasu z <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtICME</i>	gen kódující isoprenylcystein methylesterasu z <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtICMTA/B</i>	geny kódují isoprenylcystein methyltransferasy z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosin trifosfát
<i>AtSte24/AtRce1</i>	geny kódující CaaX proteasy z <i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	páry bází (z angl. base pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
ddH ₂ O	destilovaná deionizovaná voda
DMAPP	dimethylallyl difosfát
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERA1	zýšená odezva na kyselinu abscisovou 1 (z angl. enhanced response to abscisic acid 1)
FPP	farnesyl difosfát
fw	označení primeru „po směru“, ve směru genu 3'→5' (z angl. forward)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
GGB	geranylgeranyltransferasa beta
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
HF	vysoce specifický (z angl. high-fidelity)
iP	isopentenyl adenin
iPMP	isopentenyl adenosinmonofosfát
iPDP	isopentenyl adenosindifosfát
iPRP	isopentenyl adenosinfosfát
iPTP	isopentenly adenosin trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPTG	β-D-1-thiogalactopyranosid
kb	kilobáze
kDa	kilodalton

LeFTA/B	α/β -podjednotka rajčatové farnesyltransferasy
MCS	vícečetné klonovací místo (z angl. multiple cloning site)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyseliny
OD	optická hustota (z angl. optical density)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PFT	proteinová farnesyltransferasa
PGGT-I	proteinová geranylgeranyltransferasa I
PLP	gen kódující α -podjednotku PFT a PGGT-I (z angl. pluripetala)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVDF	polyvinyliden difluorid
rev	označení primeru „proti směru“, proti směru genu 5'→3' (z angl. reverse)
rpm	otáčky za minutu (z angl. rotation per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírane sodného
<i>Taq</i> DNA-pol.	termostabilní DNA polymerasa z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin
TP	tranzitní protein
tRNA	transferová DNA
WT	divoký (z angl. wild-type)
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid