

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Exprese lidského  $\alpha_3 \beta_1$  komplexu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy  
v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae***

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Veronika Kolomazníková**  
Studijní program: B1406 Biochemie  
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Jaroslava Šeflová**  
Rok: 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce, Mgr. Jaroslavě Šeflové, za odborné vedení a pomoc při vypracovávání teoretické i experimentální části práce, dále také za její vstřícnost, trpělivost a především čas, který mi věnovala. Jako další bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Čechové za poskytnutí obrázků struktur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Kolomazníková
Název práce	Expresce lidského $\alpha_3 \beta_1$ komplexu $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy v kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jaroslava Šeflová
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Cílem této bakalářské práce byla příprava lidského komplexu <math>\alpha_3 \beta_1</math> <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPasy v kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPasa byla úspěšně připravena jako fúzní protein s histidinovou kotvou na N-konci <math>\beta</math> podjednotky. Důležitými faktory pro přípravu membránových proteinů je složení kultivačního média, rozrušení buněčné membrány detergenty a doba solubilizace membrán. Jako účinnější se ukázala solubilizace 2 hodiny pomocí detergentů SDS a DDM. Nicméně, využití afinitní chromatografie vedlo ke značným ztrátám podjednotky <math>\alpha</math>. Jako vhodnější metoda se ukázala purifikace s využitím diferenciatní centrifugace založená na protokolu izolace <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPasy z vepřových ledvin. Při úspěšné přípravě lidského <math>\alpha_3 \beta_1</math> komplexu <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPasy v aktivním stavu je možné studovat strukturní změny způsobené mutacemi v genu <i>ATPIA3</i> kódující isoformu <math>\alpha_3</math>, jejíž mutace zapříčiňují několik neurologických poruch.</p>
Klíčová slova	Sodno-draselná pumpa, exprese, kvasinky, neurologické poruchy
Počet stran	65
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Kolomazníková
Title	Expression of human $\alpha_3 \beta_1$ complex of the $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jaroslava Šeflová
The year of presentation	2017
Abstract	<p>We expressed the human complex <math>\alpha_3 \beta_1</math> of <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPase in yeast cells <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. The recombinant protein was expressed as the His-tag fusion protein, which was localised on the N-terminus of <math>\beta</math> subunit. A crucial step in the purification of membrane proteins is their solubilisation with detergents. We identified the suitable detergents (malto-sides and SDS) and the incubation time for membrane solubilisation. Moreover, the considerable losses of the <math>\alpha</math> subunit occurred during the affinity chromatography. According to these findings we decided to change the purification procedure. We used the analogous protocol for the isolation of the porcine kidney <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPase. The preparation of <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPase in yeast can be useful for the studies of mutation effects on the enzyme structure.</p>
Keywords	Sodium-potassium pump, expression, yeast, neurological disorders
Number of pages	65
Number of appendices	3
Language	Czech

## Obsah

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Biologické membrány a membránový transport	2
2.1.1	Lipidy	2
2.1.2	Membránové proteiny	5
2.2	Membránový transport	7
2.2.1	Pasivní transport	8
2.2.2	Aktivní transport	9
2.2.3	Transportní membránové proteiny	11
2.3	ATPasy	12
2.3.1	ATPasy P-typu	12
2.4	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa	14
2.4.1	Transportní cyklus Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasy	15
2.4.2	Podjednotka $\alpha$	16
2.4.3	Podjednotka $\beta$	17
2.4.4	FXD proteiny	19
2.4.5	Onemocnění související s Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasou	20
2.5	Vybrané metody molekulární biotechnologie	22
2.5.1	Klonovací vektory	22
2.5.2	Heterologní exprese proteinů	23
2.5.3	Inducibilní promotory	24
2.5.4	Purifikace membránových proteinů	25
2.6	Stanovení čistoty a množství proteinů	27
2.6.1	Elektroforéza	27
2.6.2	Western blot	27
2.6.3	Metody určení koncentrace celkových proteinů	28
2.6.4	Určení ATPasové aktivity	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Chemikálie	29
3.1.1	Kmen kvasinek	29
3.1.2	Kultivační média	29
3.1.3	Roztoky a pufrý	30
3.2	Použité přístroje	33
3.3	Metody	34
3.3.1	Transformace kvasinek	34

3.3.2	Pěstování kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pro produkci membránových proteinů	34
3.3.3	Příprava membrán z kvasinkové kultury	36
3.3.4	Solubilizace kvasinkových membrán	36
3.3.5	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) Tris-Tricin	37
3.3.6	Western blotting s nitrocelulosoovou membránou	38
3.3.7	Western blotting s PVDF membránou	39
3.3.8	Určení koncentrace Bradfordovou metodou	39
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5	ZÁVĚR	56
6	LITERATURA	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61
	APENDIX	63

## **Cíle práce**

1. Zpracujte teoretickou rešerši o  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, zejména s ohledem na výskyt různých isoform v lidských buňkách.
2. Proved'te expresi lidského komplexu  $\alpha_3 \beta_1 \text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy, včetně optimalizace exprese tohoto membránového proteinu.
3. Sledujte množství a čistotu získaných proteinů v závislosti na použitých experimentálních podmínkách a diskutujte výsledky.



# 1 ÚVOD

Expres lidského  $\alpha_3 \beta_1$  komplexu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* je problematika, která zatím nebyla v odborné literatuře popsána. Toto téma je ovšem důležité nejen pro vývoj optimalizačních protokolů heterologní přípravy membránových proteinů, ale i pro výzkum patologických stavů spojených s nesprávnou funkcí  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy. Výsledkem nesprávné funkce proteinu mohou být hypertenze, ale i k neurologické poruchy.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa patří do rodiny ATPas P-typu a je životně důležitou součástí všech živočišných buněk. Jedná se o heterodimer, jehož funkční celek tvoří dvě podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ). Tento enzym, označován také jako sodno-draselná pumpa, transportuje tři cytoplasmatické  $\text{Na}^+$  ionty ven do extracelulárního prostoru, následně váže dva extracelulární  $\text{K}^+$  ionty a transportuje je do cytoplasmy. Celý proces je umožněn díky energii získané hydrolýzou ATP. Pumpa je zodpovědná nejen za transport iontů přes membránu, ale i za tvorbu elektrochemického gradientu, který je významný pro sekundární transport a další buněčné procesy.

Bakalářská práce se zaměřuje především na optimalizaci kvasinkové exprese přirozených forem komplexu  $\alpha_3 \beta_1$ . V tomto komplexu se vykytuje  $\alpha_3$  isoforma kódovaná genem *ATPIA3*, jehož mutace souvisí s několika neurologickými poruchami (Familial Hemiplegic Migraine 2, Alternating Hemiplegia of Childhood, Rapid-Onset Dystonia Parkinsonism, CAPOS syndrom). Tato isoforma je přirozeně lokalizována pouze v neuronech, tudíž je její izolace a následné studium obtížné. Moderní biotechnologické metody představují vhodnou alternativu přípravy tohoto proteinu. Při získání přirozených forem proteinu v aktivním stavu mohou být mutanti pro studium neurologických poruch snadno připraveni vložením bodové mutace pomocí místně-specifické mutagenese.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Biologické membrány a membránový transport**

Buněčná membrána se vyskytuje jak u prokaryotních, tak eukaryotních buněk, a to nejen jako vnější obalová membrána, ale i jako membrána jednotlivých organel (endoplasmatické retikulum, mitochondrie, diktyozom). Membrána je tvořena lipidovou dvouvrstvou spolu s molekulami proteinů. Jedná se o fluidní dynamickou strukturu o tloušťce cca 5 nm, držící pohromadě především díky nekovalentním interakcím.

Biologické membrány se všemi svými součástmi slouží jako bariéra mezi buněčným cytosolem a vnějším prostředím. Jejich přítomnost je pro buňku klíčová, jelikož dovolu- je udržet rozdílnou koncentraci rozpuštěných látek v cytosolu od koncentrace vně buňky. Interakce buňky s okolním prostředím je nutná vzhledem k tomu, že buňka není schopná fungovat jako samostatný uzavřený systém. Je tedy důležité, aby buňka mohla přijímat živiny z vnějšího prostředí, vylučovat metabolické odpadní produkty a regulovat intracelulární iontovou koncentraci. Všechny tyto procesy jsou umožněny díky membránovému transportu (Alberts *et. al.*, 2002).

#### **2.1.1 Lipidy**

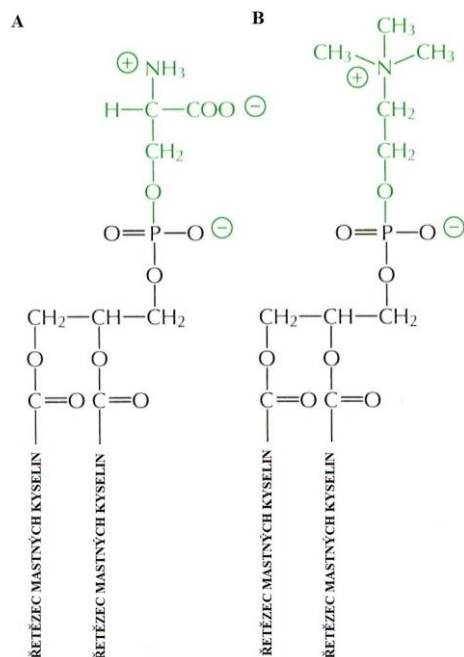
Lipidové molekuly jsou jednou ze základních složek membrán. Mají amfipatický charakter, tzn., že obsahují hydrofobní (nepolární) a hydrofilní (polární) část. Samotná lipidová molekula se skládá ze dvou základních částí, nepolární hlavy a dvou polárních uhlovodíkových řetězců. Tyto uhlovodíkové řetězce mají délku 14 až 24 uhlíků a jsou obvykle tvořeny zbytky vyšších mastných kyselin. Fluiditu membrány ovlivňuje celková organizace lipidových molekul, délka a nasycenost uhlovodíkových řetězců. Právě díky fluidní struktuře slouží membrána jako relativně nepropustná bariéra pro ve vodě nerozpustné molekuly. Membrána je tvořena především fosfolipidy, cholesterolem a glykolipidy. Složení lipidové dvojvrstvy se liší v závislosti na jejím umístění. Příklady složení několika biomembrán jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Procentuální podíl celkového množství lipidů na základě hmotnosti v rozdílných biologických membránách (převzato a upraveno podle Alberts *et. al.*, 2008, str. 624 ).

Molekula	Plasmatická membrána jaterních buněk	Plasmatická membrána červených krvinek	Mitochondrie	ER*	Bakterie <i>E. coli</i>
Cholesterol	17	23	3	6	0
Fosfatidylethanolamin	7	18	25	17	70
Fosfatidylserin	4	7	2	5	Stopové množství
Fosfatidylcholin	24	17	39	40	0
Sfingomyelin	19	18	0	5	0
Glykolipidy	7	3	Stopové množství	Stopové množství	0
Ostatní	22	13	21	27	30

\*ER – endoplasmatické retikulum

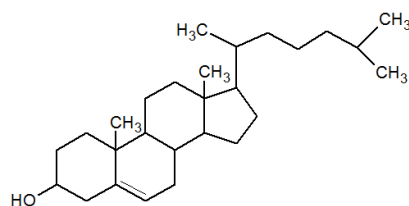
Jednou z nejvíce zastoupených skupin lipidů v membránách jsou fosfolipidy. V plasmatické membráně savců se vyskytují převážně 4 skupiny – fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, sfingomyelin a fosfatidylserin (Obr. 1). Při fyziologickém pH mají tyto fosfolipidy elektricky neutrální náboj, až na posledně jmenovaný, který se vyskytuje s nábojem záporným. Distribuce fosfolipidů v membránách je ale asymetrická. Většina lipidových molekul obsahující cholin (např. fosfatidylcholin, sfingomyelin) je orientována především na vnější straně membrány. Naopak fosfolipidové molekuly obsahující koncovou primární amino skupinu (fosfatidylethanolamin a fosfatidylserin) se vyskytují na vnitřní straně membrány. Asymetrie membrány, spolu s rozdílným nábojem lipidů, má vliv na funkci membrány, ale i na vazbu proteinů. Příkladem může být cytosolický enzym protein kináza C (PKC), který je aktivován jako odpověď na různé extracelulární signály. Tento enzym se váže na cytosolickou stranu membrány, přičemž pro vazbu vyžaduje negativní náboj fosfatidylserinu, který je lokalizován právě na této straně membrány.



Obr. 1: Vzorce fosfolipidů zastoupených v biologických membránách (A) fosfatidylserin a (B) fosfatidylcholin (převzato a upraveno podle Alberts *et. al.*, 2002, str. 590 ).

Dalším molekulou hojně se vyskytující v buněčných membránách je cholesterol (Obr. 2). Jedná se o amfipatickou molekulu nacházející se převážně v plasmatické membráně eukaryotních buněk. Primární funkcí cholesterolu je zlepšení propustnosti membrány díky polární hydroxylové části rozpustné ve vodě. Rostlinné buňky mají velmi nízkou koncentraci cholesterolu a v membránách bakterií se dokonce nevyskytuje vůbec (viz složení membrány bakterie *Escherichia coli* uvedené v Tab. 1). Tento snížený výskyt cholesterolu může být vysvětlen přítomností buněčné stěny.

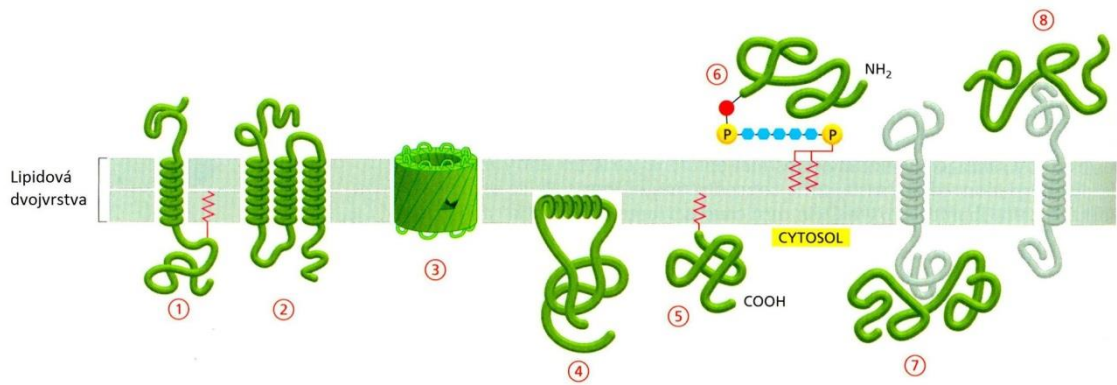
Poslední skupinou lipidů vyskytující se ve větším množství v biologických membránách jsou glykolipidy. Distribuce glykolipidů v buněčné membráně je výrazně asymetrická. Děje se tak v důsledku přidání cukernatého zbytku k lipidovým molekulám v lumen Golgiho aparátu, které je podobné vnějšímu prostředí buňky. Glykolipidy se vyskytují především na necytosolické vrstvě plasmatické membrány buněk (viz Tab. 1). Důležitou roli mají zejména v živočišných buňkách, kde zprostředkovávají komunikaci s vnějším prostředím (Alberts *et. al.*, 2002).



Obr. 2: Molekula cholesterolu (vytvořeno pomocí programu ChemSketch).

### 2.1.2 Membránové proteiny

Membránové proteiny jsou sdružené s lipidovou dvouvrstvou a zprostředkovávají většinu funkcí membrány, jako je transport specifických molekul přes membránu nebo katalýza reakcí asociovaných s membránou (např. syntéza ATP). Množství a typ proteinů vyskytujících se v membráně je velice variabilní. Plasmatická membrána obecně obsahuje 50 % proteinů a 50 % lipidů. Výjimku tvoří myelinová membrána obalující dlouhý výběžek neuronu (obsahuje méně než 25 % proteinů), nebo membrány zapojené v produkci ATP (obsahující až 75 % proteinů). Velká část membránových proteinů je před ukotvením v membráně glykosylována v lumen endoplasmatického retikula nebo Golgiho aparátu.



Obr. 3: Způsoby asociace membránových proteinů s buněčnou membránou. Většina transmembránových proteinů prochází skrz lipidovou dvojrstvu jako (1) jednoduchý  $\alpha$  helix, (2) několikanásobný  $\alpha$  helix nebo (3)  $\beta$  barel. Ostatní membránové proteiny se vyskytují pouze na jedné straně membrány. Patří sem (4) proteiny ukotvené pomocí amfipatického  $\alpha$  helixu, (5) proteiny kovalentně vázané na lipidy, (6) proteiny vázané pomocí glykosilfosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Poslední možností ukotvení je nekovalentní vazba na jiné membránové proteiny (7, 8). (Převzato a upraveno podle Alberts *et. al.*, 2008, str. 630).

Různé membránové proteiny mohou být s buněčnou membránou asociovány odlišnými způsoby. Membránové proteiny dělíme, podle jejich asociace s membránou, na následující typy: transmembránové proteiny, proteiny ukotvené pomocí  $\alpha$  helixu, proteiny kovalentně vázané proteiny na lipidy, vazba proteinů pomocí fosfatidylinositolu a nekovalentně vázané proteiny. Všechny varianty asociace proteinů s membránou jsou zobrazeny na Obr. 3.

První jmenované jsou transmembránové proteiny. Většina transmembránových proteinů prochází lipidovou dvojrstvou jako jednoduchý  $\alpha$  helix (varianta jedna na Obr. 3), několikanásobný  $\alpha$  helix (varianta dvě na Obr. 3), nebo svinutý  $\beta$  skládaný list, označován také jako  $\beta$  barel (varianta tři na Obr. 3). Některé z těchto proteinů mají navíc kovalentně vázaný řetězec mastných kyselin ukotvený v cytosolické vrstvě buněčné membrány (varianta jedna na Obr. 3). Transmembránové proteiny procházejí přes buněčnou membránu a jsou amfipatické, stejně jako membrána. Jejich hydrofobní část prochází lipidovou dvojrstvou a interaguje s hydrofobním řetězcem lipidových molekul, tvořící membránu. Tato část obvykle obsahuje 20 – 30 aminokyselin. Oproti tomu hydrofilní část je vystavena vodnému prostředí na druhé straně membrány. Hydrofobicita některých transmembránových proteinů může být zvýšena kovalentní vazbou na řetězce mastných kyselin. Transmembránové proteiny jako jediné procházejí přes celou lipidovou dvojrstvu, takže mohou interagovat na obou jejich stranách. Tyto proteiny

často slouží jako receptory na vnější straně plasmatické membrány, kde zajišťují příjem a přenos extracelulárního signálu do buňky. O důležitosti transmembránových proteinů svědčí jejich množství v organismech. Příkladem mohou být pučící kvasinky, kde transmembránové proteiny tvoří 20 % z celkového proteomu.

Dalším typem jsou proteiny asociované s membránou. Tyto proteiny se vyskytují pouze na jedné straně lipidové dvojvrstvy. První možností asociace s membránou je ukotvení pomocí amfipatického  $\alpha$  helixu (varianta čtyři na Obr. 3). Takovéto proteiny mohou být ukotveny pouze na cytosolické straně membrány. Další variantou ukotvení je kovalentní vazba na lipidový řetězec (varianta pět na Obr. 3). Tento řetězec je tvořen zbytky mastných kyselin nebo prenylovou skupinou. Tímto způsobem je opět možné ukotvit proteiny pouze na cytosolické straně membrány. Obecně je možné připojit protein k membráně také pomocí glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy (varianta šest na Obr. 3). Protein díky tomu zůstane kovalentně vázaný na necytosolické straně membrány. Výhodou je, že proteiny ukotvené pomocí GPI kotvy mohou být od membrány snadno odděleny, například pomocí specifického enzymu fosfatidylinositol fosfolipasa C.

Poslední skupinou jsou proteiny asociované s membránou pomocí nekovalentních interakcí s jinými membránovými proteiny (varianty sedm a osm na Obr. 3). Tento druh membránových proteinů nezasahuje do hydrofobní části membrány vůbec. Takové proteiny dělíme na periferní a integrální membránové proteiny a mohou se vyskytovat na obou stranách lipidové dvojvrstvy. Nekovalentně vázané proteiny lze relativně snadno oddělit od membrány např. pomocí roztoku s extrémním pH. Oproti tomu integrální membránové proteiny drží v membráně velice pevnou vazbou a nemohou být takto uvolněny (Alberts *et. al.*, 2002).

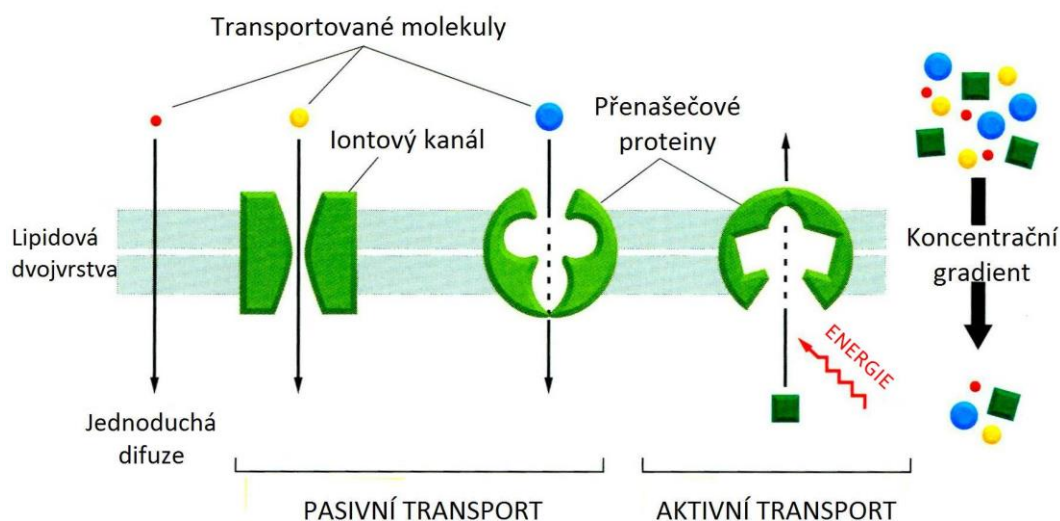
## 2.2 Membránový transport

Jednoduchou difúzí jsou transportovány pouze nepolární molekuly a voda (viz Obr. 4). Pro ostatní látky, jako jsou ionty, cukry, aminokyseliny nebo nukleotidy, jsou třeba speciální transportní membránové proteiny. Membránový transport generuje elektrochemický gradient udržováním rozdílné iontové koncentrace na vnitřní a vnější straně lipidové dvojvrstvy. Vzniklý elektrochemický gradient se následně využívá na další transportní procesy, jako je například přenos elektrického signálu v excitabilních buňkách, nebo na tvorbu ATP enzymem ATP synthasa. Membránový transport umožňuje přenos

téměř jakékoliv molekuly přes buněčnou membránu, přičemž rychlost tohoto přenosu závisí na velikosti molekuly a jejích hydrofobních vlastnostech. Malé napolární molekuly, jako je kyslík nebo oxid uhličitý, projdou přes membránu velmi snadno. Nicméně, membrána je téměř nepropustná pro nabitě ionty, přestože je jejich velikost zanedbatelně malá. Z tohoto důvodu si buňka vytváří speciální transportní membránové proteiny, které umožňují a urychlují transport přes membránu. Děje se tak na základě rozdílné iontové koncentrace na vnitřní a vnější straně lipidové dvojvrstvy. Transportní membránové proteiny rozdělujeme na dvě základní skupiny – přenašečové proteiny (pumpy) a iontové kanály (Alberts *et. al.*, 2002).

### 2.2.1 Pasivní transport

Pasivní transport, označován také jako usnadněná difúze, je umožněn rozdílnou koncentrací iontů na opačných stranách membrány. Rozdílná iontová koncentrace tvoří tzv. koncentrační gradient, který řídí a určuje směr pasivnímu transportu. Díky koncentračnímu gradientu již není potřeba dodávat energii pro transport z jiných zdrojů. Pasivní transport využívají všechny iontové kanály, ale i velké množství přenašečových proteinů (viz Obr. 4). Pasivní transport je omezen na přenos jednoduchých, elektroneutrálních molekul (Alberts *et. al.*, 2002).

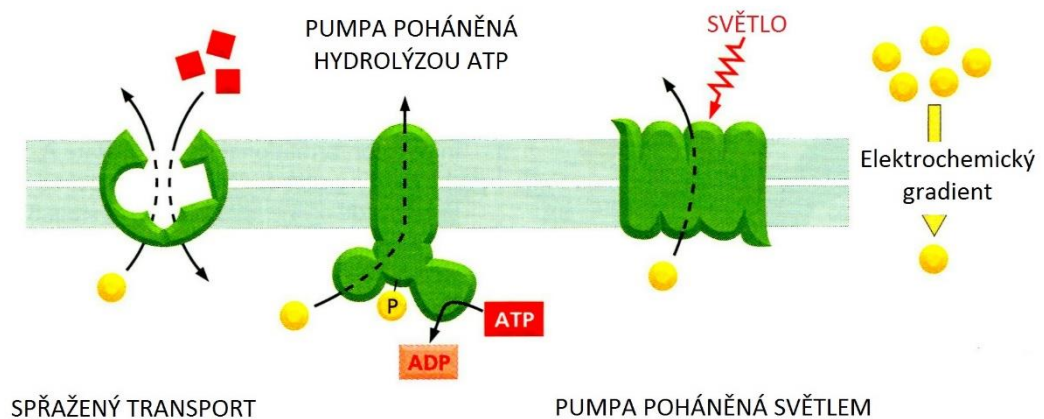


Obr. 4: Schéma pasivního a aktivního transportu (převzato a upraveno podle Alberts *et. al.*, 2008, str. 654).



## 2.2.2 Aktivní transport

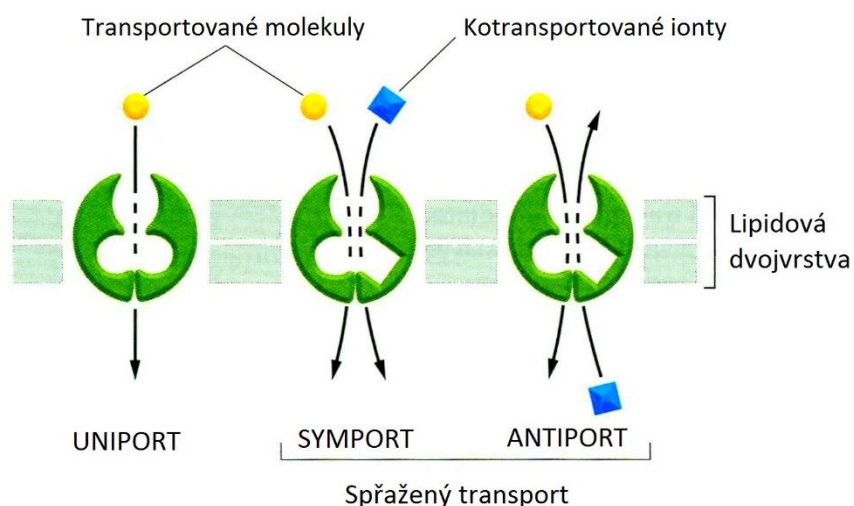
Hlavní dominantou aktivního transportu je přenos nabitých molekul. Díky nabitým molekulám dochází ke generování tzv. membránového potenciálu, který spolu s iontovým/koncentračním gradientem vytváří elektrochemický gradient. Transport molekul proti jejich elektrochemickému gradientu vyžaduje dodání energie z vnějšího zdroje (viz Obr. 4). K tomu se využívá metabolická energie z hydrolýzy ATP nebo z iontového gradientu. Aktivní transport je prováděn s využitím některých přenašečových proteinů, které se často označují jako pumpy. Buňky vykonávají aktivní transport následujícími třemi způsoby: spřaženým transportem, pomocí pump poháněných hydrolýzou ATP, pomocí pump poháněných světlem. Všechny tyto možnosti jsou zobrazeny na Obr. 5.



Obr. 5: Způsoby aktivního transportu - aktivně transportované molekuly mají žlutou barvu, zdroj energie pro daný transport je znázorněn červeně (převzato a upraveno podle Alberts *et. al.*, 2008, str. 656).

Přenos jednotlivých molekul je pak umožněn pomocí tří různých mechanismů označovaných jako uniport, symport a antiport (Obr. 6). Rozdíl mezi těmito mechanismy je v počtu molekul, které jsou přes membránu přenášeny a také ve směru přenosu. Při uniportu jde o jednoduchý transport jedné molekuly přes membránu. V případě symportu a antiportu hovoříme již o tzv. spřaženém transportu. Symport je závislý transport dvou různých molekul ve stejném směru (z jedné strany membrány na druhou). Oproti tomu antiport transportuje dvě molekuly v opačném směru. Spřažený transport využívá jako hybnou sílu energii uloženou v podobě elektrochemického gradientu jedné z molekul (typicky iontu).

Aktivní transport můžeme také rozdělit na primární a sekundární. V případě primárního aktivního transportu se přenáší pouze jedna částice. Také je zapotřebí volná energie např. ve formě ATP. Obecně tedy můžeme říci, že pumpy poháněné hydrolýzou ATP zprostředkovávají primární transport. Sekundární aktivní transport se týká především spřaženého transportu. Zajišťují ho pumpy řízené ionty, tudíž energie nepochází ze štěpení makroergické vazby ATP, ale z rozdílu elektrochemického gradientu (Alberts *et. al.*, 2002).



Obr. 6: Mechanismy přenosu molekul přes membránu (Převzato a upraveno podle Alberts *et. al.*, 2008, str. 656).

### 2.2.3 Transportní membránové proteiny

Biologické membrány obsahují několik druhů transportních proteinů, přičemž každý druh se specializuje na transport specifické třídy molekul. Tyto proteiny umožňují průchod molekul přes membránu bez nutnosti přímého kontaktu s hydrofobní částí lipidové dvojvrstvy.

Prvním typem transportních membránových proteinů jsou přenašečové proteiny neboli pumpy. Tyto proteiny obsahují jedno, ale i více vazebných míst pro přenášenou molekulu. Do tohoto místa se molekula naváže a následně přenašečový protein prodělá konformační změnu, aby danou látku přenesl. Transport je reversibilní proces, jehož princip je podobný reakci enzym-substrát, s tím rozdílem, že oproti enzymatické reakci transportovaná molekula není kovalentně modifikovaná.

Druhou skupinou jsou iontové kanály. Tyto transportní membránové proteiny formují hydrofilní póry, které prochází skrz celou lipidovou dvojvrstvu. V případě, že jsou póry otevřené, mohou jimi procházet molekuly daného druhu (nejčastěji to jsou anorganické ionty shodného náboje a velikosti). Transport pomocí iontových kanálů je mnohem rychlejší než pomocí přenašečových proteinů, ale je méně specifický než ten zprostředkovaný proteiny (Alberts *et. al.*, 2002).

## 2.3 ATPasy

ATPasy jsou enzymy katalyzující přeměnu ATP na ADP a fosfát za vzniku energie. Specifickou skupinou ATPas jsou transmembránové ATPasy využívající vzniklou energii pro přenos molekul přes membránu. Hlavními typy těchto enzymů jsou ATPasy F-typu, ATPasy P-typu a ABC transportéry. K ATPasám P-typu patří enzym  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, který je klíčový pro tuto práci, proto bude tato skupina podrobně popsána v samostatné podkapitole.

První zmíněnou skupinou jsou ATPasy F-typu, označované také jako ATP syntasy. Jedná se o multipodjednotkové komplexy s enzymatickými vlastnostmi. Vyskytují se v plasmatické membráně bakterií, tylakoidní membráně chloroplastů a ve vnitřní mitochondriální membráně (zde se označují jako V komplex). Oproti ostatním ATPasám fungují ATPasy F-typu reverzně, a proto jejich iontový gradient řídí syntézu ATP z ADP a fosfátu. Iontový gradient je generován během transportu elektronů v průběhu oxidativní fosforylace aerobních bakterií a mitochondrií, nebo během fotosyntézy v chloroplastech.

Druhou skupinou přenašečových proteinů využívajících energii z hydrolýzy ATP jsou ABC transportéry. Název proteinů je odvozený z anglického „ATP-Binding Cassettes“. Tato skupina je, co do počtu typů největší a také nejrozmanitější. ABC transportéry jsou důležitým cílem klinického výzkumu, protože zahrnují proteiny zodpovědné za cystickou fibrózu, nebo přirozenou rezistenci rakovinných buněk vůči léčivům (Alberts *et. al.*, 2002).

### 2.3.1 ATPasy P-typu

Rodina ATPas P-typu čítá okolo 300 členů s podobným mechanismem iontového transportu (Kaplan, 2002). ATPasy P-typu jsou životně důležité pro všechny eukaryotní i pro většinu prokaryotních buněk. Jsou zodpovědné za transport iontů přes membrány, tvorbu elektrochemického gradientu a zajišťují i asymetrickou distribuci lipidů napříč membránami. Tyto esenciální pumpy spotřebovávají značnou část energie buňky - celkově se jedná o 1/3 veškeré energie, nicméně v mozku se hodnoty pohybují od 40 do 70 % celkové energie (Bublitz *et. al.*, 2016).

Klasifikace ATPas P-typu je založena na substrátové specifitě enzymu. Dělíme je do 5 tříd ( $P_I - P_V$ ), z nichž nejlépe prostudovaná je třída  $P_{II}$ . Do této skupiny patří živočišná  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, ale například i  $\text{H}^+$ -ATPasa, lokalizovaná v buňkách

rostlin a hub (Bublitz *et. al.*, 2010). Tato rodina ovšem nezahrnuje pouze sodné, draselné nebo protonové pumpy, ale také pumpy transportující těžké kovy a lipidy (Axelsen a Palmgren, 2001).

Pouze u dvou enzymů z této skupiny byl popsán funkční celek složený z více než jedné podjednotky. Jedná se o enzymy  $H^+/K^+$ -ATPasa a  $Na^+/K^+$ -ATPasa, přičemž oba tyto enzymy jsou tvořeny podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ . Jedním z možných vysvětlení je, že transport draselných iontů vyžaduje specifickou stabilizaci, kterou umožňuje právě podjednotka  $\beta$  (Kaplan, 2002).

## 2.4 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (sodno-draselná pumpa, NKA) je membránově vázaný protein s katalytickými vlastnostmi, skládající se ze dvou podjednotek (Obr. 7). Jedná se tedy o heterodimer, tvořený komplexem podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , s nimiž je asociován protein z FXYD rodiny (často označován jako podjednotka  $\gamma$ ) (Morth *et. al.*, 2007). Jednotlivé podjednotky budou detailně popsány v následujících podkapitolách.

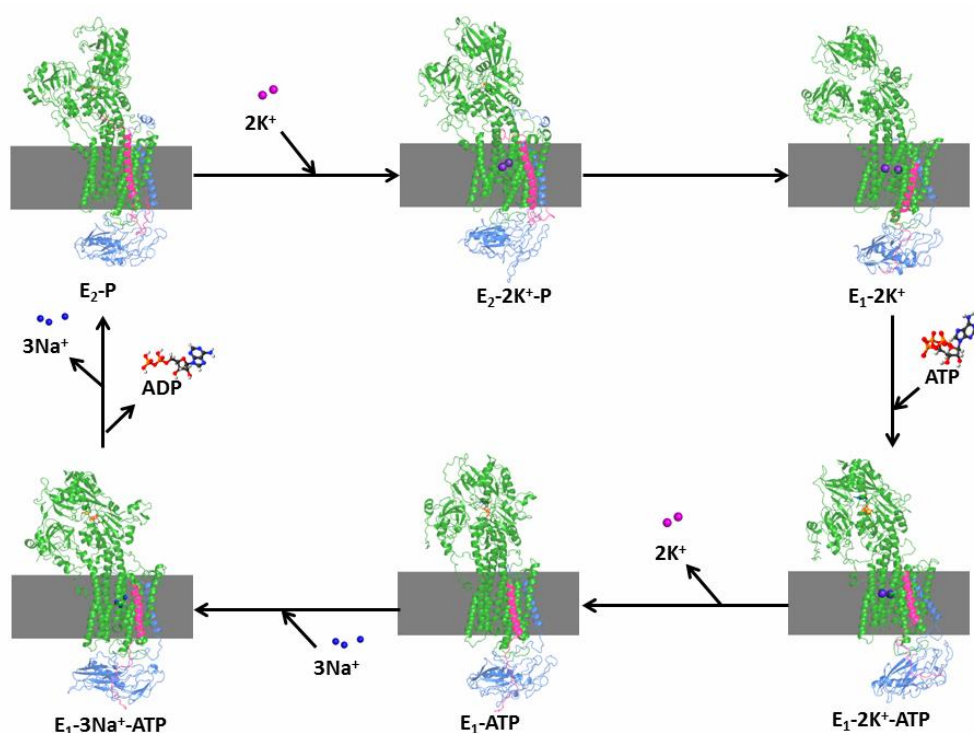
Pumpa je zodpovědná za udržování elektrochemického gradientu napříč plasmatickou membránou, což je nezbytné pro regulaci objemu buňky, udržování klidového potenciálu nebo pro sekundární aktivní transportní systémy (Capendeguy *et. al.*, 2006).



Obr. 7: Celková struktura Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasy vytvořená na základě krystalové struktury s PDB ID 2ZXE (Shinoda, 2009) pomocí programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, 2013).

## 2.4.1 Transportní cyklus $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy

Během transportního cyklu váže pumpa tři cytoplasmatické  $\text{Na}^+$  ionty a uvolňuje je na extracelulární straně membrány, následně váže dva extracelulární  $\text{K}^+$  ionty a transportuje je do cytoplasmy. Celý proces je umožněn díky energii získané hydrolýzou ATP (Carpender *et. al.*, 2006). Transport iontů umožňují konformační změny enzymu mezi dvěma stavy, často označovány jako  $E_1$  a  $E_2$  (Morth *et. al.*, 2007). Transportní cyklus sodno-draselné pumpy je detailně popsán v Obr. 8. Toto schéma se označuje jako Post-Albersův diagram.



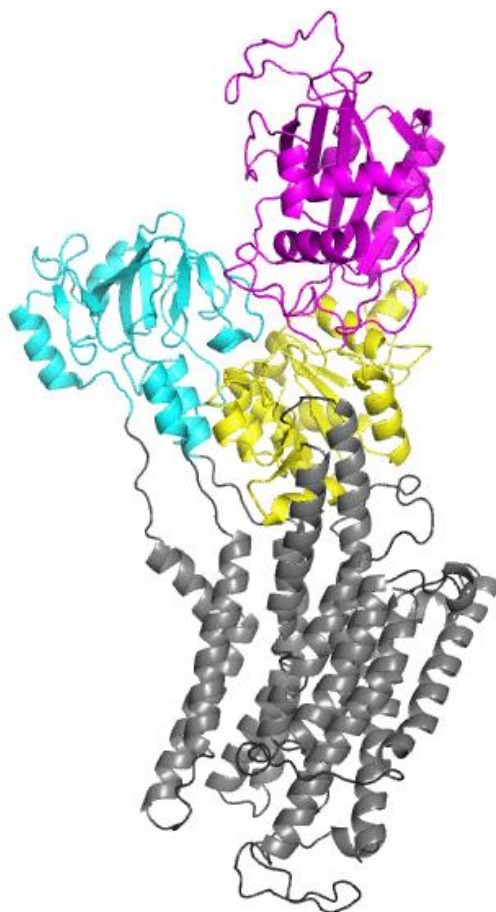
Obr. 8: Post-Albersův diagram ilustrující reakční cyklus NKA. První fází cyklu je vazba intracelulárních sodných iontů na protein, což katalyzuje fosforylaci samotného enzymu pomocí již navázaného ATP. Toto uspořádání se nazývá  $E_1$  a protein při něm vykazuje vysokou afinitu právě pro sodné ionty a ATP. Fosforylaci se stav mění na  $E_1$ P, následně ADP opouští protein, díky čemuž mohou být okludovány sodné ionty. Tři sodné ionty jsou vypuštěny na extracelulární straně. Po vazbě draselných iontů na vnějším povrchu proteinu se konformace mění na  $E_2$ P. Dále dochází k defosforylaci proteinu, uvolní se fosfát na vnitřní straně proteinu a dojde k okluzi draselných iontů. Konformace se změní na  $E_2$ K<sub>2</sub>. Uvolnění draselných iontů do intracelulárního prostoru je katalyzován ATP, které se naváže do místa s velmi nízkou afinitou. Enzym se z konformačního stavu  $E_2$  vrací zpět do  $E_1$ , kde má nízkou afinitu pro draselné ionty. Díky tomu jsou draselné ionty uvolněny na intracelulární straně a protein je připraven začít nový cyklus (Kaplan, 2002). Obrázky konformací s vázanými sodnými nebo draselnými ionty byla vytvořena na základě krystalových struktur s PDB ID 4HPQ (Nyblom *et. al.*, 2013) a 2ZXE (Shinoda, 2009).

### 2.4.2 Podjednotka $\alpha$

Podjednotka  $\alpha$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy se skládá přibližně z 1000 aminokyselinových zbytků, což odpovídá molekulové hmotnosti 110 kDa (Morth *et. al.*, 2007). Struktura podjednotky  $\alpha$  je zobrazena na Obr. 9. Podjednotka  $\alpha$  obsahuje katalytické místo pro ATP, vazebná místa pro sodné i draselné ionty a také vazebné místo pro ouabain – specifický inhibitor sodno-draselné pumpy (Capendeguy *et. al.*, 2006). Tato podjednotka je tvořena 10 transmembránovými segmenty označovanými M1 – M10 (Morth *et. al.*, 2007) a třemi cytoplasmatickými doménami, pojmenovanými podle své funkce. První je doména A (z anglického „anchor nebo „actuator“) ukotvující enzym, další doména P (z anglického „phosphorylation“) podléhá fosforylaci a doména N (podle „nucleotide-binding“) umožňuje vazbu ATP (Toyoshima *et. al.*, 2011). Strukturu této podjednotky prezentujeme na Obr. 9.

Podjednotka  $\alpha$  se v lidském těle vyskytuje ve čtyřech různých isoformách (Lingrel *et. al.*, 2007). Isoforma  $\alpha_1$  (kódována genem *ATP1A1*) se vyskytuje ve všech tkáních, kde je převládající isoformou. Také se jako, jediná isoforma, vyskytuje ve vnější ledvinové dřeni. Isoforma  $\alpha_2$  (kódována genem *ATP1A2*) je dominantní isoformou příčně pruhované svaloviny, nicméně může se vyskytovat i v mozku (astrocyty), srdci, očních bulvách a adiposní tkáni. Další isoformou vyskytující se také v mozku, ale pouze v neuronech, je  $\alpha_3$  kódovaná genem *ATP1A3* (Morth *et. al.*, 2008). Poslední isoformou je  $\alpha_4$  (kódována genem *ATP1A4*), která je exprimována výhradně ve varlatech (Woo *et. al.*, 2000).





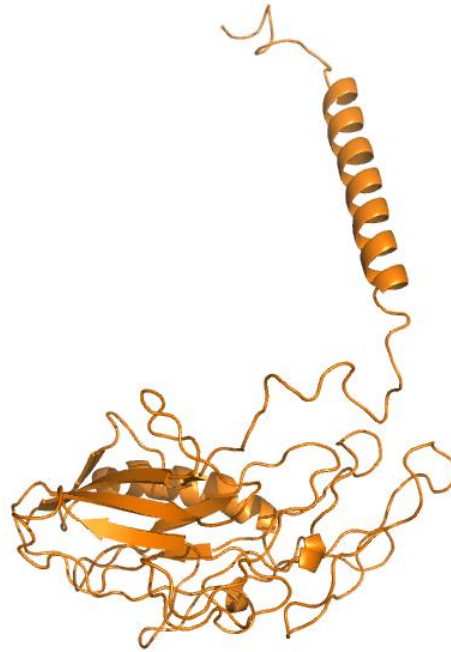
Obr. 9: Struktura podjednotky  $\alpha$  získaná pomocí programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, 2013) na základě struktury s PDB ID 2ZXE (Shinoda, 2009). Transmembránová část proteinu je zobrazena šedě, modře je zobrazena A doména, P doména je žlutá a N doména je růžová.

### 2.4.3 Podjednotka $\beta$

Podjednotka  $\beta$  má velikost okolo 55 kDa (cca 370 aminokyselin) a u člověka byly popsány její 3 isoformy (Geering, 2008). Skládá se z N-terminální cytoplasmatické domény, obsahující přibližně třicet aminokyselin, jednoho transmembránového helixu, lokalizovaného ve žlábkku mezi M7 a M10 smyčkou podjednotky  $\alpha$  a velké ektodomény, pokrývající téměř celý extracelulární povrch podjednotky  $\alpha$  (Toyoshima *et. al.*, 2011). Samostatná struktura podjednotky  $\beta$  je pak znázorněna na Obr. 10.

Podjednotka  $\beta$  je glykoprotein, fungující jako molekulární chaperon. Tato podjednotka významně ovlivňuje strukturu, ale i funkci NKA. Napomáhá také sbalení a integraci podjednotky  $\alpha$  do plasmatické membrány (Geering, 2001; Geering 2008). Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že podjednotka  $\beta$  pokrývá extracelulární smyčky

mezi helixy M5 a M6 a mezi M7 a M8 podjednotky  $\alpha$ , přičemž nad nimi tvoří uzávěr, což naznačuje účast podjednotky  $\beta$  v transportu draselných iontů (Morth *et. al.*, 2007).

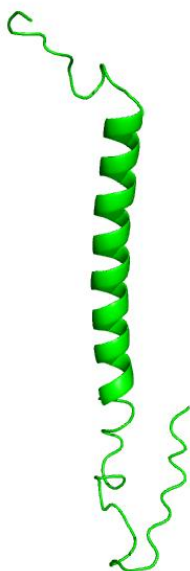


Obr. 10: Struktura podjednotky  $\beta$  získaná pomocí programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, 2013) na základě struktury s PDB ID 2ZZE (Shinoda, 2009).

#### 2.4.4 FXYP proteiny

Ve většině případů je  $\alpha\beta$  komplex asociován s tkáňově specifickým proteinem z FXYP rodiny. Lidské tělo obsahuje celkem 7 různých proteinů z této rodiny a konkrétně protein FXYP2 bývá v literatuře často označován jako podjednotka  $\gamma$ . Jedná se o proteiny tvořené přibližně 30 aminokyselinami, většinou se strukturou  $\alpha$ -helixu (viz Obr. 11). Na základě struktury získané pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) bylo zjištěno, že extracelulární část těchto proteinů obsahuje konzervovanou sekvenci aminokyselin fenylalanin – libovolná aminokyselina – tyrosin – kyselina asparagová (FXYP) (Morth *et. al.*, 2007). V případě NKA jsou nejlépe prostudované proteiny FXYP1, FXYP2 a FXYP4 (Geering, 2008).

Jelikož jsou tyto proteiny tkáňově specifické, je pravděpodobné, že regulují aktivitu sodno-draselné pumpy podle specifických potřeb daných buněk. Nasvědčují tomu rozsáhlé interakce s ostatními podjednotkami (Geering, 2008), jako je asociace s katalytickou podjednotkou  $\alpha$  v místě transmembránového helixu M9 (Morth *et. al.*, 2007). Interakce probíhá také v oblasti kličky mezi helixy M7 a M8, kde je připojena i podjednotka  $\beta$  (Zouzoulas a Blostein, 2006).



Obr. 11: Struktura FXYP2 proteinu získaná pomocí programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics Systém, 2013) na základě modifikace struktury s PDB ID 2ZXE (Shinoda, 2009).

### 2.4.5 Onemocnění související s Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasou

Jedním z významných směrů výzkumu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasy je studium neurologických poruch spojených s mutacemi v genu *ATPIA3* kódující  $\alpha_3$  isoformu. Tyto mutace jsou často spojovány se třemi neurologickými poruchami – Parkinsonova nemoc s časným nástupem (Rapid-Onset Dystonia Parkinsonism, RPD, DYT12), dětská hemiplegie (Alternating Hemiplegia of Childhood, AHC) a syndrom CAPOS (název odvozen od projevů tohoto syndromu – Cerebellar ataxia, Areflexia, Pes cavus, Optic atrophy, Sensorineural hearing loss).

V případě RDP se jedná o autosomálně-dominantní pohybovou poruchu s rozdílnou expresí a sníženou penetrací genu *ATPIA3*. Projevy této nemoci jsou charakterizovány dystonií, doprovázenou typickými symptomy Parkinsonova onemocnění jako je třes, ztráta mimiky, obtížná artikulace nebo svalová ztuhlost. Nástup symptomů je náhlý a trvá v rozmezí několika hodin až týdnů. Nemoc je často spuštěna fyzickým nebo emocionálním stresem. Dřívější výzkum odhalil 6 nesmyslných mutací genu *ATPIA3*, ale i *de novo* mutace, které způsobují narušení stability a funkce NKA (de Carvalho Aguiar *et. al.*, 2004).

Dalším onemocněním je AHC, což je poměrně vzácná neurologická porucha. Typickými příznaky jsou hemiplegické epizody, doprovázené abnormálními pohyby očí, hypotonií a nechtěnými pohyby. Tyto hemiplegické epizody mohou trvat několik minut, ale i několik dní. První projevy tohoto onemocnění nastávají již v období před 18. měsícem věku dítěte. Většina pacientů trpí sporadickou formou tohoto onemocnění, jež lze jen velmi těžko diagnostikovat rutinními laboratorními testy nebo neurologickými vyšetřeními (Sasaki *et. al.*, 2014).

Poslední jmenovaným je syndrom CAPOS. Jde o velice vzácnou neurologickou poruchu, která byla zatím popsána pouze u tří rodin. Jedná se o autosomálně dominantní nebo mitochondriálně dědičné onemocnění. Typickými syndromy odvozujícími název jsou porucha koordinace pohybů, ztráta sluchu, ztráta reflexů, vyklenuté nohy, úbytek nervové tkáně očního nervu a další (Demos *et. al.*, 2014).

AHC a RDP jsou způsobené mutacemi ve stejném genu. Nabízí se tedy porovnání těchto dvou onemocnění. Rosewich *et. al.* (2012) ve svém výzkumu porovnali genotypy a fenotypy pacientů trpících AHC s pacienty trpícími onemocněním RDP. Několik symptomů těchto chorob se překrývalo (např. náhlý nástup dystonických epizod spuště-

ných emocionálním stresem nebo projevy dysfunkce mozkového kmenu). Oproti tomu epizodické hemiplegie a kvadruplegie jsou typické pouze pro AHC (Rosewich *et. al.*, 2012). V případě RDP jsou mutace způsobující onemocnění rozptýleny po celém proteinu, zatímco mutace způsobující AHC se soustřeďují do jednoho konkrétního regionu. Samotné bodové mutace způsobující RDP se liší od mutací způsobujících AHC, nicméně byla objevena jediná společná mutace, a to D923N (Heinzen *et. al.*, 2014).

## 2.5 Vybrané metody molekulární biotechnologie

### 2.5.1 Klonovací vektory

Jako klonovací vektory se nejčastěji používají plasmidy. Plasmid je dvouřetězcová extrachromosomální, cirkulární molekula DNA schopná sebe-replikace. Velikost plasmidu je v rozmezí 1 – 500 kb, což odpovídá 0,1 – 5 % celkového množství DNA v buňce. Plasmidy se přirozeně vyskytují v cytoplasmě prakticky všech bakterií. Geny obsažené v plasmidu nejsou esenciální pro přežití organismu, ale udělují mu jistou výhodu při vystavení různým podmínkám.

Plasmid, jako autonomní sebe-replikující element, má velký potenciál pro tvorbu vektoru obsahující klonovanou DNA. Ovšem přirozeně se vyskytující plasmidy postrádají několik důležitých znaků požadovaných pro vysoce kvalitní klonovací vektory. Například postrádají unikátní rozpoznávací místa pro restriční endonukleázy (multi-klonovací místo, MCS). Přirozené plasmidy dále neobsahují selekční markery, kterých se využívá při identifikaci konstruktů v hostitelské buňce. Obecně takový konstrukt obsahuje klonovací vektor spolu s vloženou DNA (Glick *et. al.*, 2010).

Klonovací vektor obecně musí obsahovat geny potřebné k vlastní replikaci, klonovací místo (MCS) a geny rezistence pro budoucí selekci nebo další regulační geny. Při tvorbě konstruktů je cirkulární vektor nejprve enzymaticky rozštěpen restriční endonukleázou a do tohoto místa je vložena DNA kódující geny, které chceme exprimovat. Ke spojení vektoru dojde opět enzymaticky, a to pomocí DNA-ligázy za vzniku hybridního plasmidu, sloužícího jako klonovací vektor.

Většina plasmidových vektorů, využívaných pro klonování, je omezena velikostí vložené DNA (maximálně 10 kb insertovaného DNA). Nicméně, pro tvorbu např. genových knihoven, je často potřeba vložit mnohem větší množství genetické informace. Pro tyto účely byly vyvinuty vysokokapacitní klonovací systémy, jako jsou umělé chromosomy. Přehled některých z těchto systémů je zobrazen v Tab. 2 (Glick *et. al.*, 2010).

Tab. 2: Insertní kapacity běžně používaných vektorů pro klonování (Převzato a upraveno podle Glick *et. al.*, 2010).

Vektorový systém	Hostitelská buňka	Insertní kapacita (kb)
Bakteriofág $\lambda$	$\lambda/E. coli$	10 – 20
Kosmid	<i>E. coli</i>	35 – 45
Bakteriální uměle vytvořený chromosom	<i>E. coli</i>	50 – 300
Kvasinkový uměle vytvořený chromosom	Kvasinka	100 – 2000
Lidský uměle vytvořený chromosom	Kultura lidských buněk	>2000

## 2.5.2 Heterologní exprese proteinů

Prvním krokem heterologní exprese proteinů je transformace, neboli zavedení cizorodé DNA do hostitelské buňky. Přírozený transformační proces zahrnuje navázání dvouvláknové molekuly DNA na komponenty buněčné stěny, vstup DNA do periplasmu, přenos jednoho vlákna do cytoplazmy (druhé je degradováno) a integraci lineárního DNA do chromosomu. Pokud je zaváděná DNA ve formě plasmidu je nutné nejprve syntetizovat komplementární vlákno v cytoplasmě. Transformace obecně není příliš efektivní proces, jelikož transformována je obvykle pouze jedna buňka z tisíce.

Pro heterologní expresi membránových proteinů se často využívají kvasinky. Jedná se o jednobuněčné eukaryotní organismy, patřící do říše hub. Kvasinky sdílejí většinu molekulárních, genetických i biochemických znaků s vyššími eukaryoty, a proto jsou vhodné pro heterologní produkci proteinů. Navíc má exprese v kvasinkách stejné výhody jako exprese v jednodušších prokaryotních organismech (rychlý růst buněk a nízké finanční náklady). Nejtypičtější kvasinkou používanou pro heterologní expresi je *Saccharomyces cerevisiae* (Glick *et. al.*, 2010).

Po transformaci je nutné identifikovat buňky, které obsahují plasmid s klonovanou DNA. Princip selekce budeme ilustrovat pomocí následujícího příkladu. Uvažujme selekci bakterií obsahujících plasmid pBR322, do kterého byla vložena DNA. V tomto případě je selekce umožněna díky přítomnosti genů antibiotické rezistence (gen *Amp<sup>r</sup>*), umístěných přímo na plasmidu. Po transformaci jsou buňky inkubovány na médiu bez antibiotik, aby mohlo dojít k expresi genů pro antibiotickou rezistenci. Následně jsou buňky přemístěny na médium obsahující antibiotikum ampicilin. Buňky obsahující plasmid pBR322 (s vloženou DNA, ale i bez ní) mohou na tomto médiu růst, protože

obsahují neporušený gen *Amp<sup>r</sup>* z pBR322 vektoru. Netransformované buňky jsou citlivé na ampicilin, proto nejsou schopny růstu na tomto médiu a umírají (Glick *et. al.*, 2010).

Selekční strategie pro expresi v kvasinkách je založena na auxotrofních selekčních markerech nebo antibiotických selekčních markerech. Nejčastější využívanou metodou je transformace a selekce pomocí auxotrofních markerů, jako jsou *TRP1* (Tschumper a Carbon, 1980), *HIS3* (Struhl a Davis, 1980), *LEU2*, *URA3* (Rose *et. al.*, 1984). Expresní plasmidy jsou párovány s dostupnými kmeny *S. cerevisiae*, které jsou auxotrofní pro danou složku kultivačního média (např. tryptofan, histidin, leucin a uracil). Takto dostaneme mutantní kmeny kvasinek s vyřazenými auxotrofními geny. Nevýhodou auxotrofní selekce může být požadavek na kontinuální udržování selekčního tlaku pomocí minimálního média bez obsahu příslušných živin (Guthrie, 1991).

Druhou možností je selekce pomocí antibiotik, což je podobný proces jako u bakterií. Tato selekce nabízí dobrou alternativu především pro organismy, které nejsou auxotrofní. Navíc mohou být organismy pěstovány na růstových médiích bohatých na živiny. Tato antibiotika často ovlivňují zejména funkci ribozomů, proto se studie exprese proteinů provádějí v tekutých médiích s dostatkem živin a bez přítomnosti antibiotik (Robinson, 2011).

Dalším krokem heterologní exprese proteinů je přenos vybrané kultury do většího objemu, kde mají buňky optimální podmínky pro růst (složení kultivačního média, aera-ce, zdroj uhlíku, energie a živin). V této fázi kultivace protein ještě není exprimován příliš silně a je tedy nutné spuštění exprese proteinu, který je často pod kontrolou inducibilního promotoru.

### **2.5.3 Inducibilní promotory**

Promotor je nekódující sekvence genu, na kterou se váže RNA polymeráza a iniciuje se transkripce. Inducibilní promotory mají v molekulární biotechnologii velký význam, protože dovolují určit čas a úroveň genové exprese. Ke své funkci potřebují nízkomolekulární látku zvanou induktor. Inducibilní promotory se využívají zejména v případě, kdy je nutná přísná regulace exprese, protože nadexprimované proteiny by mohly být pro hostitelský organismus toxické (Robinson, 2011).

Příkladem inducibilních promotorů jsou *MET25* (gen negativně regulován methioninem), *CUP1* (gen aktivován měďnatými ionty) nebo *GAL1*, *GAL4*, *GAL7* a *GAL10* (geny aktivovány galaktosou a inhibovány glukosou) (Romanos *et. al.*, 1992). Mezi nej-



běžněji používané inducibilní promotory patří *GAL* geny. Jedná se o skupinu strukturálních a regulačních genů kódující enzymy zodpovědné za využití galaktosy (Johnston, 1987). Produkty *GAL* genů např. transportují galaktosu do buňky nebo přeměňují intracelulární galaktosu na glukosa-1-fosfát. Galaktosové inducibilní promotory  $P_{GALI}$  a  $P_{GALI-10}$  jsou často používány pro produkci membránových proteinů vzhledem k jejich efektivnímu regulačnímu mechanismu (Lohr *et. al.*, 1995).

#### **2.5.4 Purifikace membránových proteinů**

Purifikace membránových proteinů je stěžejní pro jejich kompletní strukturní charakterizaci a porozumění jejich biologickým funkcím. Při purifikaci membránových proteinů je kladen důraz na zachování jejich aktivity (např. schopnost proteinů katalyzovat reakce, zajistit proudění iontů nebo vázat specifické ligandy, stejně jako by tomu bylo v *in vivo* prostředí).

Prvním krokem purifikace membránových proteinů je rozbití buněk, např. pomocí kuličkového homogenizátoru. Buněčný lyzát je následně podroben sérii centrifugací, jejichž výsledkem jsou izolované buněčné membrány. Během manipulace s buňkami se mohou uvolňovat proteasy, které by mohly narušit strukturu a aktivitu proteinu. Proto se k buňkám přidávají sloučeniny zabráňující proteolýze membránových proteinů. Příkladem těchto sloučenin mohou být ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) a aminopolycarboxylová kyselina (EGTA), které inhibují kation-dependentní proteasy nebo fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), inhibující serionové proteasy. Postup přípravy membránových frakcí se značně liší pro periferní a integrální membránové proteiny. Obecně je obtížnější izolace integrálních membránových proteinů, jelikož jsou pevně ukotveny v buněčné membráně. Tyto proteiny je nutné z membrány izolovat pomocí detergentů, přičemž výběr detergentu je klíčový z hlediska zachování aktivity připravovaného enzymu. Příliš silný detergent rozruší nejen membránu, ale i purifikovaný protein a naopak příliš slabý detergent má nízkou účinnost a výsledný výtěžek proteinu je nízký (Deutscher, 1990).

Obecně detergenty můžeme rozdělit do 2 skupin – iontogenní a neiontogenní. Přičemž iontogenní detergenty mohou být aniontové (SDS, cholát), kationtové (akryltrimethylamonné soli) nebo zwiteriontogenní (CHAPS). Tyto detergenty jsou obecně velmi účinné při purifikaci integrálních membránových proteinů a předcházejí vzniku agregá-

tů. Iontogenní detergenty mají také vysokou (>1 mM) kritickou micelární koncentraci (CMC), tudíž mohou být snadno odstraněny ze vzorku např. dialýzou.

Druhou skupinou jsou neiontogenní detergenty, zahrnující oktylglukosidy, polyoxyetylenové deriváty nebo digitonin (komerčními názvy Triton X-100, Lubrol PX a Tween). Oproti iontogenním detergentům způsobují slabou disociaci proteinových komplexů, ale většina proteinů v jejich přítomnosti vykazuje vyšší stabilitu. Neiontogenní detergenty mají také nízkou CMC (<1 mM) a jejich odstranění ze vzorků je komplikované (Deutscher, 1990). Obecně je možné kombinovat různé detergenty za účelem zvýšení výtěžku a stability připravovaného proteinu (Cremo *et. al.*, 1981).

Kvůli zachování aktivity membránových proteinů se často využívají specifické lipidy (nejčastěji fosfolipidy), které se přirozeně nacházejí v buněčných membránách. Lipidy také chrání protein při příliš vysoké koncentraci detergentů. Nejčastějšími přídatnými lipidy jsou sójový azolektin, lipidový extrakt z mozku hovězího dobytka nebo fosfatidylcholin (Deutscher, 1990).

Pro specifické oddělení nadexprimovaných proteinů od těch abundantních se často používá metoda afinitní chromatografie. Principem této metody je interakce ligandu imobilizovaným na koloně s proteinem, který chceme purifikovat. Existují 3 typy těchto ligandů – specifický ligand (inhibitor enzymu, hormon, neurotransmiter), obecný ligand (lektin) nebo protilátka. Nevýhodou této metody je vznik proteinových agregátů nebo nespecifické vazby na kolonu. Tyto nevýhody mohou být odstraněny volbou vhodného detergentu a pufru (Deutscher, 1990). Interakce ligandového páru je následně narušena změnou podmínek (pH, iontová síla, koncentrace solí, ...) v elučňím kroku. Podmínky eluce ale mohou být pro samotný protein drastické, a proto je za eluci často zařazena dialýza, která umožní zmírnit negativní vliv těchto podmínek. Pokud má navíc získaný protein nízkou koncentraci, je možné ji zvýšit pomocí speciálních centrifugačních filtrů a následně jej standardně analyzovat.

## 2.6 Stanovení čistoty a množství proteinů

Praxe často vyžaduje rychlé a přesné určení koncentrace a čistoty připravovaného proteinu. K tomuto účelu je možné použít rozmanitou škálu metod, jako jsou například imuno-detekce specifického proteinu (Western blot), elektroforetické metody a metody určení koncentrace proteinu. Jednotlivé metody blíže popíšeme v následujících podkapitolách.

### 2.6.1 Elektroforéza

Elektroforéza, neboli migrace iontů ve stejnosměrném elektrickém poli, se velmi často používá pro analytické dělení biologických látek. Nabité částice rozpuštěné v elektrolytu se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí, která je přímo úměrná velikosti a náboji (anionty migrují k anodě, kationty ke katodě). Vzorek se pohybuje na pevném podkladu (nosiči), který by měl být hydrofilní, nerozpustný ve vodě a měl by mít co nejméně adsorpčních schopností. Velmi často se využívají gelové nosiče, jako je agarosový gel nebo polyakrylamidový gel, výjimečně i gel škrobový. Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul.

Často využívanou modifikací elektroforézy je polyakrylamidová elektroforéza za denaturujících podmínek (SDS-PAGE). Tato metoda pracuje s proteiny denaturovanými pomocí detergentu dodecylsírán sodného (SDS). Vzniklé komplexy proteinu s detergentem mají prakticky stejný povrchový (záporný) náboj, tím pádem se v zónově elektroforetickém uspořádání dělí pouze podle molekulových hmotností (Luhová *et. al.*, 2012).

### 2.6.2 Western blot

Metoda Western blot se využívá k specifické detekci proteinu ve vzorku. Skládá se ze tří základních částí – elektroforetické separace proteinů, přenosu separovaných proteinů na membránu a detekce proteinů. Nejdříve se provede gelová elektroforéza (obvykle SDS-PAGE), kdy se jednotlivé proteiny rozdělí na frakce. Následně jsou proteiny přeneseny na membránu působením elektrického proudu v blotovacím zařízení. Přítomnost proteinu je na membráně detekována pomocí primární protilátky. Primární protilátka se naváže na protein a v dalším kroku je detekována sekundární protilátkou. Přítomnost sekundární protilátky je detekována fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně, podle toho jakou značku sekundární protilátka nese. Velikost signálu může být vyhodnocová-

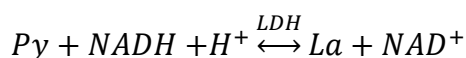
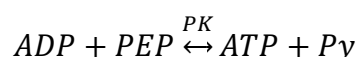
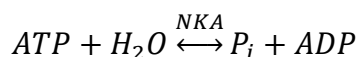
na srovnáním s naneseným proteinovým markerem, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti (labguide.cz).

### 2.6.3 Metody určení koncentrace celkových proteinů

Mezi metody určení koncentrace proteinů patří například Lowryho metoda, Bicinchoninová metoda, spektroskopická detekce pomocí absorbance při vlnové délce 280 nm, Bradfordova metoda a další. Metoda Bradfordové je nejpoužívanější metodou stanovení koncentrace proteinů díky své rychlosti a jednoduchosti. Principem metody je vazba barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 na molekulu proteinu. Barva samotného činidla je hnědá a po reakci s proteinem se mění na intenzivně modrou. Citlivost metody je obvykle 1 mg/ml v závislosti na přítomnosti bazických aminokyselin (zejména argininu) nebo aromatických aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou z velké části zodpovědné za změnu barvy, která je spektrofotometricky monitorována na vlnové délce 595 nm. Nevýhodou může být destruktivnost metody (vzorek je pro další analýzu nepoužitelný) a případná interference látek, zejména detergentů (nanoed.tul.cz).

### 2.6.4 Určení ATPasové aktivity

Během reakčního cyklu ATPas dochází k štěpení ATP na ADP a  $P_i$ . Produkty reakce lze využít pro sledování aktivity této skupiny proteinů. V případě  $Na^+/K^+$ -ATPasy lze určit aktivitu enzymu dvěma různými metodami. První metoda je založena na spřažení následujících několika enzymatických reakcí (Norby, 1988):



Kde NKA je  $Na^+/K^+$ -ATPasa,  $P_i$  je anorganický fosfát, PEP je fosfoenolpyruvát, PK je pyruvát kinasa, Py je pyruvát, La je laktát a LDH je laktát dehydrogenasa.

Oproti tomu, druhá metoda detekuje kolorimetricky přímo  $P_i$  a je často nazývána jako metoda Baginského. Tato metoda sleduje změnu absorbance na vlnové délce 710 nm, která je přímo úměrná modrému zbarvení, které vzniká reakcí molybdenanu amonného s fosfátem v kyselém prostředí. Metoda je velmi citlivá, jednoduchá a je možné ji snadno automatizovat (Baginsky et. al., 1964).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

#### 3.1.1 Kmen kvasinek

Pro expresi proteinu jsme použili kmen kvasinek Gal4 $\Delta$ Pep4 (Lenoir *et. al.*, 2002), který jsme získali díky spolupráci s Univerzitou v Aarhusu (Dánsko) na základě bilaterální smlouvy.

#### 3.1.2 Kultivační média

10x ASD médium (2 l, sterilní) – 100 g síran amonný (Lachema), 15,52 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachema), 2,56 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lachema), 10 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Lachema), 2 g NaCl (Lachner), 2 ml 0,5% roztoku H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Lachema), 2 ml 0,1% roztoku KI (Lachema), 2 ml 0,4% roztoku MnSO<sub>4</sub> (Roth), 1,2 ml 0,7% roztoku ZnSO<sub>4</sub> (Lachema), 0,8 ml 0,1% roztoku CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Lachema), 0,8 ml 0,5% roztoku FeCl<sub>3</sub> (Roth), 0,8 ml 0,5% Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub> (Roth)

10x aminokyselinový roztok (1 l, sterilní) – 180 mg/l adenin (Sigma-Aldrich), 80 mg/l kyselina p-aminobenzoová (Sigma-Aldrich) a následující složky všechny o koncentraci 760 mg/l: alanin (Roth), arginin (Roth), kyselina asparágová (Fluka), cystein (Roth), kyselina glutamová (Sigma-Aldrich), glycin (Sigma-Aldrich), histidin (Sigma-Aldrich), myo-inositol (Sigma-Aldrich), lysin (Roth), metionin (Fluka), fenylalanin (Fluka), prolin (Sigma-Aldrich), serin (Roth), treonin (Roth), tryptofan (Sigma-Aldrich), tyrosin (Alfa Aescar) a valin (Roth); pH 6,5

100x koncentrovaný zásobní roztok leucinu a uracilu - 7,6 g/l leucinu (Roth) a 7,6 g/l uracilu (Sigma-Aldrich)

Vitaminový roztok (V-200) – 4 mg/l biotin (Roth), 400 mg/l pantotenát vápenatý (Roth), 0,4 mg/l kyselina listová (Roth), 2000 mg/l myo-inositol (Sigma-Aldrich), 80 mg/l niacin (Roth), 40 mg/l kyselina p-aminobenzoová (Sigma-Aldrich), 80 mg/l pyridoxin (Roth), 40 mg/l riboflavin (Lachner) a 80 mg/l tiamin (Lachner)

Expresní médium (minimální médium, 2 l) – 60 ml glycerol (Lachner), 10 g glukosa (Penta), 200 ml 10xAA mix, 200 ml 10x ASD, 2 ml 10% chlorid vápenatý (Lachner), 10 ml V-200, 2 ml ampicilin (Biotika)

Indukční médium (2 l) – 60 ml 100% glycerol (Lachner), 200 ml 10x AA mix, 200 ml 10x ASD, 2 ml 10% chloridu vápenatého, 1 l 40% galaktosy (Roth), 10 ml V-200

YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) médium (1 l) – 15 g kvasinkový extrakt (Serva) a 15 g pepton (Serva)

10x YP (Yeast Extract-Peptide, 1 l) – 100 g kvasinkový extrakt a 100 g pepton

### **3.1.3 Roztoky a pufry**

#### **Elektroforéza**

3x AB (Akrylamid-Bis, 100 ml) – 480 g/l akrylamid (Bio-Rad), 15 g/l Bis-akrylamid (Bio-Rad) (49,5% T a 3% C)

3x GB (gelový pufr, 100 ml) – 3 M Trizma Base (Tris, Sigma-Aldrich), 0,3% SDS (Serva); pH 8,45

10x vzorkový pufr (100 ml) – 70% glycerol (Lachner), 150 mM Tris-HCl, 12% SDS, 0,05% bromfenolové modře (Roth); pH 6,8

10x Spodní pufr (1 l) – 1 M Tris-HCl; pH 8,9

10x Horní pufr (500 ml) – 1 M Tris, 1 M Tricin (Bio-Rad), 1% SDS (Serva); pH 8,25

Zásobní roztok na 10% gel (100 ml) – 20 ml AB, 33,3 ml 3xGB, 10 ml 100% glycerol, 36,7 ml voda

Zásobní roztok na 4% gel (100 ml) – 4 ml AB, 12,5 ml 3xGB, 33,5 ml voda

100% glycerol

10% persulfát amonný (APS, Bio-Rad)

Tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio-Rad)

100% isobutanol (Sigma-Aldrich)

Separáčnı gel (na 2 skla) – 10 ml 10% zásobního roztoku, 50 µl APS, 5 µl TEMED

Zaostřovací gel (na 2 skla) – 5 ml 4% zásobního roztoku, 40 µl APS, 4 µl TEMED

Odbarvovací roztok pro SDS gely – 10% kyselina octová (Lachner)

Barvicí roztok pro SDS gely – 45% metanol (Lachner), 10% kyselina octová a 1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad)

### **Western blot**

10x Přenosový pufr (nitroceluloseová membrána, 1 l) – 18,9 g Tris, 90,1 g glycerol

10x TBS (nitroceluloseová membrána, 500 ml) – 7,5 g Tris , 44 g NaCl (Lachner); pH 7,4

TBS-T (nitroceluloseová membrána, 1 l) – 1 l TBS, 1 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Blokovací roztok (nitroceluloseová membrána) – 5% sušené mléko (Nutri-Star) v TBS

0,1% roztok Ponceau S (Sigma-Aldrich) v 5% kyselině octové na barvení přenesených proteinů

Přenosový pufr (PVDF membrána, 1 l) – 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich), 14,4 g glycin, 100 ml metanol

Blokovací roztok (PVDF membrána) – 5% sušené mléko (Nutri-Star) v TBST

TBS-T (PVDF membrána, 1 l) – 1,2114 g Tris-HCl 5,844 g NaCl, 1 ml 100% Tween 20 (Sigma-Aldrich)

100% metanol

Protilátky – Primární protilátka proti  $\alpha 3$  isoformě byla Sodium Potassium ATPase Alpha 3 Antibody, polyklonální IgG z králíka od Novus Biologicals.

Primární protilátka proti  $\beta 1$  isoformě byla Anti-ATP1B1 polyklonální IgG z králíka od Merck Millipore.

Jako sekundární protilátky pro obě primární protilátky byla použita Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate od Bio-Rad.

Detekce sekundární protilátky – detekce byla provedena pomocí sestavy Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Merck-Millipore).

### **Transformace kvasinek**

50% PEG4000 (100 ml) – 50 g polyethylenglykol 4000 (Sigma-Aldrich), 50 g voda

10x Lithium acetát (LiAc) – 1 M LiAc (Sigma-Aldrich); pH 7,5 (upraveno pomocí kyseliny octové)

10x Tris/EDTA (TE) pufr - 100 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 10 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Fluka); pH 7,5

Roztok A – 0,5 ml 10x TE pufr, 0,5 ml 10x LiAc 4 ml MQ voda

Roztok B – 0,5 ml 10x TE pufr, 0,5 ml 10x LiAc, 4 ml 50% PEG4000

### **Příprava kvasinkových membrán a purifikace proteinu z membrán**

Urea (Fluka)

KCl (Sigma-Aldrich)

100x Inhibitory proteas LPC – 1 mg/ml leupeptin (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml pepstatin A (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml chymostatin (Sigma-Aldrich)

Lyzační pufr (1 l) – 1,4 M sorbitol (Sigma-Aldrich), 10 mM MOPS/Tris (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA a inhibitory proteas (1 mM PMFS, 1x LPC); pH 7,2

Membránový pufr (1 l) – 10 mM MOPS/Tris, 1 mM EDTA, 25% glycerol a inhibitory proteas; pH 7,2

Solubilizační pufr (1 l) – 250 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 5 mM imidazol (Sigma-Aldrich) a inhibitory proteas; pH 7,4

Promývací pufr (1 l) – 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 10 mM imidazol, 200 µg/ml detergent, 50 µg/ml lipidy, 10 µg/ml cholesterol (Sigma-Aldrich) a inhibitory proteas; pH 7,4

Eluční pufr (1 l) – 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 150 mM imidazol, 200 µg/ml detergent, 50 µg/ml lipidy, 10 µg/ml cholesterol (Sigma-Aldrich) a inhibitory proteas; pH 7,4

Dialyzační pufr (2 l) – 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10% glycerol; pH 7,4

100x zásobní roztok lipidů s detergentem – 20 mg/ml roztok detergentu a 10 mg/ml roztoku lipidů v chloroformu

Detergenty – n-dodecyl-β-D-maltopyranosid (DM, Antrace), n-dodecyl-α-D-maltosid (αDDM, Antrace), n-dodecyl-β-D-maltosid (βDDM, Antrace), SDS, laurylmaltoseneo-



pentylglykol (LMNG, Antrace) a oktaethylglykolmonododecylether (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, Sigma-Aldrich)

Lipidy – 1,2-diolooyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin (DOPS, Avanti), fosfatidylserin (PS, Avanti) z prasečího mozku a fosfatidylcholin (PC, Avanti)

Centrifugační filtry – Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck Millipore), Molecular Weight Cut-off (MWCO) 30 kDa

Dialyzační membrána – Dialysis tubing cellulose membrane, MWCO 14 kDa (Sigma-Aldrich)

### **Určení koncentrace Bradfordovou metodou**

Barvivo Bradfordové – Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad), koncentrát byl naředěn 4x pomocí vody, aby vznikl pracovní roztok

Proteinový standard – 1mg/ml BSA ve 150 mM NaCl (Protein Standard, Sigma-Aldrich)

### **3.2 Použité přístroje**

- Kuličkový homogenizátor BEAD-BEATER (Biospec Products, USA)
- Spektrometr pro mikrotitrační destičky Synergy Mx (BIOTEK, USA)
- Ultracentrifuga Himac CP90WX (Hitachi, Japan)
- Inkubátor ISS-4075BR (Jeio Tech, Korea)
- Příklad na vizualizaci Western blotů a SDS PAGE gelů Amersham Imager 600 (GE Health Care Bio Products AB, Švédsko)

### 3.3 Metody

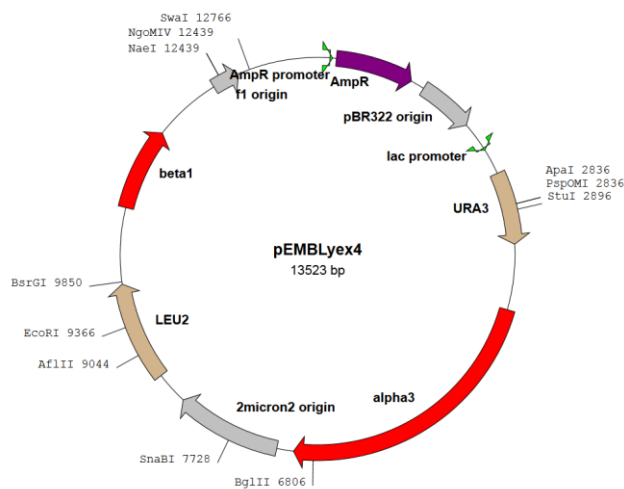
#### 3.3.1 Transformace kvasinek

- Prvním krokem bylo napěstování kvasinek (kmen Gal4ΔPep4) ve sterilním médiu, obsahující všechny potřebné živiny (YPD médiu) do  $OD_{450} = 0,9$ .
- Tato kultura byla sklizena centrifugací (3000 g, 3 minuty) a pelet byl rozpuštěn ve 40 ml sterilní vody. Centrifugace byla opakována a vzniklý pelet byl rozpuštěn v 1 ml sterilní vody. Roztok byl opět centrifugován (2500 g, 2 minuty), ale pelet byl rozpuštěn v 1 ml roztoku A. Tato centrifugace byla zopakována a pelet byl rozpuštěn v 250  $\mu$ l roztoku A. Tento roztok kvasinek byl kompetentní k transformaci.
- Ke kvasinkám bylo přidáno 30  $\mu$ l předem zdenaturované jedno-vláčenné DNA z buněk spermií lososa (single stranded salmon sperm DNA, Invitrogene, koncentrace 10  $\mu$ g/ $\mu$ l) a promícháno pomocí vortexu. Tento roztok byl rozdělen na menší části po 55  $\mu$ l.
- K takto rozděleným kvasinkám byla přidána DNA pro transformaci (vektor).
- Následně byl ke kvasinkám přidán roztoku B (300  $\mu$ l) a směs byla inkubována 30 minut při 30°C.
- Vložení vektoru do buněk kvasinek byl proveden pomocí tepelného šoku – inkubace ve vodní lázni při teplotě 42 °C po dobu 15 minut.
- Po tepelném šoku byly kvasinky centrifugovány (2500 g, 2 minuty) a rozpuštěny ve 100  $\mu$ l sterilní vody. Tento roztok byl rozetřen na kultivační misky obsahující minimální médium a antibiotikum ampicilin pro zamezení infekce.
- Misky s kvasinkami byly inkubovány při 30 °C po dobu přibližně 72 hodin.

#### 3.3.2 Pěstování kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pro produkci membránových proteinů

- K přípravě proteinu byl použit expresní vektor, zkonstruovaný na základě vektoru pEMBLyex4 (viz Obr. 12).

- Nejprve bylo naočkováno 5 ml minimálního média s leucinem nebo s uracilem kvasinkami z kultivačních misek. Tyto kultury byly inkubovány 48 hodin při teplotě 30°C.
- Následně bylo odebráno 100 µl z obou kultur a přeneseno do 5 ml minimálního média pouze s uracilem pro selekci buněk kvasinek, obsahujících pouze velké množství kopií plasmidu. Tyto kultury byly inkubovány 48 hodin při teplotě 30°C.
- Po této selekci bylo 50 ml minimálního média (s uracilem nebo s leucinem) naočkováno 500 µl kultury minimálního média z předchozího kroku. Tato kultura byla inkubována 48 hodin při 30°C.
- Pro expresi proteinu bylo naočkováno 2 l expresního média (OD<sub>450</sub> = 0,05) pomocí 50 ml kultury. Tyto kultury byly inkubovány za stálého míchání při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.
- Indukce exprese proteinu byla provedena při OD<sub>450</sub> = 1 pomocí 200 ml indukčního média (2% galactosa). Dále byl přidán roztok 10x YP tak, že výsledná koncentrace roztoku byla 1x.
- Následovala inkubace 36 hodin při teplotě 15 °C za stálého míchání.
- Kultura byla sklizena pomocí centrifugací (2500 g, 5 minut) a dle potřeby uchována pro další použití.



Obr. 12: Vektor pEMBLvex4 pro expresi lidského komplexu  $\alpha_3\beta_1$  v kvasinkách. Tento vektor obsahuje multiklonovací místo, *lac* promotor a geny *LEU2*, *URA3*, *Amp<sup>R</sup>*.

### 3.3.3 Příprava membrán z kvasinkové kultury

- Zmrazené nebo čerstvě sklizené kvasinky byly smíseny se 10 ml lyzačního pufru obsahující inhibitory proteas.
- Homogenizace byla provedena v 6 cyklech, kde se střídala 1 minuta homogenizování pomocí skleněných kuliček a přístroje Bead Beater s 1 minutou inkubace na ledě.
- Takto rozbité kvasinky byly inkubovány s 2 M ureou a 100 mM KCl po dobu 25 minut při 4 °C. Následně byl roztok centrifugován (1 000 g, 10 minut) při 4°C. Pelet obsahující nerozbité kvasinky byl odstraněn a supernatant byl podroben další centrifugaci (20 000 g, 20 minut) při 4°C.
- Pelet z předchozího kroku byl odstraněn a supernatant byl rozdělen do ultracentrifugačních kyvet a centrifugován (160 000 g, 90 minut) při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpuštěn v membránovém pufru. Vzniklý roztok byl několikrát homogenizován pomocí skleněného homogenizátoru Potterova typu a výsledný roztok membrán byl uskladněn při teplotě -80°C.

### 3.3.4 Solubilizace kvasinkových membrán

- Připravené membrány byly rozmrazeny na ledu a následně byl přidán roztok detergentu s lipidy tak, že výsledná koncentrace membrán byla 2 mg/ml a koncentrace detergentu byla 4 mg/ml (poměr membrány:detergent byl 1:2).
- Tento roztok byl za stálého míchání inkubován při 4°C po dobu 2 hodin nebo přes noc.
- Nerozpustné součásti roztoku byly odstraněny centrifugací (164 000g, 30 minut). Pelet byl odstraněn a supernatant byl smísen s kolonovým materiálem pro afinitní chromatografii v poměru 100 µl 50% kolonového materiálu na 10 mg membrán.
- Roztok kolonového materiálu se solubilizovanými membránami byl přenesen do prázdné kolony. Přebytný roztok byl odstraněn a následně byl kolonový materiál opakovaně (5x) promyt promývacím pufrem o stejném objemu jako byl objem kolony.

- Následně byl přidán eluční pufr, který byl ponechán 40 minut interagovat s kolonovým materiálem při 4°C. Roztok byl jímán z kolony a naplněn do dialyzačních střívek. Protein byl dialyzován v dialyzačním pufru při teplotě 4°C přes noc.
- Výsledný protein byl zakoncentrován pomocí centrifugačních filtrů s propustností molekul o velikosti 30 kDa.

Poznámka: Na základě předběžných výsledků jsme proces přípravy čistého proteinu z membrán optimalizovali.

### **3.3.5 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) Tris-Tricin**

- Prvním krokem byla příprava gelů pomocí stojanu s utěsněnými skly.
- Pomocí pipety byl nanesen separační gel (10%), který byl převrstven 100% isobutanolem pro vyrovnání hranice mezi zaostřovacím a separačním gelem. Gel tuhnul cca 45 minut.
- Následně byla odstraněna přebytečná voda a isobutanol. Poté byl nanesen zaostřovací gel (4%), který tuhnul minimálně 30 minut.
- Připravené gely ve sklech byly umístěny do elektroforetické cely. Mezi skla byl přidán horní pufr (koncentrace 1x) a do okolního prostoru cely byl nalit spodní pufr (koncentrace 1x).
- Citlivě denaturované (10 minut při pokojové teplotě) vzorky proteinů se vzorkovým pufrem byly aplikovány na gel.

Poznámka: Denaturace membránových proteinů pomocí standardního protokolu, tj. inkubace vzorků se vzorkovým pufrem při 70°C po dobu 30 minut, vede ke vzniku agregátů, které znehodnocují výsledky elektroforézy.

- Cella byla uzavřena krytem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Separace probíhala 70 – 100 minut při napětí 120 – 130 V.
- Po dosažení spodní hrany skel čelem gelu byla separace zastavena, gel byl vyjmut z prostoru mezi skly a barven 30 minut pomocí barvicího roztoku.

- Obarvený gel byl následně přes noc odbarven pomocí odbarvovacího roztoku. Odbarvený gel byl dále vyhodnocen pomocí přístroje Imersham Imager 600.

### 3.3.6 Western blotting s nitroceluloseovou membránou

- Po elektroforéze byla sestavena blotovací sestava v pořadí spodní elektroda, blotovací papír, membrána, gel, blotovací papír a horní elektroda. Blotovací papíry i membrána byly předem namočený v přenosovém pufru.
- Blotování bylo provedeno při proudu 172 mA po dobu 1 hodiny.
- Následně byla membrána obarvena roztokem Ponceau S, aby byl potvrzen přenos proteinů z gelu na membránu. Přebytečné barvivo bylo odstraněno pomocí deionizované vody. Následně byla membrána analyzována pomocí přístroje Imersham Imager 600.
- Proteiny obarvené na membráně byly odbarveny inkubací v TBST po dobu 5 minut.
- Membrána byla blokována pomocí blokovacího roztoku (1 hodina, pokojová teplota).
- Blokovací roztok byl z membrány odstraněn pomocí TBS (inkubace 10 minut). Tento promývací krok byl jedenkrát zopakován.
- Membrána byla inkubována s primární protilátkou (anti- $\alpha_3$  ředění 1:1000, anti- $\beta_1$  ředění 1:500) po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C.
- Primární protilátka byla odstraněna pomocí série promývání: 5x10 minut inkubace v TBST a závěrečné promytí TBS po dobu 10 minut.
- Následovala inkubace se sekundární protilátkou (anti-rabbit ředění 1:5000) po dobu 2 hodin při pokojové teplotě.
- Sekundární protilátka byla odstraněna pomocí série promývání analogicky k odstranění primární protilátky (5x10 minut v TBST a 1x10 minut v TBS).
- Sekundární protilátka byla detekována pomocí komerční sestavy obsahující chemiluminiscenční substrát pro křenovou peroxidasu. Chemiluminiscence byla detekována pomocí přístroje pro vizualizaci.

### 3.3.7 Western blotting s PVDF membránou

Princip obou metod imunodetekce proteinů je velmi podobná, liší se zejména složením pufrů, které je uvedeno v předchozí podkapitole. V případě PVDF membrány je nutná aktivace membrány pomocí 100% metanolu před přenosem proteinů z gelu. PVDF membrána neumožňuje kontrolu přenosu proteinů pomocí barvení Ponceau S. Nyní uvedeme kroky, které se neshodují s předchozím postupem.

- Po inkubaci s primární protilátkou následovalo dvojnásobné promytí v TBST s 3% BSA při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- Inkubace se sekundární protilátkou byla provedena analogicky k postupu pro nitrocelulózovou membránu.
- Sekundární protilátka byla promyta pomocí TBST + 3% BSA při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Promývací krok byl opakován pro zlepšení detekovaného signálu. Sekundární protilátka byla vizualizována stejně jako v předchozím protokolu.

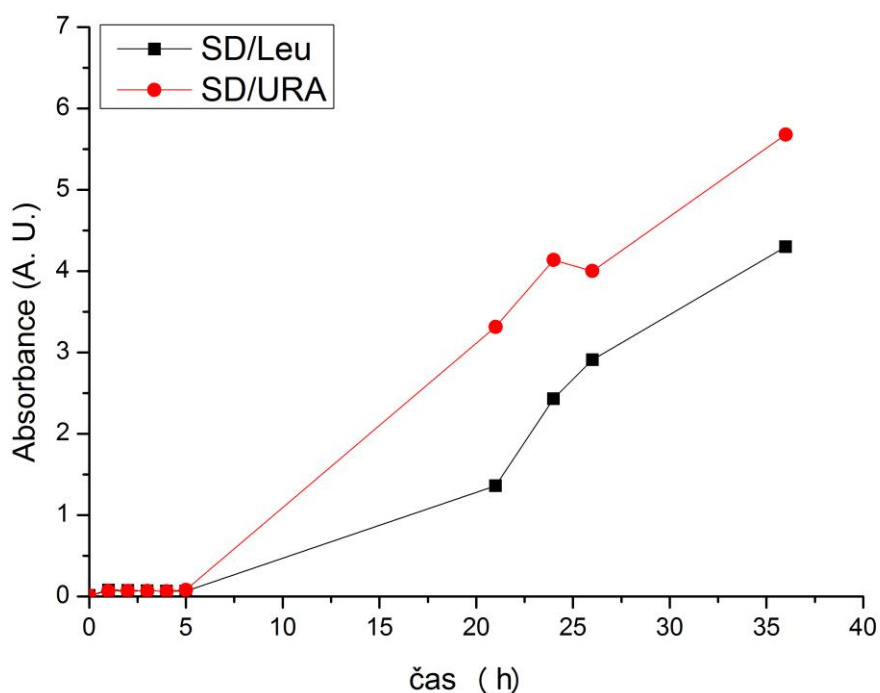
### 3.3.8 Určení koncentrace metodou Bradfordové

- Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byl rozdělen roztok standardu (1 mg/ml BSA) v pořadí 0, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ l proteinu. K proteinu byla přidána voda tak, aby celkový objem v každé jamce byl 10  $\mu$ l.
- Jako pozadí byl použit vzorek obsahující pouze 10  $\mu$ l vody.
- Samotné vzorky o neznámé koncentraci byly připraveny smísením 2  $\mu$ l proteinu a 8  $\mu$ l vody.
- Následně bylo do každé jamky přidáno 200  $\mu$ l činidla Bradfordové.
- Zbarvení vzorků na destičce bylo analyzováno pomocí spektrofotometru pro mikrotitrační destičky. Byla detekována absorbance na vlnové délce 595 nm.
- Vzorky standardu byly využity ke konstrukci kalibrační přímky, s jejíž pomocí byla určena koncentrace zkoumaných proteinů.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální část předkládané bakalářské práce má za cíl purifikovat komplex  $\alpha_3 \beta_1$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy z buněk kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a optimalizovat tento postup. Výsledky experimentální části bakalářské práce budeme prezentovat zejména jako obrázky elektroforetických gelů a Western blotů, které budeme současně diskutovat. Gely a bloty zachycují jednotlivé kroky přípravy komplexu  $\alpha_3 \beta_1$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy.

Prvním krokem přípravy  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy je kultivace, proto byl proveden test dostupných kultivačních médií. Na základě složení komerčních kultivačních médií jsme připravili médium bez uracilu (obsahující leucin) a médium bez leucinu (ale obsahující uracil), které mohou sloužit jako selekční markery. Sledováním absorbance kvasinkových kultur jsme získali růstové křivky pro daná média (viz Obr. 13).

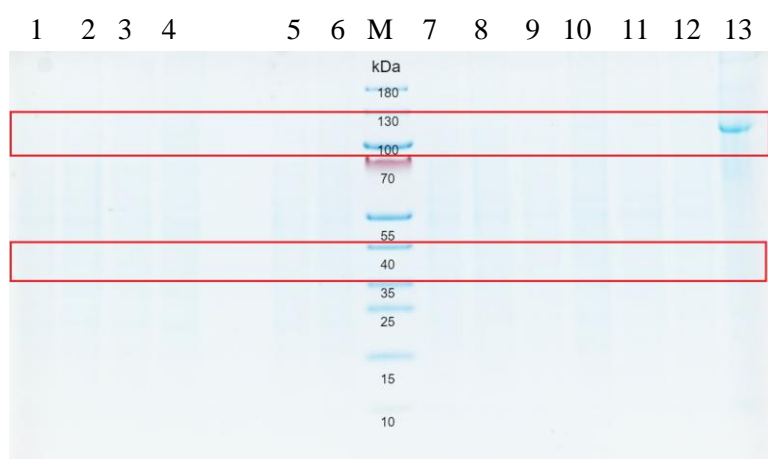


Obr. 13: Graf růstových křivek kultur kvasinek pěstovaných v komerčních kultivačních médiích bez uracilu (SD\URA), nebo bez leucinu (SD\Leu). Vytvořeno pomocí programu Origin.

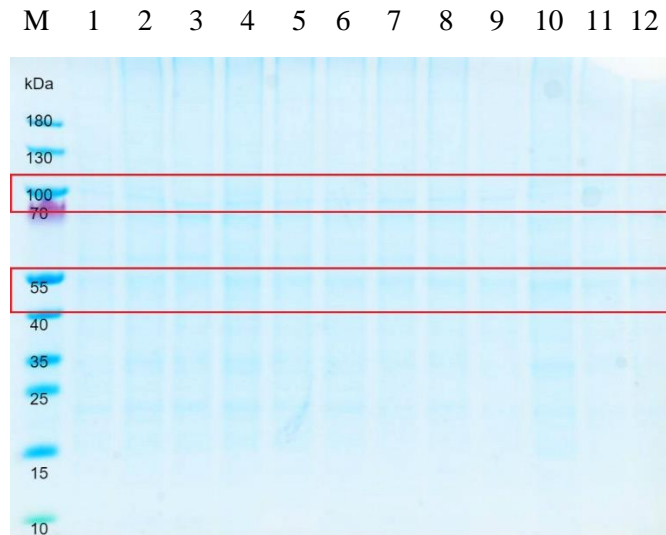


Při srovnání růstových křivek pro obě média usuzujeme, že pro kultivaci kmene kvasinek Gal4 $\Delta$ Pep4 je vhodné médium bez uracilu, ale obsahující leucin. Všechny následující kultivace byly provedeny v tomto médium.

Dalším důležitým bodem pro úspěšnou heterologní expresi membránových proteinů je výběr vhodného detergentu. V rámci optimalizací celého procesu jsme testovali 6 různých detergentů. Jednalo se o n-dodecyl- $\alpha$ -D-maltosid ( $\alpha$ -DDM), n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid ( $\beta$ -DDM), n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DM), dodecylsírán sodný (SDS), laurylmaltoseneopentylglycol (LMNG) a octoethylenglykolmonododecylether (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>). Testována byla také různá doba solubilizace proteinu s detergentem (2 hodiny nebo solubilizace přes noc). První výsledky jsou zobrazeny na Obr. 14 a 15.



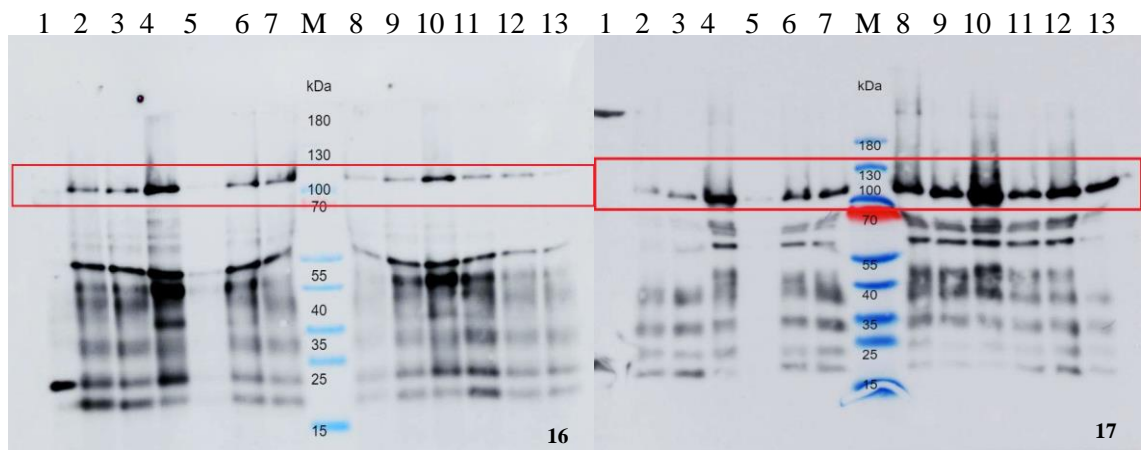
Obr. 14: Výsledky elektroforézy vzorků s rozdílnou dobou solubilizace pomocí kompletní sady detergentů. Pozice, kde se nacházejí jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, 2 h solubilizace, 4°C, **2** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, 2 h solubilizace, 4°C, **3** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, 2 h solubilizace, 4°C, **4** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, 2 h solubilizace, 4°C, **5** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, 2 h solubilizace, 4°C, **6** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, 2 h solubilizace, 4°C, **M** – marker, **7** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, solubilizace přes noc, 4°C, **8** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, solubilizace přes noc, 4°C, **9** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, solubilizace přes noc, 4°C, **10** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, solubilizace přes noc, 4°C, **11** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, solubilizace přes noc, 4°C, **12** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, solubilizace přes noc, 4°C, **13** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml)



Obr. 15: Výsledky elektroforézy vzorků s rozdílnou dobou solubilizace pomocí kompletní sady detergentů. Pozice, kde se nacházejí jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **M** – marker, **1** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, 2 h solubilizace, 4°C, **2** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, 2 h solubilizace, 4°C, **3** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, 2 h solubilizace, 4°C, **4** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, 2 h solubilizace, 4°C, **5** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, 2 h solubilizace, 4°C, **6** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, 2 h solubilizace, 4°C, **7** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, solubilizace přes noc, 4°C, **8** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, solubilizace přes noc, 4°C, **9** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, solubilizace přes noc, 4°C, **10** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, solubilizace přes noc, 4°C, **11** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, solubilizace přes noc, 4°C, **12** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, solubilizace přes noc, 4°C

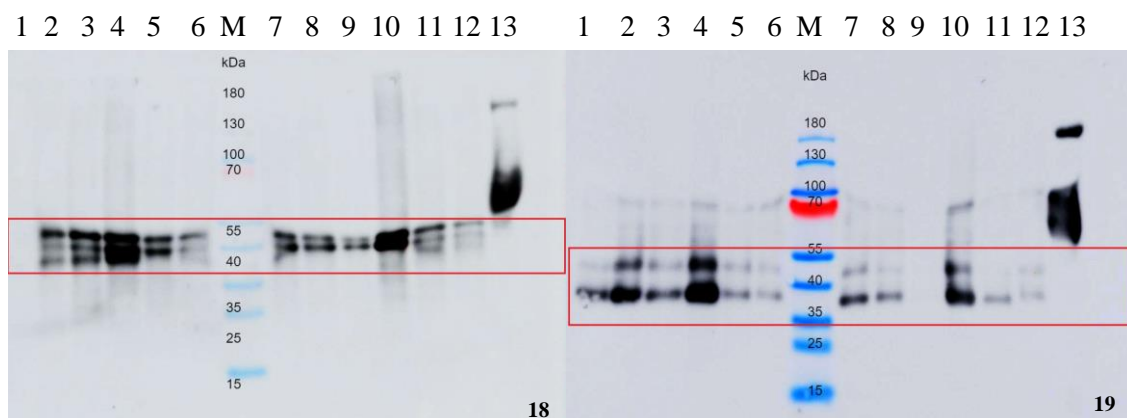
Obrázky gelů uvedené jako Obr. 14 a 15 neposkytují dostatečné množství informací o jednotlivých podjednotkách, a proto bylo nutné provést specifickou detekci proteinů pomocí Western blotu.

Nejprve jsme provedli výběr vhodné blotovací membrány – nitrocelulosová a PVDF (polyvinylidenfluorid) membrána. Výsledky pro obě tyto membrány byly srovnatelné, jak je možné porovnat na Obr. 16, 17 (anti  $\alpha_3$ ) a také 18, 19 (anti  $\beta_1$ ). Z tohoto důvodu jsme dále pracovali pouze s nitrocelulosovou membránou, jelikož je její použití nevyžaduje práci s toxickým metanolem. Jako primární protilátky byly použity protilátky proti  $\alpha_3$  isoformě a proti  $\beta_1$  isoformě. Obě tyto protilátky byly detekovány sekundární protilátkou získanou z kozy, která byla značena křenovou peroxidasou. Sekundární protilátka byla detekována chemiluminiscenční metodou pomocí sestavy (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Millipore).



Obr. 16, 17: Výsledky Western blottingu vzorků s rozdílnou dobou solubilizace pomocí kompletní sady detergentů. Podjednotka  $\alpha$  je červeně vyznačena v obrázku gelu. Legenda: **1** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml). **2** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $C_{12}E_8$ , solubilizace přes noc, 4 °C, **3** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, solubilizace přes noc, 4 °C, **4** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, solubilizace přes noc, 4 °C, **5** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, solubilizace přes noc, 4 °C, **6** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, solubilizace přes noc, 4 °C, **7** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, solubilizace přes noc, 4 °C, **M** – marker, **8** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $C_{12}E_8$ , 2 h solubilizace, 4 °C, **9** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, 2 h solubilizace, 4 °C, **10** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, 2 h solubilizace, 4 °C, **11** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, 2 h solubilizace, 4 °C, **12** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, 2 h solubilizace, 4 °C, **13** -  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, 2 h solubilizace, 4 °C

Z Obr. 16 a 17 je zřejmé, že kompletní  $\alpha$  podjednotka je exprimována jako jeden protein o celkové hmotnosti okolo 110 kDa, což odpovídá dosud publikovaným výsledkům (Haviv *et. al.*, 2007; Haviv *et. al.*, 2012, Cohen *et. al.*, 2005; Swarts a Koenderink, 2016). Na obrázcích při specifické detekci isoformy  $\alpha_3$  je, mimo jiné, možné pozorovat velmi dobré výsledky pro detergent SDS. Naopak, jako nevhodná se v tomto případě jeví solubilizace přes noc s detergentem DM, který jinak vykazoval poměrně uspokojivé výsledky.



Obr. 18, 19: Výsledky Western blottingu vzorků s rozdílnou dobou solubilizace pomocí kompletní sady detergentů. Podjednotka  $\beta$  je červeně vyznačena v obrázku gelu. Legenda: **1** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, 2 h solubilizace, 4°C, **2** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, 2 h solubilizace, 4°C, **3** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, 2 h solubilizace, 4°C, **4** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, 2 h solubilizace, 4°C, **5** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, 2 h solubilizace, 4°C, **6** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, 2 h solubilizace, 4°C, **7** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\alpha$ -DDM, solubilizace přes noc, 4°C, **8** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT,  $\beta$ -DDM, solubilizace přes noc, 4°C, **9** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, DM, solubilizace přes noc, 4°C, **10** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, SDS, solubilizace přes noc, 4°C, **11** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, LMNG, solubilizace přes noc, 4°C, **12** –  $\alpha_3$  WT +  $\beta_1$  WT, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, solubilizace přes noc, 4°C, **13** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml)

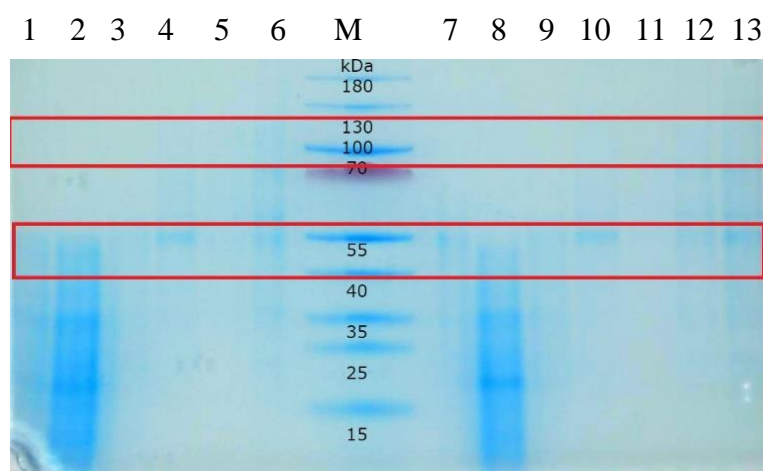
Délka doby solubilizace vykazovala výrazné rozdíly pro jednotlivé vzorky inkubované s vybranými detergenty. U vzorků inkubovaných pouze dvě hodiny byly detekovány výraznější pásy na blotovací membráně, než vzorky inkubované s detergentem přes noc (především Obr. 18 a 19). Podle tohoto zjištění jsme postupovali v následujících přípravách enzymu.

V případě detekce podjednotky  $\beta$  opět nejvýraznější pásy můžeme pozorovat pro detergent SDS (spolu s dvou hodinovou solubilizací). Jako nevhodná se ukázala solubilizace s detergentem C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. V tomto případě také nedošlo k interakci protilátky s detergentem DM na PVDF membráně. Při detekci podjednotky  $\beta$  si můžeme všimnout, že se nejedná o jeden pás nýbrž několik pásů v rozmezí 37 – 55 kDa. Tento jev dokazuje, že se podařilo zachytit podjednotku  $\beta$  v různých stupních glykosylace (Bublitz *et. al.*, 2016). Obdobné výsledky můžeme najít i v další literatuře zaměřené na alternativní způsoby přípravy NKA (Haviv *et. al.*, 2007; Haviv *et. al.*, 2012). Podobný výsledek publikoval také Koenderink a Swarts 2016 pro přípravu enzymu pomocí expresního systému baculovirus-hmyzí buňka. Pokud je ale enzym uměle deglykosylován, je možné pozorovat pouze jediný pás. Podobný výsledek je možné pozorovat u enzymu izolovaného z prasečích ledvin (Cohen *et. al.*, 2005), kde je přítomen jeden

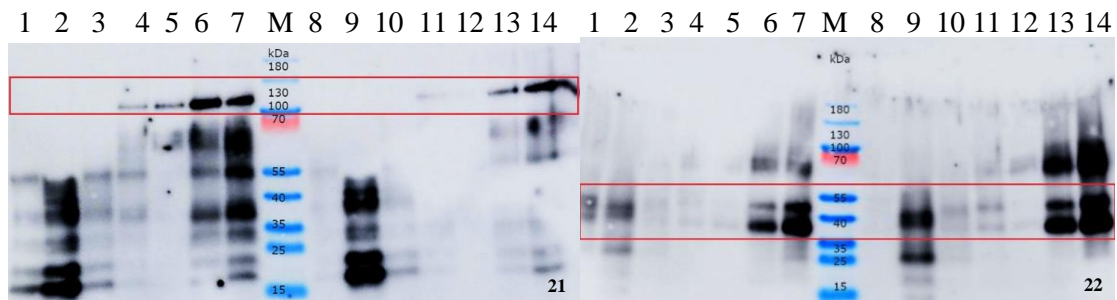
široký pás o hmotnosti v rozmezí 55 – 70 kDa. Je tedy zřejmé, že  $\beta$  podjednotka je silně ovlivněna množstvím a druhem postranlačních modifikací.

Další část experimentální práce zahrnovala purifikaci proteinů z buněk kvasinek. V průběhu celého procesu (od homogenizace membrán až po zakoncentrování čistého proteinu) jsme průběžně odebírali vzorky pro finální analýzu. Takto jsme sledovali každý krok purifikace proteinu a mohli jsme snadno navrhnout potřebné optimalizace. Přestože bylo provedeno rozsáhlé testování detergentů s uspokojivými závěry, rozhodli jsme se provést detailní studii celého procesu přípravy enzymu pro vybrané detergenty. Na závěr byla vždy provedena elektroforéza za denaturujících podmínek a Western blotting pro specifickou detekci podjednotky  $\alpha$  a podjednotky  $\beta$ .

Na Obr. 20 můžeme pozorovat výsledky přípravy enzymu pomocí prvních dvou detergentů –  $\alpha$ -DDM a  $\beta$ -DDM. Nejlépe viditelné pásy jsou vidět pro zakoncentrované proteiny. Pomocí následné specifické detekce jsme dokázali přítomnost obou podjednotek.

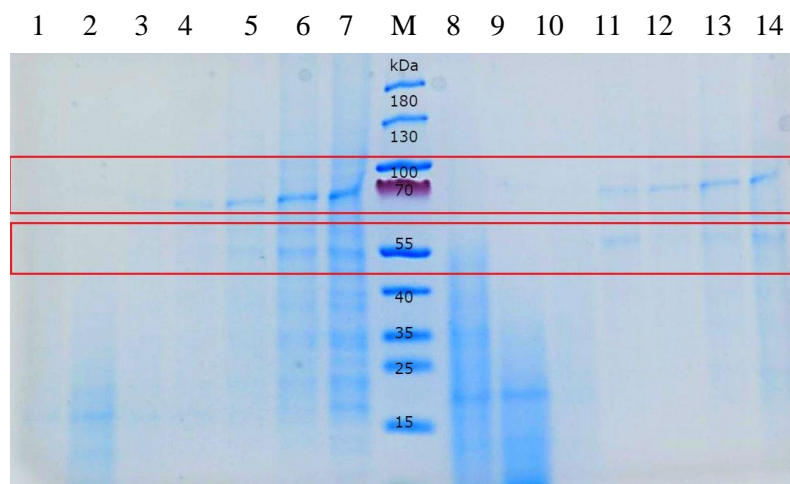


Obr. 20: Výsledky elektroforézy vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů  $\alpha$ -DDM a  $\beta$ -DDM. Jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – vzorek po solubilizaci ( $\alpha$ -DDM), **2** – průchod kolonou ( $\alpha$ -DDM), **3** – promytí ( $\alpha$ -DDM), **4** – eluce před dialýzou ( $\alpha$ -DDM), **5** – eluce po dialýze ( $\alpha$ -DDM), **6** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **M** – marker, **7** – vzorek po solubilizaci ( $\beta$ -DDM), **8** – odstranění nerozpustných částí ( $\beta$ -DDM), **9** – průchod kolonou ( $\beta$ -DDM), **10** – promytí ( $\beta$ -DDM), **11** – eluce před dialýzou ( $\beta$ -DDM), **12** – eluce po dialýze ( $\beta$ -DDM), **13** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$ -DDM)



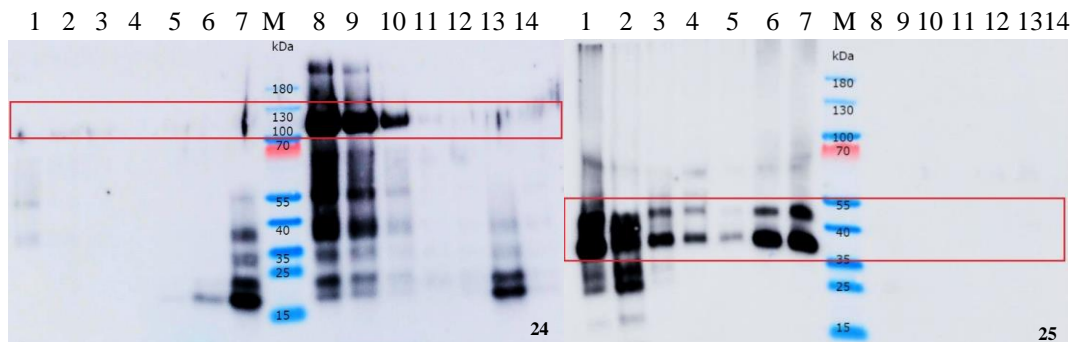
Obr. 21, 22: Výsledky Western blottingu vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů  $\alpha$ -DDM a  $\beta$ -DDM. Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  je červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – vzorek po solubilizaci ( $\alpha$  DDM), **2** – vzorek po odstranění nerozpustného materiálu ( $\alpha$  DDM), **3** – průchod kolonou ( $\alpha$  DDM), **4** – promytí ( $\alpha$  DDM), **5** – eluce před dialýzou ( $\alpha$  DDM), **6** – eluce po dialýze ( $\alpha$  DDM), **7** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$  DDM), **M** – marker, **8** – vzorek po solubilizaci ( $\beta$  DDM), **9** – vzorek po odstranění nerozpustného materiálu ( $\beta$  DDM), **10** – průchod kolonou ( $\beta$  DDM), **11** – promytí ( $\beta$  DDM), **12** – eluce před dialýzou ( $\beta$  DDM), **13** – eluce po dialýze ( $\beta$  DDM), **14** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$  DDM)

Na Obr. 21 pro specifickou detekci podjednotky  $\alpha$  se jako vhodný detergent jeví  $\alpha$ -DDM. Pásky na gelu jsou výraznější a dochází i k viditelnému pročišťování vzorku během purifikace. V případě podjednotky  $\beta$  (Obr. 22) se jeví jako vhodný detergent  $\beta$ -DDM. Obecně jsou pásky detekované pomocí protilátky proti  $\beta$  podjednotce výraznější, a to z důvodu umístění histidinové kotvy právě na tuto podjednotku. Struktura podjednotky  $\alpha$  neumožňuje přidání této značky bez značného narušení přirozené struktury proteinu a ovlivnění jeho funkce.



Obr. 23: Výsledky elektroforézy vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů DM a SDS. Jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – protein po solubilizaci (DM), **2** – protein po odstranění nerozpustného materiálu (DM), **3** – průchod kolonou (DM), **4** – promytí (DM), **5** – eluce před dialýzou (DM), **6** – eluce po dialýze (DM), **7** – koncentrovaný čistý protein (DM), **M** – marker, **8** – protein po solubilizaci (SDS), **9** – protein po odstranění nerozpustného materiálu (SDS), **10** – průchod kolonou (SDS), **11** – promytí (SDS), **12** – eluce před dialýzou (SDS), **13** – eluce po dialýze (SDS), **14** – koncentrovaný čistý protein (SDS)

Následovala analýza další dvojice detergentů – DM a SDS. Podle Obr. 23 se jako vhodný detergent jeví DM, který vykazuje výraznější pásy především pro podjednotku  $\alpha$ . Oproti tomu, ve vzorku solubilizovaném s detergentem SDS, je vidět větší množství nečistot (vzorky 8 a 9 v Obr. 23) uvolněných detergentem.



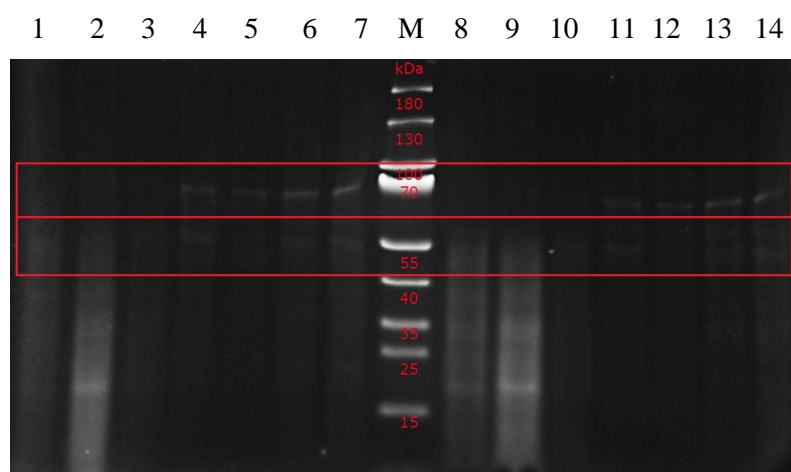
Obr. 24, 25: Výsledky Western blottingu vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů DM a SDS. Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  je červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda (Obr. 24): **1** – protein po solubilizaci (DM), **2** – protein po odstranění nerozpustného materiálu (DM), **3** – průchod kolonou (DM), **4** – promytí (DM), **5** – eluce před dialýzou (DM), **6** – eluce po dialýze (DM), **7** – koncentrovaný čistý protein (DM), **M** – marker, **8** – protein po solubilizaci (SDS), **9** – protein po odstranění nerozpustného materiálu (SDS), **10** – průchod kolonou (SDS), **11** – promytí (SDS), **12** – eluce před dialýzou (SDS), **13** – eluce po dialýze (SDS), **14** – koncentrovaný čistý protein (SDS) Legenda (Obr. 25): **1** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **2** – eluce po dialýze (SDS), **3** – eluce před dialýzou (SDS), **4** – promytí (SDS), **5** – průchod kolonou (SDS), **6** – protein po odstranění nerozpustného materiálu (SDS), **7** – protein po solubilizaci (SDS), **M** – marker, **8** – koncentrovaný čistý protein (DM), **9** – eluce po dialýze (DM), **10** – eluce před dialýzou (DM), **11** – promytí (DM), **12** – průchod kolonou (DM), **13** – protein po odstranění nerozpustného materiálu (DM), **14** – protein po solubilizaci (DM)

Na Obr. 24 je zobrazena specifická detekce podjednotky  $\alpha$  pro detergent DM, kde nevidíme žádnou interakci. Podobný výsledek jsme získali pro detergent SDS s tím, že přítomnost proteinu můžeme pozorovat na začátku, následně pak dochází k jeho rozsáhlým ztrátám. Ztráta podjednotky  $\alpha$  je pravděpodobně způsobena purifikačním protokolem založeným na afinitní chromatografii. Proto tento protokol vyžaduje optimalizaci.

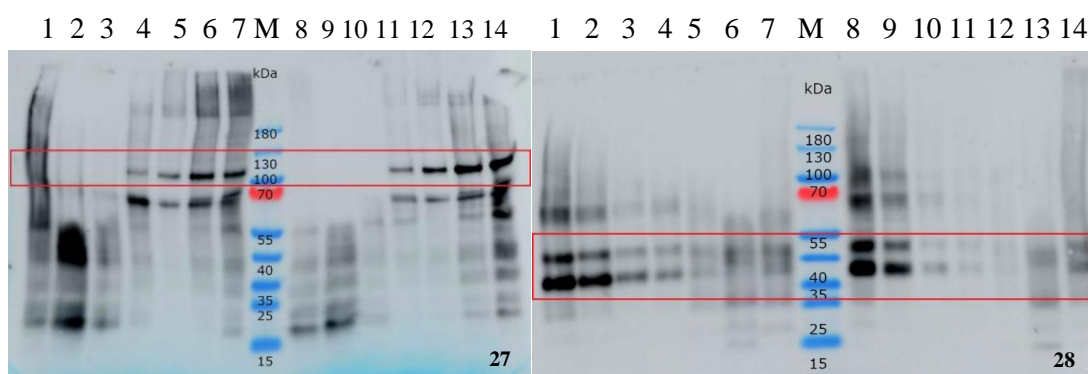
V případě detekce podjednotky  $\beta$  můžeme vidět lepší výsledek pro detergent DM, ovšem i zde dochází k výrazným ztrátám proteinu. Pro detergent SDS nebyla pozorována žádná interakce, přestože má tento detergent obvykle velmi dobré výsledky.

Jako poslední bylo provedeno porovnání detergentů LMNG a  $C_{12}E_8$ , které se v předchozích experimentech jevily jako nejméně vhodné. Na Obr. 26 můžeme pozorovat postupné pročištění vzorku. Pásky mají velmi nízkou intenzitu, proto tento gel budeme prezentovat formou obrázku v negativu.





Obr. 26: Výsledky elektroforézy vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů LMNG a  $C_{12}E_8$ . Jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – vzorek po solubilizaci (LMNG), **2** – vzorek po odstranění nerozpustného materiálu (LMNG), **3** – průchod kolonou (LMNG), **4** – promytí (LMNG), **5** – eluce před dialýzou (LMNG), **6** – eluce po dialýze (LMNG), **7** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **M**- marker, **8** – vzorek po solubilizaci ( $C_{12}E_8$ ), **9** - vzorek po odstranění nerozpustného materiálu ( $C_{12}E_8$ ), **10** – průchod kolonou ( $C_{12}E_8$ ), **11** – promytí ( $C_{12}E_8$ ), **12** – eluce před dialýzou ( $C_{12}E_8$ ), **13** – eluce po dialýze ( $C_{12}E_8$ ), **14** – koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ )



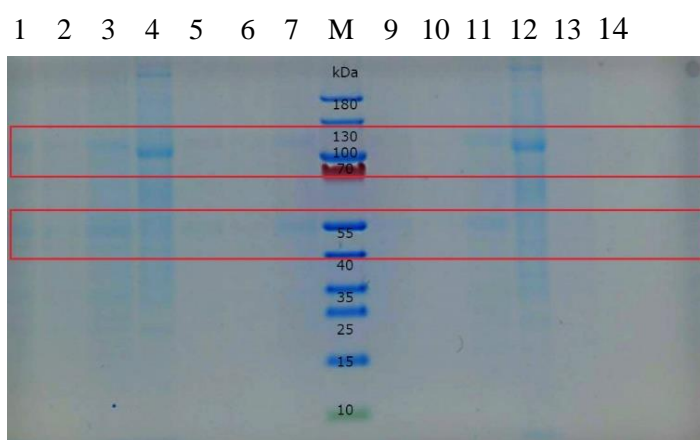
Obr. 27, 28: Výsledky Western blottingu vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů LMNG a  $C_{12}E_8$ . Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  je červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – vzorek po solubilizaci (LMNG), **2** – vzorek po odstranění nerozpustného materiálu (LMNG), **3** – průchod kolonou (LMNG), **4** – promytí (LMNG), **5** – eluce před dialýzou (LMNG), **6** – eluce po dialýze (LMNG), **7** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **M**- marker, **8** – vzorek po solubilizaci ( $C_{12}E_8$ ), **9** - vzorek po odstranění nerozpustného materiálu ( $C_{12}E_8$ ), **10** – průchod kolonou ( $C_{12}E_8$ ), **11** – promytí ( $C_{12}E_8$ ), **12** – eluce před dialýzou ( $C_{12}E_8$ ), **13** – eluce po dialýze ( $C_{12}E_8$ ), **14** – koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ )

Při detekci podjednotky  $\alpha$  (Obr. 27) je možné v případě obou detergentů pozorovat postupné pročištění vzorku. Dále si můžeme všimnout detekce proteinu o velikosti 70 kDa, kde se jedná pravděpodobně o zkrácený produkt exprese podjednotky  $\alpha$  (viz Obr. 27). Poměrně překvapivým výsledkem je výrazná ztráta proteinu při promývání

kolony (vzorek 10 na Obr. 28) při detekci podjednotky  $\beta$ , která obvykle bývá stabilně imobilizovaná při afinitní chromatografii.

Podle dosažených výsledků získaných pomocí protokolu využívajícího afinitní chromatografii můžeme označit za vhodné detergenty  $\alpha$ -DDM a  $\beta$ -DDM. Dalšími vhodnými detergenty jsou DM a SDS. SDS je velmi efektivní při získávání podjednotky  $\alpha$ , ale je málo citlivý k podjednotce  $\beta$ . DM překvapivě vykazuje opačnou efektivitu solubilizace než SDS. Zbývající dva detergenty (LMNG a  $C_{12}E_8$ ) poskytují neuspokojivé výsledky, a proto bychom jejich použití k tomuto účelu nedoporučili.

Jak již bylo zmíněno dříve, purifikační protokol zahrnující afinitní chromatografii způsobuje ve většině případů značné ztráty podjednotky  $\alpha_3$ , která je pro tuto práci klíčová. Pro další přípravu proteinů jsme se proto rozhodli využít protokol původně určený pro přípravu NKA z prasečích ledvin (Bublitz *et. al.*, 2016). Jednotlivé kroky procesu jsme monitorovali pomocí analogického přístupu. Tento protokol je technologicky i časově méně náročný, nicméně neposkytuje srovnatelný stupeň přečištění jako v případě použití afinitní chromatografie.

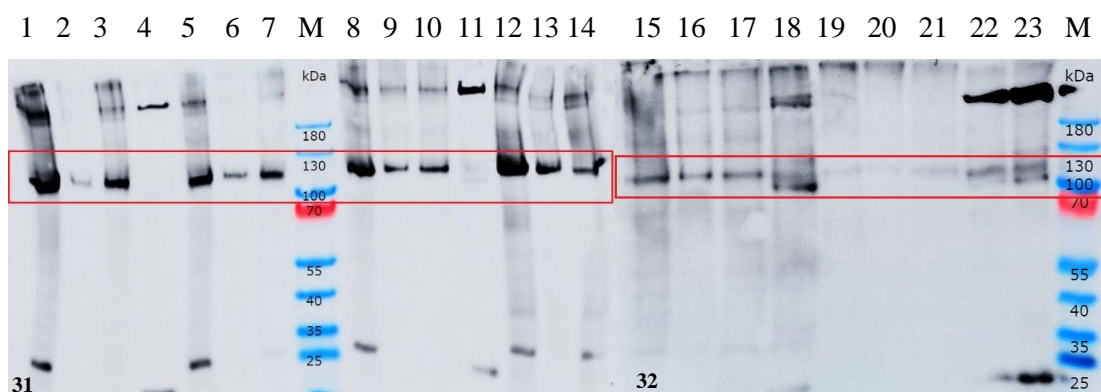


Obr. 29: Výsledky elektroforézy vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů SDS, DM,  $\beta$ -DDM a  $\alpha$ -DDM. Jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **2** – čistý protein (SDS), **3** – protein po solubilizaci (SDS), **4** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **5** – koncentrovaný čistý protein (DM), **6** – čistý protein (DM), **7** – protein po solubilizaci (DM), **M** – marker, **8** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$ -DDM), **9** – čistý protein ( $\beta$ -DDM), **10** – protein po solubilizaci ( $\beta$ -DDM), **11** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **12** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **13** – čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **14** – protein po solubilizaci ( $\alpha$ -DDM)



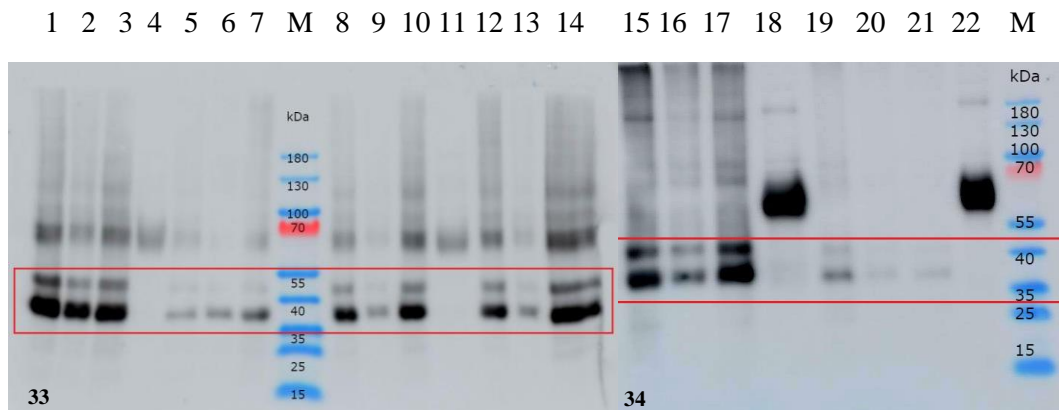
Obr. 30: Výsledky elektroforézy vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů LMNG a  $C_{12}E_8$ . Jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **M** – marker, **1** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **2** - koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **3** – čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **4** – protein po solubilizaci ( $C_{12}E_8$ ), **5** – pozitivní kontrola (NKA z vepřových ledvin 1 mg/ml), **6** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **7** – čistý protein (LMNG), **8** – protein po solubilizaci (LMNG)

V souladu s předchozími výsledky, koncentrace proteinů na Obr. 29 a 30 identifikují  $\alpha$ -DDM jako nejvíce vhodný detergent a  $C_{12}E_8$  jako detergent nejméně vhodný pro přípravu NKA.



Obr. 31, 32: Výsledky Western blottingu vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí detergentů. Podjednotka  $\alpha$  je červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **2** – čistý protein (SDS), **3** – protein po solubilizaci (SDS), **4** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **5** – koncentrovaný čistý protein (DM), **6** – čistý protein (DM), **7** – protein po solubilizaci (DM), **M** – marker, **8** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$ -DDM), **9** – čistý protein ( $\beta$ -DDM), **10** – protein po solubilizaci ( $\beta$ -DDM), **11** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **12** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **13** – čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **14** – protein po solubilizaci ( $\alpha$ -DDM), **15** – protein po solubilizaci (LMNG), **16** – čistý protein (LMNG), **17** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **18** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **19** – protein po solubilizaci ( $C_{12}E_8$ ), **20** – čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **21** – koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **22** a **23** pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **M** – marker

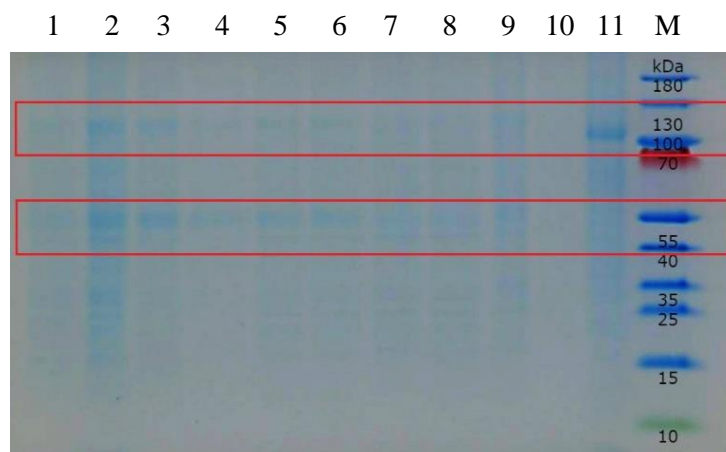
Jako nejvhodnější detergenty pro přípravu podjednotky  $\alpha$  se v závěrečných výsledcích ukázaly detergenty SDS a  $\alpha$ -DDM (vzorky 1 a 12 na Obr. 31). Také byla potvrzena nevhodnost detergentu  $C_{12}E_8$  a LMNG (vzorky 17 a 21) na Obr. 32.



Obr. 33, 34: Výsledky Western blottingu vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí celkové sady detergentů. Podjednotka  $\beta$  je červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **2** – čistý protein (SDS), **3** – protein po solubilizaci (SDS), **4** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **5** – koncentrovaný čistý protein (DM), **6** – čistý protein (DM), **7** – protein po solubilizaci (DM), **M** – marker, **8** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$ -DDM), **9** – čistý protein ( $\beta$ -DDM), **10** – protein po solubilizaci ( $\beta$ -DDM), **11** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **12** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **13** – čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **14** – protein po solubilizaci ( $\alpha$ -DDM), **15** – protein po solubilizaci (LMNG), **16** – čistý protein (LMNG), **17** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **18** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **19** – protein po solubilizaci ( $C_{12}E_8$ ), **20** – čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **21** – koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **22** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **M** – marker

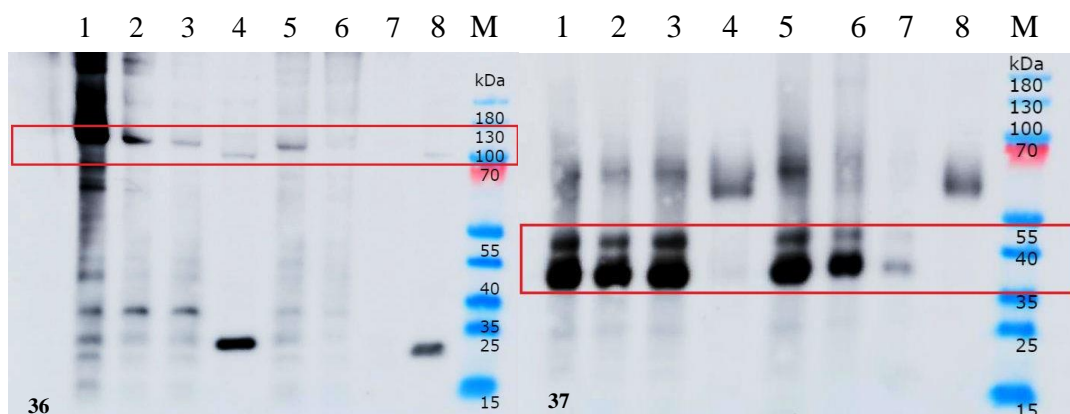
Detekce podjednotky  $\beta$  (Obr. 33) vykazovala podobné výsledky jako v předchozím případě. Detergenty SDS a  $\alpha$ -DDM se ukázali jako velmi podobné (vzorky 3 a 14). A opět se ukázalo, že ani pro purifikaci podjednotky  $\beta$  není vhodné použít detergent LMNG a především  $C_{12}E_8$  (Obr. 34).

Na závěr byly porovnávány výsledné proteiny získané pomocí kompletní sady detergentů. Pro kontrolu byly aplikovány vždy dva vzorky detergentu s výjimkou LMNG a  $C_{12}E_8$ , které se v průběhu experimentů ukázaly jako nejslabší.



Obr. 35: Výsledky elektroforézy vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí celkové sady detergentů. Jednotlivé podjednotky ( $\alpha$  a  $\beta$ ) jsou červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$  DDM), **2** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$  DDM), **3** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$  DDM), **4** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$  DDM), **5** – koncentrovaný čistý protein (DM), **6** – koncentrovaný čistý protein (DM), **7** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **8** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **9** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **10** – koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **11** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml)

Již při porovnání výsledků elektroforézy na Obr. 35 si můžeme všimnout vyšší koncentrace proteinu solubilizovaným s detergentem  $\alpha$ -DDM (vzorek 2) a nejnižší koncentrace proteinu solubilizovaným s detergentem  $C_{12}E_8$  (vzorek 10).



Obr. 36, 37: Výsledky Western blottingu vzorků s 2 hodinovou solubilizací pomocí celkové sady detergentů. Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  je červeně vyznačeny v obrázku gelu. Legenda: **1** – koncentrovaný čistý protein ( $\alpha$ -DDM), **2** – koncentrovaný čistý protein ( $\beta$ -DDM), **3** – koncentrovaný čistý protein (DM), **4** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml), **5** – koncentrovaný čistý protein (SDS), **6** – koncentrovaný čistý protein (LMNG), **7** – koncentrovaný čistý protein ( $C_{12}E_8$ ), **8** – pozitivní kontrola (NKA z prasečích ledvin 1 mg/ml)

Při specifické detekci pomocí protilátek se jako nejvhodnější detergent ukazuje  $\alpha$ -DDM pro podjednotku  $\alpha$  (vzorek 1 na Obr. 36). Negativní výsledky pro detergenty LMNG a  $C_{12}E_8$  jsou v souladu s předchozími experimenty (vzorky 6 a 7 na Obr. 37). Při detekci podjednotky  $\beta$  (Obr. 37) můžeme pozorovat prokazatelně lepší výsledky. Jako vhodné se v tomto případě ukazují všechny maltosidy ( $\alpha$ -DDM,  $\beta$ -DDM a DM), ale i SDS. V porovnání s nimi slabší koncentraci výsledného proteinu vykazuje vzorek solubilizovaný v LMNG a  $C_{12}E_8$ .

## 5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla exprese lidského  $\alpha_3 \beta_1$  komplexu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Experimentální část byla zaměřena především na optimalizaci exprese toho membránového proteinu. Jednalo se o výběr vhodného detergentu, doby solubilizace a způsob purifikace rekombinantního proteinu.

Bylo provedeno rozsáhlé testování sady celkem šesti detergentů. Jednalo se o n-dodecyl- $\alpha$ -D-maltosid ( $\alpha$ -DDM), n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid ( $\beta$ -DDM), n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DM), dodecylsírán sodný (SDS), laurylmaltoseneopentylglycol (LMNG) a octoethylglykolmonododecylether ( $\text{C}_{12}\text{E}_8$ ). Vzorky membrán byly inkubovány s detergenty a ke směsi byly přidány také fosfolipidy (fosfatidylserin) a cholesterolem pro simulaci prostředí buněčné membrány. Jako nejvhodnější pro solubilizaci celkového komplexu  $\alpha_3 \beta_1$  se ukázal detergent  $\alpha$ -DDM. Dobrých výsledků jsme dosáhli také při použití SDS. Obecně je možné použít i kombinace detergentů pro přípravu proteinu. První detergent může být použit pro solubilizaci samotných membrán, ale pro citlivější zacházení s proteinem může být v elučním pufru přítomen detergent s nižší účinností. Podobný postup navrhovali ve svých publikacích již (Cohen *et. al.*, 2005; Haviv *et. al.*, 2007), nicméně tento protokol uchovává výsledný protein přímo v elučním pufru o vysoké koncentraci imidazolu. Tím ovšem dochází k poškození proteinu, který během separace agreguje. Z těchto důvodů jsme přidali do našeho protokolu dialyzační krok. Jako nevhodný se ukázal detergent  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ , kdy jeho schopnost solubilizace byla velmi nízká a množství získaného proteinu zanedbatelné. Dále jsme v průběhu testování vyhodnotili jako vhodnější dobu solubilizace 2 hodiny, namísto solubilizace přes noc. Vzhledem k velmi nízkým koncentracím připravených proteinů (pod 1 mg/ml), může být odhadovaná koncentrace zatížena velkou chybou, a proto zde tyto hodnoty neuvádíme.

V průběhu purifikace se také jako nevyhovující ukázala metoda afinitní chromatografie. Umístění afinitní kotvy na tomto místě bylo na základě doporučení P. A. Pedersena, který detailně studoval přípravu prasečího komplexu  $\alpha_1 \beta_1$  v kvasinkách (Pedersen *et. al.*, 1996). Podjednotka  $\alpha$  není vhodná k umístění afinitní kotvy z důvodu významného narušení struktury proteinu. Purifikace celého komplexu byla v našem případě závislá na separaci pomocí histidinové kotvy, umístěné pouze na N-konci podjednotky  $\beta$ . Z tohoto důvodu ovšem docházelo ke značným ztrátám podjednotky  $\alpha$ . Proto jsme zvolili postup, využívající diferenciální centrifugaci, používaný při přímé izolaci NKA



z prasečích ledvin (Bublitz *et.al.*, 2016). Díky tomuto postupu jsme dosáhli prokazatelně lepších výsledků při purifikaci obou podjednotek.

Komplex  $\alpha_3 \beta_1$  byl v kvasinkách úspěšně exprimován, jak dokumentují výsledky Western blotů, uvedených v této práci. Takto připravený protein není součástí agregátů, jak prokázala separace pomocí SDS-PAGE a také výsledky získané pomocí HPLC (tyto výsledky přesahují rámec práce, a proto zde nejsou uvedeny). Bohužel, získaný protein nevykazuje detekovatelnou ATPasovou aktivitu, což může být způsobeno rozdílnými posttranslačními modifikacemi proteinu nebo nevhodnou simulací umělé membrány.

## 6 LITERATURA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular biology of the cell*. 4th ed., Garland Science, New York, 1463 stran. ISBN 0-8153-4072-9.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5th ed., Garland Science, New York, 1268 stran. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- Axelsen K. B., Palmgren M. G. (2001): Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant physiology* **126**, 696-706.
- Baginski E., Weiner L. M., Zak B. (1966): The simple determination of nucleotide phosphorus. *Clinica Chimica Acta* **10**, 378–379.
- Britton Z., Young C., Can Ö., McNeely P., Naranjo A., Robinson S. A. (2011): Membrane Protein Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Production of Membrane Proteins – Strategies for Expression and Isolation*. (Robinson S. A., ed.), Wiley-VCH Verlag & Co., Weinheim, Germany, 37 – 73. ISBN 978-3-527-32729-4.
- Bublitz M., Poulsen H., Morth P. J., Nissen P. (2010): In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. *Current Opinion in Structural Biology* **20**, 431-439.
- Capendeguy O., Chodanowski P., Michielin O., Horisberger J. D. (2006): Access of Extracellular Cations to their Binding Sites in Na,K-ATPase: Role of the Second Extracellular Loop of the  $\alpha$  Subunit. *The Journal of General Physiology* **127**, 641-352.
- Catignol A., Durand H., Tiraby G. (1988): Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Letters* **230**, 171-175.
- Cohen E., Goldshleger R., Shainskaya A., Tal M. D., Ebel C., Maire le M., Karlsh J. S. (2005): Purification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Expressed in *Pichia pastoris* Reveals an Essential Role of Phospholipid-Protein Interactions. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 16610 – 16618.
- Cremona C. R., Herron G. S., Schimerlik M. I. (1981): Solubilization of the atrial muscarinic acetylcholin receptor: a new detergent system and rapid assays. *Analytical Biochemistry* **115**, 331-338.
- Davies J., Davis B. D., (1968): Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 3312-3316
- de Carvalho Aquiar P., Sweadner J. K., Penniston T. J., Zaremba J., Liu L., Caton M., Linazasoro G., Borg M., Tijssen J. A. M., Bressman B. S., Dobyms B. W., Brashear A., Ozelius J. L. (2004): Mutations in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha 3$  Gene *ATP1A3* Are Associated with Rapid-Onset Dystonia Parkinsonism. *Neuron* **43**, 169-175.
- Demos K. M., van Karnebeek C., Ross J. J., Adam S., Shen Y., Zhan H. S., Shyr C., Horvath G., Suri M., Fryer A., Jones J. S., Friedman M J. a FORGE Canada Consortium (2014): A novel recurrent mutation in *ATP1A3* causes CAPOS syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **9**. <http://www.ocrd.com/content/9/1/15>.
- Fedosova N. (2016): Purification of Na, K-ATPase from Pig Kidney. In: *P-type ATPases - Methods and Protocols*. (Bublitz M., ed.), Springer - Humana Press, New York, USA, 5 – 10. ISBN 978-1-4939-3179-8.
- Geering K. (2001): The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *Journal of Bioengineering and Biomedical Science* **33**, 425-438.
- Geering K. (2008): Funkcional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **17**, 526–532.
- Glick R. B., Pasternak J. J., Patten L. C. (2010): *Molecular biotechnology – Principles and Applications of Recombinant DNA*. 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1000 stran. ISBN 978-1-55581-498-4.
- Gritz L., Davies J. (1983): Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**, 179-188.
- Guthrie C. (1991): Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymology*, **194**, 1-863.

- Hadfield C., Jordan B. E., Mount R. C., Pretorius G. H., Burak E. (1990): G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **18**, 303-313.
- Haviv H., Cohen E., Lifshitz Y., Tal M. D., Goldshleger R., Karlsh J. S. (2007): Stabilization of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Purified from *Pichia pastoris* Membranes by Specific Interactions with Lipids. *Biochemistry* **46**, 12855 – 12867.
- Haviv H., Habeck M., Kanai R., Toyoshima C., Karlsh J. S. (2012): Neutral Phospholipids Stimulate Na, K-ATPase Activity – A Specific Lipid-Protein Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 10073 – 10081.
- Heinzen L. E., Arzimanoglou A., Brashear A., Clapcote J. S., Gurrieri F., Goldstein B. D., Jóhannesson H. S., Mikati A. M., Nevillr B., Nicole S., Ouelius J. L., Poulsen H., Schyns T., Sweadner J K., van den Maagdenberg A., Vilsen B. (2014): Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurology* **13**, 503-5014.
- ChemSketch: ACD/ChemSketch Freeware, Version 1.0, ACD/Labs.
- Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. (1992): Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122.
- Johnston M. (1987): A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **51**, 458-476.
- Kaplan H. J. (2002): Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 511-535.
- Koenderink J. a Swarts H. G. P. (2016): Expression of Na, K-ATPase and H, K-ATPase Isoforms with the Baculovirus expression system. In: *P-type ATPases – Methods and Protocols*. (Bublitz M., ed.), Springer – Humana Press, New York, USA, 71 – 79.
- Lenoir G., Menguy T., Corre F., Montigny C., Pedersen A. P., Thinés D., le Maire M., Falson P. (2002): Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1560**, 67-83.
- Lingrel J. B., Williams M. T., Vorhees C. V., Moseley A. E. (2007): Na, K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *Journal of Bioengineering and Biomedical Science* **39**, 385-389.
- Lohr D., Venkov P., Zlatanova J. (1995): Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB Journal* **9**, 777-787.
- Luhová L., Peč P., Šebela M., Frébort I., Zajoncová L., Petřivalský M. (2012): *Laboratorní cvičení z biochemie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 157 stran. ISBN 978-80-244-3328-8.
- Morth P. J., Pedersen P. B., Toustrup-Jensen S. M., Sørensen L-M. T., Petersen J., Andersen P. J., Vilsen B., Nissen P. (2007): Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**, 1043-1050.
- Morth P. J., Poulsen H., Toustrup-Jensen S. M., Schack R. V., Egebjerg J., Andersen P. J., Vilsen B., Nissen P. (2008): The structure of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and mapping of isoforms differences and disease-related mutations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 217-227.
- Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové (2017) Nano studijní materiály [online] Technická univerzita v Liberci [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: [https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5746/mod\\_resource/content/1/CV2B\\_stanoven%C3%AAD%20celkov%C3%BDch%20protein%C5%AF.pdf](https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5746/mod_resource/content/1/CV2B_stanoven%C3%AAD%20celkov%C3%BDch%20protein%C5%AF.pdf)
- Nissen P. (2016): An Introduction to P-type ATPase Research. In: *P-type ATPases - Methods and Protocols*. (Bublitz M., ed.), Springer - Humana Press, New York, USA, 1 – 2. ISBN 978-1-4939-3179-8.
- Norby, J. G. (1988): Coupled Assay of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity. *Methods in Enzymology* **156**, 116-119.
- Nyblom M., Reinhard L., Andersson M., Lindahl E., Fedosova N. and Nissen P.(2013): Crystal Structure of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the Na<sup>+</sup>-Bound State. *Nature* **342**, 123-127.
- Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. (1992): Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Rose M., Grisafi P., Botstein D. (1984): Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in *Escherichia coli*. *Gene* **29**, 113-124.

- Rosewich H., Thiele H., Ohlenbusch A., Maschle U., Altmüller J., Frommolt P., Zirn B., Ebinger F., Siemens H., Nürnberg P., Brockmann K., Gärtner J. (2012): Heterozygous de-novo mutations in ATP1A3 in patients with alternating hemiplegia of childhood: a whole-exome sequencing gene-identification. *Lancet Neurol* **11**, 764-773.
- Sasaki M., Ishii A., Saito Y., Morisada N., Iijima K., Takada S., Araki A., Tanabe Y., Arai H., Yamashita S., Ohashi T., Oda Y., Ischiseki H., Hirabayashi S., Yasuhara A., Kawasaki H., Kimura H., Shimono M., Narumiya S., Suzuki M., Yoshida T., Oyazato Y., Tsuneishi S., Ozasa S., Yokochi K., Dejima S., Akiyama T., Kishi N., Kira R., Ikeda T., Oguni H., Zhang B., Tsuji S., Hirose S. (2014): Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *American Academy of Neurology* **82**, 482-490.
- Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., and Toyoshima C. (2009): Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**, 446–50.
- Struhl K., Davis R. W. (1980): A physical, genetic and transcriptomal map of the cloned his3 gene region of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **136**, 309-332.
- Swarts H. G., Koenderink J. B. (2016): Expression of Na, K-ATPase and H, K-ATPase Isoforms with the Baculovirus Expression system. *Methods in Molecular Biology* **1377**, str. 71-78.
- Pedersen P. A., Rasmussen J. H. and Jorgensen P. L. (1996): Expression in High Yield of Pig alpha 1beta1 Na,K-ATPase and Inactive Mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **5**, 2514–2522.
- PyMOL: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- Thomas C. T., McNamee G. M. (1990): Purification of Membrane Proteins. In: *Guide to Protein Purification*. (Deutscher P. M., ed.), Academic Press, San Diego, USA, 499 – 520. ISBN 0-12-213585-7.
- Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. (2011): First Crystal Structures of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: New Light on the Oldest Ion Pump. *Structure* **19**, 1732-1738.
- Tschumper G., Carbon J. (1980): Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene* **10**, 157-166.
- Western blot (2014) Labguide [online] [cit. 201702-24]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>
- Woo A. L., James P. F., Lingrel J. B. (2000): Sperm mobility is dependent on a unique of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 20693-20699.
- Zouzoulas A., Blostein R. (2006): Regions of the catalytic alpha subunit of Na,K-ATPase important for functional interactions with FXYD 2. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 8539-8544.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$\alpha$ -DDM	n-dodecyl- $\alpha$ -D-maltosid
$\beta$ -DDM	n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
AHC	Alternating Hemiplegia of Childhood (Dětská hemiplegie)
Amp <sup>r</sup>	Gen rezistence k Ampicilinu
<i>ATP1A1</i>	Gen kódující isoformu 1 podjednotky $\alpha$ NKA
<i>ATP1A2</i>	Gen kódující isoformu 2 podjednotky $\alpha$ NKA
<i>ATP1A3</i>	Gen kódující isoformu 3 podjednotky $\alpha$ NKA
<i>ATP1A4</i>	Gen kódující isoformu 4 podjednotky $\alpha$ NKA
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	Octoethylglykolmonododecylether
CAPOS	Syndrom se symptomy odvozujiící název - <u>C</u> erebellar ataxia, <u>A</u> reflexia, <u>P</u> es cavus, <u>O</u> ptic atrophy, <u>S</u> ensorineural hearing loss
CBB	Coomasie Brilliant blue, barvivo
CMC	Kritická micelární koncentrace
<i>CUP1</i>	Gen aktivovaný měďnatými ionty
DM	n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid
EGTA	Aminopolykarboxylová kyselina
ER	Endoplasmatické retikulum
<i>GAL1</i>	Gen aktivovaný galaktosou a potlačovaný glukosou
<i>GAL4</i>	Gen aktivovaný galaktosou a potlačovaný glukosou
<i>GAL7</i>	Gen aktivovaný galaktosou a potlačovaný glukosou
<i>GAL10</i>	Gen aktivovaný galaktosou a potlačovaný glukosou
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
HIS3	Auxotrofní marker pro histidin

HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <u>h</u> igh- <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) diethy-ammonio-1 propanesulfonate
kb	1000 párů bází
LEU2	Selekční gen pro leucinovou auxotrofii
LMNG	Laurylmaltoseneopentylglycol
MCS	Multiklonovací místo (z anglického „multicloning site“)
<i>MET25</i>	Gen negativně regulován metioninem
NKA	Sodno-draselná pumpa, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa
pBR322	Typ expresního vektoru pro expresi v bakteriích
P <sub>GAL1</sub>	Galaktosový inducibilní promotor
P <sub>GAL-10</sub>	Galaktosový inducibilní promotor
PKC	Protein kinasa C
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
RPD	Rapid Onset Dystonia Parkinsonism (Parkinsonova nemoc s časným nástupem)
SDS	Dodecylsírán sodný
TRP1	Auxotrofní marker pro tryptofan
URA3	Auxotrofní marker pro uracil
WT	Wild type, přirozená forma proteinu

## APENDIX

Sekvence genu pro expresi  $\alpha_3$  isoformy NKA (tato sekvence byla optimalizovaná pro expresi v kvasinkách):

ATGGGTGACAAGAAAGACGATAAGGATAGTCCAAAGAAGA  
ACAAGGGTAAAGAAAGAAGAGATTTAGATGATTTGAAGAAAGAAG  
TTGCTATGACTGAACATAAGATGTCCGTCGAAGAAGTATGTAGAA  
AGTACAACACCGATTGCGTTCAAGGTTTAACTCACAGTAAGGCTC  
AAGAAATTTTAGCAAGAGACGGTCCTAACGCTTTGACACCACCTC  
CAACTACACCAGAATGGGTAAAGTTCTGTAGACAATTGTTTCGGTG  
GTTTCTCCATTTTGTTATGGATAGGTGCAATCTTATGCTTCTTGG  
CCTATGGTATACAAGCTGGTACTGAAGATGACCCAAGTGGTGATA  
ACTTGTACTTGGGTATAGTTTTAGCTGCAGTTGTCATAATCACAG  
GTTGTTTCTCTTACTACCAAGAGGCTAAGTCTTCAAAGATCATGG  
AATCATTCAAGAACATGGTTCCTCAACAAGCCTTGGTCATTAGAG  
AAGGTGAAAAAATGCAAGTTAACGCTGAAGAAGTAGTTGTCGGTG  
ATTTAGTCGAAATTAAGGGTGGTGATAGAGTACCAGCCGACTTGA  
GAATCATTCTGCTCATGGTTGTAAGGTTGATAACTCCAGTTTGA  
CTGGTGAATCCGAACCTCAAACCAGAAGTCCAGATTGTACTCACG  
ACAACCCTTTGGAACTAGAAACATCACATTTTTCTCTACCAACT  
GCGTTGAAGGTACAGCTAGAGGTGTAGTTGTCGCAACTGGTGATA  
GAACAGTCATGGGTAGAATTGCCACCTTAGCTTCAGGTTTGGGAAG  
TAGGTAAAACCTCCAATTGCAATCGAAATCGAACATTCATACAAT  
TGATAACCGGTGTCGCCGTATTCTTGGGTGTCTCTTTCTTTATAT  
TGTCATTGATCTTGGGTTACACTTGGTTGGAAGCTGTAATCTTTT  
TGATCGGTATCATCGTTGCTAATGTCCCAGAAGGTTTGTAGCAA  
CTGTTACAGTCTGTTTAAACCTTGACTGCCAAAAGAATGGCTAGAA  
AGAACTGCTTGGTAAAGAACTTGGGAAGCAGTTGAAACATTAGGTT  
CTACATCAACCATTTGTTTACAGATAAGACTGGTACATTGACCCAAA  
ATAGAATGACCGTTGCACATATGTGGTTTGTATAACCAAATTCACG  
AAGCCGATAACCACTGAAGACCAATCTGGTACTTCATTTCGATAAAT  
CTTCACATACATGGGTTGCATTATCTCACATAGCCGGTTTGTGTA  
ATAGAGCTGTCTTTAAGGGTGGTCAAGATAACATCCCTGTCTTAA  
AAAGAGATGTAGCAGGTGACGCCTCCGAAAGTGCTTTGTTGAAGT

GCATAGAATTGTCCAGTGGTTCAGTAAAGTTGATGAGAGAAAGAA  
ATAAGAAGGTTGCAGAAATCCCATTCAACTCTACAAACAAGTACC  
AATTGTCAATACATGAAACCGAAGATCCTAACGACAACAGATACT  
TGTTGGTTATGAAAGGTGCTCCAGAAAGAATTTTAGATAGATGTT  
CTACTATCTTGTTGCAAGGCAAGGAACAACCATTGGACGAAGAAA  
TGAAAGAAGCATTTCAAAATGCCTACTTAGAATTGGGTGGTTTAG  
GTGAAAGAGTTTTGGGTTTTTGCCATTATTACTTACCTGAAGAAC  
AATTCCCAAAGGTTTTGCATTTCGATTGTGATGACGTCAATTTTA  
CAACCGACAACCTTATGCTTCGTAGGTTTGATGTCTATGATTGATC  
CTCCAAGAGCCGCTGTACCTGACGCAGTTGGCAAGTGTAGATCAG  
CCGGTATAAAAGTAATCATGGTTACAGGTGATCACCCAATTACCG  
CTAAAGCAATAGCCAAGGGTGTGGTATTATATCCGAGGGTAATG  
AAACAGTCGAAGATATCGCAGCCAGATTGAATATTCCTGTCAGTC  
AAGTAAACCCAAGAGACGCTAAGGCATGTGTTATCCATGGTACTG  
ATTTGAAGGACTTCACATCTGAACAAATCGATGAAATCTTGCAA  
ACCACACAGAAATAGTATTCGCTAGAACCTCACCTCAACAAAAGT  
TGATCATCGTTGAAGGTTGCCAAAGACAAGGTGCTATTGTAGCAG  
TACTGGTGATGGTGTTAATGACTCCCCAGCTTTGAAAAAGGCAG  
ATATAGGTGTTGCCATGGGTATCGCTGGTTCGATGTCAGTAAAC  
AAGCTGCAGACATGATATTGTTAGATGACAACCTTTGCTTCTATCG  
TTACAGGTGTCGAAGAAGGTAGATTGATCTTCGATAACTTGAAAA  
AGTCCATCGCTTACACTTTGACAAGTAACATCCCTGAAATAACTC  
CATTTTTGTTGTTTCATCATGGCAAACATTCCTTTACCATTGGGTA  
CCATAACTATCTTGTGTATCGATTTGGGTACAGACATGGTTCCTG  
CAATATCTTTGGCCTACGAAGCCGCTGAATCAGATATAATGAAGA  
GACAACCTAGAAACCCAAGAACTGACAAGTTGGTTAACGAAAGAT  
TGATATCCATGGCCTATGGTCAAATTGGTATGATCCAAGCTTTGG  
GTGGTTTCTTTTCTTACTTCGTTATCTTGGCTGAAAACGGTTTCT  
TACCTGGTAACTTAGTAGGTATCAGATTA AATTGGGATGACAGAA  
CTGTTAACGATTTGGAAGACTCTTATGGTCAACAATGGACATACG  
AACAAAGAAAGGTAGTTGAATTTACATGTCATACCGCTTTCTTTG  
TTTCTATTGTCGTAGTTCAATGGGCAGATTTGATCATCTGCAAGA  
CCAGAAGAAATTCAGTTTTCCAACAGGGTATGAAGAACAAGATCT  
TGATCTTCGGTTTGTTTCGAAGAAACAGCTTTAGCAGCCTTTTTGT



**CTTATTGTCCTGGTATGGATGTTGCATTAAGAATGTACCCTTTGA  
AACCATCCTGGTGGTTTTGCGCCTTCCCTTACTCATTTTTGATCT  
TCGTTTACGATTTTGATATTGGATCATT CAGTAATAGAAATCAGAA  
AGTTGATCTTGAGAAGAAATCCAGGTGGTTGGGTGCGAAAAAGAAA  
CTTATTACTGAGCGGCCGC**

Sekvence genu pro expresi  $\beta_1$  isoformy NKA (tato sekvence byla optimalizovaná pro expresi v kvasinkách):

**GAATTCATGGCAAGAGGTAAGGCAAAGGAAGAAGGTAGTTGGAAGA  
AGTTTATCTGGAATAGTGAAAAGAAGGAATTTTTAGGTAGAACAG  
GTGGTTCCTGGTTCAAGATATTGTTGTTTTATGTAATATTCTACG  
GTTGTTTGGCAGGTATCTTCATCGGTACTATCCAAGTTATGTTGT  
TGACAATCAGTGAATTTAAGCCAACCTACCAAGATAGAGTCGCTC  
CACCTGGTTTGACTCAAATCCCTCAAATCCAAAAGACAGAAATCT  
CTTTCAGACCAAACGACCCTAAGTCATATGAAGCTTACGTCTTGA  
ACATAGTAAGATTTTTAGAAAAGTACAAGGATTCCGCACAAAGAG  
ATGACATGATTTTCGAAGACTGCGGTGATGTCCCAAGTGAACCTA  
AAGAACGTGGTGACTTCAACCATGAAAGAGGTGAAAGAAAGGTTT  
GTAGATTCAAGTTGGAATGGTTGGGTAATTGCTCTGGTTTGAACG  
ATGAAACTTATGGTTACAAGGAAGGCAAGCCATGTATCATCATCA  
AGTTGAACAGAGTATTAGGTTTTAAACCAAAGCCACCTAAAAACG  
AATCATTGGAAACCTATCCTGTTATGAAGTACAATCCAAACGTTT  
TACCTGTCCAATGCACAGGTAAAAGAGATGAAGACAAGGATAAAG  
TTGGTAACGTTGAATACTTCGGTTTGGGTAACTCTCCAGGTTTCC  
CTTTGCAATACTACCCATACTACGGCAAGTTGTTGCAACCAAAGT  
ACTTGCAACCTTTGTTGGCCGTTCAATTCACTAACTTGACAATGG  
ATACCGAAATCAGAATAGAGTGTAAGGCTTACGGTGAAAACATAG  
GTTACTCTGAAAAGGACAGATTCCAAGGTAGATTCGATGTTAAGA  
TCGAAGTCAAGTCATGAGCGGCCGC**