

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOFYZIKY

## BAKALÁRSKA PRÁCA

**Expresia C23 a C45 slučiek jednotlivých ľudských izoforiem  
 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy v *E. coli***

Vypracovala: Martina Jamečná

Študijný odbor: Biofyzika

Vedúca bakalárskej práce: Mgr. Jaroslava Geletičová

Ďakujem vedúcej práci, Mgr. Jaroslave Geletičovej, za ochotu, odborné vedenie a pomoc pri experimentálnej a teoretickej časti práce. Ďalej by som chcela poďakovať Bc. Tereze Štenclovej za pomoc pri expresii a purifikácii proteínov.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením  
Mgr. Jaroslavy Geletičovej a s použitím zdrojov, ktoré citujem v zozname literatúry.

V Olomouci dňa 12. 5. 2016

## Súhrn

Táto bakalárska práca sa zameriava na optimalizáciu expresie veľkej cytoplazmatickej slučky C45 (medzi transmembránovými helixami M4 a M5) a slučky C23 (medzi transmembránovými helixami M2 a M3) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy.

Teoretická časť práce stručne popisuje problematiku membránových proteínov, ich funkciu a štruktúru s dôrazom na izoformy podjednotky  $\alpha$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy. Ďalej je spracovaný teoretický základ metód molekulárnej biológie, ktoré boli použité pri heterologickej expresii proteínov v *E. coli*. Cieľom experimentálnej časti bola expresia slučiek C23 a C45 jednotlivých ľudských izoformiem Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy v *E. coli* a navrhnutie optimalizácie pre zvýšenie čistoty výtlačku. Úspešne bola uskutočnená optimalizácia expresie slučiek  $\alpha_1$  C45 a  $\alpha_3$  C45. Bohužiaľ expresia proteínov  $\alpha_1$  C23,  $\alpha_2$  C23,  $\alpha_3$  C23 a  $\alpha_3$  C45 vyžaduje komplexnú optimalizáciu.

## Summary

The thesis is focused on the optimization of the large cytoplasmic loop C45 (connecting transmembrane helices M4 and M5) and the loop C23 (connecting transmembrane helices M2 and M3) of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

The theoretical part describes the issue of membrane proteins, their function and structure; it is mainly focused on the isoforms of  $\alpha$ -subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. The basics of molecular biology methods used at the heterologous expression of proteins in *E. coli* are outlined. The aim of the experimental part was to express C23 and C45 loops of the human Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in *E. coli* and to suggest an optimized procedure to increase the purity of the output. The optimization of  $\alpha_1$  C45 and  $\alpha_3$  C45 loops was successful. Unfortunately the protein expression of  $\alpha_1$  C23,  $\alpha_2$  C23,  $\alpha_3$  C23 and  $\alpha_2$  C45 requires further optimization.

## Zoznam skratiek

ADP	adenozíndifosfát
APS	peroxodisíran amónny
ATP	adenozíntrifosfát
ATPáza	adenozíntrifosfatáza
BSA	hovädzí sérový albumín
C23	cytoplazmatická slučka medzi helixami M2 a M3
C45	cytoplazmatická slučka medzi helixami M4 a M5
Da	jednotka hmotnosti (Dalton)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
GPI kotva	glykofosfatidilinozitolová kotva
HeLa bunky	bunková línia ľudských epiteliálnych buniek
His-Tag	histidínová kotva
IPTG	izopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranozid
LB médium	Luria-Bertrani médium
M1 – M10 helixy	transmembránové helixy
OD	absorbancia (optical density)
pET28b	klonovací vektor

Pi	fosfátová skupina
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
RNA	ribonukleová kyselina
Rpm	jednotka frekvencie otáčok (revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovom géle v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Temed	N,N, N', N'-tetrametyletyléndiamín
$\alpha_1$ C23	C23 slučka z $\alpha_1$ izoformy
$\alpha_1$ C45	C45 slučka z $\alpha_1$ izoformy
$\alpha_2$ C23	C23 slučka z $\alpha_2$ izoformy
$\alpha_2$ C45	C45 slučka z $\alpha_2$ izoformy
$\alpha_3$ C23	C23 slučka z $\alpha_3$ izoformy
$\alpha_3$ C45	C45 slučka z $\alpha_3$ izoformy

## Obsah

Úvod.....	1
1 Prehľad problematiky.....	2
1.1 Membránový transport .....	2
1.1.1 Štruktúra cytoplazmatickej membrány .....	2
1.1.2 Pasívny a aktívny transport.....	4
1.1.3 ATPázy .....	6
1.2 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPáza .....	8
1.2.1 Katalytický cyklus Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPázy .....	9
1.2.2 Štruktúra .....	10
1.2.3 Izoformy podjednotky $\alpha$ .....	13
1.3 Vybrané metódy molekulárnej biotechnológie.....	15
1.3.1 Klonovacie vektory.....	15
1.3.2 Heterologická expresia v baktériách <i>E. coli</i> .....	15
1.3.3 Purifikácia proteínov .....	16
1.3.4 Stanovenie koncentrácie a čistoty proteínov .....	19
2 Materiál a metódy .....	20
2.1 Kmeň baktérie <i>E.coli</i> a expresné vektory.....	20
2.2 Príprava C45 slučky .....	20
2.2.1 Postup prípravy C45 slučky.....	21
2.2.2 Postup optimalizácie expresie C45 slučky .....	24
2.3 Príprava C23 slučky .....	26
2.3.1 Postup prípravy C23 slučky.....	26
2.4 Elektroforéza za denaturujúcich podmienok .....	27
2.4.1 Postup elektroforézy za denaturujúcich podmienok.....	28
2.5 Stanovenie koncentrácie metódou Bradfordovej.....	29
2.5.1 Postup stanovenia koncentrácie metódou Bradfordovej.....	29
3 Výsledky a diskusia.....	31
4 Záver .....	51
Zoznam literatúry .....	52



## Úvod

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza je jedným z najvýznamnejších enzýmov živočíšnych buniek, ktorý výmenou dvoch sodných iónov za tri draselné ióny udržiava pokojový membránový potenciál, osmotickú rovnováhu a sekundárny transport látok. Nesprávna činnosť tohto enzýmu vedie k celej rade ochorení.

Štruktúrne sa táto pumpa delí na tri podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Podjednotka  $\alpha$  je tvorená veľkou cytoplazmatickou slučkou C45 a slučkou medzi helixami M2 a M3 označovanou ako slučka C23.

Veľká cytoplazmatická slučka nesie rovnaké štruktúrne a funkčné vlastnosti ako celý enzým a môže byť jednoducho exprimovaná v *E. coli*. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza napríklad interaguje s cisplatinou, ktorá často spôsobuje funkčné poškodenie obličiek pri chemoterapii. K tejto interakcii dochádza s veľkou pravdepodobnosťou v oblasti C45 slučky [Kubala et al. 2014].

Problematika Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy so zameraním na jej funkciu, štruktúru a izoformy podjednotky  $\alpha$  je uvedená v teoretickej časti spolu s teóriou metód použitých pri heterologickej expresii proteínov v *E. coli*.

Cieľom experimentálnej časti bola expresia C45 a C23 slučiek troch izoformiem podjednotky  $\alpha$  v *E. coli*. Na základe pozorovaného množstva a čistoty jednotlivých proteínov bola navrhnutá optimalizácia pre zvýšenie čistoty výťažku.

# 1 Prehľad problematiky

## 1.1 Membránový transport

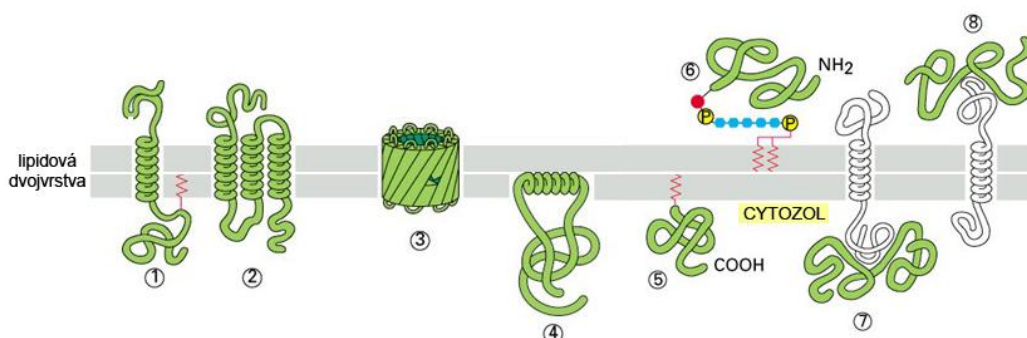
### 1.1.1 Štruktúra cytoplazmatickej membrány

Bunkové membrány sú nevyhnutné pre život bunky. Základom cytoplazmatickej membrány je lipidová dvojvrstva, do ktorej sú včlenené proteíny. Membrána je tvorená amfifilnými molekulami lipidov, tzn. majúcimi hydrofilnú hlavičku a hydrofóbny chvost.

Cytoplazmatická membrána obklopuje vnútorný priestor bunky, čím vymedzuje jej hranice a udržiava rozdielnosť prostredia medzi cytozolom a vonkajším okolím bunky. Transmembránové iónové gradienty, ktoré vznikajú aktivitou membránových proteínov, sú využívané na syntézu ATP, riadenie membránového transportu určitých látok, produkciu a prenos elektrického signálu v nervových a svalových bunkách ako reakcia na vonkajšie podnety. Kapitola o membránovom transporte bola spracovaná podľa knihy [Alberts et al. 2007, str. 617 – 657].

### Membránové proteíny

Membránové proteíny udeľujú každej cytoplazmatickej membráne charakteristické funkčné vlastnosti. Množstvo a typy proteínov v membráne sú variabilné. Líšia sa štruktúrou a spôsobom, akým sú spojené s membránou, čo odpovedá rozdielnosti funkcií. Z hľadiska funkcie sa delia na prenášače, receptory a enzýmy.



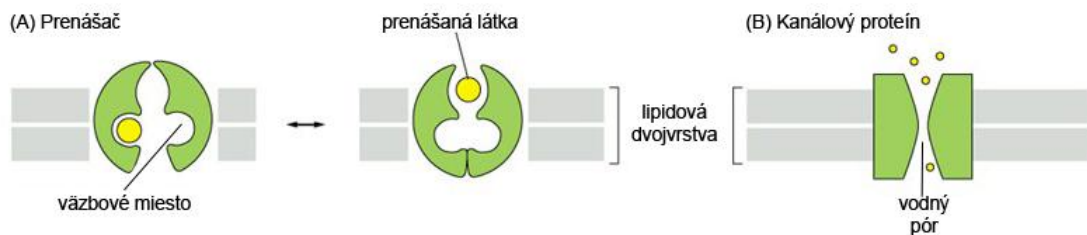
**Obrázok 1:** Spôsoby asociácie membránových proteínov s lipidovou dvojvrstvou. Integrálny proteín s transmembránovou doménou  $\alpha$ -helix (1), viacnásobný  $\alpha$ -helix (2) a  $\beta$ -skladaný list ( $\beta$ -barel) (3). Proteíny, ktoré asociujú len s jednou stranou membrány:

asociácia prostredníctvom amfifilného  $\alpha$ -hélixu (4), asociácia prostredníctvom kovalentnej väzby (5). Proteíny vo vonkajšom prostredí bunky: asociácia prostredníctvom GPI kotvy (6). Periférne proteíny (7, 8). Spracované podľa [Alberts et al. 2008, str. 630].

Na obrázku 1 sú uvedené spôsoby, akými môžu byť membránové proteíny asociované s lipidovou dvojvrstvou. Najväčšie zastúpenie majú integrálne proteíny, ktorých polypeptidový reťazec prechádza aspoň raz cez membránu, vid' obrázok 1 (proteíny 1, 2, 3). Hydrofóbne časti proteínu prechádzajú lipidovou dvojvrstvou, kde sú izolované od vody, zatiaľ čo hydrofilné časti proteínu sú vystavené vode na oboch stranách membrány. Druhú skupinu tvoria proteíny, ktoré sa nachádzajú v cytozole a asociujú s membránou buď prostredníctvom amfifilného alfa helixu, vid' obrázok 1 (proteín 4), alebo sú kovalentne viazané na lipidové reťazce, vid' obrázok 1 (proteín 5). Tretiu skupinu tvoria proteíny nachádzajúce sa vo vonkajšom prostredí bunky, ktoré sú spojené kovalentnou väzbou s oligosacharidom a prostredníctvom fosfatidylinozitolu s vonkajšou stranou membrány, vid' obrázok 1 (proteín 6). Ide o takzvanú GPI kotvu. Štvrtú skupinu tvoria proteíny, ktoré sú viazané s membránou prostredníctvom nekovalentnej väzby s iným membránovým proteínom. Nazývajú sa periférne proteíny a sú zobrazené na obrázku 1 (proteíny 7, 8).

Priepustnosť lipidovej dvojvrstvy je obmedzená veľkosťou, polaritou a nábojom molekúl. Malé nepolárne molekuly (kyslík) a nenabité polárne molekuly (voda) prechádzajú membránou samovoľne. Ióny, nabité molekuly a veľké polárne molekuly neprechádzajú membránou samovoľne, ale prostredníctvom transportných proteínov.

Transportné proteíny delíme na prenášače a kanálové proteíny, vid' obrázok 2. Prenášače vplyvom naviazania určitej látky podliehajú konformačným zmenám, ktoré vedú k transportu látky cez membránu. Uzatvárateľné iónové kanály umožňujú predovšetkým transport iónov. Tento transport je zabezpečený elektrochemickým gradientom, ktorý umožňuje samovoľný prechod látky iba jedným smerom. Oproti tomu, elektrochemický gradient je tvorený koncentračným gradientom (samovoľný prechod molekúl z miesta s vyššou koncentráciou do miesta s nižšou koncentráciou) a membránovým potenciálom (rozdiel nábojov medzi vonkajšou a vnútornou stranou membrány).

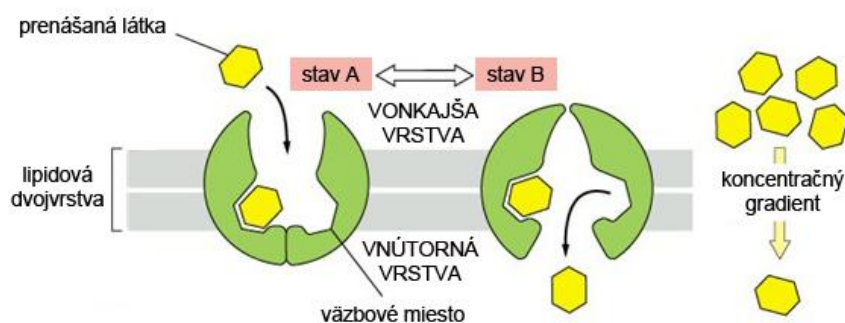


**Obrázok 2:** Prenášače a kanálové proteíny. Dve rôzne konformácie prenášača s väzbovým miestom prístupným najskôr z jednej, potom z druhej strany lipidovej dvojvrstvy (A). Kanálový proteín formujúci vodný pór, cez ktorý môžu prechádzať látky (B). Spracované podľa [Alberts et al. 2008, str. 653].

### 1.1.2 Pasívny a aktívny transport

Transportné deje sa delia z hľadiska spotreby energie na pasívny a aktívny transport. Všetky kanály, ale aj niektoré prenášače dovoľujú látkam prechádzať cez membránu pasívne. Nenabité molekuly sú transportované na základe rozdielu koncentrácií na opačných stranách membrány. V prípade transportu nabitých molekúl je pasívny transport riadený elektrochemickým gradientom. Pretože transport v smere koncentračného a elektrochemického gradientu nevyžaduje energiu, označujeme ho ako pasívny transport.

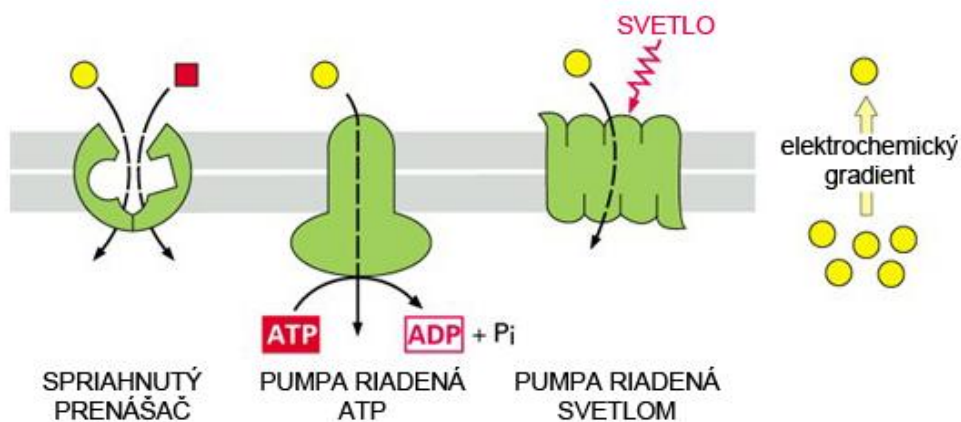
Proces, ktorým prenášač transportuje molekulu cez lipidovú dvojvrstvu je možné prirovnať k interakcii enzýmu so substrátom, ale na rozdiel od klasickej enzymatickej reakcie, prenášaná molekula nie je premenená. K prenosu látky dochádza vplyvom reverzibilných konformačných zmien, ktoré striedavo odkrývajú väzbové miesta najskôr na jednej, potom na druhej strane membrány. Tento mechanizmus je zobrazený na obrázku 3.



**Obrázok 3:** Model znázorňujúci konformačné zmeny prenášača pri pasívnom transporte. Väzbové miesto prenášača prístupné z vonkajšej strany lipidovej dvojvrstvy

– konformačný stav A. Väzbové miesto prenášača prístupné z vnútornej strany lipidovej dvojvrstvy – konformačný stav B. Prenášač naviaže látku na jednej strane dvojvrstvy a vplyvom konformačnej zmeny ho preniesie na druhú stranu membrány. Ak je koncentrácia látky vo vonkajšom prostredí väčšia ako vo vnútornom, viac látky sa naviaže v konformačnom stave A a dôjde k prenosu látky v smere jej koncentračného gradientu. Spracované podľa [Alberts et al. 2008, str. 655].

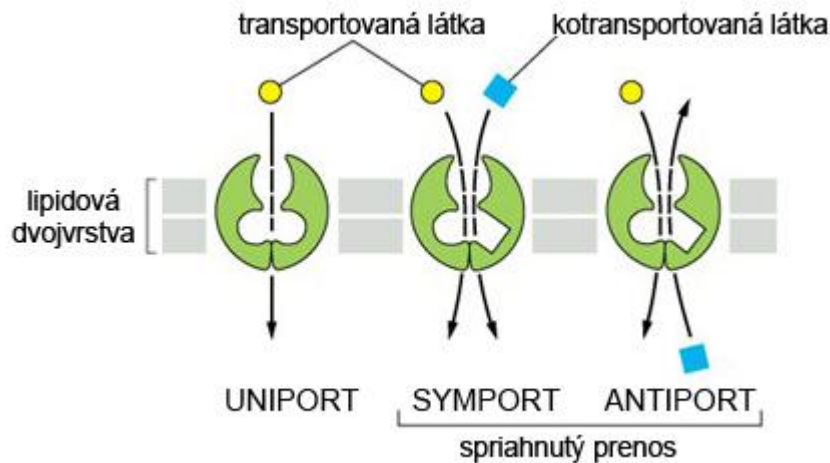
Transportné proteíny taktiež zabezpečujú aktívne pumpovanie látok cez membránu proti elektrochemickému gradientu. Energia potrebná na tento transport je získavaná napríklad z hydrolýzy ATP. Tento proces sa nazýva aktívny transport a je sprostredkovaný prenášačmi, ktoré sú označované ako pumpy. Aktívny transport v bunke môže prebiehať tromi odlišnými spôsobmi. Ide o spriahnuté prenášače (prenos jednej látky cez membránu proti elektrochemickému gradientu je spojený s pasívnym prenosom druhej látky v smere elektrochemického gradientu), pumpy riadené ATP (prenos látky je spojený s hydrolýzou ATP) a pumpy riadené svetlom (prenos látky využíva energiu získanú zo svetla), vid' obrázok 4.



**Obrázok 4:** Tri spôsoby aktívneho transportu. Usporiadané smerom zľava doprava sú spriahnutý prenášač, pumpa riadená ATP, pumpa riadená svetlom. Prenášaná molekula je znázornená žltou, zdroj energie potom červenou. Spracované podľa [Alberts et al. 2008, str.656].

Podľa počtu prenášaných častíc rozlišujeme uniport a kotransport, vid' obrázok 5. Pokiaľ prenášače sprostredkujú prenos len jednej látky z jednej strany membrány na druhú, potom ide o uniport. V prípade kotransportu (spriahnutých prenášačov) je prenos jednej látky sprevádzaný prenosom druhej látky. Ak sú obe látky prenášané jedným

smerom, hovoríme o symporte. Ale ak sa pohybujú v opačných smeroch, hovoríme o antiporte.



**Obrázok 5:** Modely prenášačov vo funkcii uniport, symport a antiport. Spracované podľa [Alberts et al. 2008, str. 656].

Antiport a symport umožňujú využívať energiu uvoľnenú pri prenose jednej látky (najčastejšie iónu) v smere elektrochemického gradientu na transport druhej látky proti smeru elektrochemického gradientu. Preto prenášače riadené iónmi zabezpečujú sekundárny transport a prenášače riadené ATP zabezpečujú primárny transport.

### 1.1.3 ATPázy

Pumpy riadené ATP sú často označované ako transportné ATPázy, pretože katalyzujú hydrolýzu ATP za vzniku fosfátu a ADP. Získanú energiu používajú na prenos iónov a iných látok cez membránu. Rozlišujeme tri typy púmp riadených ATP.

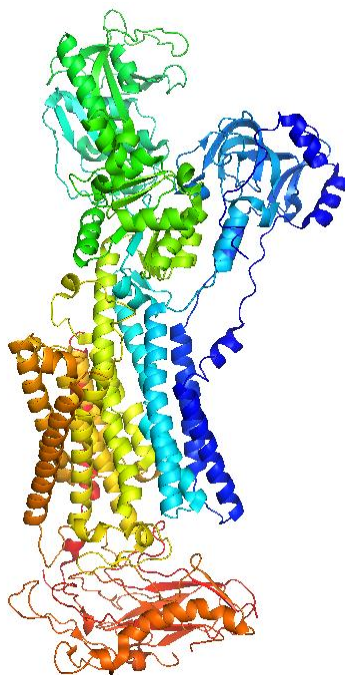
ATPázy P typu sú transmembránové proteíny. Ich názov je odvodený od fosforylácie, ktorej enzým podlieha počas reakčného cyklu. Do tejto skupiny patria napríklad pumpy, ktoré prenášajú  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  a  $\text{Ca}^+$  ióny.

ATPázy F typu sa nachádzajú v mitochondriách alebo v bakteriálnej membráne, kde voľnú energiu z gradientu využívajú na syntézu ATP. ATPázy V typu sú štruktúrne podobné ATPázam F typu, ale nachádzajú sa v lyzozómoch, vakuolách a vezikulách.

Posledným typom sú ABC transportéry, ktorých názov je odvodený z anglického ATP-binding cassette. Na rozdiel od predchádzajúcich ATPáz, ktoré pumpujú predovšetkým ióny, tieto transportéry pumpujú malé molekuly.

## 1.2 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza, označovaná tiež ako sodno-draselná pumpa (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa) je transmembránový transportný proteín. Bola jedným z prvých objavených membránových proteínov a patrí do skupiny ATPáz P typu [Morth et al. 2009]. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza je zodpovedná za aktívny transport sodných a draselných iónov cez plazmatickú membránu živočíšnych buniek. Vytvára a udržiava vysokú vnútornú koncentráciu K<sup>+</sup> iónov a nízku koncentráciu Na<sup>+</sup> iónov. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa využíva energiu získanú z hydrolýzy ATP na transport troch Na<sup>+</sup> iónov von z bunky výmenou za dva K<sup>+</sup> ióny, ktoré vstupujú do bunky. Elektrochemický gradient, ktorý Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa vytvára, je dôležitý pre udržanie osmotickej rovnováhy bunky, pokojového membránového potenciálu, excitačných vlastností nervových a svalových buniek. Navyše gradient iónov Na<sup>+</sup> umožňuje sekundárny transport iónov (H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>), substrátov (glukóza, aminokyseliny) a neurotransmitérov cez cytoplazmatickú membránu. Dôležitú funkciu má predovšetkým v obličkách, kde sa zapojuje do reabsorpcie Na<sup>+</sup> iónov a vody. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa je preto dôležitá pri udržiavaní homeostázy [Blanco, Mercer 1998]. Na rozdiel od prenášačov, ktoré využívajú gradient iónov Na<sup>+</sup> a tým ho redukujú, existuje len jeden prenášač, ktorý tvorí gradient Na<sup>+</sup>, a to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza [Kubala et al. 2014].



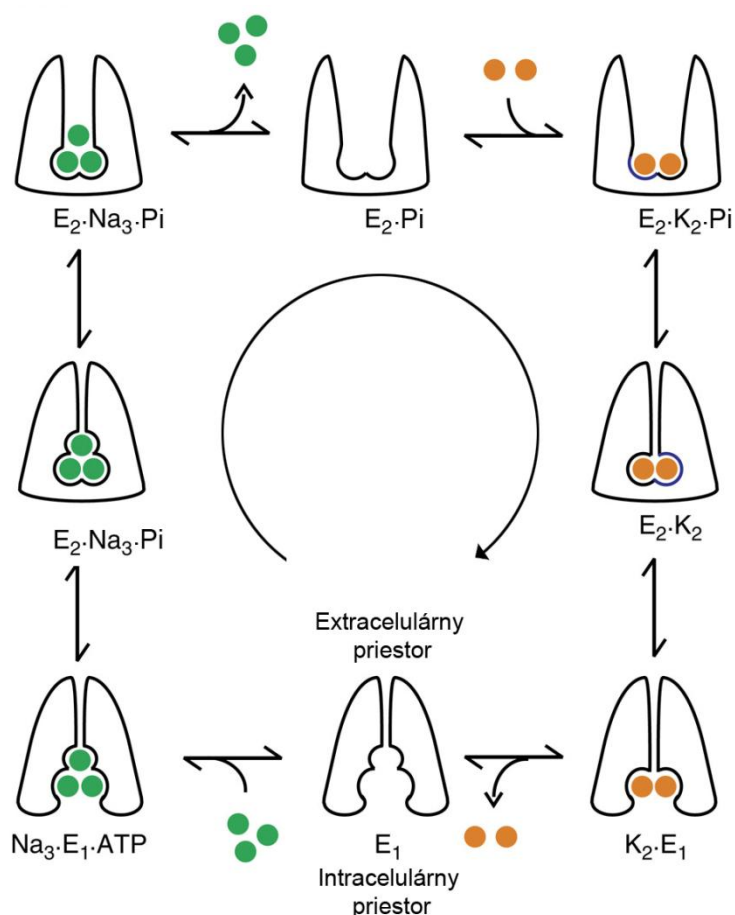
**Obrázok 6:** Obrázok Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy vytvorený na základe štruktúry PDB ID 2ZXE v programe PyMOL [Schrödinger 2010].



### 1.2.1 Katalytický cyklus $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy

Katalytický cyklus  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy spočíva v prenose troch sodných iónov von z bunky a dvoch draselných iónov do bunky. Pri transporte iónov dochádza k prechodom medzi dvomi základnými konformačnými stavmi označenými ako E1 a E2. V stave E1 má enzým vysokú afinitu k sodným iónom a ATP, ale nízku afinitu k draselným iónom. Vázkové miesta pre katióny v E1 sa nachádzajú v transmembránovej doméne a sú otvorené do cytoplazmy. Naopak, v stave E2 má enzým vysokú afinitu k draselným iónom a nízku afinitu k sodným iónom a ATP. Vázkové miesta pre katióny sú prístupné z vonkajšieho prostredia bunky [Janovská et al. 2010].

Činnosť enzýmu je popísaná Post-Albertsovým cyklom, ktorý je uvedený na obrázku 7.



**Obrázok 7:** Post-Albertsov cyklus. Spracované podľa [Gadsby et al. 2012].

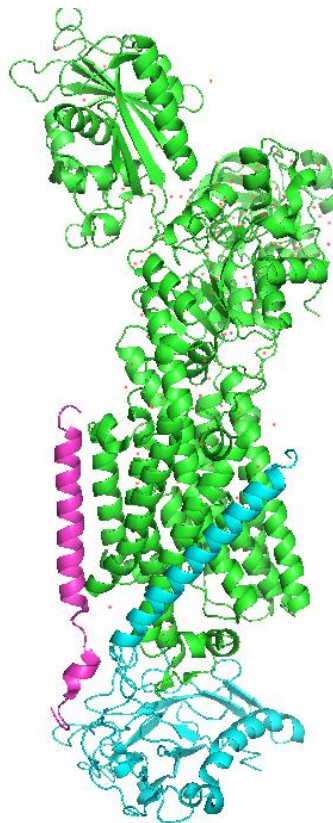
Post-Albertsov cyklus začína v stave E1. V tomto stave dochádza k aktivácii činnosti enzýmu naviazaním 3  $\text{Na}^+$  do väzkového miesta na vnútornej strane membrány.

Následne dochádza k rozštiepeniu ATP na ADP a fosfátovú skupinu Pi. V ďalšom kroku je enzým fosforylovaný, čo spôsobí konformačnú zmenu enzýmu. Teraz enzým prechádza do stavu E2 s nízkou afinitou k  $\text{Na}^+$ , čím dochádza k uvoľneniu a transportu sodných iónov von z bunky.

Väzbové miesta sú vystavené prostrediu s vyššou koncentráciou draselných iónov a afinita k enzýmu je takisto vyššia. Naviazanie draselných iónov spôsobí defosforyláciu enzýmu, ktorú nasleduje konformačná zmena. Enzým prechádza späť do stavu E1 s nízkou afinitou ku  $\text{K}^+$ , čím dochádza k uvoľneniu draselných iónov do vnútra bunky a celý cyklus sa opakuje [Kühlbrandt 2004 a Martin 2005].

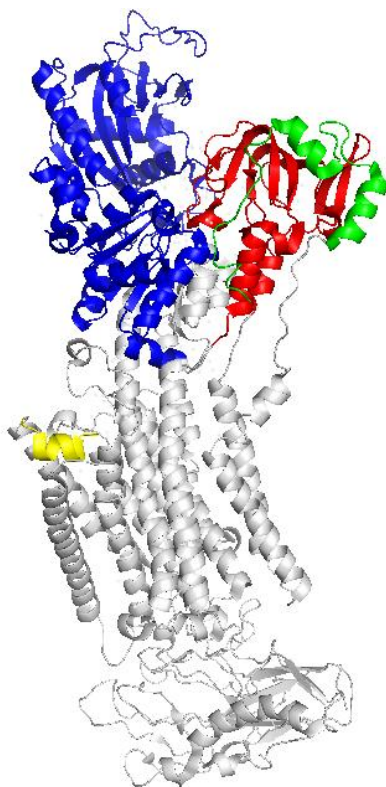
### 1.2.2 Štruktúra

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza je enzýmový komplex s molekulovou hmotnosťou okolo 165 kDa [Kubala et al. 2016]. Je zložená z troch podjednotiek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , vid' obrázok 8.



**Obrázok 8:** Štruktúra  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Jednotlivé podjednotky sú farebne vyznačené: podjednotka  $\alpha$  zelená, podjednotka  $\beta$  modrá a podjednotka  $\gamma$  ružová. Obrázok vytvorený na základe štruktúry PDB ID 2ZXE v programe PyMOL [Schrödinger 2010].

Podjednotka  $\alpha$  obsahuje väzbové miesta pre ATP,  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  ióny [Morth et al. 2009]. Jej hmotnosť je okolo 110 kDa a existuje v štyroch izoformách ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ). Podjednotka  $\alpha$  je zložená z desiatich transmembránových helixov označovaných M1 – M10 a z dvoch cytoplazmatických segmentov, ktoré sú tvorené tromi doménami, označovanými ako A, P, N, vid' obrázok 9.



**Obrázok 9:** Štruktúra podjednotky  $\alpha$ . Amino koniec proteínu je znázornený zelenou, cytoplazmatická slučka C23 je červená, veľká cytoplazmatická slučka C45 je modrá, karboxylový koniec proteínu je žltý. Obrázok vytvorený na základe štruktúry PDB ID 2ZXE v programe PyMOL [Schrödinger 2010].

Doména A je tvorená približne 120 aminokyselinami a tvorí ju amino koniec proteínu a cytoplazmatická slučka C23 (medzi helixami M2 a M3). Označenie A pochádza z anglického „actuator“, čo odkazuje na jej funkciu [Kaplan 2002 a Kubala et al. 2014].

Domény N a P sú tvorené veľkou cytoplazmatickou slučkou C45 (medzi helixami M4 a M5), ktorá je tvorená 430 aminokyselinami. Doména N (z anglického „nucleotide“) obsahuje väzbové miesto pre ATP a doména P (z anglického

„phosphorylation“) obsahuje konzervovanú sekvenciu aminokyselín, na ktorú sa viaže fosfátová skupina Pi [Morth 2007].

Podjednotka  $\beta$  je glykoproteín tvorený jedným membránovým helixom. Obsahuje tri glykolyzované sekvencie s väzbovými miestami pre N-glykozylované oligosacharidy. Je tvorená z približne 370 aminokyselín a jej hmotnosť je okolo 55 kDa. Úlohou podjednotky  $\beta$  je ukotvenie a správne zloženie podjednotky  $\alpha$  [Kaplan 2002]. Existujú tri izoformy podjednotky  $\beta$  [Blanco, Mercer 1998].

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATP-áza je ďalej tvorená proteínom zo skupiny FXYD proteínov. Tieto proteíny interagujú s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATP-ázou a regulujú jej aktivitu v závislosti od typu tkaniva a izoformy [Lingrel 2010]. FXYD2 proteín je definovaný ako podjednotka  $\gamma$ . Tento proteín bol prvým objaveným FXYD proteínom interagujúcim s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPázou. Podjednotka  $\gamma$  je malý hydrofóbny polypeptid s hmotnosťou v rozmedzí 8 – 14 kDa [Blanco, Mercer 1998]. Vyskytuje sa predovšetkým v obličkách a reguluje afinitu enzýmu k  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iónom [Lingrel et al. 2007]. Pri vysokom negatívnom membránovom potenciáli zvyšuje afinitu ku  $\text{K}^+$ . Pri nižšom negatívnom membránovom potenciáli znižuje afinitu ku  $\text{K}^+$ , ale len v prítomnosti extracelulárnych  $\text{Na}^+$  iónov. Taktiež zvyšuje afinitu ATP [Geering 2006].

### 1.2.3 Izoformy podjednotky $\alpha$

Zistenie, že enzýmy môžu byť exprimované vo viacerých formách sa stalo prelomovým v oblasti biológie. V roku 1959 Markert a Moller ako prví použili pojem „izoforma“ na popísanie odlišných enzýmov, ktoré katalyzujú rovnaké biochemické procesy. Odvtedy vedci skúmajú štruktúrne odlišnosti enzýmov s cieľom porozumenia ich fyziológie [Blanco, Mercer 1998].

V súčasnosti sú známe štyri izoformy podjednotky  $\alpha$  a tri izoformy podjednotky  $\beta$  [Lingrel 2010]. Samozrejme rôzne izoformy podjednotiek sú kódované rôznymi génmi.

Izoformy podjednotky  $\alpha$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy sú exprimované v závislosti od typu tkaniva. Izoforma  $\alpha_1$  je prítomná vo všetkých tkanivách,  $\alpha_2$  je prítomná predovšetkým v kostrových svaloch, srdci, mozgu a nervových bunkách. Izoforma  $\alpha_3$  je predovšetkým v neurónoch a  $\alpha_4$  sa nachádza len v semenníkoch, kde ovplyvňuje pohyblivosť spermií [Therien et al. 1996].

Prvú demonštráciu izoforiem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy uskutočnil Sweadner, ktorý identifikoval dve formy podjednotky  $\alpha$ . Išlo o obličkovú podjednotku  $\alpha$  a mozgovú formu, označovanú ako  $\alpha^+$ . Izoforma  $\alpha^+$  migrovala pomalšie na SDS polyakrylamidovom géle a bola citlivejšia k ouabaínu [Sweadner 1979 v Blanco, Mercer 1998]. Sweadnerova práca bola nasledovaná štúdiami, ktoré sa zamerali na biochemické vlastnosti oboch izoforiem. Rozdiely reaktivity izoforiem s N-etylmaleimidom a citlivosti na pyritiamín naznačili, že izoformy sa štruktúrne líšia.

Kompletná sekvencia aminokyselín izoforiem podjednotky  $\alpha$  bola získaná z kruhovej DNA kódujúcej polypeptidy z potkana, sliepok a človeka. Bolo zistené, že izoformy sa líšia v dĺžke polypeptidového reťazca.

Pokiaľ porovnáme jednotlivé izoformy, tak  $\alpha_3$  je najmenšia, pretože obsahuje iba 1014 aminokyselín. Izoforma  $\alpha_1$  je tvorená z 1024 a  $\alpha_2$  z 1021 aminokyselín. Izoforma  $\alpha_4$  je, čo sa dĺžky týka, najväčšia podjednotka a je tvorená 1028 aminokyselinami. Izoformy  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  vykazujú podobnosť 87%, zatiaľ čo  $\alpha_4$  je zhodná s  $\alpha_1$  iba zo 78%. Najväčšia diverzita izoforiem spočíva v štruktúre N-koncovej časti polypeptidu, extracelulárneho väzbového miesta pre ouabaín a cytoplazmatickej časti medzi aminokyselinami číslo 403 a 503 (podľa číslovania sekvencie z potkana). Naopak najviac podobné sú v oblasti väzbových miest ATP a fosfátovej skupiny, transmembránových hydrofóbných segmentov a C-koncovej časti [Blanco, Mercer

1998]. Sekvencie týchto miest sú vysoko konzervované, čo vypovedá o ich význame pre funkciu enzýmu.

### **Enzymatické vlastnosti izoforiem podjednotky $\alpha$**

Pochopenie funkčných vlastností izoforiem uľahčila dostupnosť klonovacej DNA, ktorá umožnila heterologickú expresiu. Jewell a Lingrel sa zaoberali štúdiom izoforiem  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  [Jewell, Lingrel 1991]. Zmenou dvoch aminokyselín medzi prvým a druhým transmembránovým helixom konvertovali  $\alpha_2$  aj  $\alpha_3$  na ouabaín-rezistentné formy. Klonovacie DNA, kódujúce zmutované ouabaín-rezistentné izoformy  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ako aj prirodzene ouabaín-rezistentnú izoformu  $\alpha_1$ , boli včlenené do klonovacieho vektora, ktorý bol prenesený do HeLa buniek. V HeLa bunkách boli v prítomnosti 1  $\mu\text{M}$  ouabaínu izolované jednotlivé ouabaín-rezistentné izoformy od endogénnej ouabaín-citlivej  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy HeLa buniek. Analýza jednotlivých izoforiem ukázala, že  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  preukazovali vyššiu afinitu k  $\text{Na}^+$  ako  $\alpha_3$ . Isoforma  $\alpha_3$  vykazovala vyššiu afinitu k ATP. Afinita všetkých izoforiem ku  $\text{K}^+$  bola rovnaká [Jewell, Lingrel 1991]. Blanco a Mercer v roku 1998 exprimovali všetky izoformy v expresnom systéme bakulovírus-hmyzia bunka. Výsledky odpovedali vlastnostiam, ktoré boli pozorované v prípade expresie všetkých izoforiem v eukaryotickom expresnom systéme (HeLa bunky). Jediný pozorovaný rozdiel bol v afinite  $\alpha_3$  ku  $\text{K}^+$ , ktorá bola nižšia v porovnaní s  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ . Tento rozdiel mohol vzniknúť v dôsledku rozdielneho prostredia buniek cicavcov a bezstavovcov alebo v dôsledku mutácií väzbových miest pre ouabaín [Blanco, Mercer 1998]. Clausen et al. v roku 2015 uskutočnili expresiu izoforiem  $\alpha_4$  z potkana a myších izoforiem  $\alpha_1 - \alpha_3$  vo vajíčkach Pazúrnatky vodnej. Zistili, že všetky tieto izoformy majú porovnaním s izoformou  $\alpha_1$  z potkana (v prítomnosti 100 mM  $\text{Na}^+$ ) vyššiu afinitu k  $\text{Na}^+$ , ouabaínu a relatívne nízku afinitu ku  $\text{K}^+$  [Clausen et al. 2015].

Najväčší rozdiel izoforiem spočíva v rozdielnej afinite k ATP a ouabaínu.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza je vysoko citlivá na inhibíciu kardiotonickými steroidmi, predovšetkým triedou digitalis/ouabaín, ktoré sa využívajú pri liečbe arytmie a zlyhania srdca. Napríklad  $\alpha_1$  izoforma je v prípade potkanej  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy relatívne ouabaín-rezistentná, zatiaľ čo  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$  sú ouabaín-senzitívne. Všetky ľudské izoformy podjednotky  $\alpha$  sú ouabaín-senzitívne [Lingrel 2010].

### **1.3 Vybrané metódy molekulárnej biotechnológie**

Analýza proteínov je komplexný proces pozostávajúci z heterológnej expície proteínov pomocou klonovacieho vektora v baktériách *E. coli*, purifikácie afinitnou chromatografiou a následnou elektroforézou až po stanovenie koncentrácie. Kapitola o vybraných metódach molekulárnej biotechnológie bola spracovaná podľa knihy [Glick et al. 2010].

#### **1.3.1 Klonovacie vektory**

Podstata klonovania spočíva vo vložení fragmentu DNA obsahujúceho vybrané gény do klonovacieho vektora (plazmid, kruhová DNA) a následnom množení takto získaného hybridného plazmidu v baktérii *E. coli*.

Klonovacie vektory sú založené na bakteriálnych plazmidoch (kruhová DNA), ktoré sú zbavené prebytočných sekvencií a obsahujú gény nesúce rezistenciu voči antibiotiku, sekvenciu s replikačným počiatkom, regulačné gény a multiklonovacie miesta. Pre vloženie DNA s vybranými génmi sa vektor najskôr rozštiepi endonukleázou (restrikčný enzým), čím sa vektor stáva lineárnym. Vkladaný fragment DNA a lineárny vektor potom môžu byť spojené pomocou DNA ligázy za vzniku hybridného plazmidu. Takto vznikajú chcené kombinácie vektorov s fragmentmi, nechcené kombinácie (napríklad kombinácie fragmentov DNA medzi sebou alebo kombinácie vektorov) alebo prázdne vektory (uzavretie vektoru do pôvodného stavu).

#### **1.3.2 Heterologická expresia v baktériách *E. coli***

Prvým krokom heterologickej expície je transformácia buniek baktérie *E. coli*. Samotný proces včlenenia rekombinantnej DNA do bunky *E. coli* sa nazýva transformácia. Bunky schopné prijať DNA sa potom nazývajú kompetentné. Vloženie DNA do hostiteľského organizmu vyžaduje narušenie bunkovej steny baktérie. K tomuto účelu slúžia metódy elektroporácie, tepelného šoku, ale aj Gene gun (vstrelenie guľičiek ťažkého kovu obalených plazmidovou DNA).

Po transformácii je potrebné identifikovať tie bunky, ktoré obsahujú rekombinantnú DNA. Na identifikáciu slúžia gény, ktoré nesú rezistenciu voči antibiotiku. Počas transformácie sú bunky inkubované v médiu bez antibiotík, čo vedie k expícii aj tých

génov, ktoré nie sú rezistentné voči antibiotiku. Po inkubácii sú bunky prenesené na selekčné médium, ktoré obsahuje antibiotikum. Bunky, ktoré nesú daný vektor alebo prázdny vektor, môžu rásť v prítomnosti antibiotika.

Niektoré proteíny môžu byť produkované v bunkách baktérie *E. coli* z plazmidov, ktoré sú pod kontrolou špeciálnej sekvencie, tzv. operónu. Najčastejšie sa využíva Lac operón, ktorý pozostáva z promotóra (na promotór sa viaže RNA polymeráza), operátorového génu (na operátorový gén sa viaže regulačný proteín) a štruktúrnych génov (štruktúrne gény obsahujú genetickú informáciu o proteínoch, ktoré vzniknú ich expresiou). Regulačný proteín (tzv. represor) sa viaže na DNA, čím inhibuje transkripciu génov zo sekvencie umiestnenej za týmto väzbovým miestom. Oproti tomu väzba laktózy na represor spôsobí disociáciu represora z DNA. V tomto prípade hovoríme o pozitívnej regulácii transkripcie, tzv. indukcii. Pre aplikácie molekulovej biológie je potrebná možnosť spustiť indukciu pridaním vybranej látky. V prípade Lac operónu sa používa IPTG, ktoré pôsobí rovnako ako laktóza. V bunkách baktérií *E. coli* sa tiež nachádza L-arabinóza operón, kódujúci proteíny, ktoré riadia katabolický cyklus L-arabinózy. Proteín AraC je represor, ktorý inhibuje transkripciu týchto génov. Väzba L-arabinózy na represor spôsobí disociáciu represora z DNA, čím pozitívne reguluje transkripciu [Johnson, Schleif 1995].

### 1.3.3 Purifikácia proteínov

Pred skúmaním štruktúry a funkcie proteínu je potrebné proteín purifikovať z bakteriálneho lyzátu. Pretože proteíny sa líšia veľkosťou, nábojom a rozpustnosťou vo vode, neexistuje jedna univerzálna izolačná metóda. Izolácia špecifického proteínu od ostatných vyžaduje celú škálu metód od rozbitia buniek po separáciu proteínov a analýzu pomocou elektroforézy. Molekuly, akými sú napríklad proteíny, môžu byť separované na základe odlišných chemických a fyzikálnych vlastností. Čím sú rozdiely vlastností väčšie, tým je izolácia jednoduchšia. Dve najpoužívanejšie charakteristiky sú veľkosť (definovaná ako dĺžka aminokyselinového reťazca alebo molekulová hmotnosť) a afinita.

Pred samotnou purifikáciou je potrebné uvoľniť proteíny z buniek baktérie *E. coli*. Na tento účel slúži napríklad sonikácia, pri ktorej vplyvom ultrazvuku dochádza k narušeniu buniek a uvoľneniu ich obsahu.



Prvým krokom purifikácie je najčastejšie centrifugácia. Pri centrifugácii dochádza k separácii častíc na základe ich hmotnosti alebo hustoty. Ťažšie a hustejšie častice sedimentujú rýchlejšie ako ľahšie a redšie. Centrifugácia urýchľuje sedimentáciu silou väčšou ako gravitačná sila. Miera sedimentácie je daná sedimentačným koeficientom.

Najčastejšia je diferenciálna centrifugácia založená na separácii rozpustných proteínov od nerozpustného bunkového materiálu. Nerozpustný materiál ako organely a časti membrány sedimentujú vo forme pelety, pričom rozpustné proteíny sú súčasťou supernatantu. Supernatant môže byť jednoducho odobraný a jednotlivé proteíny môžu byť následne izolované radou purifikačných metód.

Druhá separačná technika je založená na princípe interakcie rozpustených molekúl v rozpúšťadle s pevným podkladom. V tejto technike, nazývanej kvapalinová chromatografia, je vzorka adsorbovaná na matricu v kolóne, kde putuje vplyvom gravitácie alebo hydrostatických síl. Výsledkom sú frakcie obsahujúce proteíny, ktoré sú ďalej analyzované. Pôvod matrice určuje, či separácia proteínov závisí na rozdieloch hmotností, náboja alebo afinity. Rozlišujeme gélovú, ionexovú a afinitnú chromatografiu.

Základom afinitnej chromatografie je schopnosť proteínov špecificky interagovať s inými molekulami. Ligandy, ktoré interagujú s cieľovými proteínmi, sú imobilizované v matrici. Ligandmi môžu byť enzýmové substráty alebo iné malé molekuly. Afinitná kolóna zachytí len tie proteíny, ktoré sa naviažu na imobilizované ligandy a ostatné proteíny prejdú kolónou bez ohľadu na ich hmotnosť alebo náboj. Pokiaľ zachytený proteín interaguje s inou molekulou, celý komplex je zachytený na kolóne. Proteíny zachytené na kolóne sú eluované pomocou skokovej zmeny pH, koncentrácie soli alebo nadmerným pridaním ligandov. Takto dôjde k narušeniu väzby proteín-ligand a odmytiu proteínov z kolóny. Výber vhodného afinitného páru ovplyvňuje schopnosť separácie proteínov, ale príliš silná väzba medzi väzbovým párom môže byť nežiaduca.

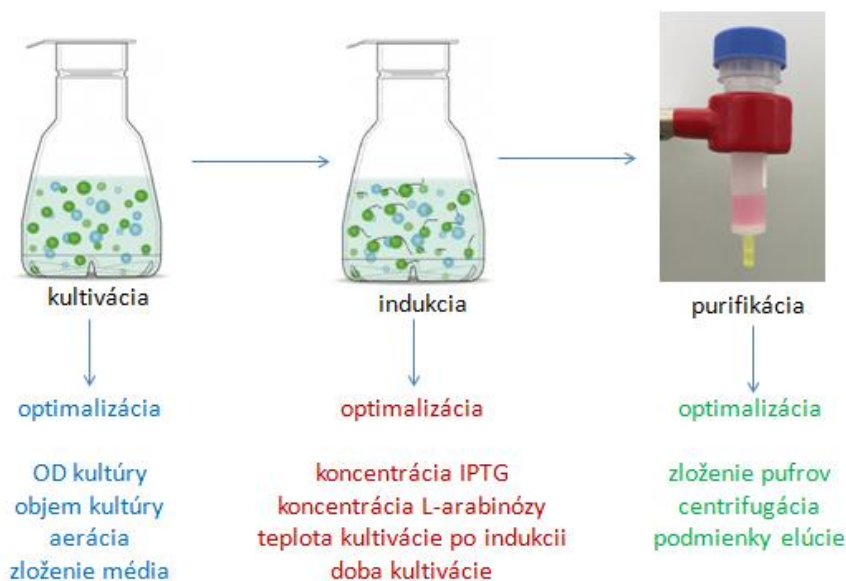
Afinitná chromatografia najčastejšie využíva proteíny obsahujúce histidín [Ferrer-Miralles et al. 2011]. Táto metóda je nenáročná a vykazuje značnú efektívnosť pri purifikácii proteínu. Je možné vložiť krátku sekvenciu DNA kódujúcu minimálne šesť aminokyselín histidínu priamo do klonovacieho vektoru. Táto sekvencia sa označuje ako histidínová kotva (His-Tag). Afinita histidínovej kotvy k iónom  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  alebo  $\text{Zn}^{2+}$  umožňuje rýchlu separáciu proteínu od ostatných bakteriálnych proteínov

[Hengen 1995]. Ióny kovu sú z pravidla imobilizované na kolóne, kde interagujú s bakteriálnym lyzátom a proteíny s histidínovou kotvou môžu byť vyzolované z komplexnej zmesi proteínov.

Posledným krokom je často elektroforéza, ktorá slúži na rýchlu analýzu purifikovaného proteínu. Elektroforéza je separačná metóda, pri ktorej dochádza k oddeleniu molekúl pôsobením elektrického prúdu. Migrácia nabitých molekúl v elektrickom poli je definovaná pomerom náboja a hmotnosti. V prípade dvoch molekúl s rovnakou hmotnosťou, molekula s väčším nábojom bude migrovať k elektróde rýchlejšie.

Separácia proteínov môže byť uskutočnená pomocou elektroforézy za denaturujúcich podmienok v polyakrylamidovom géle. Princípom tejto metódy je rozdiel v migrácii veľkých a malých molekúl, ktoré sú aplikované do gélu. Gély sa nalievajú medzi dve sklá, kde tuhnú postupnou polymeráciou akrylamidových monomérov. Miera migrácie molekúl gélom je ovplyvnená veľkosťou pórov zaostrovacieho gélu a privedeným elektrickým prúdom. Pre zlepšenie separácie proteínovej zmesi, sú proteíny vystavené iónovému detergentu SDS. Tento detergent denaturuje proteíny, čím vytvárajú polypeptidové reťazce s negatívnym nábojom a rovnakým pomerom náboj:hmotnosť. SDS eliminuje efekty spôsobené rozdielnym tvarom, a preto je dĺžka reťazca priamo úmerná hmotnosti a ako jediná rozhoduje o miere migrácie proteínov. Pre rozštiepenie disulfidových mostíkov sa do zmesi proteínov pridáva merkaptoetanol, ktorý tieto mostíky redukuje. Molekulárnu hmotnosť proteínu možno kvalitatívne odhadnúť porovnaním vzdialenosti, ktorú proteín urazí v géle, so vzdialenosťou, ktorú urazia proteíny so známou molekulovou hmotnosťou štandardu.

Pri optimalizácii heterologickej expresie proteínov v baktériách je možné meniť podmienky kultivácie, indukcie a purifikácie. Tieto zmeny sú uvedené na obrázku 10.



**Obrázok 10:** Schéma heterologickej expresie proteínov v baktériách. Vyznačené sú kroky prípravy, ktoré je možné optimalizovať. Obrázok kultivačnej banky bol upravený podľa [Biotrade 2016].

#### 1.3.4 Stanovenie koncentrácie a čistoty proteínov

Metóda Bradfordovej sa používa pri kvantitatívnej analýze proteínu. Stanovenie koncentrácie proteínu je založené na princípe naviazania farbiva Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteín v kyslom pH. Naviazanie farbiva na proteín spôsobí posun absorpčného maxima zo 465 nm na 595 nm a práve nárast absorbancie pri 595 nm je monitorovaný. Farebná zmena je priamo úmerná množstvu proteínu. Stanovenie koncentrácie je rušené interferujúcimi látkami ako sú SDS, Triton X-100, deoxycholan sodný. Medzi prednosti tejto metódy patrí nenáročnosť a rýchlosť. Ako kalibračný proteín sa často používa hovädzí sérový albumín [Bradford 1976 a Peč et al. 2008].

## **2 Materiál a metódy**

### **2.1 Kmeň baktérie *E.coli* a expresné vektory**

Kmeň baktérie *E. coli* označovaný ako BL21 bol získaný od New England Biolabs, USA.

Jednotlivé expresné vektory boli skonštruované pomocou vloženia génov pre C23 alebo C45 slučku do vektoru pET28b. Tento vektor obsahuje rezistenciu na antibiotikum kanamycín, ktoré bolo použité pre selekciu. Postup prípravy expresných vektorov pre jednotlivé izoformy aj slučky bol analogický. Sekvencie výsledných vektorov boli overené pomocou sekvenovania DNA realizované firmou Seqme s.r.o. Následne boli overené vektory použité k expresii jednotlivých slučiek.

#### **Chemikálie pre kultiváciu baktérií**

- LB médium – 10 g/l peptón z kazeínu (Serva), 5 g/l kvasinkový extrakt (Serva), 10 g/l NaCl (Lachner); pH 7,4.
- LA médium – LB médium, 1% agar (Sigma).
- Na prípravu selektívnych médií bol použitý 30 mg/ml kanamycín (Fluka).
- Indukcia bola realizovaná pomocou 100 mg/ml IPTG (Roth) a 1,3 M L-arabinózy (Roth).

### **2.2 Príprava C45 slučky**

#### **Chemikálie a pufre na purifikáciu C45 slučky**

- Kolóny na afinitnú chromatografiu boli pripravené pomocou matrice Talon metal affinity resin (Clontech) tak, že výsledný objem kolónového materiálu bol 2 ml.
- Purifikačný pufer – 10 mM TRIS (Sigma), 10 mM NaCl (Sigma); pH 8,8. Pri optimalizácii purifikácie bola použitá hodnota pH 7,5.
- Inhibítory proteáz – uvedené množstvo bolo pridané do 30 ml purifikačného pufru.
  - 15 mg lysozým (Sigma).
  - 26 mg PMSF (Sigma).
  - 10 µl leupeptin (Sigma) s koncentráciou zásobného roztoku 2 mg/ml.
  - 4 µl pepstatin (Sigma) s koncentráciou zásobného roztoku 5 mg/ml.
  - 10 µl 1 M dithiotreitol (Bio Rad).

15  $\mu$ l 200 mM EDTA (Fluka).

- Dialyzačný pufer – 20 mM TRIS, 140 mM NaCl; pH 7,4.
- Premývací pufer – 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 30 mM imidazol (Roth); pH 7,0.
- Elučný pufer C45 – 500 mM imidazol; pH 8,5.

Pri optimalizácii purifikačného procesu bolo zloženie elučného pufru zmenené na 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 500 mM imidazol; pH 7,4.

### **2.2.1 Postup prípravy C45 slučky**

Vzhľadom ku komplexnosti celého procesu, budeme jednotlivé kroky prípravy C45 slučky deliť do nasledujúcich krokov: príprava selekčných misiek a médií, transformácia *E. coli*, očkovanie a rast, indukcia a purifikácia.

#### **Príprava selekčných misiek a médií**

1. LA a LB médium bolo sterilizované po dobu 20 minút pri teplote 121°C.
2. Po sterilizácii sa zmesi chladili a pri teplote okolo 55°C bolo k LA médiu pridané antibiotikum kanamycín v pomere 1  $\mu$ l antibiotika na 1 ml média.
3. Následne bolo LA médium rozliate do prichystaných misiek, kde tuhlo približne 20 minút.

#### **Transformácia *E. coli***

1. Zmrazené zásobné roztoky baktérií boli citlivo rozmrazené pri teplote okolo 4°C.
2. K 10  $\mu$ l zmrazených buniek bolo pridaných 150 ng plazmidovej DNA.
3. Následne boli baktérie s plazmidmi inkubované 30 minút na ľade.
4. Bol uskutočnený teplotný šok pomocou inkubácie vzoriek po dobu 45 s vo vodnom kúpeli s teplotou 42°C.
5. Vzorky po teplotnom šoku boli 3 minúty chladené na ľade.
6. Následne bolo pridaných 250  $\mu$ l LB média s teplotou 37°C a vzorky boli inkubované za stáleho miešania (180 rpm) pri teplote 37°C po dobu 1 hodiny.
7. Baktérie boli nanosené na misky s príslušným antibiotikom.
8. Misky s baktériami boli kultivované približne 16 hodín pri teplote 37°C.

## **Očkovanie a rast**

1. V sterilnom prostredí bola odobratá pomocou očkovacej slučky jedna kolónia narastených buniek a prenesená do 5 ml LB média, ktoré obsahovalo 5  $\mu$ l kanamycínu.
2. Nasledovala inkubácia za stáleho miešania pri teplote 37°C približne 13 – 16 hodín.
3. Súčasne bol pripravený roztok 200 ml LB média, do ktorého sa pridalo 200  $\mu$ l kanamycínu.
4. Potom sa vopred vypestovaná kultúra prepipetovala do objemu 200 ml a bola inkubovaná pri teplote 37°C za stáleho miešania.
5. Rast buniek bol sledovaný priebežným meraním absorbanie na spektrofotometri (Specord 250 plus, Nemecko) na vlnovej dĺžke 600 nm v 30 minútových intervaloch, až kým nebola dosiahnutá absorbania v rozmedzí 0,6 – 0,8.

## **Indukcia**

1. Expresia proteínu bola indukovaná pridaním IPTG (konečná koncentrácia 10  $\mu$ M) a L-arabínózy (konečná koncentrácia 100  $\mu$ M).
2. Expresia prebiehala pri teplote 17°C po dobu 19 hodín.

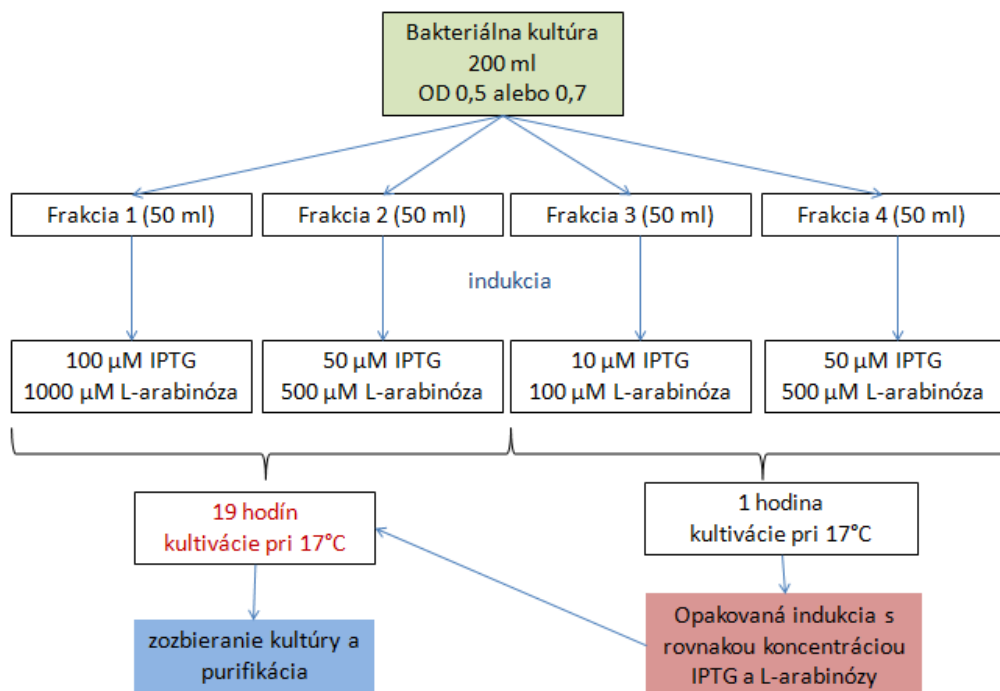
**Poznámka 1:** V prípade opakovanej indukcie alebo v prípade optimalizácie bola koncentrácia IPTG a L-arabínózy zvýšená. Tieto zmeny sú uvedené v postupe optimalizácie expresie C45 slučky.

## **Purifikácia**

1. Po 19 hodinách kultivácie boli indukované kultúry zozbierané pomocou centrifugácie pri teplote 4°C rýchlosťou 7000 g po dobu 10 minút.
2. Supernatant bol odliaty a pelet bol rozpustený v 6 ml purifikačného pufru obsahujúcom inhibítory proteáz.
3. Nasledovalo rozbitie baktérií pomocou sonikácie. Sonikácia prebiehala s periódami 30 s pri výkone 30%. Sonikačný cyklus bol 3x opakovaný.
4. Suspenzia bola nasledovne centrifugovaná pri teplote 4°C rýchlosťou 15 000 g po dobu 1 hodiny.
5. Izolácia C45 slučky od balastných proteínov bola realizovaná afinitnou chromatografiou. Afinitné kolóny boli najskôr premyté 200 ml dialyzačného pufru.
6. Následne bol supernatant z centrifugácie z kroku 4 nanesený na kolónu, kde bol inkubovaný pri teplote 4°C po dobu 1 hodiny.
7. Kolóna bola ďalej premytá 200 ml premývacieho pufru, aby boli odstránené nečistoty.
8. C45 slučka bola získaná premytím kolóny 2 ml elučného pufru, ktorý interagoval s kolónou po dobu 30 minút.
9. Elúcia bola opakovaná celkom trikrát.
10. Eluovaný proteín bol dialyzovaný v dialyzačných črievkách s veľkosťou pórov 12 000 – 14 000 Da.
11. Dialýza prebiehala v 1 l dialyzačného pufru pri teplote 4°C po dobu 18 hodín. Po prvých 30 minútach dialýzy bol dialyzačný pufer vymenený za nový.
12. Čistota exprimovaného proteínu bola overená pomocou SDS-PAGE.
13. Koncentrácia proteínu bola určená metódou Bradfordovej.

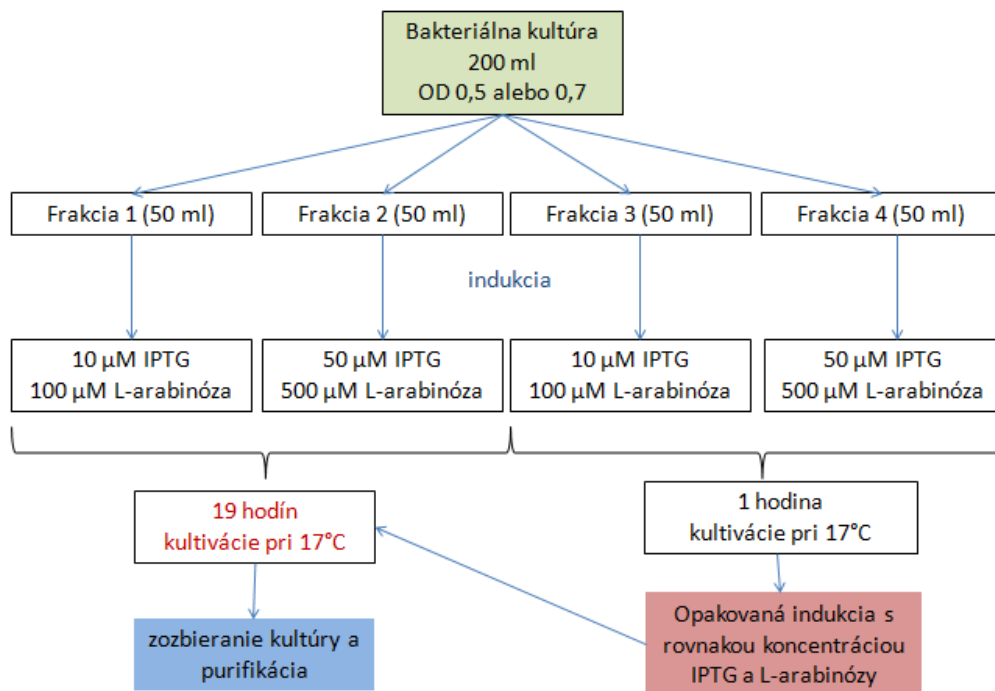
## 2.2.2 Postup optimalizácie exprese C45 slučky

Transformácia, očkovanie a rast prebehli za rovnakých podmienok, ako už bolo uvedené v postupe pre štandardnú expresiu C45 slučky. Pôvodný objem 200 ml kultúry bol rozdelený do frakcií, kde každá frakcia obsahovala 50 ml totožnej kultúry. Expresia proteínu bola indukovaná pridaním IPTG a L-arabinózy s rôznymi koncentraciami, ako popisujú schémy, uvedené na obrázkoch 11 a 12. Indukované kultúry boli inkubované pri teplote 17°C po zhodnú dobu 19 hodín.



**Obrázok 11:** Schéma postupu optimalizácie exprese  $\alpha_2$  C45 slučky. Optimalizácia bola uskutočnená pre dve pôvodné bakteriálne kultúry s objemom 200 ml, pričom tieto kultúry boli indukované pri dosiahnutí OD 0,5 a 0,7. Výsledkom bola sada celkom ôsmich frakcií.





**Obrázok 12:** Schéma postupu optimalizácie expresie  $\alpha_3$  C45 slučky. Optimalizácia bola uskutočnená pre dve pôvodné bakteriálne kultúry s objemom 200 ml, pričom tieto kultúry bol indukované pri dosiahnutí OD 0,5 a 0,7. Výsledkom bola sada celkom ôsmich frakcií.

### Purifikácia

Prvé štyri kroky purifikácie boli rovnaké ako v prípade štandardného postupu purifikácie C45 slučky.

1. Supernatant bol preliaty do 15 ml kónickej skúmavky.
2. Izolácia slučky bola realizovaná afinitnou chromatografiou. Po premytí 200 ml dialyzačného pufru bolo prepipetovaných 250  $\mu$ l kolónového materiálu do 15 ml kónickej skúmavky, kde bol resuspendovaný v supernatante za stáleho miešania pri teplote 4°C po dobu 1 hod.
3. Nasledovala centrifugácia pri teplote 4°C rýchlosťou 5000 g 5 min.
4. Supernatant bol odliaty a pelet bol resuspendovaný v 10 ml premývacieho pufru.
5. Centrifugácia opakovaním kroku 4.
6. Premytie proteínu opakovaním kroku 5.
7. Centrifugácia opakovaním kroku 4.

- Supernatant bol odliaty a pelet bol resuspendovaný v 250  $\mu$ l elučného pufru a inkubovaný pri teplote 4°C 30 min. Výsledkom bola elúcia.
- Čistota exprimovaného proteínu bola overená pomocou SDS PAGE.

## **2.3 Príprava C23 slučky**

### **Chemikálie a pufre na purifikáciu C23 slučky**

- Purifikačný pufer – 50 mM HEPES (Roth), 100 mM NaCl, 25 mM imidazol, 10% glycerol (Lachner); pH 7,5.
- HS (high salt) pufer – 50 mM HEPES, 1000 mM NaCl, 25 mM imidazol, 10% glycerol; pH 7,5.
- Elučný pufer – 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 500 mM imidazol, 10% glycerol; pH 7,5.
- Dialyzačný pufer – 20 mM HEPES, 20 mM NaCl; pH 7,5.

### **2.3.1 Postup prípravy C23 slučky**

Transformácia, očkovanie a rast prebehli za rovnakých podmienok, ako už bolo uvedené v postupe prípravy C45 slučky. Expresia proteínu bola rovnako indukovaná pridaním IPTG a L-arabínózy a kultivácia prebiehala pri teplote 17°C po dobu 19 hodín. V nasledujúcom postupe uvedieme iba kroky prípravy proteínu, v ktorých sa procedúra významne líši od postupu prípravy C45 slučky.

- Kultúra bola zozbieraná pomocou centrifugácie pri teplote 4°C rýchlosťou 4000 g po dobu 15 minút.
- Supernatant bol odliaty a pelet bol rozpustený v 10 ml purifikačného pufru, obsahujúcim inhibítory proteáz.
- Nasledovala sonikácia, ktorá prebiehala s 1 minútovými periódami rozbíjania buniek pri výkone 30%.
- Sonikát bol nasledovne centrifugovaný 25 minút pri teplote 4°C rýchlosťou 15 000 g.
- Izolácia slučky bola rovnako realizovaná afinitnou chromatografiou. Na rozdiel od C45 slučky, v prípade C23 slučky bola použitá kobaltnatá kolóna s objemom adsorbentu 3 ml.

6. Po premytí kolóny 200 ml dialyzačného pufera bol supernatant nanesený na kolónu, kde bol inkubovaný 1 hodinu pri teplote 4°C.
7. Kolóna bola premytá 6 ml purifikačného pufru.
8. Nasledovalo premytie 6 ml HS pufru.
9. Prečistenie proteínu zachyteného na kolóne bolo dokončené zopakovaním premývacieho kroku 7.
10. Proteíny boli získané elúciou pomocou 2 ml elučného pufru, ktorý 30 minút interagoval s kolónovým materiálom.
11. Elúcia bola trikrát zopakovaná.
12. Nasledovala dialýza v dialyzačných črievkách s veľkosťou pórou 7000 Da.
13. Dialýza prebiehala 18 hodín v 1 l dialyzačného pufru pri teplote 4°C. Po prvých 30 minútach dialýzy bol dialyzačný pufer vymenený za nový.

## **2.4 Elektroforéza za denaturujúcich podmienok**

### **Chemikálie na elektroforézu za denaturujúcich podmienok**

- 3x zásobný roztok Akrylamid-Bis - 480 g/l akrylamid (Sigma), 15 g/l Bis-akrylamid (Bio Rad). Parametre sieťovania gélu boli 49,5 % T a 3% C.
- 3x gélový pufer – 3 M TRIS, 0,3% SDS (Bio Rad); pH 8,45.
- 10x spodný pufer – 1 M TRIS; pH 8,9.
- 10x vrchný pufer – 1 M TRIS, 1 M Tricine (Bio Rad), 1% SDS; pH 8,25.
- Zásobný roztok na 10% gél – pre úplnosť uvedieme zloženie 100 ml zásobného roztoku, ktorý bol použitý na prípravu separačného gélu (10% gél). Zloženie bolo nasledujúce:
  - 20 ml 3x zásobný roztok Akrylamid-Bis.
  - 33,3 ml 3x gélový pufer.
  - 10 ml 100% glycerol.
  - 36,7 ml voda.
- Zásobný roztok na 4% gél – analogicky ako pre 10% gél uvedieme zloženie 50 ml zásobného roztoku na prípravu zaostrovacieho gélu (4% gél). Zloženie zásobného roztoku bolo:
  - 4 ml 3x zásobný roztok Akrylamid-Bis.

12,5 ml 3x gélový pufer.

33,5 ml voda.

- Na prevrstvenie separačného gélu bol použitý 100% izobutanol (Roth).
- Polymerizácia bola uskutočnená pridaním roztoku 10 % peroxidisíranu amónneho (APS; Bio Rad) a N,N,N',N'-Tetrametyletyléndiamínu (Temed; BioRad).
- 3% 10x vzorkovací pufer – 70% glycerol, 60,6 mg/ml TRIS, 250 mg/ml SDS a 0,2 mg/ml bromfenolovej modrej (Bio Rad); pH 6,8.

Pre úplnosť uvedieme zloženie roztokov na prípravu separačných a zaostrovacích gélov, ktoré boli použité na analýzu purifikovaných proteínov. Pomocou uvedeného množstva roztokov je možné pripraviť dva zhodné gély. Zloženie bolo nasledujúce:

- Separáčny gél – 10 ml zásobného roztoku na 10% gél, 50  $\mu$ l APS, 5  $\mu$ l Temed.
- Zaostrovací gél – 5 ml zásobného roztoku na 4% gél, 40  $\mu$ l APS, 4  $\mu$ l Temed.
- Na farbenie gélu bol použitý roztok, ktorého zloženie bolo nasledujúce: 45% CH<sub>3</sub>OH, 10% CH<sub>3</sub>COOH, 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio Rad).

#### **2.4.1 Postup elektroforézy za denaturujúcich podmienok**

1. Najskôr sa do prichystaných skiel napipetoval separáčny gél a prevrstvil izobutanolom, aby nevznikli bublinky. Gél polymerizoval 1 hodinu.
2. Po odstránení izobutanolu bol nanosený zaostrovací gél, do ktorého bol vložený hrebienok, a nechal sa 30 minút polymerizovať.
3. Takto nachystaný gél sa vložil do aparatury na elektroforézu.
4. Medzi sklá bol naliaty 1x vrchný pufer a do nádoby 1x spodný pufer.
5. Vzorky, ktoré boli nanosené na gél, obsahovali 17  $\mu$ l proteínu, 1  $\mu$ l merkaptoetanolu a 2  $\mu$ l vzorkovacieho pufru.
6. Pred nanesením boli vzorky denaturované na termobloku pri teplote 70°C po dobu 30 minút.
7. Na gél bolo nanosených 15  $\mu$ l vzorky a 5  $\mu$ l štandardu.
8. Po elektroforéze bol gél zafarbený za stáleho miešania po dobu 30 minút.
9. Nasledovalo odfarbovanie pomocou 10% CH<sub>3</sub>COOH (Lachner).
10. Gély boli analyzované pomocou prístroja gel scanner.

**Poznámka 2:** V prípade  $\alpha_1$  C45 a  $\alpha_3$  C45 bol použitý štandard Sigma Marker Wide Range Mol WT (Sigma) v ostatných prípadoch bol použitý štandard Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo).

## 2.5 Stanovenie koncentrácie metódou Bradfordovej

### Chemikálie na stanovenie koncentrácie metódou Bradfordovej

- Roztok 1 mg/ml hovädzieho sérového albumínu (BSA; Sigma).
- Koncentračná rada BSA bola pripravená pomocou tabuľky 1.
- Bradfordovej farbivo (Sigma).
- Vzorky proteínov boli riedené vodou v pomere 1:14.

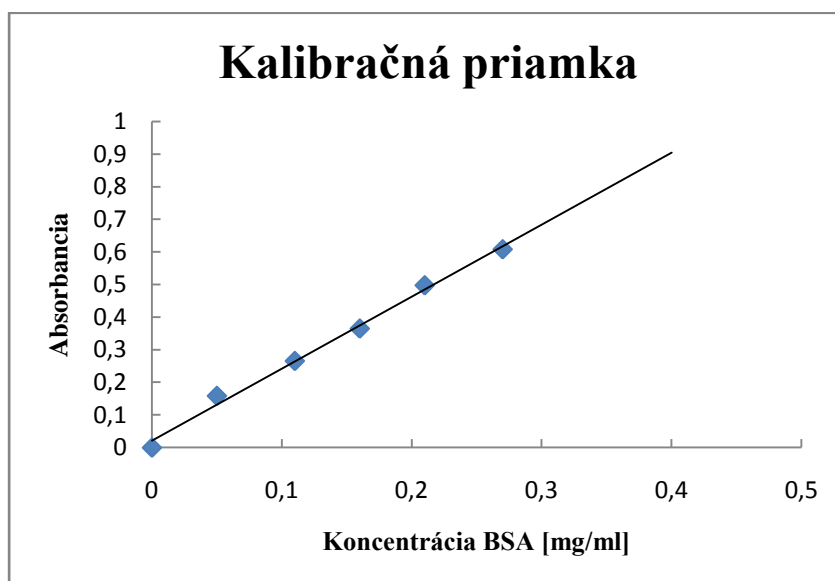
**Tabuľka 1:** Koncentračná rada BSA.

BSA [ $\mu$ l]	Voda [ $\mu$ l]	Výsledná koncentrácia BSA [mg/ml]
0	150	0,00
8	142	0,05
16	134	0,11
24	126	0,16
32	118	0,21
40	110	0,27
48	102	0,32
56	94	0,37
60	90	0,40

### 2.5.1 Postup stanovenia koncentrácie metódou Bradfordovej

1. K 10  $\mu$ l vzorky proteínu bolo pridaných 140  $\mu$ l vody.
2. Ku kalibračným roztokom BSA rovnako k zriedeným vzorkám proteínov bolo pridaných 1350  $\mu$ l Bradfordovej farbiva.
3. Nasledovalo meranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 595 nm, integračnom čase 1 s a veľkosti štrbiny 1 nm. Ako štandard bolo použité Bradfordovej farbivo. Meranie bolo opakované dvakrát a bol určený priemer hodnôt.
4. Potom bola meraná absorbanca vzoriek proteínov. Meranie bolo opakované opäť dvakrát za rovnakých podmienok ako v kroku 2.

5. Z nameraných hodnôt bol zostrojený graf závislosti absorbancie na koncentrácii BSA zobrazený na obrázku 13.



**Obrázok 13:** Kalibračná priamka BSA. Závislosť absorbancie na koncentrácii BSA. Rovnica priamky bola  $y=2,207x+0,021$ . Koeficient stability bol 0,993.

6. Z rovnice priamky bola dopočítaná koncentrácia proteínu nasledovne:

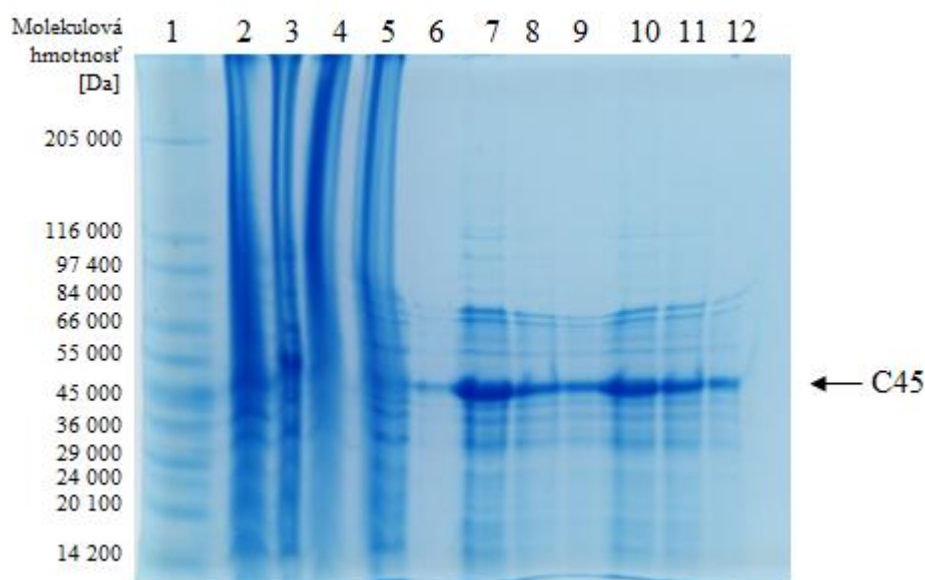
$$c = \frac{y - 0,021}{2,207},$$

kde  $y$  bola absorbanca skúmaného proteínu. Hodnoty koncentrácií boli ďalej prepočítané vzhľadom k riedeniu 15x. Výsledná koncentrácia bola upravená empirickým korekčným koeficientom pre C45 slučku, ktorého hodnota je 3.

### 3 Výsledky a diskusia

Výsledkom heterologickej expresie slučiek C45 a C23 v baktériách *E. coli* boli proteíny, ktoré boli analyzované elektroforézou. Výsledky expresie proteínov budeme prezentovať predovšetkým vo forme elektroforetických gélov (obrázky 14 – 36). Získané výsledky budeme ďalej diskutovať.

Ako prvá bola uskutočnená expresia proteínu  $\alpha_1$  C45 postupom, ktorý v laboratóriu používame rutinne na expresiu myšej C45 slučky. Elektroforetický gél je uvedený na obrázku 14.



**Obrázok 14:** Obrázok gélu pre  $\alpha_1$  izoformu C45 slučky. V hornej časti obrázku sú číselne označené jednotlivé kroky purifikácie proteínu, ktoré odpovedajú: 1 – štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer, 7 – 1. elúcia pred dialýzou, 8 – 2. elúcia pred dialýzou, 9 – 3. elúcia pred dialýzou, 10 – 1. elúcia po dialýze, 11 – 2. elúcia po dialýze, 12 – 3. elúcia po dialýze. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Molekulová hmotnosť proteínu  $\alpha_1$  C45 je približne 48 000 Da, z čoho vyplýva, že jeho poloha na géle bude medzi pásmi štandardu odpovedajúcimi hmotnostiam 45 000 a 55 000 Da. Z intenzity pásov vyplýva, že proteín je nadexprimovaný, rozpustný a eluovaný v dostatočnom množstve (viď supernatant, prvú až tretiu elúciu pred dialýzou

na obrázku 14). Najväčší výtazok proteínu bol získaný v prvej elúcii, ale najvyššiu čistotu vykazoval proteín získaný v tretej elúcii.

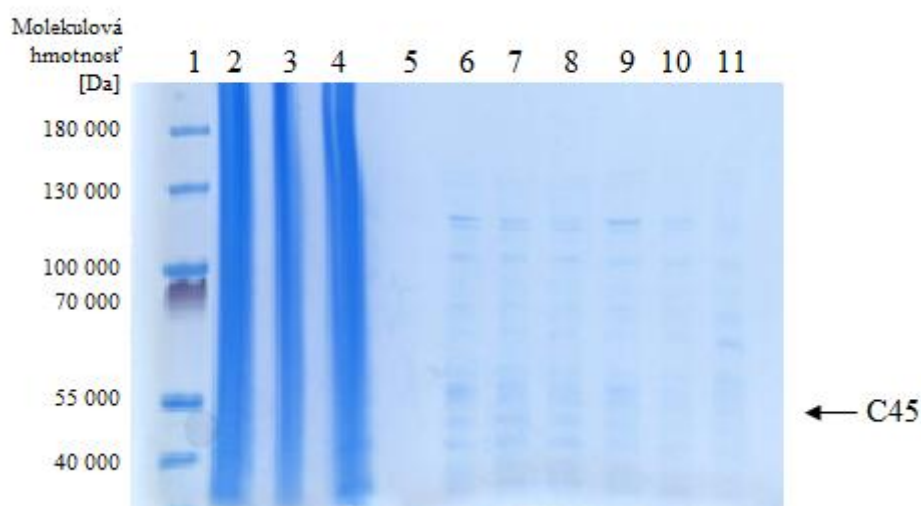
Na géloch sú pozorovateľné aj iné menej intenzívne pásy. Môže ísť o nečistoty z exprese proteínov alebo o protolytické štiepenie produktu. Preto môžu byť výsledné koncentrácie proteínov  $\alpha_1$  C45 v elúciach po dialýze ovplyvnené chybou spojenou s prítomnosťou ostatných proteínov.

Koncentrácia proteínov z prvej až tretej elúcie po dialýze bola určená metódou Bradfordovej. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

**Tabuľka 2:** Tabuľka koncentrácií proteínov  $\alpha_1$  C45. Koncentrácia bola určená pre 1. – 3. elúciu po dialýze.

	Koncentrácia [mg/ml]
1. elúcia	4,50
2. elúcia	2,23
3. elúcia	0,83

Nasledovala expresia proteínu  $\alpha_2$  C45 zhodným postupom ako  $\alpha_1$  C45. Hodnota pH purifikačného pufru bola 7,5. Zloženie elučného pufru bolo 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 500 mM imidazol; pH 7,4. Výsledok elektroforézy je uvedený na obrázku 15.



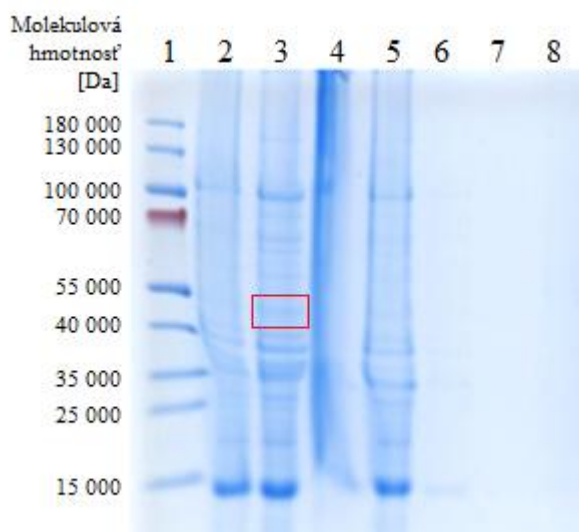
**Obrázok 15:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Číselné poradie vzoriek bolo nasledujúce: 1 – štandard, 2 – supernatant, 3 – pelet, 4 – prechod kolónou, 5 – premývací pufer, 6 – 1. elúcia pred dialýzou, 7 – 2. elúcia pred dialýzou, 8 – 3. elúcia pred dialýzou, 9 – 1.



elúcia po dialýze, 10 – 2. elúcia po dialýze, 11 – 3. elúcia po dialýze. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

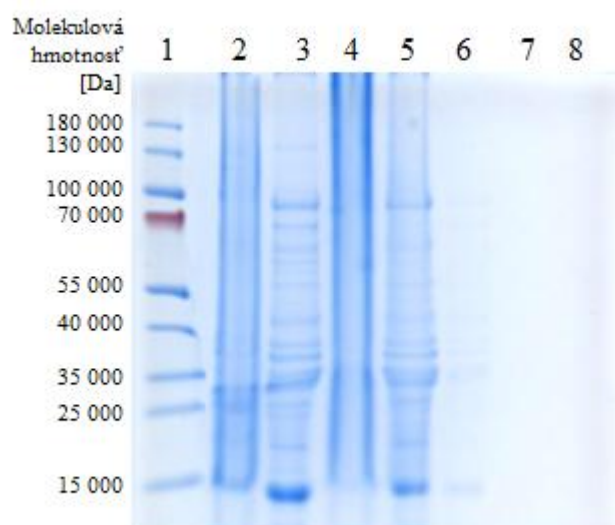
V prípade  $\alpha_2$  C45 jednoznačne nevidíme nadexpresiu proteínu (viď supernatant, prechod kolónou na obrázku 15). V elúciach pred dialýzou nie je proteín v dostatočnom množstve a navyše sú eluované aj iné proteíny. Preto postup expresie a purifikácie proteínu  $\alpha_2$  C45 vyžadoval optimalizáciu.

Optimalizácia spočívala v zmene koncentrácií IPTG, L-arabinózy pri indukcii (viď obrázok 11). Hodnota pH purifikačného pufru bola 7,5. Zloženie elučného pufru bolo 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 500 mM imidazol; pH 7,4. Výsledky optimalizácie uvedieme vo ôsmich obrázkoch, kde každý elektroforetický gél reprezentuje skrátenú purifikáciu za zhodných podmienok (obrázky 16 – 23).



**Obrázok 16:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,5; 50  $\mu$ M IPTG, 500  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Elektroforetický gél neobsahuje intenzívny pás v oblasti okolo 50 000 Da, z čoho je možné usúdiť nízku expresiu proteínu (viď supernatant na obrázku 16). Tieto podmienky expresie nie sú vhodné.



**Obrázok 17:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,5; 50  $\mu$ M IPTG, 500  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

5x vyššia koncentrácia IPTG (oproti štandardnému protokolu), nízka hodnota absorbancie a opakovanie indukcie po 1 hodine neprinieslo významné zlepšenie úrovne expresie proteínu (obrázok 17). Ani tieto podmienky neboli optimálne.



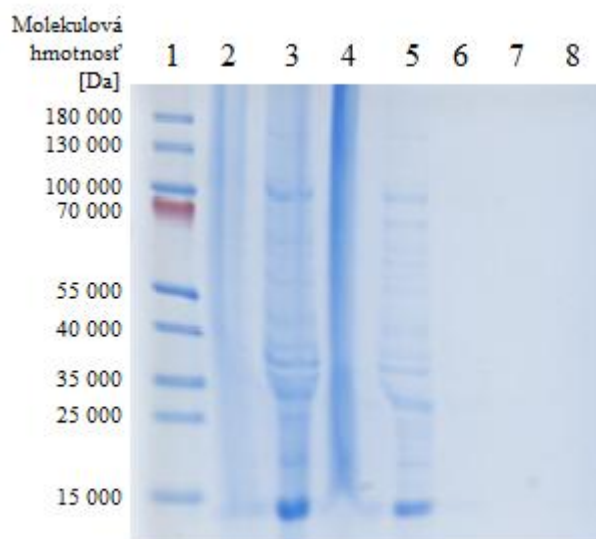
**Obrázok 18:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbanie 0,5; 10  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Pri nižšej koncentrácii IPTG, nízkej absorbanii kultúry a opakovaní indukcie proteínu vidíme na géle pás s vhodnou veľkosťou (vid' supernatant, prechod kolónou na obrázku 18). Bohužiaľ veľká časť tohto proteínu prejde kolónou, prípadne je z kolóny vymytá počas premývacieho kroku. Pravdepodobne ide o nečistotu alebo nedochádza k správnej interakcii s kolónovým materiálom. Navyše v supernatante je vidieť dvojitý pás pre proteín vhodnej veľkosti, čo môže byť dôsledkom protolytického štiepenia.



**Obrázok 19:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,5; 100  $\mu$ M IPTG, 1000  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Vyššia koncentrácia IPTG ako v predchádzajúcom prípade, jediná indukcia vedie k podobným výsledkom ako na obrázku 18.



**Obrázok 20:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,7; 50  $\mu$ M IPTG, 500  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod

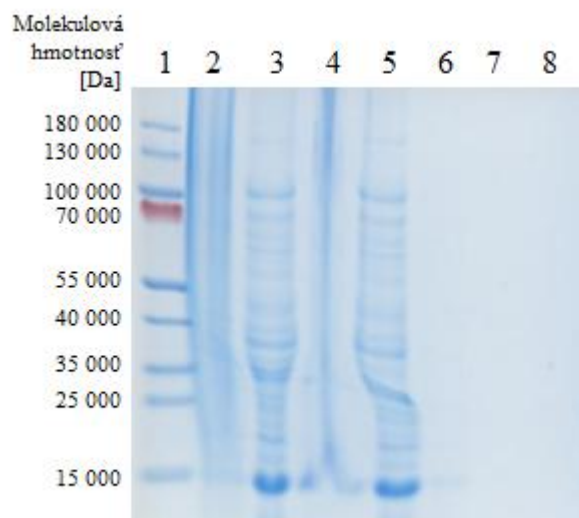
kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Za týchto podmienok (50  $\mu$ M IPTG, 500  $\mu$ M L-arabinóza, hodnote OD 0,7 a jednonásobnej indukcii) nie je proteín exprimovaný v plnej veľkosti (obrázok 20).



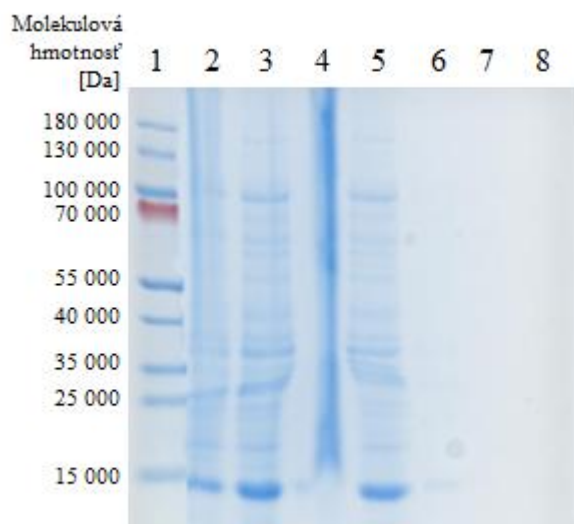
**Obrázok 21:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,7; 50  $\mu$ M IPTG, 500  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Pri rovnakých podmienkach ako v predchádzajúcom prípade, opakovanie indukcie umožnilo nízku expresiu proteínu (viď supernatant na obrázku 21). Bohužiaľ úroveň tejto expresie je nízka, a teda nie je vhodná pre produkciu proteínu s vysokým výťažkom.



**Obrázok 22:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbanie 0,7; 10  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Z prítomnosti pásu okolo 50 000 Da (obrázok 22) vidíme, že proteín je pravdepodobne exprimovaný, ale vzhľadom k jeho neprítomnosti v elúciach, nie je zadržovaný na kolóne.



**Obrázok 23:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbanie 0,7; 100  $\mu$ M IPTG, 1000  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek

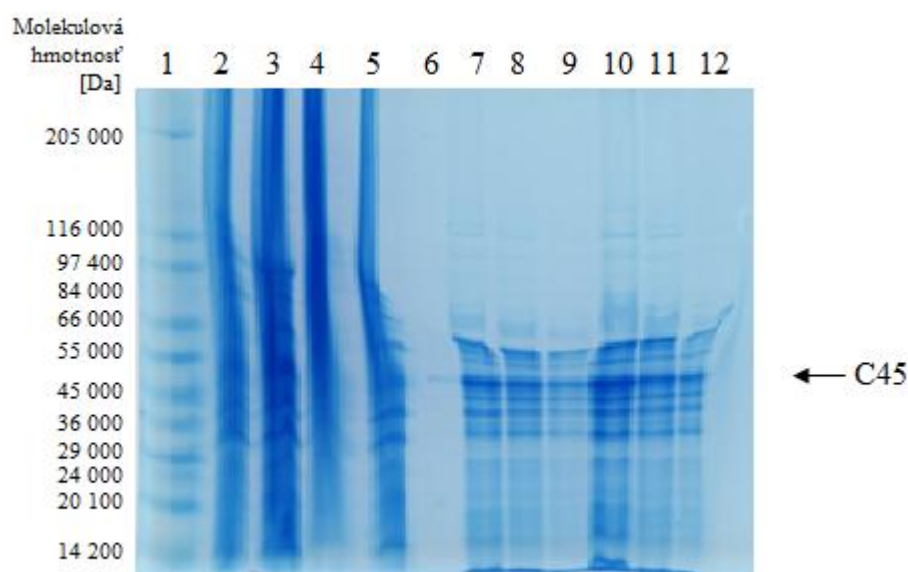
bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Podmienky použité na obrázku 23 neprinesli zlepšenie výsledkov.

Z výsledkov optimalizácie vidíme, že proteín je pravdepodobne exprimovaný hoci v minimálnom množstve (vid' obrázky 16 – 23, predovšetkým supernatant). Avšak v elúcii nie je pás proteínu viditeľný. Je teda možné, že sa proteín nezachytáva na kolóne, alebo je eluovaný vo veľmi nízkej koncentrácii, ktorú nie sme schopný detekovať pomocou elektroforézy. Z výsledkov sme usúdili, že postup expresie proteínu  $\alpha_2$  C45 potrebuje ďalšiu optimalizáciu.

V budúcnosti by bolo vhodné expresiu proteínu overiť pomocou metódy Western blotting. Na základe týchto informácií je možné identifikovať miesta purifikácie, kde dochádza k stratám proteínu a navrhnúť tak optimalizáciu priamo na mieru tomuto proteínu.

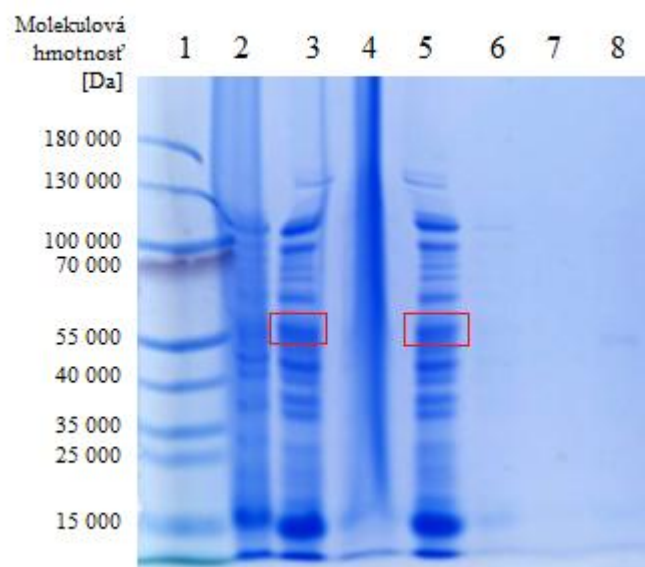
Poslednou C45 slučkou bola exprimovaná  $\alpha_3$  C45. Analogicky k predchádzajúcim izoformám sme najskôr uskutočnili expresiu štandardným postupom. Hodnota pH purifikačného pufra bola 8,8. Výsledok elektroforézy je uvedený na obrázku 24.



**Obrázok 24:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Číselné poradie vzoriek bolo nasledujúce: 1 – štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer, 7 – 1. elúcia pred dialýzou, 8 – 2. elúcia pred dialýzou, 9 – 3. elúcia pred dialýzou, 10 – 1. elúcia po dialýze, 11 – 2. elúcia po dialýze, 12 – 3. elúcia po dialýze. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

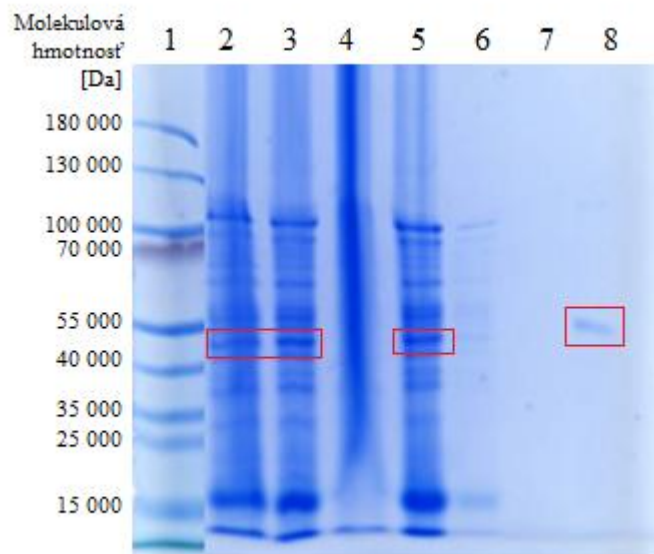
Na géle sú dobre viditeľné pásy odpovedajúce C45 slučke. Proteín je exprimovaný a eluovaný v dostatočnom množstve (viď obrázok 24 supernatant, prechod kolónou, 1. – 3. elúcia pred dialýzou). Avšak v prvej až tretej elúcii je významná prítomnosť iných proteínov, ktorých koncentrácia je približne rovnaká ako koncentrácia  $\alpha_3$  C45. Preto postup expresie proteínu  $\alpha_3$  C45 vyžadoval optimalizáciu, ktorá umožní získať proteín vo vyššej čistote. Táto optimalizácia spočívala v zmene koncentrácií IPTG a L-arabínózy pri indukcii (viď obrázok 12), aby došlo k zníženiu tlaku na expresný systém. Výsledky optimalizácie opäť prezentujeme pomocou obrázkov gélov z elektroforézy, ktoré sú uvedené na obrázkoch 25 – 32.





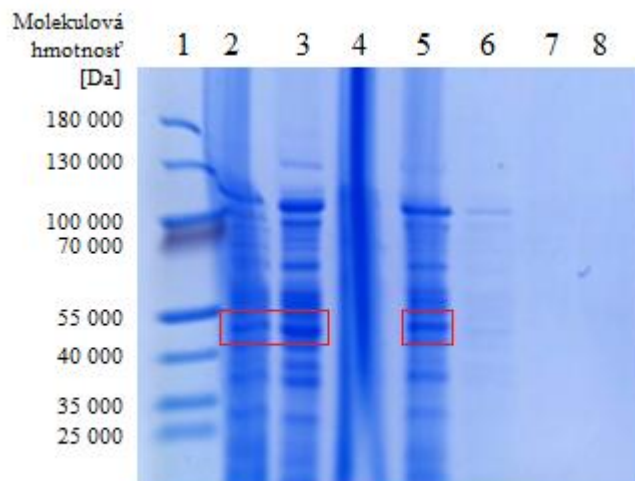
**Obrázok 25:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,5; 5  $\mu$ M IPTG, 50  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Z obrázku 25 je možné vyčítať, že proteín sa exprimuje v dostatočnom množstve (viď supernatant, prechod kolónou na obrázku 25). Z intenzity pásu v elúcii súdime, že proteín je eluovaný, ale jeho výťažok je minimálny.



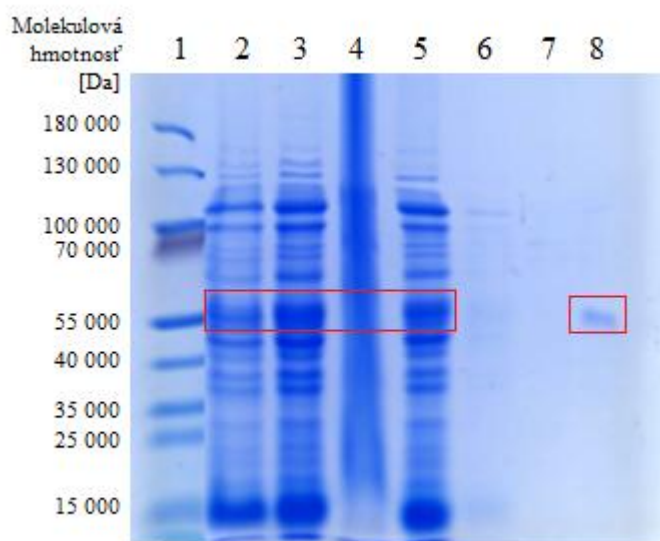
**Obrázok 26:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,5; 5  $\mu$ M IPTG, 50  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Pri rovnakých koncentráciách IPTG a L-arabinózy, ale dvojnásobnej indukcii (obrázok 26) vidíme, že koncentrácia a čistota eluovaného proteínu sa zvýšila. Tieto podmienky sú vyhovujúce pre daný proteín.



**Obrázok 27:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbančie 0,5; 10  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

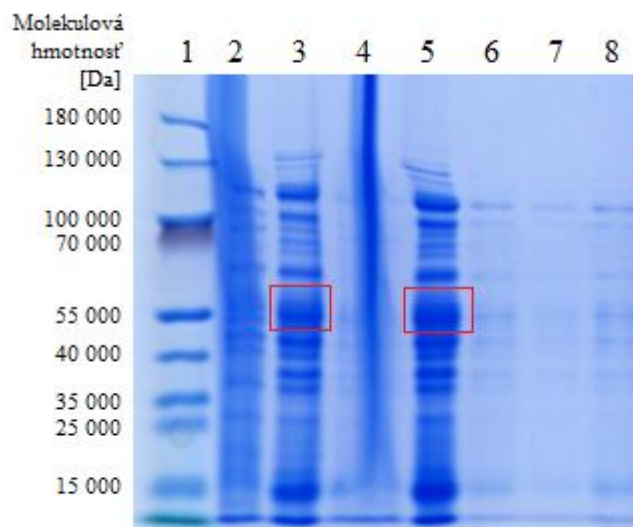
Za podmienok z obrázku 27 je proteín exprimovaný (vid' supernatant, prechod kolónou), avšak výťažok v elúcii nie je markantný. Tieto podmienky nie sú vhodné a ďalej neboli použité pre expresiu proteínu vo veľkom množstve.



**Obrázok 28:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbančie 0,5; 10  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek

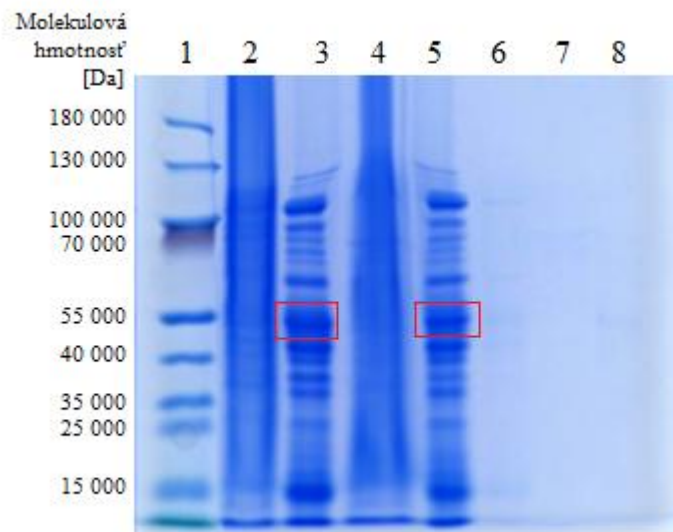
bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Z dvojnásobnej indukcie oproti predchádzajúcemu prípadu vedie k nárastu intenzity pásu v elúcii (obrázok 28). Za týchto podmienok dochádza k elúcii čistého proteínu v pomerne vysokej koncentrácii. Tieto podmienky boli ďalej použité pre expresiu proteínu z 200 ml kultúry.



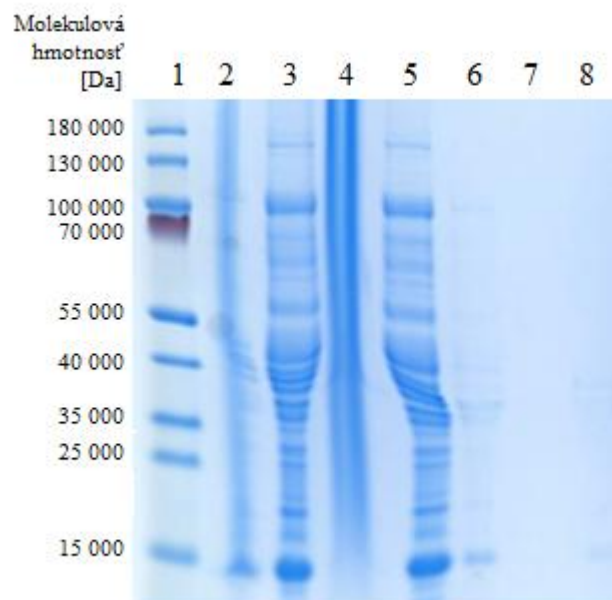
**Obrázok 29:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbancie 0,7; 5  $\mu$ M IPTG, 50  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Na obrázku 29 vidíme, že v elúcii je viditeľná prítomnosť iných proteínov, ktorých koncentrácia sa zhoduje s koncentráciou proteínu  $\alpha_3$  C45. Tieto podmienky vedú k purifikácii proteínu s nízkou čistotou.



**Obrázok 30:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbanie 0,5; 5  $\mu$ M IPTG, 50  $\mu$ M L-arabinóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. Červenou je zvýraznený proteín C45. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

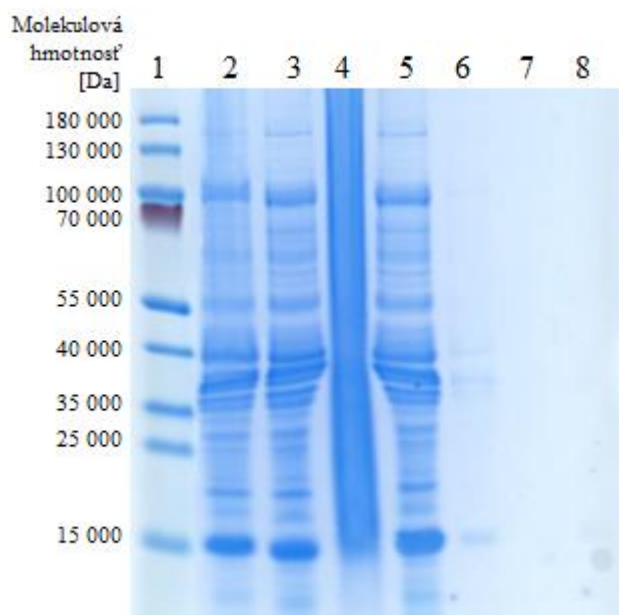
Ani opakovaná indukcia nevedla k optimálnej elúcii proteínu (obrázok 30).



**Obrázok 31:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbanie 0,7; 10  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ M L-arabinóza, 1x indukované. Poradie vzoriek

bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Obrázok 31 ilustruje, že nadexprimovaný proteín a jeho prítomnosť v elúcii je minimálna. Ani tieto podmienky nie sú ideálne.



**Obrázok 32:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Podmienky expresie boli: hodnota absorbie 0,7; 10  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ M L-arabínóza, 2x indukované. Poradie vzoriek bolo: 1 - štandard, 2 – bunky+purifikačný pufer, 3 – supernatant, 4 – pelet, 5 – prechod kolónou, 6 – premývací pufer 10 ml, 7 – premývací pufer 10 ml, 8 – elúcia. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Obrázok 32 zobrazuje výsledky expresie za neideálnych podmienok.

Porovnaním výsledkov optimalizácie sme zistili, že najlepšie výsledky boli získané dvojnásobnou indukciou 10  $\mu$ M IPTG a 100  $\mu$ M L-arabínózou pri OD 0,5 (viď obrázok 28). Následne bola uskutočnená expresia proteínu v objeme kultúry 200 ml za týchto podmienok indukcie. Výsledky prípravy  $\alpha_3$  C45 sú uvedené na obrázku 33. Ďalej sme zmenili hodnotu pH purifikačného pufru na 7,5 a zloženie elučného pufru bolo 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 500 mM imidazol; pH 7,4.

Avšak optimalizácia odhalila aj ďalšie vhodné podmienky indukcie a to hodnota absorbančie 0,5; 5  $\mu$ M IPTG, 50  $\mu$ M L-arabinóza, dvojnásobná indukcia, vid' obrázok 26 . Tieto podmienky neboli pre expresiu proteínu vo veľkom objeme použité.



**Obrázok 33:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C45. Číselné poradie vzoriek bolo nasledujúce: 1 – štandard, 2 – supernatant, 3 – pelet, 4 – prechod kolónou, 5 – premývací pufer, 6 – 1. elúcia pred dialýzou, 7 – 2. elúcia pred dialýzou, 8 – 3. elúcia pred dialýzou, 9 – 1. elúcia po dialýze, 10 – 2. elúcia po dialýze, 11 – 3. elúcia po dialýze. V ľavej časti sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Optimalizácia prípravy  $\alpha_3$  C45 viedla k získaniu veľmi čistého proteínu s nízkou koncentráciou (vid' pásy na géle z obrázku 33 pre 1. – 3. elúciu po dialýze). Koncentrácia proteínov z prvej až tretej elúcie po dialýze bola určená metódou Bradfordovej. Výsledky sú uvedené v tabuľke 3.

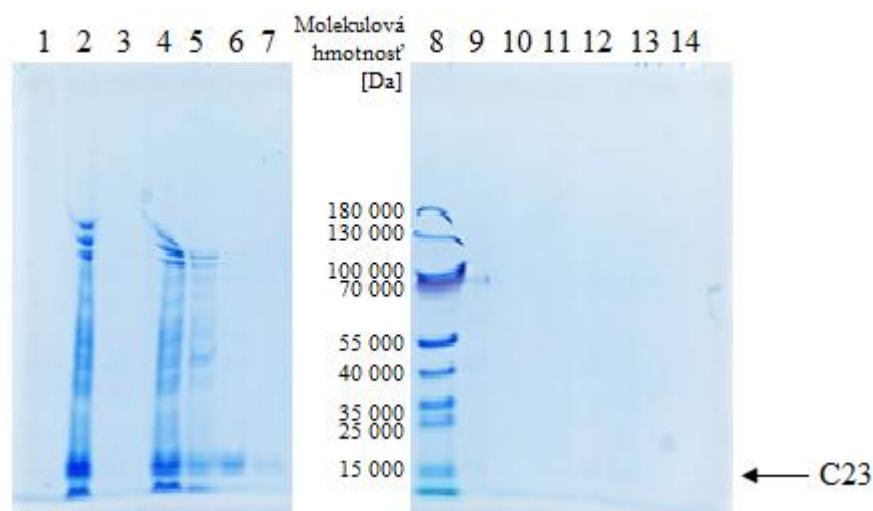
**Tabuľka 3:** Tabuľka koncentrácií proteínov  $\alpha_3$  C45. Koncentrácia bola určená pre 1. – 3. elúciu po dialýze.

	Koncentrácia [mg/ml]
1. elúcia	0,40
2. elúcia	0,35
3. elúcia	0,14

Z hodnôt koncentrácií uvedených v tabuľke 3 vidíme, že najväčšia koncentrácia proteínu je v prvej elúcii po dialýze prepísať. V našom prípade nie je koncentrácia

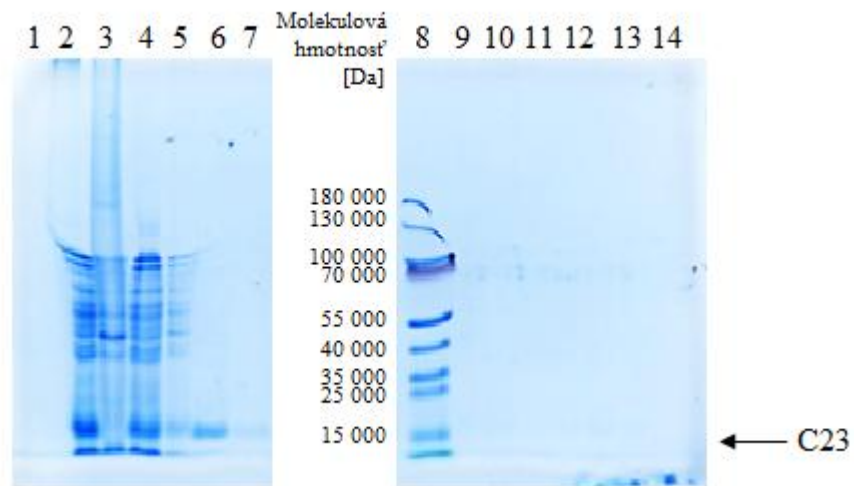
eluovaného proteínu na prekážku, pretože môžeme koncentráciu proteínu zvýšiť použitím centrifugačných filtrov.

Po príprave všetkých slučiek C45 bolo pristúpené k expresii slučiek C23. Vzhľadom k neprítomnosti proteínov v elúciach bude potrebné uskutočniť takisto optimalizáciu. Veľkosť C23 slučky (okolo 13 kDa) je navyše podobná nečistotám, ktoré možno získať ako artefakt z bakteriálneho expresného systému. Na obrázkoch 34 – 36 uvidíme obrázky elektroforetických gélov dokumentujúcich purifikáciu jednotlivých C23 slučiek.

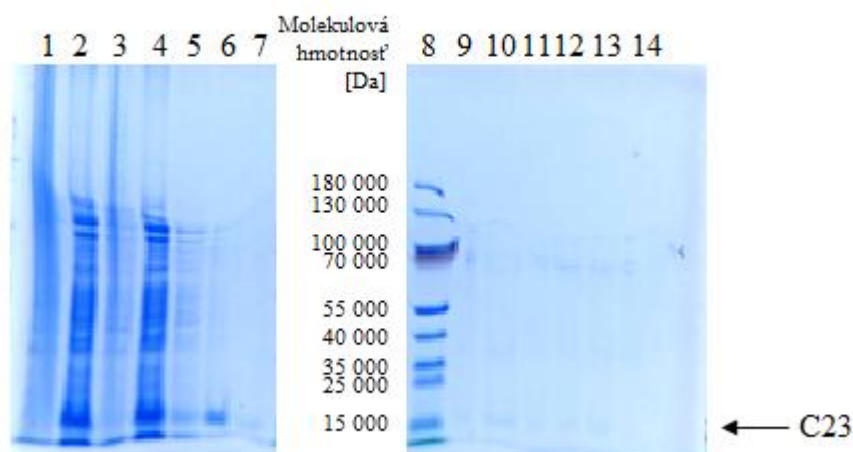


**Obrázok 34:** Obrázok gélu pre  $\alpha_1$  C23. Číselné poradie vzoriek bolo nasledujúce: 1 – bunky+purifikačný pufer, 2 – supernatant, 3 – pelet, 4 – prechod kolónou, 5 – purifikačný pufer, 6 – HS pufer, 7 – purifikačný pufer, 8 – štandard, 9 – 1. elúcia pred dialýzou, 10 – 2. elúcia pred dialýzou, 11 – 3. elúcia pred dialýzou, 12 – 1. elúcia po dialýze, 13 – 2. elúcia po dialýze, 14 – 3. elúcia po dialýze. V strede sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.





**Obrázok 35:** Obrázok gélu pre  $\alpha_2$  C23. Číselné poradie vzoriek bolo nasledujúce: 1 – bunky+purifikačný pufer, 2 – supernatant, 3 – pelet, 4 – prechod kolónou, 5 – purifikačný pufer, 6 – HS pufer, 7 – purifikačný pufer, 8 – štandard, 9 – 1. elúcia pred dialýzou, 10 – 2. elúcia pred dialýzou, 11 – 3. elúcia pred dialýzou, 12 – 1. elúcia po dialýze, 13 – 2. elúcia po dialýze, 14 – 3. elúcia po dialýze. V strede sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.



**Obrázok 36:** Obrázok gélu pre  $\alpha_3$  C23. Číselné poradie vzoriek bolo nasledujúce: 1 – bunky+purifikačný pufer, 2 – supernatant, 3 – pelet, 4 – prechod kolónou, 5 – purifikačný pufer, 6 – HS pufer, 7 – purifikačný pufer, 8 – štandard, 9 – 1. elúcia pred dialýzou, 10 – 2. elúcia pred dialýzou, 11 – 3. elúcia pred dialýzou, 12 – 1. elúcia po dialýze, 13 – 2. elúcia po dialýze, 14 – 3. elúcia po dialýze. V strede sú uvedené molekulové hmotnosti štandardu.

Expresia C23 slučky bude vyžadovať rozsiahlu optimalizáciu. Najskôr bude nutné jednoznačne preukázať expresiu správneho proteínu (Western blotting). Následne budú optimalizované podmienky interakcie s kolónovým materiálom (zloženie purifikačného pufru) a podmienky elúcie proteínu z kolóny (zloženie elučného pufru).

## 4 Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bola optimalizácia expresie C23 a C45 slučiek jednotlivých ľudských izoforiem Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy v *E. coli*.

Najskôr boli uskutočnené expresie proteínov  $\alpha_1$  C45,  $\alpha_2$  C45 a  $\alpha_3$  C45 vo veľkom objeme. V prípade proteínu  $\alpha_1$  C45 bol najväčší výtťažok získaný v prvej elúcii s koncentráciou 4,50 mg/ml. Avšak najvyššiu čistotu vykazoval proteín získaný v tretej elúcii s koncentráciou 0,83 mg/ml.

V prípade  $\alpha_2$  C45 bolo potrebné optimalizovať protokol expresie zmenou indukčných podmienok a použitím elučného pufru s vyšším obsahom solí. Výsledky optimalizácie preukázali, že proteín sa pravdepodobne exprimuje, avšak sa neeluuje alebo eluuje, ale v malom množstve. Z toho sme usúdili, že protokol expresie proteínu  $\alpha_2$  C45 je nutné ďalej optimalizovať.

V dôsledku nečistôt prítomných v elúciach proteínu  $\alpha_3$  C45 bola uskutočnená optimalizácia postupu expresie zmenou podmienok indukcie. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté dvojnásobnou indukciou 10  $\mu$ M IPTG a 100  $\mu$ M L-arabinózou pri OD 0,5. Pri týchto podmienkach bola uskutočnená expresia vo veľkom objeme, ktorej výsledkom bol veľmi čistý proteín s nízkou koncentráciou. Najväčší výtťažok bol získaný z prvej elúcie s koncentráciou 0,40 mg/ml a najmenší výtťažok z tretej elúcie s koncentráciou 0,14 mg/ml.

Následne bola uskutočnená expresia proteínov  $\alpha_1$  C23,  $\alpha_2$  C23 a  $\alpha_3$  C23. Výsledky bohužiaľ naznačujú, že táto expresia bude vyžadovať rozsiahlu optimalizáciu.

## Zoznam literatúry

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. a WALTER, P. (2008): *Molecular biology of the cell*. Fourth edition. Garland Science, New York, USA. ISBN 978-0-8153-4106-2.

BIOTRADE, s.r.o. (2016): *Ultra Yield baňky*. [dostupné online]: <http://www.biotrade.cz/trepacky-1k/prislusenstvi-ke-trepackam-27k/ultra-yield-banky-104p>, stiahnuté dňa 9. 5. 2016.

BLANCO, G. a MERCER, R. W. (1998): *Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function*. The American Journal of Physiology **275**, 633 – 650.

BRADFORD, M. M. (1946): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry **72**, 248 – 254.

CLAUSEN, M. V., NISSEN, P. and POULSEN, H. (2015): *The  $\alpha 4$  isoform of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is tuned for changing extracellular environments*. The FEBS Journal **283**, 282 – 293.

FERRER-MIRALLES, N., CORCHERO, J. L., KUMAR P., CEDANO, J. A., GUPTA, K. C., VILLAVARDE, A. a VAZQUEZ, E. (2011): *Biological activities of histidine-rich peptides; merging biotechnology and nanomedicine*. Microbial Cell Factories **10**, 101.

GADSBY, D. C., BEZANILLA, F., RAKOWSKI, R. F., DE WEER, P. a HOLMGREN, M. (2012): *The dynamic relationships between the three events that release individual  $\text{Na}^+$  ions from the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase*. Nature Communications **3**, 669.

GEERING, K. (2006): *FXFD proteins: new regulators of Na-K-ATPase*. The American Journal of Physiology. Renal Physiology **290**, 241 – 250.

GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. a PATTERN, C. L. (2010): *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. Fourth edition. ASM Press, Washington, USA. ISBN 978-1555814984.

HENGEN, P. N. (1995): *Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences **20**, 285 – 286.

JANOVSKÁ M., KUBALA M., ŠIMÁNEK, V. a ULRICHOVÁ, J. (2010): *Interaction of sanguinarine and its dihydroderivative with the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Complex view on the old problem*. Toxicology Letters **196**, 56 – 59.

JEWELL, E. A. a LINGREL, J. B. (1991): *Comparison of the Substrate Dependence Properties of the Rat Na,K-ATPase  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 a  $\alpha$ 3 Isoforms Expressed in HeLa Cells*. The Journal of Biological Chemistry **266**, 16925 – 16930.

JOHNSON, C. M. a SCHLEIF, R. F. (1995): *In Vivo Kinetics of the Arabinose Promoters in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **177**, 3438 – 3442.

KAPLAN, J. H. (2002): *Biochemistry of Na,K-ATPase*. Annual Review of Biochemistry **71**, 511 – 535.

KUBALA, M., ČECHOVÁ, P., GELETIČOVÁ, J., BILER, M., ŠTENCLOVÁ, T., TROUILLAS, P. A BIEDERMANN, D. (2016): *Flavonolignans As a Novel Class of Sodium Pump Inhibitors*. Frontiers in Nephrology **7**, 1156.

KUBALA, M., GELETIČOVÁ, J., HULIČIAK, M., ZATLOUKALOVÁ, M., VACEK, J. a SEBELA, M. (2014): *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition by cisplatin and consequences for cisplatin nephrotoxicity*. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky **158**, 194 – 200.

KÜHLBRANDT, W. (2004): *Biology, structure and mechanism of P-type ATPases*. Nature Reviews Molecular Cell Biology **5**, 282 – 295.

LINGREL, J. B. (2010): *The Physiological Significance of the Cardiotonic Steroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase*. Annual Review of Physiology **72**, 395 – 412.

LINGREL, J. B., WILLIAMS, M. T., VORHEES, C. V. a MOSELEY, A. E. (2007): *Na,K-ATPase and the role of  $\alpha$  isoforms in behaviour*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes **39**, 385 – 389.

MARTIN, D. W. (2005): *Structure-Function Relationships in the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pump*. Seminars in Nephrology **25**, 282 – 291.

MORTH, J. P., PEDERSEN, B. P., TOUSTRUP-JENSEN, M. S., SØRENSEN, T. L., PETERSEN, J., ANDERSEN J. P., VILSEN B. a NISSEN P. (2007): *Crystal structure of the sodium-potassium pump*. Nature **450**, 1043 – 1049.

MORTH, J. P., POULSEN, H., TOUSTRUP-JENSEN MADS S., SCHACK, V. R., EGEBJERG J., ANDERSEN J. P., VILSEN, B. a NISSEN, P. (2009): *The structure of the  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences **364**, 217 – 227.

PEČ, P. et al. (2008): *Laboratorní cvičení z biochemie*. Nakladatelství univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika. ISBN 978-8024409122.

Schrödinger, L. (2010): *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.6.0.

THERIEN, A. G., NESTOR, N. B., BALL§ W. J. a BLOSTEIN R. (1996): *Tissue-specific Versus Isoform-specific Differences in Cation Activation Kinetics of the Na,K-ATPase*. The Journal of Biological Chemistry **271**, 7104 – 7112.