



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PRODUKCE A PURIFIKACE IZOFOREM PROTEINU
P53 V BAKTERIÁLNÍM EXPRESNÍM SYSTÉMU**

P53 PROTEIN ISOFORMS PRODUCTION AND PURIFICATION IN THE BACTERIAL
EXPRESSION SYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Natália Vadovičová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1218/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Natália Vadovičová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Produkce a purifikace izoform proteinu p53 v bakteriálním expresním systému

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, klonování izoform proteinu p53, afinitní izolace proteinů p53.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Natália Vadovičová
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Protein p53 α není jediným proteinem, který je kódován tumor-supresorovým genem *TP53*. Alternativním sestřihem, alternativním použitím promotoru a alternativními počátky translace může dojít k expresi až jedenáct dalších izoform. Tyto izoformy byly ve zvýšeném množství pozorovány v nádorových tkáních. Jelikož jsou izoformy proteinu p53 sekvenčně, a tedy i strukturně odlišné oproti proteinu p53 α , mění se tím i jejich vazebné vlastnosti a funkce v buňce. Isoformy modulují funkci samotného proteinu p53 α , některé podporují jeho tumor-supresorovou funkci, jiné ji naopak potlačují. Objasnění mechanismu působení izoform na děje v buňce by mohlo být využito k cílenému alternativnímu sestřihu vhodných izoform a v léčbě rakoviny pomocí terapie založené na proteinu p53.

Teoretická část diplomové práce shrnuje základní poznatky o proteinu p53 a o jeho izoformách, doplněné o výsledky výzkumů z posledních let týkajících se těchto izoform. Dále je probrána použitá metoda, Gateway klonování. Cílem experimentální části práce byla produkce izoform v bakteriálním expresním systému. Produkci předcházela příprava DNA sekvencí těchto dvanácti izoform pomocí PCR a Gateway klonování. Klonováním bylo připraveno celkem dvanáct entry klonů obsahujících sekvence všech izoform a také osm expresních klonů. Zároveň byly izolací získány a pomocí SDS-PAGE a Westernového přenosu ověřeny čtyři izoformy proteinu p53, a to p53 β , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β a Δ 40p53 γ . U izoform budou v rámci navazujícího výzkumu testovány jejich DNA vazebné vlastnosti.

ABSTRACT

Apart from the p53 α protein, the TP53 tumor-suppressor gene is expressed as another eleven protein isoforms with the use of alternative splicing, alternative promoters and alternative translational initiation sites. Abnormal expression of these isoforms has been observed in tumor tissues. The binding properties as well as the biological functions are also modulated, due to sequential and therefore structural differences from the p53 α protein. p53 α is regulated by these isoforms in both suppressive and supportive manner. Explanation of the p53 isoform regulation mechanism in cells could lead to desired alternative splicing of the chosen isoforms, and modulation of isoform expression could be used in cancer treatment based on p53 therapy.

Basic information about p53 protein is summarised in the theoretical part of this master thesis, supplemented with recent advances in the field of p53 isoforms, as well as the Gateway cloning method. The main goal of the experimental part was p53 isoform production in a bacterial expression system. Prior to the protein production, DNA sequences coding twelve p53 isoforms were prepared using PCR and Gateway cloning. In total, twelve entry clones and eight expression clones were prepared by cloning the isoforms' sequences. After the protein production and purification, the detection using SDS-PAGE and Western Blotting was performed with five p53 protein isoforms: p53 β , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β and Δ 40p53 γ . DNA binding properties of p53 protein isoforms will be tested in subsequent research.

KLÍČOVÁ SLOVA

protein p53, izoformy, rakovina, gateway klonování

KEYWORDS

p53 protein, isoforms, cancer, gateway cloning system

VADOVIČOVÁ, N. *Produkce a purifikace izoforem proteinu p53 v bakteriálním expresním systému*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 64 s. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce, doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. a také Mgr. Janu Coufalovi, Ph.D., za jejich podnětné rady, trpělivost, odbornou asistenci a také za obohacující zkušenost a možnost nahlédnout do velmi zajímavé problematiky. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Petru Müllerovi, Ph.D., z RECAMO, MOÚ za úvod do Gateway klonování a za rady vztahující se k dané tématice. V neposlední řadě děkuji za příjemné pracovní prostředí kolektivu oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR, kde byla tato práce zpracovávána.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Protein p53	8
2.1.1	Historie výzkumu proteinu p53	8
2.1.2	Gen TP53	8
2.1.3	Struktura proteinu p53	8
2.1.4	Funkce proteinu p53	10
2.1.5	Regulace	12
2.1.6	Interakce proteinu p53 s DNA /Vazebné vlastnosti p53 na DNA	13
2.2	Izoformy proteinu p53	14
2.2.1	Stavba genu TP53 a exprese izoforem proteinu p53	14
2.2.2	Izoformy TAp53	15
2.2.3	Izoformy $\Delta 40p53$	16
2.2.4	Izoformy $\Delta 133p53$	16
2.2.5	Izoformy $\Delta 160p53$	16
2.2.6	Izoformy proteinu p53 a nádorová onemocnění	17
2.3	Gateway klonování	19
2.3.1	Rekombinace bakteriofága λ	19
2.3.2	Proces Gateway klonování	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Cíl práce	24
3.2	Seznam použitých materiálů	25
3.2.1	Enzymy	25
3.2.2	Primery	25
3.2.3	Kompetentní buňky	26
3.2.4	Plazmidy	26
3.2.5	Ostatní materiál	26
3.2.6	Chemikálie	26
3.2.7	Seznam použitých přístrojů, aparatur a pomůcek	27
3.3	Příprava roztoků, pufrů, medií	28
3.4	Metody	30
3.4.1	Příprava inzertů pro Gateway klonování pomocí PCR	30
3.4.2	Gateway klonování	33

3.4.3	Příprava kompetentních buněk.....	35
3.4.4	Transformace.....	35
3.4.5	Izolace plazmidové DNA.....	36
3.4.6	Produkce a izolace proteinů.....	37
3.4.7	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	38
3.4.8	Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE.....	38
3.4.9	Imunodetekce proteinů Westernovým přenosem.....	39
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
4.1	Příprava inzertů pro Gateway klonování pomocí PCR.....	41
4.2	Gateway klonování.....	43
4.2.1	Entry klony.....	43
4.2.2	Expresní klony.....	44
4.2.3	Znázornění Gateway procesu na agarózové gelové elektroforéze.....	45
4.3	Izolace proteinů a stanovení jejich celkové koncentrace dle Bradfordové	48
4.4	Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE a imunodetekce Westernovým přenosem....	49
4.4.1	Detekce jednotlivých izoform proteinu p53.....	49
5	ZÁVĚR.....	55
6	BIBLIOGRAFIE.....	56
7	SEZNAM ZKRATEK.....	63

1 ÚVOD

Studium genu *TP53*, který je od svého objevu v r. 1979 jedním z nejvíce diskutovaných a nejprostudovanějších genů lidského těla, přináší i po desetiletích výzkumu nové poznatky. Protein p53, který je tímto genem kódován, je právem nazýván „strážcem genomu“ díky své tumor-supresorové aktivitě a je jednou z nejdůležitějších molekul v našem těle. Společně s proteiny p63 a p73 tvoří rodinu proteinů p53, kde všechny proteiny hrají důležitou úlohu v nádorových tkáních [1, 2].

Množství dějů, kterých se protein p53 účastní a které reguluje, je velmi rozsáhlé. Jako transkripční faktor se váže na více než 300 promotorových sekvencí v lidském genomu. Účastní se regulace buněčné proliferace, reparace DNA, zástavy buněčného cyklu či indukce apoptózy [2, 3]. Už samotný počet procesů, kterých se protein p53 účastní, napovídalo, že regulace nemůže být zajištěna pouze jedním proteinem. V roce 1984 byly objeveny izoformy proteinu p53, kterých je společně s proteinem p53 (p53wt, p53 α) celkem dvanáct. Tyto izoformy vznikají kombinací alternativního využití promotoru, alternativního sestřihu a alternativních počátků translace, a mohou postrádat některé z domén proteinu p53, jako například doménu transaktivační, což významně ovlivňuje vlastnosti dané izoformy. Mechanismus působení izoform proteinu p53 v buňce nebyl ze začátku znám, později však, po prokázání důležitosti dříve objevených izoform proteinu p63 a p73, byla významně zkoumána i role izoform p53 v nádorech [4].

Během posledních deseti let bylo v souvislosti s izoformami proteinu p53 provedeno množství experimentů na zvířecích modelech i s lidskými buněčnými liniemi. Výsledky ukazují, že rovnováha exprese mezi různými izoformami proteinu p53 moduluje a v některých případech přímo rozhoduje o buněčné odpovědi na stresové signály, a že se izoformy přímo účastní zástavy buněčného cyklu, apoptózy aj. Navíc se prokázalo, že izoformy jsou biochemicky aktivní nejen v kombinaci a interakci ať už s p53 α či s jinou izoformou, ale také individuálně [5].

Z uvedeného vyplývá, že exprese izoform proteinu p53 může podpořit, nebo naopak inhibovat tumor-supresorovou funkci proteinu p53 α , a to i v závislosti na dalších faktorech, jako je například mutace genu *TP53*. Nejvýznamněji prostudovány jsou aktuálně izoformy p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α a Δ 133p53 α . Jelikož byla prokázána zvýšená exprese izoform proteinu p53 právě nádorových tkáních, je obzvlášť důležité věnovat pozornost objasnění jejich funkcí a mechanismů, kterými regulují transkripční aktivitu proteinu p53, což by vedlo k využití v terapii rakoviny založené na proteinu p53 [6, 7].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Protein p53

Jaderný protein p53, právem přezdívaný jako „strážce genomu“, je transkripční faktor zodpovědný za správnou buněčnou odpověď na stresové podmínky a správný průběh buněčného dělení. Mezi jeho nejdůležitější funkce patří schopnost zástavy buněčného cyklu, navození reparace DNA či spuštění apoptózy v případě neúspěšné reparace. Lokalizace proteinu p53 je v jádře buněk po celém těle, kde se přímo váže na DNA a aktivuje transkripci cílových genů. Hladina proteinu p53 ve zdravých buňkách je nízká a je zde zastoupen v neaktivní formě, naopak v buňkách vystavených stresu byla pozorována rostoucí hladina a aktivní tetramerní forma proteinu. Důležitými proteiny jsou také protein p63 a p73, objevené skoro o 20 let později, které společně s proteinem p53 tvoří rodinu proteinů p53. Tyto proteiny svou strukturou i funkcí vykazují vysokou homologii a hrají také důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a při vzniku nádorů [2, 8].

2.1.1 Historie výzkumu proteinu p53

Cesta k objevení proteinu p53 vedla od výzkumu onkovirů v sedmdesátých letech 20. století. V roce 1979, při výzkumu opičího viru SV40, bylo zjištěno, že u myších buněk transformovaných tímto virem dochází k produkci několika proteinů. Mezi nimi byl i p53, který tvořil komplex s velkým T antigenem viru SV40. Dále bylo zjištěno, že je tento protein produkován i v netransformovaných embryonálních nádorových buňkách [9, 10]. Společně s dalšími objevy, jako například že protein p53 za přítomnosti Ras onkogenu podporuje neoplastickou transformaci buněk, nebo další výzkumy, které potvrzovaly přítomnost p53 v nádorových buňkách a jeho úlohu v nádorové transformaci, byla postupně přijata informace, že se jedná o další onkoprotein [11-13]. V dalším výzkumu v roce 1988 byla použita myší cDNA, a bylo objeveno, že protein p53 nepodporuje nádorovou transformaci v přítomnosti Ras onkogenu, jak bylo zjištěno dříve. Dalšími výzkumy bylo prokázáno, že většina cDNA klonů používaných v dosavadních výzkumech byla v mutované formě, a pokusy s p53wt vedly k přisouzení skutečné funkce proteinu p53, a to nádorového supresoru [14].

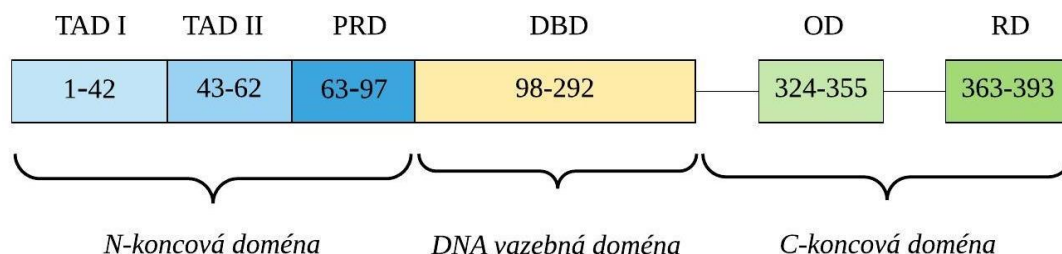
2.1.2 Gen *TP53*

Tumor-supresorový gen *TP53* kódující protein p53 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17, přesněji jde o lokus 17p13.1, a jeho velikost je cca 20 kb. Gen obsahuje 10 intronů a 11 exonů, z nichž první se neexprimuje. Dohromady má 131 kodonů kódujících 393 AMK. Podobně, jako u ostatních genů rodiny p53 dochází kvůli alternativnímu sestřihu a alternativním promotorům k produkci více variant mRNA a k expresi izoform s pozměněným C-koncem a N-koncem proteinu p53. O izoformách je podrobněji pojednáno v kapitole 2.2. [15, 16].

2.1.3 Struktura proteinu p53

393 AMK monomeru proteinu p53 rozdělujeme na několik funkčně a strukturně rozdílných oblastí. Tři strukturní oblasti jsou N-koncová doména, centrální DNA vazebná doména a C-koncová doména. N-koncová doména je funkčně rozdělena na transaktivační doménu a doménu bohatou na prolin, C-koncová doména je funkčně rozdělena na oligomerizační a regulační doménu, společně s centrální DNA vazebnou doménou je to tedy celkem pět funkčních domén ve třech strukturně odlišných oblastech (Obrázek 1) [17].

Sekvence aminokyselin proteinu p53 obsahuje také pět vysoce konzervovaných oblastí, první z nich se nachází v N-koncové doméně, zbylé čtyři v DNA vazebné doméně [18]. Protein p53 byl původně pojmenován dle velikosti na SDS-PAGE (Polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsíránem sodným), která mu byla přisuzována při jeho objevení. Reálná velikost proteinu však není 53 kDa, jak se původně předpokládalo, ale 43,7 kDa. Nesprávná velikost byla určena z důvodu vyššího obsahu prolinu, který zpomaluje migraci v gelu [19].



Obrázek 1: Struktura proteinu p53 o celkové velikosti 393 AMK s rozlišením hlavních strukturních domén (dole) i funkčních domén (nahore); Převzato a upraveno z: [17]

2.1.3.1 N-koncová doména

V N-koncové doméně se mezi aminokyselinami 1–62 nachází transaktivační doména TAD, kterou lze rozdělit na subdomény TAD I (AMK 1–42) a TAD II (AMK 43–62). Obě subdomény jsou zodpovědné za indukci transkripce cílových genů a za interakce s dalšími proteiny. Mezi takové proteiny patří například regulační protein MDM2 (z angl.: Mouse double minute 2), zodpovědný za regulaci hladiny proteinu p53 v buňce nebo TBP protein (z angl.: Tata box binding protein), důležitý v počáteční fázi transkripce [20, 21]. Doména bohatá na prolin (PRD) se v N-koncové doméně nachází v rozmezí aminokyselin 63–97 a je charakterizována repeticí pěti aminokyselinových sekvencí PXXP, kde P představuje prolin a X jednu z ostatních aminokyselin. PRD má regulační funkci a hraje důležitou roli v zastavení buněčného cyklu a při indukci apoptózy [22, 23]. N-koncová oblast je krom prolinu bohatá také na kyselé aminokyseliny (asparagová a glutamová kyselina, až 40 % oblasti) a je místem častých posttranslačních modifikací, zejména fosforylace [24, 25].

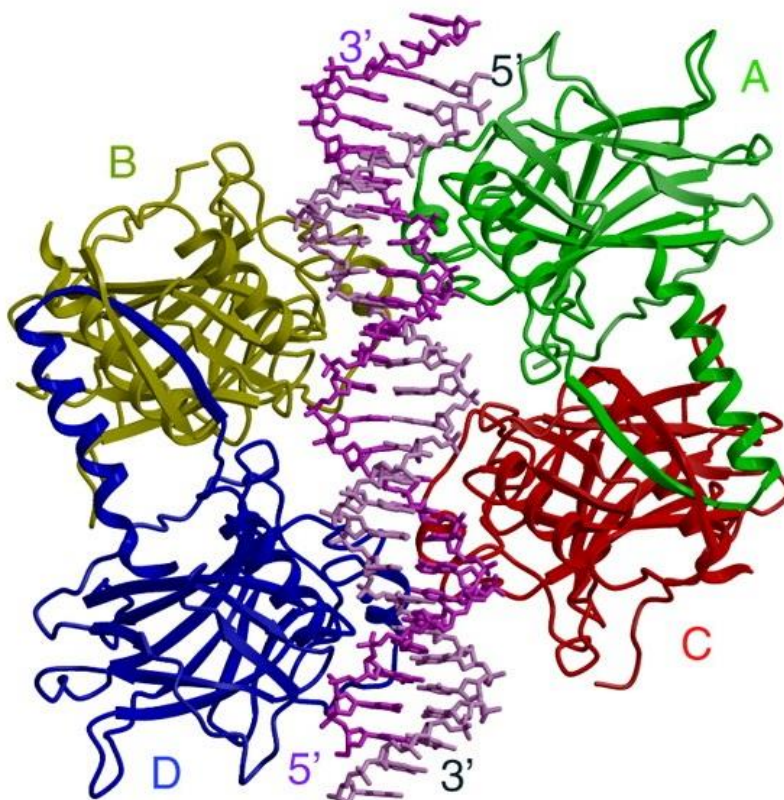
2.1.3.2 DNA vazebná doména

Mezi aminokyselinami 98–292 se nachází doména zodpovědná za sekvenčně specifickou vazbu proteinu p53 na konsenzní sekvenci v DNA (*p53CON*, viz kapitola 2.1.6.1), nazývaná také jako Centrální doména. Je to evolučně nejvíc konzervovaná část proteinu a probíhá zde interakce s homologními proteiny p63 a p73 [26].

DNA vazebná doména je také oblastí s nejvyšším procentem mutací. Až 80 % všech mutací genu *TP53* se týká této domény, a to konkrétně mezi aminokyselinami 126–306. Tyto mutace znemožňují vazbu na DNA a potlačují tak funkci p53 jako nádorového supresoru. Z výše uvedených informací je zřejmá závažnost mutací genu *TP53*, které byly nalezeny skoro v polovině všech lidských nádorů. Nejčastější mutace týkající se *TP53* jsou mutace bodové, konkrétně záměnové (missense). Následkem těchto mutací je zařazena odlišná aminokyselina a následně inhibována aktivita proteinu. V okrajových oblastech genu se objevují i delece a inserce [26, 27].

2.1.3.3 C-koncová doména

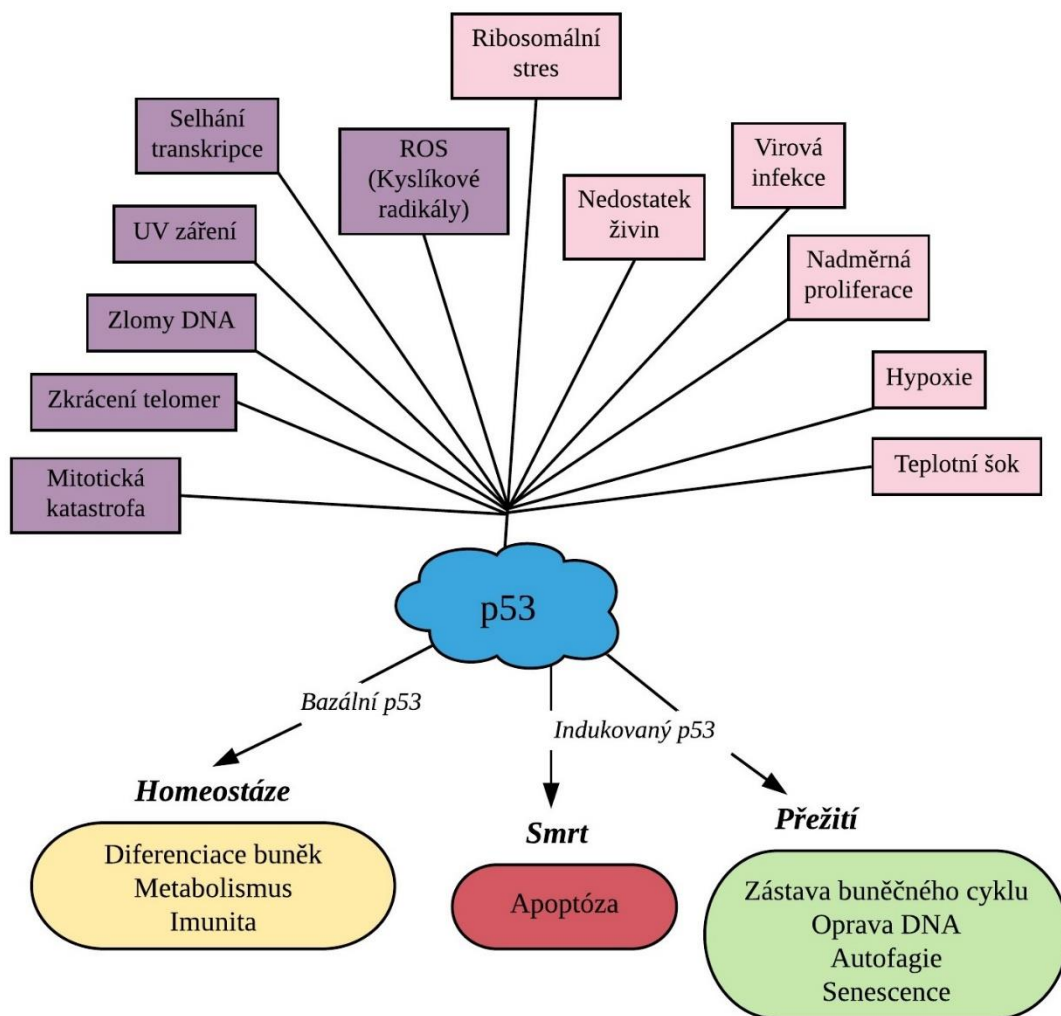
V C-koncové doméně rozlišujeme oligomerizační neboli tetramerizační doménu (OD, 4D) mezi aminokyselinami 324–355 a regulační doménu mezi aminokyselinami 363–393. Oligomerizační doména zajišťuje uspořádání proteinu p53 do struktury tetrameru (Obrázek 2), je však důležitá i pro protein-proteinové interakce, posttranslační modifikace a při přechodu v buňce z jádra do cytoplazmy. Mutace v této doméně vedou k nesprávně uspořádanému proteinu, a tedy k změně vazebných schopností [26, 28]. Regulační oblast je zodpovědná za jadernou lokalizaci a funguje jako prostorový inhibitor centrální DNA vazebné domény. Změnou svého uspořádání totiž umožní interakci centrální domény s DNA [28].



Obrázek 2: Transkripčně aktivní tetramerní forma proteinu p53 s DNA; jednotlivé monomery jsou odlišeny barevně a označeny A–D [29]

2.1.4 Funkce proteinu p53

Jak bylo uvedeno výše, protein p53 je zodpovědný za odpověď buňky na stresové faktory, mezi které patří například UV, infračervené či ionizující záření, tepelný šok, toxické látky či onkogeny, nedostatek nukleotidů nebo hypoxie. Mezi jeho hlavní funkce patří regulace buněčného cyklu, reparace DNA či navození apoptózy v případě rozsáhlejšího poškození buňky a neproveditelné reparace. Účastní se také senescence (replikativního stárnutí), diferenciace, replikace, metabolismu DNA a dalších dějů, jak shrnuje Obrázek 3 [1, 2, 30].



Obrázek 3: Přehled stresových faktorů a dějů navazujících po aktivaci p53; fialově (vlevo) jsou znázorněny stresové signály, které aktivují p53 prostřednictvím poškození DNA; Převzato a upraveno z: [31]

2.1.4.1 Zástava buněčného cyklu

Dle koncentrace proteinu p53 v buňce lze rozlišit, jak bude p53 postupovat v případě poškození buňky. Při mírně zvýšené hladině p53 dojde k zástavě buněčného cyklu, vyšší hladina způsobí indukci apoptózy. V buněčném cyklu se protein p53 účastní obou kontrolních bodů, které se nachází na konci G1 fáze a G2 fáze. Prvního kontrolního bodu se v normální buňce účastní cyklus Rb protein, ovšem v poškozené buňce se aktivuje p53, který se váže na promotor genu *p21* a spustí expresi proteinu. Protein p21 má inhibiční schopnosti a způsobí zástavu cyklu. Inhibuje cyklin-dependentní kinázy (cdk2, cdk3, cdk4 a cdk6), což brání přechodu z G1 fáze do S fáze. V druhém kontrolním bodě p53 inhibuje cdk2 a potlačuje expresi cyklinu B1, na který se cdk2 váže. Takto je znemožněn vstup z G2 fáze do M fáze. Pozastavením cyklu je ponechán buňce čas k reparaci DNA [1, 30, 32].

2.1.4.2 Indukce apoptózy

Pokud je poškození DNA rozsáhlé, je proteinem p53 indukována exprese proteinů podílejících se na apoptóze. V závislosti na poškození, které k apoptóze vede, dochází k aktivaci jiných proapoptických genů z rodiny Bcl-2, jako jsou například *Bax* (z angl.: Bcl-2 associated X protein), *Puma* (z angl.: p53 upregulated modulator of apoptosis) či *Noxa*

(z latinského výrazu pro škodlivou látku), a samotný proces apoptózy je proveden za účasti enzymů kaspáz. Například protein Bax je antagonistou represoru apoptózy, proteinu Bcl-2, a zároveň ovlivňuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu C a dalších proapoptických faktorů [33, 34].

2.1.5 Regulace p53

Za normálních fyziologických podmínek je hladina p53 v buňce nízká a vzhledem k jeho důležité funkci je potřeba i jeho důkladná regulace. Na ní se podílí protein MDM2, který za normálních podmínek tvoří s proteinem p53 zpětnovazebnou regulační smyčku a zajišťuje degradaci proteinu. Při působení stresu se o aktivaci a stabilizaci proteinu p53 starají posttranslační modifikace (fosforylace, acetylace, metylace, sumoylace aj.). Odlišné druhy i rozdílné míry stresových faktorů ovlivňují aktivaci p53 odlišně a může tak docházet k různorodým posttranslačním modifikacím [35, 36].

2.1.5.1 Zpětnovazebná smyčka s MDM2

Autoregulační smyčka mezi MDM2 a proteinem p53 je za fyziologických podmínek hlavní regulační mechanismus hladiny p53 v buňce. Nadměrné, neregulované množství p53 by na buňku mohlo mít negativní vliv.

Exprese proteinu MDM2 je indukována zvýšenou koncentrací proteinu p53 a p53 je degradován za účasti MDM2, což dále vede k snížené aktivaci transkripce MDM2. MDM2 se váže na N-koncovou transaktivační doménu p53, čímž blokuje jeho transkripční aktivitu. Také působí jako ubikvitin-ligáza, ubikvitinuje protein p53, čímž ho označí k degradaci a p53 následně putuje do cytoplasmy, kde je proteazomem 26S degradován [25, 37, 38]. Dalším proteinem, který se účastní regulace koncentrace proteinu p53, je například MDM4 (také MDMX), který je strukturálním homologem MDM2, postrádá však doménu s ubikvitin-ligázovou aktivitou, neoznačuje ho tedy k degradaci, ale brání transaktivační funkci proteinu p53. K inaktivaci proteinu p53 dochází i jadernou exkluzí či mutací [38, 39].

2.1.5.2 Posttranslační modifikace

Klíčovou roli v buňkách vystavených stresu hrají posttranslační modifikace. Poločas rozpadu proteinu p53 je 20-30 minut, ovšem posttranslační modifikace ho můžou zvýšit až na několik hodin. Stresové signály způsobí nárůst posttranslačních modifikací, což vede k aktivaci proteinu p53. Modifikace také umožňují vazbu proteinu na DNA. Prodloužením poločasu rozpadu dojde k zvýšení koncentrace p53 v buňce a ten poté může aktivovat transkripci cílových genů pro adekvátní odpověď na stres buňky.

Pozitivní regulace proteinu p53 je při buněčném poškození zajištěna například protein-kinázami ATM a ATR. Stresové podmínky vyvolají okamžitou aktivaci ATM i ATR a tyto kinázy jsou zodpovědné za fosforylaci proteinu p53, tedy jeho aktivaci. Nejvýznamnější jsou fosforylace serinu, a to Ser¹⁵, Ser²⁰ a Ser³⁷ [35, 40]. Tyto modifikace totiž regulují tvorbu komplexu p53 – MDM2, a zabraňují tak degradaci p53. Fosforylace Ser¹⁵ také brání tvorbě komplexu p53 s replikačním proteinem RPA. V případě tvorby komplexu by p53 nebyl schopen vazby k DNA a neplnil by tak svou funkci. Kináza ATM je schopna fosforylovat i Serin proteinu MDM2 (Ser³⁹⁵), což brání přechodu komplexu p53 – MDM2 z jádra do cytoplasmy, a tedy zabraňuje degradaci v proteazomu [41, 42].

Místem posttranslačních modifikací jsou hlavně N-koncová a C-koncová doména, ovšem v posledních letech bylo objeveno, že i na centrální DNA-vazebné doméně dochází

k fosforylaci. Tato fosforylace Ser²⁶⁹ vedla k změně konformace proteinu p53 a znemožnění sekvenčně-specifické vazby k DNA, a tedy k jeho inaktivaci [43]. Dalším důležitým typem posttranslační modifikace je acetylace. Acetylace je významná kvůli stabilizaci proteinu p53, ovlivňuje jeho strukturu i funkci. Na C-koncové doméně je protein p53 acetylován proteinem p300 v regulační oblasti (363–393), a to zejména v místech Lys³⁷³ a Lys³⁸², což vede k změně prostorové konformace a zvýšení míry sekvenčně specifické vazby k DNA [44].

2.1.6 Interakce proteinu p53 s DNA

Jak bylo zmíněno výše, protein p53 se váže na DNA v tetramerní formě a tato vazba je základem transkripční aktivity p53, je tedy velmi důležitá pro správnou funkci p53. Vazba p53 na DNA je dvojího druhu, a to sekvenčně specifická a sekvenčně nespecifická. Za sekvenčně specifickou odpovídá oblast DNA-vazebné domény, sekvenčně nespecifická je zprostředkována C-koncovou doménou [45].

2.1.6.1 Sekvenčně specifická vazba

Centrální DNA-vazebná doména je klíčovým vazebným místem proteinu p53. Rozpoznává na DNA tzv. konsenzní sekvenci *p53CON*. Oblasti obsahující tyto sekvence se označují jako RE („Responsive Elements“). Konsenzní sekvence má podobu dvou opakujících se motivů dlouhých deset bází: 5′-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3′, přičemž jedinými ustálenými bázemi v motivu jsou C a G a dva motivy mohou být odděleny mezerou 0–13 bp [46]. Některá vazebná místa mají místo dvou opakování i více kopií motivu, například tři až čtyři. Každá z polovin konsenzní sekvence poté ve vazbě interaguje s dvěma monomery proteinu p53. Jak bylo zmíněno výše, C-koncová doména, která podléhá posttranslačním modifikacím, ovlivňuje konformaci proteinu a tedy i sekvenčně-specifickou vazbu. Počet bází, který odděluje jednotlivé kopie motivu *p53CON* je také důležitý, prokázalo se, že u nejsilnějších vazebných míst odděluje sekvence pouze 0–1 bp [45, 47, 48].

2.1.6.2 Sekvenčně nespecifická vazba

Dalším faktorem ovlivňujícím vazbu p53 na DNA je její struktura. Oproti specifické konsenzní sekvenci *p53CON* jsou zde důležité zejména určité typy struktury rozpoznávané C-koncovou doménou proteinu p53, jako jsou kvadruplexy, triplexy či jednořetězcové zlomy. Protein p53 se preferenčně váže k superhelikální DNA, a to i s vyšší afinitou než k lineární DNA. U *p53CON* s inverzní repeticí, kde mohou vznikat křížové struktury, se p53 také váže přednostně. Bylo také zjištěno, že na strukturu vlásenky se smyčkou se p53 váže lépe než na strukturu B-DNA [49-53].

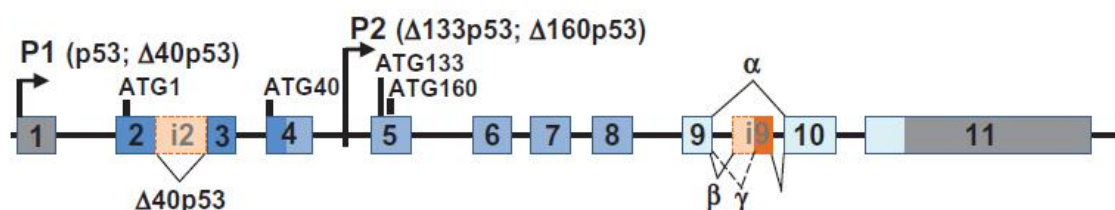
2.2 Izoformy proteinu p53

Krátce po objevu proteinu p53 bylo zjištěno, že protein p53 není v buňce jedinou exprimovanou formou tohoto proteinu. Je však jedinou formou, která se vyskytuje ve všech lidských tkáních. V souvislosti s typem tkáně se s ní může exprimovat až 11 dalších izoforem. Existence izoforem proteinu p53 byla popsána již v osmdesátých letech minulého století, a to objevem izoformy myšího proteinu p53 s alternativní C-koncovou doménou v roce 1985 [54].

Hlavní poznatky o důležitosti těchto izoforem jsou však získávány až v posledních 15 letech, kdy jsou izoformy předmětem mnoha studií. Objev těchto izoforem totiž přinesl další otázky o rozmanitosti regulace samotného proteinu p53 a o konkrétním vlivu izoforem na aktivitu p53. Vzdávající zájem o izoformy p53 je způsoben hlavně novými a důležitými informacemi o izoformách proteinů p63 a p73, které byly studovány dříve než izoformy proteinu p53 [2]. Společně s dalšími proteiny z rodiny p53, proteinem p63 a p73 je alternativním sestřihem či alternativním počátkem translace produkováno více než 40 izoforem. Některé z izoforem se chovají jako nádorový supresor, podobně jako p53, ale jiné mohou mít funkci opačnou. Dle posledních výzkumů se však zdá, že v závislosti na typu tkáně, ve které se izoformy exprimují, je většina izoforem schopna vykonávat obě funkce. Poslední poznatky napovídají, že buněčná odpověď zprostředkovaná proteinem p53 je ve skutečnosti souhrn vlastních interakcí koexprimovaných izoforem a že nevyvážená exprese jednotlivých izoforem může vést k předčasnému stárnutí, neurodegenerativním onemocněním a rakovině [5, 8].

2.2.1 Stavba genu *TP53* a exprese izoforem proteinu p53

Koexpresi izoforem je způsobena kombinací využití alternativního promotoru, alternativního sestřihu a alternativního počátku translace. U genu *TP53* jsou známy dva promotory, P1 a P2, dále jsou přítomny čtyři iniciační kodony (ATG1, ATG40, ATG133 a ATG160) a může dojít ke třem typům alternativního sestřihu (α , β , γ). Schéma struktury genu *TP53* se znázorněním výše uvedeného je na obrázku 4 [55].

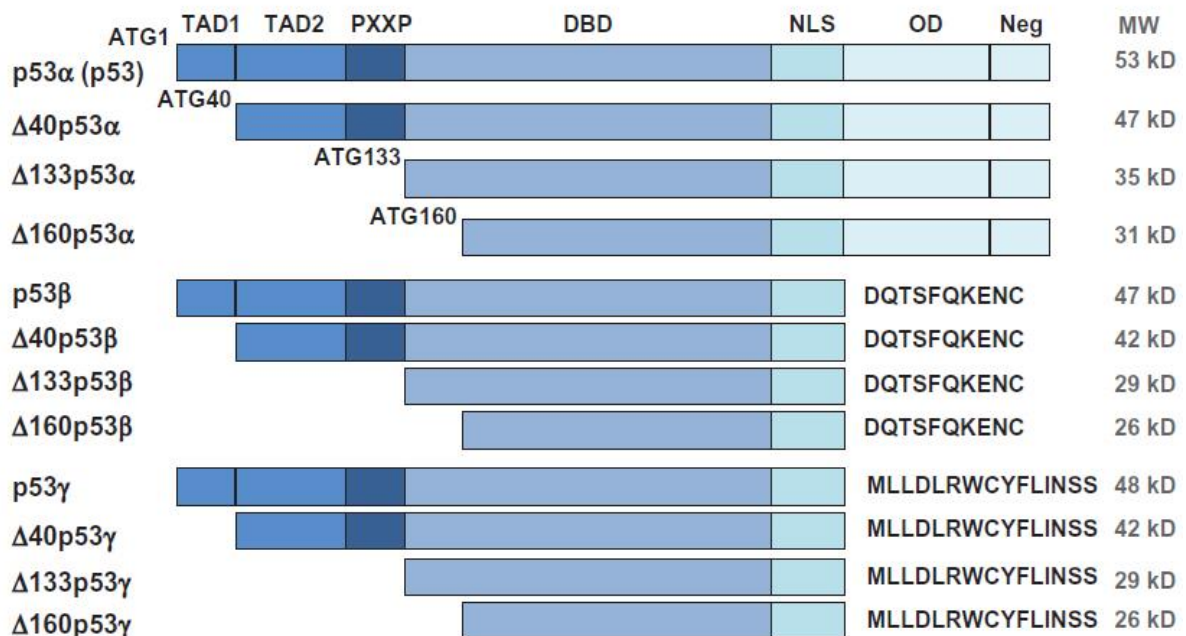


Obrázek 4: Struktura lidského genu *TP53*; gen *TP53* se skládá z 11 exonů a kóduje 12 rozdílných izoforem díky alternativním promotorům (P), alternativnímu sestřihu (\wedge) a alternativní iniciaci translace ($|ATG$) [55]

Alternativní sestřih intronu 9 dává vzniknout třem typům C-koncové domény: α , β a γ . C-koncová varianta α , vznikající kompletním sestřihem intronu 9, představuje klasické strukturní uspořádání proteinu p53 obsahující oligomerizační doménu. Varianty β a γ vznikají částečným sestřihem intronu 9 (exon 9b \rightarrow β , exon 9g \rightarrow γ) a oligomerizační doménu postrádají. Prvních sedm aminokyselin oligomerizační domény mají varianty α , β i γ společných, u β izoforem obsahuje C-koncová doména deset nových aminokyselin, u γ izoforem je zde patnáct odlišných aminokyselin. Mechanismus regulace alternativního sestřihu intronu 9 zůstává stále částečně nezodpovězený. Alternativním promotorem a iniciací translace vznikají izoformy, kterým chybí část či celá transaktivační oblast v N-koncové

doméně, tzv. ΔN izoformy. Při počátku transkripce od prvního promotoru a s plným sestřihem intronu 9 vzniká protein p53fl (p53 plné délky), v kontextu izoform často nazývaný p53 α či TAp53 α . Intron 2 podléhá také alternativnímu sestřihu. V případě sestřihu mRNA (intronu 2) transkribované od promotoru P1 může dojít k iniciaci translace jak od ATG1, tak od ATG40, a tedy k expresi izoform TAp53 i $\Delta 40$ p53. V případě uchování intronu 2 dochází k expresi pouze $\Delta 40$ p53 izoform [2, 6].

Při počátku transkripce od promotoru P2 v intronu 4 vznikají tři různé mRNA s iniciací translace buď na ATG133 nebo ATG160, exprimující izoformy $\Delta 133$ p53 a $\Delta 160$ p53, kterým chybí celá transaktivační doména a doména bohatá na prolin, u $\Delta 160$ p53 chybí i část DNA-vazebné domény. Kombinací změn na N-koncové doméně a alternativního sestřihu C-koncové domény může vznikat tedy z 9 různých mRNA celkem 12 izoform p53. Přehled izoform je uveden na obrázku 5 [5, 6].



Obrázek 5: Přehled izoform proteinu p53, jejich odlišných struktur a molekulových hmotností; TAD1, TAD2: Transaktivační doména 1 a 2; PXXP: Doména bohatá na prolin; DBD: DNA-vazebná doména; NLS: Sekvence pro transport proteinu do jádra, OD: Oligomerizační doména; Neg: Regulační doména; MW: Molekulová hmotnost proteinu; [55]

2.2.2 Izoformy TAp53

Skupina izoform TAp53 označuje izoformy, kterým jako jediným nechybí transaktivační doména TAD I – p53 α , p53 β a p53 γ . Protein p53 α je podrobně popsán v kapitole 2.1. Na rozdíl od p53 α postrádají p53 β i p53 γ celou oligomerizační i regulační doménu. Oligomerizační doména je velmi důležitou oblastí proteinu p53, protože obsahuje místo ubikvitinace pro ubikvitin-ligázy, jako je například MDM2. Oproti p53 bylo zjištěno, že p53 β se preferenčně váže na promotor *Bax*, což způsobí indukci apoptózy, naopak na MDM2 se váže jen slabě. Bez přítomnosti buněčného stresu zvyšuje p53 β také transkripční aktivitu promotoru *p21*. Dále bylo zjištěno, že přítomnost p53 a zároveň p53 β indukuje senescenci a že jsou tyto dva proteiny spolu schopny tvořit komplex, p53 β tedy reguluje tumor-supresorovou funkci proteinu p53

modulací jeho transkripční aktivity. Izoforma p53 β je lokalizována v jádře, v malém množství také v cytoplazmě [56].

Protein p53 γ může zvyšovat transkripční aktivitu promotoru *Bax*, ale na rozdíl od p53 β ji na promotoru *p21* naopak snižuje. Lokalizace izoformy p53 γ je zejména v jádře, u některých buněk i v cytoplazmě [55, 56].

2.2.3 Izoformy $\Delta 40p53$

Izoformy skupiny $\Delta 40p53$, tedy $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 40p53\beta$ a $\Delta 40p53\gamma$, postrádají prvních 39 AMK, tedy celou transaktivační doménu TAD I. Skupina také nese označení p53/47 či $\Delta Np53$. Bez transaktivační domény postrádají izoformy této skupiny schopnost vazby na MDM2. Regulační mechanismus, který zajišťuje degradaci těchto izoform v buňce namísto MDM2 však nebyl dosud popsán. Bylo zjištěno, že množství izoform $\Delta 40p53$ se při poškození DNA nezvyšuje, nepodílí se tedy pravděpodobně na buněčné odpovědi na stres. $\Delta 40p53\alpha$ je také negativním regulátorem proteinu p53 – zeslabuje jeho transkripční aktivitu. Příkladem ovlivnění aktivity proteinu p53 izoformou $\Delta 40p53\alpha$ je ubikvitinace. V přítomnosti izoformy $\Delta 40p53\alpha$ je snížena schopnost polyubikvitinace proteinu p53, naopak je podpořena monoubikvitinace a export z jádra. Zvýšená hladina izoform $\Delta 40p53$ je dle některých výzkumů spojena s horší prognózou u více typů nádorů [57, 58].

2.2.4 Izoformy $\Delta 133p53$

U izoform této skupiny ($\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$ a $\Delta 133p53\gamma$) je krom obou transaktivačních domén chybějící i část DNA-vazebné domény, celkem 132 AMK. Stejně, jako izoformy skupiny $\Delta 40p53$ tedy postrádají schopnost vazby na MDM2. $\Delta 133p53\alpha$ je nejvíce prostudovanou izoformou a předpokládá se, že hraje významnou roli v tvorbě nádorů. Po působení stresových faktorů je $\Delta 133p53\alpha$ transaktivována za účasti izoform proteinu p53, p63 i p73. Bylo zjištěno, že $\Delta 133p53\alpha$ reguluje genovou expresi přímou interakcí s p53 – izoforma je schopna tvořit komplex s p53. Navíc bylo však pozorováno, že i nezávisle na samotném p53 je $\Delta 133p53\alpha$ schopna sama regulovat genovou expresi. $\Delta 133p53\alpha$ tak může zabraňovat senescenci zprostředkované proteinem p53, zástavě buněčného cyklu v G1 fázi, nebo apoptóze. Izoforma podporuje migraci buněk endotelu, má vliv i na formování krevních cév a formování metastáz regulací exprese angiogenních genů, a to nezávisle na p53. $\Delta 133p53\alpha$ je lokalizována v jádře a v malém množství i v cytoplazmě [56, 59, 60].

O izoformách $\Delta 133p53\beta$ a $\Delta 133p53\gamma$ nejsou zatím známy jejich úlohy v buňce při regulaci p53. Jsou exprimovány i v zdravých tkáních a mají rozdílnou buněčnou lokalizaci, izoforma $\Delta 133p53\gamma$ je lokalizována v cytoplazmě [56].

2.2.5 Izoformy $\Delta 160p53$

Izoformy skupiny $\Delta 160p53$ postrádají 159 počátečních AMK, což znamená chybějící TAD I i TAD II, a zároveň chybějící část DNA-vazebné domény. Ze všech izoform byly objeveny nejpozději, popsány byly až v roce 2010, proto jejich úloha v regulaci buněčné odpovědi či v modulaci funkce proteinu p53 není zřejmá. Díky chybějícím doménám uvedeným výše je jasné, že stejně jako izoformy skupiny $\Delta 40p53$ a $\Delta 133p53$ i tato skupina postrádá schopnost vazby na MDM2. Dále bylo zjištěno, že izoformy této skupiny se exprimují i v buňkách K562, o kterých bylo doposud předpokládáno, že to jsou tzv. „p53-null“, tedy buněčné linie s absencí exprese genu *TP53* [55, 61].

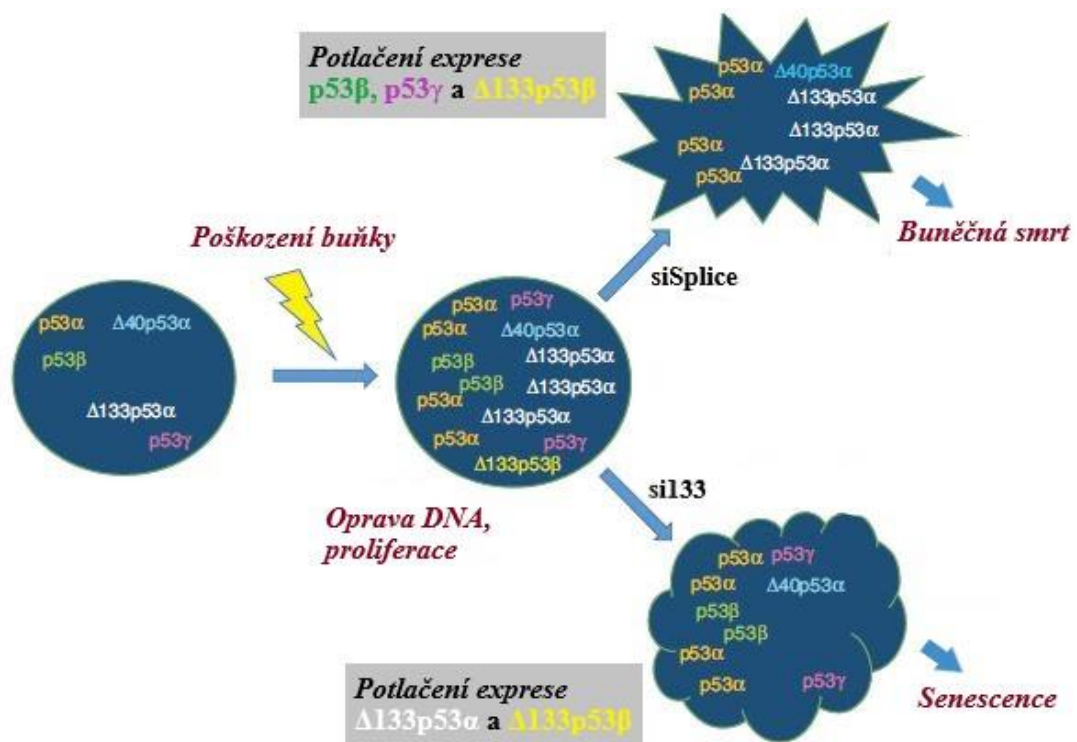
2.2.6 Izoformy proteinu p53 a nádorová onemocnění

Z výše uvedených informací plyne, že izoformy proteinu p53 modulují odpověď buňky na stresové signály buď nepřímo, pokud regulují transkripční aktivitu proteinů rodiny p53, nebo přímo, a to vazbou na promotory genů spojených s apoptózou a zástavou buněčného cyklu. Důsledkem toho buď podporují, nebo potlačují tumor-supresorovou aktivitu proteinu p53, a zároveň je usuzováno, že mají další biologické funkce nezávislé na proteinu p53.

V posledních letech výzkumu izoform proteinu p53 se prokázalo, že jsou nadměrně produkovány v různých nádorových tkáních. Z hlediska spojitosti s rakovinou jsou krom p53 α významné především izoformy p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α a Δ 133p53 α . Zejména se jedná o melanom (Δ 40p53), rakovinu ledvin či konečníku (Δ 133p53), rakovinu prsu, hlavy, krku a plic. Expres p53 β byla pozorována ve zvýšené míře v nádorech prsu a její přítomnost má za následek menší velikost těchto nádorů. Ukázalo se také, že p53 β působí protektivně u pacientů s mutantní formou p53, stejně, jako p53 α . U izoformy p53 γ bylo zjištěno, že u nádorů prsu vede k lepší prognóze pacientů s mutací *TP53*, srovnatelnou s prognózou u pacientů s nemutovaným *WT TP53*. Pacienti s mutací *TP53* a bez exprese izoformy p53 γ měli prognózu horší. Izoformy proteinu p53 jsou tedy přímo zapojeny v reakci buněk pacientů na nádorovou transformaci [5, 6].

Bylo prokázáno, že nadměrná exprese izoform v nádorech prsu může vést ke kompletní ztrátě funkce proteinu p53 jako nádorového supresoru. Na druhou stranu obvykle nejsou všechny izoformy v tkáni exprimovány najednou a žádnou z izoform nelze přímo definovat jako nádorový supresor či naopak onkogen, jelikož jejich funkce jsou spojeny s jinými izoformami a exprese vždy záleží na kontextu buňky. Některé izoformy jsou těsně spjaty s expresí jiných izoform, další dvojice naopak nikdy nejsou koexprimovány zároveň v jedné buňce. Navíc je exprese tkáňově specifická, tedy počet kombinací koexpres je omezen. Rozluštění kombinací, které vysvětlují kde a za jakých okolností dochází k expresi určitých izoform by vedlo k přesnější predikci odpovědi buňky na stresový signál [5].

Díky využití inhibitorů faktorů alternativního sestřihu, inhibitorů autofagie či použití siRNA („small interfering RNA“) bylo možno vyvolat rozdílnou buněčnou odpověď na stejný stresový signál. Molekuly siRNA jsou krátké sekvence dvouřetězcové RNA, které jsou v buňce schopny ovlivnit expresi proteinů (jev se nazývá RNA interference). Příklad rozdílné buněčné odpovědi na stejné poškození je uveden na obrázku 6, kdy byly použity siRNA specificky navržené pro určité izoformy. siRNA siSplice byla použita pro potlačení exprese izoform p53 β , p53 γ a Δ 133p53 β . Potlačení exprese těchto izoform vedlo k buněčné smrti. Naopak potlačení exprese skupiny Δ 133p53 za pomoci siRNA si133 vedlo pouze k senescenci [5, 62].



Obrázek 6: Po poškození buňky a po modulaci exprese izoforem proteinu p53 pomocí molekul siRNA dochází k potlačení exprese některých izoforem a k rozdílné buněčné odpovědi; Převzato a upraveno z: [5]

Tyto poznatky mohou vést k budoucí možné modulaci sestřihu proteinu p53 a k dalšímu využití v léčbě rakoviny založené na p53 terapii. Aktuálně je p53 terapie založena právě na modulaci alternativního sestřihu, na nadměrné aktivaci p53wt či na modulaci funkce mutantní formy p53 tak, aby vykazovala chování jako p53wt. Tohoto je dosaženo například aplikací látky PRIMA-1 (z angl.: Proline-rich membrane anchor 1), která je schopna změnit konformaci mutovaného proteinu p53 do aktivní formy [2, 6, 63].

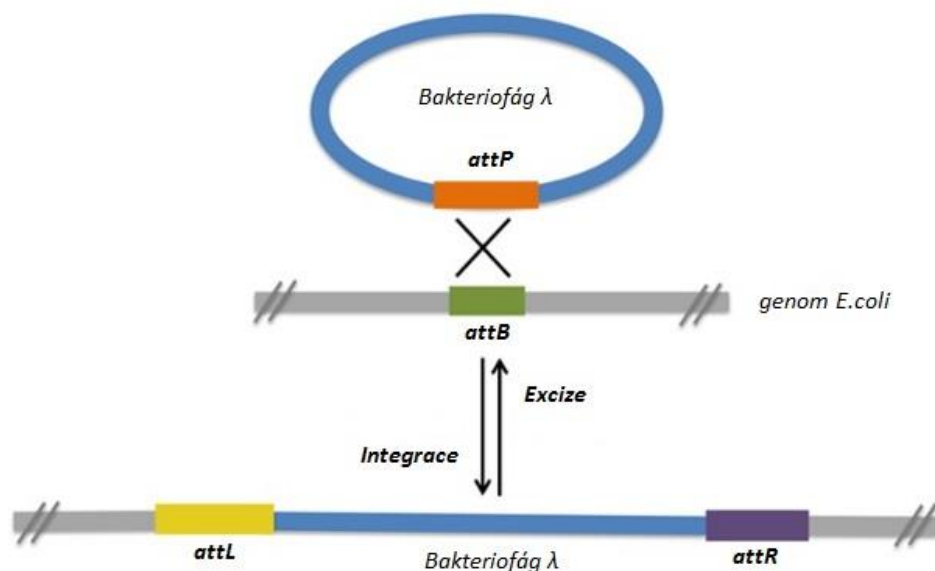
2.3 Gateway klonování

Gateway klonování patří mezi komerční rekombinační metody klonování podobně, jako dříve používané systémy Creator nebo Echo Cloning. Gateway systém byl vyvinut firmou Invitrogen na konci devadesátých let [64]. Oproti běžnému klonování přinesl rovnou několik výhod, a to zejména rychlost, vysokou efektivitu či možnost klonovat více sekvencí do jednoho vektoru v jedné reakci se zachováním orientace i čtecího rámce. Velkou výhodou je také jednoduchost v případě překlonování určité sekvence do různých typů expresních systémů, a to bez nutnosti restričního štěpení a následné ligace. Na druhou stranu je to metoda finančně nákladnější, s nutným použitím jak komerčních vektorů, tak komerčních enzymatických mixů obsahujících enzymy integrázu (*Int*) či excisionázu (*Xis*) [65].

Princípem metody je dvoukroková rekombinace vektorů ve specifických, tzv. *att* místech. Původně je celá technologie odvozena od místně specifické rekombinace bakteriofága λ , jehož enzymatický aparát umožňuje začlenění své DNA do genomu bakterie a přepínání mezi lyzogenním a lytickým cyklem [66].

2.3.1 Rekombinace bakteriofága λ

Při infekci buňky bakteriofágem λ dojde v lyzogenním cyklu k integraci DNA bakteriofága do genomu hostitelské bakterie. Děje se tak pomocí enzymu integrázy (*Int*), která je kódována fágovou DNA a procesu se účastní také integrační faktor hostitele (IHF). Fágová DNA se v buňce dále replikuje s každým dělením buňky jako tzv. profág. Případné poškození hostitelské buňky (např. UV zářením) je bakteriofágem rozpoznáno a dochází k excizi (vyštěpení) fágové DNA mimo genom bakterie a k přechodu bakteriofága na lytický cyklus. Integrace a excize bakteriofága λ je znázorněna na obrázku 7, společně se specifickými *att* rekombinačními místy [66, 67].



Obrázek 7: Integrace a excize bakteriofága λ . Rekombinací *attP* a *attB* míst vzniknou *attL* a *attR* místa; Převzato a upraveno z: [68]

Att oblasti (Obrázek 8) obsahují specifická vazebná místa pro enzymy katalyzující rekombinační reakce. U bakterie je to *attB* místo, u bakteriofága λ je to místo *attP*, obě pojmenované dle anglického názvu nositele sekvence. Délka sekvence *attB* místa je 25 bp

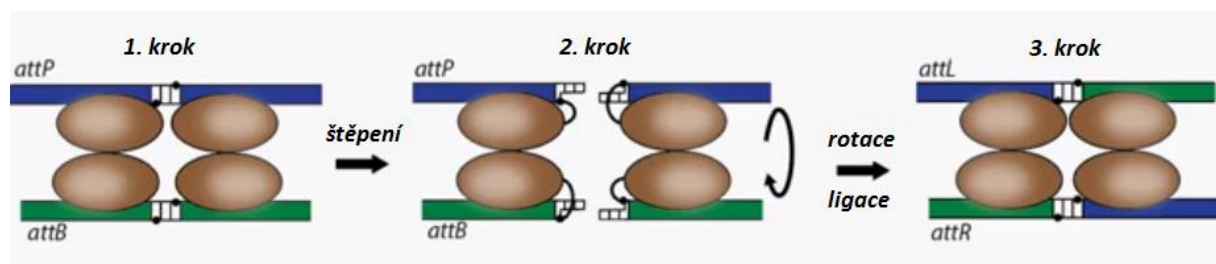
a délka sekvence *attP* místa je 243 bp. Na rozdíl od sekvencí restričních enzymů nejsou sekvence *att* míst palindromické, což při použití v klonování zajišťuje správnou orientaci [69].

V integrační reakci spolu vždy reagují *attB* a *attP* místa za účasti integrázy (*Int*) a integračního faktoru hostitelské bakterie (IHF). Integrační faktor je neenzymatický protein, který se váže na DNA a napomáhá tvorbě komplexu enzym – DNA. Samotná rekombinace probíhá pouze v homologních úsecích dlouhých 15 bp v obou zúčastněných *att* místech. Okolní sekvence jsou však důležité jako cílové sekvence pro rekombinační enzym. Rekombinací *attB* a *attP* míst vznikají *attL* a *attR* místa, pojmenovaná podle levé a pravé strany původní sekvence (left a right) - po rekombinaci obsahuje *attL* místo levou část původní integrované *attP* sekvence, *attR* místo obsahuje pravou část sekvence *attP*. Místa *attL* a *attR* se rekombinují v zpětné reakci, a to v případě excize fágové DNA z genomu bakterie, za opětovného vytvoření *attB* a *attP* míst [67, 70].



Obrázek 8: *att* místa se znázorněním centrální homologní sekvence dlouhé 15 bp [71]

Rychlost limitujícím krokem rekombinace je první krok, tedy tvorba komplexu enzym – DNA. Nejdříve se na každou stranu centrální homologní sekvence *att* místa váží monomery enzymu, které následně utvoří dimer vždy s monomerem na jiném *att* místě. Oba dimery mají rozdílné prostorové konformace, což umožní tvorbu komplexu společně s dvěma DNA vlákny v jeho těsné blízkosti. V druhém kroku proběhne vazba na DNA. Serinový zbytek v aktivním místě každého monomeru atakuje fosfátovou kostru v místech centrální homologní oblasti. Integráza tímto naštěpí homologní úseky asymetricky, čímž vytvoří lepivé konce, podobně jako restriční enzym, a zároveň vytvoří kovalentní vazbu mezi proteinem a DNA. Změna prostorové konformace umožní výměnu vláken a ve třetím, posledním kroku reakce, dojde k ligaci vyměněných vláken DNA. Schéma rekombinační reakce je vidět na obrázku 9 [71].



Obrázek 9: Rekombinační reakce mezi *attB* a *attP* místy za účasti enzymu Integrázy a IHF [71]

2.3.2 Proces Gateway klonování

Výše zmíněná *att* místa jsou v modifikovaném provedení, s mírně změněnou sekvencí, přítomna i v jednotlivých komponentech Gateway klonování. Modifikace oblastí původních *att* míst bakteriofága λ spočívaly zejména v eliminaci STOP kodonů či v eliminaci možnosti tvorby sekundárních struktur, modifikace v sekvenci proběhly také z důvodu zvýšení specifiity, zajištění čtecího rámce a zajištění správné orientace vkládané sekvence [70].

Proces rekombinace mezi modifikovanými *att* místy zůstává stejný, jako u bakteriofága λ . Rozdílem je počet *att* míst, kdy jsou v každém z komponent klonování obsažena minimálně dvě *attB*, respektive *attP* místa, a vznikají minimálně dvě *attL*, respektive *attR* místa. Dvě *att* místa ohraničují klonovanou sekvenci a v používaném komerčním vektoru ohraničují další dvě *att* místa sekvenci důležitou pro pozdější selekci. Samotný proces klonování má dva kroky – BP reakci a LR reakci, kdy každá z reakcí může trvat jen 1 hodinu, což i s přípravnými a pročišťovacími kroky činí Gateway klonování časově velmi efektivním oproti klasickému klonování [68].

V BP reakci se rekombinuje námi připravená sekvence, která je ohraničená *attB* místy, s komerčním donorovým vektorem obsahujícím *attP* místa. Takto vznikne tzv. entry klon, obsahující *attL* místa, který se v LR reakci rekombinuje s komerčním destinačním vektorem obsahujícím *attR* místa. Tím vznikne finální produkt, expresní klon. Podrobněji jsou jednotlivé reakce Gateway klonování popsány a znázorněny níže, v kapitolách 2.3.2.3 a 2.3.2.4. Za určitých podmínek a při vysoké čistotě komponent lze postup modifikovat a obě reakce spojit do jednoho kroku v jedné zkumavce, tzv. „One-Tube“ metodou [70].

Jednou z mnoha výhod Gateway klonování je právě unikátní systém modifikovaných *att* míst, který není omezen na dvě. Umožňuje jednoduše klonovat i více různých sekvencí do jednoho vektoru najednou, pokud jsou sekvence na svých okrajích opatřeny dostatečně odlišnými, ale překrývajícími se *att* místy. Díky specificky navrženým *att* místům se jednotlivé sekvence seřadí do vektoru, to vše se zachováním orientace i čtecího rámce. Tato metoda se nazývá Multisite Gateway klonování [65].

2.3.2.1 Selekcce entry a expresních klonů

Aby byla během Gateway klonování umožněna jednoznačná selekcce získaných klonů, má většina komerčních vektorů několik specifíků. Ve všech dostupných vektorech, tedy v donorových a destinačních, se mezi *attP*, respektive *attL* místy nachází sekvence obsahující dvě hlavní části. První částí je gen pro rezistenci na chloramfenikol a druhou je gen pro produkci toxinu *ccdB*. Obě části zajišťují společně dvojí selekci vzniklých entry, respektive expresních klonů [70, 72].

Gen pro produkci toxinu *ccdB* hraje zásadní roli, protože jeho produkt, protein toxický pro kmen *E.coli*, interaguje v bakteriální buňce s enzymem DNA gyrázou, která má na starosti správné vinutí a rozvolňování DNA během replikace. Toxin způsobí zlomy ve vláknech DNA, znemožní replikaci a způsobí buněčnou smrt. Využití *ccdB* genu v Gateway klonování umožnilo selekci získaných konstruktů [73]. Vektory, které obsahují gen kódující *ccdB* toxin, je nutno produkovat v buňkách na tento toxin rezistentní, například One Shot *ccdB* Survival 2 T1^R *E.Coli* [72].

2.3.2.2 Příprava klonované sekvence

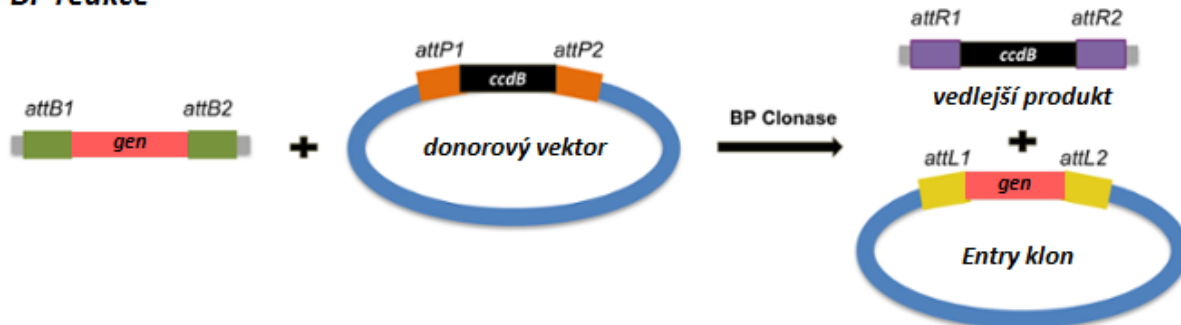
Před začátkem klonování je nutno připravit vkládanou sekvenci DNA tak, aby ji bylo možno rekombinací vložit do *attP* míst donorového vektoru. Fragment DNA, pocházející z knihovny cDNA či připravený restrikcí štěpením nebo polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), je jednoduše opatřen *attB* místy výhradně pomocí PCR se specifickými adapterovými komerčními primery. Velkou výhodou Gateway systému je komerční dostupnost celé řady již hotových entry klonů, bez nutnosti přípravy vlastní sekvence. Komerční entry klony obsahují řadu lidských a myších sekvencí, v současné době je k dispozici okolo 16 000 lidských a 2 500 myších entry klonů, které jsou po provedení LR reakce velmi jednoduše připraveny k expresi proteinů a další analýze. Dostupnost hotových entry klonů doprovází také komerční dostupnost komponent pro vytvoření vlastních donorových a destinačních vektorů. Výrobce umožňuje převést jakýkoliv vektor na vektor používaný v gateway klonování, a to využitím připravené komerční sekvence *att* míst (tzv. kazety) obsahujících gen toxinu *ccdB* a gen rezistence na chloramfenikol. K dispozici jsou kazety s různým čtecím rámcem [69, 74].

2.3.2.3 BP reakce

Výše zmíněná rekombinace *attB* a *attP* míst je v Gateway systému pojmenována jako BP reakce a je katalyzována enzymatickým mixem BP Clonase, obsahujícím *Int* a IHF. Schéma BP reakce je uvedeno na obrázku 10. Připravená sekvence, opatřená *attB* místy, se rekombinuje s donorovým vektorem obsahujícím *attP* místa. Z donorového vektoru se v reakci jako vedlejší produkt vyštěpí gen pro produkci toxinu *ccdB* (viz kapitola 2.3.2.1) společně s genem pro rezistenci na chloramfenikol. Hlavním produktem je entry klon, obsahující klonovanou sekvenci ohraničenou nově vzniklými *attL* místy [70].

Samotný donorový vektor obsahuje gen pro rezistenci na kanamycin. Navíc je mezi *att* místy krom sekvence pro *ccdB* toxin umístěn také gen pro rezistenci na chloramfenikol, kterou vzniklý entry klon postrádá. Entry klonu je tedy ponechána rezistence pouze na kanamycin, proto je navazující selekce transformantů, kteří obsahují správný vektor, jednoznačná.

BP reakce

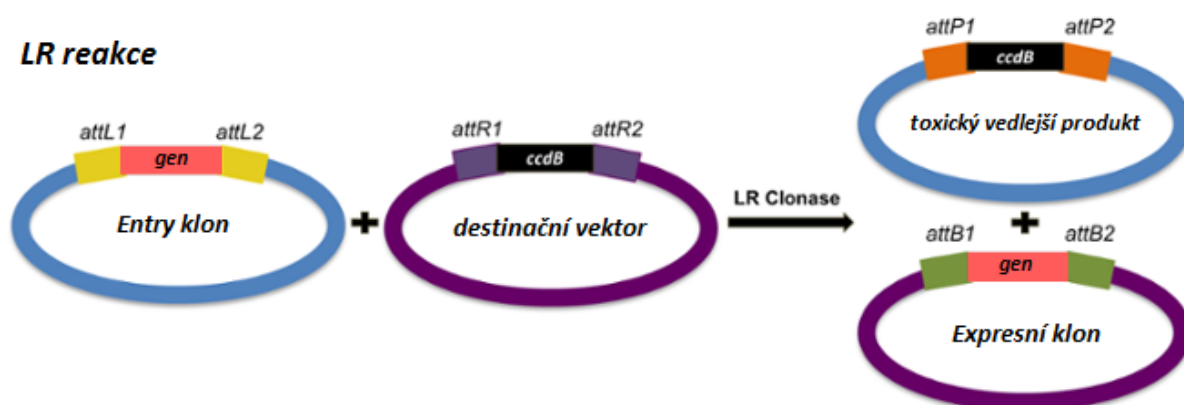


Obrázek 10: Schéma BP reakce; Převzato a upraveno z: [68]

2.3.2.4 LR reakce

LR reakce je rekombinační reakce *attL* a *attR* míst, katalyzovaná v Gateway systému enzymatickým mixem LR Clonase, obsahujícím *Int*, IHF a *Xis*. Entry klon, získaný v BP reakci, je dále použit v LR reakci společně s destinačním vektorem za vzniku expresního klonu, který opět obsahuje *attB* místa. Schéma LR reakce je uvedeno na obrázku 11. Expresní klon je po sekvenaci hotovým vektorem, obsahujícím krom žádané sekvence i další volitelné oblasti v závislosti na použitém destinačním vektoru [75].

LR reakce



Obrázek 11: Schéma LR reakce; Převzato a upraveno z: [68]

Volba destinačního vektoru závisí na typu expresního systému či typu navazujícího postupu. K dispozici je celá řada komerčních destinačních vektorů, použitelných krom bakteriálních systémů i v různých savčích, kvasinkových nebo hmyzích systémech, s odlišnými typy značení, odlišnými promotory či s rezistencí na různá antibiotika.

Podobně, jako u BP reakce je i po LR reakci důležitá pozdější selekce transformantů se správně naklonovanou sekvencí v plazmidu. Gen kódující toxin *ccdB* a gen pro rezistenci na chloramfenikol jsou v destinačním vektoru umístěny stejně, jako v donorovém vektoru, rozdílem je však gen pro rezistenci na ampicilin (donorový vektor obsahuje gen pro rezistenci na kanamycin), který ve vektoru zůstává i po rekombinaci na expresní klon. Vznikající vedlejší produkt (zbytek entry klonu) získá gen pro produkci toxinu *ccdB* i gen pro rezistenci na chloramfenikol. Buňky, které tento vedlejší produkt získají při pozdější transformaci, umírají [65, 75].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíl práce

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo:

- příprava sekvencí kódujících 12 izoforem proteinu p53, a to pomocí Polymerázové řetězové reakce
- Gateway klonování – v BP reakci příprava entry klonů pro každou z izoforem proteinu p53, v LR reakci přípravu expresních klonů pro produkci proteinů
- ověření správnosti jednotlivých klonů sekvenováním
- afinitní izolace proteinů – izoforem proteinu p53 a detekce těchto izoforem pomocí SDS-PAGE a Westernového přenosu

3.2 Seznam použitých materiálů

3.2.1 Enzymy

- Gateway BP Clonase II Enzyme Mix; Thermo Fischer Scientific
- Gateway LR Clonase II Enzyme Mix; Thermo Fischer Scientific
- Herculase II Fusion DNA Polymerase + 5× Herculase II Reaction Buffer; Agilent Technologies
- Proteinase K (2 µg/µl); Thermo Fischer Scientific

3.2.2 Primery

- Genově specifický forward primer *TEV-p53(CDS-1)-F* (100 mM):
5'-GGC TCT GAG AAC CTG TAC TTC CAG AGC ATG GAG GAG CCG CAG TCA
GAT C-3'
- Genově specifický forward primer *TEV-p53(CDS-40)-F* (100 mM):
5'-GGC TCT GAG AAC CTG TAC TTC CAG AGC ATG GAT GAT TTG ATG CTG
CT-3'
- Genově specifický forward primer *TEV-p53(CDS-133)-F* (100 mM):
5'-GGC TCT GAG AAC CTG TAC TTC CAG AGC ATG TTT TGC CAA CTG GCC
AA-3'
- Genově specifický forward primer *TEV-p53(CDS-160)-F* (100 mM):
5'-GGC TCT GAG AAC CTG TAC TTC CAG AGC ATG GCC ATC TAC AAG CAG
TC-3'
- Genově specifický reverse primer *p53(CDS-α)-STOP-GW-R* (100 mM):
5'-GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTC AGT CTG AGT CAG GCC CTT-3'
- Genově specifický reverse primer *p53(CDS-β)-STOP-GW-R* (100 mM):
5'-GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTT AAC AAT TTT CTT TTT GAA AGC
TGG TCT GGT CCT GAA GGG TGA AAT ATT CTC-3'
- Genově specifický reverse primer *p53(CDS-γ)-STOP-GW-R* (100 mM):
5'-GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTT ACG AGT TTA TCA GGA AGT AAC
ACC ATC GTA AGT CAA GTA GCA TCT GAA GGG TGA AAT ATT CTC-3'
- attB1-TEV-F forward primer (100 mM)
- attB2-R reverse primer (100 mM)
- M13 -20 forward primer (100 mM)
- M13 reverse primer (100 mM)
- T7 forward primer (100 mM)
- T7 reverse primer (100 mM)

3.2.3 Kompetentní buňky

- BL21 CodonPlus Competent cells, *E. coli*; Agilent Technologies
- One Shot Stbl3 Chemically Competent *E. coli*; Thermo Fischer Scientific
- One Shot ccdB Survival 2 T1^R Competent Cells, *E. coli*; Thermo Fischer Scientific

3.2.4 Plazmidy

- pCMVp53wt – darováno MUDr. Petrem Müllerem, Ph.D., RECAMO MOÚ
- Gateway pDONR221 Vector; Thermo Fischer Scientific
- Gateway pDEST17 Vector; Thermo Fischer Scientific
- pENTR-gus positive control; Thermo Fischer Scientific

3.2.5 Ostatní materiál

- DNA Žebříček 1 kb DNA Ladder; New England Biolabs
- DNA Žebříček 100 bp DNA Ladder; New England Biolabs
- Částice pro afinitní izolaci TALON Metal Affinity Resins; Clontech Laboratories
- ECL Western Blot detection kit; GE Healthcare
- Fluorescenční barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x; Biotium
- Izolační kit NucleoSpin Plasmid NoLid; Macherey-Nagel
- Izolační kit Isolate II Plasmid Mini Kit; Bioline
- Kolony Econo-Pac Chromatography Columns 10 ml; Bio-Rad
- Magnetické kuličky Sera-Mag SpeedBeads carboxylated protein A/G particles GE Healthcare; Sigma-Aldrich
- Proteinový žebříček Spectra Multicolor Broad Range Protein Marker 10–260 kDa; Thermo Fischer Scientific
- Protilátka Anti-polyHistidine (myší), ředění 1:3 000; Sigma-Aldrich
- Protilátka Anti-mouse IgG peroxidase (kozí); ředění 1:10 000; Sigma-Aldrich
- Purifikační kit NucleoSpin Gel&PCR Clean-up; Macherey-Nagel
- Purifikační kit QIAQuick Gel Extraction kit (50); Quiagen
- Směs nukleotidů dNTPs (100 mM; 25 mM jednotlivé dNTP); Agilent Technologies
- Tablety cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich

3.2.6 Chemikálie

- Agar; Oxoid
- Agaróza; Serva
- Akrylamid; AppliChem
- Ampicilin; BB Pharma
- APS; Sigma-Aldrich
- Betaine; Sigma-Aldrich
- činidlo Bradfordové; Serva
- Bromfenolová modř; Lachema
- Chloramfenikol; Duchefa Biochemie
- CaCl₂; Sigma-Aldrich
- EDTA; Lachema
- Etanol; Penta

- Glycerol; Serva
- Glycin, Serva
- Glukóza; Sigma-Aldrich
- Imidazol; Sigma-Aldrich
- IPTG; Sigma-Aldrich
- Kanamycin; Duchefa Biochemie
- KCl; Sigma-Aldrich
- KH_2PO_4 ; Duchefa Biochemie
- Kvasinkový Extrakt; Duchefa Biochemie
- Kyselina octová; Penta
- Metanol; Penta
- MgCl_2 ; Sigma-Aldrich
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Lach-Ner
- Na_2HPO_4 ; Lach-Ner
- NaCl; Penta
- Ponceau S; Sigma-Aldrich
- Sacharóza; Serva
- SDS; Serva
- Sušené mléko odtučněné; Laktino
- TEMED; Sigma-Aldrich
- Tris; Duchefa Biochemie
- Trypton; Duchefa Biochemie
- Xylencyanolová violet'; Sigma-Aldrich
- ZnSO_4 ; Sigma-Aldrich
- β -merkaptoetanol; Merck

3.2.7 Seznam použitých přístrojů, aparatur a pomůcek

- Analytické váhy XS 105 Dual Range, Mettler Toledo
- Autokláv Microjet Personal microwave autoclave; Enbio
- Biologický termostat BT-120M; Laboratorní přístroje Praha
- Centrifuga 5804R; Eppendorf
- Centrifuga Avanti J-30 I; Beckman
- Centrifuga Mini Spin plus; Eppendorf
- Detekční systém ILU-1, Herolab
- Elektroforetická aparatura Mini-Sub Cell GT; Bio-Rad
- Elektroforetická aparatura Mini Protean Tetra Cell System; Bio-Rad
- ELISA reader Synergy H1 Hybrid Multi-mode Reader; BioTek
- Chemiluminiscenční systém LAS 3000; FUJIFILM (Western)
- Inkubátor Innova 44; New Brunswick Scientific
- Mechanický homogenizátor Pellet mixer; VWR
- Mikrovlnná trouba SMW 3717; Sencor
- Míchačka MSH-30A; WiseStir
- Naklánědlo Multi RS-60; Biosan
- Termocyklér PCR cycler PTC-200; MJ Research

- pH metr 213; Hanna Instruments
- Sonikátor; Dynatech
- Spektrofotometr NanoDrop 1000; Thermo Scientific
- Spektrofotometr Specord 200 Plus; Analytik Jena
- Termoblok QBT2; Grant Instruments
- Termoblok Thermomixer comfort 1,5 ml; Eppendorf
- Transiluminátor UVT-28MP; Herolab
- Třepačka Orbital shaker incubator ES-20; Biosan
- UV Water Purification Systém; Synergy
- Váhy TE 412; Sartorius
- Vortex Genie-2; Scientific Industries
- Vortex IKA 4 digital; IKA
- Zdroj napětí PowerPac 300; Bio-Rad
- Zdroj napětí PowerPac 1000; Bio-Rad
- Zdroj napětí PowerPac Basic; Bio-Rad

3.3 Příprava roztoků, pufrů, medií

- Akrylamid pro SDS-PAGE, 10%, 300 ml 75 ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 19:1), 112 ml 1M Tris (pH 8,8), 1,5 ml 20% dodecylsírany sodného (SDS) + 111,5 ml Milli-Q H₂O
- Akrylamid pro SDS-PAGE, 5%, 100 ml 12,5 ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 19:1), 12,5 ml 1M Tris (pH 6,8), 0,5 ml 20% dodecylsírany sodného (SDS) + 74,5 ml Milli-Q H₂O
- Barvicí roztok Coomassie Blue 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % metanol, 10% kyselina octová; doplněno Milli-Q H₂O
- Blokovací roztok 1x PBS, 5 % sušené mléko odtučněné
- Blotovací pufr, 10x, 1 l 30,3 g Tris, 145 g glycin + Milli-Q H₂O; Pracovní roztok byl připraven smícháním 1 dílu pufru, 1 dílu metanolu a 8 dílů Milli-Q H₂O
- Eluční pufr 500 mM imidazol, 20 mM Tris (pH 8), 500 mM NaCl, 1 mM β-merkaptóetanol, 5 % glycerol, doplněno Milli-Q H₂O
- LB médium, 200 ml 2 g NaCl, 2 g Trypton, 1 g Kvasinkový extrakt, pH 7, doplněno Milli-Q H₂O; pevné LB médium: + 2,8 g agar
- Lyzační pufr, 1 l 5 mM imidazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1 % Triton X-I 00, 1 mM β-merkaptóetanol, doplněno Milli-Q H₂O, pH 8
- Nanášecí pufr LB, 6x 40 % sacharóza, 0,2 % bromfenolová modř, 0,2 % xylencyanolová violet, doplněno Milli-Q H₂O

- Nanášecí pufr CSB pro SDS-PAGE, 5x 0,25M Tris + 8 % SDS + 40 % glycerol + 8 % β -merkaptoetanol + 0,4 % bromfenolová modř, doplněno Milli-Q H₂O
- Odbarvovací roztok Destain 40 % metanol, 10 % ledová kyselina octová, doplněno Milli-Q H₂O
- PBS, 10x, 1 l 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, doplněno Milli-Q H₂O; Pracovní roztok byl připraven smícháním 1 dílu pufru a 9 dílů Milli-Q H₂O
- Promývací pufr, 1 l 10 mM imidazol, 20 mM Tris (pH 8), 500 mM NaCl, 1 mM β -merkaptoetanol, 5 % glycerol, doplněno Milli-Q H₂O
- Pufr pro SDS-PAGE, 10x, 1 l 30,3 g Tris, 144,2 g glycin; 10 g SDS, doplněno Milli-Q H₂O
- SOC médium, 100 ml 2 g Trypton, 0,5 g Kvasinkový extrakt, 1 ml 1M NaCl, 25 ml 1M KCl, 2 ml 1M glukóza, 1ml 1M MgCl₂, 1 ml 1M MgSO₄, doplněno Milli-Q H₂O
- TAE pufr, 50x, 1 l 242 g Tris p.a., 18,6 g EDTA, 57,1 ml kyselina octová, doplněno Milli-Q H₂O
- TE pufr, 1x 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, doplněno Milli-Q H₂O, pH 8
- Vazebný pufr, 1 l 5 mM imidazol, 20 mM Tris (pH 8), 500 mM NaCl, 1 mM β -merkaptoetanol, 5 % glycerol, doplněno Milli-Q H₂O

3.4 Metody

3.4.1 Příprava inzertů pro Gateway klonování pomocí PCR

Před samotným Gateway klonováním bylo připraveno celkem 12 inzertů pomocí dvou navazujících polymerázových řetězových reakcí (PCR).

První PCR byla provedena s genově specifickými primery pro sekvence kódující izoformy proteinu p53, na jejichž okrajích byla napojena sekvence nukleotidů specifických pro *att* místa. Ve druhé, adapterové PCR provedené s komerčními *attB* primery vznikly produkty ohraničené dvěma *attB* místy.

3.4.1.1 První PCR

Jako forward a reverse primery pro první PCR byly pro jednotlivé izoformy použity navržené genově specifické primery, jejichž dvojice jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled použitých forward a reverse primerů v první PCR

Reakce	Izoforma	Forward primer	Reverse primer
1	p53 α	TEV-p53(CDS-1)	p53(CDS- α)-STOP
2	p53 β		p53(CDS- β)-STOP
3	p53 γ		p53(CDS- γ)-STOP
4	Δ 40p53 α	TEV-p53(CDS-40)	p53(CDS- α)-STOP
5	Δ 40p53 β		p53(CDS- β)-STOP
6	Δ 40p53 γ		p53(CDS- γ)-STOP
7	Δ 133p53 α	TEV-p53(CDS-133)	p53(CDS- α)-STOP
8	Δ 133p53 β		p53(CDS- β)-STOP
9	Δ 133p53 γ		p53(CDS- γ)-STOP
10	Δ 160p53 α	TEV-p53(CDS-160)	p53(CDS- α)-STOP
11	Δ 160p53 β		p53(CDS- β)-STOP
12	Δ 160p53 γ		p53(CDS- γ)-STOP

U první PCR byla pro každou z izoform připravena reakční směs o celkovém objemu 25 μ l dle tabulky 2. Primery byly z původní koncentrace 100 mM 10x naředěny na 10 mM. Templátem byl plazmid pCMVp53wt, obsahující plnou sekvenci p53wt, naředěný na koncentraci 1 ng- μ l⁻¹. Pro zvýšení efektivity amplifikace byl do reakční směsi přidán Betaine, který napomáhá snadnější denaturaci DNA při vyšším obsahu GC párů v templátu.

Polymeráza byla do reakční směsi pipetována jako poslední, až po nahřátí zbytku reakční směsi v termocykléru na 95°C. Podmínky jednotlivých fází první PCR jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 2: Složky reakční směsi v první PCR; celkový objem 25 μ l

Složka první PCR	Objem [μ l]
Templát: plazmid pCMVp53wt [$1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	0,5
Forward primer [10 mM]	0,5
Reverse primer [10 mM]	0,5
Pufř: Herculase, 5x	5
Směs dNTPs	2,5
Betaine [5 M]	2,5
H ₂ O – MilliQ, ultračistá	13
Polymeráza: Herculase II Fusion	0,5

Tabulka 3: Podmínky první PCR

	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]	
Počáteční denaturace	95	30	25 cyklů
Denaturace	95	15	
Hybridizace	55	30	
Elongace	72	60	
Konečná teplota	12	-	

3.4.1.2 Agarózová gelová elektroforéza

Produkty první PCR byly ověřeny pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu o objemu 150 ml. 1,5 g agarózy bylo rozpuštěno v 150 ml 1x TAE pufřu. Po rozvaření a ochlazení gelu bylo přidáno barvivo GelRed v poměru 1:50 000. Vzorky byly na gel nanášeny ve směsi s vodou o celkovém objemu 12 μ l, a to 1 μ l PCR směsi a 9 μ l vody, společně s 2 μ l nanášecího LB pufřu. Pro kontrolu velikosti PCR produktů byl použit 100 bp DNA žebříček s rozsahem 100 – 1 517 bp. Agarózová elektroforéza probíhala při 120 V po dobu 45 minut.

3.4.1.3 Přečištění PCR produktů po první PCR

Zbytky PCR směsi byly po ověření na agarózovém gelu přečištěny za pomoci magnetických částic. 20 μ l PCR produktu bylo smícháno s 20 μ l částic a směs byla ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byly zkumavky se směsí vloženy do magnetického stojánu. Po uplynutí 10 minut a přilnutí částic s navázanou DNA k stěně zkumavky byl opatrně odpipetován zbylý roztok. Částice ve zkumavkách byly následně mimo magnetický stojánek dvakrát promyty 100 μ l TE pufřu a po oschnutí k nim bylo přidáno 50 μ l elučního EB pufřu. Zkumavky byly dobře promíchány a vloženy opět do stojánu. Po usazení částic byly jednotlivé roztoky obsahující vyeluovanou DNA odpipetovány do nových zkumavek, byla jim spektrofotometricky změřena koncentrace pomocí přístroje NanoDrop a byly použity jako templáty pro druhou, adaptivou PCR.

3.4.1.4 Druhá, adapterová PCR

V druhé PCR byly použity komerční, adapterové *attB* primery, nasedající na komplementární sekvence v primerech použitých v první PCR. Jejich koncentrace byla 10 mM. Jako templáty byly použity purifikované produkty z první PCR, vždy naředěné na 1 ng·μl⁻¹. Složení reakční směsi druhé PCR je uvedeno v tabulce 4, podmínky druhé PCR jsou uvedeny v tabulce 5. Polymeráza byla opět do směsi pipetována nakonec, až po nahřátí termocykléru na 95°C.

Tabulka 4: Složky reakční směsi v druhé, adapterové PCR, celkový objem 25 μl

Složka druhé, adapterové PCR	Objem [μl]
<i>Templát:</i> produkty první PCR (12 reakcí, [1 ng·μl ⁻¹])	1
<i>Forward primer:</i> GW-TEV [10 mM]	1,5
<i>Reverse primer:</i> GW-attB2 [10 mM]	1,5
<i>Pufř:</i> Herculase, 5x	5
Směs dNTP	2,5
Betaine [5 M]	2,5
H ₂ O – MilliQ, ultračistá	10,5
<i>Polymeráza:</i> Herculase II Fusion	0,5

Tabulka 5: Podmínky druhé, adapterové PCR

	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace	95	60
Hybridizace	50	30
Elongace	72	60
Denaturace 2	95	15
Hybridizace 2	55	30
Elongace 2	70	60
Elongace 3	72	320
Konečná teplota	12	-

24 cyklů

3.4.1.5 Agarózová gelová elektroforéza

Velikosti produktů po druhé PCR byly ověřeny pomocí agarózové gelové elektroforézy. Byl připraven 1% gel o objemu 150 ml. Na gel bylo pipetováno 15 μl reakční směsi společně s 3 μl nanášecího LB pufřu. Agarózová elektroforéza probíhala při 90 V po dobu 60 minut.

3.4.1.6 Přečištění PCR produktů po druhé, adapterové PCR

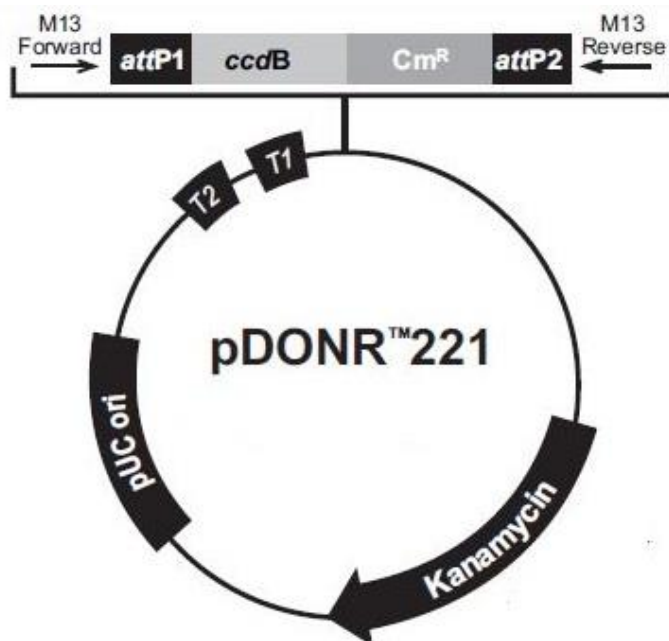
12 jednotlivých PCR produktů bylo vyřezáno z gelu, vloženo do zkumavek a následně přečištěno pomocí purifikačního kitu QIAquick Gel Extraction.

Gelové fragmenty byly ve zkumavkách zváženy a poté k nim byl přidán QG pufr v poměru 3:1, a to k původní hmotnosti fragmentu. Po přidání pufru byly zkumavky míchány na termobloku o teplotě 50 °C při 250 rpm po dobu 15 minut. Následně byl ke směsi přidán isopropanol v poměru 1:1 k původní hmotnosti fragmentu, dále byl v poměru 1:1 přidán acetátový pufr a obsah zkumavek byl převeden do kolonek posazených na odsávacím zařízení. Kolony byly převrstveny 500 µl vazebného PB pufru, následně dvakrát promyty 800 µl promývacího PE pufru a uloženy do nových zkumavek. Poté byly kolony převrstveny 40 µl elučního pufru, byly 5 minut ponechány k inkubaci při laboratorní teplotě a následně centrifugovány při 11,000 x g. Všem přečištěným produktům byla změřena koncentrace přístrojem NanoDrop.

3.4.2 Gateway klonování

3.4.2.1 Příprava entry klonu – BP reakce

12 přečištěných PCR produktů bylo použito jako inzert při rekombinační BP reakci. Jako donorový vektor byl použit pDONR221 (Obrázek 12). Během BP reakce se *attB*₁ a *attB*₂ místa obsažená v námi připraveném PCR produktu rekombinují s *attP*₁ a *attP*₂ místy umístěnými v donorovém vektoru za vzniku *attL* míst. Do donorového vektoru se začlení PCR fragment, tím vznikne požadovaný entry klon, a zároveň se z *attP* míst vyštěpí sekvence, která obsahuje gen kódující toxický *ccdB* produkt. V Gateway systému tento toxický produkt zajistí krom antibiotika i další, negativní selekci – přežijí buňky, které obsahují úspěšně rekombinovaný entry klon, a buňky, které obsahují nerekombinovaný donorový vektor, umírají.



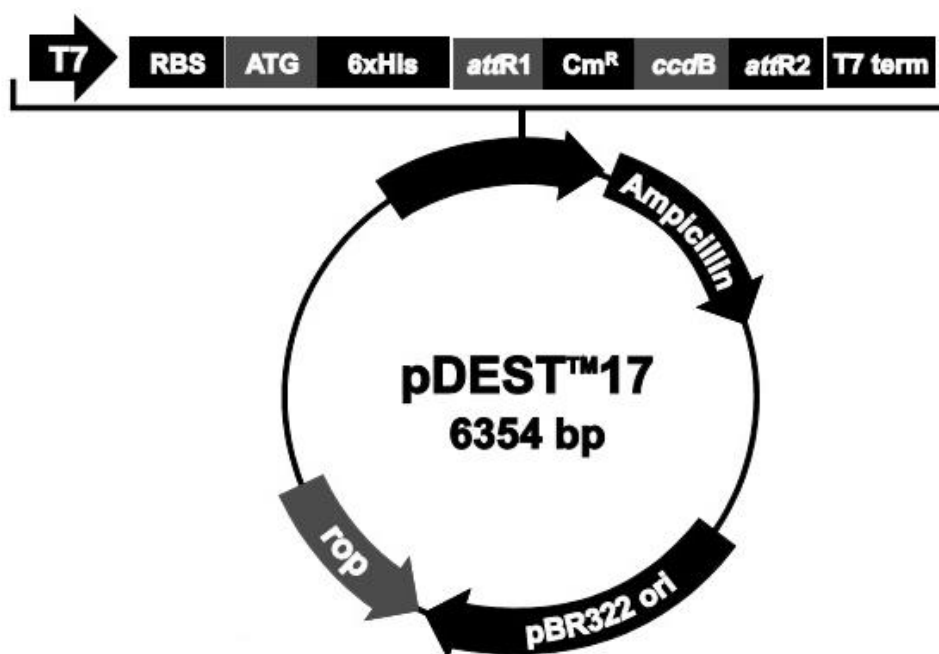
Obrázek 12: Mapa použitého donorového vektoru, pDONR221, se znázorněním attP míst

BP reakce byly vždy připraveny smícháním molárně odpovídajícího množství inzertu a donorového vektoru. 50 ng inzertu (přečištěného PCR produktu) a 150 ng donorového vektoru bylo smícháno a doplněno TE puftrem (pH 8) do 8 µl. Poté byly k reakci přidány 2 µl enzymu BP Clonase Enzyme Mix II a směs byla po promíchání inkubována přes noc při teplotě 25 °C. Následující den byl ke směsi přidán 1 µl proteinázy K pro inhibici enzymu BP Clonase a vzorky byly inkubovány 10 minut v termobloku o teplotě 37 °C.

Po BP reakci se výsledný izolovaný plazmid nazývá entry klon, který může být jednodrokově překlonován do jakéhokoliv expresního systému pomocí LR reakce. 5 µl reakční směsi po BP reakci bylo transformováno do buněk STBL3 pro ověření úspěšnosti reakce. Postup transformace je uveden v kapitole 3.4.4. Po úspěšné transformaci a přenosu kolonie do tekutého LB média byla provedena izolace plazmidové DNA, jejíž postup je uveden v kapitole 3.4.5.

3.4.2.2 Příprava expresního klonu – LR reakce

Po úspěšné izolaci a sekvenaci plazmidové DNA připraveného entry klonu byla provedena LR reakce, která je svým principem i podmínkami velmi podobná BP reakci. Vzniklá *attL* místa v entry klonu se rekombinují s *attR* místy v destinačním vektoru, a to za opětovného vzniku vedlejšího produktu s *ccdB* genem, užitečným pro selekci buněk. Jako destinační vektor byl použit pDEST17 (Obrázek 13), obsahující 6xHisTag kotvu, důležitou pro pozdější afinitní izolaci proteinů a jejich imunodetekci Westernovým přenosem.



Obrázek 13: Mapa použitého destinačního vektoru, pDEST17, se znázorněním *attR* míst

Reakce byly vždy připraveny smícháním molárně odpovídajícího množství entry klonu a destinačního vektoru. 150 ng entry klonu a 300 ng destinačního vektoru bylo smícháno a doplněno TE pufrém (pH 8) do celkového objemu 8 µl. Po promíchání byly ke směsi přidány 2 µl enzymu LR Clonase Enzyme Mix II a směs byla zvortexována a inkubována přes noc při 25 °C. Jako pozitivní kontrola byl místo entry klonu použit komerční plazmid pENTR-gus, a to v množství 100 ng (2 µl).

Následující den byla ke směsi přidána proteináza K v objemu 1 µl a po promíchání byla směs umístěna na termoblok o 37 °C na 10 minut. Poté bylo 7 µl reakční směsi transformováno do buněk STBL3, postup transformace je uveden v kapitole 3.4.4. Plazmid získaný rekombinací v průběhu LR reakce se nazývá Expresní klon. Po úspěšné transformaci a přenosu kolonie do tekutého LB média byla provedena izolace plazmidové DNA z buněk STBL3, jejíž postup je uveden v kapitole 3.4.5. Po izolaci čistého expresního klonu v dostatečném množství mohla být provedena transformace i do buněk BL-21 CodonPlus, které slouží pro produkci proteinů. Postup produkce a izolace proteinů je uveden v kapitole 3.4.6.

3.4.3 Příprava kompetentních buněk

Před transformací buněk bylo nutno připravit zásobní kompetentní buňky. Uvedení buněk do kompetentního stavu probíhá zvýšením propustnosti plazmatické membrány buněk pomocí ledového chloridu vápenatého.

Zásobní kompetentní buňky uchované při -80°C byly použity k zaočkování 10 ml LB média bez antibiotika. Kultura byla inkubována přes noc na třepačce při 160 rpm a 37°C . Následující den byl 1 ml kultury použit k inokulaci 50 ml LB média bez antibiotika a kultura byla inkubována po dobu minimálně tří hodin, dokud nedosáhla optické hustoty $\text{OD}_{550} = 0,5-0,7$. Optická hustota byla měřena spektrofotometricky na přístroji Specord 200 Plus. Po dosažení požadované optické hustoty byla kultura převedena do vychlazených zkumavek o objemu 50 ml a inkubována 10 minut na ledu. Následovala centrifugace při 4°C , 6 000 x g po dobu 10 minut, supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 10 ml vychlazeného 0,1M roztoku chloridu vápenatého. Poté byla směs inkubována na ledu 25 minut a znovu centrifugována při 4°C , 6 000 x g po dobu 10 minut. Po odlití supernatantu byl pelet resuspendován v 1 ml 0,1M roztoku chloridu vápenatého a ke směsi bylo navíc přidáno 0,2 ml 80% sterilního glycerolu. Po opatrném promíchání byla směs rozdělena do zkumavek, zmrazena v kapalném dusíku a uchována v mrazícím boxu o teplotě -80°C pro pozdější použití.

3.4.4 Transformace

Po Gateway klonování, tedy po každé BP, respektive LR reakci byla provedena transformace plazmidové DNA teplotním šokem do kompetentních buněk. Stejný postup, uvedený níže, byl použit i pro získání většího množství donorového – pDONR221, či destinačního – pDEST17 plazmidu pro další experimenty a také před zahájením produkce proteinů.

Po Gateway klonování byly na transformaci použity kompetentní buňky STBL3, pro získání většího množství samotných plazmidů pDONR221 a pDEST17 byly použity buňky One Shot ccdB Survival 2T1^R, obsahující gen pro rezistenci na toxin ccdB. Pro produkci proteinů byly použity buňky BL21-CodonPlus.

K 50 μl rozmražených kompetentních buněk bylo přidáno 50 ng plazmidové DNA. U Gateway klonování bylo přidáno 5-7 μl reakční směsi, další postup byl stejný. Zkumavka se směsí byla následně 30 minut inkubována na ledu, poté byl proveden teplotní šok. Zkumavka byla na 40 vteřin vložena do termobloku o teplotě 42°C , u buněk BL21-CodonPlus trval teplotní šok pouze 25 vteřin. Po teplotním šoku byla zkumavka přemístěna na 2 minuty na led a následně byl ke směsi přidán 1 ml SOC média, předehřátého na 37°C . Po mírném promíchání byla zkumavka uložena k inkubaci do termobloku o 37°C a 250 rpm na 1 hodinu.

Po inkubaci byla směs buněk centrifugována při 0,1 x g, přebytek SOC média byl slit a zbylý objem buněk (cca 120 μl) byl rozprostřen na Petriho misku s LB médiem a příslušným antibiotikem, ředěným do média v poměru 1: 1 000. Použitým antibiotikem byl v závislosti na použitém plazmidu buď ampicilin, kanamycin, chloramfenikol, či jejich kombinace. Konkrétní přehled použití obsahuje tabulka 6.

Tabulka 6: Přehled použitých buněk a antibiotik u provedených transformací buněk

	Buňky	Rezistence	Pracovní koncentrace ATB [mg·ml ⁻¹]
Produkce plazmidové DNA – pDONR221	One Shot ccdB Survival 2T1 ^R	KAN + CAM	KAN: 100 CAM: 34
Produkce plazmidové DNA – pDEST17		AMP + CAM	AMP: 100 CAM: 34
Ověření BP reakce	STBL3	KAN	100
Ověření LR reakce		AMP	100
Produkce proteinů	BL-21 CodonPlus	AMP + CAM	AMP: 100 CAM: 34

Petriho misky byly uloženy do inkubátoru o 37 °C na 12 hodin. Jedna kolonie z Petriho misky byla následující den křížovým roztěrem přeočkována na novou Petriho misku s příslušným antibiotikem a miska byla opět ponechána přes noc k inkubaci. Jedna kolonie z křížového roztěru byla použita k zaočkování tekutého LB média s příslušným antibiotikem pro izolaci plazmidové DNA či pro izolaci proteinů.

3.4.5 Izolace plazmidové DNA

5 ml zaočkovaného LB média s ampicilinem bylo přes noc ponecháno na třepače při 140 rpm o 37 °C, následující den bylo z kultury odebráno 500 µl, doplněno 713 µl 70% glycerolu a po důkladném promísení byla kultura uložena do hlubokomrazícího boxu na -80°C jako zásobní.

Zbytek narostlé kultury byl centrifugován při 11,000 x g po dobu 60 vteřin a pro izolaci a purifikaci plazmidové DNA z buněk STBL3 byl použit kit NucleoSpin Plasmid NoLid. Všechny další centrifugační kroky byly dle protokolu k zmíněnému kitu provedeny při 11,000 x g.

Po odlití supernatantu bylo pro zahájení buněčné lyze k peletu přidáno 250 µl roztoku A1 obsahujícího RNázu A. Směs byla před přidávkem 250 µl roztoku A2 důkladně vortexována a rozsuspendována. Směs byla následně opatrně promíchána a poté ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 300 µl modrého roztoku A3 a směs byla opět opatrně promíchávána, dokud neutralizací nezměnila barvu z modré na průzračnou s bílými, vysráženými proteiny a chromozomální DNA. Po 5minutové centrifugaci byl supernatant opatrně převeden do kolony se silika membránou, usazené v sběrné zkumavce. Následovala centrifugace 1 minutu, obsah sběrné zkumavky byl vylit do odpadu a membrána byla promyta 600 µl roztoku A4 obsahujícího ethanol. Po opětovné centrifugaci a slití odpadního roztoku byla kolona centrifugací vysušena, přemístěna do 1,5 ml zkumavky a převrstvena 50 µl elučního pufru. Před použitím byl eluční pufr inkubován při 70 °C. Kolona s elučním pufrem byla inkubována při stejné teplotě další 2 minuty. Po 2minutové centrifugaci byla změřena koncentrace izolované plazmidové DNA spektrofotometricky, pomocí přístroje NanoDrop.

3.4.5.1 Příprava vzorku DNA na sekvenaci

Dle změřené koncentrace byly vzorky zředěny na koncentraci 100 ng·µl⁻¹. 5 µl takto připraveného vzorku bylo smícháno s potřebným forward, respektive reverse primerem

v objemu 5 μ l o koncentraci 5 μ M. Použitými primery byly u pDONR221 a u entry klonů M13 -20 forward primer a M13 reverse primer, u pDEST17 a expresních klonů T7 forward a T7 reverse primer.

Vzorek byl odeslán firmě GATC Biotech provádějící Sangerovo sekvenování a výsledek sekvenace byl analyzován pomocí programu CLC Sequence Viewer 7.

3.4.6 Produkce a izolace proteinů

3.4.6.1 Kultivace bakterií

Pro izolaci proteinů byly použity transformanty buněk BL-21 CodonPlus obsahující expresní klony – plazmidy pDEST17 se sekvencí kódující izoformu proteinu p53, připravené pomocí Gateway klonování.

Zásobní kulturou těchto transformantů bylo zaočkováno 25 ml LB média obsahujícího ampicilin a chloramfenikol a tato startovací kultura byla ponechána k inkubaci přes noc při 120 rpm a 37 °C. Následující den byla startovací kultura přelita do 1 l LB média, opět obsahujícího ampicilin a chloramfenikol, a do média byl přidán i síran zinečnatý v potřebném objemu pro finální koncentraci 50 μ M ZnSO₄ v médiu. Zinek je potřeba přidat kvůli správnému sbalení proteinu p53. Kultura byla umístěna na třepačku při 120 rpm a 37 °C a byla u ní pravidelně spektrofotometricky měřena optická hustota na přístroji Specord 200 Plus. Po dosažení požadované optické hustoty OD₆₀₀ = 0,7-1,0 (cca 6 hodin) byl odebrán 1 ml kultury, a to jako kontrolní vzorek před indukcí produkce proteinů pro pozdější detekci na polyakrylamidovém gelu.

Dále byl ke kultuře přidán 1 ml 1M IPTG pro indukcí produkce proteinů a kultura byla přemístěna k inkubaci přes noc na třepačku se 120 rpm a 16 °C. Následující den byl z kultury opět odebrán 1 ml, jako kontrola po indukcí produkce proteinů, a kultura byla centrifugována při 4 °C, 6 500 x g po dobu 20 minut.

3.4.6.2 Lyze buněk

K buněčnému peletu po centrifugaci bylo přidáno 40 ml lyzačního pufru obsahujícího rozpuštěnou tabletu inhibitoru proteáz. Pelet byl v pufru rozsuspendován a následně sonikován při 4 °C po dobu 30 vteřin, celkem v deseti opakováních s 30vteřinovou pauzou mezi jednotlivými sonikacemi. Směs byla centrifugována při 4 °C, 14 000 x g, 30 minut. Ze supernatantu bylo odebráno 200 μ l jako třetí kontrola pro pozdější detekci proteinu, supernatant byl přelit do vychlazených zkumavek a pelet, obsahující nerozpustný protein, byl vyhozen.

3.4.6.3 Izolace proteinů

Protein byl izolován pomocí afinitní chromatografie za využití částic TALON Metal Affinity Resins od firmy Clontech. 4 ml těchto částic byly přidány k 40 ml vazebného pufru, směs byla dobře promíchána a centrifugována při 2 000 x g, po dobu 5 minut. Vazebný pufr byl odlit a k promytým částicím byl přidán supernatant z buněčné lyze. Proteiny se na částice vázaly při 4 °C po dobu 1 hodiny.

Následující centrifugace vždy probíhaly při 4 °C, 2 000 x g, 5 minut a po každé z nich byl odebrán 200 μ l kontrolní vzorek pro pozdější detekci exprimovaného proteinu na polyakrylamidovém gelu. Po 1. centrifugaci a slití supernatantu bylo přidáno 40 ml vazebného pufru, následovalo promíchání a 2. centrifugace, slití, přidání 40 ml promývacího

pufru, promíchání a 3. centrifugace. Po 3. centrifugaci byl supernatant částečně slit, zbytek směsi byl přelit do eluční kolony Econo-Pac a až vytekl zbylý promývací pufr, byl k částicím přidán postupně pětkrát 1 ml elučního pufru. Eluce probíhala ve 4 °C a celkem bylo získáno pět frakcí proteinu, které byly zmrazeny v tekutém dusíku. Před zmražením bylo z každé frakce odebráno 20 µl pro pozdější stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové a pro detekci na polyakrylamidovém gelu.

3.4.7 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Jako kalibrační křivka standardů při stanovení celkové koncentrace proteinů dle Bradfordové byla použita řada roztoků BSA v lyzačním pufru, a to v rozmezí koncentrací 0,2 – 2,0 mg·ml⁻¹.

Vzorky kalibrační řady i proteinových frakcí pro stanovení byly připraveny smícháním 100 µl činidla Bradfordové, 396 µl vody a 4 µl vzorku proteinu – roztoku BSA či proteinové frakce. Jako slepý vzorek byl použit lyzační pufr. Koncentrační řada, slepý vzorek i vzorky frakcí byly po 200 µl naneseny na 96jamkovou mikrotitrační destičku, která byla 10 minut ponechána při laboratorní teplotě a poté umístěna do ELISA čtečky, kde byla změřena koncentrace při 595 nm.

3.4.8 Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE

Pro separaci a detekci proteinů byla použita gelové elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (SDS-PAGE). Pro každý z detekovaných proteinů byly na gel umístěny dvě frakce proteinu, které měly nejvyšší koncentraci, jak bylo zjištěno při stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové. Dále byly na gel pipetovány i kontroly z průběhu lyze a izolace proteinu i 2 µl velikostního žebříčku s rozsahem 10–260 kDa. Pro každý protein byly vždy připraveny dva stejné gely, z nichž jeden byl použit pro detekci pomocí barviva Coomassie Blue a druhý byl použit pro Westernový přenos.

Nejdříve byl připraven polyakrylamidový gel skládající se ze dvou vrstev – spodní, separační vrstva, obsahovala 10% akrylamid a horní, koncentrační, obsahovala 5% akrylamid. Na přípravu spodní vrstvy bylo použito 10 ml 10% roztoku akrylamidu pro SDS-PAGE, ke kterému bylo přidáno 100 µl APS a 30 µl TEMEDu, iniciátoru polymerace. (Přídavek odpovídá 10 µl APS/1 ml gelu a 3 µl TEMED/1 ml gelu). Takto připravená a promíchaná směs byla nalita do skleněné aparatury o tloušťce 1,5 mm a převrstvena butanolem pro zamezení přístupu kyslíku. Po zatuhnutí gelu byl butanol odsát filtračním papírem a poté byla připravena horní, 5% vrstva gelu. Na koncentrační vrstvu bylo použito 3 ml 5% roztoku akrylamidu pro SDS-PAGE, 30 µl APS a 9 µl TEMEDu, po nalití byl do koncentrační vrstvy umístěn hřebínek.

Vzorky na gel byly připraveny smícháním 10 µl kontroly s 2,5 µl 5x CSB a smícháním 3 µl (1,5 µg) proteinových frakcí s 0,75 µl 5x CSB. CSB obsahuje dodecylsírán sodný a β-merkaptóetanol pro snadnější denaturaci proteinů ve vzorku. Následně byly vzorky, spolu s proteinovým žebříčkem, na 5 minut umístěny do termobloku o teplotě 95 °C pro tepelnou denaturaci proteinů.

Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické aparatury a zalit 1x elektrodočným pufrům. Po odstranění hřebínku a promytí startů byly vzorky pipetovány na gel a průběh elektroforézy měl tři fáze – 50 V po dobu 15 minut, 100 V po dobu 15 minut a 150 V po dobu 60 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a umístěn do skleněné vaničky, kde byl zalit barvivem Coomassie Blue a ponechán 30 minut na třepačce. Po zabarvení gelu bylo barvivo

slito a nahrazeno odbarvovacím roztokem Destain, který byl celkem 3x vyměněn, vanička s roztokem byla ponechána přes noc na třepačce a následující den byl gel po odbarvení naskenován.

3.4.9 Imunodetekce proteinů Westernovým přenosem

Pro imunodetekci izoformou proteinu p53 byl využit Westernový přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na speciální nitrocelulózu membránu. Westernový přenos spočívá v rozpoznání určitého proteinu ze směsi díky aplikaci specifické protilátky a uskutečňuje se v několika krocích – prvním je přenos proteinů z gelu na membránu, následuje tzv. zablokování membrány a aplikace protilátek, a nakonec proběhne samotná detekce proteinů chemiluminiscenčně.

3.4.9.1 Přenos proteinů z gelu na membránu

Po skončení SDS-PAGE byl gel se separovanými proteiny ponořen do skleněné vany zalité 1x blotovacím pufrem. Následovalo umístění komponent do speciální aparatury pro Westernový přenos, tzv. „sendviče“. Komponenty byly do aparatury ukládány v 1x blotovacím pufru a v zadaném pořadí zespodu nahoru. Nejdříve byly umístěny savé molitanové podložky, na ně 2 kusy filtračního papíru a gel. Na gel byla položena navlhčená membrána, filtrační papíry a opět molitanová podložka. Z celého systému byly odstraněny bubliny a aparatura byla společně s chladícím článkem umístěna do elektroforetické blotovací vany, která byla zalita 1x blotovacím pufrem. Aparatura byla do vany uložena tak, aby gel se záporně nabitými proteiny (obalenými SDS) směřoval k anodě. Westernový přenos probíhal při 150 mA po dobu 90 minut.

3.4.9.2 Blokování membrány

Po ukončení přenosu byla membrána vyjmuta z aparatury a ve skleněné vaně nabarvena barvivem Ponceau S pro vizuální kontrolu přenosu. Poté bylo barvivo slito, membrána byla opláchnuta destilovanou vodou a ponořena do blokovacího roztoku na třepačku o 100 rpm na 30 minut.

Při blokování se na povrch membrány naváže blokovací protein (u sušeného mléka kasein) všude tam, kde ještě není navázán náš separovaný protein přenesený z polyakrylamidového gelu. Specifická protilátka se následně naváže jen na antigen hledaného proteinu, a ne na membránu.

3.4.9.3 Detekce – aplikace protilátek

Dále byl do skleněné vany přichystán parafilm, na něj byl aplikován blokovací roztok se specifickou monoklonální primární protilátkou Anti-polyHistidine (myší), ředěnou do blokovacího roztoku v poměru 1:3 000. Na parafilm pokrytý vrstvou protilátky byla položena membrána tak, aby byly detekované proteiny v kontaktu s protilátkou.

Skleněná vana s membránou byla přes noc inkubována ve 4 °C. Následující den byl blokovací roztok s protilátkou odstraněn a membrána byla promyta celkem pětkrát v 1x PBS, vždy 5 minut při 100 rpm. Po promytí byla vana zalita 10 ml blokovacího roztoku obsahujícího polyklonální sekundární protilátku Anti-mouse IgG (kozí) s peroxidázou jako reportérovým enzymem, ředění v blokovacím roztoku bylo 1:10 000. Vana byla poté umístěna na třepačku při 100 rpm na 1 hodinu.

3.4.9.4 Analýza – snímání membrány

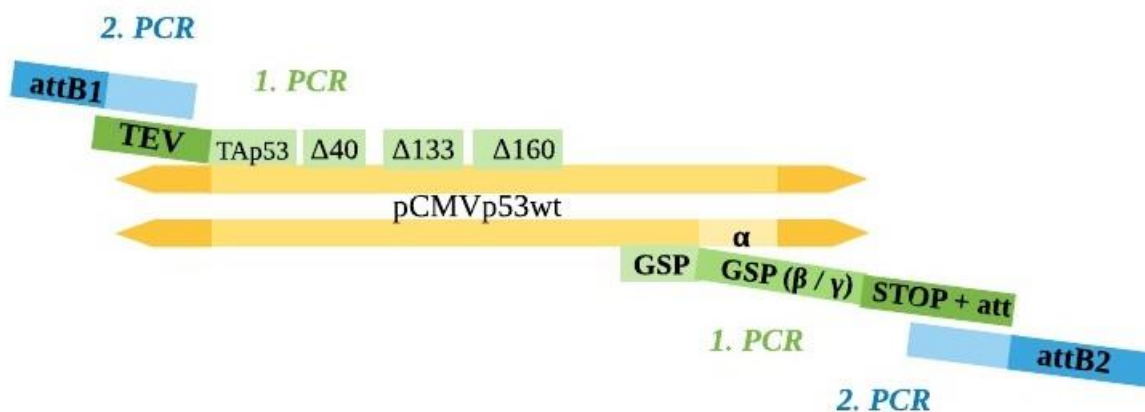
Po odstranění roztoku a opětovném pětinasobném promytí 1x PBS byla membrána převrstvena připravenou směsí 150 μ l roztoku A + 150 μ l roztoku B z detekčního kitu ECL Western Blot. Membráně byla poté okamžitě snímána chemiluminiscence na přístroji LAS-3000.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Příprava inzertů pro Gateway klonování pomocí PCR

Pomocí dvou navazujících PCR byly vytvořeny jednotlivé produkty kódující izoformy proteinu p53, které byly ohraničeny sekvencí *attB* míst a které byly připraveny pro následné Gateway klonování. V první PCR byly kombinací genově specifických primerů připojeny konce sekvencí jednotlivých izoform, a v druhé PCR byla připojena *att* místa. Postup provedených PCR je uveden v kapitole 3.4.1.

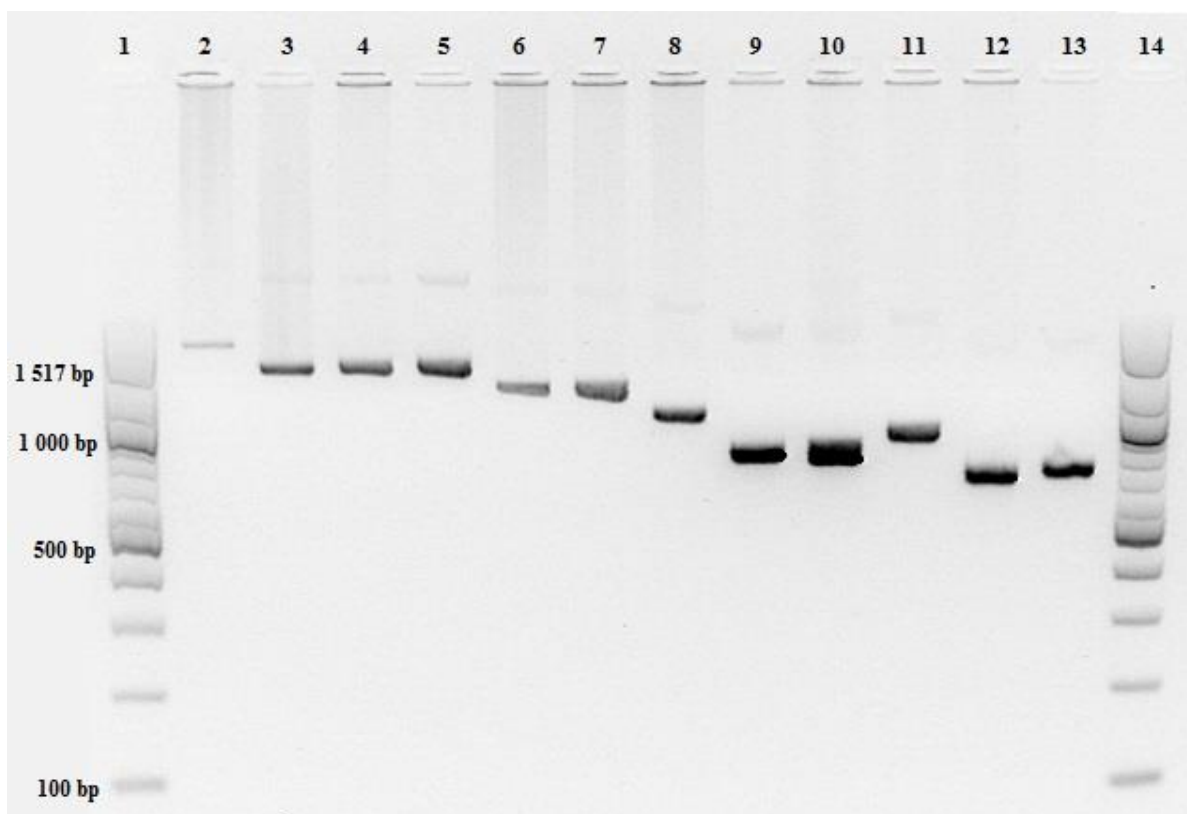
Schéma dvou postupných PCR s použitými primery je uvedeno na obrázku 14.



Obrázek 14: Schéma dvou postupných PCR reakcí při přípravě inzertů na Gateway klonování

Jednotlivé izoformy se díky rozdílným počátkům translace a rozdílným koncům, způsobeným alternativním sestřihem, výrazně liší v délce kódující sekvence. Pro znázornění a ověření různých velikostí jednotlivých PCR produktů byla provedena gelová agarózová elektroforéza (Obrázek 15). Start č. 1 a č. 14 obsahuje DNA žebříček s rozsahem 100 – 1 517 bp, od startu č. 2 následují izoformy proteinu p53 v zavedeném pořadí, tedy od p53 α do $\Delta 160$ p53 γ .

Přehled přesných velikostí získaných produktů je také uveden v tabulce 7, společně s přiřazením startů gelové elektroforézy k jednotlivým izoformám. Velikosti získaných produktů byly vypočteny z délky primerů a z délky templátu, na který primery nasedají při obou PCR. Pro porovnání je v tabulce vždy uvedena také délka sekvence kódující jen samotnou izoformu, bez přidaných sekvencí *att* míst, a také přesná velikost výsledného kódovaného proteinu. Skupině $\Delta 40$, jak název napovídá, chybí u výsledného proteinu 39 počátečních aminokyselin oproti proteinu p53 α , skupině $\Delta 133$ chybí 132 AMK, a skupině $\Delta 160$ chybí 159 AMK. Délka izoform se dále liší dle koncové sekvence α , β , či γ . β izoformám chybí oproti α izoformám 52 AMK a γ izoformám chybí oproti α izoformám 47 AMK.



Obrázek 15: Agarózová elektroforéza produktů druhé PCR, start č. 1 a č. 14: DNA žebříček o rozsahu 100 - 1 517 bp, start č. 2–13: viz Tabulka 7: Přehled vytvořených konstruktů pro jednotlivé izoformy a jejich velikosti

Tabulka 7: Přehled vytvořených konstruktů pro jednotlivé izoformy a jejich velikosti

Izoforma	Start č.	Velikost výsledné izoformy	Velikost sekvence kódující izoformu	Velikost produktu po první PCR	Velikost produktu po druhé PCR
p53 α	2	393 AMK	1 182 bp	1 228 bp	1 271 bp
p53 β	3	341 AMK	1 026 bp	1 075 bp	1 118 bp
p53 γ	4	346 AMK	1 041 bp	1 087 bp	1 130 bp
Δ 40p53 α	5	354 AMK	1 065 bp	925 bp	968 bp
Δ 40p53 β	6	302 AMK	909 bp	958 bp	1 001 bp
Δ 40p53 γ	7	307 AMK	924 bp	970 bp	1 013 bp
Δ 133p53 α	8	261 AMK	786 bp	646 bp	689 bp
Δ 133p53 β	9	209 AMK	630 bp	679 bp	722 bp
Δ 133p53 γ	10	214 AMK	645 bp	691 bp	734 bp
Δ 160p53 α	11	234 AMK	705 bp	565 bp	608 bp
Δ 160p53 β	12	182 AMK	549 bp	598 bp	641 bp
Δ 160p53 γ	13	187 AMK	564 bp	610 bp	653 bp

4.2 Gateway klonování

Připravené konstrukty popsané v předchozí kapitole byly použity pro první z reakcí Gateway klonování, BP reakci. Výsledkem BP reakce jsou entry klony, které mohou být překlonovány do různých typů expresních systémů (bakteriální, kvasinkové, savčí aj.), a to v závislosti na použitém destinačním vektoru. V této práci byl v následné LR reakci použit vektor pDEST17, který k purifikovanému proteinu přidá na N-konci polyhistidinovou kotvu (HisTag) a umožní tak provést afinitní izolaci proteinů z buněk *E. coli*. Postup Gateway klonování je uveden v kapitole 3.4.2.

4.2.1 Entry klony

Po provedené BP reakci následovala transformace do buněk STBL3 pro ověření úspěšnosti reakce. Po přeočkování do tekutého média a izolaci plazmidové DNA byla u každého z entry klonů sekvenací ověřena správnost klonování. Sekvence byla provedena z obou stran kódující sekvence, a to s použitím M13 -20 forward a M13 reverse primeru. Sekvence potvrdila správnost sekvencí všech získaných entry klonů.

Takto bylo úspěšně připraveno a zkontrolováno všech dvanáct žádaných entry klonů dvanácti izoformami proteinu p53. Přehled entry klonů je uveden v tabulce 8. Název entry klonu je odvozen od použitého donorového vektoru, pDONR221.

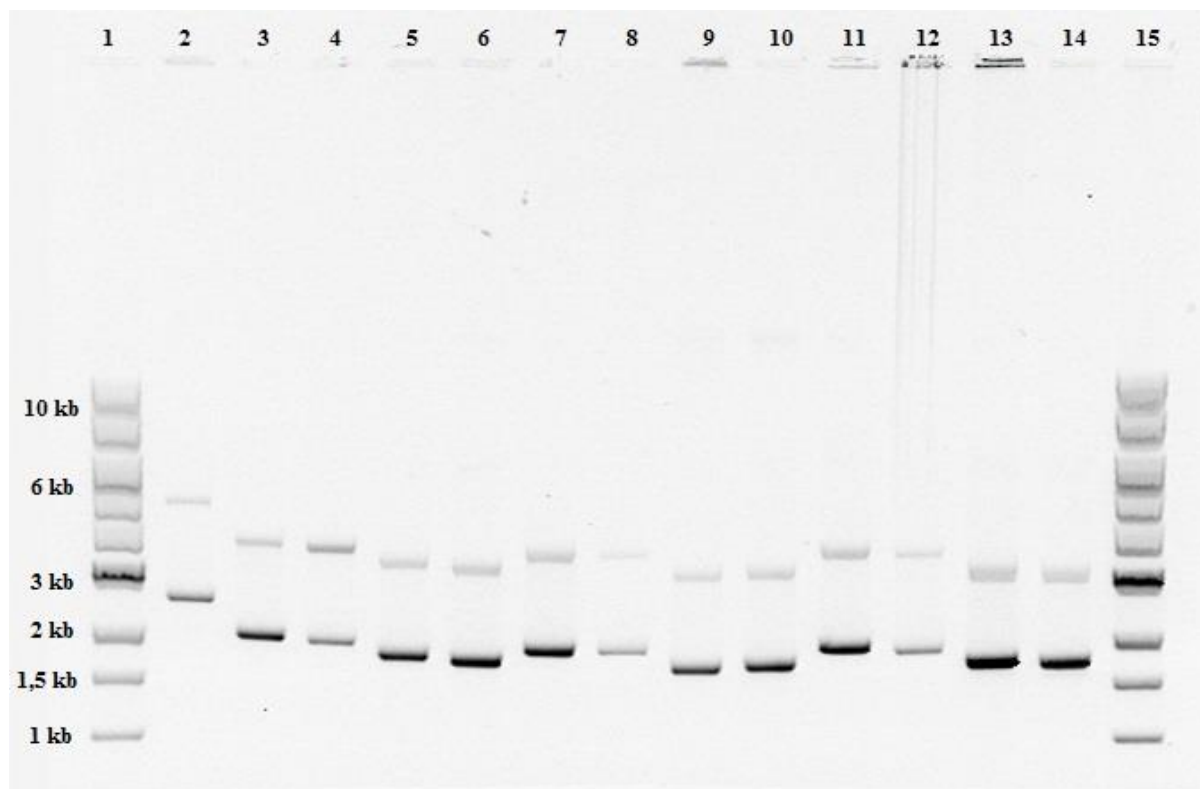
Tabulka 8: Přehled vytvořených konstruktů BP reakcí a jejich umístění na gelové elektroforéze

Konstrukt	Start č.	Velikost	Konstrukt	Start č.	Velikost
pENTR221/p53 α	3	3 756 bp	pENTR221/ Δ 133p53 α	9	3 174 bp
pENTR221/p53 β	4	3 603 bp	pENTR221/ Δ 133p53 β	10	3 207 bp
pENTR221/p53 γ	5	3 615 bp	pENTR221/ Δ 133p53 γ	11	3 219 bp
pENTR221/ Δ 40p53 α	6	3 453 bp	pENTR221/ Δ 160p53 α	12	3 093 bp
pENTR221/ Δ 40p53 β	7	3 486 bp	pENTR221/ Δ 160p53 β	13	3 126 bp
pENTR221/ Δ 40p53 γ	8	3 498 bp	pENTR221/ Δ 160p53 γ	14	3 138 bp

Dále byla provedena i agarózová gelová elektroforéza (Obrázek 16), kde jsou vidět rozdíly mezi jednotlivými konstrukty. Rozdíly v mobilitě jednotlivých entry klonů jsou však méně výrazné, než tomu bylo u samotných PCR produktů, což je zde dáno použitým donorovým vektorem pDONR221 o celkové velikosti 4,8 kb. Samotné konstrukty mají potom na gelu menší rozdíly v mobilitě v závislosti na vložené sekvenci rozdílných izoform.

Použitý žebříček, umístěný ve startu č. 1 a č. 13, má rozsah velikostí 0,5 kb - 10 kb. Nejmenší velikost, 0,5 kb, na gelu není zachycena, viditelný rozsah žebříčku začíná od 1 kb. Ve startu č. 2 byl umístěn plazmid pDONR221 (4,8 kb) pro porovnání velikostí plazmidu před a po rekombinaci. Samotný plazmid pDONR221 má mezi *attP*₁ a *attP*₂ místem umístěny sekvence, které kódují rezistenci na chloramfenikol či sekvenci *ccdB* genu, a celá sekvence mezi *attP* místy je dlouhá 1 951 bp. Během rekombinační BP reakce dojde k záměně této sekvence za sekvenci vnášené izoformy. Například u p53 β , která má vnášenou sekvenci dlouhou 1 118 bp, je výsledný plazmid poté kratší skoro o celou kilobázi, čemuž odpovídá zvýšená mobilita na gelu. Při vyhodnocování gelové elektroforézy je třeba brát na zřetel,

že pozorovaná plazmidová scDNA má v agarózovém gelu díky svému kompaktnímu uspořádání vyšší mobilitu, než lineární DNA.



Obrázek 16: Přehled všech získaných entry klonů; start č. 1 a č. 15: DNA žebříček s rozsahem 1-10 kb; Start č. 2: vektor, použitý pro BP reakci - pDONR221 o velikost 4,8 kb; start č. 2 – 14: viz Tabulka 8

4.2.2 Expresní klony

Kromě p53 α existuje jedenáct izoforem proteinu p53, které bylo cílem izolovat ve formě proteinu z buněk *E. coli*. Jedenáct připravených entry klonů bylo tedy použito pro LR reakci na vytvoření jedenácti konstruktů – expresních klonů v plazmidu pDEST17.

Po LR reakci byla vždy provedena transformace pro ověření úspěšnosti. Nejdříve bylo na transformaci použito množství směsi LR reakce dle návodu ke Gateway klonování (1 μ l) ovšem po opakovaných neúspěšných pokusech muselo být množství výrazně upraveno, a to až na 7 μ l. Neúspěšná prvotní transformace byla pravděpodobně způsobena použitím sice stejného množství buněk, jako bylo uvedeno v návodu, ovšem buňky nebyly komerční, ale byly uvedeny do kompetentního stavu v laboratoři, proto mohla být efektivita jejich transformace horší kvůli snížené kompetenci. K snížené efektivitě transformace mohlo přispět i stáří takto připravené kultury.

Pokud byla transformace úspěšná, byla po zaočkování tekutého média provedena izolace plazmidové DNA a také sekvenace pro ověření správnosti sekvence. Sekvenace byla provedena pomocí T7 forward a T7 reverse primeru. Z celkových 11 provedených LR reakcí bylo úspěšně získáno 8 expresních klonů se správnou sekvencí, jejich přehled uvádí tabulka 9.

Tabulka 9: Přehled získaných expresních klonů a výsledků sekvenace

Konstrukt	Sekvenace	Konstrukt	Sekvenace
pDEST17/p53 α	/	pDEST17/ Δ 133p53 α	ověřeno
pDEST17/p53 β	ověřeno	pDEST17/ Δ 133p53 β	ověřeno
pDEST17/p53 γ	ověřeno	pDEST17/ Δ 133p53 γ	ověřeno
pDEST17/ Δ 40p53 α	ověřeno	pDEST17/ Δ 160p53 α	*
pDEST17/ Δ 40p53 β	ověřeno	pDEST17/ Δ 160p53 β	*
pDEST17/ Δ 40p53 γ	ověřeno	pDEST17/ Δ 160p53 γ	*

U 3 expresních klonů, které jsou v tabulce označeny hvězdičkou, se nepodařilo mezi *attR* místy nalézt sekvence kódující dané izoformy. Původně se o nepodařený expresní klon jednalo i u pDEST17/ Δ 133p53 α , ovšem ten byl v dalším opakovaném procesu již připraven úspěšně, na rozdíl od expresních klonů skupiny Δ 160p53.

Zároveň byly v sekvencích expresních klonů skupiny Δ 160p53 objeveny sekvence, které nebyly očekávány. U vzorků sekvenovaných s T7 forward primerem, které by měly obsahovat iniciační kodon a počáteční sekvenci kódující danou izoformu (Δ 160), byla objevena sekvence kódující konec izoformy (α , β , γ) který by se měl nalézat u vzorku sekvenovaného s T7 reverse primerem, a naopak. Po opětovné sekvenaci s cílem vyloučit možnou chybu pipetování nebo záměnu primeru byl výsledek potvrzen.

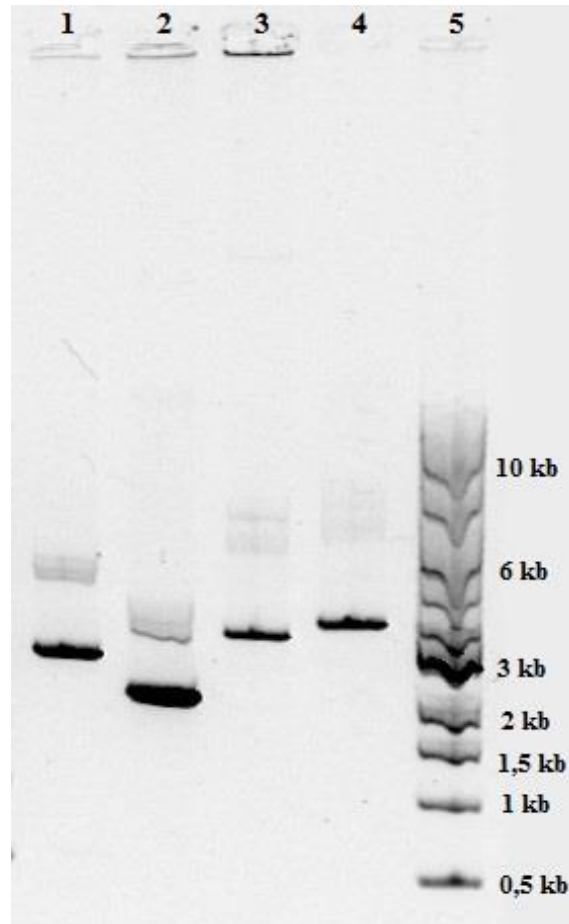
Bylo tedy zjištěno, že se sekvence, které dané izoformy kódují, klonují do *attR* míst obráceně – terminačním kodonem na začátek a iniciačním kodonem na konec, a nemůže dojít k expresi izoformy. Zatím nebyla zjištěna příčina tohoto opačného klonování, ale jelikož byly během experimentální práce vyzkoušeny celkem dva enzymatické mixy LR Clonase II, a s oběma mixy došlo k opačnému klonování a zároveň s oběma mixy došlo i k úspěšnému klonování u jiných expresních klonů, tak bylo možno vyloučit chybu konkrétního mixu.

Opačné klonování je poměrně překvapivé, vzhledem ke stavbě *att* míst, které byly právě z důvodu zachování orientace výrobcem připraveny tak, aby neobsahovaly palindromické sekvence a aby zachovaly čtecí rámec. Bohužel nebyla ohledně opačného klonování u Gateway technologie nalezena podobná problematika, díky které by se podařilo nalézt řešení, proto by u zbylých LR reakcí u skupiny Δ 160p53 měl být proveden odběr většího množství kolonií po transformaci pro izolaci plazmidové DNA a sekvenaci. Porovnáním sekvencí DNA u většího množství kolonií bude možno ověřit, zda se v případě opačného klonování jedná o náhodný jev, kdy je do plazmidu někdy klonována sekvence v správné orientaci a někdy v opačné orientaci, nebo zda se jedná o jev charakteristický pro skupinu Δ 160p53 (například vlivem délky klonované sekvence).

4.2.3 Znázornění Gateway procesu na agarózové gelové elektroforéze

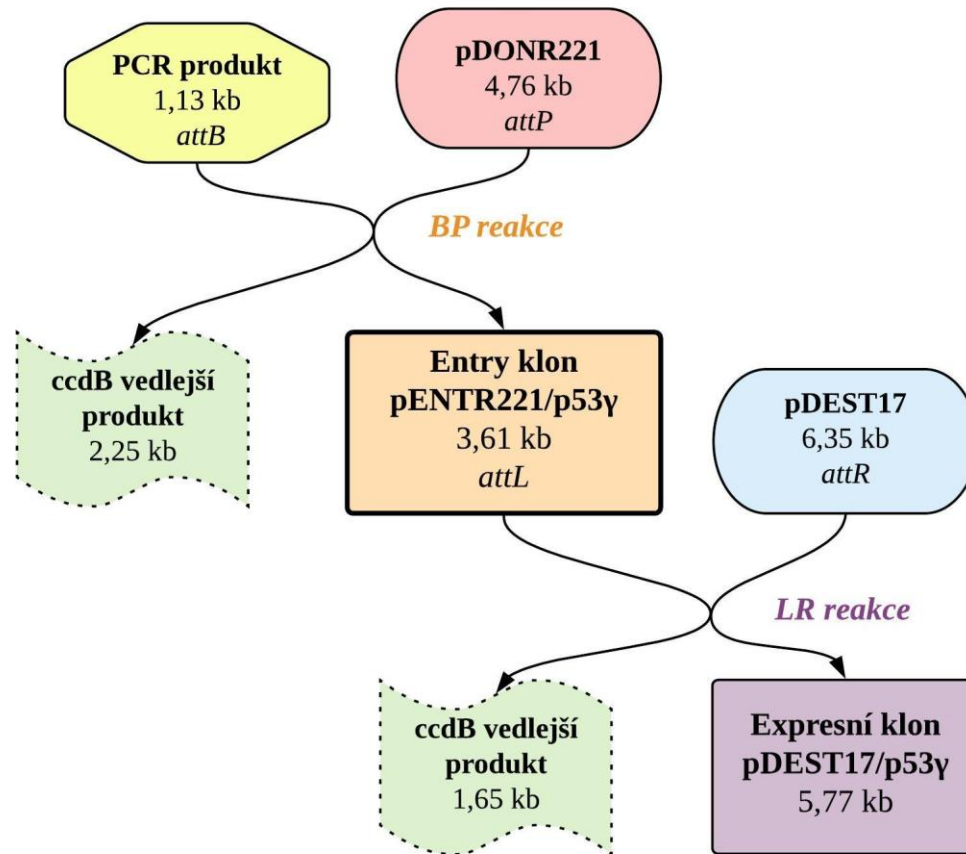
Pro názornost procesu a jednotlivých klonů byla provedena agarózová gelová elektroforéza s jednotlivými fázemi v procesu Gateway klonování. Na obrázku 17 je gel, obsahující postupně ve startu č. 1 pDONR221 (4,8 kb) jakožto počáteční donorový vektor pro BP reakci, následně ve startu č. 2 je umístěn entry klon – výsledek BP reakce, pENTR221/p53 γ . Dále je ve startu č. 4 umístěn samotný destinační vektor pDEST17, a výsledek LR reakce, expresní klon

pDEST17/p53 γ , je umístěn ve startu č. 3. Start č. 5 obsahuje DNA žebříček s rozsahem 0,5 – 10 kb.



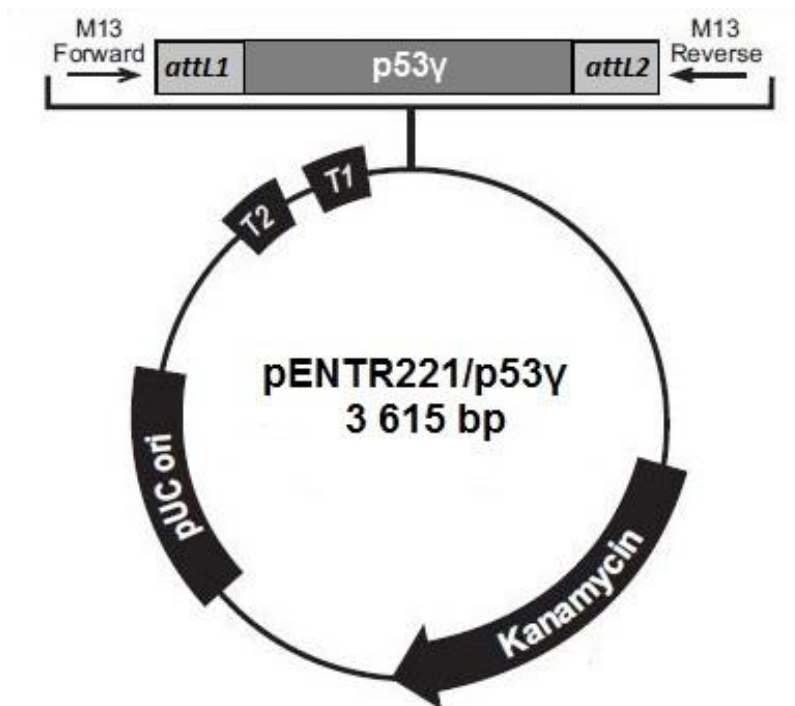
Obrázek 17: Gelová elektroforéza znázorňující jednotlivé fáze Gateway klonování a rozdílné velikosti složek procesu; start č. 1: pDONR221 (4,8 kb); start č. 2: entry klon (3,6 kb); start č. 3: expresní klon (5,9 kb), start č. 4: pDEST17 (6,4 kb); start č. 5: DNA žebříček 0,5-10 kb

Na gelu lze dobře pozorovat změnu velikostí jednotlivých složek procesu, která je podrobněji vyčíslena ve schématu na obrázku 18. Při BP reakci dochází v *attP* místech k výměně genu kódujícího toxin *ccdB* (2,25 kb) za připravený PCR produkt (*attB* místa) obsahující sekvenci izoformy (1,13 kb u p53 γ), a vznikne entry klon (3,61 kb). U LR reakce proběhne totéž, sekvence kódující izoformu se překlenuje z entry klonu (*attL* míst) do *attR* míst destinačního vektoru pDEST17 (6,35 kb), ovšem *ccdB* produkt, vyštěpený z *attR* míst, má velikost pouze 1,65 kb.

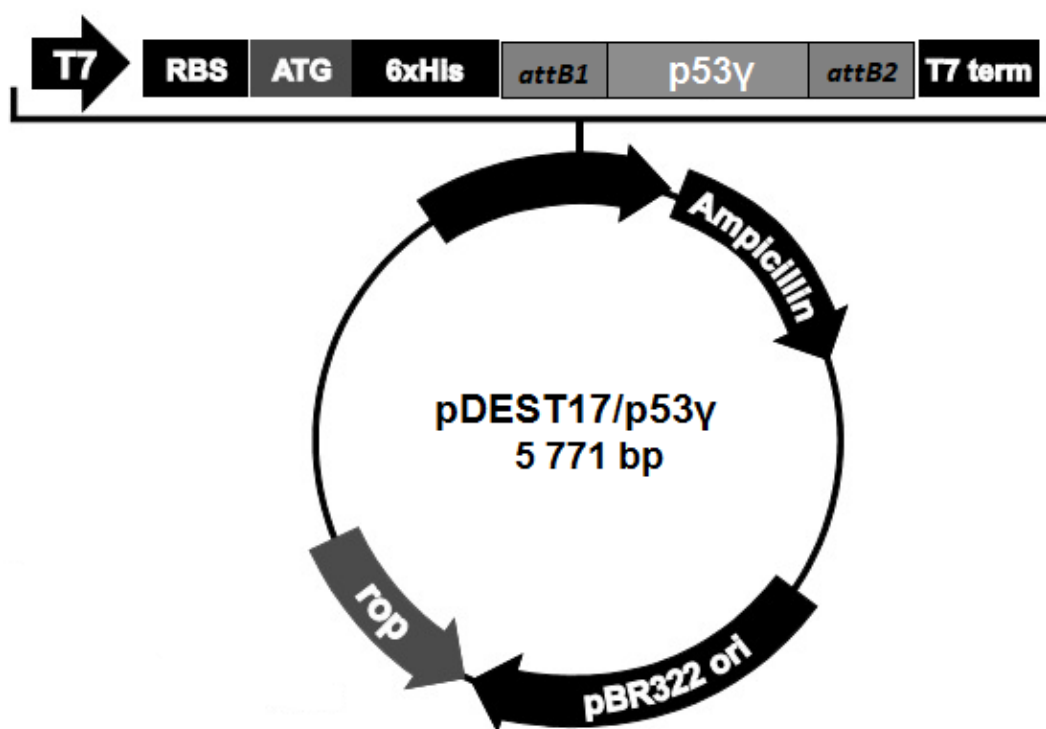


Obrázek 18: Schematické znázornění fází Gateway klonování a změn velikostí u jednotlivých složek procesu

Po sekvenaci všech získaných entry a expresních klonů byl u úspěšně ověřených konstruktů připraven FASTA soubor s kompletní sekvencí plazmidů. Dále byly připraveny mapy modelového plazmidu obsahujícího sekvenci kódující izoformu p53 γ , uvedeného již v schématu na obrázku Obrázek 18. Mapa entry klonu obsahujícího sekvenci kódující izoformu p53 γ je zobrazena na obrázku 19, mapa expresního klonu obsahujícího sekvenci kódující p53 γ je zobrazena na obrázku 20.



Obrázek 19: Mapa získaného entry klonu obsahujícího sekvenci kódující izoformu p53γ



Obrázek 20: Mapa získaného expresního klonu obsahujícího sekvenci kódující p53γ

4.3 Izolace proteinů a stanovení jejich celkové koncentrace dle Bradfordové

Po ověření správné sekvence plazmidové DNA expresních klonů byly 4 z nich transformovány také do buněk BL21-CodonPlus, následně byla zahájena produkce proteinů a poté byla provedena jejich afinitní izolace (kapitola 3.4.6). Bylo získáno 5 elučních frakcí od každého proteinu a bylo provedeno spektrofotometrické měření koncentrace proteinů

dle Bradfordové při 595 nm (kapitola 3.4.7). Výsledky získaných koncentrací pro jednotlivé frakce každého z proteinů jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Stanovení koncentrace izolovaných proteinů dle Bradfordové

Číslo proteinové frakce	Koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]			
	53β	$\Delta 40\text{p}53\alpha$	$\Delta 40\text{p}53\beta$	$\Delta 40\text{p}53\gamma$
1.	<0,200	<0,200	<0,200	<0,200
2.	1,600	1,038	1,420	0,462
3.	1,304	0,732	1,902	0,456
4.	<0,200	<0,200	<0,200	<0,200
5.	<0,200	<0,200	<0,200	<0,200

4.4 Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE a imunodetekce Westernovým přenosem

Po izolaci proteinů a změření koncentrace jednotlivých frakcí byly dvě frakce s nejvyšší koncentrací proteinu použity pro detekci na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (kapitola 3.4.8), a to společně s kontrolními vzorky odebíranými během izolace proteinů. Kontrolní vzorky před indukci, po indukci a během promývacích kroků byly odebírány z důvodu sledování správného průběhu izolace a purifikace – zjištění zbytkového proteinu v supernatantu po promývání či zbytkového proteinu v supernatantu po navázání proteinu na afinitní separační částice.

Připraveny byly vždy dva polyakrylamidové gely, kdy jeden z nich byl nabarven pomocí Coomassie Blue, odbarven a rovnou skenován, a druhý z nich byl po elektroforetické separaci dále využit na Westernový přenos (kapitola 3.4.9). Zde byl specifickou protilátkou pro HisTag detekován jenom přímo námi produkováný konkrétní protein, izoforma proteinu p53.

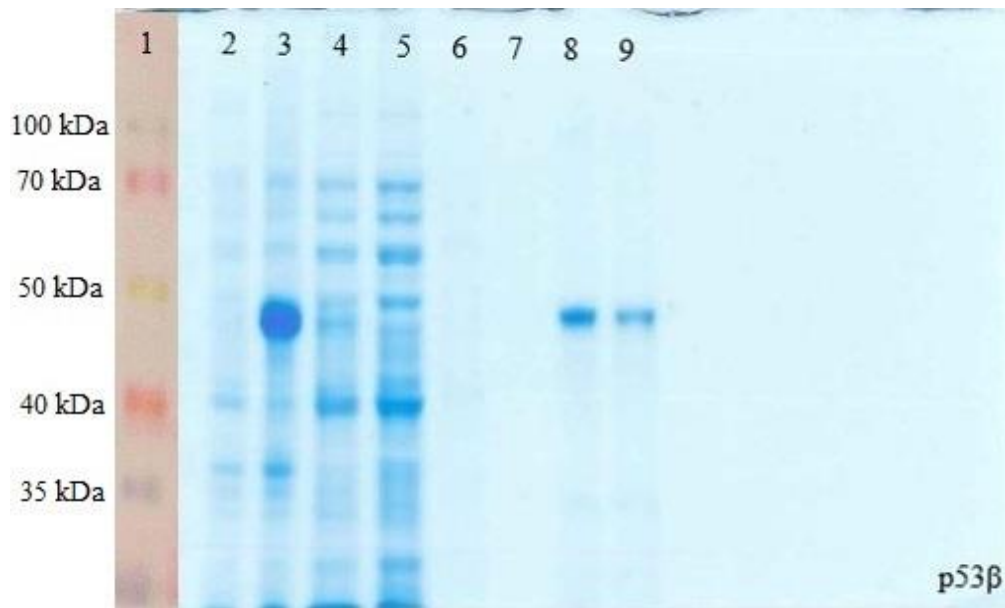
4.4.1 Detekce jednotlivých izoform proteinu p53

Polyakrylamidový gel, respektive membrána, obsahují vždy ve startu č. 1 žebříček ColorPlus Prestained Protein Marker s rozsahem 10–260 kDa. Ve startu č. 2 je umístěn kontrolní vzorek před indukci, ve startu č. 3 kontrolní vzorek po indukci a ve startech č. 4 – č. 7 jsou umístěny kontrolní vzorky odebírané během purifikace ze supernatantů po každém ze čtyř stáčení, a to stáčení po lyzi buněk, po navázání částic, po promytí vazebným pufrům a po promytí promývacím pufrům. Ve startech č. 8 a č. 9 jsou umístěny samotné izolované proteinové frakce (frakce č. 2 a frakce č. 3, viz tabulka 10).

Níže je polyakrylamidový gel uveden pouze u izoformy p53 β jako ukázka experimentu, u ostatních izolovaných proteinů byly gely provedeny stejně, výsledek detekce byl také pozitivní, proto jsou zde u zbylých proteinů dále zařazeny pouze membrány po westernovém přenosu.

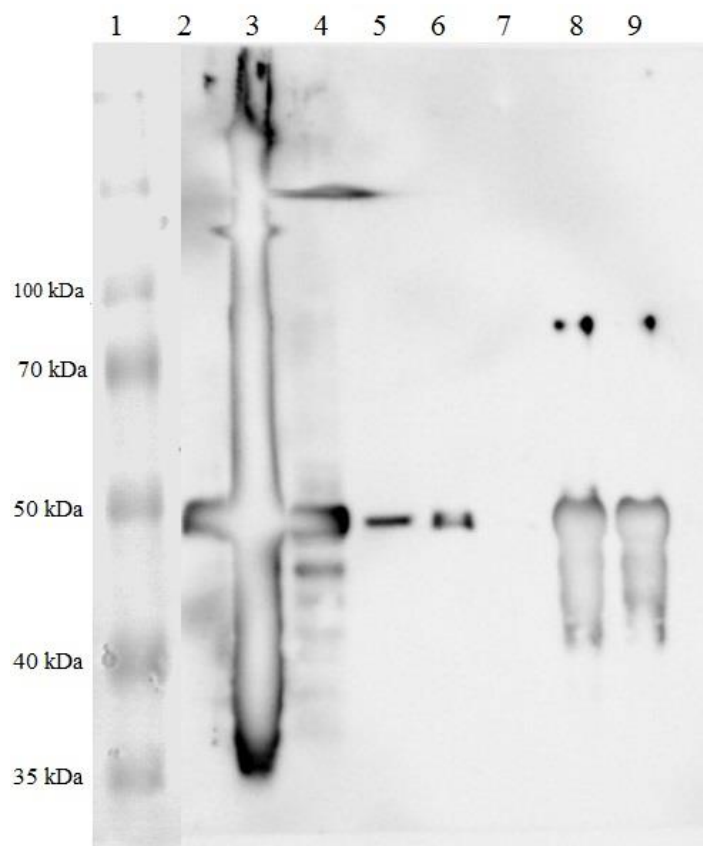
4.4.1.1 Izoforma p53 β

Izoforma p53 β má velikost 47 kDa, což bylo potvrzeno provedenou gelovou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (Obrázek 21).



Obrázek 21: Izoforma p53 β – polyakrylamidový gel s dodecylsíránem sodným, start č. 1: Proteinový žebříček 10–260 kDa; start č. 2 – č. 7: Kontrolní vzorky odebírané během produkce a purifikace; start č. 8 a č. 9: izolované frakce proteinu p53 β

Přítomnost izoformy p53 β byla úspěšně potvrzena i chemiluminiscenčně na membráně po westernovém přenosu pomocí protilátek Anti-polyHistidine (primární, myší, ředění 1:3 000) a Anti-mouse IgG peroxidase (sekundární, kozí, ředění 1:10 000), jak je vidět na obrázku 22. Ve startu č. 8 a č. 9 jsou viditelně detekovány frakce proteinu p53 β odpovídající velikosti, 47 kDa. V horní části membrány jsou viditelné zbytky nedostatečně zdenaturovaného proteinu. Ve startech č. 2 a č. 3 lze v odebraných kontrolních vzorcích před a po indukci proteinů vidět velký rozdíl v produkci izoformy po indukci pomocí IPTG.

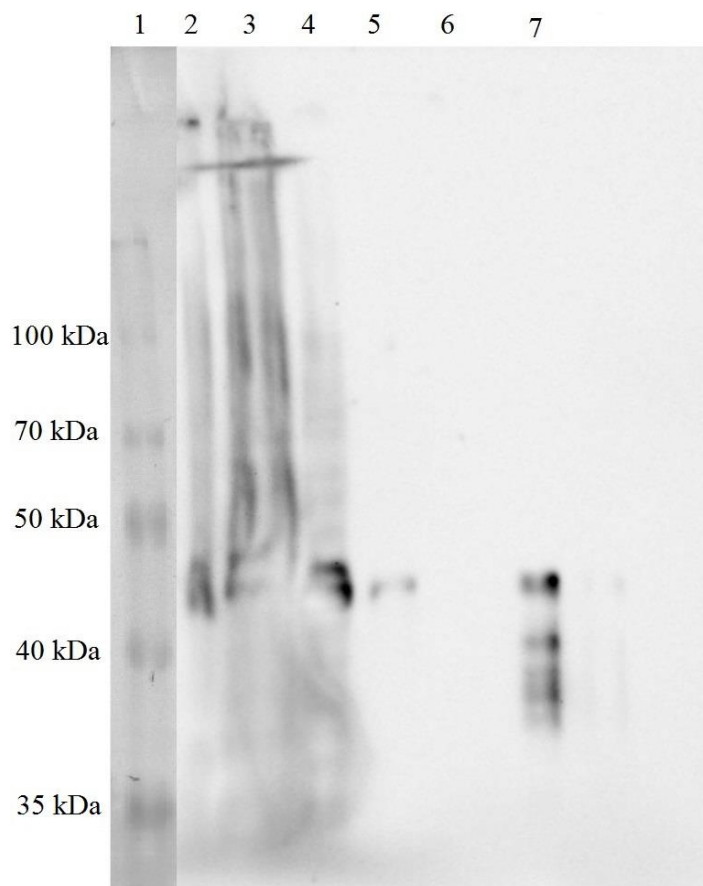


Obrázek 22: Izoforma p53 β – membrána po westernovém přenosu a aplikaci protilátek, start č. 1: Proteinový žebříček 10–260 kDa; start č. 2 – č. 7: Kontrolní vzorky odebrané během produkce a purifikace; start č. 8 a č. 9: izolované frakce proteinu p53 β

4.4.1.2 Izoforma $\Delta 40p53\alpha$

Pro izoformu $\Delta 40p53\alpha$ byl také proveden Westernový přenos. Očekávaná velikost této izoformy je 47 kDa. Postup byl stejný, jako v případě předchozí izoformy, použity byly protilátky Anti-polyHistidine (primární, myší, ředění 1:3 000) a Anti-mouse IgG peroxidase (sekundární, kozí, ředění 1:10 000). Na obrázku 23 lze opět vidět detekovaný protein $\Delta 40p53\alpha$ o očekávané velikosti, 47 kDa, ve startu č. 7.

Ve startu č. 1 je umístěn proteinový žebříček o rozsahu 10-260 kDa (zde viditelný rozsah 35–140 kDa), ve startech č. 2 – č. 3 jsou umístěny kontrolní vzorky odebrané před indukcí a po indukci produkce proteinů pomocí IPTG. Ve startech č. 4 – č. 6 jsou umístěny kontrolní vzorky odebírané postupně během stáčení po lyzi buněk, po promytí vazebným pufrem a po promytí promývacím pufrem. Kontrolní vzorek po navázání částic nebyl odebrán.

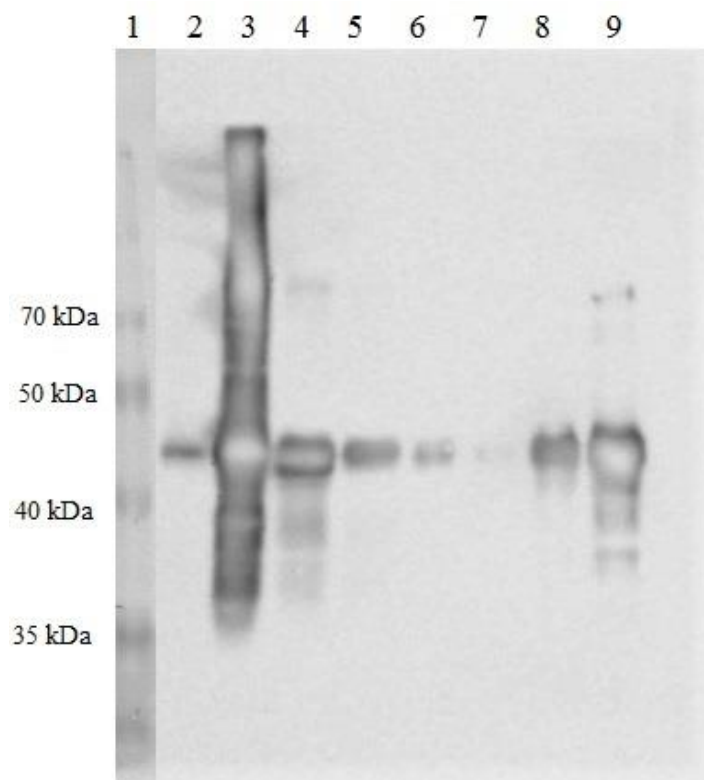


Obrázek 23: Izoforma $\Delta 40p53\alpha$ – membrána po westernovém přenosu a aplikaci protilátek, start č. 1: Proteinový žebříček 10–260 kDa; start č. 2 – č. 6: Kontrolní vzorky odebrané během produkce a purifikace; start č. 7: izolovaná frakce proteinu $\Delta 40p53\alpha$

4.4.1.3 Izoforma $\Delta 40p53\beta$

Izoforma $\Delta 40p53\beta$ má velikost 42 kDa. Po provedeném Westernovém přenosu, opět za použití protilátek Anti-polyHistidine (primární, myší, ředění 1:3 000) a Anti-mouse IgG peroxidase (sekundární, kozí, ředění 1:10 000), byl na membráně ve startech č. 8 a č. 9 detekován žádaný produkt s očekávanou velikostí (Obrázek 24) Nad detekovaným proteinem je opět i slabě viditelný proužek detekovaného nedostatečně zdenaturovaného proteinu.

Ve startu č. 1 je umístěn proteinový žebříček o rozsahu 10–260 kDa (zde viditelný rozsah 35–140 kDa), ve startech č. 2 – č. 3 jsou umístěny kontrolní vzorky odebrané před indukcí a po indukci produkce proteinů a ve startech č. 4 – č. 7 jsou umístěny kontrolní vzorky odebírané postupně během stáčení po lyzi buněk, po navázání částic, po promytí vazebným pufrem a po promytí promývacím pufrem.

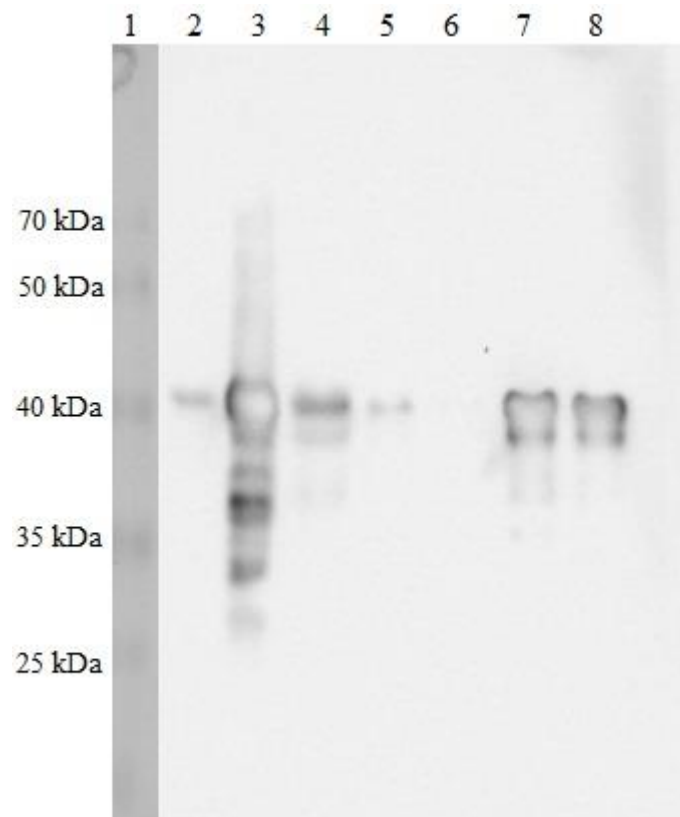


Obrázek 24: Izoforma $\Delta 40p53\beta$ – membrána po westernovém přenosu a aplikaci protilátek, start č. 1: Proteinový žebříček 10–260 kDa; start č. 2 – č. 7: Kontrolní vzorky odebrané během produkce a purifikace; start č. 8 a č. 9: izolované frakce proteinu $\Delta 40p53\beta$

4.4.1.4 Izoforma $\Delta 40p53\gamma$

Westernový přenos byl proveden i u posledního izolovaného proteinu, $\Delta 40p53\gamma$, o velikosti 42 kDa. Jak je vidět na obrázku 25, po použití protilátek Anti-polyHistidine (primární, myší, ředění 1:3 000) a Anti-mouse IgG peroxidase (sekundární, koží, ředění 1:10 000), byl na membráně také detekován očekávaný protein o dané velikosti, a to ve startech č. 7 a č. 8.

Ve startu č. 1 je umístěn proteinový žebříček o rozsahu 10–260 kDa (zde viditelný rozsah 25–70 kDa), ve startech č. 2 – č. 3 jsou umístěny kontrolní vzorky odebrané před indukcí a po indukcí produkce proteinů a ve startech č. 4 – č. 6 jsou umístěny kontrolní vzorky odebírané postupně během stáčení po lyzi buněk, po promytí vazebným pufrem a po promytí promývacím pufrem. Kontrolní vzorek po navázání částic nebyl odebrán.



Obrázek 25: Izoforma $\Delta 40p53\gamma$ – membrána po westernovém přenosu a aplikaci protilátek, start č. 1: Proteinový žebříček 10–260 kDa; start č. 2 – č. 6: Kontrolní vzorky odebrané během produkce a purifikace; start č. 7 a č. 8: izolované frakce proteinu $\Delta 40p53\gamma$

5 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce pojednává v teoretické části o významu proteinu p53, o jeho izoformách a o Gateway klonování. V experimentální části byla provedena příprava DNA sekvencí jednotlivých dvanácti izoforem pomocí dvou navazujících PCR. Jelikož bylo provedeno Gateway klonování, které je založené na rekombinaci, bylo nutné pomocí PCR vnést do produktu sekvence, které jsou pro rekombinaci nutné, tzv. *att* místa. Toho bylo docíleno použitím navržených specifických primerů a komerčních *att* primerů. Pro úspěšnou rekombinaci musí *att* místa ohraničovat klonovanou sekvenci. Primery byly úspěšně navrženy, sekvence byly připraveny pomocí PCR a jejich velikosti byly ověřeny na 1% agarózovém gelu.

Získané fragmenty DNA byly použity pro první reakci Gateway klonování, BP reakci. V BP reakci byl použit plazmid pDONR221, do kterého byla rekombinací vložena sekvence jednotlivých izoforem. Takto bylo úspěšně připraveno a sekvenací ověřeno všech dvanáct entry klonů obsahujících správné sekvence dvanácti izoforem proteinu p53. Tyto entry klony mohou být dále materiálem pro jednokrokovou klonovací LR reakci s různými destinačními vektory. Dle zvoleného vektoru mohou být produkty poté využity v různých expresních systémech, například hmyzích či kvasinkových.

V druhé reakci Gateway klonování, LR reakci, byla sekvence z entry klonu rekombinací vnesena do plazmidu pDEST17, který umožňuje expresi proteinu v bakteriálních buňkách a k exprimovanému proteinu přidává polyhistidinovou kotvu (HisTag). Tato kotva umožňuje jak izolaci proteinů pomocí afinitních částic, tak jednoduchou detekci specifickou protilátkou při Westernovém přenosu. Úspěšně bylo připraveno a následně sekvenací ověřeno 8 expresních klonů. Expresní klon proteinu p53 α nebyl připraven. Zbylé 3 expresní klony, týkající se izoforem skupiny Δ 160p53, se LR reakcí nepodařilo připravit, a sekvenace prokázala, že se sekvence izoformy klonuje do plazmidu naopak.

Z úspěšných 8 expresních klonů byly 4 z nich použity na produkci proteinů, a to: pDEST17/p53 β , pDEST17/ Δ 40p53 α , pDEST17/ Δ 40p53 β a pDEST17/ Δ 40p53 γ . V buňkách BL21-CodonPlus proběhla produkce těchto izoforem a následně byla provedena jejich izolace a purifikace za použití afinitních částic. Posledním krokem byla jejich detekce pomocí SDS-PAGE a Westernového přenosu. Všechny čtyři izoformy byly na membráně z Westernového přenosu detekovány specifickou protilátkou, a to ve správné velikosti, což bylo potvrzeno použitým proteinovým standardem.

Purifikované izoformy proteinu p53 jsou podkladem pro další práce, jelikož budou předmětem navazujícího výzkumu na Biofyzikálním ústavu AV ČR, který se bude týkat studia vazby izoforem proteinu p53 na p53CON či na specifické DNA struktury (kvadruplexy, křížové struktury a jiné) a objasnění vlivu rozdílné struktury izoforem p53 oproti celému proteinu p53 na vazbu k DNA. Využity budou metody jako AFM (mikroskopie atomárních sil) či EMSA (gelová retardační analýza). Zároveň bude díky připraveným entry klonům možné pokračovat v expresi izoforem v kvasinkových izogenních systémech pro studium vazby v kontextu chromatinu.

6 BIBLIOGRAFIE

- [1] Levine, A. J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* [online]. 1997, roč. 88, č. 3 [cit. 5. 4. 2018], s. 323-331. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039259>. ISSN 0092-8674.
- [2] Pflaum, J., S. Schlosser a M. Muller: p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Frontiers in Oncology* [online]. 2014, roč. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 285. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374842>. ISSN 2234-943X.
- [3] Muller, P., R. Nenutil a B. Vojtesek: Relevance of p53 protein and its mutations for novel strategies in cancer therapy. *Časopis Lékařů českých* [online]. 2004, roč. 143, č. 5 [cit. 5. 4. 2018], s. 313-317. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305766>. ISSN 0008-7335.
- [4] Marcel, V., M. L. Dichtel-Danjoy, C. Sagne, H. Hafsi, et al.: Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2011, roč. 18, č. 12 [cit. 5. 4. 2018], s. 1815-1824. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941372>. ISSN 1476-5403.
- [5] Joruz, S. M. a J. C. Bourdon: p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, roč. 6, č. 8 [cit. 5. 4. 2018], s. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26801896>. ISSN 2157-1422.
- [6] Solomon, H., M. Sharon a V. Rotter: Modulation of alternative splicing contributes to cancer development: focusing on p53 isoforms, p53beta and p53gamma. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2014, roč. 21, č. 9 [cit. 5. 4. 2018], s. 1347-1349. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/cdd201499>. ISSN 1476-5403.
- [7] Kim, S. a S. S. An: Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)* [online]. 2016, roč. 95, č. 26 [cit. 5. 4. 2018]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27368003>. ISSN 1536-5964.
- [8] Murray-Zmijewski, F., D. P. Lane a J. C. Bourdon: p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2006, roč. 13, č. 6 [cit. 5. 4. 2018], s. 962-972. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601753>. ISSN 1350-9047.
- [9] Lane, D. P. a L. V. Crawford: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* [online]. 1979, roč. 278, č. 5701 [cit. 5. 4. 2018], s. 261-263. Dostupné z. ISSN 0028-0836.
- [10] Linzer, D. I. a A. J. Levine: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* [online]. 1979, roč. 17, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 43-52. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222475>. ISSN 0092-8674.
- [11] Jenkins, J. R., K. Rudge, S. Redmond a A. Wade-Evans: Cloning and expression analysis of full length mouse cDNA sequences encoding the transformation associated protein p53. *Nucleic Acids Research* [online]. 1984, roč. 12, č. 14 [cit. 5. 4. 2018], s. 5609-5626. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6379601>. ISSN 0305-1048.

- [12] Jenkins, J. R., K. Rudge, P. Chumakov and G. A. Currie: The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* [online]. 1985, roč. 317, č. 6040 [cit. 5. 4. 2018], s. 816-818. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3903515>>. ISSN 0028-0836.
- [13] Wolf, D., N. Harris a V. Rotter: Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* [online]. 1984, roč. 38, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 119-126. Dostupné z. ISSN 0092-8674.
- [14] Finlay, C. A., P. W. Hinds, T. H. Tan, D. Eliyahu, et al.: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1988, roč. 8, č. 2 [cit. 5. 4. 2018], s. 531-539. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2832726>>. ISSN 0270-7306.
- [15] Miller, C., T. Mohandas, D. Wolf, M. Prokocimer, et al.: Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* [online]. 1986, roč. 319, č. 6056 [cit. 5. 4. 2018], s. 783-784. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005871>>. ISSN 0028-0836.
- [16] Flaman, J. M., F. Waridel, A. Estreicher, A. Vannier, et al.: The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* [online]. 1996, roč. 12, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 813-818. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8632903>>. ISSN 0950-9232.
- [17] Bernard, X., P. Robinson, Y. Nomine, M. Masson, et al.: Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS One* [online]. 2011, roč. 6, č. 10 [cit. 5. 4. 2018], s. e25981. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22046250>>. ISSN 1932-6203.
- [18] Soussi, T. a P. May: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1996, roč. 260, č. 5 [cit. 5. 4. 2018], s. 623-637. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709143>>. ISSN 0022-2836.
- [19] Ziemer, M. A., A. Mason a D. M. Carlson: Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1982, roč. 257, č. 18 [cit. 5. 4. 2018], s. 11176-11180. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7107651>>. ISSN 0021-9258.
- [20] Marston, N. J., T. Crook a K. H. Vousden: Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 a does not mediate wild type transformation suppressor function. *Oncogene* [online]. 1994, roč. 9, č. 9 [cit. 5. 4. 2018], s. 2707-2716. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058335>>. ISSN 0950-9232.
- [21] Millau, J. F., N. Bastien a R. Drouin: P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutation Research* [online]. 2009, roč. 681, č. 2-3 [cit. 5. 4. 2018], s. 118-133. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639648>>. ISSN 0027-5107.
- [22] Venot, C., M. Maratrat, C. Dureuil, E. Conseiller, et al.: The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *The EMBO Journal* [online]. 1998, roč. 17, č. 16 [cit. 5. 4. 2018], s. 4668-4679. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707426>>. ISSN 0261-4189.
- [23] Bergamaschi, D., Y. Samuels, A. Sullivan, M. Zvelebil, et al.: iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nature*

- Genetics* [online]. 2006, roč. 38, č. 10 [cit. 5. 4. 2018], s. 1133-1141. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16964264>. ISSN 1061-4036.
- [24] Fields, S. a S. K. Jang: Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* [online]. 1990, roč. 249, č. 4972 [cit. 5. 4. 2018], s. 1046-1049. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2144363>. ISSN 0036-8075.
- [25] Bode, A. M. a Z. Dong: Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews: Cancer* [online]. 2004, roč. 4, č. 10 [cit. 5. 4. 2018], s. 793-805. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15510160>. ISSN 1474-175X.
- [26] Bai, L. a W.-G. Zhu: p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* [online]. 2006, roč. 2, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 141-153. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.617.4281&rep=rep1&type=pdf>. ISSN 1817-4256.
- [27] Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein a C. C. Harris: p53 mutations in human cancers. *Science* [online]. 1991, roč. 253, č. 5015 [cit. 5. 4. 2018], s. 49-53. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1905840>. ISSN 0036-8075.
- [28] Weinberg, R. L., S. M. Freund, D. B. Veprintsev, M. Bycroft, et al.: Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2004, roč. 342, č. 3 [cit. 5. 4. 2018], s. 801-811. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342238>. ISSN 0022-2836.
- [29] Emamzadah, S., L. Tropa a T. D. Halazonetis: Crystal structure of a multidomain human p53 tetramer bound to the natural CDKN1A (p21) p53-response element. *Molecular Cancer Research* [online]. 2011, roč. 9, č. 11 [cit. 5. 4. 2018], s. 1493-1499. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933903>. ISSN 1557-3125.
- [30] Taylor, W. R. a G. R. Stark: Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* [online]. 2001, roč. 20, č. 15 [cit. 5. 4. 2018], s. 1803-1815. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313928>. ISSN 0950-9232.
- [31] Meek, D. W.: Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *The Biochemical Journal* [online]. 2015, roč. 469, č. 3 [cit. 5. 4. 2018], s. 325-346. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26205489>. ISSN 1470-8728.
- [32] Ezhevsky, S. A., A. Ho, M. Becker-Hapak, P. K. Davis, et al.: Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2001, roč. 21, č. 14 [cit. 5. 4. 2018], s. 4773-4784. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416152>. ISSN 0270-7306.
- [33] Cory, S. a J. M. Adams: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews: Cancer* [online]. 2002, roč. 2, č. 9 [cit. 5. 4. 2018], s. 647-656. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209154>. ISSN 1474-175X.
- [34] Bargonetti, J. a J. J. Manfredi: Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current Opinion in Oncology* [online]. 2002, roč. 14, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 86-91. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790986>. ISSN 1040-8746.

- [35] Appella, E. a C. W. Anderson: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2001, roč. 268, č. 10 [cit. 5. 4. 2018], s. 2764-2772. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358490>>. ISSN 0014-2956.
- [36] Buschmann, T., V. Adler, E. Matusevich, S. Y. Fuchs, et al.: p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14ARF, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Research* [online]. 2000, roč. 60, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 896-900. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706102>>. ISSN 0008-5472.
- [37] Ashcroft, M. a K. H. Vousden: Regulation of p53 stability. *Oncogene* [online]. 1999, roč. 18, č. 53 [cit. 5. 4. 2018], s. 7637-7643. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618703>>. ISSN 0950-9232.
- [38] Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, et al.: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* [online]. 1992, roč. 69, č. 7 [cit. 5. 4. 2018], s. 1237-1245. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535557>>. ISSN 0092-8674.
- [39] Bottger, V., A. Bottger, C. Garcia-Echeverria, Y. F. Ramos, et al.: Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene* [online]. 1999, roč. 18, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 189-199. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926934>>. ISSN 0950-9232.
- [40] Gu, B. a W. G. Zhu: Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2012, roč. 8, č. 5 [cit. 5. 4. 2018], s. 672-684. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22606048>>. ISSN 1449-2288.
- [41] Craig, A. L., J. P. Blaydes, L. R. Burch, A. M. Thompson, et al.: Dephosphorylation of p53 at Ser20 after cellular exposure to low levels of non-ionizing radiation. *Oncogene* [online]. 1999, roč. 18, č. 46 [cit. 5. 4. 2018], s. 6305-6312. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10597229>>. ISSN 0950-9232.
- [42] Khosravi, R., R. Maya, T. Gottlieb, M. Oren, et al.: Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* [online]. 1999, roč. 96, č. 26 [cit. 5. 4. 2018], s. 14973-14977. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611322>>. ISSN 0027-8424.
- [43] Fraser, J. A., A. Madhumalar, E. Blackburn, J. Bramham, et al.: A novel p53 phosphorylation site within the MDM2 ubiquitination signal: II. a model in which phosphorylation at SER269 induces a mutant conformation to p53. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010, roč. 285, č. 48 [cit. 5. 4. 2018], s. 37773-37786. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847049>>. ISSN 1083-351X.
- [44] Gu, W. a R. G. Roeder: Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* [online]. 1997, roč. 90, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 595-606. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288740>>. ISSN 0092-8674.
- [45] Nagaich, A. K., E. Appella a R. E. Harrington: DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor

suppressor protein p53. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997, roč. 272, č. 23 [cit. 5. 4. 2018], s. 14842-14849. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169453>>. ISSN 0021-9258.

[46] El-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, et al.: Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* [online]. 1992, roč. 1, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 45-49. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1301998>>. ISSN 1061-4036.

[47] Wang, Y., J. F. Schwedes, D. Parks, K. Mann, et al.: Interaction of p53 with its consensus DNA-binding site. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1995, roč. 15, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 2157-2165. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891710>>. ISSN 0270-7306.

[48] Weinberg, R. L., D. B. Veprintsev, M. Bycroft a A. R. Fersht: Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2005, roč. 348, č. 3 [cit. 5. 4. 2018], s. 589-596. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826656>>. ISSN 0022-2836.

[49] Palecek, E., D. Vlk, V. Stankova, V. Brazda, et al.: Tumor suppressor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA. *Oncogene* [online]. 1997, roč. 15, č. 18 [cit. 5. 4. 2018], s. 2201-2209. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393978>>. ISSN 0950-9232.

[50] Jagelska, E. B., V. Brazda, P. Pecinka, E. Palecek, et al.: DNA topology influences p53 sequence-specific DNA binding through structural transitions within the target sites. *Biochemistry Journal* [online]. 2008, roč. 412, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 57-63. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18271758>>. ISSN 1470-8728.

[51] Jordan, J. J., D. Menendez, A. Inga, M. Noureddine, et al.: Noncanonical DNA motifs as transactivation targets by wild type and mutant p53. *PLoS Genetics*. [online]. 2008, roč. 4, č. 6 [cit. 5. 4. 2018], s. e1000104. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714371>>. ISSN 1553-7404.

[52] Brazda, V. a J. Coufal: Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, roč. 18, č. 2 [cit. 5. 4. 2018], s. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28208646>>. ISSN 1422-0067.

[53] Brazda, V., J. Cechova, M. Battistin, J. Coufal, et al.: The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2017, roč. 483, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 516-521. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28007599>>. ISSN 1090-2104.

[54] Rotter, V. a D. Wolf: Biological and molecular analysis of p53 cellular-encoded tumor antigen. *Advances in Cancer Research* [online]. 1985, roč. 43, č. [cit. 5. 4. 2018], s. 113-141. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3887856>>. ISSN 0065-230X.

[55] Surget, S., M. P. Khoury a J. C. Bourdon: Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and Therapy* [online]. 2013, roč. 7, č. [cit. 5. 4. 2018], s. 57-68. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379683>>. ISSN 1178-6930.

- [56] Khoury, M. P. a J. C. Bourdon: The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology and Medicine* [online]. 2010, roč. 2, č. 3 [cit. 5. 4. 2018], s. a000927. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300206>>. ISSN 1943-0264.
- [57] Ghosh, A., D. Stewart a G. Matlashewski: Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, roč. 24, č. 18 [cit. 5. 4. 2018], s. 7987-7997. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15340061>>. ISSN 0270-7306.
- [58] Courtois, S., G. Verhaegh, S. North, M. G. Luciani, et al.: DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* [online]. 2002, roč. 21, č. 44 [cit. 5. 4. 2018], s. 6722-6728. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360399>>. ISSN 0950-9232.
- [59] Fujita, K., A. M. Mondal, I. Horikawa, G. H. Nguyen, et al.: p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature Cell Biology* [online]. 2009, roč. 11, č. 9 [cit. 5. 4. 2018], s. 1135-1142. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701195>>. ISSN 1476-4679.
- [60] Aoubala, M., F. Murray-Zmijewski, M. P. Khoury, K. Fernandes, et al.: p53 directly transactivates Delta133p53alpha, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2011, roč. 18, č. 2 [cit. 5. 4. 2018], s. 248-258. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689555>>. ISSN 1476-5403.
- [61] Marcel, V., S. Perrier, M. Aoubala, S. Ageorges, et al.: Δ 160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Δ 133p53 transcript. *FEBS Letters* [online]. 2010, roč. 584, č. 21 [cit. 5. 4. 2018], s. 4463-4468. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.005. Dostupné z: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.febslet.2010.10.005>>.
- [62] Terrier, O., J. C. Bourdon a M. Rosa-Calatrava: p53 protein isoforms: key regulators in the front line of pathogen infections? *PLoS Pathogens* [online]. 2013, roč. 9, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. e1003246. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592981>>. ISSN 1553-7374.
- [63] Izetti, P., A. Hautefeuille, A. L. Abujamra, C. B. De Farias, et al.: PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. *Invest New Drugs* [online]. 2014, roč. 32, č. 5 [cit. 5. 4. 2018], s. 783-794. Dostupné z: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10637-014-0090-9>>. ISSN 1573-0646.
- [64] Online příručka: Molecular Cloning: Technical Guide. NEW ENGLAND BIOLABS, INC. [online]. 2018: <https://www.neb.com/-/media/nebus/files/brochures/cloning_tech_guide.pdf>.
- [65] Katzen, F.: Gateway(R) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2007, roč. 2, č. 4 [cit. 5. 4. 2018], s. 571-589. Dostupné z: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17460441.2.4.571?journalCode=iedc20>>. ISSN 1746-0441.
- [66] Hartley, J. L., G. F. Temple a M. A. Brasch: DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* [online]. 2000, roč. 10, č. 11 [cit. 5. 4. 2018], s. 1788-1795. Dostupné z: <<https://genome.cshlp.org/content/10/11/1788.long>>. ISSN 1088-9051.

- [67] Landy, A.: Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1989, roč. 58, č. 1 [cit. 5. 4. 2018], s. 913-949. DOI: 10.1146/annurev.bi.58.070189.004405. Dostupné z: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.58.070189.004405>.
- [68] Soriano, M. Plasmids 101: Gateway Cloning. *Addgene blog* [online]. 2017: <http://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>.
- [69] Online příručka: Navigating via Gateway. Invitrogen. <https://tools.thermofisher.com/content/online%20seminars/gateway/1.htm>.
- [70] User Guide: Gateway® Technology with Clonase® II - A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION [online]. 2012: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gateway_clonaseii_man.pdf.
- [71] Vzdělávací materiál univerzity NC STATE: Chen, S. Gateway recombination [online]. publikováno: 13. 10. 2017. [cit. 6. 4. 2018], Dostupné: <https://www.youtube.com/watch?v=qGSI5qxPDM0>.
- [72] Bernard, P. a M. Couturier: Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1992, roč. 226, č. 3 [cit. 5. 4. 2018], s. 735-745. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324324>. ISSN 0022-2836.
- [73] Bahassi, E. M., M. H. O'dea, N. Allali, J. Messens, et al.: Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, roč. 274, č. 16 [cit. 5. 4. 2018], s. 10936-10944. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196173>. ISSN 0021-9258.
- [74] Roure, A., U. Rothbacher, F. Robin, E. Kalmar, et al.: A multicassette Gateway vector set for high throughput and comparative analyses in ciona and vertebrate embryos. *PLoS One* [online]. 2007, roč. 2, č. 9 [cit. 5. 4. 2018], Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878951>. ISSN 1932-6203.
- [75] Chee, M. AND C. Foan: Gateway Cloning Technology: Advantages and Drawbacks. *Cloning & Transgenesis* [online]. 2015, roč. 4, č. 2 [cit. 5. 4. 2018], s. 1-3. Dostupné z <https://www.omicsonline.org/open-access/gateway-cloning-technology-advantages-and-drawbacks-2168-9849-1000138.php?aid=56927>. ISSN 2168-9849.

7 SEZNAM ZKRATEK

- A – adenin
- AFM – mikroskopie atomárních sil (z angl. „atomic force microscopy“)
- AMK – aminokyselina
- AMP – ampicilin
- *ATM* – gen kódující protein, který je aktivován zlomy v DNA, ATM serin/threonin kináza, (z angl.: ataxia telangiectasia mutation“)
- *att* – specifická sekvence DNA u komponent, které se rekombinují při BP, respektive LR reakci (z angl. „attachment sites“)
- *ATR* – gen kódující protein, který detekuje poškození DNA a má na starost zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě (z angl.: „ataxia telangiectasia and Rad3-related protein“)
- *Bax* – gen kódující protein z rodiny Bcl-2, regulátor apoptózy (z angl.: „Bcl-2 associated X protein“)
- Bcl-2 – rodina proteinů, které regulují apoptózu
- BSA – hovězí sérový albumin
- C – cytosin
- CAM – chloramfenikol
- Cdk2 (respektive Cdk3 apod.) – cyklin-dependentní kináza 2, resp. 3
- cDNA – z angl.: complementary DNA; DNA syntetizovaná podle RNA enzymem reverzní transkriptázou
- CDS – kódující sekvence
- DBD – DNA-vazebná doména proteinu p53
- G – guanin
- GW – označení komponent (primerů) pro gateway klonování
- HisTag – polyhistidinová kotva
- IgG – Protilátky třídy G
- IHF – Integrační faktor
- *Int* – enzym Integráza
- F – forward
- K562 – erytroleukemická buněčná linie odvozená od pacienta s chronickou myeloidní leukemií; dlouhou dobu bylo uváděno, že jsou to buňky s absencí *TP53* („p53-null“)
- KAN – kanamycin
- LB – Luria-Bertani médium
- MDM2 – enzym s ubikvitin-ligázovou aktivitou E3, regulátor hladiny proteinu p53; (z angl.: „Mouse double minute 2 homolog“)
- MDM4 – enzym spolupracující s MDM2 na regulaci hladiny p53, přímou vazbou na p53 snižuje jeho transkripční aktivitu; (z angl.: „Mouse double minute 4 homolog“)
- NLS – sekvence důležitá pro transport proteinu do jádra (z angl.: „nuclear localization signal“)
- *Noxa* – gen kódující protein z rodiny Bcl-2, regulátor apoptózy (z latinského názvu pro poškození)

- OD – oligomerizační (tetramerizační) doména proteinu p53, také označována jako 4D
- p21 – protein, který je stimulován proteinem p53 a který zajišťuje regulaci buněčného cyklu
- *P53CON* – konsensní sekvence na DNA, kterou rozpoznává protein p53
- p63, p73 – další proteiny z rodiny p53 s vysokou homologií k p53
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- PRD – doména proteinu p53, bohatá na prolin
- PRIMA-1 – molekula, která je schopna reaktivovat některé mutantní formy proteinu p53 (z angl.: „Proline-rich membrane anchor 1“)
- PXXP – označení repetice pěti aminokyselinových sekvencí PXXP v doméně bohaté na prolin, kde P představuje prolin a X jednu z ostatních aminokyselin
- *Puma* - gen kódující protein z rodiny Bcl-2, regulátor apoptózy (z angl.: „p53 upregulated modulator of apoptosis“)
- R – reverse
- Rb – Retinoblastomový protein savčích buněk, který je regulátorem buněčného cyklu
- *Ras* – onkogen kódující protein Ras, jehož mutace může vést ke vzniku rakoviny
- RD – negativní regulační doména proteinu p53, označována také jako Neg
- RE – vazebná místa v DNA obsahující *p53CON*, (z angl.: „responsive elements“)
- RPA – replikační protein; mutace v genu kódujícím tento protein má za následek zvýšenou náchylnost DNA k poškození
- scDNA – z angl.: supercoiled DNA, superhelikální DNA
- SDS – dodecylsírán sodný
- SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
- siRNA – dvouřetězcové molekuly RNA s krátkou sekvencí, které jsou v buňce schopny ovlivnit expresi proteinů; (z angl. „small interfering RNA“)
- siSplice, si133 – molekuly siRNA, speciálně navržené pro potlačení exprese určitých izoform
- SV40 – opičí polyomavirus SV40 (z angl.: „simian virus 40“)
- T – thymin
- TAD – Transaktivační doména proteinu p53
- TBP – TATA vazebný protein, rozpoznávají TATA box a účastní se iniciace transkripce
- TEV – sekvence v plazmidu kódující cílové místo pro TEV proteázu, která se používá na specifické odstranění afinitních značek z rekombinantních proteinů
- *TP53* – gen kódující tumor-supresorový protein p53
- WT – divoký typ; nemutovaná forma proteinu (z angl. „wild type“)
- *Xis* – enzym Excisionáza