

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální fyziky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Heterologní exprese rekombinantních proteinů v *E. Coli*



Autor:	Klára Holibková
Studijní program:	B1701 Fyzika
Studijní obor:	Fyzika - Biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Marika Havlíková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	květen 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Mariky Havlíkové, Ph.D. a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých pramenů.

V Olomouci

.....

Poděkování

Děkuji své vedoucí bakalářské práce RNDr. Marice Havlíkové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, odborné vedení a všestrannou pomoc při práci na teoretické i experimentální části předložené bakalářské práce. Děkuji své rodině za podporu během celého mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Klára Holibková
Název práce	Heterologní exprese rekombinantních proteinů v <i>E. Coli</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra experimentální fyziky
Vedoucí práce	RNDr. Marika Havlíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Klíčová slova	<i>E. Coli</i> , vektor, SH2 doména, SH3 doména, Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa, C45, C23
Počet stran	44
Jazyk	Český

Abstrakt:

SH2 a SH3 domény se vyskytují v zadní části Src-kinázy mimo aktivní místo, kde jsou ustáleny na nečinnou enzymovou konformaci. Proteiny, které obsahují SH2 nebo SH3 ligandy, se mohou vázat na SH2 nebo SH3 domény Src-kinázy a přitahují je na konkrétní buněčná místa. Na⁺/K⁺-ATPasa (sodno-draselná pumpa) patří k jednomu z nejvýznamnějších enzymů v živočišném metabolismu. Hraje důležitou roli při vytváření klidového membránového potenciálu a vytváří gradient Na⁺ a K⁺, který následně využívají další enzymy k přenosu jiných látek přes cytoplasmatickou membránu. Cílem této bakalářské práce bylo provést expresi rekombinantních proteinů v *E. Coli*. Exprese proteinů je metoda, která umožňuje získat požadovaný protein ve velmi vysoké čistotě, což je potřeba zejména při strukturálních a interakčních studiích. Exprimované proteiny, které byly pro tuto práci vybrány, jsou SH2, SH3 a SH2SH3 homologní domény Src-kinázy a dále také cytoplasmatické segmenty α -podjednotky Na⁺/K⁺ATPasy označované jako C23 a C45 klička.

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Klára Holibková
Title	Heterologous expression of recombinant proteins in <i>E. Coli</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Experimental Physics
Supervisor	RNDr. Marika Havlíková, Ph.D.
The year of presentation	2013
Keywords	<i>E. Coli</i> , vector, SH2 domain, SH3 domain, Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, C45, C23
Number of pages	44
Language	Czech

Abstract:

SH2 and SH3 domains can be found in the rear part of Src-kinase outside the active site, where they are stabilized at inactive enzyme conformation. Proteins that contain SH2 or SH3 ligands may bind to SH2 or SH3 domain of Src-kinase and attract them to specific cellular locations. Na⁺/K⁺-ATPase (sodium-potassium pump) is one of the most important enzymes in animal metabolism. It plays an important role in the formation of resting membrane potential and creates gradient of Na⁺ and K⁺, which is then used by other enzymes for transfer of other substances through the cytoplasmic membrane. The aim of this work was expression of recombinant proteins in *E. Coli*. Protein expression is a method that allows to obtain the desired protein in very high purity which is especially needed in structural and interaction studies. The expressed proteins, which were chosen for this work, are the SH2, SH3 and SH2SH3 homology domain of Src-kinase and also cytoplasmatic segments of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit known as C23 and C45 loop.

Obsah

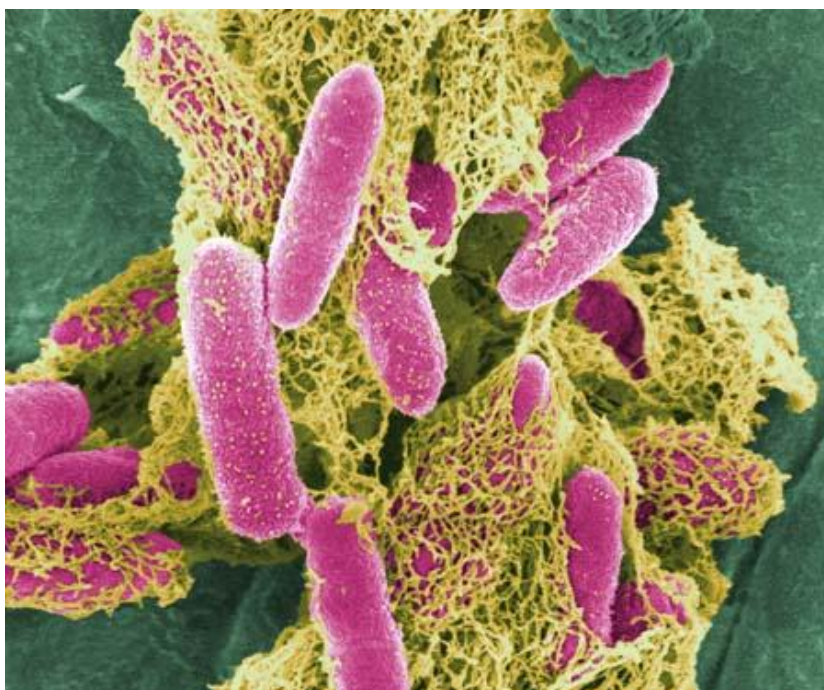
1 ÚVOD.....	7
1. 1 ESCHERICHIA COLI – NÁSTROJ PRO GENOVÉ MANIPULACE.....	8
1. 2 OBECNÉ VLASTNOSTI VEKTORŮ A JEJICH KLASIFIKACE.....	11
1. 2. 1 VEKTORY PLAZMIDOVÉHO TYPU	11
1. 3 TRANSFORMACE.....	13
1. 4 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE.....	15
1. 5 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V ESCHERICHIA COLI.....	17
1. 6 Src KINÁZY.....	19
1. 6. 1 SH2	19
1. 6. 2 SH3	20
1. 7 Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	21
1. 7. 1 C45.....	22
2 CÍL PRÁCE.....	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3. 1 MATERIÁL A METODY.....	24
3. 2 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
3. 2. 1 SELEKCE KLONU S NEJVYŠŠÍ PRODUKČÍ.....	29
3. 2. 2 DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ.....	30
3. 2. 3 SDS ELEKTROFORÉZA	32
ZÁVĚR	37
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39

1 ÚVOD

Expresí rekombinantních proteinů je proces, při kterém se pomocí expresních systémů může vytvořit protein, který je odvozený od konkrétního genu, nebo od části genu. Tento protein lze metodou purifikace oddělit od nežádoucích nečistot a lze tak získat čistý produkt. V této práci se zabývám bakteriálním expresním systémem, který patří mezi nejpoužívanější expresní systémy a to hlavně pro svou jednoduchost a vysoký výtěžek exprimovaného proteinu. Bakterie, která je v této expresi použita se nazývá *Escherichia Coli*. *E. Coli*, původním názvem *Bacterium coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, která netvoří spory a pohybuje se pomocí bičičků. Pro expresi byly vybrány Src homologní domény SH2, SH3 a SH2SH3 a dále také C45 a C23 klíčka α -podjednotky Na^+/K^+ -ATPasy.

1. 1 ESCHERICHIA COLI – NÁSTROJ PRO GENOVÉ MANIPULACE

Technologie molekulární biologie jsou založené zejména na práci s rekombinantní DNA, pro jejíž pomnožení a následnou izolaci se používají bakteriální buňky. Nejběžnější bakterií používanou v metodách molekulární biologie je *Escherichia Coli* (Obr. 1). *E. Coli*, původním názvem *Bacterium coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, která netvoří spory a pohybuje se pomocí bičků. *E. Coli* obsahuje cirkulární chromozom o velikosti cca 3×10^6 párů bází. Spadá pod čeleď *Enterobacteriaceae*, jež také zahrnuje množství patogenních rodů mikroorganismů. [Ewing 1986]

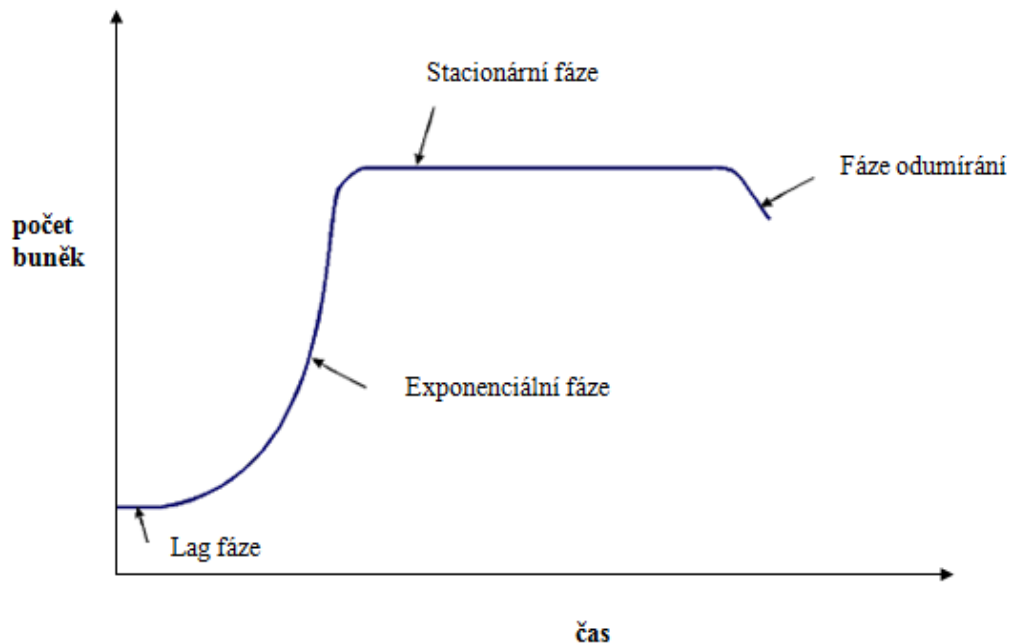


Obr. č. 1: *E. Coli*

(Převzato a upraveno z <http://www.watersag.com/microbiology.htm>)

E. Coli patří ke střevní mikroflóře teplokrevných živočichů, včetně člověka. Člověku je jako součást přirozené mikroflóry prospěšná, jelikož produkuje řadu látek, které brání rozšíření patogenních bakterií a podílí se i na tvorbě některých vitamínů (např. vitamín K). [Neill et al. 1994] Byla objevena německo-rakouským pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem v roce 1885. [Escherich 1885]

Růst bakteriální populace je charakterizován růstovou křivkou. (Obr. 2) Růstová křivka bakteriální populace je závislost počtu buněk, koncentrace buněk nebo koncentrace biomasy na čase. Křivka má tvar exponenciály (esovitý), při logaritmování osy y dostaneme křivku víceméně lineární.



Obr. č. 2: Růstová křivka bakteriální populace

(Převzato a upraveno z <http://www.corrosion-club.com/waterbactgrowth.htm>)

Fáze bakteriálního růstu

- Počáteční fáze (Lag fáze)
 - počet buněk se téměř nezvyšuje, buňky se adaptují na nové prostředí
 - buňky se prodlužují, syntetizují makromolekuly
- Exponenciální fáze
 - počet buněk se exponenciálně zvyšuje
 - v médiu je dostatek živin a podmínky pro růst jsou optimální
- Stacionární fáze
 - vyčerpání živin
 - akumulace odpadních produktů a sekundárních metabolitů

- rychlost růstu je stejná jako rychlost odumírání buněk
- bakteriální populace se nezvětšuje
- Fáze odumírání
 - exponenciální pokles počtu živých buněk

V bohatých médiích poskytujících kromě nezbytných minerálních látek i aminokyseliny, vitamíny, prekursory nukleových kyselin a další metabolity, má *Escherichia Coli* v exponenciální fázi růstu za intenzivního třepání při 37°C generační dobu cca 20 min. Ve stacionární fázi je zpravidla dosaženo koncentrace cca 2×10^9 buněk/ml. Tato bakterie však roste dobře i v minimálním médiu obsahujícím glukosu jako jediný zdroj uhlíku a energie a soli sloužící jako zdroj dusíku, fosforu, síry a stopových prvků.

Pro klonování se používají speciálně upravené kmeny *E. Coli*, které jsou zbavené schopnosti syntézy restričních endonukleáz. Pro účely molekulární genetiky byla připravena řada mutantů *E. Coli*:

- DH5- kmen zbavený schopnosti rekombinace tj. opravy DNA, používaný pro amplifikaci (zvětšení) plazmidové DNA
- BL21- kmen schopný vysoké exprese svých genů díky promotoru bakteriofága T7, jež je integrován do chromosomu bakterie *E. Coli*

1. 2 OBECNÉ VLASTNOSTI VEKTORŮ A JEJICH KLASIFIKACE

V buňce se trvale neudrží žádná DNA, která není součástí nějakého replikonu. Z toho plyne, že cizorodá DNA přenesená do buňky nemá naději na trvalé udržení v novém prostředí, pokud není sama replikonem v novém prostředí, anebo pokud nerekombinuje s nějakým replikonem hostitelské buňky tak, že při tom nezpůsobí poškození žádné životně důležité funkce hostitele. Udržení náhodného cizorodého fragmentu DNA v buňce je velmi nepravděpodobné. Proto je obvykle nutné vložit fragment do vektoru, který se může autonomně v recipientní buňce replikovat (replikativní neboli autonomní vektor), anebo který usnadní rekombinaci s nějakým buněčným replikonem (integrativní vektor).

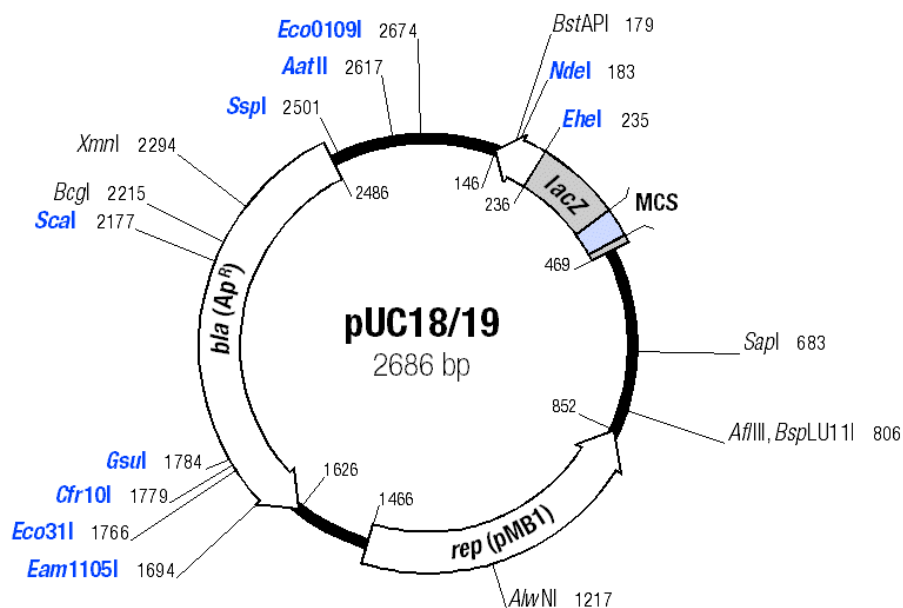
1. 2. 1 VEKTORY PLAZMIDOVÉHO TYPU

Plazmidy jsou kruhové molekuly DNA o velikosti nejčastěji 1 až 200 kpb, jejichž replikace je zabezpečena běžnými buněčnými enzymy. (Obr. 3) Počet kopií plazmidu v buňce záleží na typu plazmidu i organismu. Obvykle se pohybuje od 1 do 500 kopií. Kontrola počtu kopií v bakterii je zprostředkována vlastnostmi replikačního počátku plazmidu – ori a v některých případech také regulačními proteiny.

První skutečně účinný bakteriální plazmid byl vyvinut v roce 1977 a byl pojmenován pBR322. V dnešní době existuje nepřehledná řada plazmidů s nejrůznějšími geny a vlastnostmi, z nichž některé jsou společné pro všechny.

Nezbytnou vlastností vektorů plazmidového typu je přítomnost genů kódujících selektovatelné nebo alespoň detekovatelné znaky, protože ani neúčinnější transformační techniky nezajistí stoprocentní přenos DNA do všech bakterií nebo jiných buněk.

Nejběžněji používaným znakem je rezistence. Vektory obsahují geny, které zabezpečují hostiteli rezistenci k antibiotiku. Rezistence k ampicilinu je zajišťována produktem genu bla (amp^R), který hydrolyzuje β -laktamový kruh antibiotika. Chloramfenikol je pozměněn chloramfenikolacetyltransferázou (gen cat) na neúčinnou látku. Rezistence k tetracyklinu (tet^R) je zabezpečena účinným transportem antibiotika z buňky. Enzym aminoglykosidtransferáza pozměňuje kanamycin na neúčinnou látku (kan^R). [Vondrejs et al. 1997]



Obr. č. 3: Příklad plasmidu

(Převzato a upraveno z <http://ibabmsc01.blogspot.cz/2012/02/plasmids.html>)

MCS – (multiple cloning site) – polyklonovací místo

bla – β -laktamasa – enzym štěpící ampicilin

rep – počátek replikace

Popisky kolem plasmidu s čísly označují cílová místa pro restriční endonukleasy a pozice, v nichž tyto enzymy štěpí DNA.

1. 3 TRANSFORMACE

Vstup izolované molekuly DNA do bakteriální buňky se nazývá transformace. Na to, aby byl gen úspěšně klonovaný, musí být vnesený do živých buněk (nejčastěji bakterií), které následně rostou, dělí se a vytvářejí klony.

Většina bakteriálních kmenů je schopna přijímat DNA z média, ve kterém rostou. Přijatá DNA je často degradována, avšak v některých případech je schopná přetrvat a replikovat se uvnitř hostitelské buňky. Příkladem jsou např. plazmidy s počátkem replikace, který je rozpoznávaný hostitelem. Bakteriální buňky, včetně *E. Coli*, jsou přirozeně schopné přijmout jen limitované množství DNA. Aby se zvýšila schopnost těchto buněk přijmout DNA, musí být chemicky nebo fyzikálně upravené, přičemž takto ošetřené buňky se nazývají kompetentní.

Dodnes používaná metoda na přípravu kompetentních buněk byla vyvinutá v roce 1970 a spočívá v opracování buněk vychlazeným roztokem CaCl_2 . Předpokládá se, že působením CaCl_2 dochází k vysrážení DNA na povrchu buněk, a také ke změnám ve struktuře a náboji buněčných stěn. Tyto změny následně zlepšují interakce DNA s povrchem buňky. K přenosu DNA dovnitř buňky dochází prudkou změnou teploty na 42°C . Následně se buňky regenerují na médiu. Regenerované buňky se vysévají na pevná média s antibiotikem. Účinnost transformace buněk *E. Coli* opracovaných CaCl_2 standardně dosahuje 10^4 - 10^7 transformantů/ μg DNA.[Korduláková et al. 2008]

Alternativní metodou transformace plazmidové DNA do různých typů buněk je elektroporace. Elektroporace je metoda permeabilizace buněčné membrány, která je dnes široce používána v oblasti biotechnologie a lékařství na dodávku léčiv a genů do živých buněk.[Neumann et al. 1982]. Elektroporace je metoda využívající elektrické pulsy k přeměnění buněčných stěn a membrán protoplastů na permeabilní pro průchod DNA. Elektrický puls způsobí tvorbu pórů, kterými je pak plasmidová DNA transportována do buněk, což může vést ke stabilní nebo přechodné expresi zavedeného transgenů. Tímto způsobem lze transformovat nejen protoplasty, ale i buňky bez odstranění buněčné stěny a dokonce i celá pletiva [Newell, 2000]. Elektroporace je popisována jako náhlý nárůst v membránové propustnosti způsobené vnějšími krátkými a intenzivními elektrickými impulsy. Hydrofilní póry jsou seskupeny v lipidové

dvojrůstvě buněčné membrány a jsou vystaveny vnějším elektrickým impulsům. V buňce, která je vystavena vnějšímu elektrickému poli, přítomnost indukovaného transmembránového potenciálu zajišťuje bezplatnou energii potřebnou pro strukturní přestavby membránových fosfolipidů a umožňuje tak seskupení hydrofilních pórů. [Neumann et al. 1989, Tsong 1991, Chang et al. 1992, Weaver et al. 1996].

Transformované buňky se regenerují stejně jako při klasické technice. Účinnost elektroporace je ale v porovnání s klasickou transformací vyšší (10^{10} transformantů/ μg DNA). [Korduláková et al. 2008]

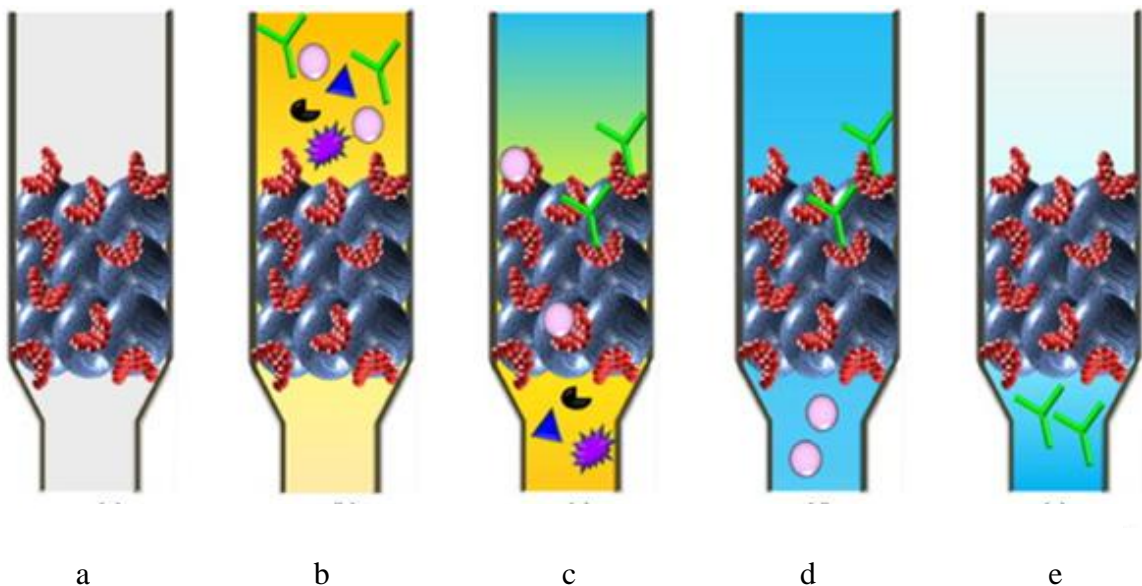
1. 4 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Afinitní chromatografie (AC) je jednou z nejvíce používaných metod čištění protilátek díky její vysoké selektivitě a rychlosti. Její účinnost je do značné míry založena na určitých vlastnostech požadované protilátky a ligandů používaných k zachycení protilátek. [Vijayalakshmi et al. 2012]

AC umožňuje oddělit z komplexní směsi omezenou skupinu příbuzných proteinů, nebo i jen jeden určitý protein. Tato technika je založena na použití imobilizovaného ligandu, tzv. afinantu, reagující specificky s enzymem, který má být purifikován. Po přidání směsi proteinů k takovému ligandu se na něj vážou jen ty proteiny, které s ligandem tvoří silné vazby. Zbytek směsi protéká kolonou beze změny. Navázaný protein se následně eluje z imobilizovaného ligandu pomocí vysoce koncentrovaného roztoku solí nebo i roztokem s rozpustnou formou ligandu. (Obr. 4) [Cuatrecasas 2004]

Afinant musí být schopen za daných podmínek specificky adsorbovat pouze cílové proteinové molekuly, které musí být následně možno uvolnit po takové změně podmínek, která nemá za následek nevratnou ztrátu 3D struktury proteinu. Pomocí techniky AC tedy lze izolovat libovolný protein, pokud je k dispozici vhodný afinant. Běžně užívané afinanty pro příslušné skupiny proteinů jsou následující:

- substrát, koenzym nebo inhibitor pro enzymy
- protilátky pro proteinové antigeny
- antigeny pro protilátky
- hormon nebo léčivo pro receptorové proteiny na membránách
- oligosacharidy pro lektiny
- lektiny pro glykoproteiny
- nukleové kyseliny pro proteiny vážící nukleové kyseliny
- kovové ionty pro rekombinantní proteiny s His-TAG koncem nebo nativní proteiny s histidinovými, cysteinovými a/nebo tryptofanovými rezidui lokalizovanými na jejich povrchu.[Amersham Biosciences, 2002]



Obr. č. 4: Kroky afinitní chromatografie [Vijayalakshmi et al. 2012]

- a) Příprava kolony a ustanovení rovnováhy imobilizovaného ligandu.
- b) Surový vzorek (obsahující směs proteinů a dalších biomolekul) je veden přes kolonu.
- c) Specifičnost ligandu způsobí zachování specifických proteinů ze vzorku.
- d) Je zde možnost určité nespecifické vazby proteinů vzhledem k jejich náboji, ale vazba je odstraněna před finální elucí.
- e) Eluce specifického proteinu.

Afinitní chromatografie poskytuje jednoduchou a časově nenáročnou metodu. Cílové molekuly mohou být čištěny od biologických směsí, mohou být odděleny přirozené formy z denaturované formy téže látky a malá množství biologického materiálu mohou být očištěna od vysoké úrovně znečišťujících látek. Cílové proteiny jsou shromažďovány v čištěné a koncentrované formě. [Anzenbacher et al. 1986]

1. 5 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V *ESCHERICHIA COLI*

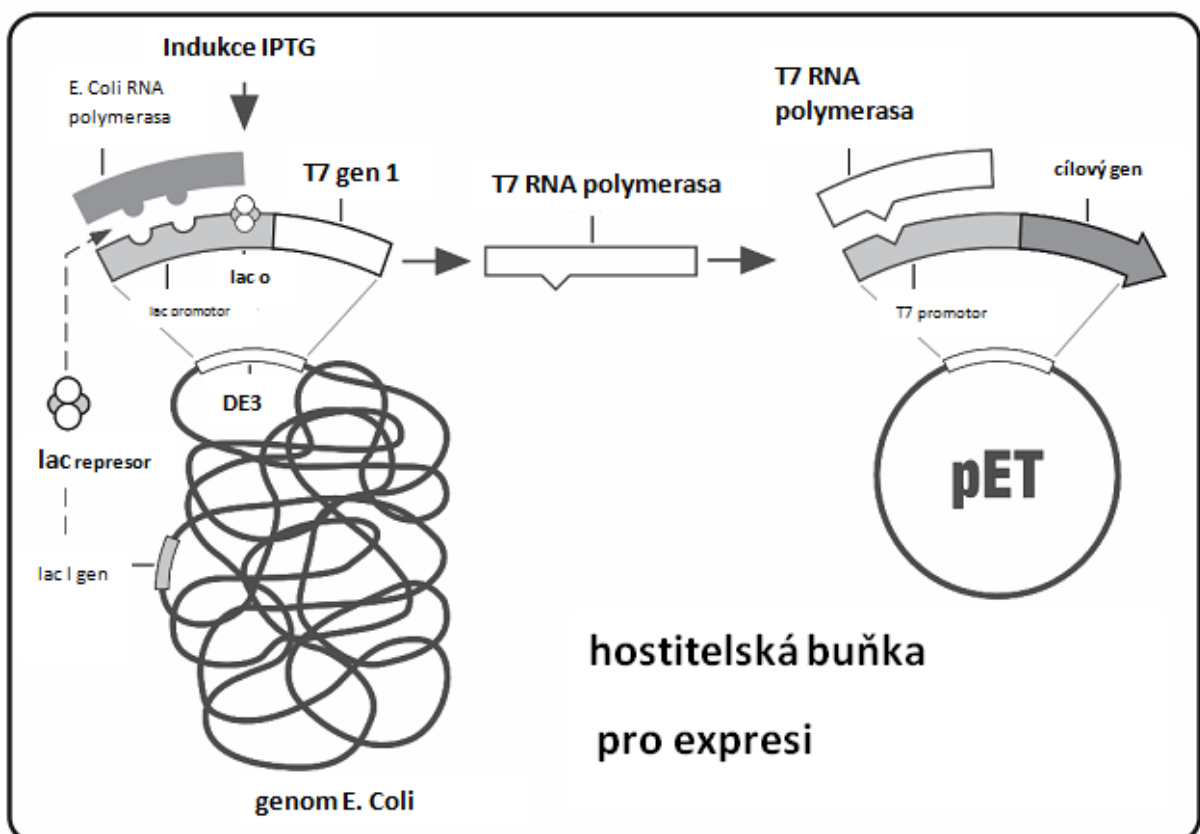
E. Coli je v molekulární biologii nejčastěji vyhledávaným hostitelským organismem pro produkci heterologních proteinů. Tato gramnegativní tyčinkovitá bakterie si svou popularitu získala díky schopnosti rychlého růstu buněk do velké hustoty i na levných substrátech. Jedná se o geneticky dobře prozkoumaný organismus, jenž nabízí nespočet mutantních kmenů a umožňuje použití mnoha klonovacích vektorů. [Baneyx 1999]

Pro produkci rekombinantních proteinů je nutno vytvořit rekombinantní molekulu DNA. Toho je docíleno vložením cizorodé DNA do klonovacího vektoru. Výsledná molekula je přenesena do hostitelské buňky, kde vytvoří více kopií replikací. Jsou používány plazmidové expresní vektory s indukovatelnými promotory a syntéza cizího proteinu je obvykle navozena až po nárůstu buněk do vhodné hustoty (OD_{600} asi 0,4–0,6). [Rosypal 2002]

Existuje také celá řada systémů pro expresi rekombinantních proteinů v eukaryotických buňkách. Tyto systémy jsou zpravidla méně účinné než bakteriální, ale dochází v nich k sestřihu RNA a je v nich dosaženo některých posttranslačních modifikací proteinu, které nemohou bakterie zajistit např. glykosylace, myristylace atd. Uplatnění nacházejí např. hmyzí buňky nebo kvasinky, které jsou vhodným nástrojem pro snadnou kultivaci a vysokou schopnost růstu. Běžně používané jsou i techniky pro expresi proteinů v živočišných buňkách. Může se jednat buď o transientní (přechodnou) expresi např. v COS buňkách (opičí buňky) nebo o expresi proteinů ve stabilních buněčných liniích, v nichž je příslušný gen integrován do chromosomu. [Rumlová et al. 2003]

Expresí rekombinantních proteinů v *E. Coli* zpravidla umožňuje získání velkého množství požadovaného produktu. Takto získaný produkt lze zpravidla použít pro purifikaci a následnou strukturní a funkční analýzu proteinů. Výhodou *E. Coli* je rychlý růst v poměrně levném médiu.

Expresce proteinu probíhá z kolonií získaných po transformaci, kdy se vybere jedna nebo více kolonií. Produkce proteinů může být řízena například T7 expresním systémem, který je zavedený ve kmenech *E. Coli* BL21, BL21(DE3) a BL21(DE3)pLysS. Do genomu těchto kmenů byla vklonována DNA sekvence pro T7 RNA polymerasu. Expresce T7 RNA polymerasy je řízena *lac* operonem. *Lac* operon je soubor tří strukturních genů (*lac Z*, *lac Y* a *lac A*) se společnou regulační oblastí, která zajišťuje využití laktosy jako jediného zdroje energie a uhlíku u bakterií *E. Coli*. Pokud je na DNA sekvenci *lac* operonu navázán *lac* represor, syntéza T7 RNA polymerasy neprobíhá. Isopropyl- β -D-thio-glykopyranosid (IPTG) přidaný do kultivačního média se v *E. Coli* naváže na *lac* represor. Ten změní svou strukturní konformaci a DNA sekvenci opouští. V tento okamžik nastává syntéza T7 RNA polymerasy. T7 RNA polymerasa pak specificky nasedá na T7 promotor a transkribuje DNA sekvenci, která za promotorem následuje. T7 promotor je součástí vneseného vektoru. (Obr. 5) [Turek 2012]



Obr. č. 5: Schéma T7 expresního systému řízeného *lac* operonem

(převzato a upraveno z <http://www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level>)

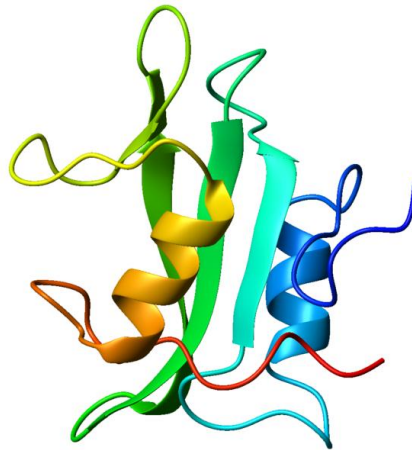
1. 6 Src KINÁZY

Src a Src-příbuzné proteinkinázy jsou proto-onkogeny, které hrají klíčovou roli v morfologii buňky, její pohyblivosti, proliferaci a přežití. Src (celulární homolog) je zakódován ve fyziologickém genu jako první z proto-onkogenů a je exprimován ve všech buňkách; avšak, v mozku, osteoklastech a v krevních destičkách jsou exprimovány 5-200krát vyšší hladiny tohoto proteinu, než většina ostatních buněk. [Brown et al. 1996]

SH2 a SH3 domény se vyskytují v zadní části kinázy mimo aktivní místo, kde jsou ustáleny na nečinnou enzymovou konformaci. [Roskoski 2004] SH2 a SH3 domény mají čtyři důležité funkce: 1) omezují aktivitu enzymu přes intramolekulární kontakty. 2) Proteiny, které obsahují SH2 nebo SH3 ligandy, se mohou vázat na SH2 nebo SH3 domény Src a přitahují je na konkrétní buněčná místa. 3) V důsledku přemístování intramolekulárních SH2 nebo SH3 domén, mohou proteiny aktivovat činnost Src kinázy. 4) Proteiny obsahující SH2 nebo SH3 ligandy mohou zvýšit jejich schopnost fungovat jako nosiče pro Src kinázy. Src-kinázy jsou řízeny protein-tyrosinovými receptory, integrinovými receptory, receptory vázanými na G-proteiny, antigenovými a Fc-receptory. [Thomas et al. 1997]

1. 6. 1 SH2

SH2 (Src Homology 2) doména (obr. 7) je strukturně zachovaná doména v onkoproteinu Src. Tyto domény o velikosti kolem 100 aminokyselin rozpoznávají a vážou specifické fosfotyrosinové sekvence. [Tong et al. 1996] SH2 doména je nejrozšířenější proteinový modul, který rozpozná fosfotyrosin. Je dokázáno, že SH2 domény jsou velmi univerzální a vykazují značnou flexibilitu v tom, jak se vážou na jejich ligandy. [Machida et al. 2005]



Obr. č. 7: Krystalografická struktura SH2 domény.

(Převzato a upraveno http://en.wikipedia.org/wiki/File:1lkkA_SH2_domain.png)

Konstrukce se skládá z velkého beta listu (zelená) lemované dvěma alfa šroubovicemi (oranžová a modrá).

1. 6. 2 SH3

SH3 (Src Homology 3) doména (obr. 8) je malá doména s asi 60 aminokyselinovými zbytky. Je složena z β -listů. SH3 doména je přítomna ve velkém množství v eukaryotických proteinech, které jsou zapojeny do přenosu signálů, buněčné polarizace a membránových interakcí. SH3 doména nemá stálou pozici v proteinu. Je pravděpodobné, že pozice SH3 domény v sekvenci proteinu není důležitá pro jeho funkci. [Musacchio et al. 1992]



Obr. č. 8: Schéma SH3 domény

(Převzato a upraveno z http://en.wikipedia.org/wiki/File:1shg_SH3_domain.png)

1. 7 Na⁺/K⁺-ATPasa

Na⁺/K⁺-ATPasa (sodno-draselná pumpa) patří k jednomu z nejvýznamnějších enzymů v živočišném metabolismu. Hraje důležitou roli při vytváření klidového membránového potenciálu a vytváří gradient Na⁺ a K⁺, který následně využívají další enzymy k přenosu jiných látek přes cytoplasmatickou membránu. [Freel et al. 1981, Bers et al. 2003] Reakční cyklus sodno-draselné pumpy, nazývaný Albert-Postovo schéma [Albers 1967, Post et al. 1969], popisuje dva hlavní konformační stavy, E1 stav s vysokou afinitou k Na⁺ a ATP a E2 stav s vysokou afinitou ke K⁺ a nízkou afinitu k ATP. Bylo popsáno, že zhruba 30% ATP vytvořené v buněčném metabolismu je použito pro fungování sodno-draselné pumpy. [Kaplan 2002]

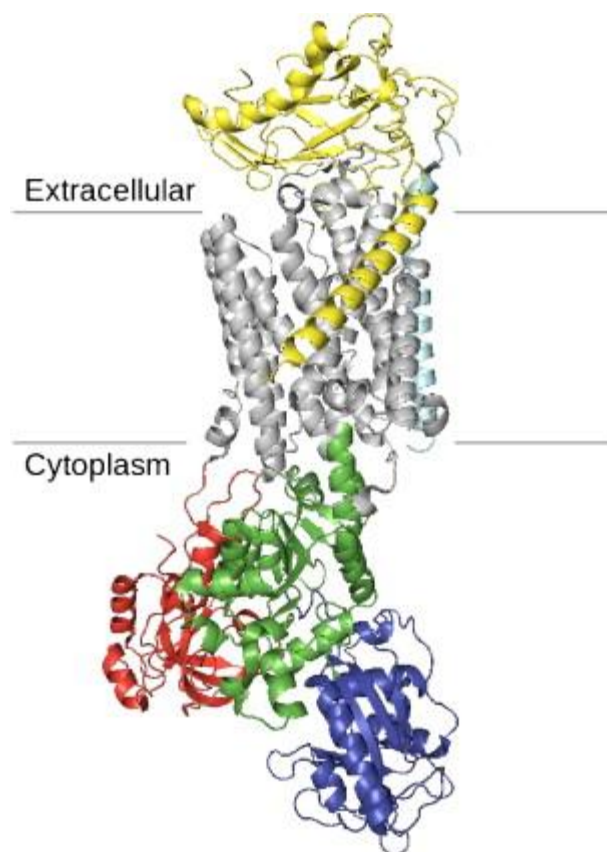
Na⁺/K⁺-ATPáza je zodpovědná za přenos tří Na⁺ iontů vně a dvou K⁺ iontů dovnitř buňky. Gradienty Na⁺ a K⁺ iontů vytvořené a udržované Na⁺/K⁺-ATPasou jsou využity k mnoha účelům, včetně tvorby akčních potenciálů podél nervů a jako zdroj energie pro sekundární aktivní transport. [Lingrel 2010] Na⁺/K⁺-ATPáza přeměňuje chemickou energii v ATP na elektrickou nebo osmotickou práci a udržuje elektrochemické Na⁺ a K⁺ přechody přes buněčnou membránu. V klidu pumpa převádí 20-30% současné produkce ATP u savců na aktivní Na⁺/K⁺-transport v ledvinách, střevě, svalech, srdci, centrálním nervovém systému a dalších buňkách těla, kde jsou požadovány Na⁺/K⁺ přechody pro udržení membránového potenciálu a buněčného objemu. [Jorgensen 2004]

Sodno-draselná pumpa je charakterizována přítomností dvou podjednotek označovaných jako alfa a beta. α -podjednotka obsahuje konzervované sekvence charakteristické pro P-ty ATPasy [Moller et al. 1996], a je zodpovědná za kationtovou translokaci stejně jako hydrolýzu ATP. α -podjednotka má deset transmembránových šroubovic a dva delší cytoplazmatické segmenty, které jsou organizovány do tří dobře oddělených domén, které tvoří N neboli nukleotidovou doménu, P neboli fosforylační doménu a A neboli „actuator“ doménu [Shinoda et al. 2009]. N a P domény jsou tvořeny kličkou mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem (C45), A doména je tvořena N-terminálním koncem a kličkou mezi druhým a třetím transmembránovým helixem (C23). [Toyoshima et al. 2000].

β -podjednotka je transmembránový glykoprotein skládající se z cytoplazmatické N-terminální domény, jednoho membránového segmentu a větší extracelulární karboxy-terminální domény [Laughery et al. 2003]. Přítomnost β -podjednotky má zásadní význam, neboť pomáhá ke správnému vložení do membrány nově syntetizované Na^+/K^+ ATPasy a α - podjednotky H^+/K^+ ATPasy. [Gatto et al. 2001].

1. 7. 1 C45

Velká cytoplazmatická klička sodno draselné pumpy (C45) (Obr 9) se nachází mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem α -podjednotky a tvoří dvě ze tří cytoplazmatických domén. Představuje přibližně 40% hmotnosti z α -podjednotky. Klička C45 obsahuje čtyři z nejvíce konzervovaných sekvencí P-typy ATPasy, včetně sekvence D-K-T-G, která obsahuje neměnný aminokyselinový zbytek (Asp369), který je fosforylován ATP jako součást katalytického mechanismu těchto proteinů. Bylo prokázáno, že klička C45 může být oddělena od zbytku enzymu [Gatto et al. 1998, Tran et al. 1999, Grycova et al. 2009], a zachovává si svou strukturu [Kubala et al. 2004], dynamické vlastnosti [Kubala et al. 2009], a schopnost vázat nukleotidy [Kubala et al. 2002, Kubala et al. 2003]



Obr. č. 9: Struktura Na^+/K^+ -ATPasy podle rentgenové krystalografie.

Cytoplazmatické domény N (modrá) a P (zelená) jsou tvořeny velkým segmentem spojující transmembránové helixy M4 a M5 tvořící C45 kličku. A doména (červená) je tvořena N-terminálním koncem a C23 kličkou. β - podjednotka je označena žlutou barvou a transmembránový helix γ -podjednotky je označen světle modrou.[Huličiak 2012]

2 CÍL PRÁCE

Expresí rekombinantních proteinů je proces, při kterém se pomocí expresních systémů může vytvořit protein, který je odvozený od konkrétního genu, nebo od části genu. Cílem této bakalářské práce je provést expresi rekombinantních proteinů v *E. Coli*. Exprimované proteiny, které byly pro tuto práci vybrány, jsou SH2, SH3 a SH2SH3 homologní domény Src kinázy a dále také C45 a C23 klička α -podjednotky Na^+/K^+ ATPasy.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A METODY

DNA sekvence C45 Na⁺/ K⁺-ATPasy byla připravena polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) z 1260 bází DNA segmentu kódující Lys354-Lys774 α 1-podjednotky myšího mozku. [Kubala et al. 2002, Kubala et al. 2003, Lánský et al. 2004, Obšil et al. 1998] cDNA Src-kinázy včetně C23 kličky jsme získali z Dánské univerzity v Aarhusu.

Exprimované proteiny:

Src-SH2	}	vektor s rezistencí vůči kanamycinu
Src-SH3		
Src-SH3SH2		
C45		
C23		vektor s rezistencí vůči ampicilinu

1. Příprava misek: LB médium + 15g/l BACTO AGAR (Difco)

LB médium:

10 g/l Peptone from casein (Serva)

5 g/l Yeast extract (Serva)

10 g/l NaCl (Sigma)

pH 7,4 (upraveno před sterilizací pomocí pH metru pH330i)

Přichystaná směs byla dána do sterilizátoru (Tuttnauer 2340M) na 45 min a teplotu 121°C. Po vytažení ze sterilizátoru se směs zchladila na cca 55°C, bylo přidáno antibiotikum kanamycin (Sigma) v konečné koncentraci 0,05 mg/ml a směs se rozlila do přichystaných misek a nechala se zhruba 15 min chladnout.

2. Transformace *E. Coli*

Transformace byla provedena metodou *heat shock*. K 10 μ l buněk (BL21 (DE3)) byly přidány 3 μ l DNA. Následovala 10 min inkubace na ledu, poté se vzorek na 60 s vystavil tepelnému šoku při teplotě 42°C a poté opět zchlazení na ledu po dobu 2 min.

Následně bylo k buňkám přidáno 700 μ l LB média o teplotě 37°C a suspenze byla při stálém míchání na třepačce kultivována 1 h při 37°C a 200 rpm. Poté byla suspenze buněk vyseta na připravené misky a buňky se nechaly při teplotě 37°C na cca 18 hod růst v inkubátoru.

3. Očkování kolonií

Uvnitř sterilizačního laminárního boxu (STERIL GEMINI) byla odebrána pomocí očkovací kličky jedna kolonie narostlých bakterií a byla převedena do 10 ml LB média, které obsahovalo 10 μ l kanamycinu (zásobní roztok 50 mg/ml) v konečné koncentraci 0,05 mg/ml. Poté následovala inkubace po dobu 13 hod na třepačce při teplotě 37°C. Po 13 hodinách se připravil roztok LB média o objemu 200 ml a do tohoto objemu se přidalo 200 μ l kanamycinu v konečné koncentraci 0,05 mg/ml. Poté se suspenze o objemu 10 ml pomocí pipety převedla do objemu 200 ml. Růstová křivka bakteriální populace byla měřena pomocí absorpčního spektrofotometru (UV500 ThermoSpectronic) při 600 nm v intervalech 30 min, až do dosažení absorpance v mezích 0,6-0,8

4. Indukce exprese

Expresce byla indukována přidáním 500 mM roztoku IPTG (Roth). Na 200 ml suspenze bylo přidáno 200 μ l IPTG v koncentraci 0,5 mg/ml. Expresce poté probíhala za stálého míchání po dobu 21 hod při teplotě 17°C.

5. Purifikace proteinu

Po 21 hod následovala centrifugace rychlostí 4000xg po dobu 15 min při teplotě 4°C. Supernatant byl slit a pelet rozpuštěn v 10 ml sonikačního pufru (10 mM TRIS, 10 mM NaCl, pH=8,8), obsahujícím tyto inhibitory proteáz:

Přidané inhibitory (na 10 ml):

15 mg lysozym (Sigma)

25 mg PMSF (Sigma)

10 μ l leupeptin (Sigma) (koncentrace zásobního roztoku 2mg/ml)

4 μ l pepstatin (Sigma)

10 μ l 1M DTT (Serva)

100 μ l 1mM EDTA

Buňky byly rozbity pomocí přístroje Ultrasonic homogenizer 3000 (BioLogics Inc.). Sonikace probíhala po dobu 3 minut s 30 s ON/OFF periodami při výkonu 30%. Suspenze byla následně centrifugována rychlostí 19000xg při teplotě 4°C po dobu 45 min.

Purifikace proteinu byla provedena metodou afinitní chromatografie. Pro AC jsou nejčastěji používané hexahistidinové kotvy (His-Tag).[Hengen 1995] His-Tag je aminokyselina uvnitř proteinu, která obsahuje nejméně 5 histidinových (His) zbytků na N- nebo C-terminálním konci proteinu.[Hochuli et al. 1988] Na koloně tak dochází k vazbě proteinu označeného His-Tag kotvou na částice kovu, které jsou součástí afinitních médií.[Gavin et al. 2002]

Byla použita nová kolona, do které bylo nalito 6 ml Talon metal affinity resin (Clontech) tak, aby v koloně zbylo 3 ml pevné fáze. Po promytí 100 ml sonikačního pufru byl supernatant neboli sonikát (rozpustná fáze) nanesen na kolony a inkubován po dobu 1 hodiny v lednici. V případě Src-kináz a C23 kličky následovalo promytí kolony 6 ml sonikačního pufru, 9 ml „high salt“ pufru (20 mM TRIS, 1M NaCl, 1 mM EDTA) a 6 ml sonikačního pufru, aby se odstranily nečistoty. Kolona s C45 kličkou byla promyta pomocí 40 ml promývacího pufru (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, pH 8). Proteiny byly z kolony vytěsněny nanesením 2 ml pufru (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH=7,6). Tento postup se opakoval ještě dvakrát a byly získány 3 eluce proteinu. Poté následovala dialýza.

Dialýza, pomocí níž byl z roztoku odstraněn přebytečný imidazol, probíhala v 1 litru dialyzačního pufru (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, pH=7,5) po dobu 24 hod při 4°C, přičemž po první hodině dialýzy byl pufr vyměněn za čistý.

6. Elektroforéza

Čistota exprimovaného proteinu byla ověřena pomocí *SDS-PAGE*. Složení roztoků pro elektroforézu bylo následující:

Elektrodový pufr (run buffer) : (na 1 l)

3g TRIS (Bio-Rad)

14,4g glycin (Roth)

1g SDS (Serva)

pH se neupravuje

Vzorkovací pufr (SDS sample buffer) : (na 1 l)

135 ml 1M TRIS (Bio-Rad)

150 ml glycerol

22 ml merkaptoetanol (Bio-Rad)

720 ml H₂O

30g SDS (Serva)

separační gel 10% : (na 10 ml)

2,5 ml 40% AA (Serva)

2,5 ml separačního pufru

4,95 ml H₂O

15 mg Na₂SO₃ (Chemapol)

9,75 µl TEMED (Bio-Rad)

25 µl APS (100 mg/ml) (Bio-Rad)

zaostřovací gel 4% : (na 10ml)

1ml 40% AA (Serva)

2,5 ml zaostřovacího pufru

6,5 ml H₂O

15mg Na₂SO₃ (Chemapol)

19,5 µl TEMED (Bio-Rad)

50 µl APS (100 mg/ml) (Bio-Rad)

zaostřovací pufr: (na 1 l)

0,5 M Tris (Bio-Rad)

0,4% SDS (w/v) (Serva)

pH 6,8

separační pufr: (na 1 l)

1,5 M Tris (Bio-Rad)

0,4% SDS (w/v) (Serva)

pH 8,8

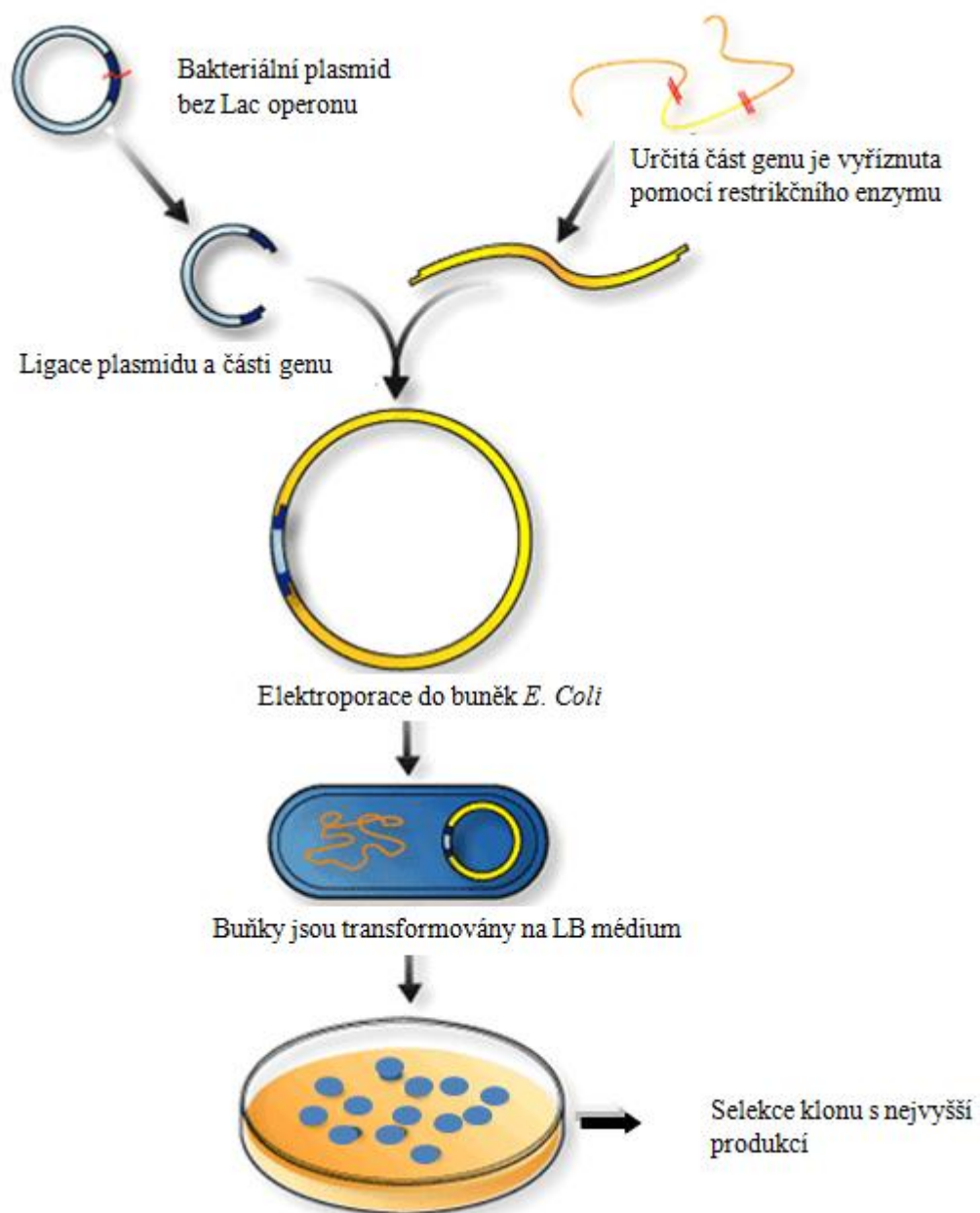
Elektroforéza byla provedena na přístroji (Mini Protean Cell firmy Bio-rad (USA)). Byly nachystány skla s vymezači na tuhnutí gelu. Nejprve se do přichystaných skel napipetoval 10% separační gel a převrstvil se isobutanolem, aby v gelu nevznikly bublinky. Gel se nechal 1 hod polymerizovat. Isobutanol byl odstraněn a poté se na separační gel napipetoval 4% zaostřovací gel, vložil se hřebínek na vytvoření jamek na vzorky a gel se opět nechal 30 min polymerizovat. Takto nachystaný gel se vložil do přichystané aparatury na elektroforézu a přelil se elektrodoým pufrem. Vzorky, které byly nanесeny na gel, obsahovaly 10 μ l roztoku získaného z elucí před a po dialýze a 5 μ l vzorkovacího pufru. Jako marker byla použita suspenze o složení 3 μ l standardu a 5 μ l vzorkovacího pufru. 3D struktura proteinu byla rozrušena vloženíм vzorků na 5 min do vodní lázně na 100°C a poté bylo přidáno 3 μ l methylenové modře (Roth) v koncentraci 1 mg/ml do každé suspenze. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 180 V po dobu 45 min.

Elektroforetický gel byl poté promyt v destilované vodě a obarven pomocí Brilliant Coomassie Blue G250 (Bio-Rad) za stálého míchání po dobu 30 min. Následovalo celonoční odbarvování pomocí 10% CH₃COOH.

3. 2 VÝSLEDKY A DISKUZE

3. 2. 1 SELEKCE KLONU S NEJVYŠŠÍ PRODUKČÍ

Pro selekci klonu s nejvyšší produkcí je nejprve nutné ligovat část požadovaného genu kódujícího exprimovaný protein s vektorem. (Obr. 10) Vektor je kruhová DNA, která je schopna proniknout do buňky. Hostitelskou buňkou je *E. Coli*. Následuje selekce klonů obsahujících rekombinantní DNA a poté následuje analýza klonované DNA. [Holasová et al. 2006, Rosypal 2003]

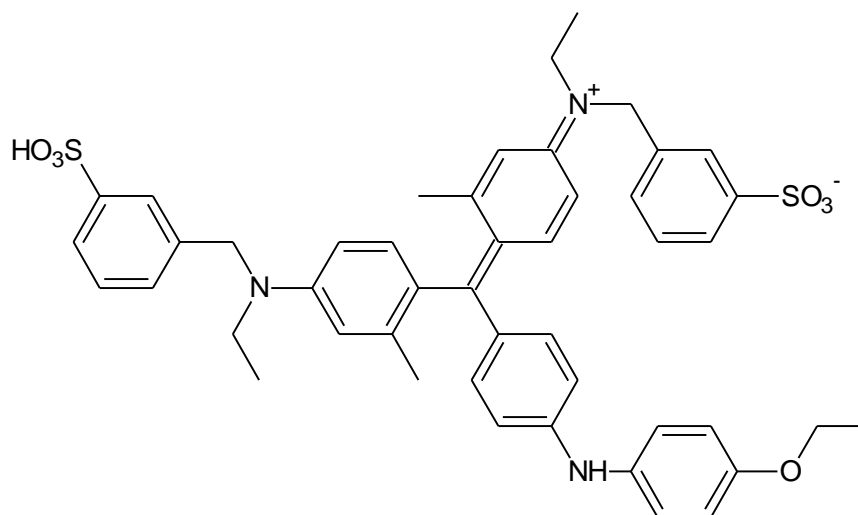


Obr. č. 10: Schéma klonování

3. 2. 2 DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

V mnoha oblastech studie proteinu je nezbytná rychlá a přesná metoda pro stanovení koncentrace bílkovin. Test původně popsáný Bradfordovou se stal upřednostňovanou metodou pro kvantifikaci proteinů v mnoha laboratořích.[Bradford 1976] Tato technika je jednodušší, rychlejší a citlivější než metoda Lowry, u které více závisí na složení proteinu. [Komsa-Penkova et al. 1996]

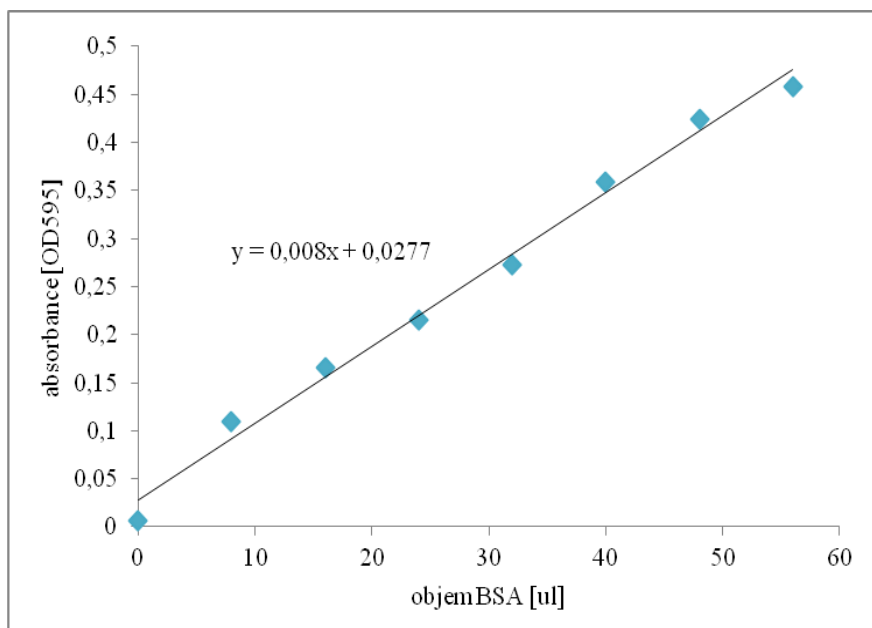
Test dle Bradfordové spoléhá na vazby barviva Coomassie blue G250 k proteinu. (Obr. 11) Podrobné studie ukazují, že čisté nebo volné nebo barvivo bez navázaného proteinu může existovat ve třech různých iontových formách, pro které jsou pK_a hodnoty 1,15 a 1,82. [Chial et al. 1993] Ze tří forem barviv, které převládají v kyselém roztoku činidla, mají kationtové zelené a červené formy maxima absorpance při 470 nm a 650 nm, naproti tomu aniontová modrá forma barviva, která se váže na bílkoviny, má maximum absorpance při 590 nm. Množství proteinů se tak odhaduje stanovením množství barvy v modré iontové formě. Toho se obvykle dosáhne měřením absorpance roztoku při 595 nm. [Compton et al. 1985]



Obr. č. 11: Coomassie blue G250

Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu byla měřena u 1. 2. a 3. eluce po dialýze. K měření koncentrace proteinu byla použita metoda dle Bradfordové. Obsah vzorku v kyvetě byl: 1350 μ l barviva, 10 μ l proteinu a 140 μ l destilované vody. Blank obsahoval 1350 μ l barviva a 150 μ l destilované vody. Koncentrace proteinů byly stanoveny z kalibrační křivky (Graf č. 1) a jako standard bylo použito BSA o koncentraci 1 mg/ml.



Graf. č. 1: Kalibrační křivka dle Bradfordové

Tab. č. 1: Naměřené hodnoty koncentrací proteinů po dialýze

protein	koncentrace [mg/ml]		
	1. eluce	2. eluce	3. eluce
SH2	6,88	3,85	2,05
C23	0,89	0,94	0,54
SH3	0,51	0,91	0,44
C45	1,45	2,34	2,37
SH2SH3	0,91	0,25	0,37

3. 2. 3 SDS ELEKTROFORÉZA

Gelová elektroforéza je metoda používaná především k separaci proteinů a to na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Principem je pohyb částic nanesených na polyakrylamidový gel v elektrickém poli. [Banga 1998]

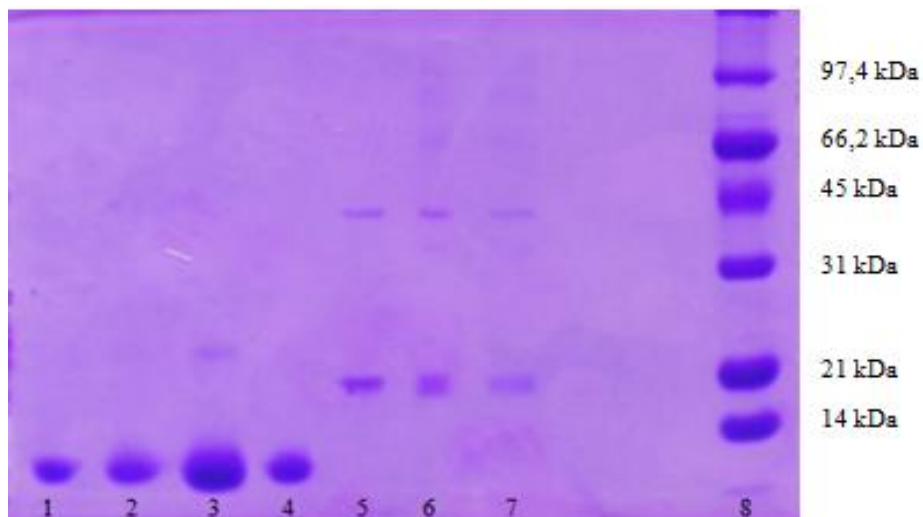
Dodecylsírán sodný (SDS) je silný detergent používaný k denaturaci proteinů. Působením SDS dojde k rozrušení kvartérní, terciální a do značné míry i sekundární struktury proteinu. Proteiny v gelu pak mají uniformní záporný náboj a pro jejich separaci je důležitá jen jejich molekulová hmotnost. [Rüchel et al. 1978]

Při přípravě SDS-PAGE jsou připraveny dvě samostatně polymerizované vrstvy polyakrylamidu, označované jako zaostřovací a separační gel. Zaostřovací gel obsahuje nízkou koncentraci polymeru a má relativně velkou velikost pórů. Velká velikost pórů umožňuje soustředit vzorek do neprodyšně uzavřených zón. Separační gel obsahuje vyšší koncentraci polymeru a má relativně malou velikost pórů. Polyakrylamidový gel je průhledný, inertní, mechanicky pevný a má vysokou rozlišovací schopnost. Gely jsou obvykle polymerizované mezi dvěma skleněnými destičkami a s vloženým hřebínkem v horní části gelu. Poté, co gel zpolymerizuje, může být hřebínek odstraněn a gel je připraven pro elektroforézu. [Schägger et al. 1987]

Elektrické pole je aplikováno přes gel, což umožňuje záporně nabitě proteiny přenést ke kladné elektrodě. Po stanovenou dobu pak proteiny migrují gelem v závislosti na své molekulové hmotnosti, menší proteiny se pohybují rychleji, zatímco větší pomaleji. [Raymond et al. 1959]

Výsledkem heterologní exprese jsou proteiny, jejichž identita a čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE. (Obr. č. 12-15)

1. Src-SH2 a C23



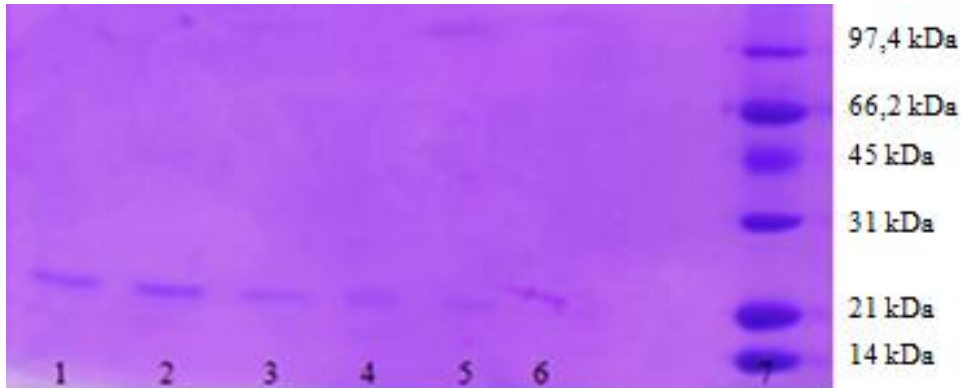
Obr. č. 12: Fotografie gelu z elektroforézy

Vzorky naneseny v pořadí

1. sonikát (supernatant) SrcSH2
2. 1. eluce po dialýze SrcSH2
3. 2. eluce po dialýze SrcSH2
4. 3. eluce po dialýze SrcSH2
5. 1. eluce po dialýze C23
6. 2. eluce po dialýze C23
7. 3. eluce po dialýze C23
8. marker

Na obrázku č. 12 je elfo gel s SrcSH2 a C23 proteiny. Z intenzity jednotlivých bandů je vidět, že největší koncentrace proteinů SrcSH2 byla získána z 2. eluce po dialýze a v případě C23 kličky byla největší koncentrace získána také z 2. eluce po dialýze.

2. Src-SH3



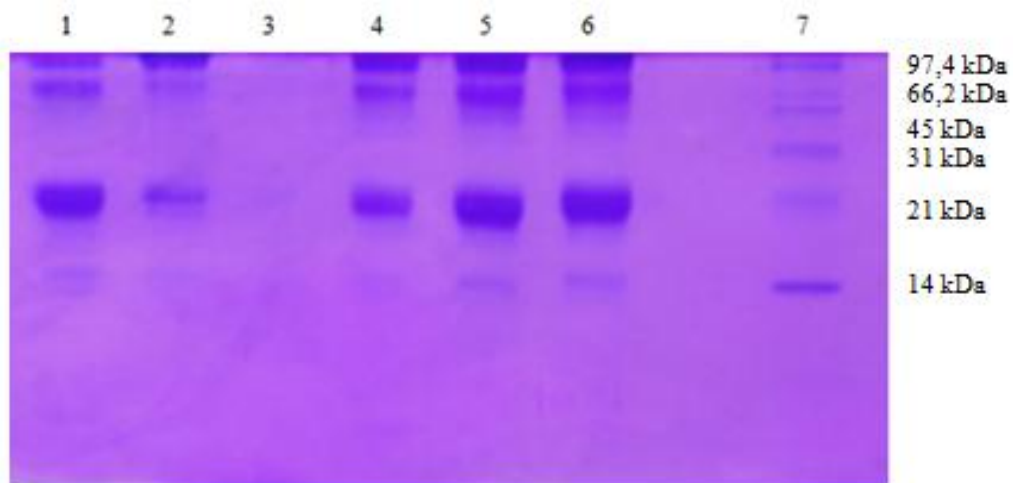
Obr. č. 13: Fotografie gelu z elektroforézy

Vzorky naneseny v pořadí

1. 1. eluce před dialýzou SrcSH3
2. 2. eluce před dialýzou SrcSH3
3. 3. eluce před dialýzou SrcSH3
4. 1. eluce po dialýze SrcSH3
5. 2. eluce po dialýze SrcSH3
6. 3. eluce po dialýze SrcSH3
7. marker

Na obrázku č. 13 je elfo gel s SrcSH3 proteinem. Z intenzity bandů je vidět, že největší výtěžek byl získán z 1. eluce před dialýzou a největší výtěžek proteinu po dialýze byl u 2. eluce.

3. C45



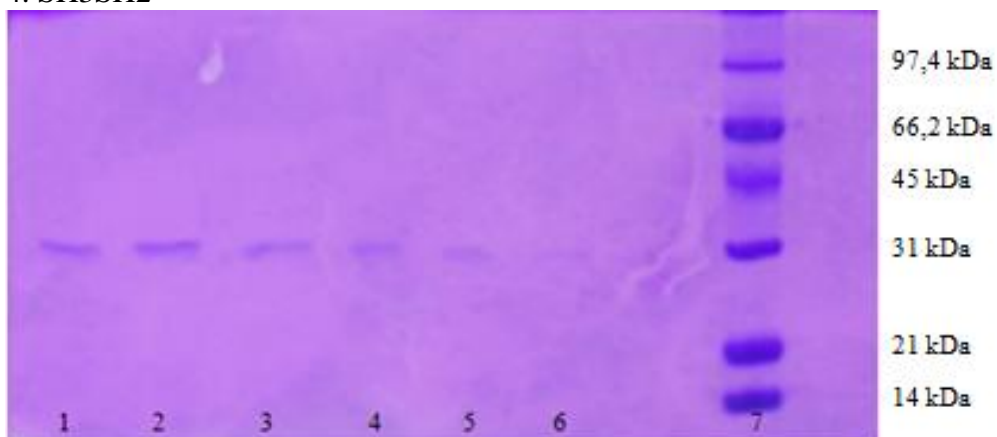
Obr. č. 14: Fotografie gelu z elektroforézy

Vzorky naneseny v pořadí

1. 1. eluce před dialýzou C45
2. 2. eluce před dialýzou C45
3. 3. eluce před dialýzou C45
4. 1. eluce po dialýze C45
5. 2. eluce po dialýze C45
6. 3. eluce po dialýze C45
7. marker

Na obrázku č. 14 je elfo gel s C45 proteiny. Z intenzity jednotlivých bandů je vidět, že největší koncentrace proteinů C45 byla získána z 3. eluce po dialýze.

4. SH3SH2



Obr. č. 15: Fotografie gelu z elektroforézy

Vzorky byly naneseny v pořadí (zleva)

1. 1. eluce před dialýzou SH3SH2
2. 2. eluce před dialýzou SH3SH2
3. 3. eluce před dialýzou SH3SH2
4. 1. eluce po dialýze SH3SH2
5. 2. eluce po dialýze SH3SH2
6. 3. eluce po dialýze SH3SH2
7. marker

Na obrázku č. 15 je elfo gel s SrcSH3SH2 proteinem. Z intenzity bandů je vidět, že největší výtěžek byl získán z 2. eluce před dialýzou a největší výtěžek proteinu po dialýze byl u 1. eluce.

Expresí proteinů je metoda, která umožňuje získat požadovaný protein v požadované velmi vysoké čistotě, což je potřeba zejména při strukturálních a interakčních studiích.

Intenzity jednotlivých bandů korespondují s výsledky měření proteinů pomocí měření dle Bradfordové a jednotlivé koncentrace proteinů jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Proteiny exprimované v této bakalářské práci byly dále použity v bakalářské práci Barbory Arnoštové s názvem Fluorescenční značení proteinů. [Arnoštová, B., Fluorescenční značení proteinů, 2013, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést expresi rekombinantní proteinů v *E. Coli*. Exprimované proteiny, které byly pro tuto práci vybrány, byly SH2, SH3 a SH2SH3 homologní domény a dále také C45 a C23 klička α -podjednotky Na^+/K^+ ATPasy.

V teoretické části jsou uvedeny kapitoly popisující bakterii *E. Coli*, vektory vhodné pro expresi, kapitola o transformaci a produkci rekombinantních proteinů. Další část teoretické části je zaměřena na Src homologní domény, funkci Na^+/K^+ -ATPasy a její dvě cytoplazmatické kličky C45 a C23.

V praktické části jsou popsány postupně jednotlivé metody vedoucí k expresi daných proteinů a také jejich vyhodnocení. Největší výtěžek proteinu na základě měření dle Bradfordové byl získán z 1. eluce po dialýze u SrcSH2 proteinu a to v koncentraci 6,88 mg/ml, u C23 proteinu byla koncentrace nejvyššího výtěžku 0,94 mg/ml. Protein SrcSH3 měl nejvyšší koncentraci při 2. eluci po dialýze a jeho koncentrace byla 0,91 mg/ml. Nejvyšší výtěžek u C45 proteinu byl v koncentraci 2,37 mg/ml. Protein SrcSH2SH3 měl největší výtěžek v koncentraci 0,91 mg/ml. Celkově se dá říct, že nejvyšší výtěžky byly identifikovány u SrcSH2 a C45 proteinů.

Expresce byla prováděna podle protokolu z Dánské univerzity v Aarhusu. Pro zvýšení výtěžku a efektivity exprese by mohly být změněny podmínky exprese např. prodloužením doby, po kterou exprese probíhala nebo také zvýšení či snížení teploty. Dále by mohla být pro expresi vybrána místo afinitní chromatografie jiný typ chromatografie jako je např. gelová chromatografie.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
AC	afinitní chromatografie
amp ^R	rezistentní k ampicilinu
BSA	hovězí sérový albumin
C23	cytoplazmatická klička Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy lokalizovaná mezi druhým a třetím transmembránovým helixem její α -podjednotky
C45	cytoplazmatická klička Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy lokalizovaná mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem její α -podjednotky
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
His-Tag	histidinová kotva (sekvence šesti a více histidinů za sebou na C- nebo N-konci proteinu)
IPTG	isopropyl- β -D-thio-glykopyranosid
kan ^R	rezistentní ke kamamycinu
LB médium	Luria Bertani médium
Na ⁺ /K ⁺ -ATPáza	sodno-draselná pumpa
OD ₆₀₀	optická densita při 600 nm
PMSF	fenylmethansulfonylchlorid
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného („sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis“)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
tet ^R	rezistentní k tetracyklinu
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Albers R. W. (1967) Biochemical aspects of active transport. *Annu. Rev. Biochem.* **36**, 727–756.

Amersham Biosciences (2002) Affinity Chromatography: Principles and Methods. *Edition AD*, 7-10.

Anzenbacher P., Kovář J. (1986) Metody chemického výzkumu pro biochemiky. pp. 38-41; 45-66, VN MON, Praha, ČSR.

Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**(5), 411–421.

Bers D. M., Barry W. H., Despa S. (2003) Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovas.Res.* **57**; 897-912.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

Brown M. T., Cooper J. A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* **1287**, 121–149.

Banga J. P. (1998) SDS-Polyacrylamide Gel Elektrophoresis (SDS-Page). *Enc.Immun.* **2**, 2143-2144.

Chang D. C., Chassy B. M., Saunders J. A., Sowers A. E. (1992) Guide to electroporation and electrofusion. *Academic Press*. San Diego. 581.

Chial H. J., Thompson H. B., Splittgerber A. G. (1993) A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G. *Anal. Biochem.* **209**, 258–266.

Compton S. J., Jones C. G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369–374.

Cuatrecasas P. (2004) Affinity Chromatography. *Enc. Biol. Chem.* **1**, 51-56.

Gavin A. C., Bösch M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J. M. et al. (2002) "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes". *Nature* **415**(6868): 141–7.

Gatto C., McCloud S. M., Kaplan J. H. (2001) Heterologous expression of Na⁺/K⁺-ATPase in insect cells: intracellular distribution of pump subunits. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C982–C992.

Gatto C., Wang A. X., Kaplan J. H. (1998) The M4M5 cytoplasmic loop of the Na, K-ATPase, overexpressed in *Escherichia coli*, binds nucleoside triphosphates with the same selectivity as the intact native protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 10578–10585.

Gryčová L., Sklenovský P., Lánský Z., Janovská M., Otyepka M., Amler, E. (2009) ATP and magnesium drive conformational changes of the Na(+)/K(+)-ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochem. Biophys. Acta (BBA)-Biomembr.* **1788**, 1081–1091.

Hengen P. (1995) "Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*". *Tr. in Biochem. Sci.* **20**(7): 285–6.

Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. (1988) "Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent". *Bio/Technology* **6**(11): 1321–1325.

Holasová Š., Radilová H., Bunčák M. Praktická cvičení z molekulární genetiky. 1. vyd. Praha : Karolinum, 47 s.

Huličiak M., Vacek J., Šebela M., Orolinová E., Znaležiona J., Havlíková M., Kubala M. (2012) Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na⁺/K⁺-ATPase by binding to its cytoplasmic part, *Biochem. Pharmacol.* **83**(11),1507–1513.

Escherich T. (1885) Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. *Fortshr. Med.* **3**:5-15-522, 547-554.

Ewing W. H. (1986) Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. *Elsevier*, New York.

Freel J. W., Goldner A. M. (1981) Sodium-coupled nonelectrolyte transport across epithelia: emerging concepts and directions. *Am.J.Physiol* **241**; G451- G460.

Jorgensen L. P. (2004) P-Type Pumps: Na⁺/K⁺ Pump, *Enc. Biol. Chem.* **3**, 571.

Kaplan J. H. (2002) Biochemistry of Na, K-ATPase, *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 511–535.

Komsa-Penkova R., Spirova R., Bechev B. (1996) Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. *J. Biochem. Biophys. M.* **32**(1),33–43.

Korduláková J., Gavurníková G. (2008) Klonovanie a expresia génu v Escherichia coli. *Univerzita Komenského v Bratislave*, Bratislava.

Kubala M., Gryčová L., Lánský Z., Sklenovský P., Janovská M., Otyepka M., Teisinger J. (2009) Changes in electrostatic surface potential of Na(+)/K(+)-ATPase cytoplasmic headpiece induced by cytoplasmic ligand(s) binding. *Biophys. J.*, **97**, 1756–1764.

Kubala M., Hofbauerova K., Ettrich R., Kopecký V., Krumscheid R., Plasek J., Teisinger J., Shoner W., Amler E. (2002) Phe(475) and Glu(446) but not Ser(445) participate in ATP-binding to the alphasubunit of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 154–159.

Kubala M., Obšil T., Obšilová V., Lánský Z., Amler E. (2004) Protein modeling combined with spectroscopic techniques: an attractive quick alternative to obtain structural information. *Physiol. Res.* **53**, S187–S197.

Kubala M., Plasek J., Amler E. (2003) Limitations in linearized analyses of binding equilibria: binding of TNP-ATP to the H-4–H-5 loop of Na/K-ATPase. *Eur. Biophys. J. Biophys.* **32**, 363–369.

Kubala M., Teisinger J., Ettrich R., Hofbauerová K., Kopecký V., Baumruk V., Krumscheid R., Plasek J., Schoner W., Amler E. (2003) Eight amino acids form the ATP recognition site of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem.* **42**, 6446–6452.

Laughery M. D., Todd M. L., Kaplan J. H. (2003) Mutational analysis of α - β subunit interactions in the delivery of Na, K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **278**(37), 34794–34803.

Lánský Z., Kubala M., Ettrich R., Kutý M., Plasek J., Teisinger J., Schoner W., Amler E. (2004) The hydrogen bonds between Arg(423) and Glu(472) and other key residues, Asp(443), Ser(477), and Pro(489), are responsible for the formation and a different positioning of TNP-ATP and ATP within the nucleotide-binding site of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem.* **43**, 8303–8311.

Lingrel J. B. (2010) The physiological significance of the cardiotonic steroid/ ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 395–412.

Machida K., Mayer B. (2005) The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* **1747**(1), Pages 1–25.

Moller J. V., Juul B., le Maire M., (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys., Acta* **186**, 1–51.

Musacchio A., Gibson T., Lehto V. P., Saraste M. (1992) SH3--an abundant protein domain in search of a function, *FEBS Lett*, **307**(1), 55–61.

Neill M. A., Tarr P. I., Taylor D. N., Trofa A. F. (1994) *Escherichia coli*. In: Hui Y. H., Gorham J. R., Murell K. D. Cliver D. O. (eds) *Footborne Diseases Handbook. Vol. 1 Diseases Caused by Bacteria.* Marcel Decker, New York, 169-213.

Neumann E., Sowers A. E. Jordan C. A. (1989) Electroporation and electrofusion in cell biology. *Plenium press*, New York.

Neumann E., Schafer-Ridder M., Wang Y. Holschneider P. H. (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO J.* **1**, 841–845.

Newell Ch. A. (2000) Plant transformation technology, developments and applications. *Mol. Biotechnol.* **16**, 53-65.

Obšil T., Merola F., Lewit-Bentley A., Amler E. (1998) The isolated H-4–H-5 cytoplasmic loop of Na,K-ATPase overexpressed in Escherichia coli retains its ability to bind ATP. *FEBS Lett.* **426**, 297–300.

Post R. L., Kume S., Tobin T., Orcutt B., Sen A.K. (1969) Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* **54**, 306–326.

Raymond S, Weintraub L. (1959) "Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis.". *Science* **130** (3377), 711.

Roskoski R. Jr (2004) Src protein–tyrosine kinase structure and regulations. *Biochem. Biophys. R. Comm.* **324**, 1155–1164.

Rosypal S. (2002) Úvod do molekulární biologie. Díl čtvrtý. 3. inovované vydání. Brno: prof. RNDr. Stanislav Rosypal, Dr.Sc.

Rosypal, S. (2003) Nový přehled biologie. [s.l.] : Scientia, s. 797.

Rumlová M., Ruml T., Pačes V. (2003) Genové inženýrství, VŠCHT, Praha

Rüchel R., Steere R. L., Erbe E.F. (1978) "Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels" *J. Chromatogr.* **166** (2), 563–575.

Schägger H., von Jagow G. (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Anal Biochem* **166** (2), 368–379.

Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. (2009) Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 angstrom resolution. *Nature* **459**, 446–U167.

Thomas S. M., Brugge J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 513–609.

Tong L., Warren T. C., King J., Betageri R., Rose J., Jakes S. (1996) Crystal structures of the human p56lck SH2 domain in complex with two short phosphotyrosyl peptides at 1.0 Å and 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256** (3), 601–10.

Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**, 647–655.

Tran C. M., Farley R. A. (1999) Catalytic activity of an isolated domain of Na, K-ATPase expressed in Escherichia coli. *Biophys. J.* **77**, 258–266.

Tsong T. Y. (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* **60**, 297–306.

Turek D. Konstrukce molekulárních nástrojů pro objevování a modulaci rostlinných hormonálních systémů[online]. 2012 [cit. 2013-05-02]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Pavel Mazura. Dostupné z: <http://theses.cz/id/6v8ec0/>

Vijayalakshmi A., Sushrut A., Murphy C., O’Kennedy R. (2012) Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Meth.* **56** (2), 116–129.

Vondrejs V., Storchová Z. (1997) Genové inženýrství I. Karolinum.

Weaver J. C., Chizmadzhev Y. A. (1996) Theory of electroporation. *Bioelectrochem. Bioen.* **41**, 135–160.