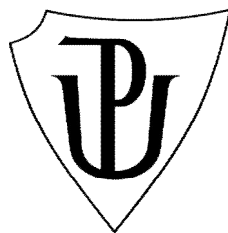


Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální fyziky



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava mutací cysteinů na cytoplasmatické části Na^+/K^+ -ATPasy

Autor:	Bc. Klára Holibková
Studijní program:	N1701 Fyzika
Studijní obor:	Fyzika - Biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	červenec 2015

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Doc. RNDr. Martina Kubaly, Ph.D., a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím
v seznamu použité literatury.

V Olomouci

.....

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D., a také Mgr. Jaroslavě Geletičové za ochotu, trpělivost, odborné vedení a všestrannou pomoc při práci na teoretické i experimentální části předložené diplomové práce. Děkuji své rodině za podporu během celého mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Klára Holibková
Název práce	Příprava mutací cysteinů na cytoplasmatické části Na^+/K^+ -ATPasy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra experimentální fyziky
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Klíčová slova	Mutace, vektor, Na^+/K^+ -ATPasa, C45, cystein
Počet stran	61
Jazyk	Český

Abstrakt:

Na^+/K^+ -ATPasa je největší proteinový komplex ATPas P-typu. Udržuje membránový elektrochemický potenciál, který je důležitý například pro šíření vzruchů v nervech. Hraje také klíčovou roli při přenosu mnoha látek přes buněčné membrány. V této práci je popsána místně specifická mutageneze vybraných cysteinových residuů C45 kličky Na^+/K^+ -ATPasy. Následovala exprese jednotlivých mutantních proteinů a pomocí Ellmanovy metody proběhla detekce reaktivních thiolových skupin. Tyto thiolové skupiny interagují s širokou škálou biologicky významných molekul.

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Klára Holibková
Title	Preparation of the cysteine mutants on cytoplasmic part of Na^+/K^+ -ATPase
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Experimental Physics
Supervisor	Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
The year of presentation	2015
Keywords	Mutation, vector, Na^+/K^+ -ATPase, C45, cysteine
Number of pages	61
Language	Czech

Abstract:

Na^+/K^+ -ATPase is the largest protein complex of P-type ATPases. It is responsible for maintaining the membrane electrochemical potential, which is important for example for propagation of impulses in the nerves. It also plays a key role in the transmission of many substances across cellular membranes. In this study, site-directed mutagenesis of selected cysteine residues C45 loop Na^+/K^+ -ATPase was performed. Followed by expression of individual mutant proteins and then, reactive thiol groups were detected using the Ellman method. These reactive thiol groups interact with a wide variety of biological molecules.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	MEMBRÁNOVÝ TRANSPORT	9
2.1.1	ROZDĚLENÍ MEMBRÁNOVÝCH PŘENAŠEČŮ	10
2.1.1.1	PASIVNÍ TRANSPORT.....	10
2.1.1.2	AKTIVNÍ TRANSPORT.....	11
2.2	Na ⁺ /K ⁺ -ATPASA	12
2.2.1	STRUKTURA Na ⁺ /K ⁺ -ATPASY	13
2.2.2	CYTOPLASMATICKÁ KLIČKA C45	15
2.2.3	KATALYTICKÝ CYKLUS Na ⁺ /K ⁺ -ATPASY	16
2.2.4	FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM Na ⁺ /K ⁺ -ATPASY	18
2.2.5	INTERAKCE Na ⁺ /K ⁺ -ATPASY S MALÝMI MOLEKULAMI	20
2.3	KLONOVACÍ VEKTORY.....	21
2.4	POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	22
2.5	HETEROLOGNÍ EXPRESE C45 V <i>E. COLI</i>	24
2.6	PURIFIKACE C45 POMOCÍ AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE	25
2.7	STANOVENÍ ČISTOTY A KONCENTRACE PROTEINU	27
2.8	DETEKCE THIOLOVÝCH SKUPIN POMOCÍ ELLMANOVA TESTU	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	MATERIÁL	30
3.2	METODY	32
3.2.1	VEKTOR SE SEKVENCÍ C45 WT	32
3.2.2	NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO PCR	33
3.2.3	PŘÍPRAVA MUTACÍ POMOCÍ PCR	34
3.2.4	HETEROLOGNÍ EXPRESE C45 KLIČKY A JEJICH MUTANTŮ	36
3.2.5	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BRADFORDOVÉ	

3.2.6	POSTUP PRO KVANTIFIKACI THIOLOVÝCH SKUPIN S POUŽITÍM CYSTEINOVÉHO STANDARDU	39
3.3	VÝSLEDKY A DISKUSE	40
3.3.1	SEKVENACE DNA.....	40
3.3.2	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	44
3.3.3	VÝSLEDKY ELLMANOVA TESTU.....	50
4	ZÁVĚR	54
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56

1 ÚVOD

Na^+/K^+ -ATPasa představuje jeden z nejvýznamnějších enzymů v živočišném metabolismu. Její součástí je velká cytoplasmatická klička (C45), která je schopna vázat ATP a malé molekuly. C45 klička obsahuje 11 cysteinových residuí a současné experimenty ukázaly, že na cysteinové zbytky se navazují biologicky významné látky, a také chemoterapeutikum cisplatina. Je pravděpodobné, že získané výsledky mohou pomoci vysvětlit mechanismus působení cisplatiny ve spojitosti s jejími vedlejšími účinky při chemoterapii.

Cílem práce bylo:

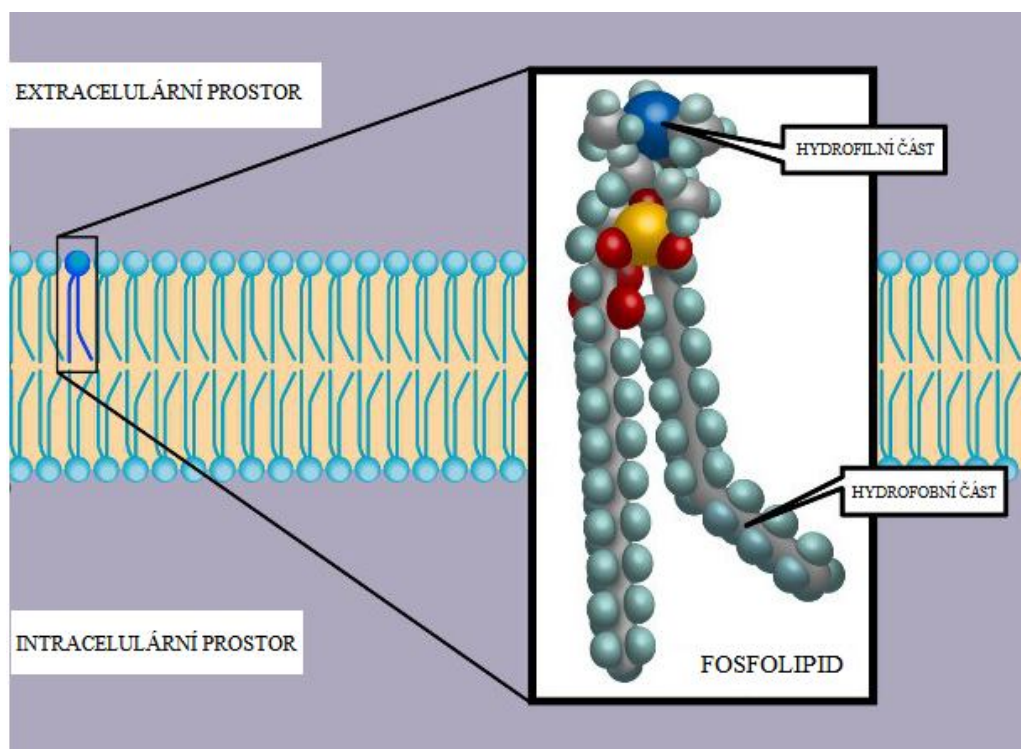
1. Příprava sady mutantů C45 kličky Na^+/K^+ -ATPasy pomocí místně specifické mutagenese.
2. Heterologní exprese proteinů pomocí *E. coli*.
3. Pomocí Ellmanovy metody odhalit povrchová residua, která se mohou zapojit do mezimolekulární interakce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MEMBRÁNOVÝ TRANSPORT

Membránový transport je nezbytný pro život všech buněk. Během buněčného cyklu je nutné zajistit všechny důležité funkce cirkulací látek přes buněčnou membránu. Transport zahrnuje začlenění biologických molekul a odstranění odpadních produktů, které jsou nezbytné pro normální funkci buňky [Pardee et al. 1968].

Membránový transport označuje soubor všech mechanismů umožňujících rozpuštěným látkám a iontům překonat přirozenou bariéru buněčné membrány. Buněčná membrána je tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů s proteiny, viz obr. 1. Buněčné membrány jsou polopropustné (semipermeabilní), což znamená, že dovnitř buňky jsou propouštěny jen některé látky. Volně prochází jen voda a některé nepochybně nepolární molekuly. Integrální proteiny zajišťují přenos látek přes fosfolipidovou dvojvrstvu nepropuštěných membránou [Kotyk 2003].



Obr. č. 1: Fosfolipidová dvojvrstva. Převzato a upraveno z http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipid_TvanBrussel.jpg

2.1.1 ROZDĚLENÍ MEMBRÁNOVÝCH PŘENAŠEČŮ

Membránové přenašeče (transportní proteiny, transportéry, bílkovinné nosiče) umožňují pasivní transport (přenos ve směru chemického nebo elektrického gradientu) i aktivní transport (proti gradientu). Tyto proteiny mohou být uniportní (přenášejí jednu látku jedním směrem), symportní (přenášejí více látek jedním směrem) nebo antiportní (vyměňují jednu látku za jinou). Aktivní transport může být primární – využívá volnou energii často získanou hydrolýzou ATP, nebo sekundární – využívá energii uloženou v gradientu elektrochemického potenciálu přes membránu.

K toku iontů přes membránu dochází nejen při aktivaci iontových kanálů, ale i v ustáleném stavu. Vyrovnání iontových gradientů by znamenalo buněčnou smrt, proto jsou průběžně obnovovány pomocí transportních proteinů, označovaných jako iontové pumpy (primární aktivní transport). Nejvýznamnější je sodno-draselná pumpa, resp. sodno-draselná ATPasa (Na^+/K^+ -ATPasa), která pumpuje sodné a draselné ionty [Atwood et al. 1989].

2.1.1.1 PASIVNÍ TRANSPORT

- PROSTÁ DIFÚZE

Látka přechází náhodným tepelným pohybem molekul z výchozí oblasti, kde je koncentrovanější, do oblasti s nižší koncentrací. Prostou difúzi využívají zejména látky rozpustné v tucích (lipofilní látky) pro transport z/do buňky přes fosfolipidovou dvojvrstvu. Příkladem takových látek jsou steroidní hormony.

- USNADNĚNÁ DIFÚZE

Podstatou je, že transportovaná molekula se váže s vysokou specifitou na transportní protein. Tato vazba vede ke konformační změně transportního proteinu a dochází k uvolnění transportované molekuly.

- IONTOVÉ KANÁLY

Prostupnost membrány pro ionty je dána přítomností specifických kanálů. Jsou to transmembránové proteiny s pohyblivou doménou, která umožňuje otevírání a zavírání kanálu. Rozlišují se tak např. kanály chemicky hradlované – kdy vazba ligandu na receptorové místo kanálu vede k jeho otevření nebo elektricky hradlované – kdy podnětem je změna membránového napětí. Existují také mechanicky hradlované kanály – reagující na pohyb nebo mechanickou sílu. Kanály hrají roli specifických branek nebo ventilů, ale k vlastnímu toku iontů pak dochází pasivně.

2.1.1.2 AKTIVNÍ TRANSPORT

Na mnoha místech v organismu je nutný transport látek proti koncentračnímu nebo elektrochemickému gradientu (spádu). Tento úkol je řešitelný pouze s vynaložením energie, a to prostřednictvím aktivních membránových přenašečů – pump. Značná část chemické energie, kterou mají organismy k dispozici, je vynaložena právě na tento aktivní transport. Je-li energie uvolňovaná z ATP spotřebovávána přímo transportní pumpou, jde o tzv. primární aktivní transport. Takové pumpy jsou také označovány jako ATPasy a nejznámějšími příklady jsou Na^+/K^+ -ATPasa, sarkoplasmatická Ca^{2+} -ATPasa nebo H^+ -ATPasa v ledvinných sběracích tubulech. Termín ATPasa je obecné označení jakéhokoli enzymu štěpícího ATP.

Jako sekundární aktivní transport je označován transport, při kterém je látka (např. glukóza ze střeva nebo ledvinného tubulu) čerpána proti elektrochemickému gradientu, ale přenašeč sám energii z ATP nespotřebovává. Je-li příslušná látka transportována stejným směrem jako hybný ion, hovoříme o kotransportu nebo symportu (např. glukóza a Na^+), jdou-li proti sobě, jde o antiport (např. Na^+ proti H^+) [Vácha et al. 2004].

2.2 Na^+/K^+ -ATPASA

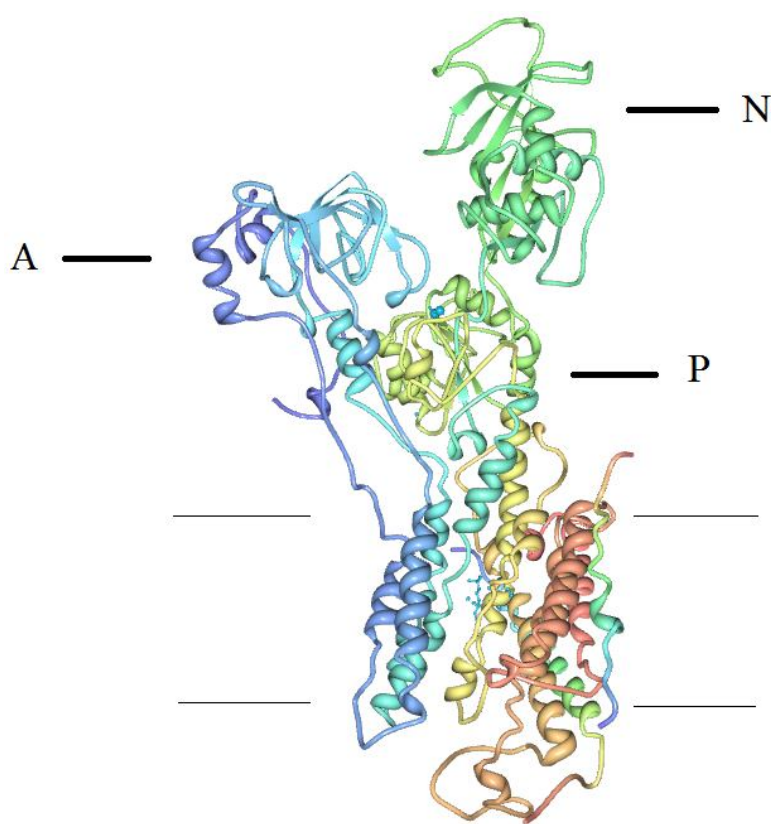
ATPasy se obvykle dělí do čtyř odlišných skupin, V-, F-, P- a ABC- ATPasy [Pedersen et al. 1987]. Členové každé skupiny sdílejí společnou strukturu a některé vlastnosti, které naznačují společný evoluční původ [Chow et al. 1995].

ATPasy P-typu tvoří velké skupiny kationových a lipidových pump a fungují jako kationtové transportéry, které se během transportního cyklu fosforylují. Bylo již plně sekvenováno více než 60 typů ATPas P-typu [Fagan et al. 1994]. K eukaryotickému P-typu ATPas patří Na^+/K^+ -ATPasa plasmatické membrány mnohobuněčných živočichů, H^+/K^+ -ATPasa žaludku a tlustého střeva savců, Ca^{2+} -ATPasa plasmatické membrány a sarkoplasmatického retikula a H^+ -ATPasa plasmatické membrány rostlin, hub a nižších eukaryot [Pedersen et al. 1987, Zhao et al. 1991].

Na^+/K^+ -ATPasa je velmi významný protein lokalizovaný v buněčných membránách. Na^+/K^+ -ATPasa se nachází v membráně živočišné buňky a používá hydrolyzu ATP k přenesení tří Na^+ iontů ven z buňky a dvou K^+ iontů dovnitř buňky. Jedná se tedy o primární aktivní transport a můžeme ji řadit do skupiny ATPas P-typu. Tato pumpa reguluje osmolaritu cytosolu změnou koncentrace rozpuštěných látek uvnitř buňky [Alberts et al. 2008].

2.2.1 STRUKTURA Na^+/K^+ -ATPASY

Všechny ATPasy P-typu mají jednoduchou strukturu ve srovnání s jinými třídami ATPas. Pro Na^+/K^+ -ATPasu je charakteristická přítomnost tří podjednotek. Funkční jednotka enzymu je tvořena katalytickou podjednotkou α (110 kDa), která je zodpovědná za transport kationtů a hydrolýzu ATP, podjednotkou β (~55 kDa), která je nezbytná pro správnou maturaci enzymu a lokalizaci v plasmatické membráně. Podjednotka β se pravděpodobně také podílí na transportu K^+ iontů [Shinoda et al. 2009, Geering 2001].



Obr. č. 3: Struktura Na^+/K^+ -ATPasy. Horizontální čáry přibližně vymezují cytoplasmatickou membránu a plasmatické domény jsou označeny písmeny A, N a P. C45 klička Na^+/K^+ -ATPasy je tvořena N a P doménou [Morth et al. 2007]. Obrázek byl pořízen pomocí programu PyMOL, na základě struktury s označením 3B8E ze stránek www.pdb.org.

Transmembránová část enzymu je tvořena deseti α -šroubovicemi (M1 – M10), které tvoří místa pro vazbu kationtů. Ty se střídavě otevírají směrem do cytoplasmy nebo směrem do extracelulárního prostoru. V cytoplasmě se nachází tři dobře oddělené domény. Doména A je tvořena N-koncem proteinu a cytoplasmatickou kličkou, která spojuje druhý a třetí transmembránový helix (C23), zatímco další dvě domény označeny jako N (nukleotidová doména) a P (fosforylační doména), tvoří velkou cytoplasmatickou C45 kličku [Gatto et al. 1998, Gryčová et al. 2009, Tran et al. 1999].

Existuje i podjednotka γ Na^+/K^+ -ATPasy. Jedná se o tkáňově specifické proteiny s regulační funkcí. Tato podjednotka patří do rodiny FXYD proteinů a bývá považována za třetí podjednotku této pumpy. Podjednotka γ interaguje s $\alpha\beta$ -komplekem a její nejvýznamnější funkcí je regulace činnosti celého enzymu [Morth et al. 2007].

2.2.2 CYTOPLASMATICKÁ KLIČKA C45

Velká cytoplasmatická klička Na^+/K^+ -ATPasy (C45) se nachází mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem α -podjednotky a tvoří dvě ze tří cytoplasmatických domén. Představuje přibližně 40 % hmotnosti celé α -podjednotky. Bylo prokázáno, že klička C45 může být oddělena od zbytku enzymu [Gatto et al. 1998, Grycova et al. 2009, Tran et al. 1999], přičemž si zachovává svou strukturu, dynamické vlastnosti [Gryčová et al. 2009, Kubala et al. 2009] a schopnost vázat nukleotidy [Kubala et al. 2003, Kubala et al. 2003].

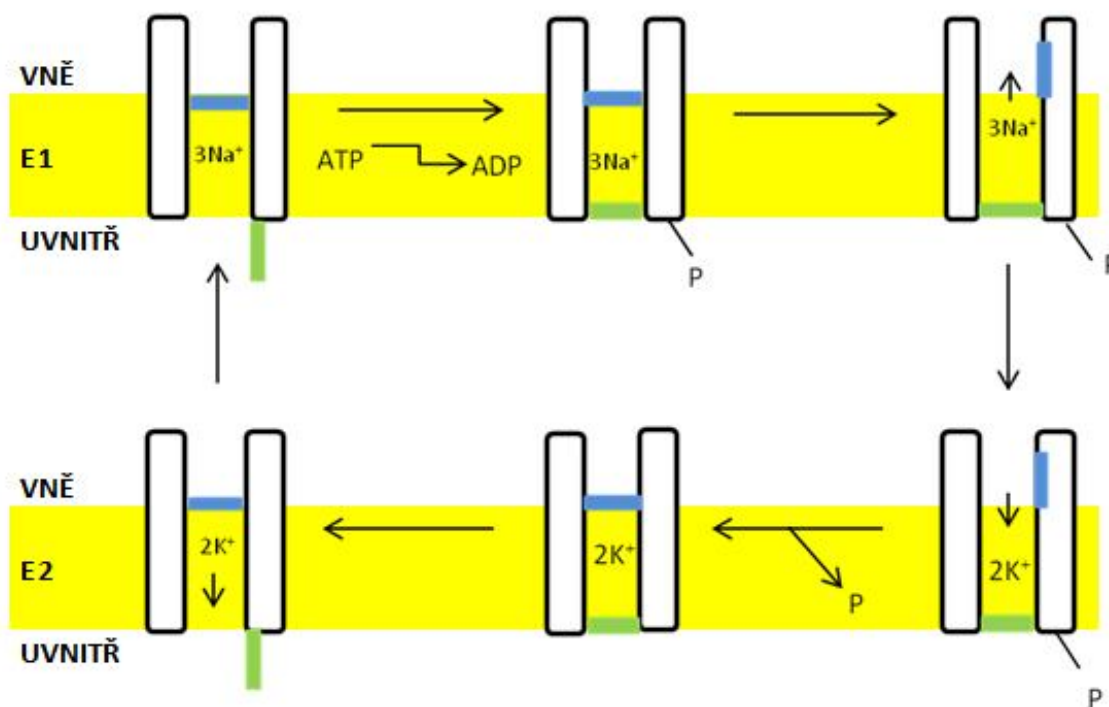


Obr. č. 4: Struktura C45 kličky. Červeně je vyznačena α helikální struktura, žlutě β skládaný list a zelenou barvou je vyznačena neuspořádaná struktura C45 kličky. Vytvořeno v programu PyMOL, na základě struktury z PDB databáze s označením 2ZXE. ze stránek www.pdb.org.

2.2.3 KATALYTICKÝ CYKLUS Na^+/K^+ -ATPASY

Na^+/K^+ -ATPasa transportuje během jednoho katalytického cyklu 3 sodné ionty vně buňky a 2 draselné ionty dovnitř buňky [Jorgensen et al. 2003]. Katalytické místo Na^+/K^+ -ATPasy je během reakčního cyklu fosforylováno, a to prostřednictvím terminálního fosfátu z ATP, který je z této molekuly odštěpen. Enzym je součástí mechanismu regulujícího složení intra- a extracelulární tekutiny. Výsledná změna elektrochemického potenciálu spustí sekundární pohyb rozpuštěných látek. Tento pohyb látek umožňuje řídit iontový transport i osmotické efekty, které jsou zodpovědné za sekundární transport vody. Takto je udržován transmembránový potenciál, který je významný pro buněčnou signalizaci. Pro správnou funkci Na^+/K^+ -ATPasy je potřeba minimálně 25% ATP, které je vytvořeno v buněčném metabolismu [DeWeer 1985].

Reakční cyklus Na^+/K^+ -ATPasy je popsán Albers-Postovým schématem [Albers 1967, Post et al. 1969], který postuluje dva hlavní konformační stavy enzymu E1 a E2. Stav E1 s vysokou afinitou k sodíku a E2 stav s vysokou afinitou k draslíku [Kaplan 2002].



Obr. č. 2: Albers-Postovo schéma.

Na^+/K^+ -ATPasa během reakčního cyklu přechází mezi dvěma hlavními konformačními stavy E1 a E2. V E1 stavu se otevírá intracelulární brána a ATP se naváže do vazebného místa, přičemž dochází ke vstupu tří Na^+ iontů. Jejich vysoká afinita indukuje hydrolýzu ATP, která podporuje uzavření Na^+ iontů uvnitř pumpy. Spontánně se tento vysokoenergetický stav E1 rychle mění na stav E2 s otevřenou extracelulární branou. Dojde k uvolnění tří Na^+ a mohou vstoupit dva K^+ na místa s vysokou afinitou pro K^+ . Při navázání dvou K^+ iontů dojde k defosforylaci a tím je uzavřena extracelulární brána. Uvolněním těchto dvou K^+ do intracelulárního prostoru se dokončí cyklus [Rodrigues et al. 2008].

Součástí Na^+/K^+ -ATPasy je velká cytoplasmatická klička (C45), která je blíže popsána v práci (Gryčová et al. 2009). Tato práce popisuje experimenty, kterými bylo zjištěno, že C45 klička v nepřítomnosti ligandu, ale v přítomnosti samotného Mg^{2+} nebo v přítomnosti Mg^{2+} a ATP, zaujímá uzavřenou konformaci. Pokud je navázáno pouze ATP je konformace C45 kličky otevřená. Tyto výsledky ukazují, že konformační změny jsou důsledkem interakce ATP a Mg^{2+} .

Výsledky jsou v souladu s modelem, kdy vazba ATP indukuje konformační změny na cytoplasmatické části enzymu a dochází k přechodu mezi $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ konformacemi. Následná vazba Mg^{2+} na komplex enzym-ATP indukuje konformační změnu a dochází k přechodu mezi $\text{E1} \rightarrow \text{E2}$ [Gryčová et al. 2009].

2.2.4 FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM Na^+/K^+ -ATPASY

Fyziologický význam Na^+/K^+ -ATPasy spočívá v udržování klidového membránového potenciálu. Dále také Na^+/K^+ -ATPasa generuje elektrochemický gradient pro Na^+ ionty, který se pak používá pro pohyb jiných látek, jako jsou např. cukry, aminokyseliny, Ca^{2+} , Cl^- a H^+ ionty. Na^+/K^+ -ATPasa čerpá sodík z intracelulárního prostoru do extracelulárního a draslík z extracelulárního prostoru do intracelulárního. Aktivita Na^+/K^+ -ATPasy ovlivňuje mimo jiné i ztrátu osmoticky aktivních částic. K dalším funkcím Na^+/K^+ -ATPasy patří udržování cytoplasmatického prostředí s vysokou koncentrací K^+ vhodného pro mnoho intracelulárních enzymů a udržování transmembránových gradientů Na^+ a K^+ [Glynn 1985].

Obecně platí, že elektrochemický gradient vytvořený Na^+/K^+ -ATPasou, je nezbytný pro činnost svalové a nervové tkáně. Na^+ gradient směřuje dovnitř buňky a je používán ve většině buněk orgánů k řízení příjmu a akumulaci široké škály základních živin. Koncentrace Na^+/K^+ -ATPasy v tkáních je velmi variabilní – nejnižší koncentrace je u erytrocytů až po nejvyšší koncentraci, kterou je možné nalézt u mozkové kůry. Hladké svalstvo má nižší hodnotu koncentrace Na^+/K^+ -ATPasy (v rozmezí 400 000 – 700 000 molekul Na^+/K^+ -ATPasy/buňka), což je cca 100x nižší hodnota než u srdečního nebo kosterního svalstva [Köksoy 2002].

Pro podjednotky α - a β - Na^+/K^+ -ATPasy byly identifikovány isoformy, které vykazují unikátní tkáňové zakončení a mají specifické funkční role. Podjednotka α má 4 isoformy: α_1 , α_2 , α_3 a α_4 . Podjednotka β má 3 isoformy: β_1 , β_2 , β_3 . Zatímco isoforma α_1 je všudypřítomná, isoforma α_2 je přítomna nejvíce v kosterních svalech, srdci, mozku adipocytech a hladké svalovině. Ale je možné ji nalézt i v dalších tkáních. α_3 isoforma se nachází téměř výhradně v neuronech a vaječnicích. Její další lokalizace může být v bílých krvinkách a srdci některých živočišných druhů, jako je například člověk [Dostanic-Larson et al. 2006]. Isoforma α_4 se nachází ve spermiích a je specificky syntetizována na fázi spermatogonia, kde je potřebná pro pohyblivost spermií [Woo et al. 2000].

Na^+/K^+ -ATPasa pravděpodobně hraje klíčovou roli během absorpce vody ve střevě a reabsorpce vody v ledvinách, protože transport vody je vždy propojen s transportem Na^+ přes epitel [Therien et al. 2000]. Dráždivé tkáně, jako jsou neurony a kosterní svalstvo, využívají Na^+/K^+ -ATPasu k obnově elektrického potenciálu přes plasmatickou membránu. Kosterní

svalstvo obsahuje Na^+/K^+ -ATPasu ve vysoké koncentraci, a proto hraje ústřední roli v odstraňování K^+ z krve během fyzické námahy nebo při příjmu K^+ z infuze [Clausen 1996]. Regulační funkce Na^+/K^+ -ATPasy je důležitá zejména pro srdeční svalovinu, protože umožňuje nástup srdeční kontrakce, popřípadě kontrakci hladkého svalstva cév [Therrien et al. 2000].

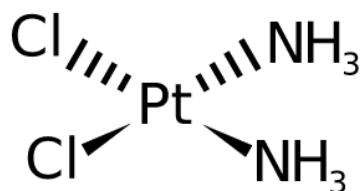
2.2.5 INTERAKCE Na^+/K^+ -ATPASY S MALÝMI MOLEKULAMI

C45 klička Na^+/K^+ -ATPasy je interakčním partnerem pro molekuly rozpustné ve vodě, které mohou blokovat funkci Na^+/K^+ -ATPasy. Zvláště reaktivní jsou pak cysteinové zbytky, které obsahují thiolovou skupinu (-SH). Bylo prokázáno, že na cysteinové zbytky se vážou toxické látky jako např. ionty rtuti. Současné experimenty naznačují, že na cysteinové zbytky se může vázat i chemoterapeutikum cisplatina.

Cisplatina (cis-diamindichlor platnatý komplex, viz obr. 5) je nejrozšířenější chemoterapeutikum při léčbě rakoviny varlat, močového měchýře a děložního čípku. Její biologické účinky spočívají v její schopnosti tvořit bifunkční adukty s jadernou DNA, tím se naruší replikace DNA a dělení buněk [Barabas et al. 2008].

Nicméně někteří pacienti užívající cisplatinu trpí velkým počtem vedlejších účinků, jako je například neuropatie nebo ztráta sluchu [Barabas et al. 2008, Dzagnidze et al. 2007]. Jedním z nejvíce závažných nežádoucích účinků je akutní selhání ledvin, které postihuje zhruba 20 – 30% pacientů v průběhu prvního týdne chemoterapie založené na cisplatině [Miller et al. 2010, Pabla et al. 2008, Ries et al. 1986]. Další klinicky schválená chemoterapeutika na platinové bázi jsou oxaliplatina a karboplatina. Tyto látky jsou mnohem méně nefrotoxické, avšak jsou účinné proti rozdílným typům nádorů [Vinciguerra et al. 2005].

Cisplatina je ve vodě rozpustná sloučenina, která se aktivuje po proniknutí přes plasmatickou membránu do buňky [Barabas et al. 2008]. Z tohoto důvodu se předpokládá interakce cisplatiny s cytoplasmatickou částí enzymu. Elektrochemické experimenty potvrdily vazbu cisplatiny na cysteinové zbytky C45 kličky [Huličiak et al. 2012].



Obr. č. 5: Struktura komplexu cisplatiny.

2.3 KLONOVACÍ VEKTORY

Klonovací vektory v molekulární biologii slouží k přepravě cizorodé DNA do hostitelské buňky, kde je tato DNA replikována a/nebo exprimována. Nejběžnější typ vektoru jsou plasmidy, cirkulární molekuly extrachromozomální DNA, které se v bakteriální buňce autonomně množí a přenášejí se při dělení do následujících generací. Často jsou využívány také virové vektory. Jedná se o rekombinantní viry, jež mají část genomu nahrazenou expresní kazetou, která po infekci (transdukci) hostitelských buněk zajistí produkci rekombinantního proteinu. Alternativou ke klasickým klonovacím systémům, ve kterých je vložení cizorodé DNA založeno na restrikčním štěpení a následné ligaci, jsou systémy založené na homologní rekombinaci. Tyto systémy umožňují snadné a efektivní klonování požadovaných genů [Růčková et al. 2014].

Plasmidové vektory jsou většinou relativně malé, (okolo 5 – 6 kb). Plasmid větší než 15 kb je jen obtížně transformovatelný a do menšího vektoru je možné vložit více cizorodé DNA. Menší plasmid obsahuje méně restrikčních míst, lépe se mapuje a často dosahuje většího počtu kopií v buňce. Nezbytnou vlastností vektorů plasmidového typu je přítomnost genů kódujících selektovatelné nebo detekovatelné znaky. Ani nejúčinnější transformační techniky nezajistí stoprocentní přenos DNA do všech bakterií nebo jiných buněk [Vondrejs et al. 1997]. Pro tuto práci byl použit vektor plasmidového typu s rezistencí k antibiotiku kanamycinu.

Pro heterologní produkci proteinů je nutno vytvořit rekombinantní molekulu DNA. Toho se docílí vložem cizorodé DNA do klonovacího vektoru. Výsledná molekula je přenesena do hostitelské buňky, kde vytvoří více kopií pomocí replikace. Často jsou používány plasmidové expresní vektory s indukovatelnými promotory, kde syntéza cizího proteinu je obvykle navozena až po nárůstu buněk do vhodné hustoty (OD_{600} asi 0,4 – 0,6) [Rosypal 2002].

2.4 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

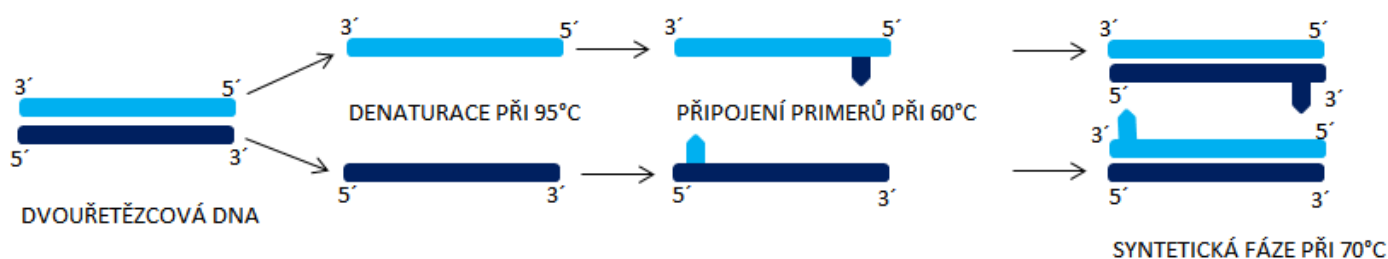
Polymerasová řetězová reakce (PCR) je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Pro DNA jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5'-koncovým sekvencím úseku, jenž má být amplifikován (pomnožen). Tato metoda, která způsobila revoluci v metodách molekulární biologie, poskytuje až 10^6 násobné pomnožení během 2 – 3 hodin. Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují:

1. tepelnou denaturaci templátu, vedoucí ke vzniku jednořetězcové DNA
2. připojení primerů
3. extenzi připojených primerů DNA polymerasou

Vzhledem k vysoké citlivosti této metody, je možné PCR použít pro detekci velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován. Velmi důležitým předpokladem pro úspěšnou reakci je navržení vhodných primerů tak, aby byla zjištěna specifita reakce. Jak návrh oligonukleotidových primerů, tak programování reakčních kroků vychází z obecné znalosti struktury DNA, včetně znalosti sekvence, k níž jsou příslušné oligonukleotidy komplementární. Je tedy nutné zdůraznit, že pro PCR je nutno znát sekvence alespoň hraničních úseků fragmentu, který má být amplifikován.

Samotná reakce vyžaduje následující složení reakční směsi:

- a) 2 oligonukleotidové primery (každý dlouhý cca 20 nukleotidů) komplementární k 3'-koncovým sekvencím obou komplementárních řetězců úseku
- b) cílová DNA, která slouží jako templát pro reakci (jedná se o úsek izolované dvojřetězcové DNA, který zahrnuje sekvenci vymezenou oběma primery)
- c) termostabilní DNA polymerasa, stálá i při teplotě 95°C
- d) směs všech čtyř deoxyribonukleotidů
- e) vhodný reakční pufr obsahující Mg^{2+} ionty, které jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerasy [Rumlová et al. 2003]



Obr. č. 6: Rámcové schéma PCR.

V prvním kroku reakce je zahřátím na 95°C denaturována templátová dsDNA (dvoušroubovicová DNA) na jednořetězcové molekuly. Termostabilní polymerasy při této teplotě nendenaturují, ale uchovávají si svou funkci. V dalším kroku je směs ochlazená na takovou teplotu, při níž mohou příslušné primery hybridizovat s templátovou DNA. Následující krok zahrnuje opětovné zvýšení teploty na 70°C, což je teplota optima termostabilní DNA polymerasy, která je pro PCR používána. Během tohoto kroku dochází k syntéze komplementárního vlákna k templátové DNA. Jako výchozí bod syntézy slouží primery hybridizované s templátovou sekvencí. Po době, která je nezbytná k vytvoření příslušné kopie DNA podle předlohy (zpravidla 2 – 3 minuty), je posloupnost reakcí opakována od začátku. Sled těchto tří kroků tvoří cyklus a může být mnohokrát opakován [Vondrejs et al. 1997].

2.5 HETEROLOGNÍ EXPRESE C45 V *E. COLI*

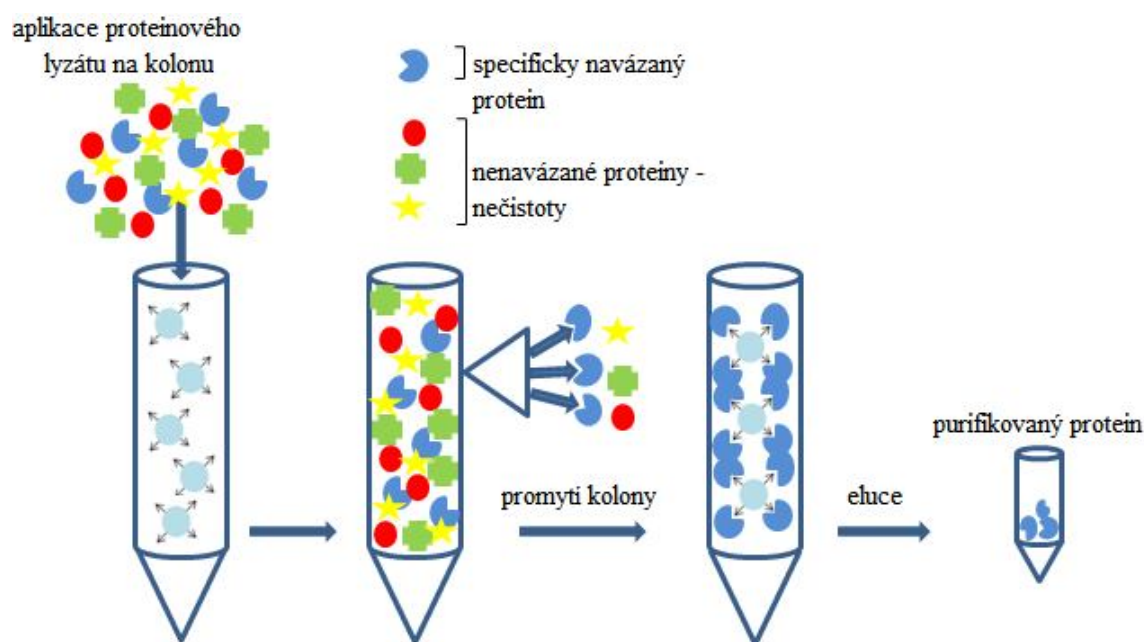
Heterologní exprese proteinů je proces, při kterém můžeme pomocí různých expresních systémů vytvořit protein odvozený od konkrétního genu, nebo části genu. Tento protein lze purifikačním systémem oddělit od nežádoucích nečistot a získat tak čistý produkt.

Expres proteinu je založena na koloniích hostitelského organismu získaných po transformaci, kdy se vybere jedna nebo více kolonií. Produkce proteinů může být řízena například T7 promotorovou sekvencí, která je zavedena v kmenech *E. coli* BL21, BL21(DE3) a BL21(DE3)pLysS. Do genomu těchto kmenů byla vložena DNA sekvence pro T7 RNA polymerasu. Expres 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 se na DNA sekvenci *lac* operonu váže *lac* represor, pak je syntéza T7 RNA polymerasy ukončena. Isopropyl- β -D-thio-glykopyranosid (IPTG) přidaný do kultivačního média se v *E. coli* naváže na *lac* represor. Ten změní svou strukturní konformaci a vyvazuje se z DNA sekvence. V tento okamžik nastává syntéza T7 RNA polymerasy. T7 RNA polymerasa pak specificky interaguje s T7 promotorem a transkribuje DNA sekvenci, která následuje za promotorem [Turek 2012].

2.6 PURIFIKACE C45 POMOCÍ AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi.

Proces purifikace je výrazně usnadněn, pokud je cílový protein opatřen afinitní značkou. Prvním krokem purifikace je v tom případě afinitní chromatografie, při níž je protein díky své afinitní značce specificky zachycen na chromatografické koloně. Nenavázané proteiny jsou v promývacím kroku odmyty a čistý protein je následně uvolněn. Uvolnění zachyceného proteinu může být provedeno specificky, a to přidáním kompetitivního ligandu, nebo nespecificky skokovou změnou pH, iontové síly či polaroty (obr. 7). Purifikační metoda je určena výběrem afinitního páru [Růčková et al. 2014].



Obr. č. 7: Schéma afinitní chromatografie. V první kroku afinitní purifikace je proteinová směs nanášena na kolonu, kde se cílový protein specificky a reverzibilně váže na ligandy zachycené na chromatografické matrici. V další fázi jsou během promývacího kroku nenavázané proteiny odmyty. Cílový protein je poté uvolněn změnou podmínek prostředí, tak aby bylo preferováno uvolnění komplexu protein – ligand [Růčková et al. 2014].

Pro tuto práci byl vybrán afinitní pár histidinová kotva a matrice obsahující imobilizované Co^{2+} ionty. Histidinová kotva se skládá alespoň z šesti histidinových (His) zbytků na C- konci proteinu. Obecně se může histidinová kotva nacházet i na N- konci proteinu [Hochuli et al. 1988]. Její umístění je podmíněno zejména strukturou exprimovaného proteinu.

2.7 STANOVENÍ ČISTOTY A KONCENTRACE PROTEINU

Stanovení koncentrace proteinů patří k nezbytným procesům před zpracováním proteinových vzorků. V závislosti na požadované přesnosti, množství a čistoty proteinu, jsou k dispozici různé metody pro stanovení koncentrace proteinu. Jednou z metod je spektrofotometrická metoda založená na absorpci UV záření aromatickými aminokyselinami při 280 nm [Rumlová et al. 2003]. Další metoda je metoda Lowryho, která kombinuje reakce iontů mědi s peptidovými vazbami s následnou oxidací proteinových aromatických zbytků. Tyto reakce probíhají v alkalickém prostředí [Everette et al. 2010].

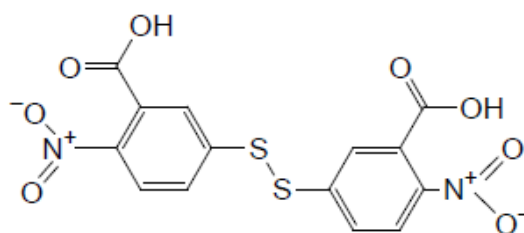
Nejběžněji používanou metodou je metoda Bradfordové, která je založena na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s bazickými a aromatickými aminokyselinami v proteinech. Použití Coomassie G-250 jako kolorimetrického činidla pro detekci a kvantifikaci proteinu bylo poprvé popsáno Dr. Marion Bradfordovou v roce 1976. Vznik charakteristického modrého zabarvení je spojen s přítomností určité aminokyseliny (zejména arginin, lysin a histidin) v proteinu. Navázání barviva na proteiny je ovlivněno van der Waalsovými silami a hydrofobní interakcí.

Výhodou metody Bradfordové je její rychlost a jednoduchost v porovnání s ostatními metodami. Vzorek proteinu je smíchán s činidlem a následně se sleduje absorbance vzniklého modrého zbarvení na vlnové délce 595 nm. Test se provádí při pokojové teplotě.

Hlavní nevýhodou této metody je její neslučitelnost s povrchově aktivními látkami (tenzidy) v koncentracích běžně používaných k rozpuštění membránových proteinů. Obecně platí, že přítomnost povrchově aktivní látky ve vzorku, a to i při nízkých koncentracích, způsobuje srážení činidla [Thermo Scientific 2010].

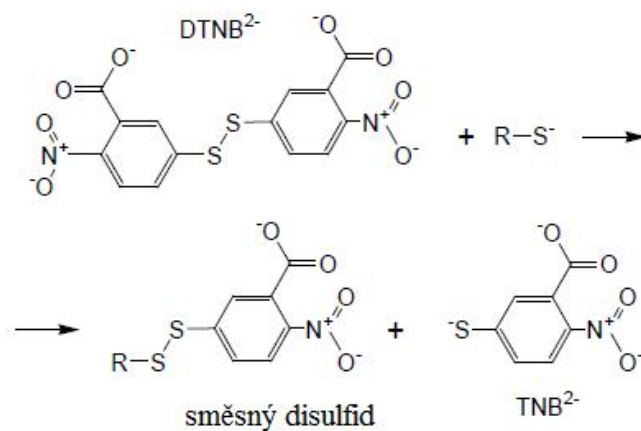
2.8 DETEKCE THIOLOVÝCH SKUPIN POMOCÍ ELLMANOVA TESTU

V roce 1959 Ellman [Ellmann 1959] představil 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoovou kyselinu) nazývanou DTNB (obr. 8), jako univerzální ve vodě rozpustnou sloučeninu pro kvantifikaci volných thiolových (sulfhydrylových) skupin v roztoku. Pokud roztok této sloučeniny reaguje s thiolem, pak produkuje měřitelný žlutý produkt. Důsledkem toho se Ellmanovo činidlo stalo užitečným nástrojem pro testování přítomnosti sulfhydrylů. Za neutrálního pH toto činidlo specificky detekuje -SH skupiny a mezi jeho další výhody patří vysoký molární extinkční koeficient a krátká reakční doba.



Obr. č. 8: Struktura Ellmanova činidla. Převzato a upraveno z www.thermoscientific.com/pierce.

Principem detekce -SH vazeb Ellmanovým testem je reakce DTNB s volnou thiolovou skupinou, čímž se získá směsný disulfid a 2nitro-5-thiobenzoová kyselina (TNB), jak zobrazuje obr. 9. DTNB v této reakci tvoří konjugovanou bázi (R-S) s volnou thiolovou skupinou. Rychlost této reakce je závislá na pH reakce, pKa thiolu a sterických nebo elektrostatických efektech [Riddles 1983].



Obr. č. 9: Redukce Ellmanova činidla. Převzato a upraveno z www.thermoscientific.com/pierce.

Množství thiolových skupin ve vzorku může být odhadnuto na základě porovnání se standardní přímkou, konstruovanou ze známých koncentrací sloučeniny obsahujících thiolovou skupinu, jako je např. cystein. Jiná metoda kvantifikace thiolových skupin pomocí DNTB je založena na extinkčním koeficientu TNB [Kuwata 1982].

V této práci jsme použili metodu založenou na konstrukci kalibrační přímky standardů, přičemž jako standard byl použit N-Acetyl-L-cystein methyl ester.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

Chemikálie

LB médium:

10 g/l Peptone from casein (Serva), 5 g/l Yeast extract (Serva), 10 g/l NaCl (Sigma), pH 7,4

Zásobní roztok antibiotika: 30 mg/ml Kanamycin (Sigma)

IPTG: isopropyl- β -D-thio-glykopyranosid (Roth)

Purifikační pufr: 10 mM TRIS (Roth), 10 mM NaCl, pH 8,8

Promývací pufr: 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 10 mM Imidazol (Roth), pH 7,6

Eluční pufr: 0,5 mM Imidazol, pH 8,5

Dialyzační pufr: 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, pH 7,6

Roztok inhibitorů proteas: (na 10 ml):

15 mg lysozym (Sigma), 25 mg PMSF (Sigma), 10 μ l leupeptin (Sigma) (koncentrace zásobního roztoku 2 mg/ml), 4 μ l pepstatin (Sigma) (koncentrace zásobního roztoku 5 mg/ml), 10 μ l 1M DTT (Serva), 100 μ l 1mM EDTA (Fluka)

NZY+ médium:

10 g/l NZ amine (casein hydrolysate, Serva), 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, pH 7,5

Afinitní matrice: Talon Metal Affinity Resin, Kobalt (Clontech)

Ellmanovo činidlo: 5,5'-Dithio-*bis*-(2-nitrobenzoová kyselina) (Life Technologies)

Reakční pufr: 0,1 M Na₃PO₄ (Sigma), pH 8,0 a obsahující 1mM EDTA (Sigma)

N-Acetyl-L-cystein methyl ester (Fluka)

Materiál na SDS – PAGE:

Elektrodový pufr : (na 1 l)

3g TRIS (Bio-Rad)

14,4g glycín (Roth)

1g SDS (Serva)

pH se neupravuje

Vzorkovací pufr: (na 1 l)

135 ml 1M TRIS (Bio-Rad)

150 ml glycerol (Sigma)

22 ml merkaptotanol (Bio-Rad)

720 ml H₂O

30g SDS (Serva)

Separační gel 10% : (na 10 ml)

2,5 ml 40% akrylamid (Serva)

2,5 ml separačního pufru

4,95 ml H₂O

15 mg Na₂SO₃ (Chemapol)

25 µl APS (100 mg/ml) (Bio-Rad)

Methylenová modř (Roth)

Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad)

Kyselina octová (LachNer)

9,75 µl TEMED (Bio-Rad)

Zaostřovací gel 4% : (na 10ml)

1ml 40% akrylamid (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)

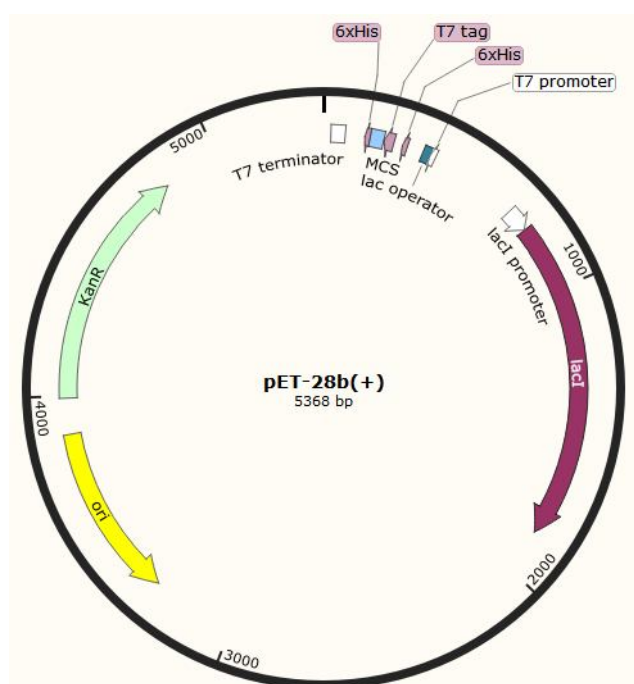
0,4% SDS (w/v) (Serva)

pH 8,8

3.2 METODY

3.2.1 VEKTOR SE SEKVENCÍ C45 WT

Byly navrženy cDNA sekvence obsahující gen pro C45 WT (WT = wild type, původní sekvence bez mutací) a restrikční místa pro endonukleasy NheI a HindIII. Původní DNA s genem pro C45 WT byla namnožena pomocí PCR a vložena do vektoru pET28b štěpeného restrikčními enzymy NheI (NEB) a HindIII (NEB). Vektor byl uzavřen pomocí T4 DNA ligasy (NEB). Konstrukt byl amplifikován pomocí DH5α *E. coli*. Sekvence konstruktu byla ověřena sekvenováním DNA [Gryčová et al. 2009].



Obr. č. 10: Bakteriální vektor pET28b (vytvořeno pomocí SnapGene). Tento vektor obsahuje následující geny:

6xHis - je úsek DNA kódující histidinovou kotvu užitečnou pro detekci a purifikaci proteinu

T7 tag – peptid odvozený od hlavního kapsidového proteinu

T7 promoter –sekvence vektoru, na kterou specificky nasedá transkripční enzym

T7 RNA polymerasa

T7 terminátor – nachází se na koncích genů a zastavuje transkripci

LacI - gen, který kóduje *lac* represor

MCS – (multiple cloning site) – polyklonovací místo

ori – (origin of replication) – počátek replikace

KanR – rezistence na kanamycin

3.2.2 NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO PCR

Konstrukt obsahující C45 WT běžně používáme v laboratoři a jeho sekvence byla dříve ověřena pomocí sekvenace. Na základě tohoto konstruktu jsme navrhli sadu primerů, které nám umožní vložit bodovou mutaci. Primery byly navrženy tak, aby splňovaly následující kritéria:

- 1) mutovaný kodon je přibližně uprostřed sekvence
- 2) na konci řetězce se nalézá co nejmenší počet G-C bází
- 3) co nejnižší teplota tání primerů
- 4) eliminace sekundárních struktur a tvorby dimerů
- 5) nově vložená aminokyselina způsobí minimální změnu ve struktuře proteinu

Primery byly objednány ze Sigma Aldrich v HPLC čistotě a jejich sekvence, jsou uvedené v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Sekvence primerů. Bodové mutace jsou zvýrazněny červenou barvou.

Název primeru	sekvence 5'-3'
C45-C599S_Fwd	5'- GCTGTGGGCAAAAGCCGCAGCGCTGGGATTAAGG -3'
C45-C599S_Rev	5'- CCTTAATCCCAGCGCTGCGGCTTTTGCCCACAGC -3'
C45-C698S_Fwd	5'- CCCTGCCGCTGGCTGCCCTCCACAATGATGAGC -3'
C45-C698S_Rev	5'- GCTCATCATTGTGGAGGGCAGCCAGCGGCAGGG -3'
C45-C456S_Fwd	5'- GCATCGAGATCAGCTGTGGCTCCGTGATG -3'
C45-C456S_Rev	5'- CATCACGGAGCCACAGCTGATCTCGATGC -3'
C45-C456S+C457S_Fwd	5'- GCATCGAGATCAGCAGTGGCTCCGTGATG -3'
C45-C456S+C457S_Rev	5'- CATCACGGAGCCACTGCTGATCTCGATGC -3'
C45-C421S_Fwd	5'- CCAGAATTGCTGGTCTCTCTAACAGGGCAGTGTTTCAGG - 3'
C45-C421S_Rev	5'- CCTGAAACACTGCCCTGTAGAGAGACCAGCAATTCTGG - 3'
C45-C452S_Fwd	5'- CCGAGTCGGCGCTCTTAGAGTCCATCGAGATCTGCTGTGGC - 3'
C45-C452S_Rev	5'- GCCACACGCAGATCTCGATGGACTCTAAGAGCGCCGACTCGG - 3'

3.2.3 PŘÍPRAVA MUTACÍ POMOCÍ PCR

PCR může být s výhodou použita pro tvorbu mutantů a k tomuto účelu lze použít komerční sestavu QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Mutantní proteiny budeme označovat C367S, C421S, C452S, C456S, C456S+C457S, C599S a C698S. Toto označení udává, že cystein (C) na pozici 367 je nahrazen serinem (S). V našem případě byl protokol pro PCR standartní a vycházel z manuálu sestavy. Pro úplnost zde uvedeme postup pro generování cysteinových mutantů C45.

Použité primery: C421S, C452S, C456S, C456S+C457S, C599S, C698S

Teplotní cyklus: 95°C	Reakční směs
95°C – 2 min	38 µl voda
95°C – 20 sec	5 µl QuikChange Lightning Buffer
60°C – 10 sec	1 µl dNTP mix
70°C – 4 min	1,7 µl templátová cDNA
68°C – 5 min	1 µl primer 1
4°C – 5 min	1 µl primer 2
	1,5 µl reagent (QuikSolution)
Počet cyklů: 18	1 µl QuikChange Lightning Enzyme

Prvním krokem byla amplifikace plasmidové DNA obsahující mutaci pomocí PCR. Po ukončení PCR byly přidány 2 µl restrikčního enzymu DpnI pro rozštěpení templátu. Templát byl štěpen minimálně 15 min při teplotě 37°C. Na ledu byl vychlazen příslušný počet mikrozkušavek, do nichž byl po 45 µl rozdělen zásobní roztok bakterií (XL 10 Gold). Ke každému alikvótu byly přidány 2 µl β-ME (β-merkaptóetanol). Takto připravené alikvóty byly inkubovány 2 minuty na ledě. Později byla k tomuto roztoku bakterií přidána PCR amplifikovaná DNA o objemu 2 µl. Tato směs byla inkubována 30 min na ledě. Mezitím byl temperován termoblok (42°C). Médium pro bakterie (NZY+médium) bylo také natemperováno. Inkorporace plasmidu byla provedena pomocí tepelného šoku – inkubace 30 s na 42°C a následně byla směs ochlazená na ledě po dobu 2 minut. Poté bylo přidáno 250 µl předeřhátého média. Vzorky byly inkubovány za stálého třepání (230 rpm) na orbitální třepačce při 37°C po dobu 1 hodiny. Směs transformovaných bakterií byla rozetřena na misky s příslušným antibiotikem. Tyto misky byly kultivovány při 37°C přes noc. V případě pozitivního výsledku byly založeny malé kultury obsahující 5 ml LB media s příslušným

antibiotikem. Tyto kultury byly následně použity k purifikaci DNA pomocí Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Koncentrace DNA byly stanoveny pomocí spektrofotometru pro měření koncentrace nukleových kyselin (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, USA).

Tab. č. 2: Hodnoty koncentrace cDNA. Čistota DNA je dána jako poměr absorbance na vlnové délce 260 nm ku 280 nm. Pro čistou DNA je tento poměr blízký 1,8.

protein	koncentrace cDNA [ng/μl]	čistota DNA
C45 WT	61	1,76
C367S	81,4	1,81
C421S	100,9	1,82
C452S	141,5	1,81
C456S	111,2	1,82
C456S+C457S	150,8	1,79
C599S	91,3	1,82
C698S	106,3	1,77

3.2.4 HETEROLOGNÍ EXPRESE C45 KLIČKY A JEJICH MUTANTŮ

Exprimované proteiny: C45 WT, C367S, C421S, C452S, C456S, C456S+C457S, C599S, C698S

Nejprve byl vektor s mutovanou sekvencí vnesen do bakteriální buňky (transformace). Následně byla připravena bakteriální kultura, která byla kultivována do vhodné optické hustoty a následně byla indukována exprese. Pomocí afinitní chromatografie byl oddělen exprimovaný protein od balastních bílkovin. Následná dialýza eluovaného proteinu zbavila vzorek přebytečného imidazolu, který by mohl protein poškodit. Čistota proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE a byla stanovena koncentrace daného proteinu. Dále uvedeme použitý postup přípravy heterologních proteinů v *E. coli*.

1. den

- příprava roztoku LB média a sterilizace roztoku ve sterilizátoru (2340M, Tuttnauer, Izrael) na 45 min a teplotu 121°C
- odebrání jedné kolonie očkovací kličkou a přenesení do 5 ml LB média
- přidání antibiotika kanamycin (finální koncentrace 30 mg/ml)
- inkubace přes noc (přibližně 16 hodin) na orbitální třepačce (180 rpm) při 37°C

2. den

- inokulace 200 ml LB média s kanamycinem
- inkubace na orbitální třepačce (180 rpm) při 37°C
- sledování absorbance na vlnové délce 600 nm každých 30 min
- po cca 2 – 2,5 hodinách, kdy absorbance dosahuje hodnot v rozmezí 0,6 – 0,8, indukování exprese přidáním IPTG (200 µl, koncentrace 100 mg/ml)
- inkubace na orbitální třepačce (180 rpm) 24 hodin při 17°C

3. den

- příprava kolony se stacionární fází
- promytí kolony 200 ml dialyzačního pufru a vychlazení na 4°C

- centrifugace (5000xg) roztoku s buňkami po dobu 25 minut při 4°C
- po centrifugaci se odstraní supernatant a pelet se rozpustí v 30 ml purifikačního pufru s inhibitory proteas
- rozbití buněk pomocí sonikační sondy (Ultrasonic homogenizer 3000, BioLogics Inc., USA), 3 x 30s ON/OFF, 30% výkon
- centrifugace (15000xg) po dobu 25 minut při 4°C
- vylití supernatantu na uzavřenou kolonu a inkubace 1 hodinu při 4°C
- promytí kolony 40 ml promývacího pufru
- eluce (přidáním 2 ml elučního pufru)
- eluce opakována celkem 3x a mezi jednotlivými elučními kroky byla vložena 30 minutová inkubace kolonové matrice s elučním pufrem
- dialýza přes noc v 1 litru dialyzačního pufru při 4°C

4. den

- analýza pomocí elektroforézy SDS-PAGE
- stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

3.2.5 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BRADFORDOVÉ

Pro stanovení koncentrace exprimovaných proteinů byla použita metoda dle Bradfordové, která je založena na interakci proteinů s ionty mědi, které jsou obsažené v barvivu. Pro odhad koncentrace je nutné změřit kalibrační závislost. Jako kalibrační protein byl v tomto případě použit BSA (bovine serum albumine) o koncentraci zásobního roztoku 1 mg/ml. Vzorky pro kalibraci byly připraveny podle tabulky č. 3. Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm na spektrometru (Specord 250 Plus, Analytik Jena A.G., Germany). Při stanovení koncentrace neznámého vzorku se smísilo 10 μ l vzorku se 140 μ l vody a 1350 μ l barviva.

Tabulka č. 3: Příprava vzorků pro kalibraci

BSA [μ l]	voda [μ l]	barvivo [μ l]	koncentrace BSA [mg/ml]
0	150	1350	0
8	142	1350	0,033
16	134	1350	0,106
24	126	1350	0,160
32	118	1350	0,215
40	110	1350	0,266
48	102	1350	0,320
56	94	1350	0,375
60	90	1350	0,400

Pro každý vzorek opakujeme měření 2x a určíme průměr. Sestrojíme závislost absorbance na koncentraci BSA a určíme rovnici přímky. Přímka má tvar

$$y = kx + q \quad (1)$$

Potom určíme absorbanci zkoumaného proteinu a úpravou rovnice 1 do tvaru

$$x = \frac{y - q}{k} \quad (2)$$

určíme koncentraci daného proteinu. Jednotlivé veličiny vystupující v rovnicích (1) a (2) jsou:

x - výsledná koncentrace zředěného proteinu v mg/ml

y - hodnota absorbance

q - posunutí na ose

k - směrnice kalibrační přímky

3.2.6 POSTUP PRO KVANTIFIKACI THIOLOVÝCH SKUPIN S POUŽITÍM CYSTEINOVÉHO STANDARDU

Pro kvantifikaci thiolových skupin s použitím cysteinového standardu byl nejprve připraven roztok Ellmanova činidla tak, že byly 4 mg Ellmanova činidla rozpuštěny v 1 ml reakčního pufru. Následovala příprava roztoků cysteinových standardů rozpuštěním N-Acetyl-L-cystein methyl esteru v reakčním pufru podle tab. 4. Roztokem A označujeme 26,58 mg N-Acetyl-L-cystein methyl esteru rozpuštěného ve 100 ml reakčního pufru.

Tabulka č. 4: Příprava roztoků cysteinových standardů.

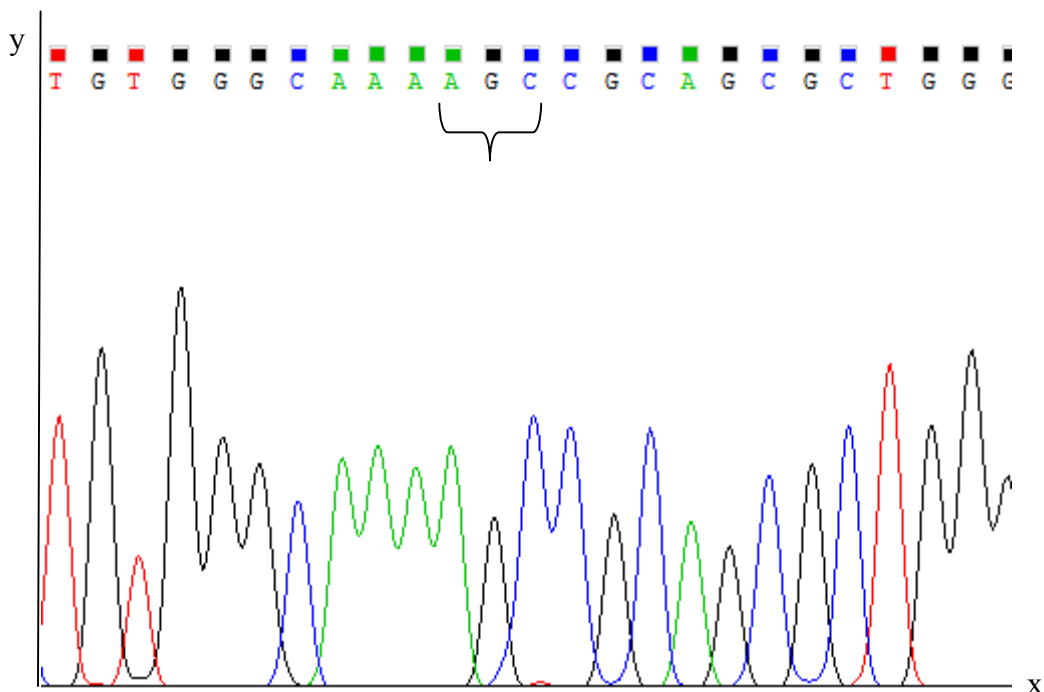
Roztok	Množství reakčního pufru	Množství N - Acetyl-L-cystein methyl esteru	koncentrace roztoku
A	100 ml	26,58 mg	1,5 mM
B	5 ml	25 ml roztoku A	1,25 mM
C	10 ml	20 ml roztoku A	1,0 mM
D	15 ml	15 ml roztoku A	0,75 mM
E	20 ml	10 ml roztoku A	0,5 mM
F	25 ml	5 ml roztoku A	0,25 mM
G	30 ml	0 ml	0 mM (blank)

Nejprve byla připravena sada roztoků standardů o známých koncentracích -SH. Dále byla připravena sada mikrozkušavek, kde každá obsahovala 20 μ l Ellmanova činidla a 1 ml reakčního pufru. Následně bylo přidáno 100 μ l každého standardu (A – G) do připravených mikrozkušavek. Takto připravené roztoky byly inkubovány na orbitální třepačce 15 min při pokojové teplotě. Následně byla změřena absorbance na vlnové délce 412 nm. Analogicky bylo postupováno u roztoků o neznámé koncentraci thiolových skupin (mutantní proteiny C45). Reakční směs v tomto případě obsahovala 10 μ l Ellmanova činidla, 100 μ l stanovovaného proteinu a 1 ml reakčního pufru. Výsledkem bylo stanovení počtu thiolových skupin v C45 kličce, a to pomocí kalibrační křivky získané z hodnot jednotlivých roztoků standardů. Jako kontrola byl použit protein C45 WT.

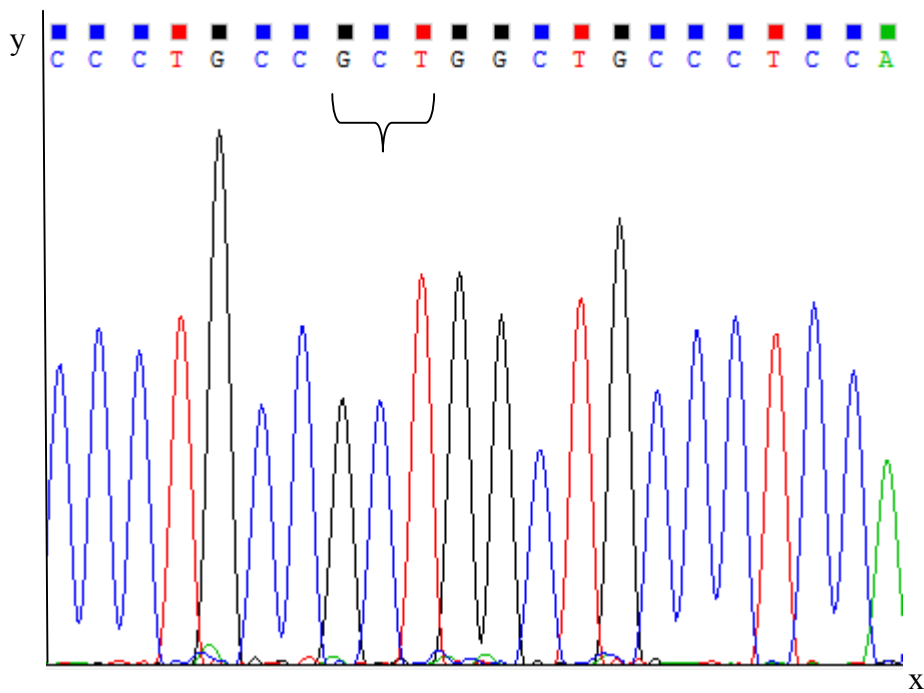
3.3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.3.1 SEKVENACE DNA

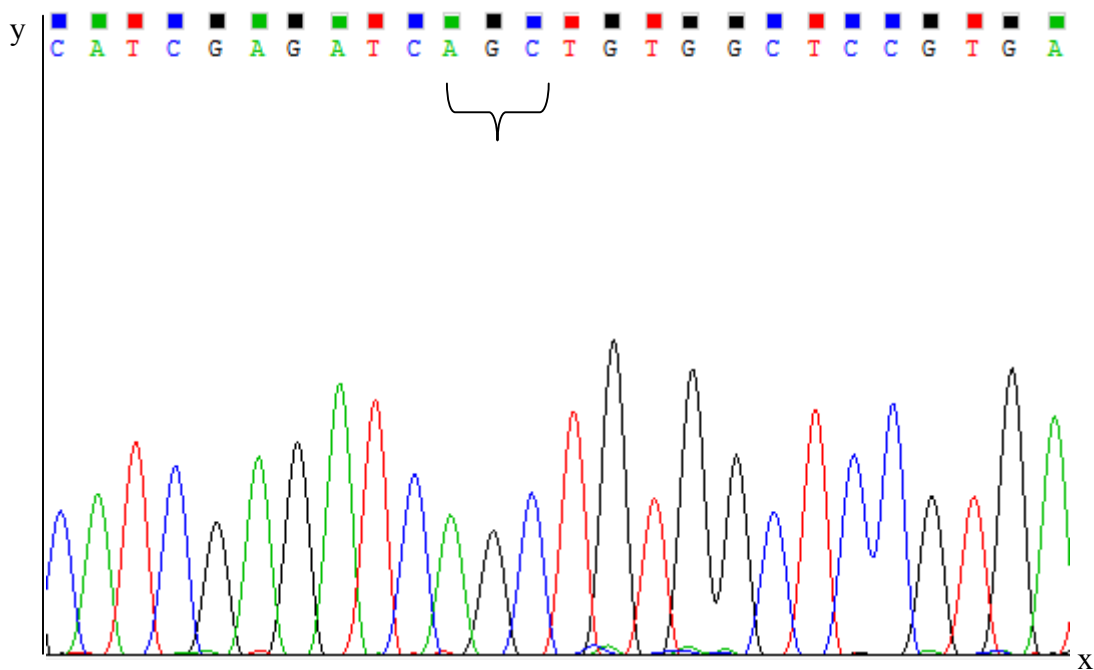
Sekvenace neboli sekvenování DNA je souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA. Metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) byly do sekvence DNA vneseny bodové mutace. Jednotlivé bodové mutace jsou znázorněny v tabulce č. 1 červenou barvou. Po dokončení PCR byly vzorky DNA odeslány do firmy Seqme a.s. a zpět nám byly zaslány jednotlivé sekvence. Tyto sekvence byly pomocí univerzálních primerů pro T7 promotor popřípadě terminátor sekvenovány. Jednotlivé vzorky byly odeslány v množství 10 µl o koncentracích uvedených v tabulce č. 2. Výsledky byly analyzovány pomocí programu Chromas Lite a jednotlivé bodové mutace jsou znázorněny v následujících obrázcích, ve kterých osa x udává pořadí v sekvenci a osa y znázorňuje intenzitu signálu.



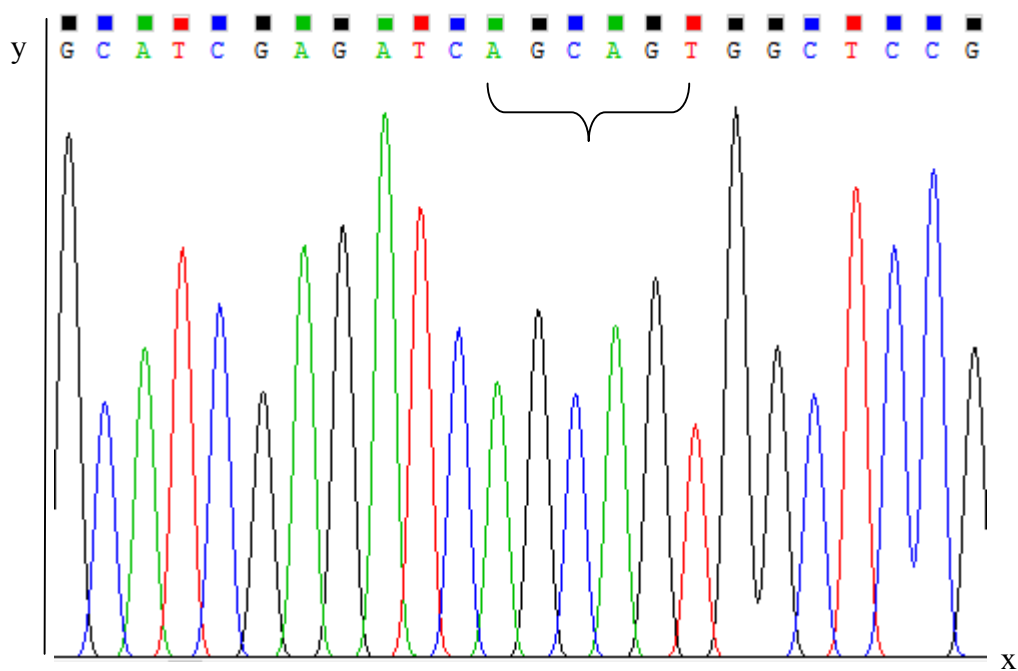
Obr. č. 11: Výsek ze sekvenace mutanta C599S. Triplet, ve kterém došlo k mutaci je zvýrazněn složenou závorkou.



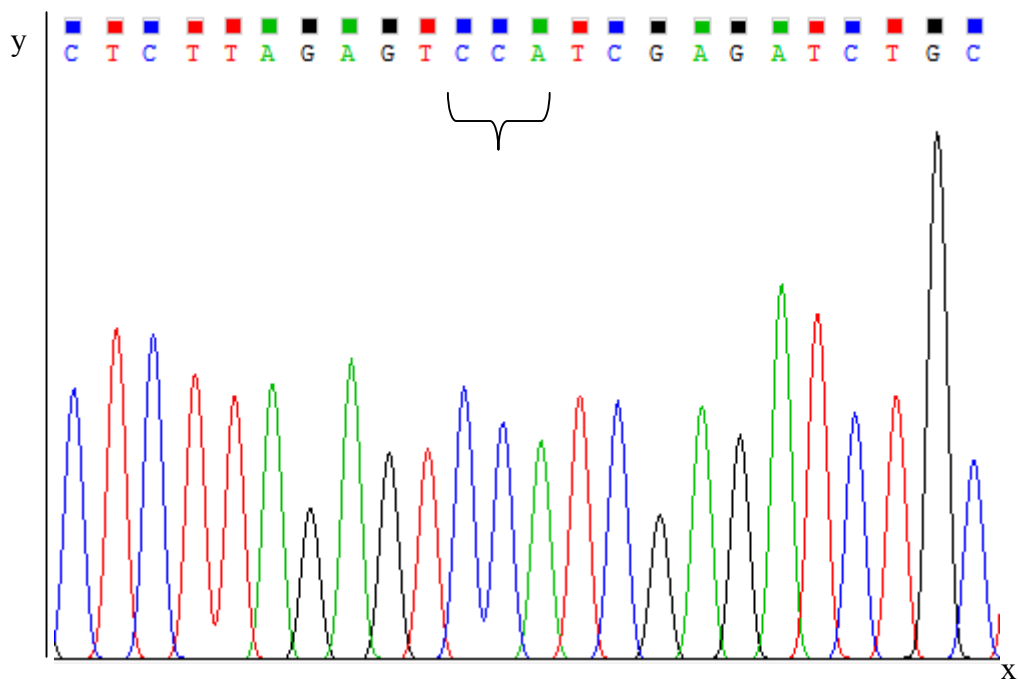
Obr. č. 12: Výsek ze sekvenace mutantu C698S. Triplet, ve kterém došlo k mutaci je zvýrazněn složenou závorkou.



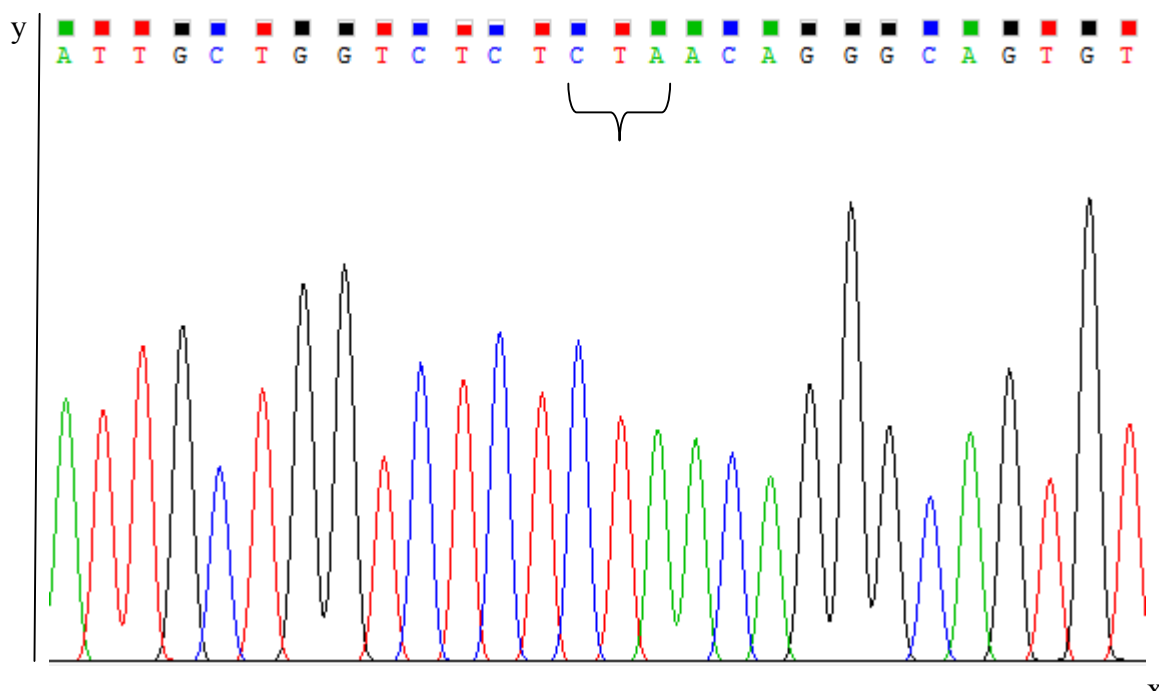
Obr. č. 13: Výsek ze sekvenace mutantu C456S. Triplet, ve kterém došlo k mutaci je zvýrazněn složenou závorkou.



Obr. č. 14: Výsek ze sekvenace mutantu C456S+C457S. Zdvojený triplet, ve kterém došlo k mutaci je zvýrazněn složenou závorkou. Tento dvojitý mutant vznikl vložením mutace na pozici C457S do vektoru obsahujícího mutaci C456S.



Obr. č. 15: Výsek ze sekvenace mutantu C452S. Triplet, ve kterém došlo k mutaci je zvýrazněn složenou závorkou.

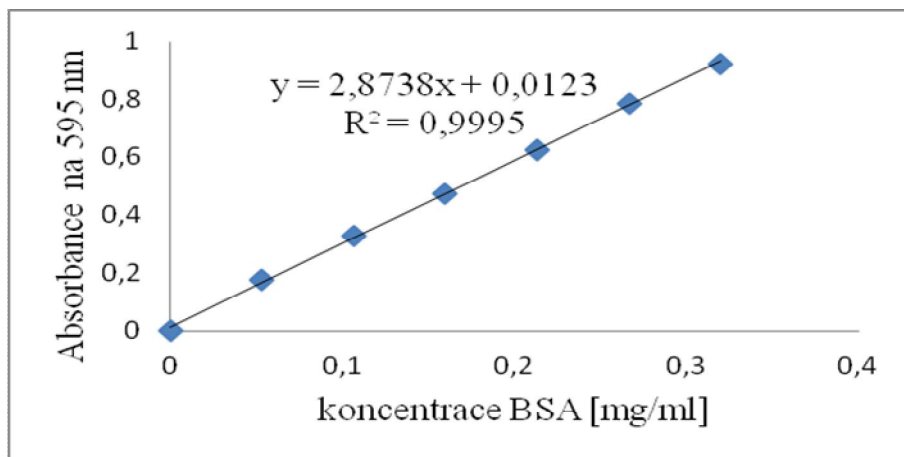


Obr. č. 16: Výsek ze sekvenace mutantu C421S. Triplet, ve kterém došlo k mutaci je zvýrazněn složenou závorkou.

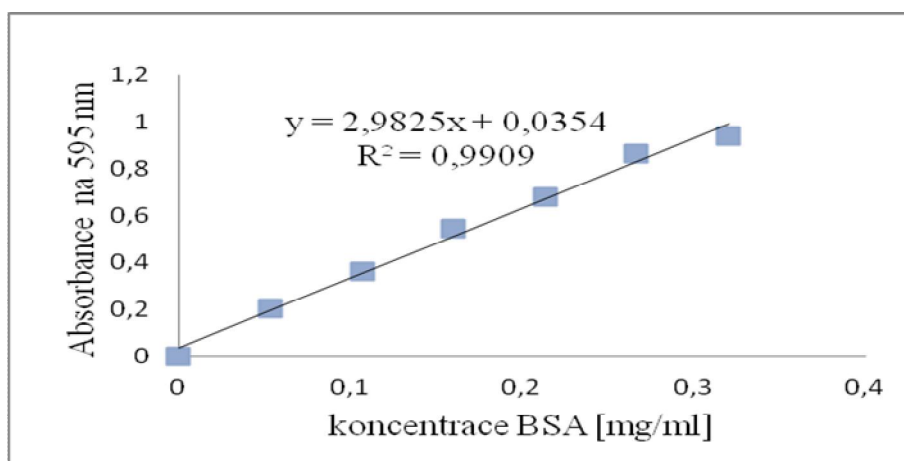
Byly porovnávány jednotlivé kodony v sekvencích a byly vybrány sekvence, u kterých došlo k bodovým mutacím. Sekvenace potvrdila, že zamýšlené bodové mutace byly ve všech případech provedeny.

3.3.2 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

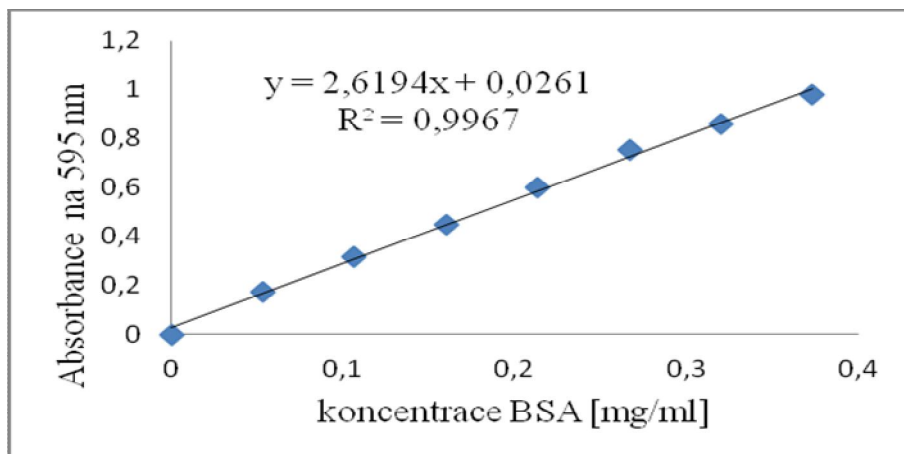
Koncentrace daných proteinů byla stanovena metodou Bradfordové. Vzhledem k možnému stárnutí chemikálií bylo nutné kalibrační křivku naměřit vždy před určením koncentrace každého vzorku, viz obr. 17 – 21.



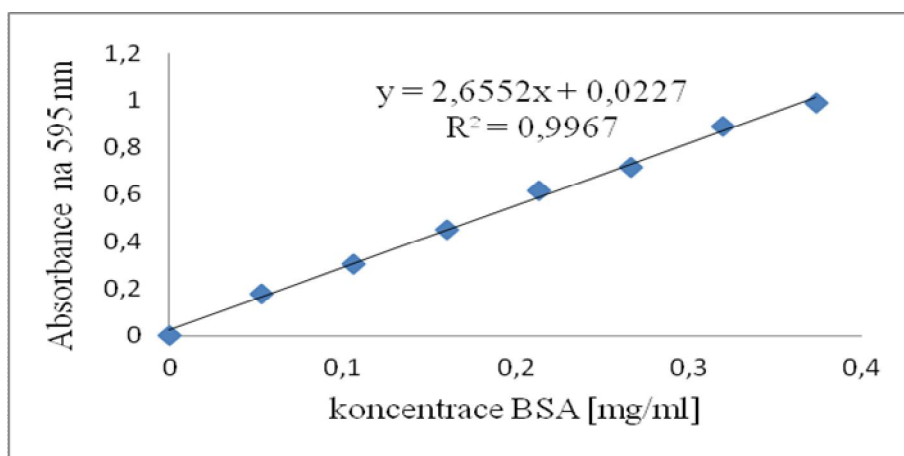
Obr. č. 17: Kalibrační křivka pro C45WT.



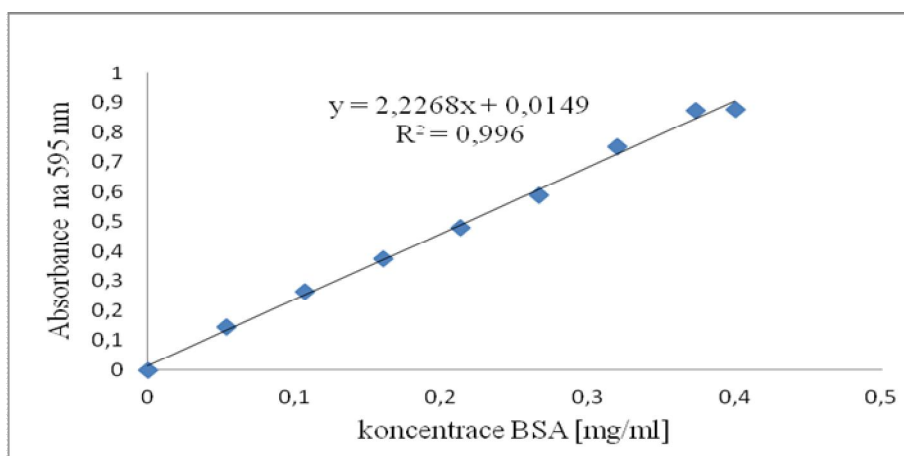
Obr. č. 18: Kalibrační křivka pro C367S.



Obr. č. 19: Kalibrační křivka pro C456S a C456S+C457S.



Obr. č. 20: Kalibrační křivka pro C599S a C421S.



Obr. č. 21: Kalibrační křivka pro C452S a C698S.

Pro měření koncentrace proteinů byly pro jednotlivé proteiny zjištěny hodnoty absorbance, které jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tab. č. 5: Hodnoty absorbance jednotlivých proteinů.

protein	absorbance na 595 nm	
	1. eluce	2. eluce
C45-WT	0,289	0,199
C367S	0,868	0,56
C421S	0,382	0,219
C452S	0,256	0,224
C456S	0,732	0,575
C456S+C457S	0,689	0,529
C599S	0,473	0,309
C698S	0,231	0,187

Jednotlivé koncentrace daných proteinů byly vypočítány podle postupu uvedeného v kapitole 3. 2. 5. Výsledné hodnoty koncentrací pro jednotlivé exprimované proteiny jsou shrnuty v tabulce 6. Uvádíme hodnoty koncentrací pouze z 1. a 2. eluce proteinu vzhledem k tomu, že koncentrace 3. eluce byla často velice nízká, a proto byly tyto vzorky vyloučeny z dalších experimentů.

Tab. č. 6: Koncentrace jednotlivých proteinů po dialýze.

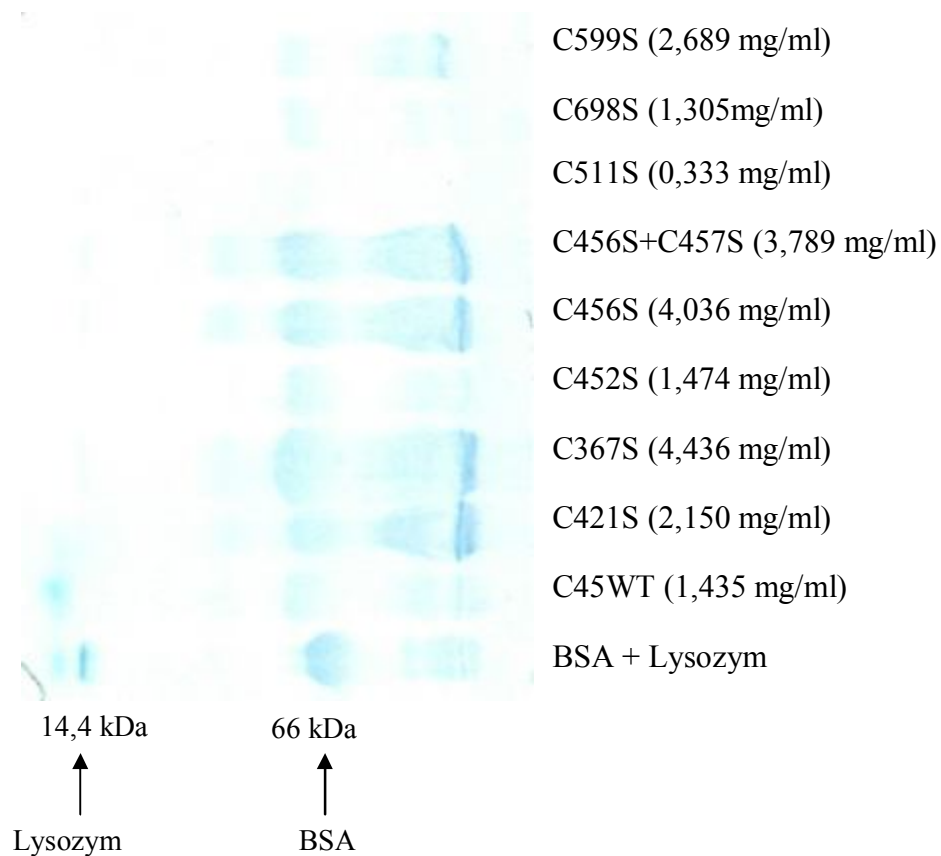
protein	koncentrace [mg/ml]	
	1. eluce	2. eluce
C45-WT	1,435	0,929
C367S	4,436	2,735
C421S	2,150	1,189
C452S	1,474	1,259
C456S	4,036	3,136
C456S+C457S	3,789	2,874
C599S	2,689	1,723
C698S	1,305	1,004

Kontrola čistoty proteinů byla provedena pomocí SDS-PAGE, což je gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (SDS). SDS-PAGE patří mezi biochemické metody, které se používají k separaci látek nesoucí elektrický náboj. Aparatura na elektroforézu se skládá ze skel s vymezovači na tuhnutí gelu. Nejprve byl mezi skla napipetován 10% roztělovací gel přibližně do 4/5 výšky skel a byl převrstven isobutanolem (eliminace případných bublin na rozmezí gelů). Po ztuhnutí roztělovacího gelu byl nanesen 4% zaostřovací gel a výsledný gel se nechal tuhnut. Skla s gelem byly zasunuty do aparatury na elektroforézu a na gel byly nanесeny vzorky, které obsahovaly 5 μ l SDS, 10 μ l exprimovaného proteinu a 3 μ l methylenové modře o koncentraci 1 mg/ml. SDS-PAGE probíhala při napětí 180 V po dobu 45 min. Výsledný gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue. Barvení probíhalo 30 min při pokojové teplotě. Následně byl gel odbarven pomocí 10% kyseliny octové.



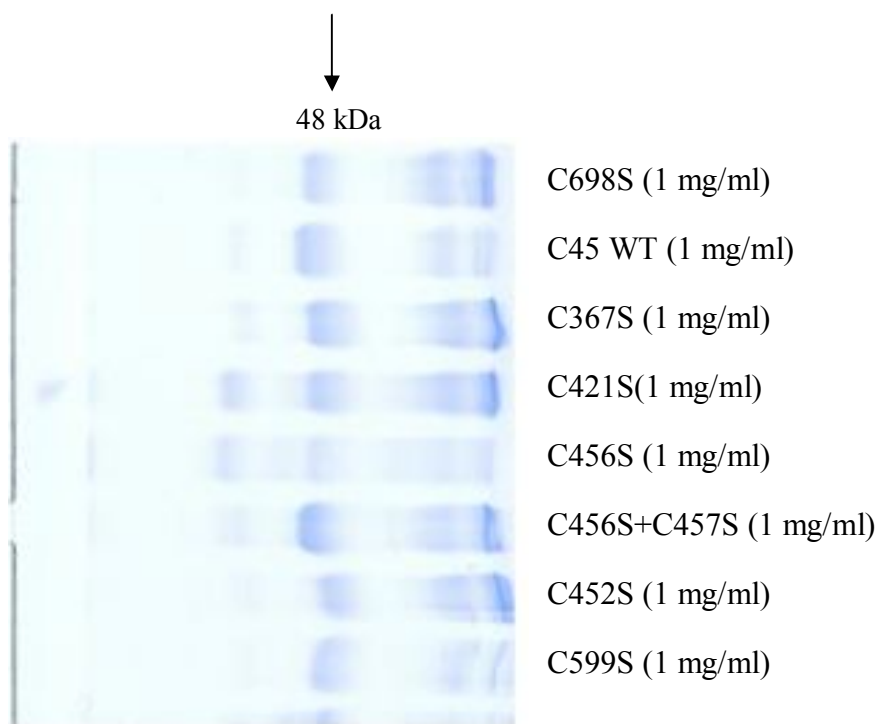
2. eluce po dialýze C45
 1. eluce po dialýze C45
 1. eluce před dialýzou C45
 promytí prom. puřrem
 2. eluce před dialýzou C45
 po afinitní chromatografii
 centrifugace – pelet
 centrifugace – supernatant
 po sonikaci
 reference C45WT

Obr. č. 22: Elektroforetický gel dokumentující čistotu proteinu v průběhu purifikace.



Obr. č. 23: Souhrnný gel pro všechny exprimované proteiny. Všechny proteiny pochází z 1. eluce a koncentrace jednotlivých proteinů jsou uvedeny v závorkách.

Exprimované proteiny nebyly úplně čisté a proto jsme použili centrifugační filtry (Amikon Ultra 2 ml, Ultra Cell 10 k, Merck Millipore) k odstranění nízkomolekulárních látek, které jsou menší než 10 kDa. Po purifikaci přes centrifugační filtry byly proteiny zředěny na koncentraci 1 mg/ml. Tyto vzorky byly také analyzovány pomocí SDS-PAGE, viz obr. 24.



Obr. č. 24: Elektroforetický gel se vzorky po použití koncentrátorů. Linie exprimovaných proteinů je vyznačena šipkou.

Proteiny se nepodařilo úplně vyčistit. Příčinou neúplného vyčištění proteinů mohou být například jiné proteiny, které se nepodařilo odmyt při afinitní chromatografii. Na obr. 24 je vyznačena linie exprimovaných proteinů s molekulovou hmotností 48 kDa. Nalevo jsou vidět proteiny s nižší molekulovou hmotností a může se také jednat o degradační produkty proteolytického štěpení. Naopak napravo jsou proteiny s vyšší molekulovou hmotností a může se jednat o oligomery. Pro zvýšení čistoty proteinů jsme zvětšili objem promývacího pufru ze 40 ml na 100 ml, ale ani tato změna neposkytla vyšší přečištění proteinů. Pro zlepšení purifikace proteinů by mohly být pozměněny podmínky exprese nebo by mohla být použita jiná metoda chromatografie.

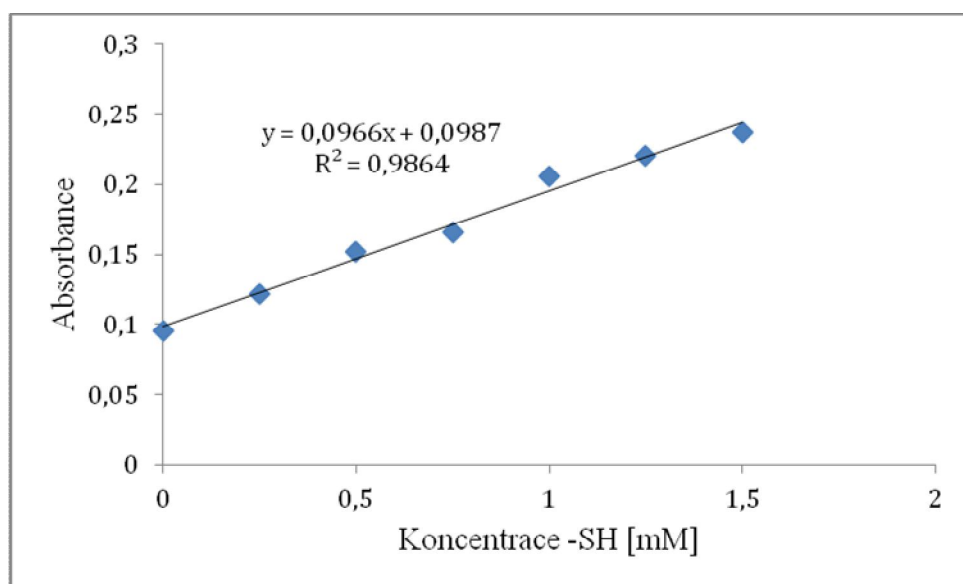
3.3.3 VÝSLEDKY ELLMANOVA TESTU

Stanovení počtu reaktivních thiolových skupin v jednotlivých proteinech je založeno na srovnání známé koncentrace proteinů se zjištěnou koncentrací reaktivních cysteinových zbytků. Pro měření byly použity proteiny, které byly koncentrovány na 1 mg/ml pomocí centrifugačních filtrů a jako kontrolní protein byl použit C45 WT. Následné měření absorbance při vlnové délce 412 nm bylo opakováno celkem 3x. Z těchto měření byla určena průměrná hodnota absorbance na této vlnové délce a byla určena také směrodatná odchylka.

Tab. č. 7: Výsledky měření absorbance proteinu.

		měření absorbance				
	koncentrace [mM]	1	2	3	průměr	sm. odch.
Roztok A	1,5	0,242	0,239	0,232	0,237	0,004
Roztok B	1,25	0,223	0,217	0,218	0,220	0,003
Roztok C	1	0,206	0,206	0,205	0,206	0,0003
Roztok D	0,75	0,174	0,147	0,177	0,166	0,014
Roztok E	0,5	0,149	0,154	0,153	0,152	0,003
Roztok F	0,25	0,123	0,121	0,121	0,122	0,001
Roztok G	0	0,095	0,096	0,094	0,095	0,001
C45-WT	0,021	0,189	0,186	0,188	0,188	0,001
C367S	0,021	0,184	0,183	0,180	0,183	0,002
C421S	0,021	0,189	0,192	0,190	0,190	0,001
C452S	0,021	0,191	0,193	0,189	0,191	0,002
C456S	0,021	0,186	0,193	0,190	0,193	0,003
C456S+C457S	0,021	0,198	0,196	0,195	0,196	0,001
C599S	0,021	0,191	0,189	0,192	0,191	0,001
C698S	0,021	0,186	0,188	0,189	0,188	0,001

Dále byla vytvořena kalibrační křivka, kdy na ose x byly vyneseny hodnoty koncentrací připravených roztoků v mM a na ose y byly vyneseny hodnoty průměru naměřených absorbancí. Graf č. 25 zobrazuje regresní přímku včetně koeficientů regrese, které byly použity pro stanovení počtu thiolových skupin.



Obr. č. 25: Kalibrační křivka jednotlivých roztoků.

Koncentrace thiolových skupin u jednotlivých proteinů byla určena pomocí rovnice regrese kalibrační přímky. Tuto hodnotu je nutné vztáhnout ke koncentraci proteinu, protože C45 klička obsahuje větší počet cysteinových residuů. Takto získáme počet thiolových skupin.

Tab. č. 8: Tabulka koncentrací proteinů, koncentrací –SH a počtu thiolových skupin.

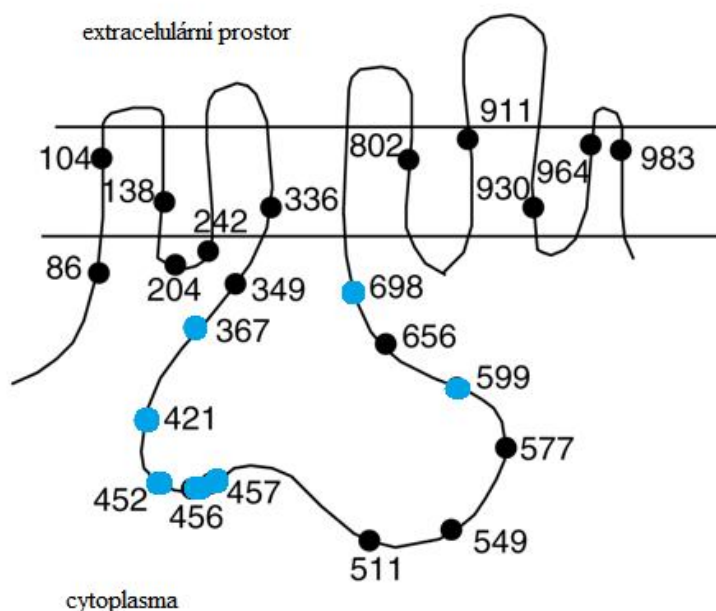
protein	koncentrace [mM]	konc. -SH [mM]	počet -SH průměr	standartní chyba měření
C45WT	0,021	0,095	4,512	0,087
C367S	0,021	0,094	4,489	0,118
C421S	0,021	0,115	5,475	0,087
C452S	0,021	0,097	4,631	0,114
C456S	0,021	0,096	4,583	0,170
C456S+C457S	0,021	0,098	4,673	0,087
C599S	0,021	0,097	4,629	0,087
C698S	0,021	0,093	4,439	0,087

Pro stanovení počtu reaktivních thiolových skupin byla použita metoda využívající cysteinového standardu. C45 klička Na^+/K^+ -ATPasy by měla obsahovat 11 cysteinových zbytků obsahující thiolovou skupinu, ale nemůžeme je detekovat všechny, protože většina je ukryta pod povrchem proteinu.

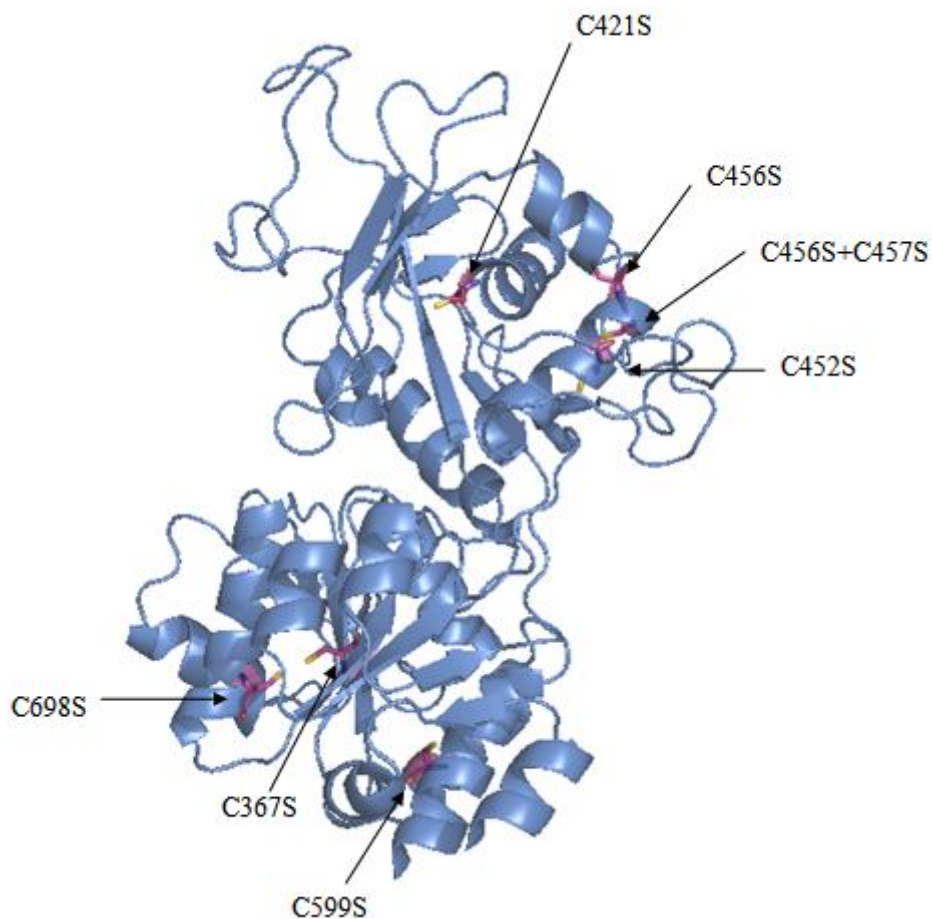
Struktura této kličky je dobře popsána včetně pozic cysteinových residuí. Tato data jsou založena na rentgenové krystalografii, která zkoumá krystal proteinu a nikoli nativní protein v roztoku. Proteiny jsou často dynamické systémy, a proto studium jejich přirozené struktury neztrácí na významnosti.

V práci (Huličiak et al. 2012) bylo zjištěno, že na C45 kličku Na^+/K^+ -ATPasy se mohou vázat až 4 molekuly cisplatiny právě na cysteinové zbytky. Dále se cysteinovými zbytky zabývali v práci (Petrushanko et al. 2012) kde je popsána vazba molekul na residua C452, C456 a C457, přičemž tato vazba změní konformaci proteinu, a to má za následek snížení afinity ATP k enzymu.

V této práci jsem detekovala na celé C45 kličce přibližně 4 – 5 thiolových skupin a při provedení bodové mutace je očekáváno, že počet reaktivních cysteinů u jednotlivých proteinů zůstane stejný, v tom případě leží cystein uvnitř proteinu nebo se počet cysteinů sníží o 1, neboť byl mutací odstraněn. Získané výsledky nebyly dostatečně přesné pro spolehlivé pozorování očekávaného efektu. Výsledky počtu reaktivních cysteinů jsou cca v polovině celočíselné hodnoty. Nepřesnost v určení počtu reaktivních cysteinů může být přičtena k nedokonalému vyčištění jednotlivých proteinů, a také k chybě při určování koncentrace jednotlivých proteinů.



Obr. č. 26: Topografická mapa vzájemné polohy cysteinů α -podjednotky Na^+/K^+ -ATPasy. (převzato a upraveno z <http://www.jbc.org/content/275/39/30734.full>)



Obr. č. 27: Rozmístění jednotlivých cysteinových residuí, které jsou mutovány na velké cytoplasmatické kličky C45. Obrázek byl pořízen pomocí programu PyMOL, na základě struktury s označením 2ZXE ze stránek www.pdb.org.

Ve výsledcích detekce thiolových skupin došlo k chybám, které mohou být přičteny neúplnému vyčištění exprimovaného proteinu. Dalším zdrojem nepřesností mohly být systematické chyby při určení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové.

4 ZÁVĚR

Na^+/K^+ -ATPasa je enzym, který má zásadní význam pro metabolismus všech živočišných buněk. Tento enzym je přítomen v plasmatické membráně většiny eukaryotických buněk a je členem skupiny ATPas P-typu. Tato práce je zaměřena na velkou cytoplasmatickou kličku C45 Na^+/K^+ -ATPasy, která se nachází mezi 4 a 5 transmembránovým helixem podjednotky α .

V teoretické části této práce jsou kapitoly popisující funkci a rozdělení membránových přenašečů, strukturu a funkci Na^+/K^+ -ATPasy a je zde detailněji popsána C45 klička Na^+/K^+ -ATPasy včetně její interakce s malými molekulami. Dále jsou zde popsány jednotlivé metody, které vedly k přípravě heterologních mutantních proteinů a k detekci reaktivních thiolových skupin na C45 kličce Na^+/K^+ -ATPasy. Pro tuto práci byly vybrány tyto proteiny: C45 WT, C367S, C421S, C452S, C456S, C456S+C457S, C599S a C698S.

Příprava mutantů pomocí PCR byla úspěšná a jednotlivé bodové mutace byly ověřeny sekvenací DNA. Při následné expresi se nepodařilo vybrané proteiny dokonale vyčistit, a to pravděpodobně díky snížené rozpustnosti proteinu. Stanovení reaktivity cysteinových zbytků Ellmanovou metodou vedlo k nekonzistentním výsledkům, což může pravděpodobně spočívat v nízké čistotě proteinů. Pro další pokračování by bylo vhodné přepracovat postup purifikace proteinů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
C23	cytoplasmatická klička Na^+/K^+ -ATPasy lokalizovaná mezi druhým a třetím transmembránovým helixem její α -podjednotky
C45	cytoplasmatická klička Na^+/K^+ -ATPasy lokalizovaná mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem její α -podjednotky
DTT	dithiotreitol
DTNB/TNB	5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoová kyselina)
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G, C, A, T	guanin, cytosin, adenin, thymin
His-Tag	histidinová kotva (sekvence šesti a více histidinů za sebou na C- nebo N-konci proteinu)
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie („high pressure liquid chromatography“)
IPTG	isopropyl- β -D-thio-glykopyranosid
kan ^R	rezistentní ke kanamycinu
bp	počet komplementárních páru bází
kDa	molekulová hmotnost (kilodalton)
LB médium	Luria Bertani médium
Na^+/K^+ ATPasa	sodno-draselná pumpa
OD ₆₀₀	optická hustota při 600 nm
rpm	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného („sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis“)
β -ME	β -merkaptoetanol

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Albers R. W. (1967) Biochemical aspects of active transport. *Annu. Rev. Biochem.* 727 – 756.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*. 661 – 663.
- Atwood H. L., MacKay W. A. (1989) Essentials of Neurophysiology. *B. C. Decker Inc.* Toronto. Philadelphia.
- Barabas K., Milner R., Lurie D., Adin C. (2008) Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet. Comp. Oncol.* 1–18.
- Chow D. C., Forte J. G. (1995) Functional significance of the β -subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J. Exp. Biol.* 1–17.
- Clausen T (1996) The Na⁺ ,K⁺ pump in skeletal muscle: quantification, regulation and functional significance. *Acta Physiol. Scand.* 156, 227 – 235.
- DeWeer P. (1985) Cellular sodium–potassium transport. In Seldin, D. W., Giebisch, G. (Eds.), The Kidney: Physiology and Pathophysiology. *Raven*. New York. 31 – 48.
- Dostanic-Larson I, Lorenz J. N., Van Huysse J. W., Neumann J. C., Moseley A. E., and Lingrel J. B. (2006) Physiological role of the $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -isoforms of the Na⁺ /K⁺ -ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am. J. Physiol. Regul. Intel. Comp. Physiol.* 290, R524 – R528.
- Dzagnidze A., Katsarava Z., Makhalova J., Liedert B., Yoon M. S., Kaube H. (2007) Repair capacity for platinum – DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J. Neurosci.* 9451.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 70 – 7.

Everette J. D., Bryant Q. M., Green A. M., Abbey Y. A., Wangila G. W., Walker R. B. (2010) Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin – Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* 58 (14).

Gatto C., McLoud 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.* 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.

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.

Geering K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 425 – 438.

Glynn I. M. (1985) The Na⁺, K⁺-Transporting Adenosine Triphosphatase. In the *Enzymes of Biological Membranes*. 2nd Ed. Plenum. New York. 35 – 114.

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.* 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*. 1321 – 1325.

Horisberger J. D., Lemas V., Kraehenbühl J. P., Rossier B. C. (1991) Structure–function relationship of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. of Physiol.* 565 – 584.

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

Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlish S.J.D. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* ;65:817 – 849.

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

Köksoy A. A (2002) Na⁺ /K⁺ -ATPase: A Review. *J. Ankara Med. Sch.* 73 – 82.

Kotyk A. (2003) Klasifikace transportních proteinů. *Chem. Listy.* 37 – 40.

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.

Kuwata K. (1982) Liquid chromatographic determination of alkylthiols via derivatization with 5, 5'- dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Chem.* 54, 1082 – 7.

Kvasnicová V., Balínová P. (2006) Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie. Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK. Univerzita Karlova v Praze.

Miller R. P., Tadagavadi R. K., Ramesh G., Reeves W. B. (2010) Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins.* 2, 2490 – 518.

Morth P., Pedersen B. P., Toustrup-Jensen M. S., Sorensen T. L.-M., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nissen P. (2007) Crystal structure of the sodium–potassium pump. *Nature.* 450, 1043 – 1050.

Pabla N., Dong Z. (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 73, 994 – 1007.

Pardee A. (1968) Membrane transport proteins: proteins that appear to be parts of membrane transport systems are being isolated and characterized. *Science* 162. 632 – 637.

Pedersen P. L., Carafoli E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell fiction. *Tr. in Bioch. Sciences.* 12, 146 – 150.

Pedersen P. L., Carafoli E. (1987) Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output, *Tr. in Bioch. Sciences.* 12, 186 – 189.

Petrushanko Yu I., Yakushev S., Mitkevich A. V., Kamanina V. Y., Ziganshin H. R., Meng X., Anashkina A. A., Makhro A., Lopina D. O., Gassmann M., Makarov A. A., Bogdanova A. (2012) S-Glutathionylation of the Na,K-ATPase Catalytic α Subunit Is a Determinant of the Enzyme Redox Sensitivity. *J. Biol. Chem.* 287, 32195 – 32205.

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

Riddles P. W. (1983) Reassessment of Ellman's reagent. *Meth. Enzymol.* 91, 49 – 60.

Ries F., Klastersky J. (1986) Nephrotoxicity induced by cancer-chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am. J. Kidney Dis.* 8,368 – 79.

Rodrigues A. M., Almeida A.-C. G., Infantosi A. F. C., Teixeira H. Z., Duarte M. A. (2008) Model and simulation of Na^+/K^+ pump phosphorylation in the presence of palytoxin. *Comp. Biol. and Chem.* 5 – 16.

Rosenberg B. (1979) Anti-cancer activity of cis-dichloroammineplatinum(II) and some relevant chemistry. *Cancer Treat. Rep.* 63,1433 – 8.

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

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

Růčková E., Müller P., Vojtěšek B. (2014) Expres a purifikace proteinů. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*, 92 – 97. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186.pdf> [27. 4. 2015]

Safaei R. (2006) Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett.* 234,34 – 9.

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.

Therien A. G. and Blostein R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C541 – C566.

Thermo Scientific (2010) Pierce protein assay. Technical handbook. 2. version. 21.

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.

Turek D. (2012) Konstrukce molekulárních nástrojů pro objevování a modulaci rostlinných hormonálních systémů[online]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <http://theses.cz/id/6v8ec0/> [cit. 2015-04-18]

Vácha M., Fellnerová I., Bičík V., Petrásek R., Šimek V. (2004) *Srovnávací fyziologie živočichů* [online]. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, [cit. 2015-04-28]. ISBN 9788021033795.

Vinciguerra M., Mordasini D., Vandewalle A., Feraille E. (2005) Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the Na,K-pump in collecting duct principal cells. *Semin. Nephrol.* 25,312 – 21.

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

Yonezawa A., Inui K. (2011) Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem. Pharmacol.* 81,563 – 8.

Woo A. L., James P. F., and Lingrel J. B. (2000) Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275, 20693 – 20699

Zhao D. Y., Dell K. R., Hollenberg M. D., Severson D. L. (1991) Phosphorylation of aortic plasma membranes by protein kinase C, *Mol. and Cell.Biochem.* 106, 171 – 180.