

Jihočeská universita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Purifikace a charakterizace proteinu IDGF2

Magisterská práce

Václav Brož

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2009

Brož, V., 2009: Purifikace a charakterizace proteinu IDGF2 [Purification and characterization of protein IDGF2. Mgr. Thesis, in Czech.] – 35 p Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this work was to characterize a member of the *Drosophila Idgf* family. IDGF2 was expressed in *Drosophila S2* cells and purified by affinity chromatography. Function of wild-type and mutant IDGF2 was compared.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Finanční podpora:

Tato práce je součástí projektu financovaného grantem Grantové agentury Akademie věd ČR, č. 610/1013 a byla podpořena grantem SGA č. 01-2060-9

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích 6.5.2009

.....
Václav Brož

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školitelovi Dr. Michalu Žurovcovi za umožnění této práce. Zvláštní poděkování patří Lucii Kučerové, Olze Jedličkové a Janě Fleischmanové za pomoc a všem ostatním členům laboratoře za vynikající atmosféru. A především bych chtěl poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
1. 1. Imaginal Disc Growth Factors	1
1. 2. Imunita.....	2
1. 3. Inzulínová dráha	4
1. Cíle práce.....	6
2. Materiály a metody.....	7
3.1. Pokusné organismy.....	7
3.2. Příprava reportérových konstruktů.....	7
3.2.1. Příprava konstruktů FOXO-Luc	7
3.2.2. Příprava konstruktů obsahující promotorové oblasti genů „Matrix Mettaloproteinase“ (CG4859) a <i>fear of intimacy</i> (CG6817).....	9
3.3. Práce s buňkami.....	11
3.3.1. Média.....	11
3.3.2. Rozmrazování buněk S2.....	11
3.3.3. Pasážování buněk	11
3.3.4. Zamrazování buněk	11
3.3.5. Transfekce buněk S2	12
3.3.6. Purifikace proteinů IDGF	12
3.3.7. Měření účinků IDGF proteinů pomocí reportérových konstruktů	13
3.3.8. Příprava nativních preparátů pro konfokální mikroskopii	14
3. Výsledky	15
4.1. Příprava konstruktů	15
4.2. Stabilní buněčné linie	15
4.2.1. Reportérové linie a linie s GFP	15
4.2.2. Linie produkující proteiny IDGF	16
4.3. Purifikace rekombinantních proteinů IDGF.....	16
4.4.1. Detekce účinku IDGF2.....	19
4.4.2. Linie nesoucí luciferázové reportérové konstrukty pod promotory genů CG4859 a CG6817.	21
4.4.3. Vliv IDGF2 na inzulínovou dráhu	22
4.5. Konfokální mikroskopie buněk obsahující fúzní protein PH : GFP	23
4. Diskuze.....	25
5. 1. Izolace proteinů IDGF.....	25
5. 2. Charakterizace vazebného centra IDGF2.....	25
5. 3. Vliv IDGF2 na inzulínovou dráhu.....	28
6. Závěr	30
7. Seznam literatury	31

1. ÚVOD

1. 1. Imaginal Disc Growth Factors

Rodina *Idgf* u *D. melanogaster* má šest členů, jež mají dosti podobnou sekvenci ale liší se specificitou exprese. Prvně popsáný člen rodiny byl nazván DS47 (Kirkpatrick et al. 1995) a svým biologickým účinkem je spíše podobný ostatním homologním proteinům, které byly popsány u ostatních skupin živočichů, od hmyzu až po obratlovce. DS47 je produkován embryonální buněčnou linií, stejně tak velká část homologických genů byla objevena v souvislosti s antibakteriální odpovědí, např. geny *AgBR1* a *AgBR2*, které se exprimují jako odpověď na bakteriální infekci u komára (Shi and Paskewitz. 2004), a homology genů *Idgf1-5* u *Glossina morsisitans morsisitans* (Attardo et al. 2006). Na základě DNA-čipové analýzy, prováděné exprese genů různými stimuly byly indukce IDGF zjištěny jako součást odpovědi na infekce gramnegativními a grampozitivními bakteriemi i na poranění, jako součást jakéhosi hmyzího „strupu“ po poranění i jako geny specifické pro imaginální terčky (IDGF4, DS47) (Karlsson et al. 2004; Irving et al. 2005; Vierstraete et al. 2004).

Bílkoviny podobné IDGF byly nedávno popsány i u člověka: jedná se o dva podobné proteiny HC-gp39 (kódující gen chitinase 3-like 1) a YKL-40 (kódující gen chitinase 3-like 2), které se účastní zánětlivých procesů (Hakala et al. 1993; Hu et al. 1996). Protein HC-gp39 byl nalezen v synoviální tekutině pacientů s revmatickými chorobami a osteoartritidou. Soudí se, že vysoký obsah těchto proteinů souvisí s udržováním homeostáze v těchto tkáních (Recklies et al. 2002).

Proteiny IDGF byly prvně popsány růstové faktory u bezobratlých vykazující sekvenční příbuznost k chitinázám, ze kterých se zřejmě vyvinuly (Kawamura et al. 1999), a spolu s ostatními sekvenčně příbuznými homology je řadíme mezi Chitinase Like Proteins (CLP) genové rodiny 18-glykosyl hydroláz (Badariotti et al. 2006). Několik dalších CLP postrádající enzymatickou aktivitu bylo popsáno u savců (Chang et al. 2001; Shackelton et al. 1995; Buhi et al. 1996).

Vyjma diptera, tak u ostatních skupin hmyzu nalézáme pouze po jednom zástupci rodiny *Idgf*. Patří sem homologický gen bource (Tsuzuki et al. 2001), nebo *Pieris rapae* (Asgari et al. 2004). Zástupce CLP byl objeven i u měkkýšů. Kódovaný protein je funkčně více podobný homologům popsáných u savců než drozofilím členům *Idgf*. Dále z tohoto srovnání vyplývá, že původ proteinů sahá až k počátku evoluce živočichů.

Během evoluce vyšších dipter muselo zřejmě dojít k duplikaci těchto genů, kdy větší počet růstových faktorů mohl napomoci pro rychlou metamorfózu diptera (Badariotti et al. 2006).

Je známa krystalická struktura *Idgf2* (Varela et al. 2002). Srovnáním sekvencí aminokyselin chitináz a IDGF lze zjistit, že u *Idgf2* došlo v pozici 132 ke změně klíčové skupiny Glu, přítomné v chitinázách, na Gln, což mělo za následek ztrátu hydrolytické aktivity. Nezbytnost Glu v aktivním místě je dokázána cílenou mutací prováděnou na bakteriálních chitinázách (Sun et al. 2001). Protože se nadále zachovalo vazebné místo, získaly novou schopnost vázat se jako lektin na cukerné složky membránových proteinů na povrchu buněk případně patogenů (Varela 2002). Obdobnou záměnu klíčové skupiny nalézáme u ostatních zástupců CLP postrádajících hydrolytickou aktivitu (Sun et al. 2001; Fusetti et al. 2003).

Z výzkumů prováděných v naší laboratoři bylo zjištěno že proteiny IDGF podporují růst *in vitro* (Kawamura et al. 1999). Dále účinek proteinu IDGF2 má za následek aktivace obraných mechanismů, jako např. Antimikrobiálních peptidů. Signální dráhy, které kontrolují spuštění obraných mechanismů se zdají být možným cílem působení proteinů IDGF. Bylo zjištěno, že IDGF2 rozpoznává a váže cukerný motiv Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β . Tohoto poznatku bylo využito pro vytvoření mutantní verze proteinu IDGF2, kde je změněna aminokyselina aspartamín v pozici 115 na alanin. V době, kdy byla vytvořena RTG struktura, nebyl znám vazebný cukr a skupina se snažila do vazebného centra zabudovat N-acetylglukosamin (Varela et al. 2002).

Protože bylo zjištěno, že po přidání IDGF2 k buňkám dochází k indukci některých genů, byly připraveny reportérové konstrukty promotor + luciferáza pro sledování funkčnosti proteinu IDGF2. Ve své práci se snažím připravit buněčné sublinie stabilně exprimující reportérové konstrukty a zavedení metod testování funkce IDGF2.

1. 2. Imunita

Přirozenou obranyschopnost proti patogenům najdeme u všech mnohobuněčných organismů, od hmyzu až po savce. Pouze u savců nalezneme i tzv. získanou imunitu, která je založena na produkci protilátek. Přirozená imunita rozeznává konzervované motivy patogenů jako jsou např. složky bakteriálních stěn. Dalším společným rysem přirozené imunity je konzervovanost signálních drah, které ji řídí, proto lze použít

modelový organizmus *Drosophila melanogaster* pro pochopení těchto buněčných pochodů (De Gregorio 2002).

U drozofily se imunitní odpověď skládá ze třech částí: (1) krevními buňkami zprostředkovaná fagocytóza a „enkapsulizace“, (2) proteolytická kaskáda vedoucí k tvorbě melaninu a (3) sekrece antimikrobiálních peptidů (Tzou et al. 2002).

Buněčnou odpověď zajišťují krevní buňky nazývané hemocyty. Podle morfologie se dělí na plasmacyty, lamellocyty a krystalové buňky. Plasmacyty jsou nejpočetnější a fagocytují bakterie a jiné cizorodé částice. Pro obranu proti větším parazitům, jako např. vajíčka parazitických vos, slouží kapsule tvořené dlaždicovými lamellocyty. Krystalové buňky mají úlohu při tvorbě pro mikroorganismy toxického melaninu, který je ukládán kolem okrajů ran a cizích objektů (Aggarwal and Silverman. 2008).

Protože hmyz je příliš malý pro sběr hemocytů a následný výzkum účinných látek, které produkují, je zatím nejlépe pochopena humorální odpověď, konkrétně produkce antimikrobiálních peptidů (dále jen AMP) (Lavine and Strand 2002). U drozofily nalezneme asi 34 AMPs tvořících osm genových rodin. Ačkoliv se tyto rodiny liší ve velikosti a aminokyselinovém složení, dají se dále rozdělit podle biologické funkce, tedy odpověď na napadení houbami nebo gramnegativními či grampozitivními bakteriemi. Jen několik hodin po rozpoznání patogena dosahují mikromolárních koncentrací v hemolymfě. K produkci AMPs dochází v tukovém tělese, ekvivalentu savčích jater (Hultmark 2003).

Imunitní odpověď u drozofily, tak jako u savců, je řízena dvěma vývojově nezávislými signálními drahami, které ale spolu do jisté míry interagují. Aktivace dráhy Toll je způsobena přítomností grampozitivních bakterií a hub, oproti tomu na infekci gramnegativními bakteriemi odpovídá dráha Imd (Vierstraete et al. 2004).

Toll je transmembránový receptor, prvně objevený při embryogenezi, nezbytný pro vytvoření dorso-ventrální osy. Přítomnost patogena vede až k aktivaci dvou transkripčních faktorů Dif a Dorsal. Úloha Dorsal je převážně při embryogenezi, Dif je více důležitý pro imunitu a transkripci AMPs (Tauszig et al. 2000). Zatímco u savců se tato dráha účastní výhradně imunitní odpovědi, což je pravděpodobně původní funkce, u hmyzu získala ještě další úlohu spjatou s vývojem (Imler et al. 2004).

Dráha Imd (Immune deficiency) vede k aktivaci transkripčního faktoru Relish, který mimo to také dále inhibuje dráhu JNK. Tato dráha je aktivní při embryogenezi, konkrétně při uzavírání embrya, ději který je podobný procesu při hojení ran, při němž je JNK také aktivní. JNK zde neúčinkuje při aktivaci AMPs ale jako odpověď na stres

vyvolaný poraněním a řídí expresi jiných genů, které jsou spojené s imunitní odpovědí (Ramet et al. 2002, Silverman et al. 2003). Zajímavý příklad toho, že regulace těchto dvou drah není doposud zcela pochopena, je regulace AMPs v zaživacím ústrojí a epitelu tracheí u drozofily. Zde je jediným regulátorem odpovědi dráha Imd, která zde přebírá roli dráhy Toll (Buchon 2009).

Pro aktivaci Toll a Imd slouží rodina receptorů rozeznávající konzervované motivy patogenů. Jsou to komponenty buněčných stěn bakterií, tzv. peptidoglykany, které jsou rozeznávány „Peptidoglycan Recognition Protein“ (PGRP). Houby aktivují Toll receptor jiným způsobem, vedoucí rovnou k aktivaci receptoru (Tanji et al. 2005).

1. 3. Inzulínová dráha

S postupem doby a přibývajícimi poznatky inzulínová dráha přestala být pouze dráhou kontrolující metabolismus živin. Tato dráha se zdá být zahrnutá do všech buněčných dějů, jako je vývoj, dělení a růst buněk, velikost těla, stárnutí a smrt. Molekulární mechanizmy (od aktivace receptoru až po změnu transkripce) jsou neuvěřitelně konzervované, savčí inzulín funguje u zástupců bezobratlých, jako je modelový organizmus *Drosophila melanogaster* (Garofalo et al. 2002).

Aktivace začíná navázáním inzulínu na receptor (InR), transmembránový glykoproteid, složený ze dvou podjednotek α a dvou podjednotek β . Navázání inzulínu na α podjednotky způsobí dimerizaci receptoru. Dojde k přiblížení transmembránových podjednotek β , a jejich vzájemné fosforylaci (inzulínový receptor patří do rodiny receptorových tyroxine kinase) (McKern et al. 2006). Aktivovaný receptor fosforyluje svůj substrát (u drozofily nazývaný *Chico*) (Bohni et al. 1999). Ten předává signál dále a reaguje s PI3K (Phosphatidylinositol 3'-kinase). PI3K katalyzuje fosforylaci v membráně se vyskytujícího fosfatidylinositol-4,5-fosfátu (PIP2) na PIP3. Molekula PIP3 funguje jako druhý posel a náhlá změna její koncentraci způsobí lokalizaci proteinů, které mají ve své molekule přítomnou tzv. PH doménu (pleckstrin homology), která se váže na PIP3 (Varnai et al. 1999). Jeden z tumor supresorových genů je *Pten*, jehož produkt převrací směr reakce ve prospěch PIP2, je negativním regulátorem PI3K (Goberthan et al. 1999). PIP3 aktivuje kinázu Akt/PKB (proteine kinase B), která dále fosforyluje velké množství substrátů. Aktivovaná Akt vstupuje do jádra a tam aktivuje nebo inhibuje různé transkripční faktory. Doposud nejprozkoumanější cíl Akt je transkripční faktor FOXO (Forkhead Box class O). Pokud buňka hladoví, je inzulínová

dráha vypnuta a FOXO je aktivní. FOXO transkribuje geny, které v promotoru obsahují Insulin Response Element. Nejznámější jsou represor transkripce 4EBP a samotný inzulínový receptor, který podléhá autoregulaci. Při změně živin je dráha citlivější na aktivaci inzulínem v důsledku zvýšeného počtu InR (Puig et al. 2005)

Inzulínová dráha je složitě spojena s jinými drahami, které jsou také vysoce konzervované a regulují vývoj, růst a diferenciaci nebo se často podílejí při vzniku nádorů. Na úrovni InR a jeho substrátu *Chico* se kříží s dráhou Ras/MAPK (Ras/Mitogen activated proteine kinase pathway). Tato dráha je vysoce konzervovaná a účastní se mnoha procesů při vývoji organismu (Oldham et al. 2002). Další dráha, která původně kontrolovala buněčný růst a diferenciaci na základě dostupnosti živin je TOR (Target Of Rapamycin). Řízení této dráhy se kříží s inzulínovou na úrovni kinázy Akt (Goberdham et al. 2003). Tato kináza představuje uzel, ve kterém dochází k interakci s další dráhou, JNK (Jun N-terminal kinase). Ta je aktivní při embryogenezi a hojení ran, při stresu navozuje vstup do apoptózy, kterou však za jistých okolností inhibuje (Luo et al. 2007).

Velikost organismu je kontrolována dělením a růstem buněk. Mutace v jednotlivých komponentách signálních drah mají za následek nestandardní počet či velikost buněk nebo obojí. Zjištěním na jakém stupni regulace se stala chyba je možno dráze přisoudit stěžejní funkci (Sancak 2007). Doposud všechny popsané alely InR jsou embryonálně letální. To dokazuje nezbytnost dráhy při vývoji. Fenotyp *Chico* mutantů je charakteristický redukcí velikosti těla, která je způsobena zmenšením počtu buněk tak i jejich velikostí (Bohni et al. 1999). Obdobně mutace v PI3K, PTEN a Akt/PKB vedou ke změně ve velikosti a počtu buněk. Naopak nadprodukce enzymů PI3K a Akt vede pouze k zvětšení velikosti buněk, jejich počet však zůstává konstantní. Toto zjištění nasvědčuje tomu, že k aktivaci drah vedoucích k proliferaci je nutná ještě spoluúčast ostatních drah, nejpravděpodobněji výše popsaných (Brogiolo et al. 2001).

1. Cíle práce

- 1) Příprava reportérových konstruktů na bázi luciferázy pro detekci funkce IDGF2
- 2) Příprava stabilních buněčných linií.
- 3) Purifikace proteinů IDGF afinitní chromatografií z hmyzích buněk.
- 4) Srovnání účinků IDGF2, mutantní formy DGF2 a rostlinných lektinů pomocí reportérových testů.

2. Materiály a metody

3.1. Pokusné organismy

- *Drosophila melanogaster* (z chovu na ENTÚ) dospělci použiti k izolaci DNA
- *Escherichia coli* kmen DH5 α byl použit k přípravě kompetentních buněk
- Adherentní buněčná linie S2 odvozená z embryonálních buněk *Drosophila melanogaster*

3.2. Příprava reportérových konstruktů

3.2.1. Příprava konstruktů FOXO-Luc

Sekvence oligonukleotidů tvořící Insulin Response Element (IRE), na který se váže transkripční faktor FOXO, byla navržena podle Puig et. al (2003). Na 5' konec byly přidány nukleotidy tvořící po „annealingu“ přečnávající kohezivní konce (sekvence viz příloha č.1).

„Annealing“ oligonukleotidů

Složení reakční směsi: 1 μ l primeru IREF (1 ng/ μ l) + 1 μ l primeru IRER (1 ng/ μ l) + 16 μ l dd H₂O. Směs byla inkubována 1 min při 94°C a poté nechána vychladnout.

Fosforylace oligonukleotidů

Složení reakční směsi: 1 μ l předchozí směsi + 7 μ l dd H₂O + 1 μ l PNK buffer (Biolab) + 1 μ l T4 Polynukleotide kinase (Biolab). Inkubováno cca 5 min za pokojové teploty.

Restrikční štěpení vektoru pGL2 basic (Promega)

Vektor byl současně štěpen restrikčními enzymy Hind III a Xbo I

Složení restrikční směsi : 66 μ l dd H₂O + 7 μ l NE Buffer 2 (Biolab) + 1 μ l BSA (Biolab) + 2 μ l vektor pGL2 basic (1 ng/ μ l) + 2 μ l Hind III (Biolab) + 2 μ l Xbo I (Biolab). Inkubace byla prováděna přes noc při 37°C, inaktivace enzymů proběhla 20 min. při 65°C.

Izolace vektoru

Naštípaný vektor byl čištěn provedením elektroforézy (1,5% agarózový gel, 120V, barveno ethidiumbromidem). Stanovení velikosti fragmentů bylo za pomoci standardu molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas). Vektor byl vyříznut pod UV lampou a přečištěn pomocí „QIAquick Gel Extraction Kit“ dle návodu.

Ligace

Složení ligační směsi : 3 μl dd H_2O + 5 μl fosforylovaných oligonukleotidů + 10 μl vektoru (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 1 μl ligation buffer (Fermentas) + 1 μl ligasa (Fermentas)

Inkubace byla prováděna přes noc při 16°C, ukončení reakce proběhlo uložením do -20°C.

Transformace bakterií

Do 100 μl kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5a bylo přidáno 2 μl merkaptoethanolu a 5 μl plazmidu z předchozí reakce, promícháno kroužením. Směs byla nechána 20 min stát na ledu. Poté byl proveden tepelný šok ponořením na 40 sekund do 42°C horké vodní lázně a vrácením na led. Ke směsi bylo přidáno 500 μl tekutého LB média. Vše bylo inkubováno 45-50 min při 37°C v třepačce.

Na předem připravené agarové misky (obsahující tuhé LB médium s přidaným ampicilínem o konečné koncentraci 100 mg/ml) bylo nanášeno po 100 μl bakteriální směsi a rovnoměrně rozetřeno. Inkubace proběhla 15-18 hodin při 37°C v inkubátoru dnem vzhůru (první hodinu misky z 2/3 odkryté dnem dolů pro odpaření přebytečné tekutiny). Na důkaz zaklonování správného fragmentu bylo provedeno PCR.

Pro ověření konstruktů FOXO-Luc byl navržen primer zahrnující 5' koncové restrikční místo, do kterého bylo klonováno, a začátek IRE. Tento primer byl použit v kombinaci s primerem pro vektor pGL2 basic.

Složení reakční směsi

PCR reakce měla objem 12,5 μl a obsahovala tyto složky: 7,25 μl dd H_2O + 1,25 μl 10x Ex Taq pufru (TaKaRa) + 1,0 μl dNTP (2,5mM každý, TaKaRa) + 0,75 μl Primer forward (5 μM) + 0,75 μl Primer revers (5 μM) + 0,05 μl TaKaRa Ex Taq polymerázy (5 jednotek/ μl). Reakce byla připravena na ledu, přidání polymerázy byl poslední krok. Jako templát posloužila část kolonie, která byla resuspendována v 20 μl dd H_2O a cca 5 min povařena při 94°C.

PCR program

Amplifikace proběhla ve 30 cyklech, při teplotách 94°C 30 sek., 53°C 30 sek., 72°C 1 min.; s úvodní denaturací 94°C 1 min. a závěrečnou extenzí 72°C 5 min. (Biometra cycler).

Izolace plazmidu z pozitivních klonů

Kolonie byly přeneseny do 3 ml tekutého LB média obsahující ampicilín (konečná koncentrace 100 mg/ml) a kultivovány 6 hodin při 37°C v třepačce. Touto kulturou bylo naočkováno 200 ml stejného média a kultivováno asi 12 hodin. Plazmidy byly izolovány

pomocí kitu firmy Qiagen „QIAGEN® Plazmid Midi Kit“ dle návodu. Množství izolovaného plazmidu bylo stanoveno na spektrofotometru BioPhotometr (Eppendorf)

Sekvenační směs

Pro sekvenování byl použit „BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit“.

¼ reakční směs (20 µl)

Složení reakční směsi: 2,0 µl sekvenačního mixu + 3,0 µl 5x sekvenačního pufru + 1,0 µl primeru (5 µM) + 0,5 - 1 µg plazmidu, vše doplněno dd H₂O do 20 µl

Sekvenační program

Sekvenační reakce proběhla v 35 cyklech při teplotách 96°C 30 sek., 50°C 30 sek., 60°C 4 min.; s úvodní denaturací 96°C 3 min. (Biometra cycler).

Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček

Hydratace Sephadexu: Pro přípravu 10 sloupečků bylo rozmícháno 0,5 g Sephadex G-50 v 7 ml MilliQ H₂O. Bylo ponecháno minimálně 45 min stát při 4°C.

Příprava sloupečku: 1 ml aerosolová špička byla uříznuta cca 5 mm pod filtrem a umístěna do 1,5 ml mikrozkuhavky. Roztok Sephadexu byl důkladně promíchán. Bylo nanášeno 400 µl na každý sloupeček a byla protlačena přebytečná voda. Bylo nanášeno dalších 400 µl a stočeno 2 min při 1 000 g. Sloupečky byly umístěny do nových 1,5 ml mikrozkuhovek.

Čištění sekvenační reakce: Sekvenační reakce byla nanášena na sloupek sephadexu. Povrch by neměl obsahovat nečistoty a neměl by být popraskaný. Sloupečky byly umístěny v centrifuze ve stejné orientaci a stočeny 2 min. při 1 000 g. Přečištěná sekvenační reakce byla vysušena ve Speed-Vac (cca 20 min).

Vyhodnocení sekvencí

K vyhodnocení sekvencí byl použit automatický sekvenátor ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) (Biologické centrum AVČR UMBR, Laboratoř genomiky).

3.2.2. Příprava konstruktů obsahující promotorové oblasti genů „Matrix Metallproteinase“ (CG4859) a *fear of intimacy* (CG6817)

Byly vybrány geny u kterých byla vlivem IDGF2 zvýšena exprese u buněk Cl8+ (práce doktora Žurovce a Mgr. Kučerové, nepublikované data)

Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována z den starých dospělců pomocí kitu „Qiagen DNeasy Tissue Kit“ dle návodu výrobce.

Amplifikace fragmentů metodou „Nested PCR“

Byly navrženy primery, které zahrnovaly oblast cca. 2500 bp „upstream“ od počátku transkripce. První amplifikace byla za použití vnějších primerů. Složení PCR směsi bylo viz.níže. Druhá amplifikace proběhla z vnitřních primerů, které obsahovaly na 5´ konci restrikční místa a jako templát byl použit 1 µl předcházející PCR reakce. Sekvence primerů viz příloha I.

Složení PCR směsi

PCR reakce měla objem 12,5 µl a obsahovala tyto složky : 6,25 µl dd H₂O + 1,25 µl 10x Ex Taq pufru (TaKaRa) + 2,0 µl dNTP (2,5mM každý, TaKaRa) + 0,75 µl Primer forward (5 µM) + 0,75 µl Primer revers (5 µM) + 1,0 µl Templátová DNA (100 ng/µl) + 0,05 µl TaKaRa Ex Taq polymerázy (5 jednotek/µl) + 0,01 µl Fermentas Pfu polymerázy (2,5 jednotek/µl). Reakce byla připravena na ledu, přidání polymerázy byl poslední krok.

PCR program

Amplifikace proběhla ve 30 cyklech, při teplotách 94°C 30 sek., 55°C 30 sek., 72°C 2 min.; s úvodní denaturací 94°C 1 min. a závěrečnou extenzí 72°C 10 min. (Biometra cycler).

Restrikce a čištění PCR produktů

Složení reakční směsi: 50 µl PCR produktu + 6 µl NE Buffer 2 (Biolab) + 1 µl BSA (Biolab) + 1,5 µl Hind III (Biolab) + 1,5 µl Xbo I (Biolab)

Inkubace byla prováděna přes noc při 37°C, inaktivace enzymů proběhla 20 min. při 65°C. Naštípané PCR produkty byly odděleny provedením elektroforézy (1,5% agarózový gel, 120V, barveno ethidiumbromidem). Stanovení velikosti fragmentů bylo za pomoci standardu molekulových vah (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas). Fragmenty byly vyříznuty pod UV lampou a přečištěny pomocí „QIAquick Gel Extraction Kit“ dle návodu.

Následující kroky byly shodné jako při přípravě konstruktů FOXO-Luc. Pro ověření správnosti konstruktů bylo opět použito „Nested PCR“. První amplifikace proběhla z vnějších primerů pro vektor pGL2, druhé kolo amplifikace, složení reakční směsi a PCR program byly stejné jako při amplifikaci fragmentů.

3.3. Práce s buňkami

3.3.1. Média

S2 buňky byly pěstovány v Schneider's medium (Sigma) obsahující 10 % FBS, 1 % penicilin a streptomycin a insulin 0,125 IU/ml (Sigma) (dále jen CM). Minimální médium (MM) neobsahovalo FBS ani insulin a skládalo se z Schneider's medium a 1 % penicilin a streptomycin. Pro izolaci proteinů IDGF byly buňky pěstovány v médiu o složení shodném s CM jen na místo FBS obsahovalo 10 % Insect medium supplement (Serum supplement medium SSM) (Sigma)

Média byly sterilizovány pomocí filtrů s pórozitou 0,22 μ m (Biotech)

3.3.2. Rozmrazování buněk S2

Buňky v 10% DMSO byly vyjmuty z tekutého dusíku, rozmrazení (zahříváním v dlani) a přeneseny na sterilní misku s CM. Po přichycení buněk ke dnu misky (maximálně 1hod) bylo médium obsahující DMSO vyměněno za nové. Buňky byly pěstovány při 25°C a pasážovány každé 2-3 dny.

3.3.3. Pasážování buněk

Poté, co buňky porostou celé dno misky je třeba je rozdělit, jinak by buňky začaly přerůstat a následně volně plavat. Při tom může docházet k nežádoucím změnám na úrovni fenotypu i genotypu buňky. Dále se doporučuje měnit médium nejdéle po pěti dnech, protože pak dochází k hromadění odpadních produktů buněk a osmotické změně média.

Staré médium je odstraněno serologickou pipetou a buňky jsou staženy z povrchu misky cca. 1 ml nového média pouhým pipetováním, následuje rozdělení suspenze buněk na nové misky.

3.3.4. Zamrazování buněk

Buňky v exponenciální růstové fázi, poté co pokryjí ze 70-80% dno 10cm misky, jsou zbaveny média a staženy 1 ml nového. Po přidání 10% DMSO jsou buňky rozděleny po 1,1 ml do viálek, nejprve zamrazeny v -80°C a po 24 h přeneseny do tekutého dusíku.

3.3.5. Transfekce buněk S2

3.3.5.1. Lipofekce a selekce buněk (příklad pro FOXO-Luc konstrukt)

Buňky S2 byly nasazeny den před transfekcí na 6 cm misku v celkové koncentraci $6 \cdot 8 \times 10^5$. Při lipofekční reakci bylo smícháno 0,9 μg konstruktu FOXO-Luc, 0,05 μg pCoHydro a 0,04 μg Copia *Renilla* a doplněno EC pufrem do objemu 150 μl . Ke směsi bylo přidáno 8 μl Enhanceru, krátce zvortexováno a necháno inkubovat cca. 5 min při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 25 μl transfekční reagentie Effectene a vortexováno 10 sec. Směs byla inkubována cca. 10 min. za pokojové teploty. Mezitím bylo odstraněno staré CM, buňky promyty 1x PBS a byly přidány 4 ml nového CM. Ke směsi byl přidán 1 ml CM, celá reakce byla promíchána a po kapkách přidána k buňkám. Do maximálně 24 hod. bylo médium vyměněno za nové. Pro selekci bylo po 48 hod. od lipofekce médium vyměněno za CM obsahující antibiotikum Hygromycin B (300 $\mu\text{g/ml}$). Selekcce trvala 2-3 týdny, výměna média byla prováděna každé 3-4 dny.

3.3.5.2. Transfekce pomocí precipitace DNA s fosforečnanem vápenatým (příklad pro expresní vektor IDGF2)

Příprava roztoku A : bylo smícháno 18 μg plazmidu IDGF2 + 1 μg pCoHydro + 36 μl 2M CaCl_2 a doplněno na 300 μl dd H_2O .

Roztok B (2x HEPES buffered saline pH 7,1)

Příprava roztoku: 1,6 g NaCl + 0,074 g KCl + 0,027g Na_2HPO_4 + 0,2 g glukóza + 1,0 g Hepses. Doplněno do 100 ml dd H_2O , pH upraveno pomocí NaOH/HCl, sterilizováno pomocí filtru s pórozitou 0,22 μm (Biotech) a rozděleno na alikvoty.

Transfekce : K 300 μl roztoku B byl za stálého míchání provzdušňováním pomocí serologické pipety pozvolna přikapáván roztok A. Směs se nechala inkubovat cca. 40 min a poté byla přidána k buňkám, nasazení buněk, výměna média, doba inkubace a selekce byla shodná jako při lipofekci.

3.3.6. Purifikace proteinů IDGF

Složení pufrů je uvedeno v příloze II. Všechny kroky byly prováděny při 4°C. Pro produkci rekombinantních proteinů byly buňky nasazeny do suspenze bezsérového média a pěstovány za stálého třepání při 25°C 7-8 dnů.

Buněčná suspenze byla stočena (10 min, 1000g) a médium bylo dialyzováno (Spektra/Por[®] Membrane) v Lysis buffer. Poté bylo přidáno 2 ml Ni-NTA agarose

(Qiagen) a inkubováno za mírného míchání 1-2 hod. Následovalo stočení (5 min, 500g), a tekutá fáze byla odstraněna. Ni-NTA agarose byla rozpuštěna v Wash buffer a přenesena na kolonku. Kolonka byla promyta Wash buffer než optická hustota proteinů v „Flow-throw“ byla 0,01 (měřeno při 280 nm). Rekombinantní protein byl eluován pomocí Elution buffer, jednotlivé eluční frakce byly sbírány po cca. 1 ml. Alikvoty jednotlivých frakcí byly uchovány pro pozdější SDS-PAGE analýzu (dle manuálu OxyBlot™ Proteine Oxidation Detection Kit, Chemicon international). Eluční frakce byly zbaveny imidazolu dialýzou v 1x PBS (pH 7,4), následně koncentrovány použitím látek absorbující vodu (Aquacide II-A, Calbiochem). Koncentrace proteinů byla určena pomocí Bradford assay (Bradford 1976).

3.3.7. Měření účinků IDGF proteinů pomocí reportérových konstruktů

3.3.7.1. Měření vlivu IDGF2 na imunitní dráhu (Att-Luc konstrukt)

CM bylo nahrazeno při pasáži CM : MM 1 : 4 a buňky byly nechány růst do dalšího dne. Před pokusem bylo odstraněno staré medium, buňky byly promyty 1x PBS aby si nemohly vytvořit specifické prostředí a staženy z povrchu MM médiem. Koncentrace buněk byla spočítána pomocí Bürkerovy komůrky a naředěna v MM médiu na koncentraci 1×10^6 buněk/ml. Suspenze buněk byla nasazena na 96-jamkovou neprůsvitnou misku v množství 100 μ l na jamku.

Do jednotlivých jamek byla přidána účinná látka:

- IDGF2 (výsledná koncentrace 15 mg/ml)
- mutantní IDGF2A (výsledná koncentrace 15 mg/ml)
- IDGF2 + protilátka proti IDGF2 (nadbytek protilátky, předcházela 1 h inkubace v chladu za mírného míchání směsi)
- 3 μ l protilátky proti IDGF2 pro kontrolu
- 10 μ l 1xPBS jako negativní kontrola
- tepelný lyzát bakterie E. coli jako pozitivní kontrola
- lektin Griffonia

Inkubace probíhala 4 hodiny.

Do každé jamky bylo poté přidáno 28 μ l 5x Passive lysis buffer a buňky byly lyzovány 15 minut na třepače polymax 1040 (Heidolph).

96-jamková miska byla umístěna do luminometru Orion II (Berthold Detection Systém) a pomocí programu Simplicity 4 (delay 2,05 s, measurement 10,0 s, volume 50 μ l, Berthold Detection Systém) byla změřena luminiscence luciferázy. Byl udělán průměr hodnot jednotlivých tříd měření. Hodnoty byly normalizovány vzhledem k hodnotě negativní kontroly.

3.3.7.2. Transientní transfekce a měření účinku IDGF2 pomocí konstruktů obsahující promotor genu *fear of intimacy*

Byla provedena lipofekce stejným způsobem jako v bodě 4.7.1. Byl však použit pouze 1 μ g reportérového konstruktů. Po 15 h. od transfekce bylo médium vyměněno za směs CM: MM 1: 4, buňky byly nechány růst do dalšího dne, kdy byl prováděn pokus (postup byl již stejný jako v předchozím bodě).

3.3.7.3. Měření vlivu IDGF2 na insulinovou dráhu

CM bylo nahrazeno za MM a buňky byly nechány hladovět alespoň 48h. Před pokusem bylo odstraněno staré MM, buňky promyty 1x PBS a staženy novým MM. Suspenze o koncentraci 1×10^6 buněk/ml byla rozdělena na 96-jamkovou neprůsvitnou misku po 100 μ l na jamku. Do jednotlivých jamek byl přidán inzulin (konečná koncentrace 5 μ g/ml) nebo IDGF2 (15 mg/ml). Inkubace probíhala 6 hodin.

Další kroky jsou již stejné jako v předchozím bodě 4.9.1.

3.3.8. Příprava nativních preparátů pro konfokální mikroskopii

(buněčná linie PH : GFP)

Na dno jamky v 6-jamkové misce byly položeny krycí skla (sterilizovaná UV zářením) na které se nechaly přichytit buňky. V den pokusu bylo CM vyměněno za MM a buňky byly nechány hladovět po dobu 3 hod. Poté byl do jamky přidán inzulin (konečná koncentrace 5 μ g/ml) Po dvou minutové inkubaci bylo krycí sklo opatrně vyjmuta sterilní pinzetou, spodní strana osušena a stranou s buňkami přiklopeno na sterilní podložní sklo (sterilizováno UV zářením) obsahující kapku téhož média. Takto hotový preparát byl použit na konfokální mikroskopii prováděnou Mgr. Lucíí Kučerovou. Stejným způsobem byly zhotoveny preparáty MM bez přídavku inzulinu a buňky v CM sloužící jako pozitivní kontrola. Pro vliv IDGF2 byly buňky inkubovány v MM po dobu 4 hod, IDGF2 (15 mg/ml) byl přidán 1 hod po výměně CM za MM.

3. Výsledky

4.1. Příprava konstruktů

Před vlastním měřením účinku proteinu IDGF2 bylo třeba připravit odpovídající konstrukty. Promotorové oblasti byly zaklonovány do vektoru pGL2 basic (Promega). Konstrukty, které byly získány darem, bylo třeba namnožit. Nově izolovaná DNA se díky superspiralizované formě lépe včleňuje do genomu transfekovaných buněk.

4.2. Stabilní buněčné linie

Pro vytvoření stabilních linií byly použity dvě transfekční metody (lipofekce pomocí „Effectene[®] transfection Reagent“ (Qiagen) a precipitace DNA s fosforečnanem vápenatým). Účinnost obou metod byla u buněk S2 srovnatelná.

4.2.1. Reportérové linie a linie s GFP

Pro monitorování aktivace inzulinové signální dráhy byly připraveny buněčné linie stabilně nesoucí dva konstrukty. První nese před reportérovým genem (luciferáza světlušky) promotorovou oblast nazývanou „Insulin Response Element“ (Puig et al. 2003). Druhá linie obsahuje fúzní protein PH doména - GFP. Při aktivaci této dráhy dochází k lokalizaci tohoto proteinu na plazmatické membráně buňky. Pokud není tato dráha aktivovaná, nachází se tento protein v cytoplasmě. Pomocí sledování přesunu fúzního proteinu PH-GFP je možno vizualizovat aktivitu této dráhy (Britton et al. 2002).

Vliv proteinů IDGF na indukci exprese genů byl studován na linii, u které do konstruktů obsahující luciferázu světlušky, byla zaklonována cca. 2500 pb dlouhá „upstream“ oblast genu CG4859, který byl vybrán na základě výsledků z DNA čipů (Žurovec a Kučerová, nepublikovaná data). Dále pro tento účel byly použity konstrukty se sekvencí promotorů Antimikrobiálních peptidů (Attacin, Dipterin, Defensin a Cecropin) (Tzou et al. 2000). Seznam a bližší popis linií je uveden v tabulce č. 1.

<i>Název linie</i>	FOXO	48	Dip	Att	PH
<i>Plazmidový vektor</i>	pGL2	pGL2	pGL3	pGL3	pRmHa-3
<i>Typ konstruktů</i>	reportérový				fúzní
<i>Promotor genu</i>	IRE	CG4859	Diptericin	Attacin	---
<i>Reportérový gen</i>	Luciferáza světlušky				GFP
<i>Referenční konstrukt</i>	Copia Renilla				---
<i>Rezistence</i>	pCoHydro				pCoHydro

Tabulka č. 1: Přehled připravených reportérových buněčných linií. Tabulka uvádí název linie, použitý plazmid, typ o jaký konstrukt se jedná, promotor jakého genu byl použit, reportérový gen použitý v konstruktě, konstrukt pro referenční měření a konstrukt pro rezistenci.

4.2.2. Linie produkující proteiny IDGF

Pro purifikaci rekombinantních proteinů IDGF byly vytvořeny stabilní linie, které měly geny IDGF zaklonované do vektoru pAc5.1 Zde dochází k vysoké kontinuální transkripci inzertu vlivem silného aktinového promotoru (5C). Další výhodou tohoto vektoru je histidinová kotvička, které se využívá při selektivní purifikaci proteinu (dar od doktora Žurovce). Seznam a charakterizace linií uveden v tabulce č. 2.

<i>Název linie</i>	IDGF2	IDGF2A	IDGF4
<i>Produkovaný protein</i>	IDGF2	mutantní IDGF2	IDGF4
<i>Plazmidový vektor</i>	pAc5.1		
<i>Typ konstruktů</i>	expresní		
<i>Rezistence</i>	pCoHydro		

Tabulka č. 2: Přehled připravených expresních buněčných linií. Tabulka uvádí název linie, použitý plazmid, typ o jaký konstrukt se jedná a použitou rezistenci.

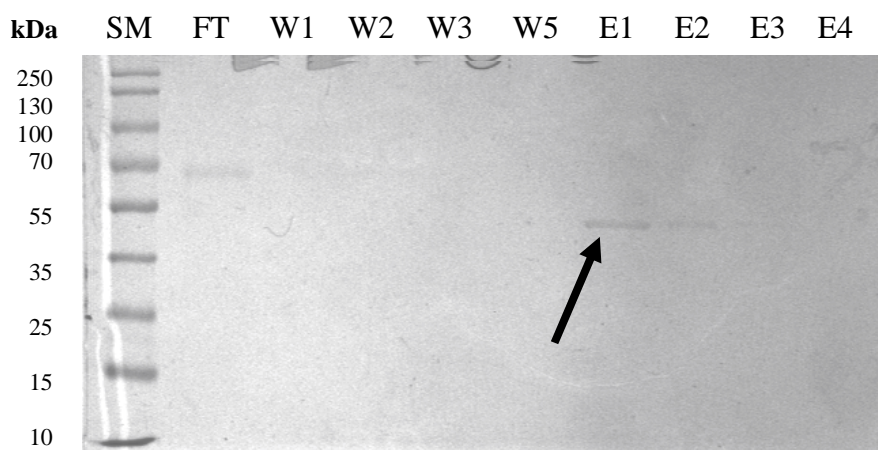
4.3. Purifikace rekombinantních proteinů IDGF

Po selekci buněk bylo nejprve nutné ověřit produkované proteiny. Byla provedena purifikace rekombinantních IDGF proteinů z 1×10^7 buněk, rostoucích v bezsérovém médiu na 10 cm misce, pomocí afinitní chromatografie. Jednotlivé frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE (obrázky č. 1 až 6)

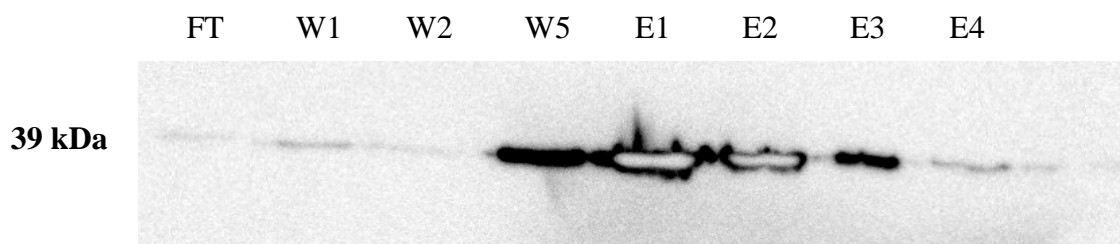
Pro produkci proteinů byly buňky pěstovány v suspenzi bezsérového média za stálého třepání. Po přechodu na bezsérové médium buňky rostou zpočátku pomaleji a po

4-5 dnech začínají plavat a tvořit shluky. Třepáním se zabránilo tvorbě shluků. Pokus, při kterém byla srovnávána expresivita buněk pěstovaných na misce a buněk v suspenzi dokázal, že obě metody dávají stejné výtěžky (srovnání pomocí SDS-PAGE, značené protilátkou) (Obr. č. 5).

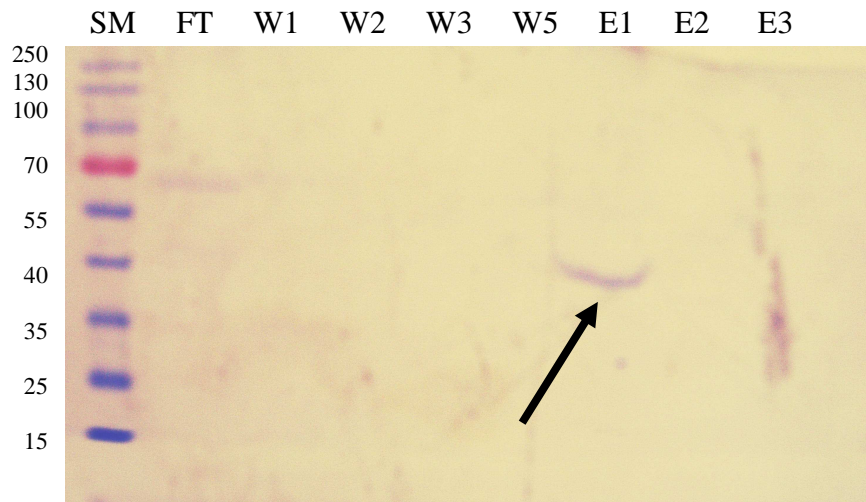
Byla provedena izolace proteinů IDGF2 a mutantní formy IDGF2. Celkem bylo získáno 1,0 mg proteinu IDGF2 při spotřebě 800 ml SSM. Mutované verze IDGF2 se podařilo izolovat 0,5 mg při celkové spotřebě 400 ml SSM.



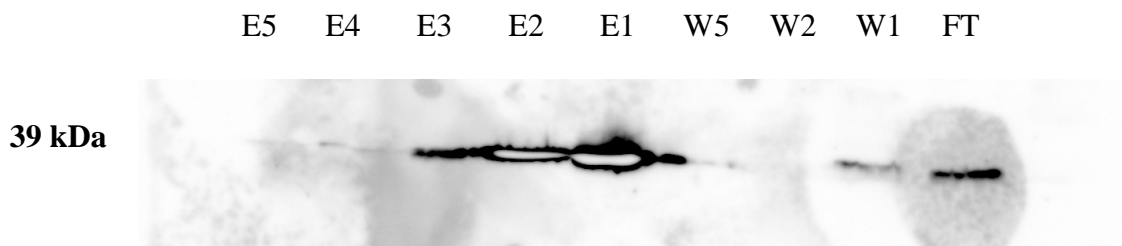
Obrázek č. 1. SDS-PAGE (barvení pomocí Commasie blue). Ověření produkce IDGF2. SM – standard molekulových vah (Sigma), FT – průtoková frakce, W1-W5 – promývací frakce, E1-E4 – eluční frakce



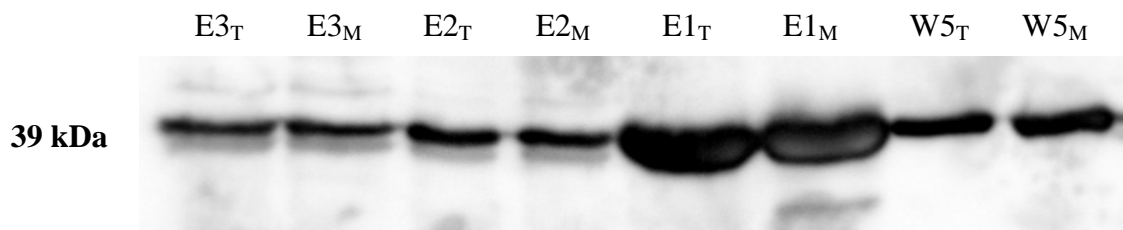
Obrázek č. 2. SDS-PAGE (značení protilátkou). Ověření produkce IDGF2. FT - průtoková frakce, W1-W5 – promývací frakce, E1-E4 – eluční frakce



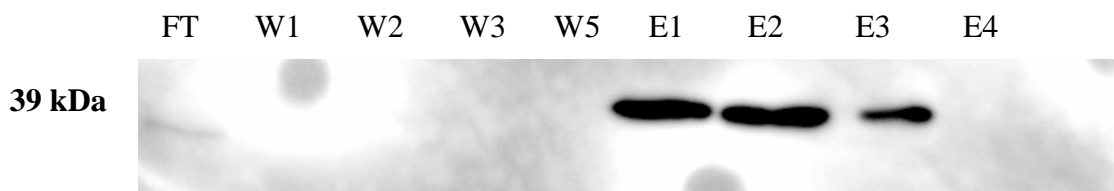
Obrázek č. 3. SDS-PAGE (barvení pomocí Commasie blue). Ověření produkce mutantní formy IDGF2. SM – standard molekulových vah (Sigma), FT - průtoková frakce, W1-W5 – promývací frakce, E1-E3 – eluční frakce



Obrázek č. 4. SDS-PAGE (značení protilátkou). Ověření produkce mutantní formy IDGF2. FT - průtoková frakce, W1-W5 – promývací frakce, E1-E5 – eluční frakce



Obrázek č. 5. SDS-PAGE (značení protilátkou). Srovnání produkce IDGF2. W5 - promývací frakce, E1-E3 – eluční frakce (T – buňky pěstované v suspenzi za třepání, M – buňky pěstované na misce)



Obrázek č. 6. SDS-PAGE (značení protilátkou). Ověření produkce IDGF4. FT - průtoková frakce, W1-W5 – promývací frakce, E1-E4 – eluční frakce

5.4. Zkoumání účinků proteinu IDGF2

Byl zkoumán účinek IDGF2 pomocí reportérových konstruktů ve stabilně exprimujících buňkách.

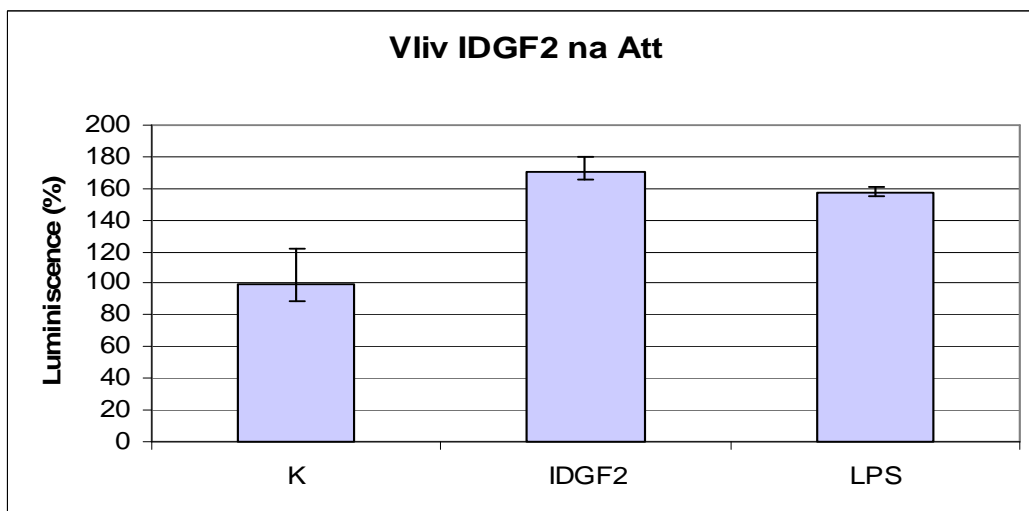
4.4.1. Detekce účinku IDGF2

Pro detekci účinku proteinu IDGF2 posloužila buněčná linie nesoucí konstrukt s promotorovou oblastí genu Att. Exprese luciferázy se po stimulaci buněk proteinem IDGF2 zvýšila asi o 60 % (Graf 1). Oproti tomu Dip linie nevykazovala žádnou odpověď (Graf 2).

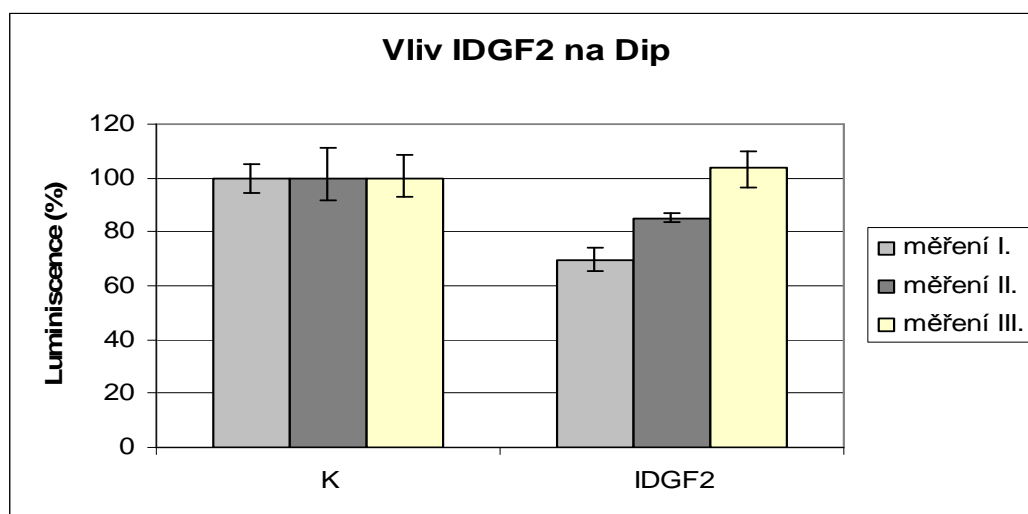
Dále bylo pomocí linie s reportérem Att-Luc studován vliv mutantní formy IDGF2A. Tento protein obsahuje místo aminokyseliny aspartamin v pozici 115 alanin. Záměna této aminokyseliny způsobila ztrátu účinku proteinu (Graf 3).

Další možností bylo použít protilátku k zablokování funkce IDGF2. Směs IDGF2 a protilátky nevykazovala žádný účinek na aktivaci Att dráhy, ba dokonce expresi luciferázy ještě snižovala. Volná protilátky po přidání k buňkám zřejmě vyvázala molekuly IDGF2. Produkce proteinů IDGF proteinů se zdá být pro buňky životně důležitá. Aktivita luciferázy u buněk sloužící jako kontrola je způsobená touto hladinou IDGF2 proteinu, který si buňky sami produkují (Graf 3).

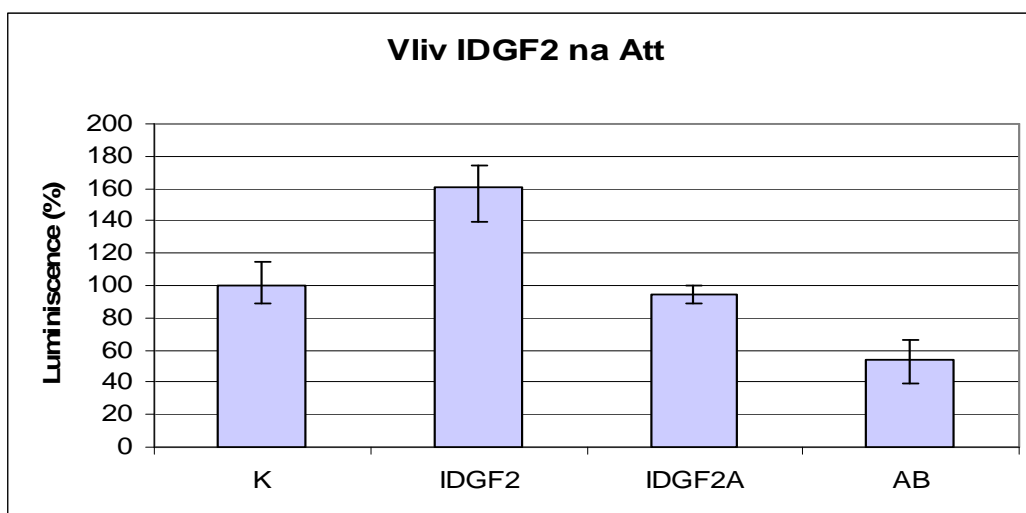
Rostliný lektin *Griffonia simplicifolia* není sekvenčně příbuzný s rodinou Idgf. Tento lektin také rozpoznává a váže stejný cukerný motiv jako IDGF2 (Lescar et al. 2002). Z pokusů se ukázalo, že protein IDGF2 je účinný až od koncentrace 15 µg/ml. Lektin *Griffonia simplicifolia* byl účinný až za použité koncentrace 50 µg/ml, kdy zvyšoval aktivitu reportéru asi jen o 20 %, oproti tomu IDGF2 zvyšoval aktivitu luciferázy o 60 %. Kontrolní lektiny, které váží jiný cukerný motiv vykazovaly rovněž cca 20 % účinek. Sojový lektin (molekulová hmotnost cca. 32 kDa) účinkoval od koncentrace 20 µg/ml, lektin z *Ricinus communis* (molekulová hmotnost 120 kDa) od 30 µg/ml (Graf 4).



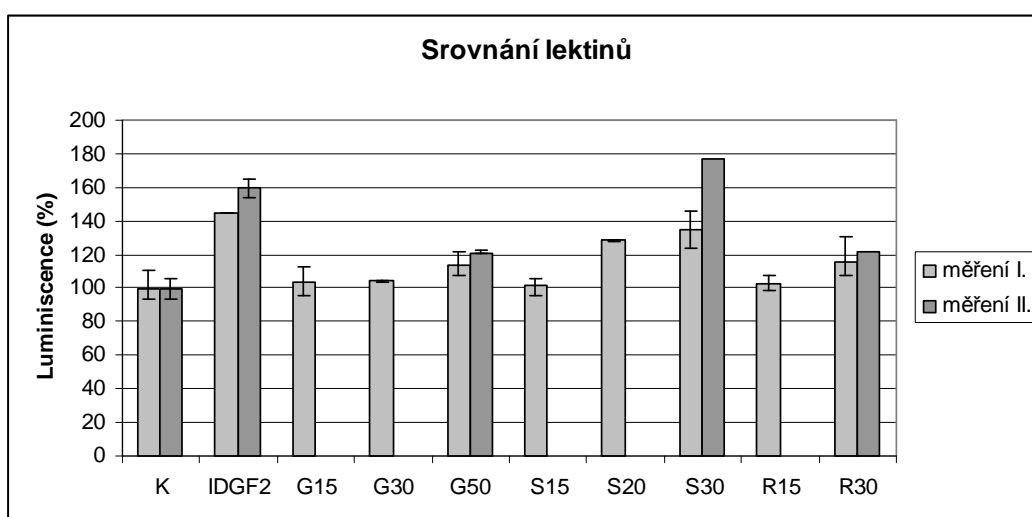
Graf 1: Ověření účinku IDGF2 na reportérový konstrukt Att-Luc. (K – kontrola, IDGF2 – 15 $\mu\text{g/ml}$, LPS – lipopolysacharid, pozitivní kontrola)



Graf 2: Ověření účinku IDGF2 na reportérový konstrukt Att-Luc. (K – kontrola, IDGF2 – 15 $\mu\text{g/ml}$).



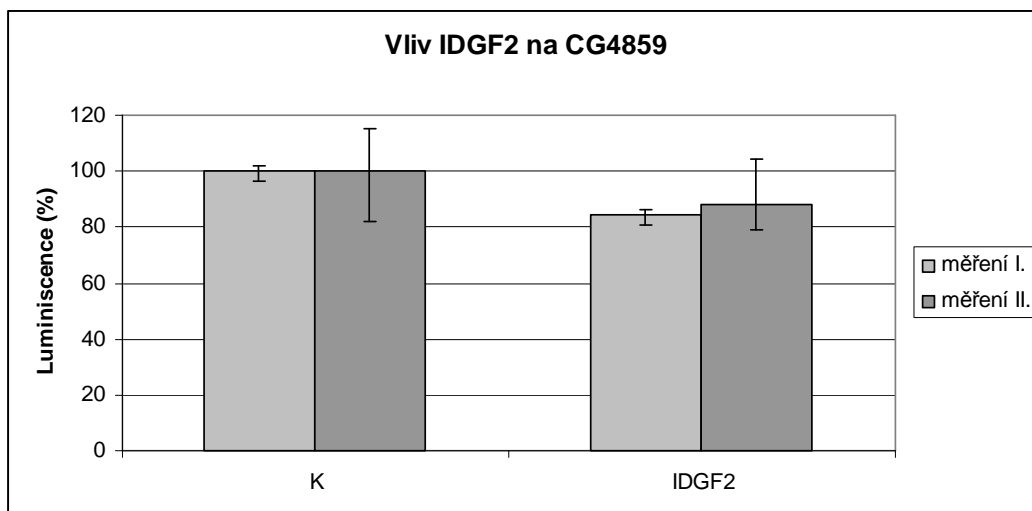
Graf 3: Srovnání účinku IDGF2, mutantní formy a vliv protilátky na aktivaci Att-Luc. (K – kontrola, IDGF2 – 15 µg/ml, IDGF2A – mutantní forma, 15 µg/ml, AB – protilátka).



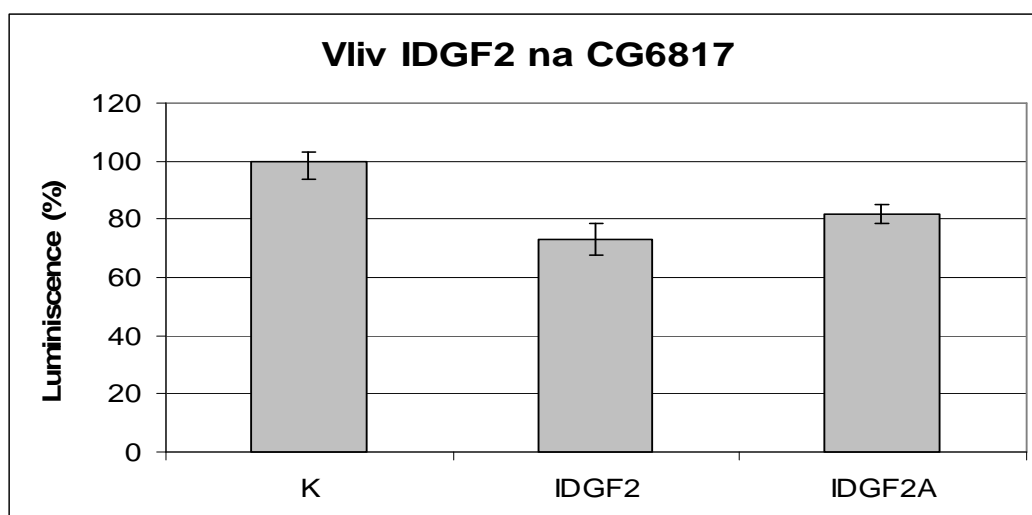
Graf 4: Srovnání účinku IDGF2 a rostlinných lektinů (G – *Griffonia simplicifolia*, S – sojový lektin, R – lektin z *Ricinus communis*, čísla udávají koncentraci v µg/ml).

4.4.2. Linie nesoucí luciferázové reportérové konstrukty pod promotory genů CG4859 a CG6817.

Buňky nesoucí konstrukt s promotorem „Matrix Metalloproteinase“ (CG4859) neodpovídala na stimulaci proteinem IDGF2, na rozdíl od výsledků z DNA čipů u buněk C18+, docházelo zde naopak k mírnému poklesu transkripce. Buněčnou linii obsahující reportér s promotorem genu *fear of intimacy* (CG6817) se nepodařilo připravit. Tento konstrukt byl vyzkoušen pouze transientně, ale výsledky byly stejné jako u linie nesoucí konstrukt s promotorem „Matrix Metalloproteinase“ (Grafy 5 a 6)



Graf 5: Vliv proteinu IDGF2 na konstrukt s promotorovou oblastí genu CG4859 (K – kontrola, IDGF2 – 15 µg/ml).



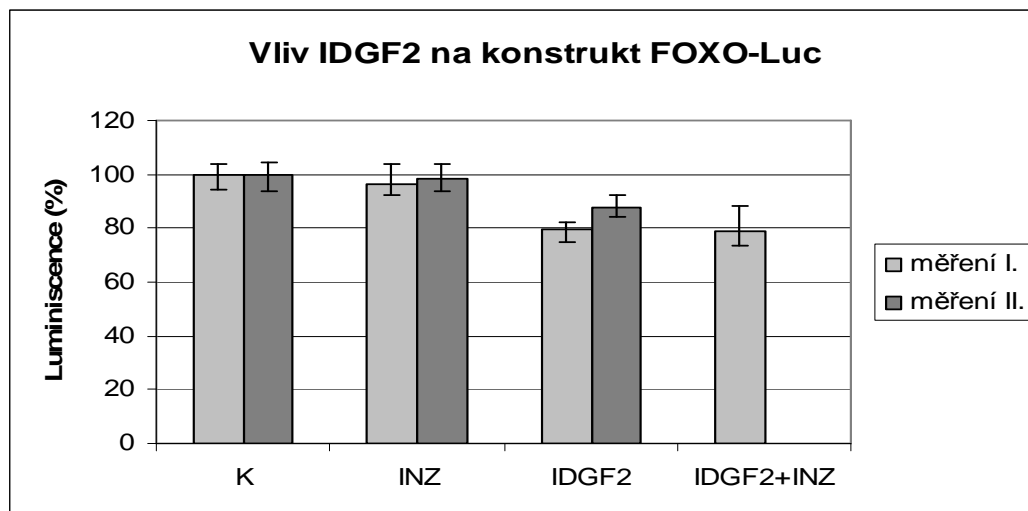
Graf 6: Vliv proteinu IDGF2 na konstrukt s promotorovou oblastí genu CG6817 (K – kontrola, IDGF2 – 15 µg/ml, IDGF2A – mutamtní forma, 15 µg/ml).

4.4.3. Vliv IDGF2 na inzulínovou dráhu

Pro studium inzulínové signalizace byl získán reportérový konstrukt (Slade et al. 2007). Při kontrole konstruktů sekvenováním se ukázalo, že neobsahuje regulační oblast. Do reportérového konstruktů byla proto za tímto účelem vložena sekvence IRE (Puig et al. 2003)

Na počátku bylo nutné zopakovat pokus úbytku aktivity luciferázy po stimulaci inzulínem, buněk nesoucí reportérový konstrukt s promotorovou oblastí reagující na inzulín (Puig et al. 2003) a dále zkoumat účinek IDGF2 na tuto dráhu. Reportérový

konstrukt však neodpovídaly na stimulaci inzulinem. Přídavek proteinu IDGF2 sice snižoval expresi luciferázy asi o 1/5, ale protože se nepodařilo zopakovat popsany pokus, nedají se tyto výsledky nikterak použít a rozvinout (Graf 7).



Graf 7: Vliv IDGF2 na konstrukt FOXO-Luc (K – negativní kontrola, buňky inkubované po dobu 48 h. v MM. INZ – inzulin 5 µg/ml, IDGF2 15 µg/ml)

4.5. Konfokální mikroskopie buněk obsahující fúzní protein PH : GFP

Konstrukt byl darem od J. S. Britton (Univerzita Seattle). V zápětí po stimulaci inzulinem (5 µg/ml) došlo k lokalizaci PH - GFP na membráně (Obr. 11 a 12). Inkubace buněk s IDGF2 (15 µg/ml) probíhala po dobu tří hodin. U takto stimulovaných buněk nedošlo k aktivaci studované dráhy (Obr. 13 a 14). Buňky pěstované za standardních podmínek v kompletním médiu s inzulinem sloužily jako pozitivní kontrola (Obr. 7 a 8).

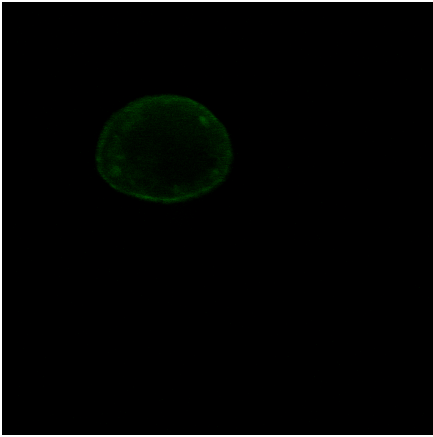
Obrázky 7 a 8. Kompletní médium (pozitivní kontrola).

Obrázky 9 a 10. Minimální médium (negativní kontrola).

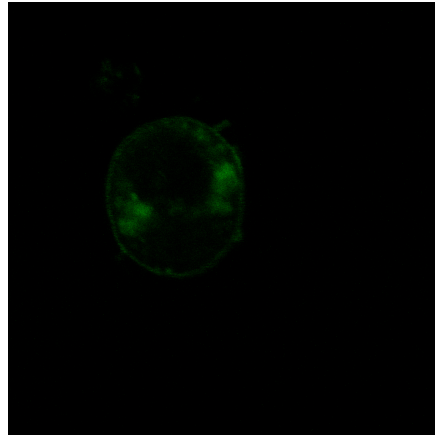
Obrázky 11 a 12. Minimální médium + inzulin (5 µg/ml).

Obrázky 13 a 14. Minimální médium + IDGF2 (15 µg/ml).

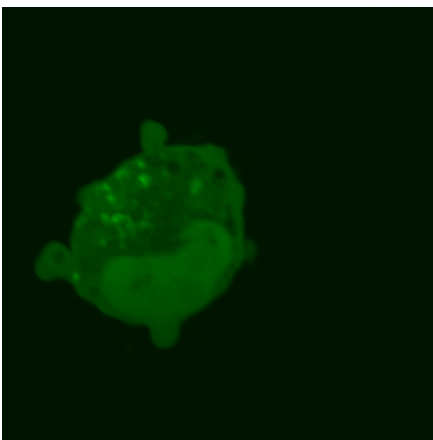
Obr. 7



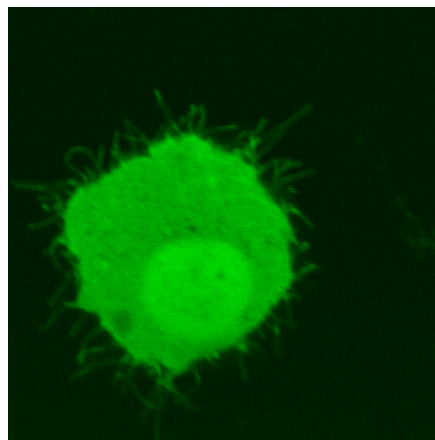
Obr. 8



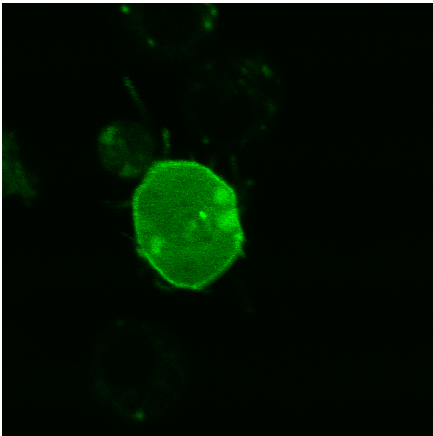
Obr. 9



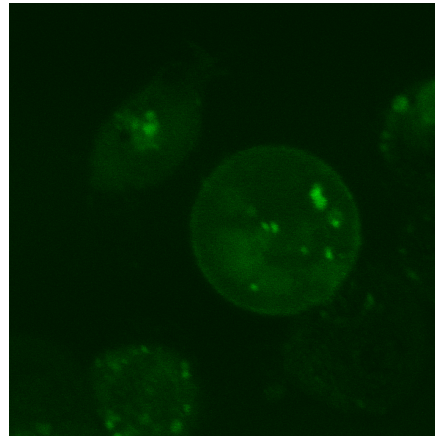
Obr. 10



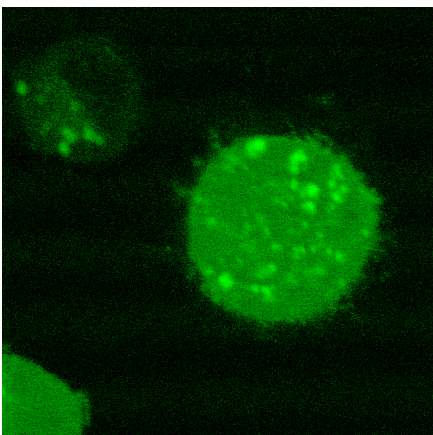
Obr. 11



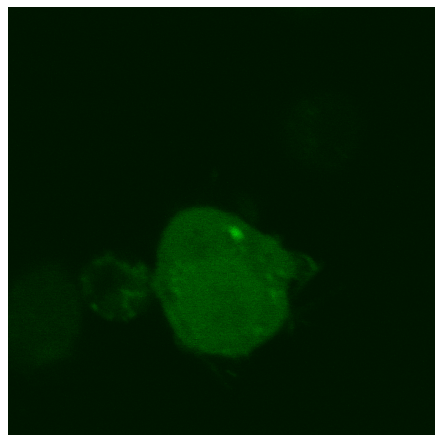
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



4. Diskuze

5. 1. Izolace proteinů IDGF

Je známá krystalická struktura IDGF2 (Varela et al. 2002). Pokusy prováděné doktorem Žurovcem identifikovaly cukerný motiv, na který se IDGF2 váže (nepublikovaná data). Ve spolupráci s doktorem J. Bryndou (UMG, Praha) byl navržen počítačový model 3-D struktury IDGF2 společně s navázaným cukrem. Pro experimentální potvrzení modelu je však zapotřebí cca. 10 mg proteinu pro rentgenovou krystalografii. Celkový výtěžek izolace pomocí S2 buněk za popsaných podmínek činil 1 mg proteinu. Bude zapotřebí optimalizovat metodu izolace, popřípadě přejít na metodu jinou. Při izolaci docházelo k ztrátám v poslední promývací frakci, množství uvolněného proteinu bylo srovnatelné s druhou a třetí eluční frakcí (Obrázky č. 2, 4 a 5). Pro zvýšení výtěžku bude potřeba zamezit těmto ztrátám při promývání.

5. 2. Charakterizace vazebného centra IDGF2

5.2.1. Vhodné buněčné linie

Na začátku bylo třeba najít vhodnou buněčnou linii, která by odpovídala na účinek proteinu IDGF2. Reportérové konstrukty připravené z promotorů vytypovaných genů z předchozí práce doktora Žurovce a Mgr. Kučerové neodpovídaly na stimulaci IDGF2. Možné vysvětlení může být i) rozdílná povaha buněk C18+ vs. S2. Buňky C18+ jsou odvozeny z imaginálních terčků, zatímco S2 jsou embryonálního původu (Silverman et al. 2003). ii) Do vektoru pGL2 byly pro tento účel zaklonovány 2500 bp dlouhé „upstream“ oblasti těchto genů (bráno od počátku transkripce). Pro regulační oblasti eukariot pro tzv. enhancery je však typické, že působí přes velikou vzdálenost a námi zvolený rozsah nemusel zahrnovat hledaný enhancer. iii) Sekvence promotoru nebo enhanceru může být natolik konzervovaná, že i sebemenší mutace (např. vzniklá při začlenění do genomu) může způsobit ztrátu funkce regulační oblasti.

Tyto hypotézy jsou možným vysvětlením pro konstrukt Dip-Luc, který rovněž neodpovídal na stimulaci IDGF2. Jako nejlepší vysvětlení se zdá být rozdílná povaha použitých buněk.

5. 2. 2. Konstrukt Att-Luc.

Attacin je antimikrobiální peptid, jehož exprese je řízena signální dráhou Imd. Z předchozích pokusů naší laboratoře prováděných na buňkách C18+ byla exprese genu Attacin zvýšena vlivem IDGF2 (Janečková, magisterská práce). Jiné pokusy prováděné na buňkách S2 ukázaly, že stimulace buněk složkami stěn gramnegativních bakterií způsobuje zvýšení exprese Att (Tanji et al. 2007). Reportérový konstrukt obsahující promotor genu Attacin se prokázal být vhodným nástrojem pro detekci účinku proteinu IDGF2. Za použití tohoto konstrukt byly prováděny testy, které přinesly důležité poznatky o účinku proteinu IDGF2.

Po identifikaci cukerného motivu, na který se IDGF2 váže, a vytvoření modelu aktivního centra proteinu s navázaným cukrem, byla provedena záměna klíčových aminokyselin. V proteinu IDGF2A byl asparagin v pozici 115 změněn na alanin (Obr. 15). Jak je zřejmé z pokusu, tato změna způsobila ztrátu funkce proteinu, nejspíše z důvodů ztráty schopnosti vázat se na cukerné motivy. Asparagin v této pozici se ukazuje být nezbytný pro správnou funkci proteinu. Pro podložení této hypotézy bude zapotřebí dalších testů.

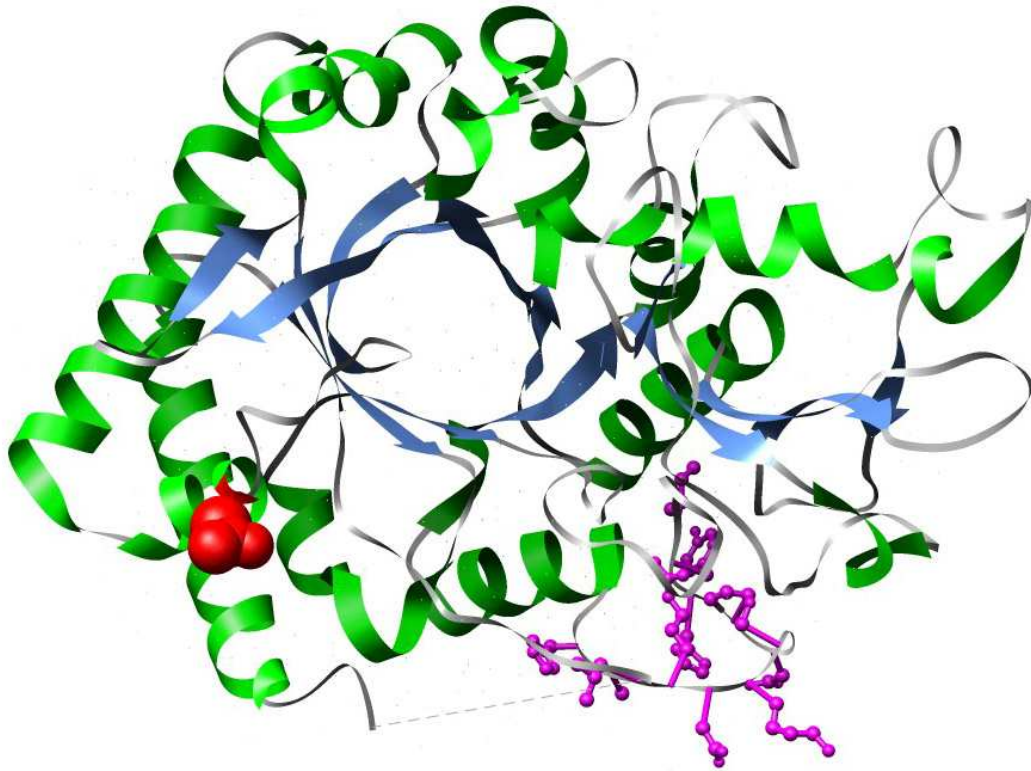
Otázka vazebných cukrů je pro většinu členů rodiny CLP stále otevřená. Varela et al. vytvořili krystalickou strukturu proteinu IDGF2, ale postrádali znalosti jaký cukerný motiv IDGF2 rozpoznává. Do počítačového modelu byl zabudován chitin, na který se však IDGF2 podle našich výsledků neváže. V další práci, ve které byla představena krystalická struktura lidského člena rodiny Chitináz proteinu HCgp-39 se do modelu podařilo zabudovat řetězec chitinu a ověřit pomocí rentgenové krystalografie. Volný chitin se však ve tkáních, ve kterých je HCgp-39 nalézán, nevyskytuje. Substrát tohoto proteinu bude zřejmě jiný (Fusetti et al. 2003). Zablokování funkce IDGF2 chitinem a dále námi identifikovaným cukrem jsou testy, které dále plánujeme do budoucnosti.

Zajímavý výsledek vyšel z pokusu s protilátkou. Tato protilátka rozpoznává skupinu aminokyselin přítomných v pozici 240 – 252 (Obr. 15), nacházejících se na smyčce, která se podílí na vzniku vazebné kapsy. Po navázání protilátky o velikosti cca. 150 kDa (IDGF2 39 kDa) dojde k zneprístupnění vazebného místa, nebo k důležité konformační změně vazebného centra a ztrátě schopnosti se vázat. Při pokusu byl rekombinantní protein inkubován v nadbytku protilátky. Volná protilátka po přidavku k buňkám způsobila snížení bazální aktivity luciferázy pod úroveň naměřenou u buněk bez přidavku rekombinantního IDGF2. Tato bazální hladina je způsobena účinkem proteinů IDGF2, které si buňky samy vyprodukují. Podle výsledků se zdá být produkce IDGF2

pro buňky důležitá pro jejich přežívání. Tento pokus dokázal nutnost vazebného centra IDGF2 pro správnou funkci, ale také potvrdil, že proteiny IDGF jsou potřebné faktory pro přežívání buněk.

Že IDGF2 funguje specificky na dráhu vedoucí k aktivaci genu pro Attacin, dokázal pokus, kdy byla srovnávána účinnost několika dalších lektinů. Lektin z *Griffonia simplicifolia*, který váže stejný cukerný motiv (Lescar et al. 2002), však neměl srovnatelný vliv. Při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ došlo pouze k 20 % zvýšení exprese, při koncentraci do 30 $\mu\text{g/ml}$ byl neúčinný. Vliv IDGF2 je možno pozorovat od koncentrace 15 mg/ml . Lektin z *Griffonia* (molekulová hmotnost 114 kDa) je asi třikrát větší než IDGF2 (39 kDa), však za srovnatelných podmínek (počet molekul) je jeho aktivita v porovnání s IDGF2 nižší. Kontrolní lektiny vykazovaly stejnou aktivitu jako *Griffonia*, vzrůst exprese o 20 % se dá vysvětlit nespecifickým působením rostlinných lektinů. Sojový lektin rozpoznává řetězce zakončené cukrem N-acetyl-galaktosamin a lektin z *Ricinus communis* řetězce zakončené cukrem β -D-galaktóza (Andrews et al. 1997). Lektíny jsou proteiny, které vážou cukerné řetězce a zprostředkovávají množství buněčných dějů. Důležitou otázkou zůstává, jaký protein je glykosylovaný tímto cukerným řetězcem, na který se IDGF2 váže.

Vazba volných nebo na membránu vázaných lektinů na glykoproteiny nebo glykolipidy nacházející se na povrchu buněk má mnoho funkcí. Může jít o interakci mezi buňkami nebo buňkou s extracelulárním prostředím. Další úlohu mohou hrát lektíny např. při rozpoznání patogena (Vasta et al. 2004).



Obrázek č. 15: Model struktury IDGF2 vytvořený pomocí programu UCSF Chimera molecular visualization application (Pettersen et al.2004). Autoři Mgr. Kučerová a Bc. Brož. Orientace: přímý pohled na $(\alpha\beta)_8$ soudkovitou strukturu, Struktura: α šroubovice zobrazeny zeleně, β listy modře, fialové postraní zbytky aminokyselin vyznačují úsek, na který se váže protilátka a aminokyselina změněná cílenou mutagenézí je zvýrazněna červeně. Umístění vazebné kapsy je před nákresem v blízkosti označeného aspartaminu.

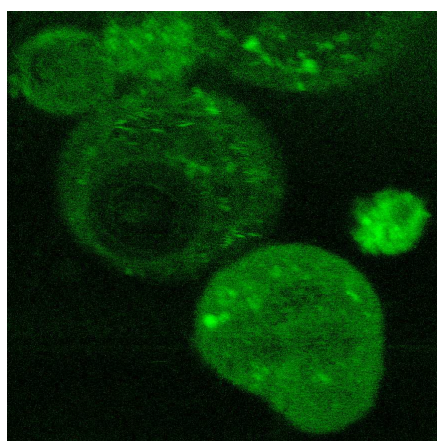
5. 3. Vliv IDGF2 na inzulínovou dráhu

Jako možný cíl působení IDGF proteinů byla navržena inzulínová dráha (Kawamura et al. 1999). Tato dráha kontroluje děje jako jsou buněčný růst, proliferace a smrt. Proliferace buněk C18+ byla zvýšena kooperací proteinů IDGF1 a IDGF2 spolu s inzulínem. Samotný inzulín však nevykazoval tak silný účinek na dělení buněk (Kawamura et al. 1999). Inzulínový receptor se zdál být vhodným substrátem pro vazbu IDGF proteinů (Varela et al. 2002).

Jedním z prokázaných účinků inzulínu je regulace transkripčního faktoru FOXO (Puig et al. 2003). Tento faktor v době hladovění pozitivně ovlivňuje expresi genů obsahující tzv. IRE, například inhibitor transkripce a samotný InR. Při stimulaci

inzulínem, ukazatel dostatku živin, aktivovaná Akt negativně reguluje FOXO. Tohoto poznatku mělo být využito při zkoumání vlivu IDGF2 na inzulínovou dráhu.

Teoretická úvaha byla následující: K hladovějících buňkám je přidán inzulín. Přidání inzulínu vede k negativní regulaci faktoru FOXO, které vlivem fosforylace, zprostředkované aktivní kinázou Akt, opouští jádro, kde bylo doposud aktivní. Po inkubaci buněk s inzulínem měla být aktivita luciferázy nižší oproti hladovějícím buňkám. Exprese reportérového genu však byla stejná u buněk s inzulínem i bez. Poločas luciferázy je asi dvě hodiny, po šesti hodinové inkubaci buněk s inzulínem by množství enzymu mělo být nižší, v důsledku inhibice dráhy a degradace luciferázy (Di Lorenzo et al. 2008). Možné vysvětlení neúčinku inzulínu je příliš dlouhá doba hladovění buněk. Po určité době může být množství transkripčních faktorů FOXO natolik vysoké, že inhibice části faktorů inzulínovou kaskádou nezpůsobí viditelné změny na úrovni exprese. Při pokusu s buňkami s fúzním proteinem PH doména - GFP byla doba inkubace buněk v MM pouze tři hodiny. Tyto buňky normálně reagovaly na stimulaci inzulínem (Britton et al. 2002) (Obrázky č. 11 a 12). Pokud byly buňky nechány hladovět 48 hodin, rovněž neodpovídaly na inzulín (Obrázek 16). Aktivita inzulínové dráhy se dá pozorovat vzápětí po stimulaci inzulínem. Během jedné minuty dochází k lokalizaci PH domény na vnitřní straně plazmatické membrány. Účinek IDGF2 na aktivaci této dráhy nebyl zaznamenán. Protože pokusy, zda IDGF2 působení na inzulínovou dráhu nepřinesly jednoznačné závěry zůstává tato otázka nadále otevřená.



Obrázek 16: Minimální médium (48 h.) + inzulín

6. Závěr

Protein IDGF2 a mutantní verze IDGF2 byly purifikovány pomocí hmyzích S2 buněk affinitní chromatografií.

Pro testování vlivu IDGF2 byly nejprve vytvořeny reportérové konstrukty. Dále byly získány buněčné sublinie trvale vesoucí tyto konstrukty.

Na připravených subliniích byly zavede testy pro měření účinku IDGF2. Jako vhodná linie pro zkoumání účinku IDGF2 se ukázala být buněčná linie trvale nesoucí konstrukt Att-Luc. Za pomoci těchto buněk byl porovnán účinek IDGF2, mutantní formy IDGF2 a několika rostliných lektinů. Po záměně aminokyseliny aspartamín za alanin v pozici 115 došlo ke ztrátě funkce proteinu IDGF2. Účinek rostlinných lektinů byl nespecifický.

5. Seznam literatury

Aggarwal, K., and N. Silverman (2008). Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB reports* 41(4): 267-277

Andrews, L., A. Laughinghouse and B. J. Sina (1997). Lectin Binding Characteristics of Male and Female Salivary Gland Proteins of *Anopheles gambiae*: Identification and Characterization of Female Specific Glycoproteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 159-166

Asgari, S. and O. Schmidt. (2004): Isolation of an imaginal disc growth factor homologue from *Pieris rapae* and its expression following parasitization by *Cotesia rubecula*. *Journal of Insect Physiology.* 50: 687-694

Attardo, G.M., P. Strickler-Dinglasen, S.A.H. Perkin, E. Caler, M.F. Bonaldo, M.B. Soares, N. El-Sayeed, and S. Aksoy. (2006): Analysis of fat body transcriptome from the adult tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Molecular Biology.* 15: 411-424

Badariotti, F., M. Kypriotou, C. Lelong, M. P. Dubos, E. Renard, P. Galera, and P. Favrel. (2006): The phylogenetically conserved molluscan Chitinase-like protein 1 (*Cg-Clp1*), homologue of human *HC-gp39*, stimulates proliferation and regulates synthesis of extracellular matrix components of mammalian chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 281:29583-29596

Bohni, R., J. Riesgo-Escovar, S. Oldham, W. Brogiolo, H. Stocker, B. F. Andruss, K. Beckingham and E. Hafen (1999). Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a *Drosophila* Homolog of Vertebrate IRS1–4. *97: 865–875*

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.

Brogiolo, W., H. Stocker, T. Ikeya, F. Rintelen, R. Fernandez and E. Hafen (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology* 11: 213–221

Buhi, W.C., I.M. Alvarez, I. Choi, B.D. Cleaver, and F.A. Simmen (1996): Molecular Cloning and Characterization of an Estrogen-Dependent Porcine Oviductal Secretory Glycoprotein. *Biology of reproduction* 55: 1305-1314

Buchon, N., N. A. Broderick, M. Poidevin, S. Pradervand, and B. Lemaitre (2009) *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host & Microbe* 5: 200–211

De Gregorio, E., P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin and B. Lemaitre (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO J.* 21: 2568-2579

Fusetti, F., T. Pijning, K. H. Kalk, E. Bos, and B. W. Dijkstra (2003): Crystal Structure and Carbohydrate-binding Properties of the Human Cartilage Glycoprotein-39. *J. Biol. Chem.* 37753–37760

Garofalo, R. S. (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* 13: 157-162

Goberdhan, D. C. I. and C. Wilson (2003). The functions of insulin signaling: size isn't everything, even in *Drosophila*. *Differentiation* 71:375–397

Goberdhan, D. C. I. N. Paricio, E. C. Goodman, M. Mlodzik and C. Wilson (1999). *Drosophila* tumor suppressor *PTEN* controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *GENES & DEVELOPMENT* 13: 3244–3258

Hakala, B. E., C. White, and A.D. Recklies (1993): Human cartilage *GP-39*, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 268: 25803-25810

Hall, B.G. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp.Ser.* 41: 95-98

Hall, B.G. (2004): *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts

Hu, B., K. Trinh, W.F. Figueira, and P.A. Price (1996): Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 271: 19415-19420

Hultmark, D.(2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 12-19

Chang, Nan-Chi A. , Shuen-Iu Hung, Kuo-Yuan Hwai, Ikunoshin Kato, Ju-Eng Chen, Cheng-Hsiun Liu and A. Chien Chang (2001). A Macrophage Protein, Ym1, Transiently Expressed during Inflammation Is a Novel Mammalian Lectin. *J. Biolog. Chem.* 276: 17497–17506

Imler, J. L. and L. Zheng (2004). Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 18–26

Irving, P., J-M. Ubeda, D. Doucet, L. Troxler, M. Lagueux, D. Zachary, J. A. Hoffmann, C. Hetru and M. Meister (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology* 7: 335–350

Karlsson, C., A. M. Korayem, C. Scherfer, O. Loseva, M. S. Dushay and U. Theopold (2004). Proteomic Analysis of the *Drosophila* Larval Hemolymph Clot. *J. Biol. Chem* 279: 52033–52041

Kawamura, K., T. Shibata, O. Saget, D. Peel, and P.J. Bryant. (1999): A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* 126: 211-219

Kirkpatrick R. B, R. Matico , D. E. McNulty , J. E. Strickler and M. Rosenberg (1994): An abundantly secreted glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages. *Gene* 153:147-154.

Lavine, M. D. and M. R. Strand (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295–1309

Lescar, J., R. Loris, E. Mitchell, C. Gautier, V. Chazalet, V. Cox, L. Wyns, S. Perez, C. Breton and A. Imberty (2002). Isolectins I-A and I-B of *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia*. *J. Biological Chemistry* 277: 6608-6614

Lou, M., T. P. J. Garrett, N. M. McKern, P. A. Hoyne, V. Ch. Epa, J. D. Bentley, G. O. Lovrecz, L. J. Cosgrove, M. J. Frenkel and C. W. Ward (2006). The first three domains of the insulin receptor digger structurally from the insulin-like growth factor 1 receptor in the regions governing ligand specificity. *PNAS* 103: 12429–12434

McKern, N. M., M. C. Lawrence, V. A. Streltsov, M. Z. Lou, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, T. C. Elleman, K. M. Richards, J. D. Bentley, P. A. Pilling, P. A. Hoyne, K. A. Cartledge, T. M. Pham, J. L. Lewis, S. E. Sankovich, V. Stoichevska, E. Da Silva, Ch. P. Robinson, M. J. Frenkel, L. G. Sparrow, R. T. Fernley, V. Ch. Epa and C. W. Ward (2006). Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443: 218-

Oldham, S., H. Stocker, M. Laffargue, F. Wittwer, M. Wymann and E. Hafen (2002). The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdInsP3 levels. *Development* 129: 4103-4109

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. "UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J. Comput. Chem.* **25**(13):1605-1612 (2004).

Puig, O. and R. Tjian (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *GENES & DEVELOPMENT* 19: 2435–2446

Puig, O., M. T. Marr, M. L. Ruhf and R. Tjian (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *GENES & DEVELOPMENT* 17:2006–2020

Ramet, M., R. Lanot, D. Zachary and P. Manfruegli (2002). JNK Signaling Pathway Is Required for Efficient Wound Healing in *Drosophila*. *Developmental Biology* 241: 145–156

Recklies, A. D., L. Baillargeon, and H.Ling (2000) *HC-gp39* is a growth factor for connective tissue cells. *Arthritis Rheum.* 43 (9, suppl.), S295

Ronquist, F. and J.P.Huelsenbeck (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574

Sancak, Y., C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell* 25, 903–915

Shackelton, L. M., D.M. Mann, and J.A Millis (1995): Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (*gp38k*) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J. Biol. Chem.* 270: 13076-13083

Shi, L., and S.M. Paskewitz. (2004): Identification and molecular characterization of two immune-responsive chitinase-like proteins from *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular biology.* 13(4): 387-398

Schneider, I(1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27: 353-365.

Silverman, N., R. Zhou, R. L. Erlich, M. Hunter, E. Bernstein, D. Schneider and T. Maniatis (2003) Immune Activation of NF- κ B and JNK Requires *Drosophila* TAK1. *J. Biological Chemistry* 278: 48928–48934

Slade, J. D., J. L. E. Rotchford and B. E. Staveley (2007). Evaluation of FOXO activity during nutritional stress and development. 48TH Annual *Drosophila* Research Conference. Program and abstracts. Philadelphia 421p.

Sun, Y.J., N.C. Chang, S.I. Hung, A.C. Chang, C.C. Chou, and C.D. Hsiao (2001): The Crystal Structure of a Novel Mammalian Lectin, Ym1, Suggests a Saccharide Binding Site. *J. Biol. Chem.* 276:17507–17514

Swofford, D.L. (1998): PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts

Tanji, T., X. Hu, A. N. R. Weber and Y. T. Ip (2007). Toll and IMD Pathways Synergistically Activate an Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* 27: 4578–4588

Tauszig, S., E. Jouanguy, J. A. Hoffmann and Jean-Luc Imler (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *PNAS* 97: 10520-10525

Tsuzuki, S., M. Iwami a, S. Sakurai (2001). Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 321–331

Tzou, P., E. De Gregorio and B. Lemaitre (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiolog.* 5:102–110

Varela, P. F., A. S. Llera, R. A. Mariuzza, and J. Tormo (2002): Crystal Structure of Imaginal Disc Growth Factor-2. *J. Biol. Chem.* 277: 13229–13236

Varnai, P., K. I. Rother and T. Balla (1999). Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Membrane Association of the Bruton's Tyrosine Kinase Pleckstrin Homology Domain Visualized in Single Living Cells. *J. Biological Chemistry* 274: 10983–10989

Vasta, G. R., H. Ahmed and E. W. Odom (2004). Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Current Opinion in Structural Biology* 14: 617–630

Vierstraete, E., P. Verleyen, F. Sas, G. Van den Bergh, A. De Loof, L. Arckens, and L. Schoofs (2004) The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 1052–1060

Příloha I.

Přehled použitých primerů

Primery použité pro přípravu konstruktů FOXO-Luc

název	Sekvence (od 5' k 3' konci)
IREF	TCGAGTTTGTGGTCGATTAAATAAACATGTAACACTTTGTTTTGTTGATACAAACAAA
IRER	AGCTTTTGTGGTATCAACAAAACAAAGTGTTCATGTTTATTTAATCGACAAACAAAC
Xho/FOXO	TAGCTCGAGAGTTTGTGGTC

Primery pro přípravu konstruktů s promotory „IDGF2“ indukčních genů

název	Sekvence (od 5' k 3' konci)
4859F	AAAGTATAAATTATAAGCAACGAC
4859R	TTGCCGCTGGCACTTTGAAC
6817F	GAGATGTTATGCGAACTAAAG
6817R	TCCGCCGAGATCAGTCAGTC
4859Nhe	ATAGCTAGCACGACAGCGACAACAAACAAGAG
4859Xho	TATCTCGAGCTGCAAAGGGAAAGGGTGAAGG
6817Nhe	ATAGCTAGCTTTTTGGTACAGTAGCCTCTC
6817Xho	TATCTCGAGCTGAAATTGAATGGGAATGTC

Primery pro použitý vektor pGL2 basic

název	Sekvence (od 5' k 3' konci)
pGL2	TACAAATAAAGCAATAGCATCAC
LucUp	ATCCTCTAGAGGATAGAATGG

Příloha II.

Složení použitých pufřů

Lysis buffer (1 liter):

50 mM NaH ₂ PO ₄	6.90 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (MW 137.99 g/mol)
300 mM NaCl	17.54 g NaCl (MW 58.44 g/mol)
10 mM imidazol	0.68 g imidazol (MW 68.08 g/mol)
pH 8,0 (upraveno pomocí NaOH)	

Wash buffer (1 liter):

50 mM NaH ₂ PO ₄	6.90 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (MW 137.99 g/mol)
300 mM NaCl	17.54 g NaCl (MW 58.44 g/mol)
20 mM imidazol	1.36 g imidazol (MW 68.08 g/mol)
pH 8,0 (upraveno pomocí NaOH).	

Elution buffer (1 liter):

50 mM NaH ₂ PO ₄	6.90 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (MW 137.99 g/mol)
300 mM NaCl	17.54 g NaCl (MW 58.44 g/mol)
250 mM imidazol	17.00 g imidazol (MW 68.08 g/mol)
pH 8,0 (upraveno pomocí NaOH)	

Příloha III.

Seznam použitých zkratk

Zkratka	Význam
dd H ₂ O	Deionizovaná voda
dNTP	Deoxi nukleotid trifosfát
PCR	Polymerázová řetězová reakce
bp	„Base pair”
IU	„International units“
PLB	Lyzační pufr (Passive Lysis Buffer)