

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie a matematika se zaměřením na vzdělávání



Martina Mazurová

Struktura a interakce lidského regulačního proteinu 14-3-3 pomocí *in vitro* fotoafinitního značení s využitím proteinových nano sond a hmotnostní spektrometrie
Structure and interaction of human 14-3-3 regulatory protein using *in vitro* photoaffinity labelling in combination of protein nano probes and mass spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph. D.

Konzultant: Mgr. Renata Ptáčková

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.6.2014

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Renatě Ptáčkové za neocenitelnou pomoc při provádění experimentů, za její neskutečnou trpělivost, ochotu a laskavý přístup. Mé obrovské díky jí patří za neutuchající nasazení při opravách této práce a také za její vstřícnost a snahu mi kdykoliv a s čímkoliv poradit.

Děkuji také svému vedoucímu doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph. D., za odborné vedení a cenné rada a připomínky, které mi pomohli zpracovat tuto bakalářskou práci.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřená na studium struktury a mechanismu lidského proteinu 14-3-3, který patří mezi významné regulační proteiny vyskytující se ve všech eukaryotických buňkách. V dnešní době je u savců známo 7 isoform tohoto proteinu a přestože jejich krystalová struktura vykazuje vysokou podobnost, můžeme pozorovat několik změn. Cílem této práce je příprava experimentálního nástroje, který umožní ověřit, zda jsou tyto rozdíly v krystalové struktuře isoformy ζ přítomné i v roztocích proteinů a současně zda ovlivňují strukturně funkční mechanismus této isoformy. Optimalizace exprese rekombinantního proteinu 14-3-3zeta s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem leucinu v sekvenci proteinu byla provedena v limitním médiu s prokaryotním expresním systémem *E. coli* BL-21 DE3 Gold, nebo auxotrofním systémem *E. coli* K-12 bez funkční biosynthesy leucinu.

Klíčová slova

Expresa a purifikace rekombinantního proteinu, hmotnostní spektrometrie, proteinová struktura

Abstract

This thesis is focused on the study of the structure and mechanism of human 14-3-3 protein, which is one of the important regulatory proteins present in all eukaryotic cells. Nowadays it is known seven isoforms of this protein in mammals. Although their crystal structure shows a high similarity, their mutual comparison reveals some changes. The aim of this work is to prepare experimental tools for verification whether the differences in the crystal structure of the ζ isoform are present in solution and how the structure-functional mechanism of this isoform is affected. The optimization of 14-3-3zeta recombinant protein expression with incorporated a photo-labile analog of leucine in the protein sequence was performed using limiting medium with prokaryotic expression system of *E. coli* BL-21 DE3 Gold or system of auxotrophic *E. coli* K-12 with non-functional leucine biosynthesis.

Keywords

Expression and purification of recombinant protein, mass spectrometry, protein structure

Obsah

Abstrakt.....	4
Klíčová slova.....	4
Abstract.....	5
Keywords.....	5
1 Seznam zkratk.....	8
2 Úvod.....	10
3 Teoretická část.....	11
3.1 Obecná charakteristika proteinů 14-3-3.....	11
3.1.1 Objevení a vznik názvu.....	11
3.1.2 Výskyt.....	11
3.1.3 Struktura.....	12
3.1.4 Vazebné vlastnosti a funkce.....	13
3.2 Příprava rekombinantních proteinů.....	15
3.2.1 Expres rekombinantních proteinů v <i>E. coli</i>	16
3.2.2 Purifikace a charakterizace rekombinantních proteinů.....	17
3.3 Studium struktury proteinů pomocí síťovacích technik a hmotnostní spektrometrie.....	18
3.3.1 Síťovací techniky („cross-linking“ techniques).....	18
3.3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	19
4 Cíl práce.....	22
5 Experimentální část.....	23
5.1 Seznam použitých přístrojů, pomůcek a materiálů.....	23
5.1.1 Přístroje a pomůcky.....	23
5.1.2 Chemikálie.....	23
5.1.3 Bakteriální buňky a plazmidy.....	24
5.1.4 Roztoky a pufrы.....	24
5.1.5 Kultivační média.....	25
5.2 Expres proteinu 14-3-3zeta v limitním médiu s fotoaktivovatelným analogem leucinu.....	26
5.2.1 Transformace plazmidem pET-15b 14-3-3zeta WT.....	26
5.2.2 Kultivace v LB médiu.....	26
5.2.3 Produkce v limitním médiu s foto-Leu.....	27
5.3 Expres proteinu 14-3-3zeta s využitím auxotrofních bakterií.....	27
5.3.1 Příprava expresního vektoru.....	27

5.3.2	Produkce v limitním médiu s foto-Leu	31
5.4	Sledování míry inkorporace foto-Leu do sekvence 14-3-3zeta pomocí MALDI-TOF MS	33
5.4.1	Denaturační gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	33
5.4.2	Příprava vzorku na MS analýzu.....	33
5.4.3	Štěpení proteinů v gelu	34
5.4.4	MALDI-TOF MS analýza	34
6	Výsledky.....	35
6.1	Expresce proteinu 14-3-3zeta v limitním médiu s fotoaktivovatelným analogem leucinu.....	35
6.1.1	Produkce v limitním médiu M9 s foto-Leu	35
6.1.2	MALDI-TOF MS analýza	36
6.2	Expresce proteinu 14-3-3zeta s využitím auxotrofních bakterií	38
6.2.1	Příprava expresního systému v buňkách <i>E. coli</i> K-12 Δ Leu	38
6.2.2	Optimalizace produkce v buňkách <i>E. coli</i> K-12 Δ Leu	39
7	Diskuse.....	41
8	Závěr.....	44
9	Seznam literatury	45

1 Seznam zkratek

AMK	aminokyseliny
BAD	protein rodiny Bel-2 účastníci se iniciace apoptosy (z angl. Bcl-2-associated death promoter)
Bcl-2	proteiny regulující apoptosu (z angl. B-cell lymphoma 2)
Bcr	protein kódovaný BCR genem (z angl. breakpoint cluster region)
bp	páry bází (z angl. base pairs)
CCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (z angl. α-cyano-4-hydroxycinnamon acid)
CDC25	proteinová fosfatasa zodpovědná za kontrolu buněčného cyklu (z angl. cell division cycle 25)
DEAE	diethylaminoethanol
EtMf	ethylenmorfolin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylendiaminetetraacetic acid)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
K_D	disociační konstanta
MALDI-TOF MS	technika ionizace laserem v přítomnosti matrice v kombinaci s průletovým analyzátozem (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MAPK	kinasa (z angl. mitogen-activated protein kinase)
p27	protein 27

PI3-K	fosfatidylinositol 3-kinasa (z angl. phosphatidylinositol 3-kinase)
Raf	specifická kinasa (z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma)
SDS-PAGE	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti denaturačního detergentu dodecylsírany sodného
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (z angl. N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)
Δ Leu	nefunkční biosynthesa leucinu

2 Úvod

Rodina proteinů 14-3-3 patří do skupiny lidských regulačních proteinů, které se v eukaryotických buňkách podílí na celé řadě procesů, od kontroly buněčného cyklu až po buněčný metabolismus a kontrolu apoptozy. Tato bakalářská práce je věnována optimalizaci postupu pro expresi rekombinantního proteinu 14-3-3 za účelem studia jeho struktury s využitím nové síťovací techniky a hmotnostní spektrometrie.

Cílem je vytvoření lidské isoformy 14-3-3zeta s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem leucinu na místo přirozeného leucinu v bakteriích *E. coli* (BL-21 nebo auxotrofním kmenu s nefunkční dráhou pro syntézu leucinu). V experimentální části je také využita hmotnostní spektrometrie, pomocí které je sledovaný protein identifikován a současně charakterizována úspěšná inkorporace foto-Leu do sekvence proteinu.

U takto připraveného proteinu (fotoaktivovatelná proteinová nanosonda) bude následně studována jeho struktura s využitím foto-síťovací techniky v kombinaci s hmotnostní spektrometrickou analýzou, která umožní studovat strukturu a interakce proteinů za nativních podmínek v roztoku.

3 Teoretická část

3.1 Obecná charakteristika proteinů 14-3-3

3.1.1 Objevení a vznik názvu

Proteiny 14-3-3 patří do všudypřítomné a vysoce konzervované rodiny proteinů, které se váží na různé molekuly účastníci se přenosu signálu a regulace buněčného cyklu [1]. Proteiny 14-3-3 se řadí mezi polypeptidy kyselé povahy a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 28-33 kDa [2, 3].

Rodina proteinů 14-3-3 byla poprvé objevena v roce 1967 Moorem a Perezem při analýze savčí mozkové tkáně [3]. V tomto ohledu se však můžeme setkat také s rokem 1968 [2]. Výzkum byl prováděn za účelem systematické klasifikace mozkových proteinů pomocí DEAE – celulózové chromatografie [3, 4]. Získané frakce byly vyhodnocovány škrob-gelovou elektroforézou [2, 4]. Název 14-3-3 tedy ve skutečnosti označuje eluční frakci obsahující tyto proteiny. Číslo 14 označuje frakci, ve které byly proteiny po chromatografii obsaženy, a číslo 3.3 značí podíl, ve kterém se vyskytovaly na elektroforéze [3, 5, 6].

3.1.2 Výskyt

Proteiny 14-3-3 se vyskytují především ve formě homo a hetero dimerních katalyticky aktivních komplexů ve všech eukaryotických buňkách [3, 7, 8]. U rostlin můžeme nalézt až 15 isoformů a u kvasinek byly identifikovány 2 isoformy. U savců je známo nejméně 7 isoformů (β , γ , ϵ , σ , ζ , τ a η ; kde β a ζ jsou fosforylované formy zpočátku popsané jako α a δ), které byly pojmenovány podle pořadí eluce na HPLC. Každá z existujících isoformů je kódována odlišným genem [3, 4, 7, 8]. Navzdory této genetické rozmanitosti je překvapivě vysoká sekvenční identita mezi jednotlivými isoformami proteinu [7].

Proteiny 14-3-3 se hojně vyskytují v nervových tkáních a to především v neuronech v centrální nervové soustavě, kde představují 1 % (w/v) z celkových proteinů cytosolu [5, 9]. Kromě nervové tkáně nalezneme 14-3-3 proteiny i v jiných

lidských tkáních. Například lidské τ a σ isoformy jsou přítomny v T lymfocytech a epitelových buňkách. A γ isoforma je hlavní 14-3-3 protein, který se nachází v Golgiho aparátu v savčích buňkách [9].

3.1.3 Struktura

V současné době je známa 3D struktura proteinů 14-3-3 (Obr. 1, str. 13) [10, 11]. Přestože výsledky krystalových struktur všech sedmi lidských isoform vykazují vysokou podobnost (Obr. 1B, str. 13), vzájemná srovnávací analýza odhalila několik změn. Jednotlivé struktury se odlišují v relativní poloze monomerů v důsledku změn v úhlu mezi dvěma podjednotkami [11].

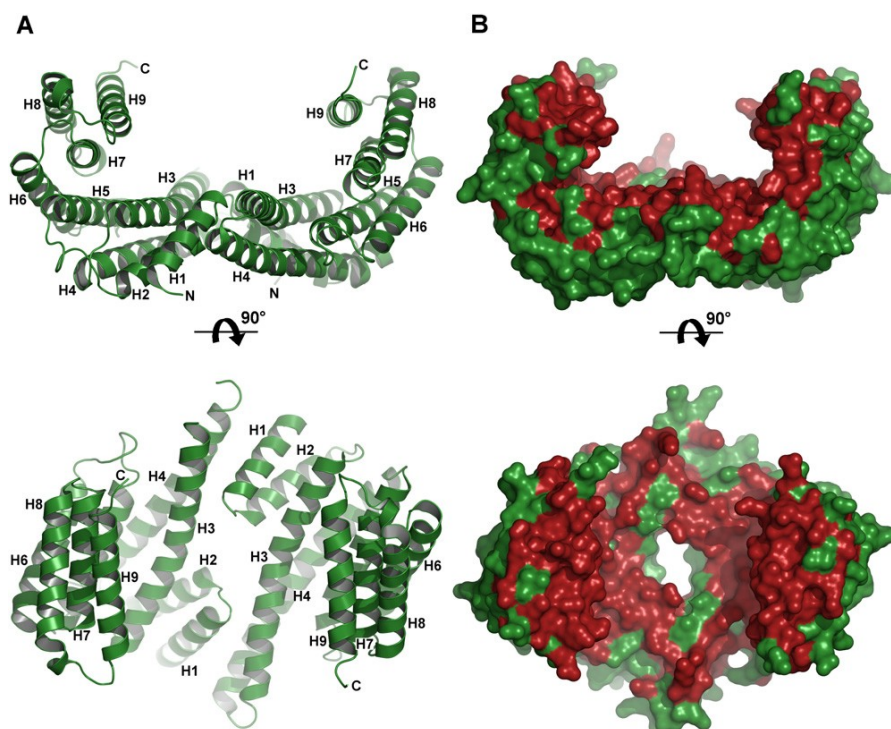
První krystalové struktury lidského 14-3-3 ζ a 14-3-3 τ odhalily, že 14-3-3 proteiny jsou dimerní a vysoce helikální [11]. Po rentgenovém ozáření krystalů 14-3-3 ζ a 14-3-3 τ v nepřítomnosti vazebného ligandu se ukázalo, že dimerní molekula má miskovitý tvar [7, 12]. Jelikož se jedná o proteiny, jejichž struktury jsou velmi podobné, lze výsledky zobecnit na celou rodinu [12].

Protein 14-3-3 lze zařadit strukturní podobností do nadrodiny v angl. literatuře nazývané tetratricopeptide repeat family, která se skládá ze sady 3-16 motivů tvořících nosné struktury podílející se na tvorbě protein-proteinových interakcí [6].

Každý monomer obsahuje svazek devíti antiparalelních α -helixů [7, 8, 11], které jsou uspořádány do N-koncových a C-koncových domén [6] a tvoří tzv. L strukturu [12]. Vnitřní (konkávní) část této L-struktury je tvořena α -helixy H3 a H5, které obsahují nabitě/polární aminokyseliny a α -helixy H7 a H9, které obsahují hydrofóbní aminokyseliny [12]. Tyto čtyři α -helixy tvoří konkávní amfipatickou drážku, která interaguje s cílovými klientními proteiny/peptidy [11, 12]. Struktura vnitřní části je značně konzervovaná, zatímco na vnějším konvexním povrchu se vyskytují variabilní aminokyselinové zbytky.

Monomery proteinů 14-3-3 jsou schopné vytvářet buď homo či heterodimerní komplexy. Někteří členové rodiny, jako jsou například σ a γ , upřednostňují homodimerizaci a jiní, jako například ϵ , preferují tvorbu heterodimeru [3]. K dimerizaci 14-3-3 proteinů dochází na základě interakce N-koncového helixu H1 jednoho monomeru s helixem H3 a H4 protilehlého monomeru. Vysoká podobnost

aminokyselinových sekvencí podél šroubovic H1 a H3 mezi různými isoformami umožňuje 14-3-3 proteinům zmíněnou heterodimerizaci [6]. V dimeru pak mohou být současně vázány dva stejné nebo různé proteiny [12].



Obr. 1: Krystalová struktura proteinu 14-3-3 (lidská isoforma ζ, PDB ID 1QJB) [11] (A) Struktura dimeru 14-3-3ζ. (B) Znáznornění povrchové struktury proteinu. Červeně označené části jsou shodné pro všechny známé lidské isoformy.

3.1.4 Vazebné vlastnosti a funkce

Význačný rys 14-3-3 proteinů je jejich schopnost vázat řadu strukturálně i funkčně rozdílných proteinových ligandů. K vazbě dochází většinou prostřednictvím fosforylovaných serinových nebo threoninových motivů. Počet tzv. klientních proteinů se již rozrostl na více než 200 [5, 13].

Dimerní 14-3-3 proteiny se mohou vázat na dva různé regiony stejného proteinu a ovlivnit tak jeho konformaci a aktivitu. Mohou se také vázat na dva různé cílové proteiny a uvést je do těsné blízkosti, což vede k vytvoření stabilního ternárního komplexu [5, 14]. Zapojení dvou vazebných motivů může vést také k efektivní

konstrukční modulaci vázaného ligandu a/nebo k maskování motivu důležitého pro funkci cílové molekuly [14].

14-3-3 proteiny regulují funkci jiných proteinů prostřednictvím řady různých mechanismů. Jak bylo uvedeno již dříve, rozpoznávají fosforylované vazebné motivy a mnoho 14-3-3 vazebných partnerů obsahuje dva nebo více takových motivů. Průkopnický výzkum 14-3-3 vazebných míst na kinase Raf vedl k identifikaci dvou optimálních fosfoserinových/fosfothreoninových motivů - RSX_1pSXP a RXX_1XpSXP (pS v obou případech reprezentuje fosfoserin, X ve všech pozicích označuje jednotlivé aminokyseliny a X_1 aromatický zbytek) [4, 7, 11]. Na objevu těchto dvou motivů, které jsou charakteristické pro všechny isoformy proteinu 14-3-3 [7], se podíleli Muslin et al. [8], kteří poskytli i jejich důkaz.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že 14-3-3 jsou schopny regulovat aktivitu protein kinasy C a mohou interagovat s proteinem kódovaným BCR genem (Bcr). Veškeré poznatky dále ukázaly, že tvoří komplexy s velkým množstvím kinas, fosfatas a dalších proteinů [6], které jsou klíčové v celé řadě biologických procesů [11] jako jsou kontrola buněčného cyklu (Cdc25), buněčná signalizace (Raf-1), buněčný metabolismus, integrita cytoskeletu, buněčné šíření a migrace, kontrola apoptosy a buněčná regulace [2, 13].

K ligandům závislým na fosforylaci patří například [2, 5, 11, 15]:

- extracelulární kinasy (Raf-1, MAPK, PI3-K)
- proteiny pro regulaci buněčného cyklu (CDC25, p27, p53)
- enzymy (tyrosin a tryptofan hydroxylasa, N-acetyltransferasa)
- proteiny podílející se na kontrole apoptózy (BAD)
- strukturní a cytoskeletální proteiny (vimentin a keratiny)
- receptory (receptor pro glukokortikoidy)

Ačkoliv většina ligandů interagujících se 14-3-3 proteiny je závislá na fosforylaci, najdou se i takové, které na fosforylaci závislé nejsou a přesto se 14-3-3 proteiny interagují [2, 4, 12]. Jako dva dobře známé příklady takových ligandů lze uvést exoenzym S a R18 [4, 11]. Je také velmi pravděpodobné, že fosforylované i

nefosforylované ligandy mohou interagovat se stejnou vazebnou doménou proteinu 14-3-3 [4].

Kromě již výše uvedeného seznamu buněčných dějů, odhalených v uplynulých 20 letech výzkumu, jsou tyto proteiny také příčinou neuropatologických procesů. Proteiny 14-3-3 byly detekovány v mozkomíšním moku u různých neurodegenerativních onemocnění jako je roztroušená skleróza nebo Creutzfeldt-Jacobovy nemoci. 14-3-3 proteiny však můžeme nalézt i u Alzheimerovy choroby nebo u Parkinsonovy choroby [5].

Všechny tyto poznatky řadí 14-3-3 proteiny mezi významné buněčné regulátory a jejich výzkum je velmi důležitý pro pochopení buněčných procesů a mnoha dalších působení této významné rodiny proteinů. Přestože se v současné době věnuje velká pozornost studiu struktury a funkce proteinů 14-3-3, přesný mechanismus jejich účinku nebyl doposud objasněn.

3.2 Příprava rekombinantních proteinů

Rekombinantní technologie jsou v dnešní době velmi dobrou alternativou k izolaci proteinů z přírodních zdrojů, jako jsou živočišné tkáně, rostlinná pletiva nebo mikroorganismy [16].

Produkty rekombinantní exprese tzv. rekombinantní proteiny jsou vyrobené genovými modifikacemi [17] a kódované rekombinantní DNA [16]. Do genomu producenta je začleněn gen kódující požadovanou bílkovinu z jiného organismu [17]. Rekombinantní protein je exprimován hostitelským proteosyntetickým aparátem a následně izolován z produkujícího organismu [16]. Jedná se tedy o proces, kdy za pomoci různých expresních systémů lze vytvořit protein odvozený od konkrétního genu [18].

V současnosti jsou k dispozici různé expresní systémy pro tvorbu takovýchto proteinů. Volba hostitelského organismu pro expresi proteinů závisí na typu post-translační modifikace potřebné pro zachování biologické aktivity molekuly [19]. Můžeme volit ze dvou hlavních tříd - prokaryotní expresní systémy (bakteriální) a eukaryotní expresní systémy (kvasinkové, hmyzí, savčí) [18, 20]. K nejpoužívanějším patří bakterie. Jejich největší výhodou je jednoduchost a vysoký výtěžek proteinu. Nelze

však mít vysoké nároky na kvalitu proteinu, protože systém neumožňuje post-translační modifikace. U bakterií je protein omezen také velikostně (max. 150 kDa). Tímto systémem jsou proteiny exprimovány do cytosolu nebo se hromadí v inkluzních tělíkách [18].

3.2.1 Exprese rekombinantních proteinů v *E. coli*

Prvním krokem při tvorbě rekombinantního proteinu je izolace jeho kódujícího genu [16]. Jedná se o lineární molekulu DNA nesoucí sekvenci nukleotidů kódujících rekombinantní protein, která je specificky upravená pro zaklonování do expresního vektoru (na konci sekvence jsou restriční místa kompatibilní s expresním vektorem). Pomocí endonukleas je tak možné vytvořit ligační přesahy a vložit úsek DNA, tzv. inzert, do vektoru. Je nutné, aby inzert nesl sekvenci pro začátek transkripce (methionin) a stop kodon, dále také může obsahovat specifickou sekvenci umožňující snadnou izolaci/purifikaci [18].

Vložení připraveného inzertu do vhodného vektoru zajišťuje enzym DNA ligasa. Expresní vektory jsou složeny z několika základních sekvencí důležitých pro integraci inzertu, selekci bakteriálního klonu a expresi proteinu [18].

Následujícím krokem je transformace, tedy vnesení vytvořeného vektoru do buněk vhodných pro expresi rekombinantního proteinu. *Escherichia coli* je zdaleka nejvíce používaná bakterie pro produkci rekombinantních proteinů. Mezi výhody tohoto organismu patří rychlá výroba biomasy v důsledku vysokého tempa růstu, snadná genetická manipulace a nízké náklady na kultivační média [19]. Vhodné expresní buňky jsou například geneticky modifikované kmeny *E. coli* BL21. Mají genom speciálně upravený tak, abychom mohli cíleně ovlivnit a načasovat expresi rekombinantního proteinu [18]. Transformaci kompetentních buněk (buněk schopných přijmout plazmid) lze provést teplotním šokem nebo elektroporací. Poté následuje selekce transformovaných klonů pomocí selekčních markerů [18]. Nejčastěji se jedná o produkty genů zajišťujících resistenci k antibiotikům [16].

Dalším krokem je produkce proteinu, která může být kontinuální nebo indukovatelná. Může jít například o indukci pomocí isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), který spouští syntézu T7 RNA polymerasy, která

specificky transkribuje pouze geny umístěné za T7 promotorem [16]. Při produkci hraje roli volba vhodného expresního média a kultivačních podmínek.

3.2.2 Purifikace a charakterizace rekombinantních proteinů

Důležitou podmínkou pro získání rekombinantního proteinu v homogenní formě je účinná purifikace. Purifikaci lze usnadnit řízeným směřováním proteinu např. do periplazmatického nebo vnějšího prostoru *E. coli* užitím specifických signálních sekvencí [21].

Je-li protein produkován do cytosolu, pak je k uvolnění proteinu do roztoku nutná lýze buněk. Ta je obvykle prováděna kombinací fyzikálních, chemických a enzymatických lyzačních postupů. Příkladem může být působení lysozymu a sonikace, pokud se jedná o protein 14-3-3. Pokud je sledovaný protein nerozpustný a bakterie ho shromažďují v inkluzních tělískách [18], je nutná solubilizace tělísek denaturačním činidlem a následná renaturace proteinu [16].

Pro purifikaci z komplexních bakteriálních lyzátů využíváme zejména chromatografické metody. Jednou z těchto metod je gelová chromatografie, která slouží k oddělení velkých molekul od malých. Malé molekuly vnikají do hydratovaných gelů a tím se zpožďují, zatímco velké molekuly prochází rychleji [22]. Další důležitou technikou je chromatografie na iontoměničích, kdy se proteiny oddělují na základě náboje na jejich povrchu [16, 22].

Nejčastěji se používá afinitní chromatografie, která umožňuje oddělit ze směsi proteinů čistou frakci jediného proteinu [18]. Tato metoda využívá různých purifikačních značek tzv. tagů. Nejznámější značkou je značka složená ze sekvence několika histidinů nazývaná His-tag. Histidinová sekvence má velkou afinitu k iontům přechodných kovů. Tato vlastnost je základem metody IMAC využívající imobilizace kovových iontů na agarozovou matici pomocí chelatační vazby s kyselinou imidodioctovou nebo kyselinou nitrilotrioctovou [16]. Pro studium struktury a funkce proteinů za nativních podmínek je potřeba značku odstranit. Proto se mezi His kotvu a sekvenci proteinu vkládá štěpící místo pro vysoce selektivní proteasu (např.: thrombin).

Po provedení purifikace je potřeba získaný preparát charakterizovat. Pro kontrolu čistoty lze použít elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti

denaturačního detergentu dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) [22]. Ke kontrole správného nativního stavu lze použít například nativní gelovou elektroforézu. Pro zjištění identity je možné použít hmotnostní spektrometrii (MS).

3.3 Studium struktury proteinů pomocí síťovacích technik a hmotnostní spektrometrie

V dnešní době lze studovat 3D strukturu proteinů pomocí modifikace proteinů síťovacími činidly v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Jelikož modifikace probíhá v roztoku, mají tyto techniky velkou výhodu v udržení nativní struktury proteinu.

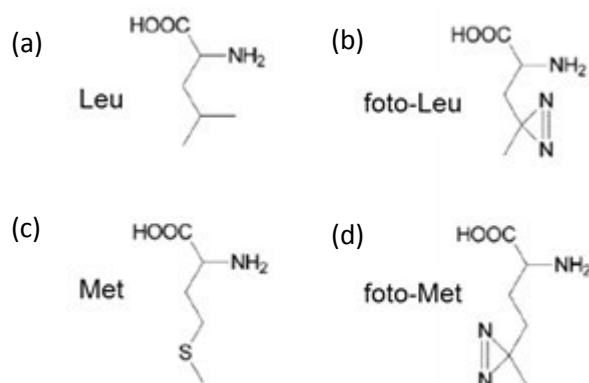
3.3.1 Síťovací techniky („cross-linking“ techniques)

Síťovací techniky umožňují spojování lineárních nebo rozvětvených makromolekulárních řetězců dvou či více molekul příčnými vazbami do struktury prostorové sítě [23, 24]. Samotný proces je závislý na teplotě, čase, po který je vzorek teplotě vystaven a na volbě a koncentraci síťovacího činidla [24].

Chemická síťovací činidla se svými reaktivními skupinami specificky váží na funkční skupiny aminokyselinových zbytků v molekulách proteinu. S využitím celé řady dostupných činidel tak můžeme cíleně modifikovat studované proteiny a s pomocí hmotnostní spektrometrie sledovat přístupnost a reaktivitu aminokyselinových zbytků a vzdálenost mezi funkčními skupinami v proteinech.

Kromě běžných síťovacích technik lze využít síťování pomocí fotoaktivovatelných proteinových nanosond. Tato nová metoda kombinující chemické síťování a fotoafinitní značení je založena na inkorporaci fotoaktivovatelného analogu aminokyseliny (např. foto-Met nebo foto-Leu) přímo do sekvence studovaného proteinu. K inkorporaci dochází během rekombinantní exprese na základě strukturní podobnosti s přirozenými aminokyselinami (Obr. 2, str. 19). Aminokyselinové analogy obsahují diazirinovou funkční skupinu, ze které po aktivaci UV zářením vzniká velmi reaktivní karbénový biradikál, který je schopen napadat jakýkoliv aminokyselinový zbytek v blízkém okolí za vzniku kovalentní vazby [25].

Vytvořené kovalentní produkty jsou separovány pomocí SDS-PAGE [26]. Každý proteinový proužek (např.: kovalentně propojené integrující proteiny) může být z gelu vyříznut [26], odbarven a po promytí podroben trypsinové hydrolyze v gelu [27]. S využitím hmotnostní spektrometrie jsou nalezeny kovalentně spojené peptidy a identifikovány aminokyselinové zbytky tvořící kovalentní spojení [26].



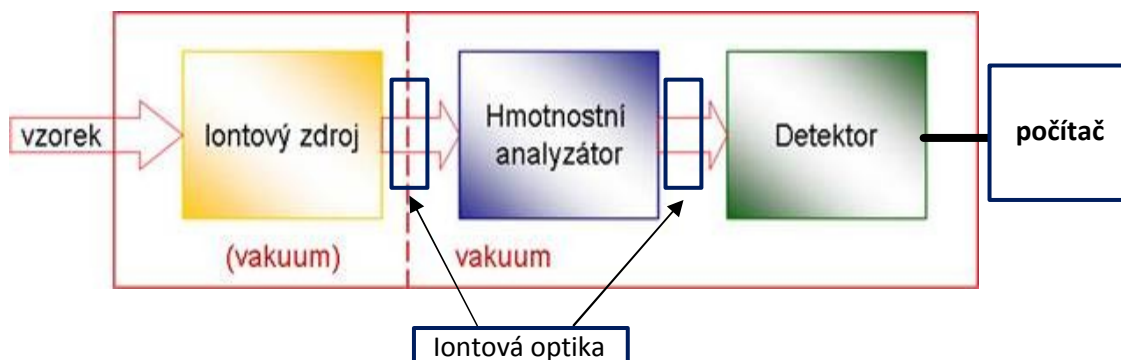
Obr. 2: Struktura aminokyselin (a) leucin a (c) metionin a jejich fotoaktivovatelných analogů (b) foto-leucin a (d) foto-methionin

3.3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. „mass spectrometry“) je metoda, s jejíž pomocí lze identifikovat a charakterizovat různé molekuly (např.: proteiny) a určením poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [18, 28]. Nezbytnou podmínkou této metody je tedy přeměna neutrálních molekul analytu na ionty. V posledních letech snahy mnoha vědců vedli k vývoji nových měkkých ionizačních technik [28].

Hmotnostní spektrometr je tvořen z několika částí (Obr. 3, str. 20). První částí je iontový zdroj, který slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Za iontovým zdrojem se nachází hmotnostní analyzátor sloužící k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru m/z . Poslední součástí je detektor, který slouží k detekci iontů po jejich rozdělení a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů [29].

Dalšími důležitými částmi hmotnostního spektrometru jsou vakuový systém, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat (např.: porovnání spekter s knihovnou) [29].



Obr. 3: Hmotnostní spektrometr

3.3.2.1 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Technika ionizace/desorpce laserem v přítomnosti matrice (MALDI, z angl. „matrix-assisted laser desorption/ionization“) v kombinaci s průletovým analyzátozem (TOF, z angl. „time-of-flight“) je populární a univerzální způsob jak analyzovat řadu makromolekul biologického původu [30]. První zprávy prokazují úspěšnou MALDI-TOF MS analýzu ve dvou laboratořích: (1) Karas a Hillenkamp, (2) Tanaka [31]. Přístroj se následně stal komerčně dostupným od roku 1991. To znamená, že obecné využití MALDI-TOF MS se ukázalo jako účinný nástroj pro studium biomolekul v posledním čtvrtstoletí [30].

MALDI je velmi citlivá ionizační technika [32]. Jedná se o metodu, kdy dochází k tvorbě molekulárních iontů $[A+H]^+$, kde A je analyt a H atom vodíku. Analyt smíchaný s matricí je nanesen na ocelový terč a po odpaření rozpouštědla tvoří směsné krystalky. Po vložení destičky do vysokého vakua v iontovém zdroji [30, 33] jsou krystalky ozářeny laserovým nanosekundovým paprskem [30, 32, 31, 33]. Například ultrafialovým paprskem s vlnovou délkou 266 nebo 337 nm [31]. Matrice absorbuje energii laseru a dojde k desorpci matrice spolu s analytem, matrice se ionizuje a předává molekulám analytu ion vodíku. Následně dochází k transportu iontů analytu do průletového hmotnostního analyzátozu [30, 33].

V analyzátozu dochází k zrychlení iontů (vztahuje se na ně stejné elektrické pole) [30, 33]. Následně se měří čas průletu iontu od analyzátozu až k detektoru [31, 33]. Zjišťovaná hmotnost se pak může vypočítat podle následujícího vzorce [33]

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

Kde t je doba průletu, L délka driftové zóny, U vložené napětí, e elementární náboj, m hledaná hmotnost a z náboj iontu.

MALDI-TOF MS se používá na analýzu celé řady biomolekul, jako jsou proteiny, peptidy, cukry, polymery a mnoho dalších [32]. Matrice se volí podle typu analytu. Mezi nejběžnější typy matrice patří kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, nebo kyselina sinapová [33]. Samotná příprava vzorku je v podstatě velmi jednoduchá, ale zároveň je to jeden z nejdůležitějších kroků v procesu analýzy MALDI [32]. Pro přípravu analytu je důležité, aby byla matrice v nadbytku nad analytem. Roztok matrice by měl být vždy čerstvý a pH matrice by mělo být kyselé. Je také dobré mít vyšší podíl organického rozpouštědla pro rychlejší odpaření a menší čas pro tvorbu krystalků matrice s analytem [33].

4 Cíl práce

Optimalizace postupu pro expresi rekombinantního proteinu 14-3-3zeta s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem leucinu za účelem studia jeho struktury s využitím kombinace nové fotoaktivovatelné síťovací techniky a hmotnostní spektrometrie.

1. Transformace expresním plazmidem a optimalizace exprese rekombinantního proteinu v *E. coli* BL-21 DE3 Gold v limitním mediu
2. Příprava nového expresního vektoru pro použití v auxotrofním kmeni *E. coli* K-12 s nefunkční biosyntézou leucinu
3. Transformace expresním plazmidem a optimalizace exprese rekombinantního proteinu v auxotrofním kmeni *E. coli* K-12 s nefunkční biosyntézou leucinu

5 Experimentální část

5.1 Seznam použitých přístrojů, pomůcek a materiálů

5.1.1 Přístroje a pomůcky

Spektrometr	DU-70 Spectrophotometer	Beckman Coulter, USA
Třepačka	BigGer Bill	Thermolyne, USA
Rotační koncentrátor	SpeedVac DNA 110	Savant, USA
Sonikační lázeň	Elmasonic S	Elma, Německo
Hmotnostní spektrometr	MALDI-TOF, Ultraflex III	Bruker Daltonics, USA
Centrifuga	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga	Coulter Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga	MiniSpin	Eppendorf, Německo
Centrifuga	Universal 320R	Hettich, Německo
Spektrometr	NanoVue Spectrophotometer	GE Healthcare, UK
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
Aparatura na elektroforézu	SE 260	Hoeffer, USA
Zdroj	EPS 3501	GE Healthcare, UK
pH metr	pHM 210	Radiometer, Dánsko

5.1.2 Chemikálie

Genomed, Německo: JET Quick Gel Extraction Spin Kit

Invitrogen, USA: SYBR Safe DNA gel stain,

Lachema, ČR: isopropanol, ethanol, EDTA, KCl

Lach-Ner, ČR: glycerol, kyselina octová

Fluka, Švýcarsko: Tris-Cl, SDS, TEMED, ammonium persulfát, Coomassie Brilliant Blue R 250, ethylmorfolin, TFA (kyselina trifluoroctová), TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride), NaCl, kvasničný extrakt

Merck, SRN: acetonitril (ACN), H₂O

Bruker Daltonics, SRN: CCA (α -kyano-4-hydroxyskořicová kys.), pepmix II (kalibrační standard)

Oxoid, UK: trypton

GE Healthcare, UK: dithiotreitol

Sigma Aldrich, USA: MgSO₄, MgCl₂, thiamine hydrochloride, bromfenolová modř, sacharosa, glukosa, aminokyseliny, Marker Sigma Wide Range (6,5 – 200 kDa), jodacetamid, akrylamid, N,N'-metylen-bis-akrylamid, IPTG, chloramfenikol, kanamycin, ampicilin

New England BioLabs, UK: NcoI (10000 U/ml), BamHI (100000 U/ml), NEBuffer 3, T4 DNA Ligase Buffer, T4 DNA Ligase (400000 U/ml)

5.1.3 Bakteriální buňky a plazmidy

Buňky *E. coli* DH5 α

Buňky *E. coli* BL21 DE-3 Gold

Buňky *E. coli* K-12 Δ Leu (JW5807-2, 11943) Coli genetic Stock center, USA

Plazmid pET-15b 14-3-3zeta WT Poskytnut z laboratoře prof. Tomáše Obšila, Ph. D.

Plazmid pAR1219 Sigma Aldrich, USA

Plazmid pACYCDuet-1 Novagen, USA

5.1.4 Roztoky a pufry

Ix PB: 10 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTA; pH 7,7; sterilizace 20 min.; 121 °C

Roztok K-AC: 3M draslík, 5M octan, pH 5,4

Matrice CCA (α -cyano-4-hydroxysořicová kys.): 10 mg/ml CCA v 50% ACN a 0,1% TFA, připravený roztok před použitím naředit 1:1 (v/v) rozpouštědlem

Roztok CBB: 1,25 g CBB R-250, 225 ml methanol, 50 ml kyselina octová, 225 ml H₂O

Odbarvací roztok: H₂O, ethanol, kyselina octová v poměru 55:35:10

Lyzační pufr: 10% (w/v) SDS, 5M NaOH

Pufr pro SDS-PAGE (5x koncentrovaný): 0,1M Tris/HCl, 1M glycin, 0,5% (w/v) SDS, pH 8,5

STE pufr: 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8,0

GTE pufr: 50mM glukosa, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA, pH 8,0

Roztok PEG: 2,5M NaCl, 20% PEG 8000

TAE pufr: 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA, pH 8,0

Bromfenolová modř: 0,5 g/l bromfenolová modř, 400 g/l sacharosa, 20 mmol/l EDTA

5x redukující pufr (10 ml): 2,5 ml 1M Tris-Cl, 0,7712 g dithiotreitol, 1 g SDS, 0,05 g bromfenolová modř, 5 ml glycerol, pH 8,0

5 ml 12% gelu pro SDS-PAGE (dělicí): 1,6 ml H₂O; 2,0 ml akrylamidový mix (29,2% akrylamid; 0,8% bis-akrylamid); 1,3 ml 1,5M Tris-Cl (pH 8,8); 0,05 ml 10% (w/v) SDS; 0,05 ml 10% (w/v) amonium persulfát; 0,002 ml TEMED

2 ml 3% gelu pro SDS-PAGE (zaostřovací): 1,4 ml H₂O; 0,33 ml 30% akrylamidový mix (29,2% akryamid, 0,8% bis-akrylamid); 0,25 ml 1M Tris-Cl (pH 6,8); 0,02 ml 10% (w/v) SDS; 0,02 ml 10% (w/v) amonium persulfát; 0,004 ml TEMED

5.1.5 Kultivační média

LB médium: 1% trypton; 0,5% kvasničný extrakt; 1% NaCl; pH 7,7; sterilizace 20 min.; 121 °C

Rotok A pro přípravu LM-M9 (500 ml LM-M9): 3 g Na₂HPO₄; 1,5 g KH₂PO₄; 0,5 g NH₄Cl; 0,25 g NaCl; H₂O do 480 ml; sterilizace 20 min.; 121 °C

Limitní médium M9 (100 ml): 90 ml roztoku A; 100 µl 1M MgSO₄; 10 µl 0,5% (w/v) vitamin B1 (thiamine hydrochloride); 1 ml 4% (w/v) glukosa; 4 ml aminokyselinový mix (L-Lys, L-Phe a L-Thr o konc. 2,5 mg/ml, L-Ile a L-Val o konc. 1,25 mg/ml); 100 µl antibiotikum (1000x koncentrovaný zásobní roztok); 2 ml foto-Leu (60µg/ml); 4 ml L-Met (1,25mg/ ml)

SOC médium: 2% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukosa

5.2 Exprese proteinu 14-3-3zeta v limitním médiu s fotoaktivovatelným analogem leucinu

5.2.1 Transformace plazmidem pET-15b 14-3-3zeta WT

Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *E. Coli* BL-21 DE3 Gold. K 50 µl buněk bylo přidáno 20 ng plazmidu pET-15b 14-3-3zeta WT. Vzorky byly inkubovány na ledu 30 minut. Poté byl proveden teplotní šok trvající 90 sec při 42 °C. Následovalo ochlazení na ledu. Následně bylo ke vzorkům přidáno 500 µl LB média a buňky byly inkubovány 1 hodinu a 30 minut při 37 °C s třepáním. Během 90 minutové inkubace byly připraveny plotny s LB médiem a kanamycinem (finální konc. 50 µg/ml).

Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 5 min při 4515 x g a následně bylo odebráno 400 µl supernatantu. Ve zbytku byly peletky resuspendovány a kultury naneseny na připravené plotny a inkubovány přes noc při 37 °C.

5.2.2 Kultivace v LB médiu

2 µl glycerolové kultury (*E. coli* BL-21 DE3 Gold transformované plazmidem pET-15b 14-3-3zeta WT) byly inokulovány do 3 ml LB média s ampicilinem (finální koncentrace 100 µg/ml) v 15ml zkumavce a inkubovány přes noc při 37 °C a 200 rpm.

100 μ l noční kultury bylo asepticky převedeno do 10 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) v 50ml zkumavce. Roztok byl inkubován při 37 °C a 200 rpm, dokud nebylo dosaženo OD₆₀₀ 0,6 – 0,7 (přibližně 3 hod.).

5.2.3 Produkce v limitním médiu s foto-Leu

Po kultivaci v LB médiu byly buňky převedeny do limitního média M9, které obsahovalo fotoaktivovatelný analog leucinu místo přirozeného leucinu. Kultura byla centrifugována 5 minut při 4220 x g a 4 °C. Získané buněčné pelety byly 2x opláchnuty 20 ml předem vychlazeného sterilního PB a následně resuspendovány v 10 ml LM-M9 s ampicilinem (100 μ g/ml). Následně byly inkubovány 15 minut při 37 °C a 200 rpm.

Po inkubaci byly odebrány 1,4 ml kultury jako kontrola před indukcí exprese. 400 μ l bylo použito na stanovení absorbance při 600 nm a 1 ml byl centrifugován 5 minut při 4515 x g, supernatant byl odstraněn a peletka resuspendována ve 100 μ l sterilní H₂O. Připravený vzorek byl následně analyzován pomocí SDS-PAGE. Zbylá kultura (8,6 ml) byla indukována 125 μ l 0,04M IPTG (finální koncentrace 0,5mM). Protein byl produkován 2 hodiny při 37 °C a 200 rpm. V průběhu inkubace byly odebírány vzorky, a to po 1 hodině a po 2 hodinách, které byly zpracovány stejně jako odběr před indukcí IPTG.

5.3 Exprese proteinu 14-3-3zeta s využitím auxotrofních bakterií

5.3.1 Příprava expresního vektoru

S ohledem na přítomnou rezistenci auxotrofních kmenů s nefunkční biosyntesou leucinu ke kanamycinu a neexistenci genu pro T7 polymerasu v genomu (oproti kmenu *E. coli* BL-21 DE3 Gold) bylo potřeba cDNA kódující protein 14-3-3zeta vyštěpit a izolovat z pET-15b vektoru (kanamycinová rezistence) a následně ho vložit do expresního vektoru s jiným genem majícím rezistenci na kanamycin či ampicilin (vektor nesoucí T7 polymerasu mající rezistenci na ampicilin).

5.3.1.1 Izolace plazmidové DNA

Buňky *E. coli* BL-21 DE3 Gold transformované plazmidem pET-15b 14-3-3zeta WT nebo pACYCDuet-1 byly kultivovány přes noc v LB médiu s příslušným antibiotikem (ampicilin 100 µg/ml nebo chloramfenikol 34 µg/ml).

Buňky byly sklizeny centrifugací a peleta z 10 ml kultury byla resuspendována v 1 ml STE pufru a přenesena do 1,5ml mikrozkušavky. Poté byly vzorky centrifugovány 5 min. při 3900 x g. Následně byl STE pufr odstraněn a peletka resuspendována ve 200 µl GTE pufru. Okamžitě bylo přidáno 300 µl čerstvě připraveného lyzačního pufru, roztok byl promíchán převrácením a inkubován 5 min. při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 200 µl ledově vychlazeného roztoku K-AC. Vzorky byly promíchány převrácením a inkubovány 5 min. na ledu. Poté byly centrifugovány 10 min. při 4 °C a 15000 x g. Supernatant byl opatrně přesunut do čisté mikrozkušavky. Následně byl odečten objem a ke vzorku bylo přidáno stejné množství roztoku fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1, v:v:v) a roztoky byly řádně protřepány pomocí vortexu. Poté byly vzorky centrifugovány 5 min. při 4 °C a 15000 x g. Horní vodná fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky. Extrakce byla zopakována s roztokem chloroformu, abychom odstranili veškeré zbytky fenolu.

K vodné fázi byl přidán stejný objem isopropanolu, roztoky byly zamíchány pomocí vortexu a centrifugovány 30 min. při 4 °C a 15000 x g. Poté byly vzorky promyty vychlazeným roztokem 70% ethanolu (0,5 ml) a centrifugovány 2 min. při 4 °C a 15000 x g. Peletka byla vysušena pod vakuem. K usušeným vzorkům bylo přidáno 100 µl TE pufru a 0,5 µl RNAsy A (zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml) a byly inkubovány 20 min při 50 °C. Poté bylo přidáno 60 µl roztoku PEG a vzorky byly 2x pomalu promíchány špičkou a inkubovány na ledové tříšti 1 hod. Po inkubaci na ledu byly vzorky centrifugovány 20 min. při 4 °C a 15000 x g. Poté byla peletka promyta 150 µl vychlazeného 70% ethanolu. Po promytí byl ethanol odstraněn a peletka DNA vysušena pod vakuem.

K peletce DNA bylo přidáno 20 µl vody a vzorky byly inkubovány do rozpuštění peletky při 50 °C. Po rozpuštění peletky byla určena spektrofotometricky ($A_{260\text{ nm}}$) koncentrace DNA a čistota.

5.3.1.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí NanoVue Spectrophotometr. Byla měřena absorbance při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Z těchto hodnot je možné zjistit čistotu DNA (z poměru A_{260}/A_{280}) a její koncentraci v roztoku (A_{260}). Koncentrace DNA se měří v jednotkách $\mu\text{g/ml}$. Platí, že pokud je poměr A_{260}/A_{280} v rozmezí hodnot 1,7-1,8, podařilo se izolovat čistou DNA. Pokud je tento poměr menší než 1,7, je DNA znečištěna proteiny nebo organickými látkami. V případě, že je tento poměr větší než 1,9, je DNA znečištěna RNA nebo organickými látkami [34].

5.3.1.3 Štěpení DNA

Tab. 1 – Štěpící směs pro jednu reakci

V [μl]	Složka
2	10X BSA
2	10x NEBuffer 3
1	NcoI (10000 U/ml)
0,1	BamHI (100000 U/ml)
5,9	DNA (5 μg)
Doplnění H_2O do 20 μl	

Získaná plazmidová DNA (pET-15b 14-3-3zeta WT, pACYCDuet-1) o požadované čistotě byla štěpena přes noc při 37 °C. Štěpící směs byla namíchána dle Tab. 1.

5.3.1.4 Agarosová elektroforéza

Po štěpení plazmidové DNA byla provedena separace inzertu a vektoru pomocí agarosové elektroforézy. Byl připraven 1% agarosový gel v TAE pufru s přidavkem SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Připravený gel byl umístěn do aparatury a byly na něj naneseny jednotlivé vzorky, ke kterým byla přimíchána nanášecí barva bromfenolová modř, aby mohla být sledována rychlost putování vzorku gelem. Elektroforéza běžela v přítomnosti TAE pufru při 110 V 35 min.

5.3.1.5 Extrakce DNA z gelu

Po separaci štěpené DNA na gelu byly proužky odpovídající velikosti (792bp pro inzert 14-3-3zeta WT, 3971bp pro plazmid pACYCDuet-1) vyříznuty a byla provedena extrakce DNA pomocí komerční sady JET Quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed). Vyříznuté části gelu byly převedeny do předem zvážených mikrokumavek a byla určena jejich hmotnost. Ke každému vzorku byl přidán roztok L1 podle poměru 300 μ l/ 100 mg gelu. Poté byly vzorky inkubovány při 50 °C 15 – 20 min do rozpuštění gelu za občasného míchání.

Vzorky byly naneseny na kolonky umístěné v čistých mikrokumavkách a centrifugovány 1 min. při laboratorní teplotě a 16100 x g. Roztok L1 byl odlit a vzorky zachycené na kolonkách promyty 500 μ l roztoku L2 a opět centrifugovány za stejných podmínek. Roztok L2 byl odlit a vzorky byly znovu centrifugovány. Poté byly kolonky přendány do čistých mikrokumavek, bylo naneseno 30 μ l vody vytemperované na 70 °C a vzorky byly inkubovány 1 min. při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky eluovány centrifugací 2 min. při 16100 x g. Bylo provedeno stanovení koncentrace DNA, jak je uvedeno v kapitole 4.3.1.2.

5.3.1.6 Ligace

Tab. 2 – Ligační směs

V [μ l]	Složka
10	Inzert cDNA (14-3-3zeta WT)
7	Plazmid (pACYCDuet-1)
2	10X T4 DNA Ligase Buffer
1	T4 DNA Ligase (400000U/ml)

Ligační reakce byla připravena dle Tab. 2. Množství DNA bylo vypočítáno tak, aby v reakci bylo přibližně 5x více inzertu oproti plazmidu. Před přidáním enzymu byla směs inkubována 5 min při 45 °C a poté prudce ochlazena na ledu. Pro kontrolu ligace byla namíchána reakce v polovičním objemu, do které byla přidána sterilní voda místo inzertu. Reakční směsi byly inkubovány přes noc při 16 °C.

5.3.1.7 Transformace legační směsí

Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *E. coli* DH5 α . K 50 μ l buněk byly přidány 2 μ l nebo 18 μ l legační směsi nebo 10 μ l kontroly ligace. Takto připravené vzorky byly inkubovány na ledu 30 min.

Poté byl proveden teplotní šok, který trval 90 sec při 42 °C a následné ochlazení na ledu. Následně bylo ke vzorkům přidáno 500 μ l LB média a vzorky byly inkubovány 1 hodinu a 30 minut při 37 °C a 200 rpm.

Během 90 minutové inkubace byly připraveny agarové plotny s LB médiem a chloramfenikolem (finální koncentrace 34 μ g/ml). Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 5 min při 4515 x g a poté bylo odebráno 400 μ l supernatantu. Ve zbylých 100 μ l byla resuspendována buněčná peletka. Kultury byly nanесeny na připravené plotny a inkubovány přes noc při 37 °C.

Vybrané kolonie narostlé na plotně byly kultivovány přes noc v LB médiu s chloramfenikolem (34 μ g/ml) a připravený expresní vektor pACYCDuet-1 14-3-3zeta WT byl izolován z buněk postupem popsáním v kapitole 5.3.1.1.

5.3.2 Produkce v limitním médiu s foto-Leu

5.3.2.1 Transformace kompetentních buněk *E. coli* K-12 Δ Leu dvěma plazmidy současně

Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *E. coli* K-12 Δ Leu, které byly připraveny pomocí roztoku 100mM CaCl₂ podle protokolu Sambrook et al. [35].

K 50 μ l buněk bylo přidáno 20 ng každého ze dvou plazmidů pAR1219 s vloženým inzertem pro T7 RNA polymerasu a pACYCDuet-1 s vloženým inzertem pro expresi 14-3-3zeta WT. Vzorky byly inkubovány na ledu 30 minut. Poté byl proveden teplotní šok trvající 90 sec při 42 °C. Následovalo ochlazení na ledu. Následně bylo ke vzorkům přidáno 500 μ l SOC média a buňky byly inkubovány 1 hodinu a 30 minut při 37 °C s třepáním. Během inkubace byly připraveny plotny s LB médiem a antibiotiky (ampicilin 25 μ g/ml, chloramfenikol 10 μ g/ml).

Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 2 min při 1060 x g a následně bylo odebráno 450 µl supernatantu. Ve zbytku byly peletky resuspendovány a kultury nanесeny na připravené plotny. Vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

5.3.2.2 Produkce v LB médiu

Kolonie z plotny byla převedena do LB média s antibiotiky (ampicilin 100 µg/ml, kanamycin 50 µg/ml, chloramfenikol 34 µg/ml) v 15ml zkumavce. Následovala inkubace přes noc při 37 °C s třepáním.

100 µl noční kultury bylo asepticky převedeno do 10 ml LB média s antibiotiky (ampicilin 100 mg/ml a chloramfenikol 34 mg/ml) v 50ml zkumavce. Roztok byl inkubován při 37 °C a 200 rpm, dokud nebylo dosaženo OD₆₀₀ 0,6 – 0,7 (přibližně 3 hod.).

Po dosažení dostatečné denzity bylo odebráno 0,5 ml kultury, které byly centrifugovány 5 min při 4220 x g, supernatant byl odstraněn a peletka resuspendována v 50 µl sterilní H₂O. Přípravený vzorek byl následně analyzován pomocí SDS-PAGE. Zbytek kultury (9,5 ml) byl indukován 100 µl IPTG (0,05M). Protein byl produkován 3 hodiny při 37 °C s třepáním. V průběhu inkubace byly odebírány vzorky, a to po 1, 2 a 3 hodinách, které byly zpracovány stejně jako odběr před indukcí IPTG.

5.3.2.3 Produkce v limitním médiu s foto-Leu

Produkce byla provedena podle protokolu v kapitole 5.2.2. Bylo použito limitní médium M9, které obsahovalo fotoaktivovatelný analog leucinu místo přirozeného leucinu (finální koncentrace 60 µg/ml) a pro kontrolu limitní médium M9 obsahující přirozený analog leucinu (finální koncentrace 50 µg/ml nebo 250 µg/ml, 500µg/ml a 2,5 mg/ml).

5.4 Sledování míry inkorporace foto-Leu do sekvence 14-3-3zeta pomocí MALDI-TOF MS

5.4.1 Denaturační gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro přípravu vzorků bylo k 20 μ l nesuspendované buněčné kultury v destilované vodě přidáno 5 μ l 5x koncentrovaného redukujícího pufru. Zároveň byl připraven standard molekulových hmotností smísením 4 μ l zásobního roztoku s 12 μ l vody a 4 μ l 5x koncentrovaného redukujícího pufru. Před nanesením na gel byly vzorky 5 minut vařeny.

Na čistém filtračním papíře byla sestavena skla pro elektroforézu. Následně byl připraven 12% malopórový separační (dělicí) gel a ten byl okamžitě po přidání ammonium persulfátu nalit mezi připravená skla. Gel byl převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí gelu byla voda odlita a byl nanesen 3% velkopórový (zaostřovací) gel. Do gelu byl ihned umístěn hřeben. Po ztuhnutí byla skla s gelem umístěna do aparatury naplněné elektrodovým pufrem.

Na takto připravený gel bylo naneseno do každé jamky 20 μ l připravených vzorků. Po aplikaci byla spuštěna elektroforéza, která běžela 1 hod. a 30 min. při 140 V. Po skončení elektroforézy byl gel obarven pomocí CBB a poté odbarven odbarvovacím roztokem.

5.4.2 Příprava vzorku na MS analýzu

Čistým skalpelem na skleněné desce byly vyříznuty z gelu proužky odpovídající velikosti proteinu 14-3-3zeta (28 – 33 kDa). Vyříznuté proužky gelu byly nakrájeny na kousky o přibližné velikosti 1 mm³ a přeneseny do 0,5ml mikrozkušavky.

Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l odbarvovacího roztoku (ACN: 100mM EtMf pufr, pH 8,0 v poměru 1:1 (v/v)) a vzorky byly inkubovány v sondační lázni do odbarvení. Poté byly kousky gelu promyty čistým acetonitrilem, aby došlo k dehydrataci gelu před přidáním dalšího roztoku.

Následně byla provedena modifikace cysteinových zbytků. Prvním krokem byla redukce SH skupin. Ke vzorkům bylo přidáno 50 μ l čerstvě připraveného 30mM

roztoku TCEP ve 100mM EtMf pufru, pH 8,0 a byly inkubovány 20 min. při 70 °C a 700 rpm (Thermomixer, Eppendorf). Po inkubaci byly vzorky opět promyty čistým acetonitrilem a následně k nim bylo přidáno 50 µl 30mM roztoku jodacetamidu ve 100mM EtMf pufru, pH 8,0 a byly inkubovány v temnu 60 min, aby bylo dosaženo alkylace, která zabrání zpětné oxidaci SH skupin a tvorbě disulfidových můstků.

Dále byly provedeny promývací kroky, které slouží k částečnému odstranění solí a nízkomolekulárních kontaminantů. Vzorky byly promyty roztokem acetonitrilu a poté vodou (tento postup byl 2x zopakován) a nakonec 50% roztokem acetonitrilu. Po promytí byly vzorky sušeny 10 min pod vakuem.

5.4.3 Štěpení proteinů v gelu

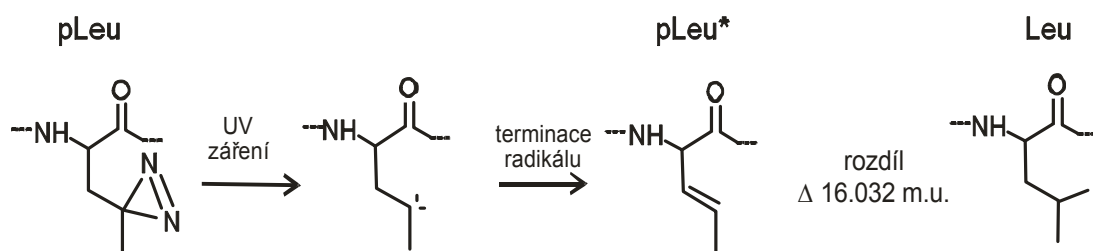
K vysušeným vzorkům bylo přidáno 20 – 25 µl 30x ředěného trypsinu ve 25mM EtMf pufru s 10% ACN, zároveň byla připravena kontrola bez vzorku. Poté byly vzorky inkubovány přes noc při 37 °C.

Po inkubaci byla ke vzorkům přidána směs ACN a TFA (do finální koncentrace 30% ACN a 0,1% TFA), čímž bylo zastaveno enzymové štěpení. Vzorky byly sonikovány 15 minut a 0,4 µl vzorku obsahujícího směs peptidů bylo nanášeno na MALDI terč. Po zaschnutí byly vzorky převrstveny 0,4 µl matrice CCA (5 mg/ml v 50% ACN, 0,1% TFA (v/v)).

5.4.4 MALDI-TOF MS analýza

MS analýza byla provedena pomocí spektrofotometru MALDI-TOF Ultraflex III firmy Bruker Daltonics. Je to metoda, u které dochází k ionizaci laserem za přítomnosti matrice (obr. 4, str. 35) a měří se čas průletu nabitě částice od ionizačního zdroje k detektoru. Vše probíhá ve vakuu. Ze získaného času pak určíme poměr m/z.

V našem případě jsme po trypsinizaci proteinu hledali ve spektru rozdíl 16,032 hmotnostních jednotek, který odpovídá peptidu s inkorporovaným analogem foto-Leu nebo peptidu s přirozeným leucinem.



Obr. 4: Mechanismus fotoaktivace foto-leucinu (pLeu) UV zářením

6 Výsledky

Experimenty v této práci byly prováděny za účelem vytvoření proteinu 14-3-3zeta s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem leucinu místo přirozeného leucinu. Za pomoci síťování působením UV záření a hmotnostní spektrometrie bude možné dále studovat strukturu a protein-proteinové interakce tohoto proteinu.

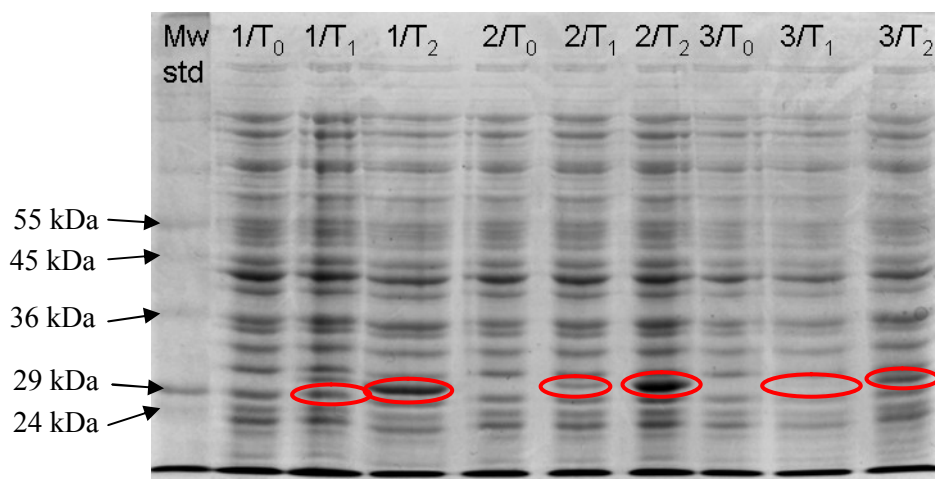
6.1 Exprese proteinu 14-3-3zeta v limitním médiu s fotoaktivovatelným analogem leucinu

6.1.1 Produkce v limitním médiu M9 s foto-Leu

Nejprve byly buňky *E. coli* BL-21 DE3 Gold transformované plazmidem pET-15b 14-3-3zeta WT kultivovány v LB médiu s ampicilinem do OD_{600} 0,6. Následovalo převedení do limitního média M9, které obsahovalo fotoaktivovatelný analog leucinu místo přirozeného leucinu. Na základě strukturní podobnosti foto-Leu a nižší specifitě $Leu-tRNA^{Leu}$ synthasy jsme předpokládali začlenění analogu do sekvence 14-3-3 proteinu v průběhu rekombinantní exprese. Kultura byla centrifugována, získané buněčné pelety opláchnuty PB pufrem a resuspendovány v LM-M9 s ampicilinem. Následovala 15 minutová inkubace. Po inkubaci byla odebrána část kultury před indukci exprese (T_0). Ke zbytku kultury byl přidán IPTG a protein byl produkován dvě hodiny při 37 °C s třepáním. V průběhu byly odebírány vzorky po jedné a po dvou hodinách (T_1 , T_2).

Odebrané vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Na obr. 5 (str. 36) je znázorněn gel, na němž jsou označeny dráhy pro jednotlivé klony v časech 0, 1 a 2

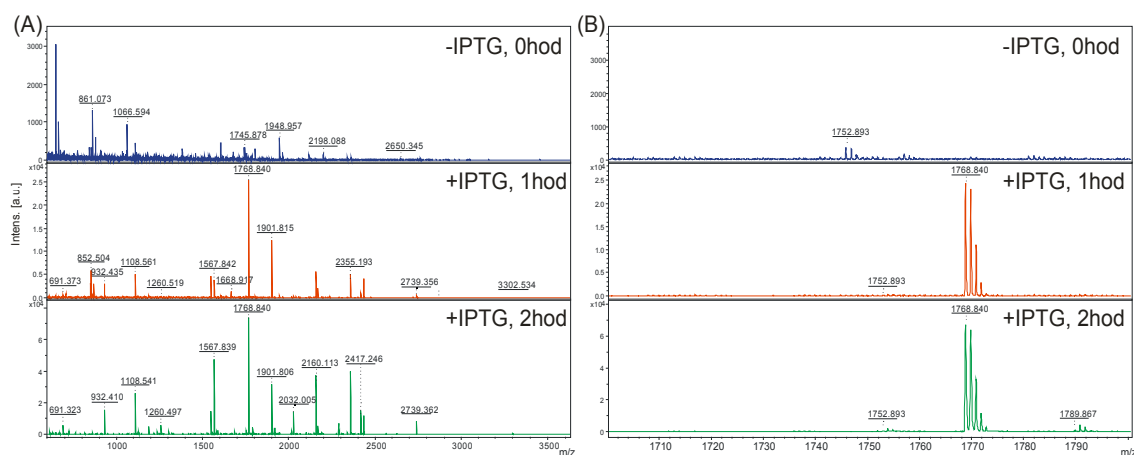
hodiny. Červeně jsou vyznačeny zóny, které odpovídají proteinu 14-3-3zeta. Je vidět, že produkce za těchto podmínek v LM-M9 proběhla úspěšně. Také je možné vidět, že množství produkovaného proteinu s časem roste. V čase T_2 jsou vidět nejsilnější proužky odpovídající největší produkci.



Obr. 5: Produkce 14-3-3zeta v LM-M9 s foto-Leu: Kontrola produkce pomocí SDS-PAGE za použití 10% dělicího a 3% zaostřovacího gelu. Dráhy jsou označeny podle jednotlivých klonů (1-3) v časech 0, 1 a 2 hodiny produkce (T_0 - T_2). Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250, jako standard molekulových hmotností byl použit Marker Sigma Wide Range. Červeně jsou označeny proužky produkovaného proteinu 14-3-3zeta.

6.1.2 MALDI-TOF MS analýza

S využitím hmotnostní spektrometrie bylo sledováno, zda během rekombinantní exprese v *E. coli* BL-21 DE3 Gold došlo k inkorporaci foto-Leu do sekvence studovaného proteinu. Z gelu byly vyříznuty proužky odpovídající velikosti proteinu 14-3-3zeta (28-33 kDa). Proužky gelu byly po odbarvení, provedení modifikace cysteinových zbytků a promytí štěpeny trypsinem přes noc při 37 °C. Získané peptidové směsi byly po extrakci analyzovány MALDI-TOF MS metodou, jejíž výsledky jsou vidět na obr. 6 (str. 37).



Obř. 6: Sledování míry inkorporace foto-Leu do sekvence 14-3-3zeta: Spektra z MALDI-TOF MS analýzy po trypsinizaci vzorku za použití CCA matrice. (A) Celé MS spektrum a (B) detail MS spektra. Hodnota m/z 1768,8 odpovídá peptidu s přirozeným leucinem (sekvence .GSSHHHHHHS SGLVPR.) a hodnota m/z 1752,8 odpovídá peptidu s inkorporovaným foto-Leu.

Tab. 3: Hodnoty m/z a jim odpovídající sekvence proteinu 14-3-3zeta

14-3-3 zeta					
m/z [M+H] ⁺	sekvence	m/z [M+H] ⁺	sekvence	m/z [M+H] ⁺	sekvence
691.349	75-79	1548.688	47-60	2144.108	105-122 pL
932.410	140-146	1567.839		2160.113	105-122
1108.541	178-186	1752.883	1-16 pL	2417.246	103-122
1236.630	177-186	1768.850	I.16	2437.200	47-68
1260.497	fragment	1901.806	31-46	2739.362	fragment
1304.667	123-134	2032.005	fragment	3302.473	213-241

Modřá barva na obrázku značí klon 1 v čase 0 hodin. Červeně je označen klon 1 v čase 1 hodina a zeleně klon 1 v čase 2 hodiny. Na obrázku 6A jsou znázorněna MS spektra v rozsahu 600-3600 m/z . Zde je vidět, že již ve vzorku po 1 hodině inkubace dochází k expresi proteinu 14-3-3zeta. V následném vzorku (2 hodiny) roste intenzita signálů m/z peptidů tohoto proteinu (tab. 3). Dále na obrázku 6B jsou znázorněny pouze vybrané rozsahy m/z části spektra, tak abychom mohli sledovat, zda došlo k inkorporaci foto-Leu do sekvence 14-3-3zeta na základě rozdílu 16,032 hmotnostních jednotek. Hodnota m/z 1768,8 značí signály, které odpovídají peptidu, v jehož sekvenci je přirozený leucin. Hodnota m/z 1752,8 značí místa, kde by měly být signály odpovídající peptidu s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem leucinu. Ve spektrech vzorků

v časech 1 hodina a 2 hodiny jsou vidět intenzivní signály o m/z 1768,8 oproti kontrole v čase 0 hodin (před indukci exprese). Signály o m/z 1752,8 byly detekovány s velice nízkou intenzitou, což značí, že za zvolených podmínek k požadované inkorporaci foto-Leu dochází minimálně.

S ohledem na nízkou inkorporaci fotoanalogu Leu do sekvence 14-3-3zeta exprimovaného proteinu lze předpokládat, že v buňkách je dostatek přirozeného leucinu, který kompetuje s fotoanalogem o aktivní centrum Leu-tRNA^{Leu} synthasy. Proto je třeba snížit biosynthesu a výslednou koncentraci leucinu v buňkách použitím auxotrofního kmene s nefunkční biosyntetickou dráhou pro Leu.

6.2 Exprese proteinu 14-3-3zeta s využitím auxotrofních bakterií

6.2.1 Příprava expresního systému v buňkách *E. coli* K-12 Δ Leu

Nejprve bylo nutné vložit DNA kódující protein 14-3-3zeta do vhodného expresního vektoru, který může být použit k transformaci buněk *E. coli* K-12 Δ Leu společně s plazmidem pAR1219 pro produkci T7 RNA polymerasy. Auxotrofní bakterie na rozdíl od *E. coli* BL-21 DE3 Gold neobsahují gen pro T7 RNA polymerasu, která je nezbytná pro indukci exprese pomocí IPTG. Vzhledem k tomu, že *E. coli* K-12 Δ Leu jsou rezistentní na kanamycin a plazmid pAR1219 nese rezistenci na ampicilin a obsahuje replikon ColE1, byl pro přípravu expresního vektoru vybrán komerčně dostupný plazmid pACYCDuet-1, který nese rezistenci na chloramfenikol a obsahuje replikon p15A, který je kompatibilní s replikonem ColE1.

Buňky *E. coli* BL-21 DE3 Gold transformované plazmidem pET-15b 14-3-3zeta WT nebo pACYCDuet-1 byly kultivovány v LB médiu s příslušným antibiotikem (ampicilin nebo chloramfenikol). Po kultivaci byly buňky sklizeny a podle protokolu v kapitole 5.3.1.1 byla připravena plazmidová DNA a stanovena její koncentrace a čistota. Následně byla získaná plazmidová DNA štěpena restričními endonukleasami NcoI a BamHI a pomocí agarosové elektroforézy byla provedena separace inzertu a vektoru. Po separaci byly proužky gelu odpovídající velikosti inzertu 14-3-3zeta (792bp) a štěpenému plazmidu pACYCDuet-1 (3971bp) vyříznuty a byla provedena extrakce DNA z gelu pomocí komerční sady JET Quick Gel Extraction Spin Kit. Extrahovaná DNA byla ligována za přítomnosti T4 DNA Ligasy a poté transformována

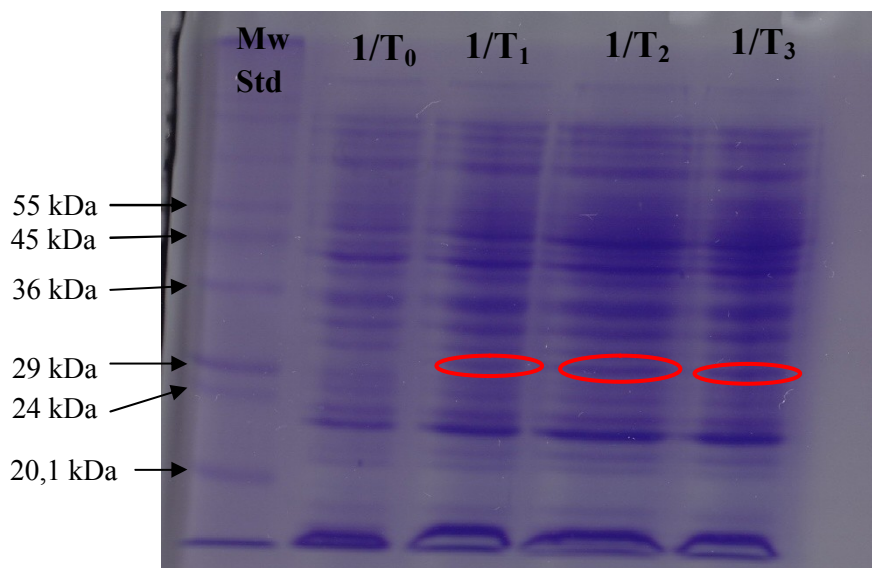
do buněk *E. coli* DH5 α . Z kolonií narostlých na plotnách byla izolována plazmidová DNA a tak byl získán plazmid pACYCDuet-1 s vloženým inzertem pro expresi 14-3-3zeta (pACYCDuet-1 14-3-3zeta).

Do buněk *E. coli* K-12 s nefunkční dráhou pro syntézu leucinu byl vložen připravený expresní vektor pACYCDuet-1 14-3-3zeta a zároveň komerčně dostupný plazmid pAR1219 s inzertem pro T7 RNA polymerasu. Produkce T7 RNA polymerasy je pod kontrolou lac promotoru. Pomocí IPTG tak bude následně možné vyvolat syntézu T7 RNA polymerasy, která specificky nasedá na T7 promotor a spouští produkci proteinu 14-3-3zeta, který se nachází právě za tímto promotorem. Transformace byla provedena podle protokolu v kapitole 5.3.2.1. Po úspěšné transformaci byly selektovány klony nesoucí oba plazmidy a byl získán expresní systém v buňkách *E. coli* K-12 Δ Leu.

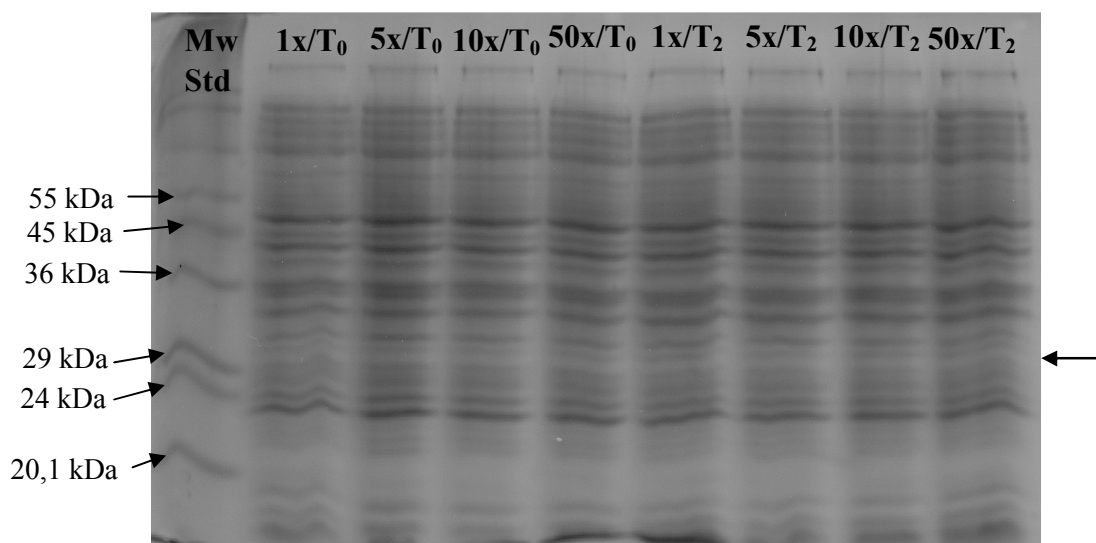
6.2.2 Optimalizace produkce v buňkách *E. coli* K-12 Δ Leu

Následovala produkce v LB médiu s antibiotiky (ampicilin, kanamycin a chloramfenikol), která sloužila k ověření funkce připraveného expresního systému. Produkce byla provedena podle protokolu v kapitole 5.3.2.2. Získané vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Na obr. 7 (str. 40) je znázorněn gel pro náhodně vybraný klon v časech 0, 1, 2 a 3 hodiny produkce. Červeně jsou označeny zóny, které odpovídají proteinu 14-3-3zeta. Na obrázku je vidět, že protein se v LB médiu produkuje. Množství produkovaného proteinu s časem roste. V čase T₃ je vidět nejsilnější proužek.

Poté co byla ověřena produkce v LB médiu, byla vyzkoušena produkce v LM-M9, které obsahovalo pouze foto-Leu a pro kontrolu také v LM-M9, které obsahovalo přirozený leucin. Produkce ani v jedné z těchto dvou podmínek neproběhla (gel z této produkce zde není ukázán), a tak následovala optimalizace. Pro optimalizaci bylo použito LM-M9 s různými koncentracemi přirozeného leucinu. Produkce byla provedena podle protokolu v kapitole 5.2.2. Na obr. 8 (str. 40) je znázorněn gel z této produkce. Šipka vpravo ukazuje, kde by se měl nacházet proužek odpovídající velikosti proteinu 14-3-3zeta pro produkci při původní (1x), 5x, 10x a 50x zvýšené koncentraci přirozeného leucinu v časech 0 a 2 hodiny. Na obrázku je vidět, že k produkci nedošlo a to znamená, že ani tento optimalizační krok k cíli nevedl.



Obr. 7: Produkce 14-3-3zeta v buňkách *E. Coli* K-12 Δ Leu v LB médiu: Kontrola produkce pomocí SDS-PAGE za použití 12% dělicího a 3% zaostřovacího gelu. 1/T₀-T₃ značí klon 1 v časech 0, 1, 2 a 3 hodiny produkce. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant blue R-250, jako standard molekulových hmotností byl použit Marker Sigma Wide Range. Červeně jsou označeny proužky produkovaného proteinu 14-3-3zeta.



Obr. 8: Optimalizace produkce 14-3-3zeta v buňkách *E. Coli* K-12 Δ Leu v LM-M9: Kontrola produkce pomocí SDS-PAGE za použití 12% dělicího a 3% zaostřovacího gelu. Dráhy jsou označeny podle koncentrace leucinu (1x-50x) v časech 0 a 2 hodiny produkce (T₀ a T₂). Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant blue R-250, jako standard molekulových hmotností byl použit Marker Sigma Wide Range. Šipka vpravo ukazuje polohu proteinu 14-3-3zeta.

7 Diskuse

Proteiny 14-3-3 se vyskytují ve všech eukaryotických buňkách a to ve formě homo či heterodimerních katalyticky aktivních komplexů [3, 7, 8]. U těchto proteinů lze pozorovat vysokou sekvenční identitu, i když se jedná o geneticky rozmanitou rodinu [7]. V lidském organismu se vyskytují hlavně v centrální nervové soustavě, ale najdeme je také v epitelových buňkách.

Studium těchto proteinů ukázalo, že jsou schopny vázat řadu strukturně i funkčně odlišných ligandů [5, 13]. Díky tomu se podílejí na řadě buněčných dějů, ale jsou i příčinou mnoha neuropatologických procesů. Mechanismus jejich účinku zatím není detailně objasněn. Proto je studiu jejich struktury a funkčního mechanismu věnována velká pozornost.

Tato práce je zaměřena na vytvoření metodického nástroje pro studium strukturně funkčního mechanismu proteinu 14-3-3. Cílem je vytvořit rekombinantní protein 14-3-3zeta s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem leucinu. Ten umožní vznik fotoaktivovatelného kovalentního zesílení (foto „cross-linků“), díky nimž dojde k fixaci protein-proteinové interakce s následnou detekcí MS. Podnět k této práci vzešel z již úspěšně provedeného pokusu o inkorporaci foto-Met do sekvence 14-3-3zeta. Pro přípravu proteinu s foto-Leu byl tedy zvolen stejný protokol jako v případě foto-Met [36].

Nejprve byly kultivovány buňky *E. coli* BL-21 DE3 Gold transformované plazmidem pro produkci proteinu 14-3-3zeta v LB médiu. Po převedení do LM-M9 s foto-Leu byla indukována exprese pomocí IPTG a protein byl produkován 2 hodiny. Pomocí SDS-PAGE bylo prokázáno, že k produkci za těchto podmínek dochází bez větších problémů. Následovala MALDI-TOF MS analýza. Získaná spektra ukázala, že k inkorporaci foto-Leu do sekvence 14-3-3zeta dochází ve velmi malé míře.

Tento neúspěch může mít mnoho různých vysvětlení. Pokud budeme srovnávat úspěšnou inkorporaci foto-Met s neúspěchem při inkorporaci foto-Leu, musíme se dívat hlavně na výskyt methioninů a leucinů v sekvenci 14-3-3zeta. V molekule proteinu je totiž mnohem více leucinů (25) než methioninů (7) a to může být hlavním důvodem neúspěchu. Další důvodem proč bakterie během rekombinantní exprese neinkorporují

foto-Leu do sekvence proteinu může být vyšší specifita aminoacyl tRNA synthetasy pro leucin na rozdíl od metioninu. Navíc pravděpodobně v buňkách zůstává dostatečné množství leucinu, které úspěšně kompetuje s fotoanalogem o aktivní centrum Leu-tRNA^{Leu} synthasy a tak dochází k malé míře inkorporace tohoto fotoanalogu. V literatuře se uvádí, že analogy aminokyselin (AMK) mají 40-5000x vyšší K_D (disociační konstantu) než vlastní AMK [37].

Na základě neúspěchu jsme tedy začali přemýšlet o jiné variantě jak získat protein 14-3-3zeta s inkorporovaným foto-Leu a proto se naše pozornost obrátila k auxotrofním kmenům bakterie *E. coli*. Bylo však potřeba připravit expresní systém, protože auxotrofní kmeny postrádají T7 RNA polymerasu. Pro expresi byly použity buňky *E. coli* K-12 s nefunkční dráhou pro syntézu leucinu, do nichž byly vloženy plazmidy pAR1219 pro syntézu T7 RNA polymerasy a pACYCDuet-1 s vloženým inzertem pro expresi 14-3-3zeta.

Po úspěšné přípravě expresního systému následoval stejný postup jako s buňkami *E. coli* BL-21 DE3 Gold. Nejprve byla provedena produkce v LB médiu, abychom zjistili, zda jsou auxotrofní buňky schopné produkce tohoto proteinu. SDS-PAGE ukázala, že tyto podmínky buňkám vyhovují a k produkci proteinu opravdu dochází.

Následovala tedy produkce v LM-M9 s foto-Leu a pro kontrolu také v LM-M9 s přirozeným leucinem. Tato produkce však proběhla bez úspěchu. Příčinou neúspěchu je pravděpodobně prostředí, ve kterém mělo k produkci docházet. Jelikož nedošlo k produkci ani v LM-M9 s přirozeným leucinem, domnívali jsme se, že je potřeba zvýšit jeho koncentraci.

Za účelem optimalizace produkce v LM-M9 jsme se rozhodli vyzkoušet produkci za 5x, 10x a 50x zvýšené koncentrace leucinu. SDS-PAGE však odhalila, že ani tento optimalizační krok nebyl úspěšný. To naznačuje, že ani při zvýšení koncentrace leucinu nebudou podmínky dostatečně vhodné, aby auxotrofní buňky dokázali produkovat tento protein. Je tedy potřeba hledat další způsoby optimalizace, abychom získali protein s inkorporovaným foto-Leu a mohli pokračovat ve studiu jeho struktury a interakcí za pomoci nové síťovací techniky v kombinaci s MS.

Jako možná cesta se nabízí optimalizace poměru AMK:fotoanalog AMK při expresi proteinu amelogeninu v *E. coli* BL-21 DE3 jak ilustruje bakalářská práce Jany Štrohalmové [38].

8 Závěr

Podářila se produkce proteinu 14-3-3zeta v buňkách *E. coli* BL-21 DE3 Gold v prostředí limitního média M9, které obsahovalo fotoaktivovatelný analog leucinu místo přirozeného leucinu. Výsledky MALDI-TOF MS analýzy však ukázaly, že za daných podmínek dochází k inkorporaci foto-Leu do sekvence 14-3-3zeta ve velmi nízké míře.

Na základě předchozího neúspěchu byl úspěšně zkonstruován expresní vektor pACYCDuet-1 14-3-3zeta, který byl společně s plazmidem pro expresi T7 RNA polymerasy vnesen do buněk *E. coli* K-12 Δ Leu s nefunkční dráhou pro syntézu leucinu.

Funkce připraveného expresního systému byla ověřena produkcí 14-3-3zeta v LB médiu. K produkci proteinu v limitním médiu M9 s foto-Leu však nedošlo a to ani poté, co byl foto-Leu nahrazen přirozeným leucinem. Optimalizační kroky s různými koncentracemi Leu byly rovněž neúspěšné.

9 Seznam literatury

- [1] **Muslin A.J., Tanner W.J., Allen M.P., Shaw S.A.** Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell press*. March 1996, vol. 84, p. 889-897. ISSN 0092-8674.
- [2] **Mhaweck P.** 14-3-3 proteins - an update. *Cell research*. April 2005, 15(4), p. 228-236.
- [3] **Morrison K.D.** The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol*. January 2009, 19(1), p. 16-23.
- [4] **Dougherty K.M., Morrison K.D.** Unlocking the code of 14-3-3. *J.Cell Sci*. 2004, 117(10), p. 1875-1884.
- [5] **Shimada T., Fournier E.A., Yamagata K.** Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *BioMed research international*. October 2013, vol. 2013, 11 pages. ID 564534.
- [6] **Aitken A.** 14-3-3 proteins: A historic overview. *Semin Cancer Biol*. 2006, 16(3), p. 162-172.
- [7] **Yaffe B. Michael.** How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*. 2002, vol. 513, p. 53-57. ISSN 0014-5793.
- [8] **Yaffe B.M., Rittinger K., Volinia S., Aitken A., et al.** The structural basis for 14-3-3: Phosphopeptide binding specificity. *Cell press*. December 1997, vol. 91, p. 961-971. ISSN 0092-8674.
- [9] **Satoh J., Yamamura T., Arima K.** The 14-3-3 protein ϵ isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *AJP*. August 2004, vol. 165, no. 2, p. 577-592.

- [10] **Igarashi D., Ishida S., Fukazawa J., Takahashi Y.** 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant cell*. November 2001, vol. 13, p. 2483-2497.
- [11] **Obšil T., Obšilová V.** Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in cell*. 2011, 22, p. 663-672.
- [12] **Ferl J.R., Manak S.M., Reyes F.M.** The 14-3-3s. *BioMed Central*. June 2002, 3(7), p. 3010.1-3010.7. ISSN 1465-6914.
- [13] **Porter W.G., Khuri R.F., Fu H.** Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Seminars in cancer biology*. 2006, vol. 16, p. 193-202.
- [14] **Řežábková L., Kacířová M., Šulc M., Herman P., Večeř J., Štěpánek M., Obšilová V., Obšil T.** Structural modulation of phosphoducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *Biophysical journal*. November 2012, vol. 103, no. 9, p. 1960-1969. ISSN 0006-3495.
- [15] **Masters C.S., Fu H.** 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J.Biol.Chem.* November 2001, vol. 276, no. 48, p. 45193-45200.
- [16] **Křupka M.** Příprava a purifikace rekombinačních proteinů. Olomouc, 2011. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav imunologie.
- [17] **Kodíček M.** Bílkoviny rekombinantní. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [citováno 2014-04-15]. Dostupný z: [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=bilkoviny_rekombinantni](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=bilkoviny_rekombinantni)
- [18] Internetový portál, [on/line]. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Expres-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf>
- [19] **Montesino R., Toledo R.J.** The mammary gland: bioreaktor for the production of recombinant proteins. *Biotechnología Aplicada*. December 2006, vol. 23, no. 4, p. 279-286.

- [20] **Weigl E., Raška M., et al.** Škola molekulárních biotechnologií: Profession. Brno: Tribun EU, spol. s r.o., 2010. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: www.knihovnicka.cz
- [21] **Zouhar J.** Afinitní chromatografie proteinu na vázaných kovových iontech. Chem. Listy. 1999, vol. 93, p. 683-685.
- [22] **Kolektiv autorů.** Proteiny, peptidy a aminokyseliny. Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu. 2003. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: <http://ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-01.pdf>
- [23] **Ducháček V.** Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-617-6.
- [24] **Goňa T.** Optimalizace síťovací reakce proteinových hydrolyzátů pro přípravu termo-izolačních panelů z recyklovaného plastu. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta aplikované informatiky.
- [25] **Řápková R., Fusek M., Pouzar V., Drašar P.** XII Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků. Chem. Listy. 2012, vol. 106, p. 413-454.
- [26] **Kapoor M.** How to cross-link proteins. Cellular, molecular and microbial biology division. University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: <http://www.fgsc.net/neurosporaprotocols/How%20to%20cross-link%20proteins.pdf>
- [27] **Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.** Základní analytická chemie. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0553-8
- [28] Internetový portál, [on/line]. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php
- [29] **Polášek M.** Hmotnostní spektrometrie. Akademie věd ČR, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Praha. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: www.njh.cz/seminare/13569848/1270588

- [30] **Marvin F.L., Roberts A.M., Fay B.L.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*. August 2003, vol. 337, p. 11-21. ISSN 0009-8981.
- [31] **Jurinke Ch., Oeth P., Dirk van den Boom.** MALDI-TOF mass spectrometry. Humana Press Inc. 2004, vol. 26, no. 2, p. 147-163. ISSN 1073-6085.
- [32] Internetový portál, [on-line]. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/MALDI-TOF
- [33] Internetový portál, [on/line]. [citováno 2014-04-22]. Dostupný z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/kurzy/KU1-1_2013_pr1.pdf
- [34] **Navrátil M., Uvírová L., Nádvorník P., Kubaláková M., Klukáčková J.** Základní praktická cvičení z molekulární biologie. Olomouc, 2004. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta.
- [35] **Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. ColdSpringHarborLaboratoryPress. ColdSpringHarbor 1989
- [36] **Ptáčková R., Ječmen T., Novák P., Hudeček J., Stiborová M., Šulc M.** The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: The combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, vol. 15, p. 9224-9241. ISSN 1422-0067.
- [37] **Kiick K. L., Tirrell D. A.** *Tetrahedron*. November 2000, vol. 56, p. 9487-9493.
- [38] **Štrohalmová J.** Optimalizace exprese fotoafinitních proteinových nanosond lidských strukturních proteinů zubní skloviny. Bakalářská práce, katedra Biochemie PřF UK, 2014.