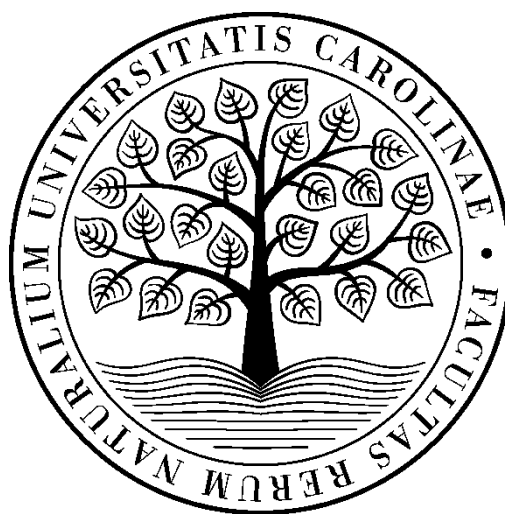


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Nicola Koupilová

Příprava lidské Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinasy kinasy 2 fosforylované na Ser100 a Ser511

Preparation of human Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 phosphorylated at Ser100 and Ser511

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha, 2019

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, 27.05.2019

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za trpělivost a cenné rady při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Veronice Obšilové a ostatním kolegům, kteří mi vždy ochotně poradili s jakýmkoliv problémem. Dále chci také poděkovat Olivii Petrvalské, která provedla analytickou ultracentrifugaci, a měla trpělivost se všemi mými 42 000 otázkami a RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D za provedení MS analýzy mých vzorků.

Dále bych chtěla poděkovat osobě, díky které jsem se rozhodla studovat obor obsahující matematiku, fyziku a chemii, paní Ing. Zdeňce Brandové. Tímto jí děkuji za její ochotu, vlídná slova a ukázání jedné z mnoha cest.

Na závěr děkuji své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Ca²⁺/kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasy (CaMKK) jsou serin/threonin kinasy, které se účastní vápníkové signální dráhy, přičemž u savců byly popsány dvě isoformy CaMKK, CaMKK1 a CaMKK2. Při zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů dochází k aktivaci CaMKK prostřednictvím vazby komplexu Ca²⁺/kalmodulin na C-koncový segment CaMKK, což uvolní autoinhibici přerušением interakcí autoinhibičního segmentu s aktivním centrem kinasy. Aktivované CaMKK následně fosforylují a aktivují proteinkinasy CaMK1 a CaMK4 a v případě CaMKK2 i AMPK.

Aktivita CaMKK je dále regulována prostřednictvím fosforylace cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA). Tato fosforylace vytvoří dva vazebné motivy, které jsou rozpoznány regulačními proteiny 14-3-3. Předchozí studie ukázaly, že protein 14-3-3 udržuje fosforylovanou CaMKK1 v inhibovaném stavu tím, že blokuje defosforylaci inhibičního fosforylačního místa. Předpokládá se, že i CaMKK2 by mohla být regulována podobným způsobem. Nicméně úloha vazby proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK2 je nejasná. Pro studium tohoto komplexu je však nutné připravit rekombinantní CaMKK2, která bude plně fosforylována na obou 14-3-3 vazebných motivech.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat protokol pro fosforylaci lidské CaMKK2 (rezidua 93-517) obsahující pouze dvě fosforylační místa, Ser100 a Ser511, a následně charakterizovat komplexy CaMKK2:protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C a CaMKK2:CaM:protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C pomocí analytické ultracentrifugace.

Pro optimalizaci fosforylace CaMKK2-S100,S511 prostřednictvím PKA byla použita hmotnostní spektrometrie a phos-tag SDS-PAGE. Pomocí analytické ultracentrifugace bylo zjištěno, že se komplex CaMKK2:protein 14-3-3 tvoří se stechiometrickým poměrem 1:2 a se zdánlivou disociační konstantou v mikromolární oblasti. Pro komplex CaMKK2:CaM:protein 14-3-3 γ byl stanoven stechiometrický poměr 1:1:2.

Abstract

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKK) are serine/threonine kinases involved in the calcium signaling pathway. Two CaMKK isoforms were described in mammals: CaMKK1 and CaMKK2. The increase in calcium concentrations induces Ca²⁺/CaM binding to the C-terminal segment of CaMKK, thus relieving autoinhibition by disrupting the interaction between the autoinhibitory segment and the kinase domain. Active CaMKK then phosphorylate and activate their downstream kinases CaMK1 and CaMK4, and in the case of CaMKK2 also AMPK.

The activity of CaMKK is also regulated by phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase A (PKA). This phosphorylation creates two binding motifs recognized by the regulatory 14-3-3 proteins. Previous studies have suggested that the 14-3-3 protein keeps phosphorylated CaMKK1 in the inhibited state by blocking the dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site and it has been speculated that CaMKK2 is regulated in a similar manner. However, the role of 14-3-3 protein in the regulation of CaMKK2 is unclear. In order to study this protein complex, it is necessary to prepare recombinant CaMKK2 fully phosphorylated at both 14-3-3 binding motifs.

The main aim of this bachelor thesis was to optimize the protocol for the phosphorylation of human CaMKK2 (residues 93-517) containing only two phosphorylation sites, Ser100 and Ser511, and characterize the CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C and CaMKK2: CaM: protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C complexes by analytical ultracentrifugation.

Mass spectrometry and phos-tag SDS-PAGE were used to optimize the phosphorylation of CaMKK2-S100, S511 by PKA. Analytical ultracentrifugation revealed that doubly phosphorylated CaMKK2 forms with the 14-3-3 protein complex with molar stoichiometry 1:2 and dissociation constant in micromolar range. The CaMKK2:CaM:14-3-3 protein complex is formed with molar stoichiometry 1:1:2.

Obsah

1	LITERÁRNÍ ÚVOD	9
1.1	Fosforylace a proteinkinasy	9
1.2	Ca ²⁺ signální dráha	12
1.3	CaMKK2	13
1.3.1	<i>Struktura a vlastnost CaMKK2</i>	14
1.3.2	<i>Biologická funkce</i>	15
1.3.3	<i>Regulace</i>	15
1.4	Protein 14-3-3	16
2	CÍLE PRÁCE	18
3	CHEMIKÁLIE	19
4	PŘÍSTROJE	20
5	METODY	21
5.1	Zásobní roztoky	21
5.2	Složení gelů	22
5.3	Expresa a purifikace TEV proteasy	23
5.3.1	<i>Expresa proteinu a lyzace buněk</i>	23
5.3.2	<i>Sonikace</i>	23
5.3.3	<i>Niklová chelatační chromatografie a dialýza</i>	23
5.3.4	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	24
5.4	Expresa a purifikace cAMP-dependentní protein kinasy A (PKA)	25
5.4.1	<i>Expresa proteinu a lyzace buněk</i>	25
5.4.2	<i>Sonikace a niklová chelatační chromatografie</i>	25
5.4.3	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	26
5.4.4	<i>Stanovení kinasové aktivity proteinkinasy A pomocí sady ADP-GLO™</i>	27
5.5	Expresa a purifikace kalmodulinu (CaM)	27
5.5.1	<i>Expresa proteinu a lyzace buněk</i>	27
5.5.2	<i>Sonikace</i>	28
5.5.3	<i>Chromatografie založená na hydrofobních interakcích</i>	28
5.5.4	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	29
5.6	Expresa a purifikace proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta C$	29
5.6.1	<i>Expresa proteinu a lyzace buněk</i>	29
5.6.2	<i>Sonikace</i>	30

5.6.3	<i>Niklová chelatační chromatografie a štěpení TEV proteasou</i>	30
5.6.4	<i>Aniontově výměnná chromatografie</i>	31
5.6.5	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	31
5.7	<i>Expres a purifikace CaMKK2-S100,S511</i>	32
5.7.1	<i>Expres proteinu a lyzace buněk</i>	32
5.7.2	<i>Sonikace</i>	32
5.7.3	<i>Niklová chelatační chromatografie a štěpení pomocí TEV proteasy</i>	32
5.7.4	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	33
5.7.5	<i>Fosforylace</i>	33
5.7.5.1	<i>Phos-tag gel</i>	34
5.7.5.2	<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	34
5.7.6	<i>Gelová permeační chromatografie po fosforylaci</i>	35
5.7.7	<i>Analytická ultracentrifugace (AUC)</i>	35
6	VÝSLEDKY	37
6.1	<i>Purifikace TEV proteasy</i>	37
6.2	<i>Purifikace cAMP-dependentní proteinkinasy A</i>	39
6.2.1	<i>Meření kinasové aktivity purifikované PKA</i>	40
6.3	<i>Purifikace kalmodulinu</i>	42
6.4	<i>Purifikace proteinu 14-3-3γΔC</i>	43
6.5	<i>Purifikace CaMKK2-S100,S511 a následná fosforylace</i>	46
6.5.1	<i>Optimalizace fosforylace pro CaMKK2-S100S511</i>	49
6.5.2	<i>Fosforylace CaMKK2-S100,S511 závislá na době a koncentrace CaMKK2</i>	52
6.5.3	<i>Fosforylace CaMKK2-S100S511 v přítomnosti CaM</i>	53
6.5.4	<i>Fosforylace CaMKK2-S100,S511 v přítomnosti CaM pomocí DAPK2</i>	53
6.5.5	<i>Fosforylace CaMKK2 D330A</i>	55
6.6	<i>Analytická ultracentrifugace</i>	55
7	DISKUZE	57
8	ZÁVĚR	59
9	LITERATURA	60

Seznam zkratek

AI medium	autoindukční medium
ATP	adenosin-5'-trifosfát
APS	peroxodisíran amonný
CaM.....	kalmodulin
CaMK.....	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní proteinkinasa
CaMKK.....	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa
CBD	kalmodulin vazebná doména
DTT	4-dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
H/D výměna	Vodík-deuteriová výměna
IPTG.....	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB medium	médium podle Luria-Bertani
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MS.....	hmotnostní spektrometrie
OD.....	optická hustota
PBS.....	fosfátový pufr
PKA.....	cAMP-dependentní proteinkinasa A
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Rpm.....	otáčky za minutu
SAXS	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE.....	Elektroforéza s SDS polyakrylamidovým gelem
TCEP.....	Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED.....	tetramethylethylendiamin
TEV proteasa.....	Tobacco etch virus proteasa
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
βME.....	β-merkptoethanol

1 Literární úvod

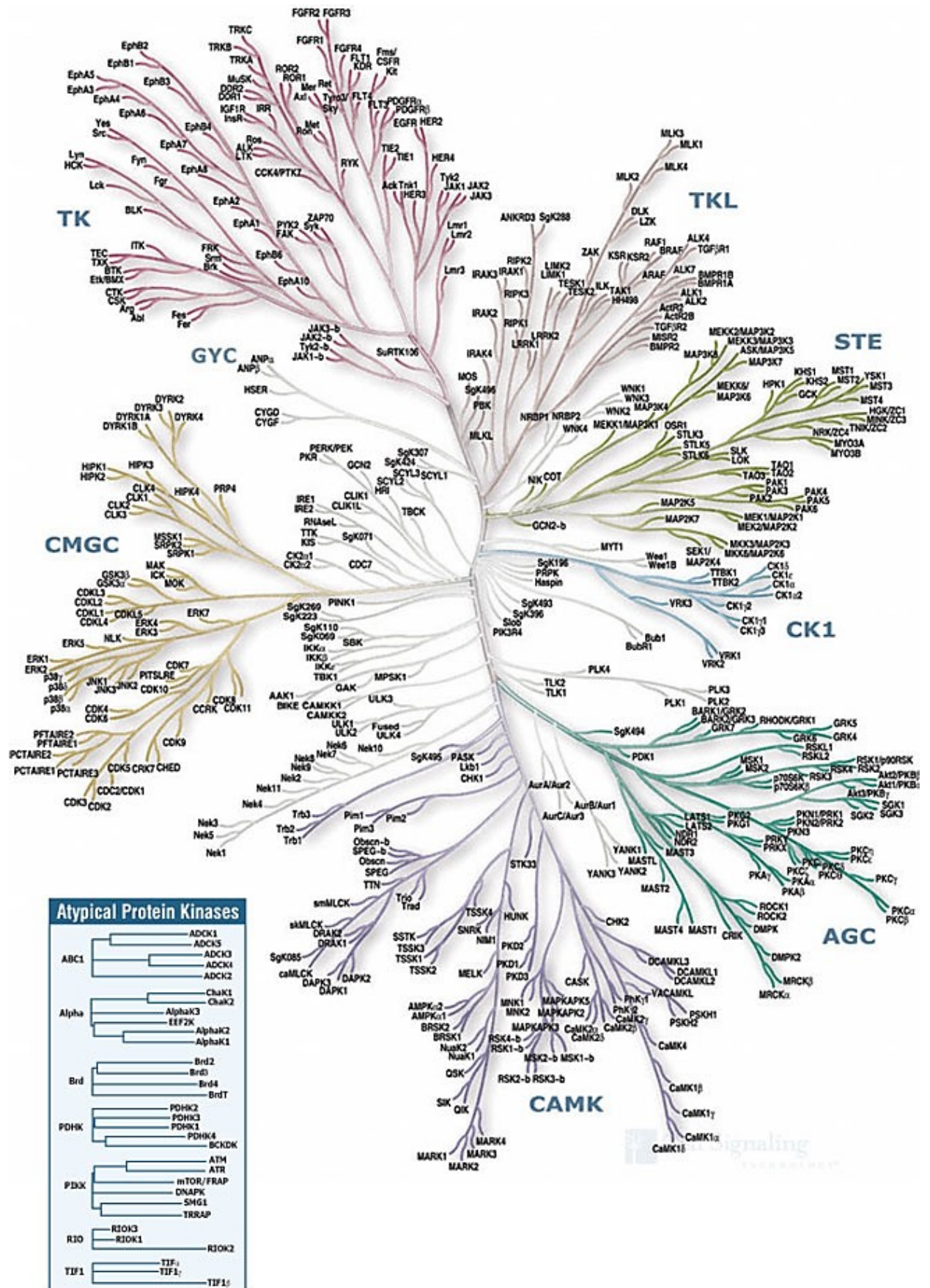
1.1 Fosforylace a proteinkinasy

Fosforylace je děj, při kterém se přenáší fosfátová skupina na substrát. V buňce probíhá fosforylace bílkovin v průběhu posttranslačních modifikací na postranním řetězci aminokyselin. Je to významná modifikace, která způsobuje změnu náboje postranního řetězce. Fosforylací tyrosinu, serinu a threoninu vznikají fosfoestery. Naopak fosforylace postranních řetězců histidinu, lysinu nebo argininu je méně běžná.

Fosforylace a defosforylace jsou významné regulační mechanismy pro kontrolu aktivity proteinů. Některé proteiny při fosforylaci mění konformaci a jsou biologicky aktivnější, jiné proteiny mohou být naopak aktivnější po odštěpení fosfátové skupiny [1]. Za tyto regulační mechanismy jsou zodpovědné fosfatasy a kinasy. Fosfatasy využívají hydrolytické štěpení esterové vazby a patří do skupiny hydrolas. Proteinkinasy jsou enzymy, které přenášejí γ fosfátovou skupinu z ATP/GTP na substrát [2]. Patří do skupiny transferas, proto je můžeme najít pod E.C. 2.7.-.-. Kinasy jsou zodpovědné za různé procesy v buňce, od ovlivnění transkripce a růstu buňky, přes diferenciaci buňky, regulaci metabolismu až po apoptosu [3, 4]. Význam mají také v buněčné signalizaci a na správném udržení homeostasy. Při mutaci a špatné regulaci kinas dochází k patofyziologickým onemocněním jako je diabetes, rakovina, neurodegenerativní vývoj nebo imunitní onemocnění. Proto jsou kinasy a mechanismy jejich regulace intenzivně studovány [5].

Lidský kinom, obsahuje 518 proteinkinasy (viz Obrázku 1.1 na straně 10) a přibližně 20 lipidkinasy. Z 518 proteinkinasy 478 kinasy obsahuje eukaryotickou kinasovou doménu. Tyto kinasy se značí jako ePK (eukaryotické proteinkinasy). Zbylých 40 kinasy je značených jako aPK (atypické proteinkinasy). Pro ePK existuje osm hlavních skupin, rozdělených podle sekvenční podobnosti kinasové domény. 1.TK (tyrosin kinasy), 2. TKL (tyrosine kinase-like), 3.STE (homolog kvasinkových kinasy Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20), 4. CK1 (kasein kinasy 1), 5. AGC (proteinkinasy A, proteinkinasy G, a proteinkinasy C), 6. CAMK (Ca²⁺/kalmodulin-dependentní kinasy), 7.CMGC (Cyclin-dependent kinase, Mitogen-activated proteinkinase (MAPK), Glycogen synthase kinase (GSK), Cdk-like kinasy) a 8.RGC (Receptor Guanylate Cyclases). Mezi významné aPK patří kinasy pyruvát dehydrogenasy, kinasy bromodomény a kinasy PIKK související s fosfatidylinositol-3-kinasou [4].

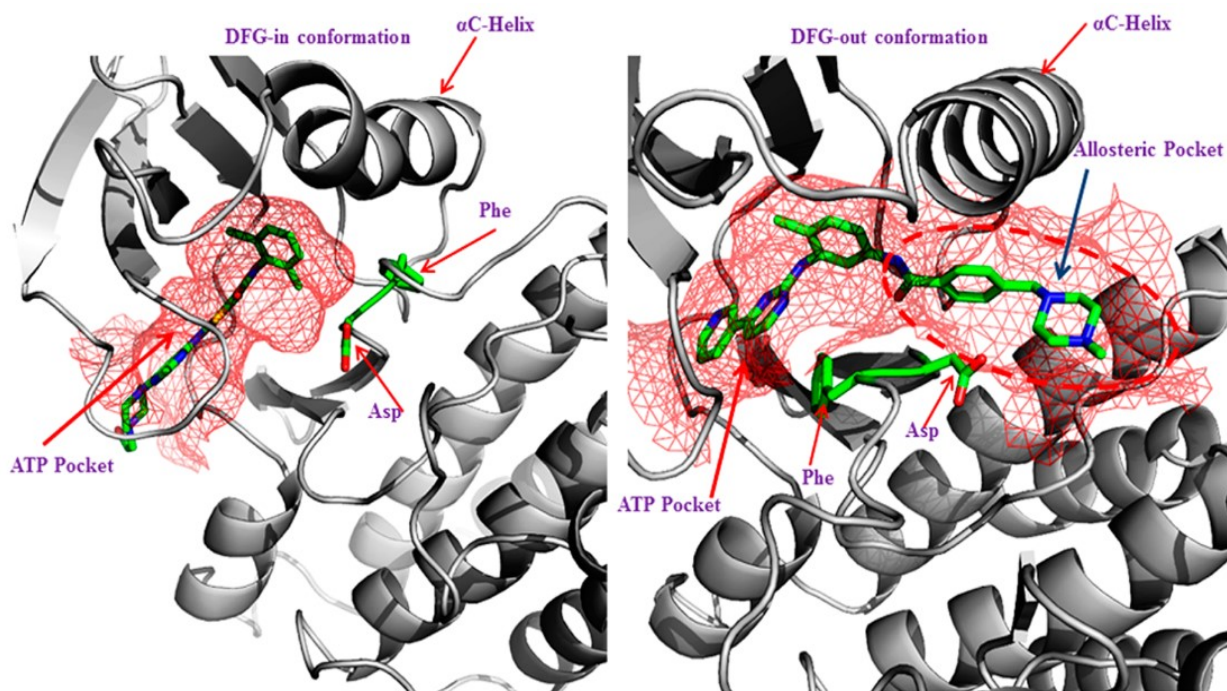
Pro katalytické domény eukaryotických proteinkinasy (ePK) je typická struktura skládající se z menšího N-koncového a většího C-koncového laloku spojeného „pantem“. N-lalok obsahuje pětivláknový β list a tzv. „αC-helix“, zatímco C-lalok je tvořen většinou α-helixy. Kofaktor ATP se váže na vysoce konzervovanou oblast, která je lokalizována hluboko mezi oběma laloky a tvoří vodíkové vazby s „pantovou“ oblastí. C-terminální doména obsahuje flexibilní aktivační smyčku, typicky o délce 20 až 30 aminokyselin, a vyznačuje se konzervovaným motivem Asp-Phe-Gly („DFG“) umístěným na začátku. Fosforylace aktivační smyčky je společný mechanismus pro aktivaci kinasy. Dalším konzervovaným motivem je motiv triády His-Arg-Asp („HRD“), který předchází aktivační smyčce a hraje hlavní roli v katalýze. Tyto sekvenční vlastnosti jsou dobře zachovány napříč kinasovými podrodinami [2, 6].



Obrázek 1.1- Přehled lidského kinomu. TK - tyrosin kiny, TKL - tyrosine kinase-like, STE - homolog kvasinkových kiny Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20, CK1 - kasein kiny 1, AGC - proteinkiny A, proteinkiny G a proteinkiny ,CAMK - (Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kiny, CMGC - Cyclin-dependent kinase, Mitogen-activated proteinkiny, Glycogen synthase kinase, Cdk-like kiny a RGC - receptor guanylyl cyclasa. Převzato z [7].

Kinasy, které obsahují DFG motiv, se dělí na klasické DFG kinasy a DFG kinasy. Toto rozdělení je na základě inhibice podle inhibitorů typu I (DFG kinasy) a typu II (klasické DFG kinasy). Zatímco se inhibitory typu I vážou pouze do ATP vazebného místa, ale ne do alosterického místa, inhibitory typu II zasahují pouze částečně do vazebného místa ATP a zároveň do alosterického místa, které vznikne po přetočení aspartátu v DFG motivu o 180° vzhledem ke konformaci aktivního stavu. Přetočený DFG motiv přemístí aspartát pryč od ATP vazebného místa o přibližně 5Å, což vede ke katalycky nekompetentnímu stavu nazývanému DFG-out. Stav DFG-out otevírá nové alosterické místo přímo sousedící s ATP vazebným místem (viz Obrázek 1.2). Inhibitory typu II jsou tudíž selektivnější a jsou předmětem pro vývoj nových inhibitorů. Kinasy jsou následně aktivní při motivu DFG-in a inaktivní při motivu DFG-out [6, 8]. Kromě přetočení motivu DFG byly pozorovány i další konformační změny mezi aktivní a inaktivní konformací kinas. V aktivním stavu aspartát DFG motivu směřuje do ATP-vazebného místa a koordinuje dva Mg^{2+} ionty. Spolu s aktivační smyčkou vykazuje otevřenou konformaci, a α C helix, se v aktivní konformaci otáčí dovnitř směrem k aktivnímu místu, spolu s charakteristickou interakcí iontového páru mezi konzervovaným Glu α C helixu a Lys β 3. Mechanismus autoinhibice některých kinas však není doposud objasněn.

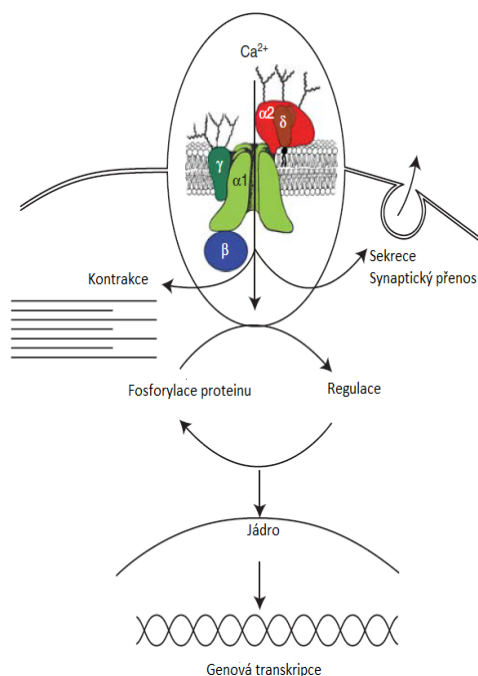
Existují další dva typy inhibitorů, inhibitory typu III a IV. Inhibitory typu III se vážou do alosterického místa naproti ATP vazebnému místu a tím vyvolávají konformační změny aktivační smyčky a následně α C helix zaujímá inaktivní konformaci. Inhibitory typu IV se vážou do jakéhokoliv alosterického místa vzdáleného od ATP vazebného místa a indukují konformační změny vedoucí k inaktivaci kinas [6].



Obrázek 1.2- Struktura DFG-in (vlevo) a DFG-out motivu (vpravo). Převzato z [6].

1.2 Ca^{2+} signální dráha

Vápenatý kation (Ca^{2+}) je běžný posel, který reguluje mnoho procesů v buňce, např. kontrakce, sekrece, synaptický přenos a transkripci (viz Obrázek 1.3). Regulace koncentrace Ca^{2+} je spojena s aktivitou transmembránových kanálů a ukládáním Ca^{2+} do organel, kterým je např. endoplazmatické retikulum (ER), ve svalecth sarkoplazmatické retikulum (SR) [9].

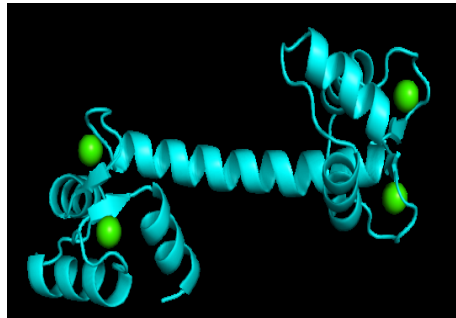


Obrázek 1.3 - Přenos signálu řízený Ca^{2+} kanálky. Převzato z [13].

Existují různé typy vápníkových kanálů. Typ L, který se nachází v srdečním, hladkém a kosterním svalstvu, je typický pro svou dlouhou aktivaci [10]. Typ P je nazýván podle umístění kanálku v Purkyněho buňkách [11]. Typ P má obdobnou roli jako kanály typu N při uvolňování neurotransmiterů [12] a typ T se podílí na excitaci neuronů [13]. Dále existují kanály typu R, které se nacházejí v neuronech a jsou senzitivní na peptidovou složku SNX-482 obsaženou v pavoučím jedu [14]. Tento typ je také nezbytný pro sekreci somatostatinu, který reguluje sekreci glukagonu a inzulínu [15]. Kanály typu Q se vyskytují v neuronech v mozku a jsou velice podobné kanálu P [16].

Při změně koncentrace Ca^{2+} je vyslán signál po signálních drahách do cílové oblasti, která poté reaguje určitou odpovědí. Jedna z nich je Ca^{2+} /kalmodulin signální dráha. Při zvýšení množství intracelulárních kationtů vápníku dochází k aktivaci kalmodulinu. Kalmodulin je tvořen dvěma laloky, které jsou spojeny helixem. Laloky obsahují tzv. helix-loop-helix motiv a každý lalok je schopen vázat dva ionty Ca^{2+} (Obrázek 1.4 na straně 13). Při nízké koncentraci Ca^{2+} , N-konec kalmodulinu zaujímá uzavřenou konformaci, zatímco C-koncový lalok zůstává v polootevřené konformaci. Zvýšení intracelulárního Ca^{2+} vede k vazbě Ca^{2+} na CaM, což indukuje konformační změnu obou laloků do otevřenější pozice. Tato konformace vystavuje hydrofobní části, které podporují interakce s cílovými proteiny. Šroubovice spojující obě domény umožňuje komplexu Ca^{2+} /CaM zaujmout řadu různých flexibilních konformací, z nichž každá je jedinečná pro rozpoznání a regulaci specifického substrátu. Mezi vazebné partnery CaM patří i kalmodulin-dependentní kinasy, CaMKK1 a CaMKK2 [17].

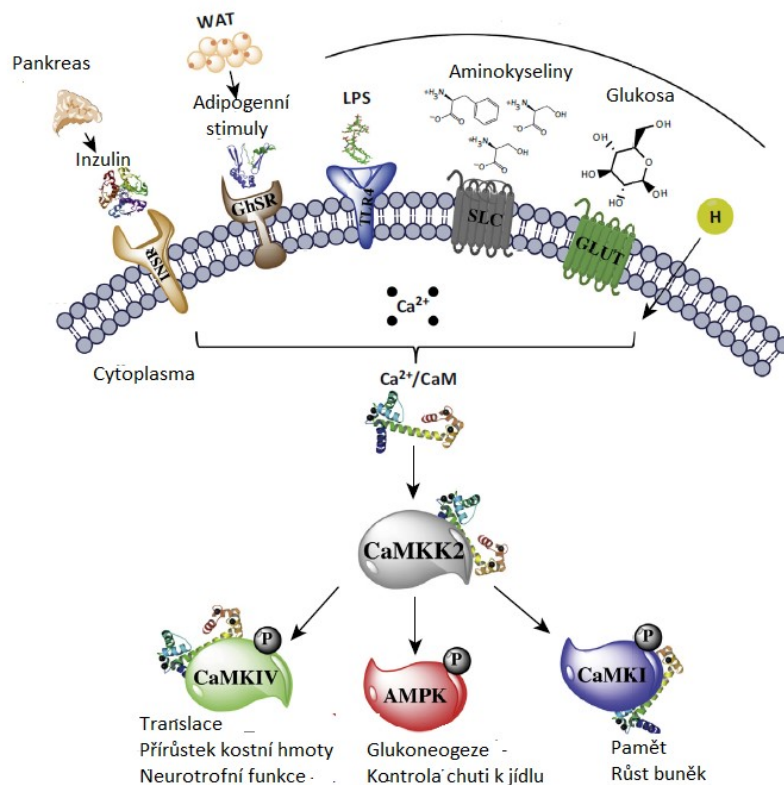
Při zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů dochází k aktivaci CaMKK prostřednictvím vazby komplexu Ca^{2+} /kalmodulin na C-koncový segment CaMKK, což uvolní autoinhibici přerušením interakcí autoinhibičního segmentu s aktivním centrem kinasy [19].



Obrázek 1.4- Sekundární struktura kalmodulinu (modře) s navázanými vápenatými ionty (zeleně). Krystalová struktura převzata z PDB databáze pod kódem 1OSA. Rozlišení struktury 1, 68 Å. Rezidua 2-149. Vizualizováno pomocí programu PyMol [18].

1.3 CaMKK2

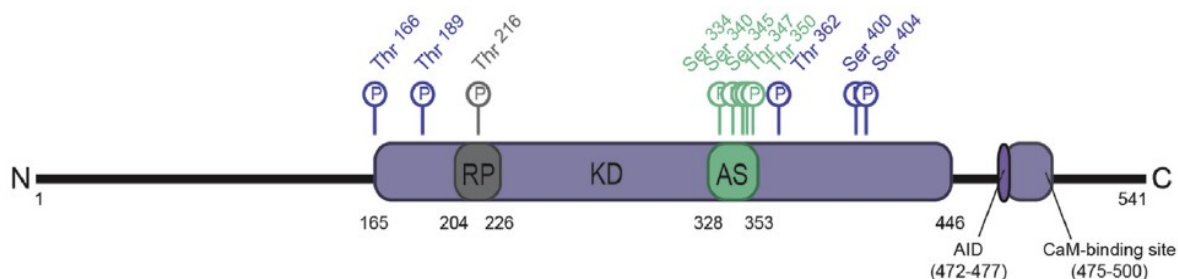
Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa 2 (CaMKK2) patří do rodiny serin/threonin kinas, která po zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} je aktivována vazbou kalmodulinu (viz Obrázek 1.5). Následně dochází k regulaci CaMK1, CaMK4, AMPK, PKB a histon deacetylasy Sirt1 signální dráhy, které kontrolují fyziologicky důležité neuronové procesy, mezi které patří například buněčný růst a apoptosa. Při dysregulaci CaMKK2 dochází k onemocněním jako je schizofrenie, bipolární porucha, neurodegenerace a rakovina [20, 21].



Obrázek 1.5 - Znárodnění aktivace CaMKK2 a následná fosforylace jeho vazebných partnerů. INSR-inzulinový receptor. GhSR -receptor růstového hormonu, TLR4- Toll-like receptor 4. WAT- bílá tuková tkáň, LPS- lipopolysacharidy, SLC- Solut Carrier, přenašeč rozpuštěné látky. GLUT- glukozový transporter Převzata z [17].

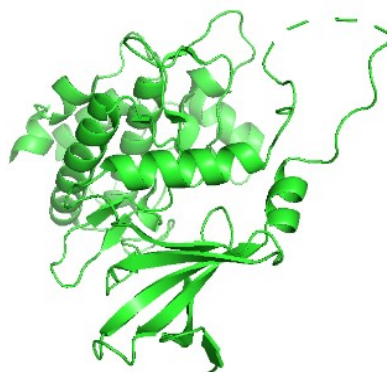
1.3.1 Struktura a vlastnost CaMKK2

CaMKK2 obsahuje 588 aminokyselin. Nejdelší úsek, který se doposud podařilo vykrytalizovat, je dlouhý 291 aminokyselin a zahrnuje rezidua 158 až 448 (viz Obrázek 1.7). Kinasová doména obsahuje rezidua 165-446. Autoinhibiční doména se částečně překrývá s kalmodulin vazebnou doménou a C-konec je velice flexibilní. Struktura CaMKK2 je zobrazena na Obrázku 1.6.



Obrázek 1.6 - Struktura CaMKK2. KD představuje kinasovou doménu. RP je doména bohatá na arginin a prolin. AS představuje aktivační segment. AID je autoinhibiční doména, která se částečně překrývá s kalmodulin vazebnou doménou. Převzato z [22].

Aktivita CaMKK2 je regulována vazbou kalmodulinu a fosforylací. Některá fosforylační místa jsou modifikována cyklin-dependentní kinasou 5 (CDK5) a glykogensyntasou kinasou 3 (GSK3) [22]. Jiná fosforylační místa podléhají autofosforylaci. V klidovém stavu autoinhibiční doména stéricky brání aktivní místo. Při interakci s kalmodulinem CaMKK2 podléhá konformační změně a následné autofosforylaci na threoninu 85 a 482 [19, 20, 23]. Tyto autofosforylace zvyšují aktivitu CaMKK2. Studie naznačily, že Ala329 je zodpovědný za aktivitu CaMKK2 při vazbě s kalmodulinem, jelikož mutace tohoto rezidua (A329T) vedla ke ztrátě schopnosti aktivace v přítomnosti kalmodulinu. Autonomní aktivita byla rovněž potlačena mutací glycinu 87 a argininu 139, jelikož mutantní formy CaMKK2 G87R a R139W nebyly schopné fosforylat AMPK [20]. Další důležitou oblastí, která je odpovědná za katalytickou aktivitu je tzv. RP doména [23]. Tato doména je nezbytná pro aktivaci CaMK4 a CaMK1, na základě fosforylace threoninu v aktivační smyčce, ale není podstatná pro autofosforylaci a aktivaci PKB [21]. Při vazbě CaMKK2 s AMPK v přítomnosti kalmodulinu dochází ke tvorbě stabilního komplexu pomocí kinasových domén. Komplex CaMKK2/CaM/AMPK je regulován Ca^{2+} , ale není regulován AMP. Tyto poznatky naznačily,



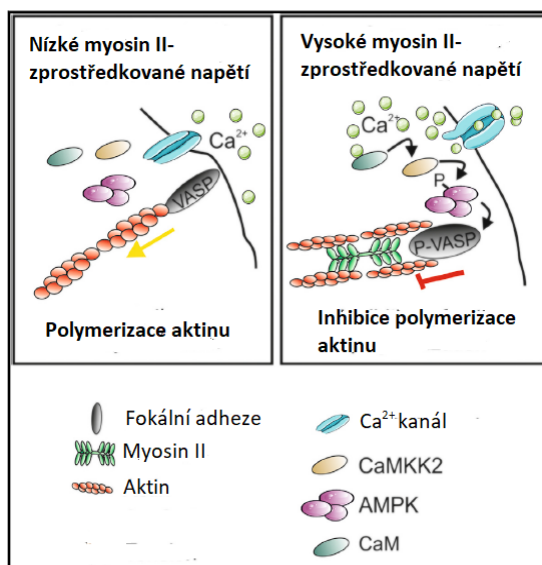
Obrázek 1.7 - Krystalová struktura CaMKK2. Vizualizováno v programu PyMOL. Struktura převzata z PDB databáze pod kódem 5UY6. Rozlišení je 1,7Å. Rezidua 161-449

že aktivovaná CaMKK2 může působit jako molekulární přepínač mezi dráhou CaMKK2/AMPK nebo CaMKK2/CaMK [23].

1.3.2 Biologická funkce

Největší exprese CaMKK2 probíhá v mozku, přičemž dysregulace CaMKK2 je považována za základní faktor vedoucí k Alzheimerově chorobě (AD). CaMKK2 je také obsažena v ledvinách, játrech a svazech [24]. Tato kinasa má rovněž vliv na vývoj a rozvětvení neuritů prostřednictvím PKA, která reguluje sestřih CaMKK2 za vzniku dvou odlišně fosforylovaných variant, přičemž každá varianta odlišně moduluje neuronální diferenciaci [25]. Kaskáda CaMKK / CaMK4 může stimulovat transkripci genů prostřednictvím fosforylace Ser133 a to může hrát roli v učení a paměti [21].

Ve svazech CaMKK2 ovlivňuje aktivitu AMPK. Svalové vlákno je tvořeno myofibrily, které obsahuje proteiny aktin a myosin. Při stahu svalu se délka vlákna zkracuje, jelikož se aktinová a myosinová filamenta vzájemně zasouvají. Tato vlákna mají také za následek pohyb a přitahování buněk. Polymerace a odbourávání aktinových vláken je závislá na VASP proteinu (z angl. *Vasodilator-stimulating phosphoprotein*). VASP protein je fosforylován pomocí AMPK, která je regulována fosforylací CaMKK2. Tato dráha je znázorněna na Obrázku 1.8. Inhibice CaMKK2 měla negativní dopad na fosforylaci AMPK vedoucí ke ztrátě fokální adheze [26].



Obrázek 1.8 - CaMKK2 / AMPK signální dráha při adhezi. CaMKK2 reguluje AMPK, která následně fosforyluje VASP). CaM – kalmodulin, VASP (z angl. *Vasodilator-stimulating phosphoprotein*). Převzato z [26].

Dysregulace CaMKK2 je kromě paměti a AD spojována s bipolárními poruchami, depresí, buněčným vývojem, regulací energie a chuti k jídlu, rakovinou prostaty a plic, sekrecí inzulínu a dalšími ději [17, 27, 28].

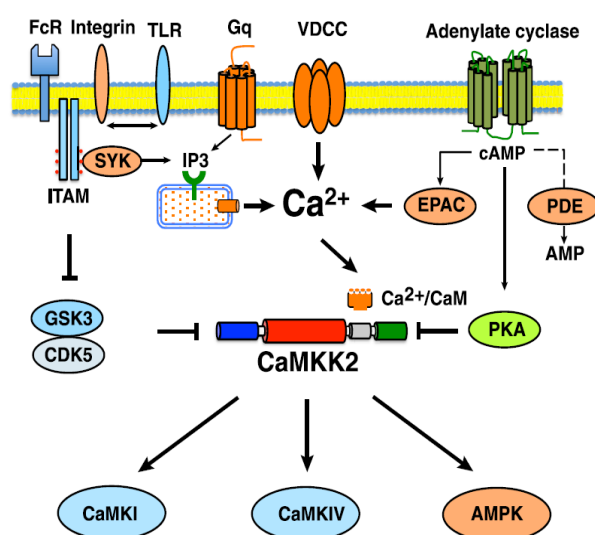
1.3.3 Regulace

CaMKK2 je regulována dvěma způsoby jež jsou znázorněny na Obrázku 1.9. První z nich je vazba s CaM a následná autofosforylace, přičemž dojde ke zvýšení aktivity CaMKK2 [13].

Druhý způsob regulace CaMKK2 je fosforylace prostřednictvím jiných kinas. CDK5 a GSK3 jsou zodpovědné za fosforylaci serinu 129, 133 a 137 vedoucí ke snížení aktivity [29].

CaMKK2 také obsahuje čtyři fosforylační místa pro cAMP-dependentní proteinkinasu A, Ser100, Thr145, Ser495 a Ser511, jejichž modifikace měla za následek inhibici CaMKK2. Studie naznačily, že DAPK se může podílet také na fosforylaci Ser511 [30].

Ser100 a Ser511 jsou vysoce konzervovaná rezidua, která v izoformě CaMKK1 zprostředkovávají vazbu s proteinem 14-3-3, což má za následek snížení aktivity CaMKK1. Stejný efekt by mohla mít i tvorba komplexu mezi CaMKK2 a proteinem 14-3-3 [31]. Tvorba tohoto komplexu vedla ke snížení aktivity CaMKK2, ale mechanismus tohoto procesu nebyl zatím objasněn. Nabízí se několik alternativ. Vazba 14-3-3 může ovlivnit konformaci aktivního místa CaMKK2 nebo změnit jeho přístupnost. Další možností může být, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje interakce v kinasové doméně, nebo chrání CaMKK2 před defosforylací. Tato vazba může také zabránit vazbě s kalmodulinem. Bylo potvrzené, že oba seriny, Ser100 a Ser511, se vazby s proteinem 14-3-3 účastní [32].



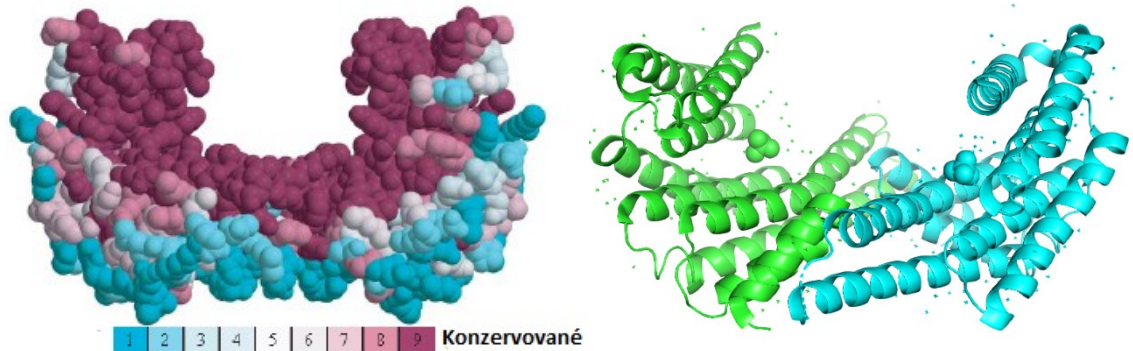
Obrázek 1.9 - Regulace CaMKK2. Aktivace Ca²⁺/CaM, a inhibice GSK3, CDK5 a PKA. Dále je znázorněna aktivace CaMKI, CaMKIV a AMPK. VDCC – voltage-dependent calcium channel (kanál závislý na napětí vápníku), FcR – Fc-receptor, ITAM- Imunoreceptorový aktivizační motiv založený na tyrosinu 18. Převzato z [23].

1.4 Protein 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou skupinou regulačních molekul, které jsou exprimovány ve všech eukaryotických buňkách. Výrazným rysem proteinů 14-3-3 je jejich schopnost vázat množství funkčně odlišných signálních proteinů jako jsou kinasy, fosfatasy a transmembránové receptory. Protein 14-3-3 hraje roli v životně důležitých regulačních procesech, jako například kontrola buněčného cyklu nebo apoptosa. Název je odvozen od migračního obrazce na dvourozměrné DEAE-celulosové chromatografii a na škrobové elektroforéze [33].

Doposud bylo u savců popsáno sedm isoform (β,γ,ε,σ,τ,ζ,η) [34] a u kvasinek dvě (Bmh1 a Bmh2) [35]. Proteiny 14-3-3 existují jako homodimery i heterodimery s monomerní molekulovou hmotností přibližně 30 000 Da. Výjimkou je isoforma σ, která spíše tvoří pouze homodimery. Izoelektrický bod se pohybuje v kyselější oblasti okolo hodnot 4–5 [34, 35].

Protomer obsahuje devět antiparalelních helixů [33] a celkový tvar dimeru připomíná kalíšek. Struktura je velmi rigidní s výjimkou karboxylového konce, který je flexibilní. Vnitřní struktura protein 14-3-3 je velice konzervovaná (viz Obrázek 1.10) [38]. Proteiny 14-3-3 tvoří komplexy se signálními proteiny obsahující fosforylovaný serin/threonin v typickém motivu. Rozpoznávají se dva typy motivů: RSXpSXP a RXXXpSXP, kde pS představuje fosfoserin, R je arginin, P- prolin a X jakákoliv aminokyselina [34, 38].



Obrázek 1.10 Vlevo porovnání sekvence evolučně odlišných protein 14-3-3 (*Bmh1*), protein 14-3-3 ϵ (octomilka obecná), protein 14-3-3 ζ (lidská), protein 14-3-3 isoforma 1 (háďátka obecná). Fialově zachovalá sekvence, modrá minimální sekvence podobnost. Převzato z [38]. Vpravo struktura lidského protein 14-3-3 τ , převzato z PDB databáze pod kódem 5IQP. Vizualizováno v programu PyMOL [18].

Byly navrženy tři mechanismy regulace substrátů. První možností je, že protein 14-3-3 změní konformaci cílového proteinu. Vazba proteinu 14-3-3 na substrát může buď blokovat vazbu dalšího proteinu nebo chránit signální sekvence substrátu a tak ovlivňovat jeho lokalizaci. Jedním z příkladů jsou histon deacetylasy třídy II (HDAC). Po fosforylaci se proteiny 14-3-3 vážou na HDAC. Tato vazba vede k jejich přemístění z jádra do cytoplazmy. Příčinou změny lokalizace je maskování blízké nukleární lokalizační sekvence (NLS) sousedící s vazebným místem proteinu 14-3-3. Po odstranění jaderné exportní sekvence (NES), zůstal protein v jádře i přes vazbu proteinu 14-3-3, což dokazuje, že vazba proteinu 14-3-3 zpřístupňuje NES na C-konci. Protein 14-3-3 také může být součástí takzvaného „molekulového lešení“, které je typické pro signální dráhy [33, 38].

Ačkoliv je hodně příkladů, jak proteiny 14-3-3 regulují své substráty, o regulaci samotných proteinů 14-3-3 toho není moc známo [38, 39]. Konkrétní isoformy proteinu 14-3-3 jsou spojovány s různými onemocněními. Jako příklad lze uvést isoformu σ , která je spojena s rakovinou prsu [40] a ζ spojenou s neurologickými poruchami [41].

2 Cíle práce

- Připravit lidskou Ca^{2+} /kalmmodulin-dependetní kinasu kinasu 2 (rezidua 93-517), obsahující mutace T145A, D330A, S495A (CaMKK2-S100,S511)
- Připravit kalmmodulin a protein 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ (Rezidua 1-234)
- Připravit katalytickou doménu cAMP-dependetní proteinkinasy A (PKA)
- Optimalizovat protokol pro fosforylaci lidské CaMKK2-S100,S511 pomocí PKA a DAPK2 (Death-associated proteinkinase 2)
- Charakterizovat stabilitu a stechiometrii komplexu mezi fosforylovanou CaMKK2-S100,S511 a proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ pomocí analytické ultracentrifugace

3 Chemikálie

1,4-dithiothreitol.....	Sigma-Aldrich, USA
Sada ADP-Glo™ Kinase Assay	Promega, USA
ATP	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid/bisakrylamid 30% ROTIPHORESE® (37,5 : 1).....	Carl Roth, Německo
ampicilin	Carl Roth, Německo
azid sodný	Penta, ČR
Brillant Blau G250	Carl Roth, Německo
bromfenolová modř	Lachema
Coomassie Brilliant Blue R-250	Carl Roth, Německo
dihydrogenfosforečnan draselný	Penta, ČR
dodecylsírán sodný, SDS	Carl Roth, Německo
ethanol.....	Lach-Ner, ČR
fenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF	Carl Roth, Německo
glukosa	Carl Roth, Německo
glycerol	Carl Roth, Německo
glycin	Carl Roth, Německo
hydrogenfosforečnan sodný	Penta, ČR/Lachema
chloramfenikol	Carl Roth, Německo
chlorid draselný	Carl Roth, Německo
chlorid hořečnatý.....	Penta, ČR
chlorid manganatý.....	Penta, ČR
chlorid sodný	Carl Roth, Německo
chlorid vápenatý	Lach-Ner, ČR
imidazol	Carl Roth, Německo
isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid	Carl Roth, Německo
kanamycin	Carl Roth, Německo
kvasinkový extrakt	Carl Roth, Německo
kyselina ethylendiamintetraoctová	Carl Roth, Německo
kyselina octová	Penta, ČR
lysosym	Carl Roth, Německo
medium Luria-Bertani	Carl Roth, Německo
metanol.....	Penta, ČR
phos-tag™ AAL-107.....	NARD
persulfát amonný.....	Sigma-Aldrich, USA
sírán hořečnatý	Penta, ČR
sírán nikelnatý.....	Penta, ČR
terrific broth (TB) médium.....	Carl Roth, Německo
tetramethylethylendiamin.....	Carl Roth, Německo
TRIS	Carl Roth, Německo
TRIS-hydrochlorid	Carl Roth, Německo
trypton.....	Carl Roth, Německo
β-merkptoethanol	Carl Roth, Německo

4 Přístroje

96-jamková mikrodestička	GEHealthcare, USA
Centrifuga 5804R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Sigma 8K.....	Sigma, Německo
Centrifuga Z323K	Hermle, Německo
Dialyzační membrána, typ 27/32 (cut off 14000)	Carl Roth GmbH, Německo
HPLC	Watrex, ČR
Koncentrátor VivaspinTurbo.....	Biovendor, ČR
Magnetická míchačka Variomag.....	P-Lab, ČR
Mikrodestičková čtečka Infinite M200 PRO.....	Tecan, Švýcarsko
NanoPhotometer P-Class P 300	IMPLEN, Německo
Peristaltická pumpa Rotarus.....	VWR, USA
pH metr 3505 Jenway.....	P-Lab, ČR
Souprava na elektroforézu	Bio-Rad, USA
Sonikátor Q700	QSonica, USA
Spektrofluorimetr PC1	ISS, USA
ProteomLab™ XL-I analytická centrifuga.....	Beckman Coulter, USA
Termoblok	Grant, UK
Inkubátor Gallenkamp Orbital Incubator	Gemini BV, Holandsko
Inkubátor Multitron Infors	AG, Švýcarsko
Vertikální elektroforesa	Bio-Rad, USA
Vodní lázeň SSB Aqua Pro	Grant, UK

5 Metody

5.1 Zásobní roztoky

V průběhu kultivace buněk a purifikace proteinů byly použity zásobní roztoky, jejichž složení je uvedeno v Tabulkách 5.1 až 5.4.

Tabulka 5.1 - Složení pufrů pro elektroforézu

4 x Separační pufr	4 x Zaváděcí pufr	10x pufr pro elektroforézu
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	0,5M Tris-HCl, pH 6.8	0,24M Tris
0,4 % SDS	0,4 % SDS	1,9M Glycin
dH ₂ O	dH ₂ O	1% SDS
		dH ₂ O

Tabulka 5.2 - Pufr pro přípravu vzorku na SDS-PAGE

5 x Pufr pro přípravu vzorku
60mM Tris – HCl, pH = 6,8
5% 2-merkaptoethanol
0,1% bromfenolová modř
25% glycerol
5% SDS
dH ₂ O

Tabulka 5.3 - Složení zásobního roztoku PBS a regeneračního roztoku

10 x PBS (pH = 7,4)	Regenerační roztok pro matrici Chelating Fast Flow	20x NPS	50x 5052
1,36M NaCl	50mM EDTA	50mM Na ₂ HPO ₄	0,5% glycerol
0,0268M KCl	0,5 M NaCl	50mM KH ₂ HPO ₄	0,05% glukosa
0,081M Na ₂ HPO ₄		5mM Na ₂ SO ₄	0,02% galaktosa
0,0176M KH ₂ HPO ₄		1M MgSO ₄	
NaN ₃			
dH ₂ O			

Tabulka 5.4 - Složení médií pro E.Coli

LB Medium pro E. Coli (1l)		Autoindukční medium (1l)	
LB Broth (Luria/Miller)	25 g	ZY medium	930 ml
Deionizovaná voda	1 l	50x 5052	20 ml
		20x NPS	50 ml

5.2 Složení gelů

Pro ověřování čistoty proteinu je použita metoda SDS-PAGE. Složení gelů a pufrů pro SDS-PAGE je uvedeno v Tabulce 5.5 až 5.7.

Tabulka 5.5 - Složení separačního SDS polyakrylamidového gelu

Separační SDS polyakrylamidový gel		
	12%	15%
Akrylamid/Bis-akrylamid	4 ml	5 ml
1,5M Tris-HCl (pH=8.8)	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	100 μ l	100 μ l
H ₂ O	3,5 ml	2,5 ml
10% Persulfát amonný	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l
Celkový objem	10 ml	10 ml

Tabulka 5.6 - Složení separačního SDS polyakrylamidového gelu s 50 μ M phos-tag

Separační polyakrylamidový 50 μ M phos-tag gel	
	12%
Akrylamid/Bis-akrylamid	4 ml
1,5M Tris-HCl (8.8)	2,5 ml
SDS (10%)	100 μ l
H ₂ O	3,15 ml
5mM Phos-tag	100 μ l
10mM MnCl ₂	100 μ l
10% Persulfát amonný	60 μ l
TEMED	12 μ l
Celkový objem	10 ml

Tabulka 5.7 - Složení zaváděcího gelu

Zaváděcí gel	
Akrylamid/Bis-akrylamid	0,3 ml
0,5M Tris-HCl (6,8)	0,5 ml
SDS (10%)	20 μ l
H ₂ O	1,168 ml
10% Persulfat amonny	24 μ l
TEMED	2 μ l
Celkový objem	2 ml

5.3 Exprese a purifikace TEV proteasy

5.3.1 Exprese proteinu a lyzace buněk

TEV proteasa má molekulovou hmotnost 29 kDa a $\epsilon = 1,24$ mg/ml. Roztok obsahující 5 ml LB média (složení viz tabulka 5.4, str. 21), ampicilin o finální koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, chloramphenicol o koncentraci 34 $\mu\text{g/ml}$ a buňky E.Coli BL21(DE3)RIL s plazmidovou DNA viru tabákové mozaiky (TEV) a s histidinovou kotvou na N-konci byl inkubován po dobu 15 hodin při 190 rpm a 37 °C v orbitálním inkubátoru. Do 900 ml LB média obsahujícího ampicilin o finální koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a chloramphenicol o finální koncentraci 34 $\mu\text{g/ml}$ bylo přeneseno 5 ml narostlé kultury. Následovala inkubace v orbitálním inkubátoru Multitron při 37 °C a 210 rpm, než optická hustota při 600 nm (OD_{600}) dosáhla hodnoty 0,6 cm^{-1} . Poté byla teplota snížena na 30 °C. Po dosažení $\text{OD}_{600} = 0,8$ cm^{-1} bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 100 $\mu\text{mol/dm}^3$ a inkubace pokračovala při snížené teplotě po dobu 15 hodin. Poté byly kultury přelity do 900ml kyvet a centrifugovány rychlostí 2073 g při 4 °C po dobu 20 minut. Následně byla každá peleta resuspendována ve 40 ml lyzačního pufru (složení viz Tabulka 5.8). Lyzát byl zmražen na teplotu -80 °C.

Tabulka 5.8 - Složení lyzačního pufru

Lyzační pufr

1x PBS

2mM imidazol

1M NaCl

4mM β ME

5.3.2 Sonikace

Sonikace je pulsová metoda, která využívá ultrazvuk k rozbíjení buněčné stěny. Po rozmražení lyzátu byly buňky inkubovány po dobu 20 minut s lysozymem o finální koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Následně byly buňky vystaveny ultrazvuku při následujícím programu: 20 minut celkového času čisté sonikace, kde se střídaly intervaly 15 s zapnuto, 45 s vypnuto, při výkonu 45-50 W. Následně byl sonikát centrifugován při 19561 g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Dále se pracovalo se supernatantem.

5.3.3 Niklová chelatační chromatografie a dialýza

Niklová chelatační chromatografie patří mezi afinitní chromatografie, kde se využívá vazby kov-ligand. Na matrici Chelating Sepharosu Fast Flow se navážou nikelnaté ionty, které na základě donor-akceptorové vazby interagují s histidiny proteinů. Čím více histidinů za sebou, tím je afinita větší, proto se do purifikovaného proteinu zavede tzv. His-tag kotva, která obsahuje šest za sebou jdoucích histidinů. Imidazol, který se také váže na Ni^{2+} ionty je použit k eluci proteinu. Pro regeneraci kolony se matrice promyje roztokem obsahující EDTA, která na sebe naváže nikelnaté ionty. Poté se kolona uchovává ve 20% EtOH při 7 °C.

Na purifikaci TEV proteasy z 1 l kultury bylo použito 3 ml matrice Chelating Sepharosu Fast Flow. Sepharosa byla promyta v následujícím pořadí: 15 ml destilované vody, 20 ml 0,1M

NiSO₄, 15 ml dH₂O, 15 ml pufru E. Následovala adsorbce sonikátu na matici a poté byla matrice promyta 300 ml 10% F v pufru E. Dalším krokem byla eluce 20 ml pufru F a poté byla provedena SDS-PAGE. Frakce obsahující protein v dostatečné čistotě byly sjednoceny. Následovala dialýza po dobu 15 hodin a gelová permeační chromatografie. Složení pufru E, F a dialyzačního pufru je uvedeno v Tabulce 5.9.

Tabulka 5.9 - Složení pufrů E, F a dialyzačního pufru

Niklová chelatační chromatografie		Dialyzační pufr O/N 4 °C
Pufr E	Pufr F	50mM Tris-HCl, pH7,5
1x PBS	1x PBS	5mM EDTA, pH=8
0,5M NaCl	0,5 M NaCl	0,5M NaCl
1mM imidazol	600 mM imidazol	4mM βME
2mM βME	2mM βME	10% glycerol

5.3.4 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) je metoda, která odděluje látky na základě jejich molekulové hmotnosti, velikosti a tvaru. Kvalita separace závisí na objemu vzorku, rychlosti průtoku a typu kolony. Kolona je tvořena stacionární fází, která obsahuje porézní gel, a mobilní fází. Stacionární fází mohou být různé gely např. Sephadex, který je tvořen z dextransu nebo Sepharosa, která je z agarosy. Mobilní fází je pufr.

Pro gelovou permeační chromatografii byla použita kolona Superdex® Increase 75 10/300 GL. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Vzorek byl zakoncentrován na 0,5 ml s použitím koncentrátoru s cut-off 10 kDa. Po oddělení nečistot byly vzorky obsahující protein analyzovány pomocí SDS-PAGE pro kontrolu čistoty. V tomto případě byl použit 15% SDS-polyakrylamidový gel. Elektroforéza probíhala po dobu 50 minut při napětí 200 V. Do první jamky byl nanesen standard molekulových vah o objemu 5 μl. Další jamky obsahovaly 2 μl vzorku, 8 μl vody a 2 μl 5x pufru pro přípravu vzorku. Frakce obsahující TEV proteasu s dostatečnou čistotou byly sjednoceny a protein byl zředěn na výslednou koncentraci 0,838 mg/ml a zamražen ve frakci o objemu jednoho mililitru. Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii je uvedeno v Tabulce 5.10. Aktivita TEV proteasy při koncentraci 0,838mg/ml je stanovena na 250 U/mg proteinu, kde 1U = 0,125μl.

Tabulka 5.10 - Pufr pro gelovou permeační chromatografii

Pufr pro GPC
50mM Tris-HCl pH7,5
10% glycerol
1mM EDTA
5mM DTT

5.4 Exprese a purifikace cAMP-dependentní protein kinasy A (PKA)

5.4.1 Exprese proteinu a lyzace buněk

PKA má molekulovou hmotnost 43 kDa a molární absorpční koeficient proteinu v redukovaném stavu je $53860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Parametry byly získány pomocí programu ProtParam na stránce expasy.org [42]. DNA cAMP-dependentní proteinkinasy A ve vektoru pET15b byla transformována do buněk BL21(DE3).

Směs tvořená ze 3 μl plasmidové DNA s vektorem pET15b a 30 μl kompetentních buněk BL21(DE3), byla inkubována 20 minut na ledu. Následně byl proveden teplotní šok, kdy byla směs ponechána 45 s ve vodní lázni ohřáté na teplotu $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Následovalo rychlé zchlazení na ledu a přidání 300 μl LB média (složení viz Tabulka 5.4, str. 21) bez antibiotika. Směs byla ponechána 1 hodinu v orbitálním inkubátoru při 190 rpm a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně byla přenesena na agarovou misku, obsahující LB-agar a ampicilin. Miska byla inkubována při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 hodin a narostlé kolonie byly přeneseny do 5 ml LB média obsahující ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Z narostlé kultury byla izolována DNA pomocí komerční sady GeneJet Plasmid miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) a odeslána pro kontrolu na sekvenaci do firmy Eurofins Scientific [43]. Dále byl vytvořen zásobní glycerolový roztok obsahující směs 700 μl narostlé kultury a 300 μl glycerolu.

Po zkontrolování sekvenované DNA byl vytvořen roztok obsahující 5 ml LB média (složení viz Tabulka 5.4, str. 21), ampicilin o finální koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a 10 μl zásobního glycerolového roztoku. Následně byl roztok inkubován po dobu 15 hodin při 190 rpm a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v orbitálním inkubátoru. Do 900 ml LB média, obsahujícího ampicilin o finální koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ bylo přeneseno 5 ml narostlé kultury. Následovala inkubace v orbitálním inkubátoru Multitron při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 210 rpm do $\text{OD}_{600} = 0,5 \text{ cm}^{-1}$, poté byla teplota snížena na $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Po dosažení $\text{OD}_{600} = 0,8 \text{ cm}^{-1}$ bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 100 $\mu\text{mol/dm}^3$ a inkubace pokračovala při snížené teplotě po dobu 15 hodin. Poté byly kultury přelity do 900ml kyvet a centrifugovány rychlostí 2073 g při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Každá peleta byla resuspendována v 50 ml lyzačního pufru a suspenze byla zmrazena na teplotu $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Složení lyzačního pufru po optimalizaci obsahuje Tabulka 5.11.

Tabulka 5.11 - Složení lyzačního pufru pro PKA

Lyzační pufr
1x PBS
10mM imidazol
1M NaCl
4mM βME

5.4.2 Sonikace a niklová chelatační chromatografie

Po rozmražení bakteriální kultury byly buňky inkubovány po dobu 20 minut s lysozymem o finální koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$. K buněčné suspenzi byl přidán inhibitor serinových proteas,

PMSF, o finální koncentraci 0,1 mmol/dm³ a buňky byly vystaveny ultrazvuku při následujícím programu: 20 minut celkového času čisté sonikace, kde se střídaly intervaly 3 s zapnuto, 17 s vypnuto, při výkonu 50-60 W. Následně byl sonikát centrifugován při 19561 g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Pro izolaci proteinu byl použit supernatant.

Na purifikaci PKA z buněk získaných z 1 LB média bylo použito 0,5 ml matrice Chelating Sepharosy Fast Flow. Sepharosa byla promyta v následujícím pořadí: 15 ml destilované vody, 20 ml 0,1M NiSO₄, 15 ml dH₂O, 15 ml pufru E. Následovala adsorbce sonikátu na matrici. Ke zjištění optimálních podmínek purifikace byla sledována koncentrační závislost imidazolu na promytí a eluci proteinu. Nakonec byl vybrán pufr na promytí obsahující 20mM imidazol o objemu 100 ml. Protein byl eluován 7 ml elučního pufru F, obsahujícího 400mM imidazolu. Kvalita a čistota proteinu byla stanocena pomocí 12% SDS-PAGE. Frakce obsahující protein byly sjednoceny a následovala dialýza při 4 °C po dobu 15 hodin a gelová permeační chromatografie. Složení pufrů je uvedeno v Tabulce 5.12.

Tabulka 5.12 - Složení pufrů pro niklovou chelatační chromatografii a dialýzu

Niklová chelatační chromatografie		Dialyzační pufr	
Pufr E	Pufr na promytí	Pufr F	50mM Tris-HCl, pH7,5
1x PBS	1x PBS	1x PBS	5mM EDTA, pH=8
0,5M NaCl	0,5 M NaCl	0,5 M NaCl	0,5M NaCl
20mM imidazol	20 mM imidazol	400 mM imidazol	4mM βME
2mM βME	2mM βME	2mM βME	10% glycerol

5.4.3 Gelová permeační chromatografie

Po ukončení dialýzy byla PKA zakoncentrována na 2 ml s použitím koncentrátoru s propustností pro molekuly menší než 30 kDa. PKA byla následně purifikována pomocí gelové permeační chromatografie při rychlosti průtoku 2 ml za minutu a s použitou kolonou HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg. Složení pufru pro GPC je uvedeno 5.13. Po eluci PKA byly vzorky analyzovány pomocí 12% SDS-PAGE. Na gel bylo nanášeno 10 µl vzorku a 2 µl barvicího pufru. Vzorky obsahující čistou PKA byly sjednoceny a zakoncentrovány na koncentraci 60-80 µmol/dm³. Následně byla stanovena kinasová aktivita a porovnána s komerční PKA pomocí komerční sady ADP-GLO™ (Promega, USA).

Tabulka 5.13 Pufr pro gelovou permeační chromatografii

GPC pufr
40 mM Tris-HCl, pH= 7,5
20mM MgCl ₂
1mM EDTA
2mM DTT
10% glycerol

5.4.4 Stanovení kinasové aktivity proteinkinasy A pomocí sady ADP-GLO™

Stanovení kinasové aktivity pomocí sady ADP-GLO je založeno na množství přeměněného ATP na ADP. Substrátem pro PKA byl použit protein vázající maltosu, MBP. Jako první byla vytvořena konverzní křivka s 5%, 10%, 20% a 40% konverzí. Následně byla změřena spotřeba ATP purifikované PKA a komerční PKA. Stanovení spotřebovaného ATP se provádí ve třech krocích. První krok je inkubace kinasy se substrátem. Při tomto kroku se spotřebovává ATP. V rámci experimentu byly testovány dvě doby inkubace, 5 minut a 20 minut. Po inkubaci je kinasová reakce ukončena přidáním prvního činidla, které odbourává zbylé ATP v reakční směsi. Doporučená doba ponechání prvního činidla s reakční směsí je 40 minut. Po inkubaci je do reakce přidáno druhé, tzv. kinasové detekční činidlo, které veškeré vzniklé ADP v průběhu kinasové reakce promění v ATP a toto nově vzniklé ATP je poté využito k reakci s luciferinem za vzniku oxyluciferinu a chemiluminiscenčního signálu, který je detekován a je úměrný spotřebovanému ATP v reakci. Doporučená doba inkubace s kinasovým činidlem je 30 minut.

Intenzita luminiscenčního signálu byla měřena v 96-jamkové mikroděstičce pomocí luminiscenční čtečky Infinite M200 PRO. Každé měření probíhalo v triplikátech a obsahovalo kontrolu (viz Tabulka 5.14). Byl zvolen parametr mikroděstičky Corning 96 Flat Bottom White Polystyrol [COS96fw.pdf] v programu Tecan i-control, verze 1.8.50.0. Poté byla data zprůměrována a odlehlé hodnoty byly vyloučeny. Následně byla sestrojena konverzní křivka a byla vypočtena aktivita proteinkinasy A. Pro ověření stanovené aktivity byla provedena kontrola pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50 μ M phos-tag, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5.6 na straně 22.

Tabulka 5.14 - Složení reakční směsi – kPKA- 0,85 μ M komerční PKA, pPKA – 0,85 μ M purifikovaná PKA, MBP – maltosu vázající protein o koncentraci 1 mg/ml, pufr - 40 mM Tris-HCl, pH= 7,5, 20mM MgCl₂, 2mM DTT. Kontrola obsahuje vzorky bez substrátu (ATP).

	Inkubace	pPKA	kPKA	MBP	pufr	ATP	1. činidlo	2. činidlo
Frakce 1-3	5 min	5 μ l	-----	5 μ l	10 μ l	5 μ l	25 μ l	50 μ l
Frakce 4-6		5 μ l	-----	5 μ l	15 μ l	-----		
Frakce 7-9	20 min	5 μ l	-----	5 μ l	10 μ l	5 μ l		
Frakce 10-12		5 μ l	-----	5 μ l	15 μ l	-----		
Frakce 13-15	5 min	-----	5 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l		
Frakce 16-18		-----	5 μ l	5 μ l	15 μ l	-----		
Frakce 19-21	20 min	-----	5 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l		
Frakce 22-24		-----	5 μ l	5 μ l	15 μ l	-----		

5.5 Exprese a purifikace kalmodulinu (CaM)

5.5.1 Exprese proteinu a lyzace buněk

Kalmodulin má molekulovou hmotnost 17 kDa a $\epsilon = 2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Kalmodulin byl transformován do vektoru pET3a s rezistencí na ampicilin v buňkách BL21(DE3). Roztok obsahující 5 ml LB média (složení viz Tabulka 5.4, str. 21), ampicilin o finální koncentraci 100 μ g/ml a 10 μ l zásobního glycerolového roztoku byl inkubován po dobu 15 hodin při 190 rpm a

37 °C v orbitálním inkubátoru. Do 900 ml LB média, obsahujícího ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml bylo přeneseno 5 ml narostlé kultury. Následovala inkubace v orbitálním inkubátoru Multitron při 37 °C a 210 rpm do $OD_{600} = 0,4 \text{ cm}^{-1}$, poté byla teplota snížena na 25 °C. Po dosažení $OD_{600} = 0,6 \text{ cm}^{-1}$ bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 100 µmol/dm³ a inkubace pokračovala při snížené teplotě po dobu 20 hodin. Následně byly kultury přelity do 900ml kyvet a centrifugovány rychlostí 2073 g při 4 °C po dobu 20 minut. Každá peleta byla resuspendována v 35 ml lyzačního pufru a následně byla suspenze zmrazena na teplotu -80 °C. Složení lyzačního pufru obsahuje Tabulka 5.15.

Tabulka 5.15 - Složení lyzačního pufru

Lyzační pufr pro CaM

50mM Tris-HCl, pH = 7,5

2mM EDTA

2mM B-merkapt ethanol

dH₂O

5.5.2 Sonikace

Po rozmražení resuspendovaných buněk byly buňky inkubovány po dobu 20 minut s lysozymem o finální koncentraci 0,1µg/ml. Následně se přidalo PMSF o finální koncentraci 0,1 mmol/dm³ a buňky byly vystaveny ultrazvuku při následujícím programu: 15 minut celkového času čisté sonikace, kde se střídaly intervaly 5 s zapnuto, 17 s vypnuto, při výkonu 50-60 W. Poté byl sonikát centrifugován při 19561 g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C a následně se do supernatantu přidal chlorid vápenatý, jehož finální koncentrace byla 5mM. Poté byl protein v supernatantu purifikován pomocí chromatografie na fenylsepharose CL-4B.

5.5.3 Chromatografie založená na hydrofobních interakcích

Chromatografie založená na hydrofobních interakcích (HIC) využívá matici obsahující aromatické hydrofóbní skupiny. Pro kalmodulin byla použita matrice Phe-Sepharosa CL-4B.

Hydrofóbní části proteinu se snaží co nejméně interagovat s polárním rozpouštědlem a proto začnou interagovat s fenylovou skupinou na koloně. Čím větší má rozpouštědlo iontovou sílu, tím je interakce s matricí silnější. Protein je eluován při snížení iontové síly mobilní fáze nebo změnou pH, popřípadě lze použít detergent narušující vazby mezi matricí a proteinem.

Kalmodulin po navázání vápníku mění konformaci a odkrývá svá hydrofóbní rezidua. Díky velké iontové síle v pufru interaguje s fenyl-sepharosou. Po navázání kalmodulinu na matici je matrice promyta puftrem obsahující 100mM NaCl a následně se kalmodulin eluuje pomocí kyseliny ethylendiamintetraoctové. EDTA vyváže vápník, přičemž dojde ke změně konformace kalmodulinu, která vede ke schování hydrofobních reziduí.

Na purifikaci proteinu CaM z buněk získaných ze 4 l LB byly použity 4 ml matrice Phe-Sepharosy CL-4B. Matrice byla nejprve promyta 15 ml dH₂O, následně 3x20 ml puftrem A. Poté byl adsorbován sonikát, matrice byla promyta 2x20 ml puftrem B, 3x20 ml puftrem C a

eluze byla provedena 20 ml pufrém D. Složení pufrů obsahuje Tabulka 5.16. Následně byla kolona regenerována promytím vodou, 20 ml NaOH a uchována ve 20% ethanolu při 4 °C.

Tabulka 5.16 - Složení pufrů pro HIC

	Pufr A	Pufr B	Pufr C	Pufr D
Zásobní roztok	Výsledná koncentrace			
1M Tris-HCl, pH = 7,5	50mM	50mM	50mM	50mM
5M NaCl	100mM	100mM	500mM	100mM
1M CaCl ₂	5mM	1mM	1mM	-----
0,5M EDTA	-----	-----	-----	1,5mM

Po eluci následovala kontrola čistoty proteinu na 15% SDS-PAGE. Vzorčky obsahovaly 10 µl proteinu a 2 µl 5x vzorkovacího pufru. Po kontrole čistoty a sloučení frakcí byl protein zakonzentrován na 2 ml, pomocí koncentrátoru s cut-off 10 kDa, a byla provedena gelová permeační chromatografie.

5.5.4 Gelová permeační chromatografie

Pro purifikaci kalmulinu byla použita kolona HiLoad® 26/600 Superdex® 75 pg. Průtok byl nastaven na 2 ml/min. Složení pufru pro purifikaci proteinu pomocí gelové permeační chromatografie je obsaženo v Tabulce 5.17.

Tabulka 5.17 - Složení pufru pro GPC

Pufr pro GPC
20mM Tris-HCl, pH =7,5
150mM NaCl
1mM CaCl ₂
10% glycerol

Následně byla provedena 15% SDS-PAGE. Vzorčky obsahovaly 10 µl frakce s proteinem a 2 µl vzorkovacího pufru. Frakce obsahující protein byly sloučeny, zakonzentrovány na koncentraci 1 mg/ml a zamraženy.

5.6 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 γΔC

5.6.1 Exprese proteinu a lyzace buněk

Fúzní protein 14-3-3γΔC je konstrukt bez flexibilního C-konce obsahující rezidua 1-234, který se chová jako dimer o velikosti 54 kDa. Roztok obsahující 5 ml LB média (složení viz Tabulka 5.4, str. 21), ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml a 10 µl zásobního glycerolového roztoku byl inkubován po dobu 15 hodin při 190 rpm a 37 °C v orbitálním inkubátoru. Do 900 ml LB média, obsahujícího ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml bylo přeneseno 5 ml narostlé kultury. Následovala inkubace v orbitálním inkubátoru Multitron při

37 °C a 210 rpm do $OD_{600} = 0,5 \text{ cm}^{-1}$, poté byla teplota snížena na 30 °C. Po dosažení $OD_{600} = 0,8$ bylo přidáno IPTG o finální koncentraci $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ a inkubace pokračovala při snížené teplotě po dobu 20 hodin. Poté byly kultury přelity do 900ml kyvet a centrifugovány rychlostí 2073 g při 4 °C po dobu 20 minut. Poté byla každá peleta resuspendována v 35 ml lyzačního pufru. Suspenze byla zmražena na teplotu -80 °C. Složení lyzačního pufru obsahuje Tabulka 5.18.

Tabulka 5.18 - Lyzační pufr pro protein 14-3-3

Lyzační pufr

1x PBS
2mM imidazol
1M NaCl
4mM β ME

5.6.2 Sonikace

Po rozmražení buněk následovala inkubace po dobu 20 minut s lysozymem o finální koncentraci $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$. Následně se přidalo PMSF o finální koncentraci $0,1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ a buňky byly vystaveny ultrazvuku při následujícím programu: 20 minut celkového času čisté sonikace, kde se střídaly intervaly 10 s zapnuto, 30 s vypnuto, při výkonu 50-60 W. Následně byl sonikát centrifugován při 19561 g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Dále se pracovalo se supernatantem.

5.6.3 Niklová chelatační chromatografie a štěpení TEV proteasou

Na purifikaci proteinu 14-3-3 z buněk získaných ze 3 l LB média bylo použito 5 ml matrice Chelating Sepharosy Fast Flow. Sepharosa byla promyta v následujícím pořadí: 15 ml destilované vody, 20 ml $0,1\text{M NiSO}_4$, 15 ml dH_2O , 15 ml pufru E. Následovala adsorbce sonikátu na matrici a následně byla matrice promyta 300 ml 10% F v pufru E. Dalším krokem byla eluce 20 ml F a byla provedena 15% SDS-PAGE. Vzorek obsahoval 2 μl proteinu, 8 μl vody a 2 μl vzorkovacího pufru. Následně byly sjednoceny frakce obsahující protein. Následovala dialýza po dobu 3 hodin. Poté bylo stanoveno množství proteinu a bylo přidáno ekvivalentní množství TEV proteasy. Inkubace probíhala při 30 °C po dobu 2 hodin. Poté byl protein dialyzován po dobu 15 hodin ve 4°C. Následující den byla provedena kontrola štěpení na 15% SDS-PAGE. Poté následovala aniontová výměnná chromatografie. Složení pufru E, F a dialyzačního pufru je uvedeno v Tabulce 5.19.

Tabulka 5.19 - Složení pufru E, F a dialyzačního pufru pro protein 14-3-3

Niklová chelatační chromatografie	Dialyzační pufr O/N 4 °C
Pufr E	Pufr F
1x PBS	20mM Tris-HCl, pH=7,5
0,5M NaCl	2mM EDTA, pH=8
1mM imidazol	10% glycerol
2mM β ME	2mM DTT
	600 mM imidazol
	2mM β ME

5.6.4 Aniontově výměnná chromatografie

Tento typ chromatografie mohl být použit díky kyselému pI, jehož hodnota pro protein 14-3-3 je 5,14. Byla použita kolona 10/50 s Q sepharosu. Nejprve byla kolona promyta pufrům F, následně pufrům E. Protein byl nanesen v prostředí pufru E na Q sepharosu. Pro eluci proteinu byl použit koncentrační gradient pufru F. Průtok byl nastaven na 1 ml/minutu a pro kontrolu čistoty proteinu byla použita 15% SDS-PAGE. Vzorky na SDS-PAGE obsahovaly 3 µl proteinu, 7 µl vody a 2 µl vzorkovacího pufru. Poté byly frakce obsahující protein 14-3-3 byly sloučeny a zakonzentrovány na 2 ml. Jelikož protein 14-3-3 tvoří dimery s velkou afinitou, byl použit koncentrátor s cut-off 30 kDa. Po zakonzentrování následovala gelová permeační chromatografie. Složení pufrů E a F je uvedeno v Tabulce 5.20.

Tabulka 5.20 - Složení pufrů pro aniontovou výměnnou chromatografii

Aniontová výměnná chromatografie	
Pufr E	Pufr F
50mM Tris-HCl, pH =8	50mM Tris-HCl, pH =8
1mM DTT	1mM DTT
	1M NaCl

5.6.5 Gelová permeační chromatografie

Pro protein 14-3-3 byla použita kolona HiLoad® 26/600 Superdex® 75 pg. Složení pufru je uvedeno v Tabulce 5.21. Průtok byl nastaven na 2 ml/min. Frakce byly sbírány po 1 ml.

Tabulka 5.21 - Složení pufru pro GPC

Pufr pro GPC
20mM Tris-HCl, pH =7,5
150mM NaCl
1mM EDTA
10% glycerol
5mM DTT

Následovala kontrola čistoty proteinu pomocí 15% SDS-PAGE (složení gelu viz Tabulka 5.5 na str.22). Vzorek obsahoval 4 µl proteinu, 6 µl vody a 2 µl vzorkovacího pufru. Frakce obsahující čistý protein byly sloučeny a následně byla stanovena koncentrace. Poté byl protein zamražen.

5.7 Exprese a purifikace CaMKK2-S100,S511

CaMKK2-S100S511 značí protein Ca²⁺/kalmmodulin-dependetní kinasu kinasu 2 obsahující rezidua 93-517 s mutacemi T145A, D330A, S495A, přičemž tento konstrukt má pouze dvě fosforylační místa (Ser100 a Ser511).

5.7.1 Exprese proteinu a lyzace buněk

CaMKK2 obsahuje rezidua 93-517 s molekulovou hmotností 48 kDa a molární absorpční koeficient v redukovaném stavu je 28880 M⁻¹cm⁻¹. Roztok, obsahující 5 ml LB média (složení viz Tabulka 5.4, str. 21), kanamycin o finální koncentraci 100 µg/ml a 10 µl zásobního glycerolového roztoku obsahující buňky E.Coli BL21(DE3) s DNA zmutované kinasy CaMKK2-S100,S511 ve vektoru pHGT2 (upravený vektor pRSFDuet-1), byl inkubován po dobu 15 hodin při 190 rpm a 37 °C v orbitálním inkubátoru. Následující den bylo 2,5 ml narostlé kultury přeneseno do 900 ml autoindukčního média (ZYP 5052, složení viz Tabulka 5.4, str. 21), obsahující kanamycin o finální koncentraci 280 µg/ml, a buňky byly inkubovány v orbitálním inkubátoru Multitron při 37 °C a 210 rpm do OD₆₀₀ = 0,5 cm⁻¹. Poté byla teplota snížena na 20 °C a inkubace pokračovala při snížené teplotě přes noc přibližně 18 hodin. Poté byly kultury přelity do 900ml kyvet a centrifugovány rychlostí 2073 g při 4 °C po dobu 20 minut. Každá peleta byla resuspendována v 50 ml lyzačního pufru a suspenze byla zmrazena na teplotu -80 °C. Složení lyzačního pufru obsahuje Tabulka 5.22.

Tabulka 5.22 - Složení lyzačního pufru

Lyzační pufr

1x PBS

2mM imidazol

1M NaCl

4mM βME

5.7.2 Sonikace

Po rozmražení buněk následovala inkubace po dobu 20 minut s lysozymem o finální koncentraci 0,1 µg/ml. Následně bylo přidáno PMSF o finální koncentraci 0,1 mmol/dm³ a buňky byly vystaveny ultrazvuku při následujícím programu: 20 minut celkového času čisté sonikace, kde se střídaly intervaly 3 s zapnuto, 17 s vypnuto, při výkonu 50-60 W. Poté byl sonikát centrifugován při 19561 g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Dále se pracovalo s proteinem v supernatantu.

5.7.3 Niklová chelatační chromatografie a štěpení pomocí TEV proteasy

Na purifikaci CaMKK2-S100,S511 ze 4 l LB média bylo použito 2 ml matrice Chelating Sepharosy Fast Flow. Sepharosa byla promyta v následujícím pořadí: 15 ml destilované vody, 20 ml 0,1M NiSO₄, 15 ml dH₂O a 15 ml pufru E. Následovala adsorbce proteinu na matici a poté byla matrice promyta 300 ml 10% F v pufru E. Dalším krokem byla eluce proteinu 10-15 ml pufru F do 14 ml dialyzačního pufru a protein byl následně dialyzován při 4 °C. Po 2

hodinách bylo stanoveno množství proteinu a do dialýzy bylo přidáno ekvivalentní množství TEV proteasy. Následovala dialýza po dobu 12 hodin při 4 °C. Po ukončení dialýzy byla provedena kontrola štěpení na 12% SDS-PAGE a poté následovala gelová permeační chromatografie. Složení pufru E, F a dialyzačního pufru je uvedeno v Tabulce 5.23.

Tabulka 5.23 - Složení pufru E, F a dialyzačního pufru

Niklová chelatační chromatografie		Dialyzační pufr O/N 4 °C
Pufr E	Pufr F	20mM Tris-HCl, pH=7,5
1x PBS	1x PBS	2mM EDTA, pH=8
0,5M NaCl	0,5 M NaCl	10% glycerol
1mM imidazol	600 mM imidazol	2mM βME
2mM βME	2mM βME	

5.7.4 Gelová permeační chromatografie

Po ukončení dialýzy byl protein zakoncentrován na objem 2 ml pomocí koncentrátoru s cut-off 30 kDa. Pro CaMKK2-S100,S511 byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg. Rychlost průtoku byla nastavena na 2 ml/min. Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii je uvedeno v Tabulce 5.24.

Tabulka 5.24 - Složení pufru pro GPC

Pufr pro GPC
50mM Tris-HCl pH=8
0,5M NaCl
5mM DTT
10% glycerol

Nakonec byla ověřena čistota pomocí 12% SDS-PAGE a frakce obsahující protein s dostatečnou čistotou byly sloučeny. Vzorek na 12% gel obsahoval 10 µl proteinu a 2 µl vzorkovacího pufru. Po sloučení frakcí se stanovila proteinová koncentrace a následně byl protein zmražen v -80 °C.

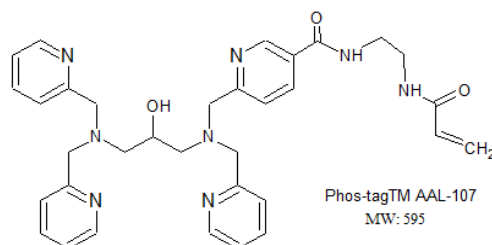
5.7.5 Fosforylace

Fosforylace proteinu je posttranslační modifikace, při které dochází k adici fosfátové skupiny na protein. Pro fosforylaci CaMKK2 byla použita cAMP-dependentní proteinkinasa A (PKA) v přítomnosti ATP a MgCl₂.

Jelikož má CaMKK2 dvě místa určená k fosforylaci, bylo nejdříve nutné zjistit, jaké množství PKA je optimální pro fosforylaci obou míst. Serin na pozici 100 se snadno a rychle fosforyluje, serin na pozici 511 vykazuje pomalejší kinetiku fosforylace. Průběhy fosforylačních reakcí byly vizualizovány pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50µM phos-tag (složení viz Tabulka 5.6 na straně 22). Pro ověření byla provedena ještě MS analýza. Výsledné množství potřebného PKA bylo stanoveno na 37,4 µg proteinkinasy A pro fosforylaci 1 mg proteinu CAMKK2-S100,S511.

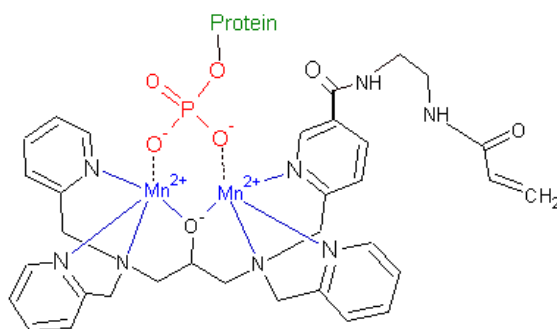
Pro fosforylaci CaMKK2-S100,S511 byla připravena reakční směs obsahující 750 μM ATP, 20mM MgCl_2 , CaMKK2 a PKA. Reakční směs byla inkubována při 30 $^\circ\text{C}$ po dobu 4 hodin. Následně byla provedena gelová permeační chromatografie.

5.7.5.1 Phos-tag gel



Obrázek 5.1 - Struktura Phos-tagu™ AAL-107. Vytvořeno v programu ChemSketch

Phos-tag je látka, která je schopna na sebe navázat fosfátovou skupinu fosforylovaných serinů, tyrosinů nebo threoninů v přítomnosti manganatých nebo zinečnatých iontů (viz Obrázek 5.1 a 5.2). Po navázání snižuje migrační rychlost fosforylovaných proteinů v polyakrylamidovém gelu. Čím více fosforylovaných aminokyselin, tím nižší migrační rychlost. Při phos-tag SDS-PAGE bylo nutné optimalizovat dobu trvání elektroforézy a složení gelu. Nakonec byl použit 12% SDS-polyakrylamidový gel obsahující 50 μM Phos-tag a doba elektroforézy byla 4 hodiny.



Obrázek 5.2 - Struktura Phos-tagu s vazbou na fosforylovaný protein v přítomnosti manganatých kationtů. Struktura byla vytvořena v programu ChemSketch.[44].

5.7.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní analýza se využívá k identifikaci molekul na základě určení poměru hmotnosti a náboje (m/z). Spektrometr se skládá z ionizátoru, kde se látka zionizuje, a ve formě plynu putuje do hmotnostního analyzátoru. Podle typu analyzátoru se látka rozdělí podle své kinetické energie (elektrický analyzátor) nebo podle poměru m/z (magnetický hmotnostní analyzátor). Analyzátorů mohou být kvadrupóly, iontové pasti atd. Poslední částí je detektor.

Rozdělení látky podle poměru m/z vyplývá z rovnice pro kinetickou energii iontu (1) a z rovnice pro výpočet Lorentzovy síly, která působí na ion v magnetickém poli a je v rovnováze se silou odstředivou (2). Dosazením rovnice (1) do rovnice (2) získáme tzv. rovnici hmotnostního spektrometru (3) [45].

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = zV \quad (1)$$

$$F_L = Bzv = mv^2/r \quad (2)$$

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (3)$$

(E_k - kinetickou energii iontu, m - hmotnost iontu, v - rychlost iontu, z - náboj iontu, V - akcelerační napětí iontového zdroje, F_L – Lorentzova síla, B - magnetická indukce, r - poloměr dráhy iontu).

Pro sledování úrovně fosforylace byly vzorky podrobeny hmotnostně spektrometrické analýze v servisním středisku Centra molekulární struktury v BioCevu. Hmotnostně spektrometrickou analýzu provedl RNDr. Petr Pompach, Ph.D pomocí hmotnostního spektrometru s iontově cyklotronovou celou - 15T solariX FT-ICR (Bruker Daltonics). Protein byl štěpen přímo na koloně s imobilizovaným pepsinem a vzniklé peptidy byly následně separovány na koloně s obrácenou fází C18, která byla spojena s iontovým zdrojem (elektrosprej) hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním, na datech závislém módu. Získaná data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics) a vytvořené mgf soubory byly vloženy do vyhledávacího programu Mascot.

Na základě hmotnostně spektrometrické analýzy byla ověřena fosforylace Ser100 a Ser511.

5.7.6 Gelová permeační chromatografie po fosforylaci

Fosforylovaný protein musel být zbaven ATP, PKA a dalších nečistot prostřednictvím purifikace na koloně Superdex®HiLoad 26/600 200 pg. Protein byl zakoncentrován na 2 ml, průtok činil 2 ml/min a frakce byly sbírány po 1,5 ml. Následovala kontrola čistoty na 12% SDS-PAGE. Následně byl protein zmrazen nebo byl rovnou použit k experimentu. Složení pufrů pro gelovou permeační chromatografii je uvedeno v Tabulce 5.25.

Tabulka 5.25 - Složení pufrů pro GPC po fosforylaci

Pufr pro GPC po fosforylaci k zamražení	Pufr pro GPC po fosforylaci na AUC
50mM Tris-HCl pH7,5	50mM Tris-HCl pH7,5
10% glycerol	150mM NaCl
150mM NaCl	1mM TCEP
5mM DTT	

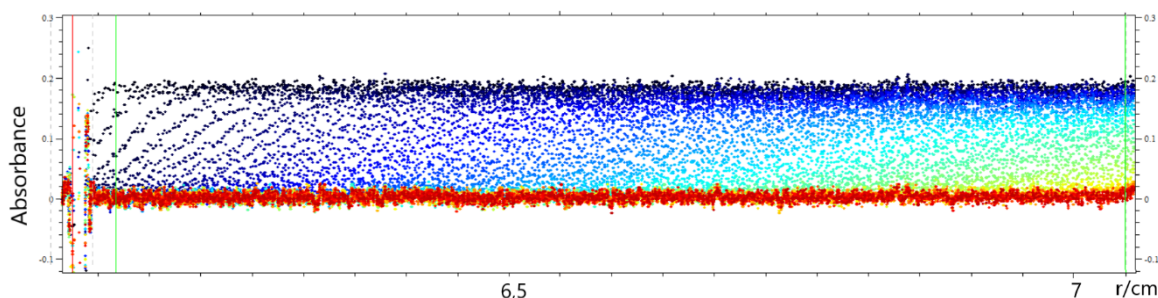
5.7.7 Analytická ultracentrifugace (AUC)

Analytická centrifugace (AUC) je metoda určená ke studiu proteinů a proteinových komplexů. Existují dva typy metod při použití AUC, jsou to sedimentační rychlost a sedimentační rovnováha. Pomocí metody sedimentační rychlosti můžeme určit sedimentační koeficient a hydrodynamické vlastnosti. Pomocí metody sedimentační rovnováhy lze vyhodnotit molekulovou hmotnost a disociační konstantu [46]. Odstředivé síly jsou příčinnou pohybu makromolekul směrem ke dnu kyvety, v důsledku čehož vzniká tzv. koncentrační rozhraní jehož pohyb je sledován jako funkce času (viz Obrázek 5.3 na straně 36).

Definice sedimentačního koeficientu makromolekul, s , je dána Svedbergovou rovnicí (4),

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1-\bar{v}\rho)}{RT} \quad (4)$$

Kde u je rychlost sedimentace makromolekuly, ω je úhlová rychlost rotoru, r je vzdálenost makromolekuly od osy rotace, M je relativní molekulová hmotnost makromolekuly (Da), f je frikční koeficient, N_A je Avogadrova konstanta, D je difúzní koeficient, R je univerzální plynová konstanta, ρ je hustota ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), T je termodynamická teplota, \bar{v} je specifický objem makromolekuly (cm^3/g), Jednotka sedimentačního koeficientu je Svedberg (S) a je rovna 10^{-13} sekund [46].



Obrázek 5.3 - Závislost absorbance vzorku na vzdálenosti od osy rotace a časová změna této závislosti. Data sbírána v různých časových okamžicích jsou od sebe odlišeny barevně. Modře - data sbíraná na začátku experimentu, červeně – naměřená absorbance u konce experimentu. Vytvořeno v programu SEDFIT [48].

Měření

Pro analýzu byly připraveny vzorky obsahující různé molární poměry proteinů CaMKK2, CaM a 14-3-3 (viz Tabulka 5.25). Pro určení stechiometrie komplexu a zdánlivé disociační konstanty byla použita metoda sedimentační rychlosti za použití centrifugy ProteomLab™ XL-I (Beckman Coulter, USA). Měření a vyhodnocení provedla Mgr. Olívia Petřalská, Ph.D. Data byla sbírána při 141995 g a 20 °C při vlnové délce 280 nm.

Tabulka 5.26 - Molární poměry proteinů ve vzorcích pro analytickou centrifugaci

CaMKK2: protein 14-3-3	CaMKK2: protein 14-3-3: CaM
1:20	1:1:20
1:6	1:1:6
1:2	1:1:2
3:2	3:3:2
5:1	5:5:1

Vyhodnocení

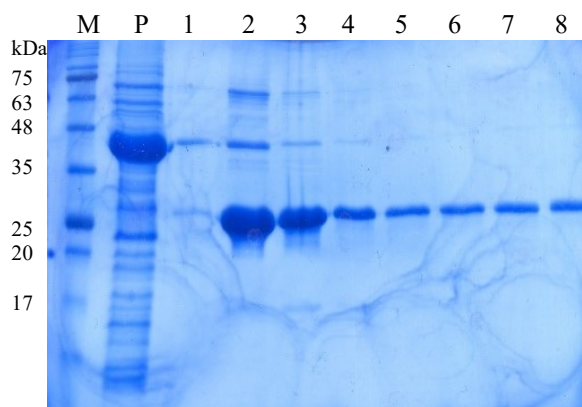
Jako první krok byla vypočítána hustota a viskozita použitého pufru za pomoci programu Sednterp [47]. Hodnota viskozity byla stanovena na 0,010312 St (1 Stokes = $1 \text{ cm}^2/\text{s}$) a hodnota hustoty byla stanovena na $1,0058 \text{ g}/\text{cm}^3$. Následně byla data vyhodnocena programem SEDFIT [48]. Do programu byly zadány vypočítané hodnoty hustoty a viskozity. Následně byly načteny data z analytické ultracentrifugace. Výsledné distribuce sedimentačních koeficientů byly vyneseny v programu Gussi [49] a distribuční funkce byly normalizovány podle plochy pod křivkou. Zdánlivá disociační konstanta byla stanovena v programu SEDPHAT.

6 Výsledky

6.1 Purifikace TEV proteasy

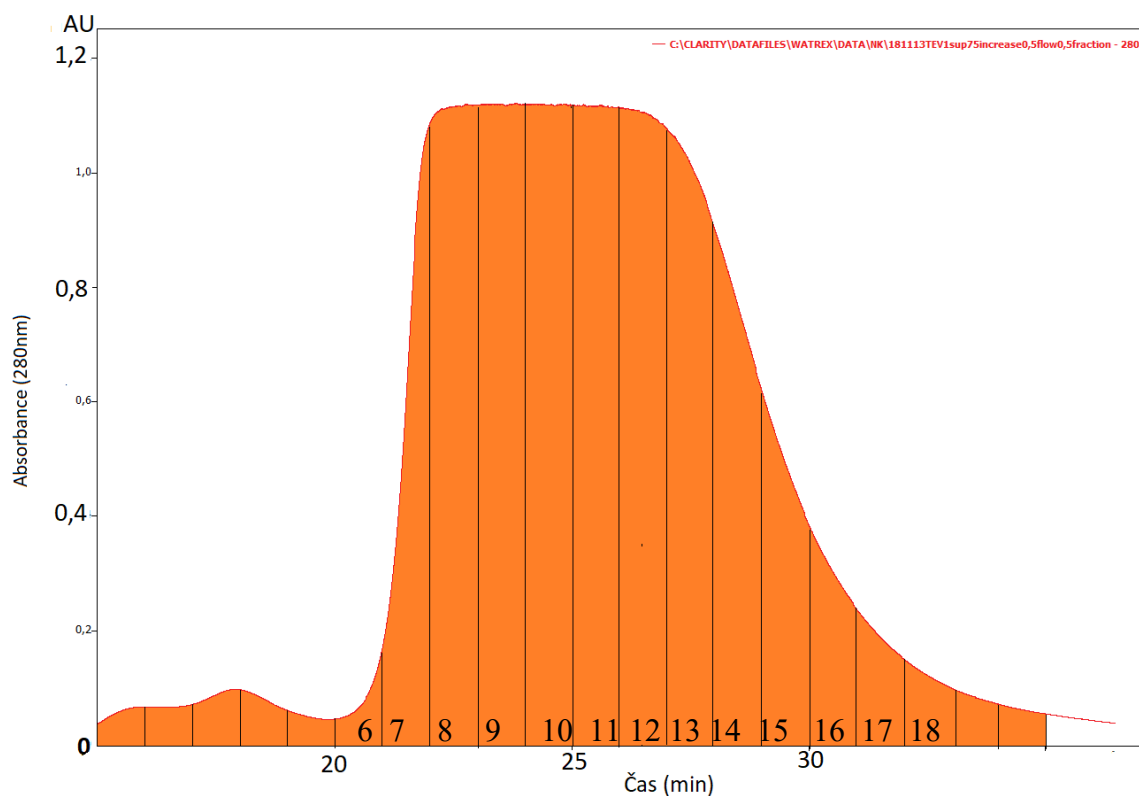
Pro snazší purifikaci rekombinantních proteinů CaMKK2 a 14-3-3 obsahují tyto proteiny na N-konci histidinovou kotvu po níž následuje štěpící místo pro TEV proteasu. Po niklové chelatační chromatografii tato kotva už není dále potřebná, a proto je štěpena TEV proteasou. Průběh purifikace TEV proteasy je vizualizován pomocí 15% polyakrylamidových SDS gelů, jejichž složení je uvedeno v Tabulce 5.5 na straně 22.

Purifikace TEV proteasy probíhala dle postupu popsáno v kapitole 5.3 na straně 23. Po rekombinantní expresi proteinu v kmenu bakterií BL21(DE3), následovala disrupce buněk s použitím ultrazvuku a izolace proteinu pomocí niklové chelatační chromatografie. Čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii byla vizualizována pomocí 15% SDS-PAGE (Obrázek 6.1).

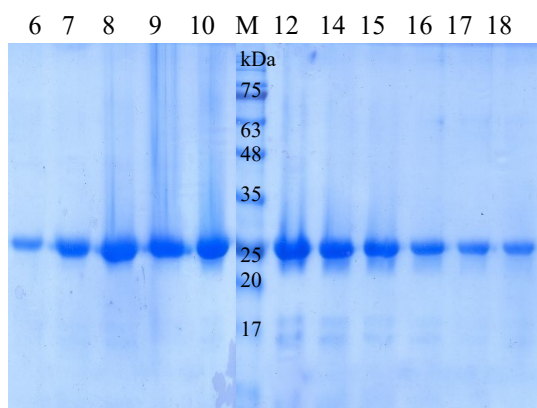


Obrázek 6.1 - Výsledek 15% SDS-PAGE po niklové chelatační chromatografii. M-Standard molekulových vah, P-peleta po centrifugaci sonikátu, 1-8 -Eluční frakce. Vzorky nanesené na gel obsahovaly 3 μ l proteinu, 7 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.

Z SDS-PAGE na Obrázku 6.1 je patrné, že žádná TEV proteasa nezůstala v peletě. Jelikož čistota nebyla optimální, bylo zapotřebí provést další purifikační krok, gelovou permeační chromatografií, pro níž byly použity a zakoncentrovány frakce 2-8. Protein byl purifikován na koloně Superdex® Increase 75 10/300 GL, při průtoku 0,5 ml/min. Průběh gelové permeační chromatografie je vizualizován pomocí chromatogramu na Obrázku 6.2 na straně 38. Následně byla provedena 15% SDS-PAGE jež obsahovala frakce po gelové permeační chromatografii s čísly 6,7,8,9,10,12,14,15,16,17 a 18 (viz Obrázek 6.3 na straně 38). Vzorky obsahovaly 5 μ l proteinu, 5 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.



Obrázek 6.2 – Chromatogram během purifikace TEV proteasy při použití kolony Superdex® Increase 75 10/300 GL.. Rychlost průtoku byla nastavena na 0,5 ml/minutu. Před gelovou permeační chromatografií byla TEV proteasa zakonzentrována na 0,5 ml. Červená křivka představuje hodnotu absorbance při 280 nm. Černě jsou vyznačené sbírané frakce.

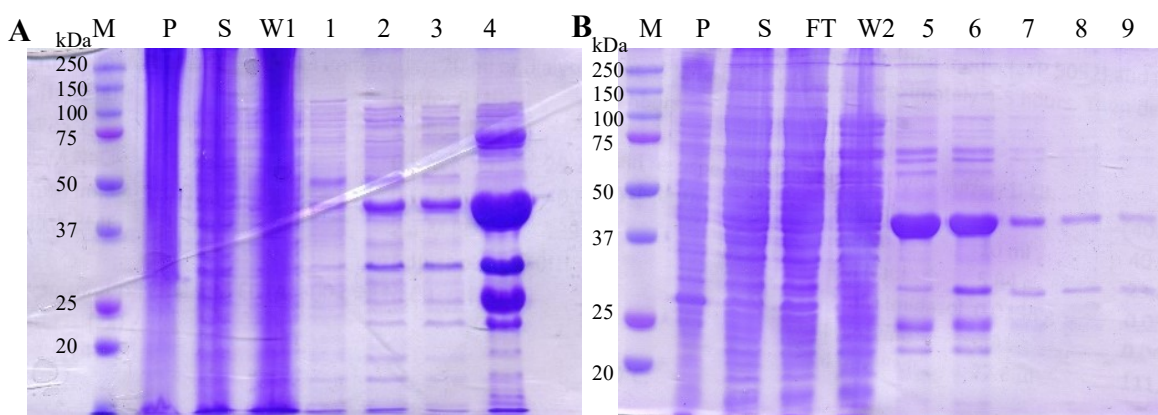


Obrázek 6.3 - Kontrola čistoty purifikované TEV-proteasy pomocí 15% SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii. Vzorky obsahovaly 5 μ l proteinu, 5 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.

Z 15% SDS-PAGE je patrné, že purifikovaná TEV proteasa byla získána v dostatečné čistotě. Frakce 2-18 byly sjednoceny a protein byl zředěn na výslednou koncentraci 0,838 mg/ml. Celkový výtěžek TEV proteasy z jednoho litru buněčných kultur bylo 12,3 mg.

6.2 Purifikace cAMP-dependentní proteinkinasy A

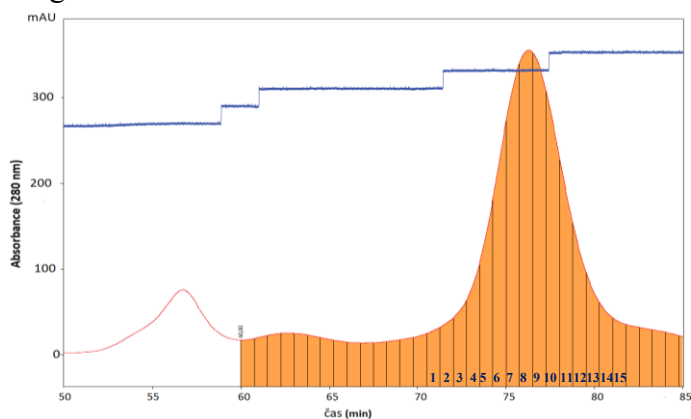
Pro optimalizaci fosforylačního protokolu CaMKK2-S100,S511 bylo zapotřebí nejdříve získat čistou cAMP-dependentní proteinkinasu A (PKA). Hlavním úkolem po sonikaci buněk obsahujícím tento protein bylo nalézt optimální množství imidazolu v promývacím pufru. Standardní množství imidazolu (40mM) používané na ostatní proteiny bylo pro PKA příliš vysoké a docházelo k vymývání proteinu z matrice. Afinity PKA k matrici byla studována pro různé koncentrace imidazolu v promývacím pufru (viz Obrázek 6.4A). Bylo zjištěno, že k vymývání PKA dochází již při 30mM koncentraci imidazolu. Při promytí kolony 10mM imidazolem však čistota PKA nebyla dostatečná. Z těchto důvodů byl zvolen promývací pufr obsahující 20mM imidazol a eluční pufr obsahující 400mM imidazol. Eluce tímto způsobem je znázorněna na Obrázku 6.4B.



Obrázek 6.4 - 12% SDS-polyakrylamidový gely po niklové chelatační chromatografii. M - Marker, P - peleta po centrifugování, S - sonikát po centrifugování. A - W1 - roztok prošlý kolonou při promytí 100 ml 10mM imidazolu. 1-4 - eluce 20mM, 30mM, 40mM a 400mM imidazolem. B - FT - roztok prošlý kolonou při adsorpci sonikátu, W2 - roztok prošlý kolonou při promytí 100 ml 20mM imidazolu. Frakce 5-9 - eluce 7ml 400mM imidazolem, sbírané po 1,5 mililitru. Vzorky na SDS-PAGE obsahovaly 10 μ l proteinu a 2 μ l vzorkovacího pufru.

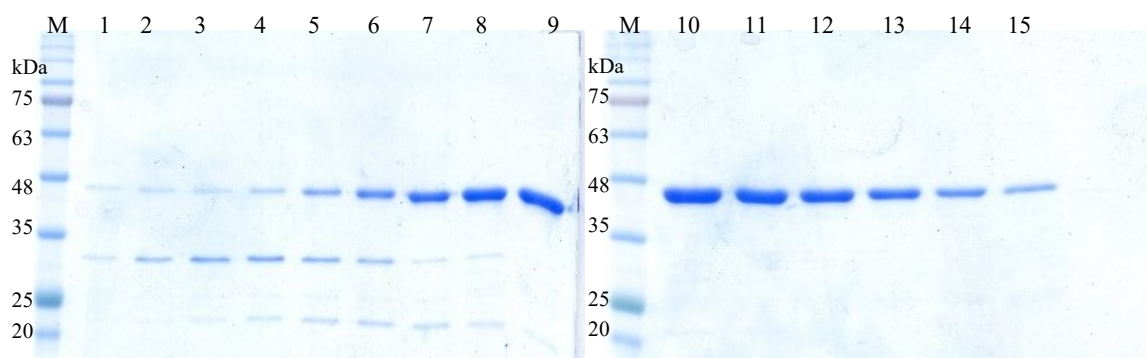
Vzorky 5 a 6 byly shledány jako dostatečně čisté na následující purifikační krok, gelovou permeační chromatografií, které předcházela dialýza přes noc pro odstranění veškerého imidazolu.

Pro purifikaci PKA byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg. Průtok byl nastaven na 2 ml/min a frakce byly sbírány po 1,5 mililitrech. Průběh gelové permeační chromatografie je znázorněn chromatogramem na Obrázku 6.5.



Obrázek 6.5 - Chromatogram při gelové permeační chromatografii, za použití kolony HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg, při průtoku 2 ml/min. Červenou křivkou je znázorněna absorbance při 280 nm. Oranžově jsou znázorněny sbírané frakce.

Čistota proteinu po eluci byla zkontrolována pomocí 12% SDS-PAGE (viz Obrázek 6.6). Na gel byly nanášeny vzorky obsahující 10 µl proteinu z frakcí 1-15.



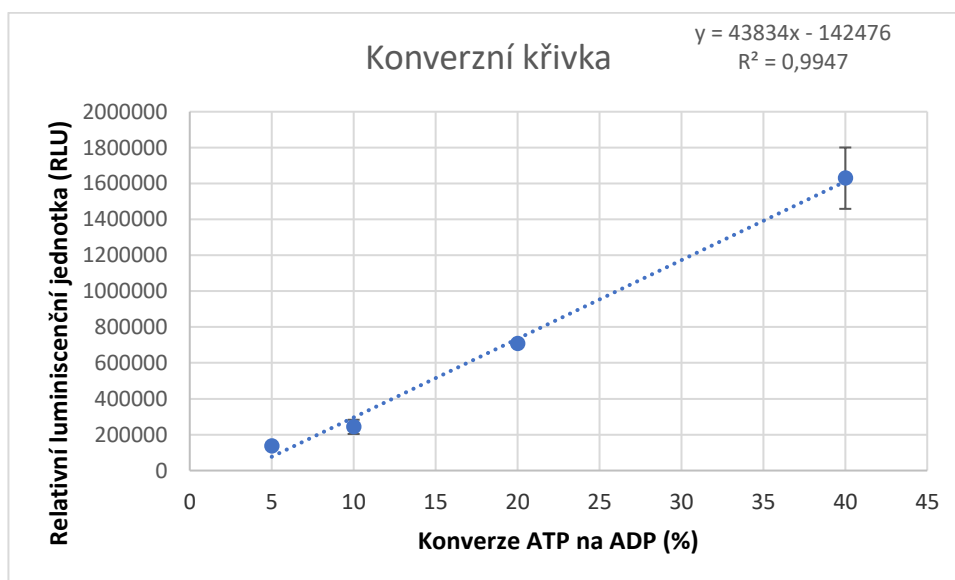
Obrázek 6.6 - 12% SDS polyakrylamidové gely obsahující vzorky po gelové permeační chromatografii. Vzorky na gel obsahovaly 10 µl proteinu a 2 µl vzorkovacího pufru.

Pro další experimenty byly sjednoceny frakce 9-13 a PKA byla zakoncentrována na 60 µM a výtěžek z jednoho litru buněčných kultur byl 1,5 mg.

6.2.1 Meření kinasové aktivity purifikované PKA

Kinasová aktivita PKA byla měřena komerční sadou ADP-Glo™.

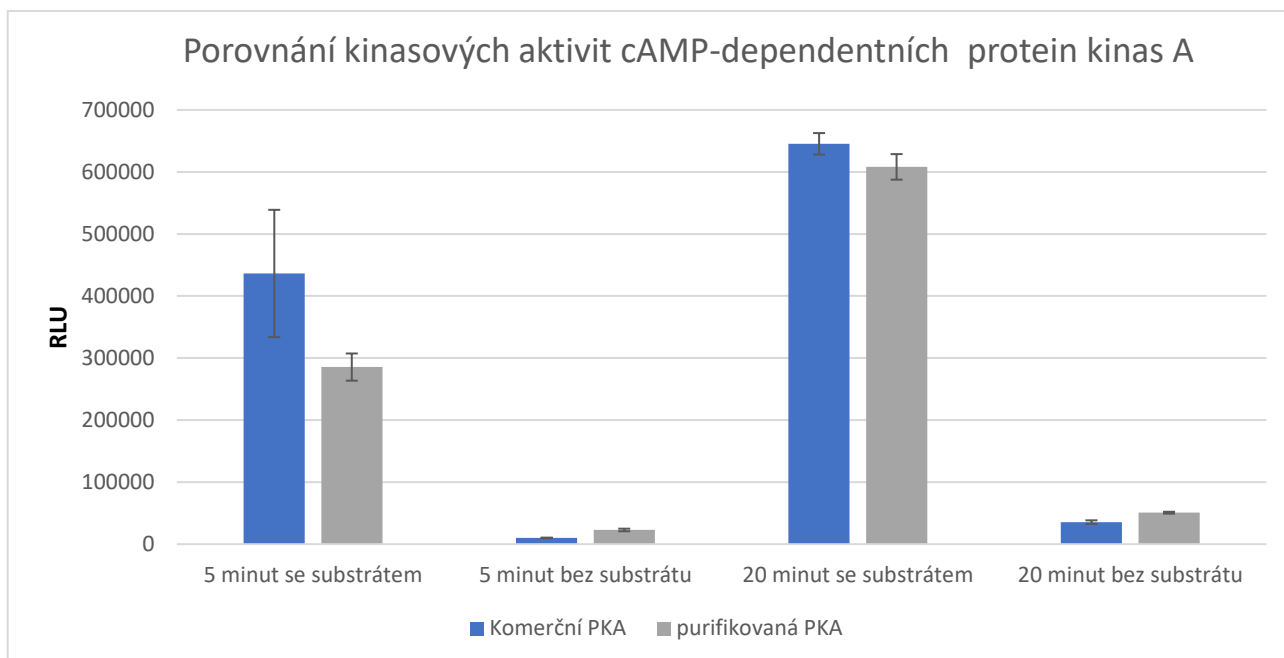
Pro stanovení aktivity bylo potřeba nejdříve sestavit konverzní křivku. Pro sestavení této křivky bylo použito 5%, 10%, 20% a 40% roztok ADP v ATP (viz Graf 6.1). Přidáním prvního činidla do reakce dochází k odstranění reziduálního ATP. Teprve po přidání druhého činidla, které přeměnilo ADP na ATP, mohla být naměřena lumiscence jednotlivých vzorků. Experiment byl prováděn v triplicátech.



Graf 6.1 - Křivka konverze ATP na ADP. Na ose y – signál lumiscence v RLU. Na ose x je vynesena konverze.

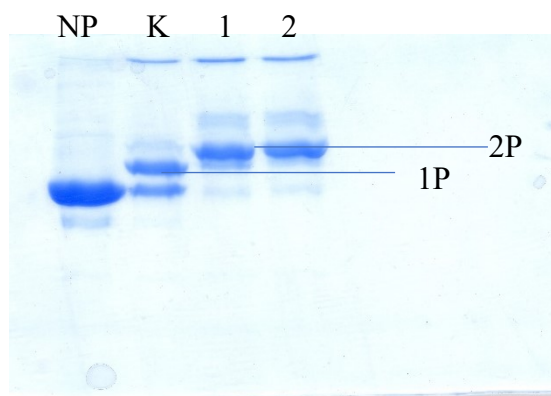
Díky konverzní křivce mohl být luminescenční signál následně převeden na spotřebu ATP. Intenzita luminescenčního signálu byla měřena v 96-jamkové mikroděstičce pomocí luminescenční čtečky Infinite M200 PRO.

Poté byla porovnána kinasová aktivita komerční a vypurifikované PKA (viz Graf 6.2). Měření probíhalo opět v triplikátech. Pro zředění proteinkinasy byl použit pufr obsahující 40mM Tris-HCl pH=7,5, 20mM MgCl₂ a 2mM DTT. Reakční směs je uvedena v Tabulce 5.14 straně 27.



Graf 6.2 - Porovnání kinasových aktivit proteinkinasy A. Se substrátem – reakční směs obsahovala MBP. Bez substrátu - směs neobsahovala MBP. 5 minut a 20 minut značí dobu inkubace fosforylační reakce.

Z výsledků je patrné, že aktivita purifikované proteinkinasy je mírně nižší než u komerční. Zatímco komerční PKA dosáhla po 20 minutách v průměru 17,5% konverze, purifikovaná PKA dosáhla v průměru 16% konverze. Kontrola kinasových aktivit byla vizualizována na 12% SDS-PAGE obsahující 50μM phos-tage. Substrátem byla tentokrát 4μM CaMKK2. Bylo použito 2684 U PKA na miligram CaMKK2. Výsledek fosforylace lze vidět na Obrázku 6.7.



Obrázek 6.7 - Porovnání kinasových aktivit pomocí phos-tag gelu. NP – nefosforylovaná CaMKK2. K- Fosforylovaná CaMKK2 purifikovanou proteinkinasou po 20 minutách. 1 – Fosforylace CaMKK2 purifikovanou PKA (2684U PKA/mg CaMKK2) po dobu inkubace 4 hodin. 2 - Fosforylace CaMKK2 komerční PKA po dobu inkubace 4 hodin. 1P – CaMKK2 obsahující fosforylovaný serin pouze na jedné pozici. 2P – CaMKK2 obsahující fosforylovaný Ser100 i Ser511.

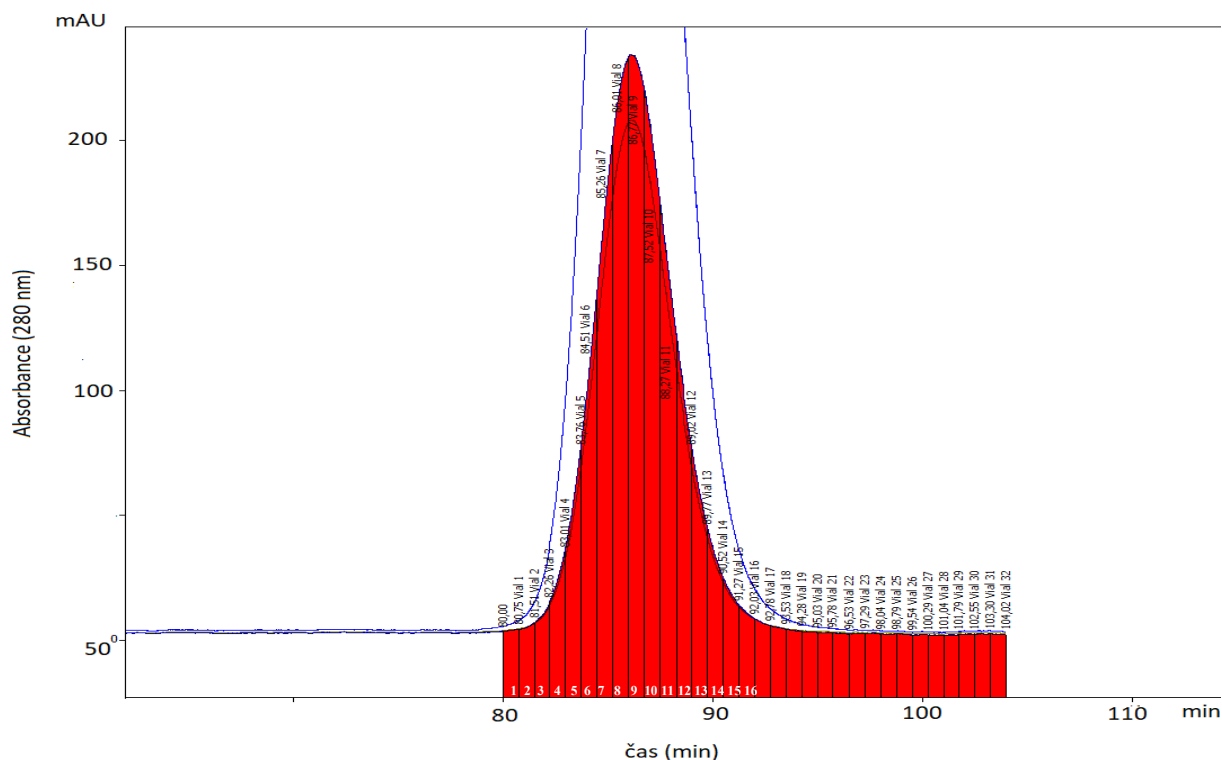
6.3 Purifikace kalmodulinu

Díky změně konformace po navázání Ca^{2+} , lze použít pro purifikaci kalmodulinu hydrofobní interakční chromatografii. Kalmodulin byl purifikován dle postupu popsaného v kapitole 5.5 začínající na straně 27. Po eluci byly připraveny vzorky na 15% SDS-PAGE, obsahující 10 μl proteinu a 2 μl 5xpufru pro přípravu vzorků (složení obsahuje Tabulka 5.2 na straně 21). Z Obrázku 6.8 lze pozorovat, že už po chromatografii založené na hydrofóbních interakcích je purifikovaný kalmodulin velmi čistý. Avšak pro odstranění případných agregátů je zapotřebí provést ještě gelovou permeační chromatografii.



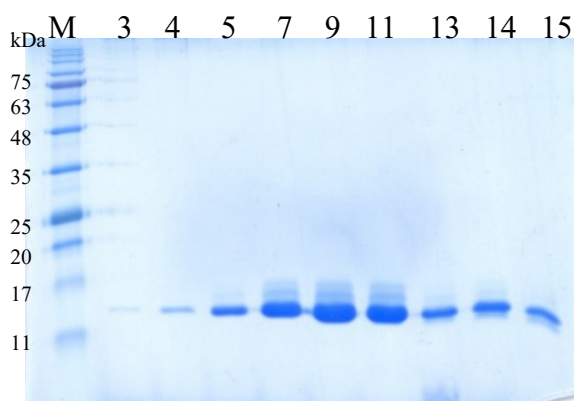
Obrázek 6.8 - Gel z 15% SDS-PAGE po hydrofóbní interakční chromatografii. M – Marker, 1-9 Získané frakce po eluci. Vzorky pro SDS-PAGE obsahovaly 10 μl proteinu a 2 μl vzorkovacího pufru.

Po sjednocení frakcí 4-7 byl protein zakoncentrován na 2 ml a byla provedena gelová permeační chromatografie. Pro kalmodulin byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg, průtok činil 2 ml/min a frakce byly sbírány po 1,5 ml. Průběh gelové permeační chromatografie je znázorněn chromatogramem (viz Obrázek 6.9).



Obrázek 6.9 - Chromatogram během gelové permeační chromatografie. Černá křivka znázorňuje hodnotu absorbance při vlnové délce 280 nm. Červeně jsou značeny sbírané frakce. Byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg, při průtoku 2ml/min. Sběr frakcí byl po 1,5 ml.

Po gelové permeační chromatografii následovala kontrola čistoty proteinu pomocí 15% SDS-PAGE. Vzorky obsahovaly 10 μ l proteinu a 2 μ l vzorkovacího pufru. Na gel byly naneseny frakce 3,4, 5,7,9,11,13,14, 15 (viz Obrázek 6.10).

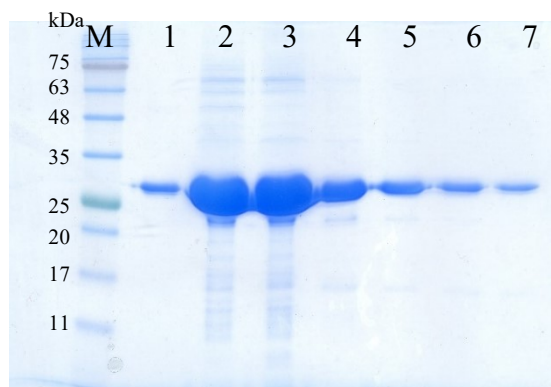


Obrázek 6.10 - Kontrola čistoty proteinu pomocí 15% SDS-PAGE. Vzorky obsahovaly 10 μ l proteinu, a 2 μ l vzorkovacího pufru. M – Standard molekulových vah, 3-15 získané frakce po gelové permeační chromatografii.

Podle chromatogramu i podle 15% SDS-polyakrylamidového gelu je čistota vypurifikovaného kalmodulinu dostatečná pro další experimenty. Frakce 5-14 byly sjednoceny a protein byl zakoncentrován na koncentraci 1 mg/ml. CaM byl vypurifikován s výtěžkem 12 mg ze 4 l buněčné kultury.

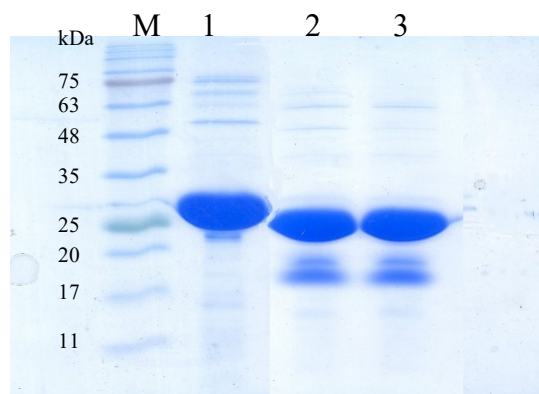
6.4 Purifikace proteinu 14-3-3 Δ C

Fúzní protein 14-3-3 Δ C je konstrukt bez flexibilního C-konce obsahující rezidua 1-234 a histidinovou kotvu, díky které ho lze oddělit od většiny jiných proteinů pomocí niklové chelatační chromatografie. Purifikace probíhala dle postupu v kapitole 5.6 začínající na straně 29. Pro vizualizaci čistoty proteinu po niklové chelatační chromatografii byla použita 15% SDS-PAGE (viz Obrázek 6.11). Jelikož se protein 14-3-3 exprimuje ve velkém množství, vzorek na SDS-polyakrylamidovém gelu obsahoval pouze 2 μ l nasbírané frakce, 8 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.



Obrázek 6.11 - 15% SDS- polyakrylamidový gel, obsahující frakce po niklové chelatační chromatografii. M-standard molekulových vah, Frakce 1-7 – protein získaný po eluci při niklové chromatografii. Vzorky na SDS-PAGE obsahovaly 2 μ l proteinu, 8 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.

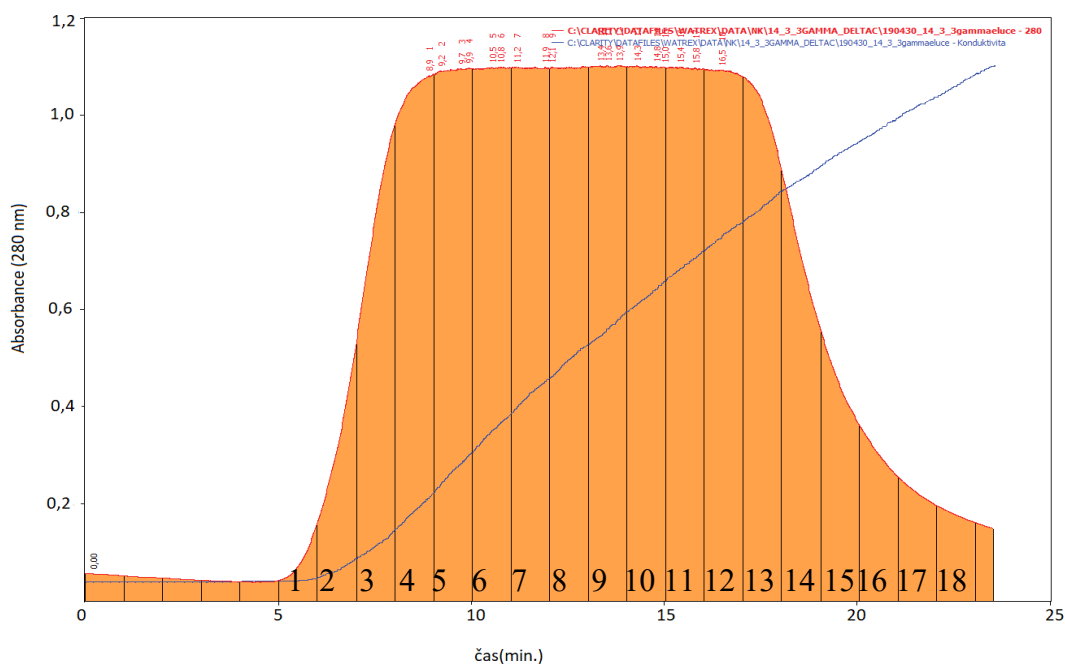
Po niklové chelatační chromatografii následuje odštěpení histidinové kotvy, která už nemá žádný význam. TEV proteasa velice špatně štěpí histidinovou kotvu u proteinu 14-3-3, proto bylo zapotřebí použít 120% vypočítaného množství TEV proteasy. Po dialýze přes noc následovala kontrola štěpení pomocí 15% SDS-PAGE, jejíž výsledek je vizualiován na Obrázku 6.12.



Obrázek 6.12 - Kontrola po štěpení TEV proteasou. M - standard molekulových vah. 1 – Vzorek před štěpením. 2 a 3 - Vzorky po štěpení. Velkost proteinu bez histidinové kotvy je přibližně 27 kDa, což odpovídá pozici proteinu na gelu. 2 μ l proteinu, 8 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.

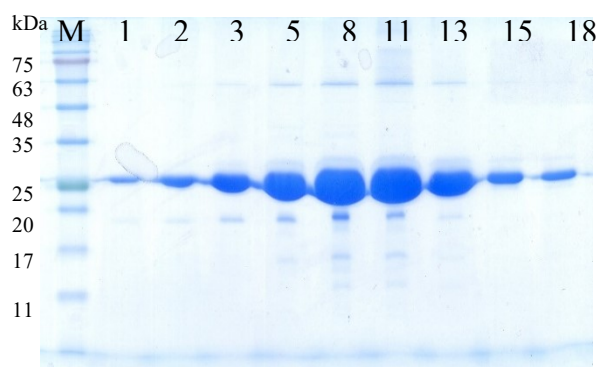
Z 15% SDS-PAGE je patrné, že protein 14-3-3 už neobsahuje histidinovou kotvu, tudíž bylo možné pokračovat k dalšímu purifikačnímu kroku, jež je iontová výměnná chromatografie.

Hodnota izoelektrického bodu proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta C$, získaná pomocí programu Protparam, leží v kyselé oblasti (5,14). Pro proteiny podobné povahy je vhodnou strategií purifikace pomocí aniontově výměnné chromatografie, čehož bylo využito i v tomto případě. Průběh chromatografie je zobrazen na Obrázku 6.13. Průtok činil 1 ml/min a sběr frakcí byl po jednom mililitru.



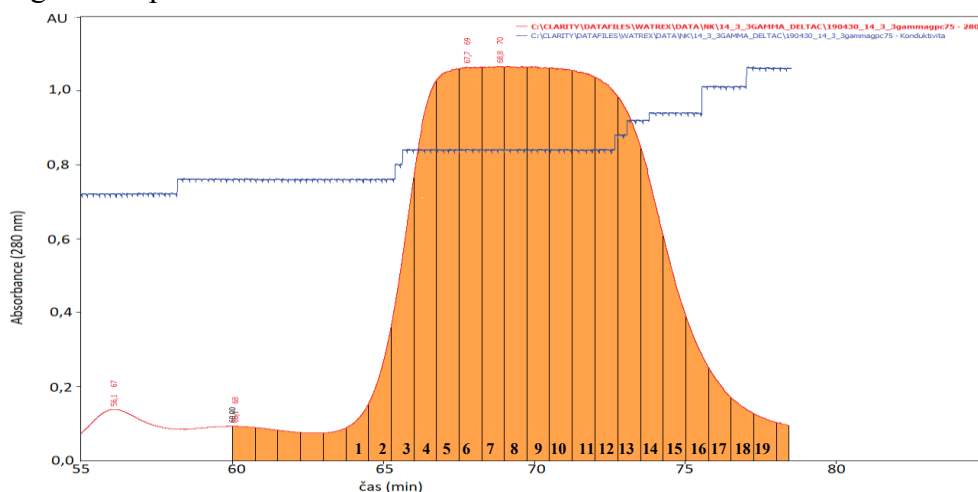
Obrázek 6.13 - Chromatogram z aniontové výměnné chromatografie. Pro 14-3-3 byla použita kolona 10/50 s Q sepharosou. Červená křivka znázorňuje hodnotu absorbance při vlnové délce 280 nm. Modrá křivka znázorňuje rostoucí konduktivitu v důsledku eluce gradientem soli. Průtok byl nastaven na 1 ml/min.

Po eluci byla zkontrolována čistota proteinu pomocí 15% SDS-PAGE, jež je zobrazena na Obrázku 6.14. Vzorčky pro SDS-PAGE po aniontové výměnné chromatografii obsahovaly 3 μ l proteinu a 7 μ l vody.



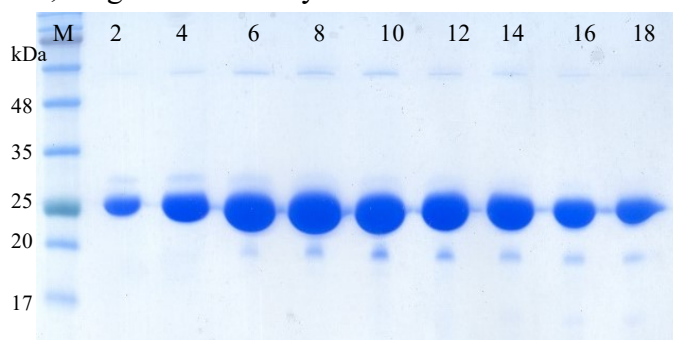
Obrázek 6.14 - Výsledek 15% SDS-PAGE. Do první jamky zleva bylo nanášeno 5 μ l standardu molekulových hmotností (M). Následovaly vzorky obsahující 3 μ l proteinu z frakcí 1, 2, 3, 5, 8, 11, 13, 15 a 18, 7 μ l vody a 2 μ l vzorkovacího pufru.

Posledním purifikačním krokem pro odstranění nečistot byla gelová permeační chromatografie. Při rychlosti průtoku 2ml/minutu byly sbírány frakce po 1,5 ml. Kolona používaná pro purifikaci proteinu 14-3-3 byla HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg a výsledný chromatogram lze pozorovat na Obrázku 6.15.



Obrázek 6.15 - Průběh gelové permeační chromatografie, při průtoku 2 ml/min byly sbírány frakce po 1,5

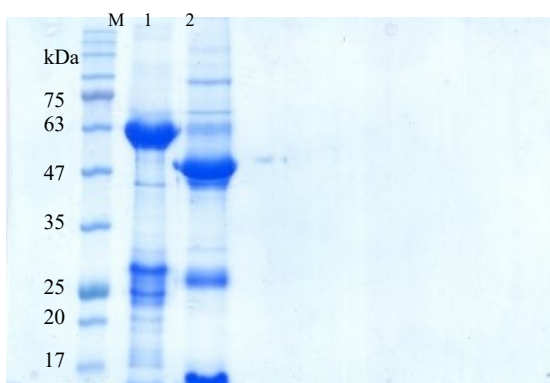
Kvalita a čistota proteinu byla opět kontrolována pomocí 15% SDS-PAGE. (viz Obrázek 6.16). Frakce 2 až 18 byly sjednoceny. Přestože lze stále pozorovat jisté nečistoty, v porovnání se samotným proteinem jsou zanedbatelné. Po stanovení proteinové koncentrace byl finální výtěžek 44,1 mg ze 3 l buněčných kultur.



Obrázek 6.16 - Gel po 15% SDS-PAGE. Vzorčky z frakcí po gelové permeační chromatografii obsahovaly 4 μ l proteinu, 6 μ l pufru. a 2 μ l vzorkovacího pufru. M- Standard

6.5 Purifikace CaMKK2-S100,S511 a následná fosforylace

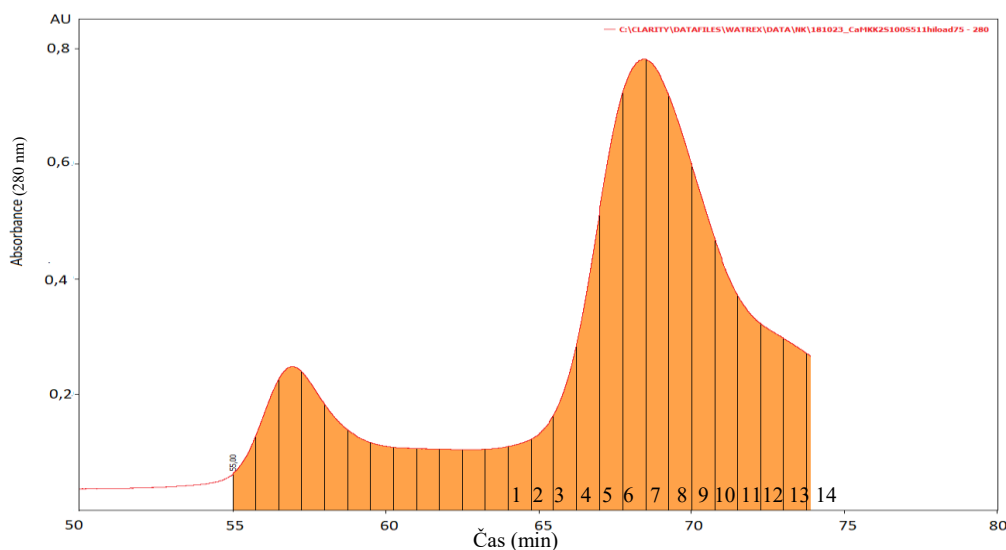
Produktem exprese konstruktů obsahujících gen pro mutantní variantu CaMKK2-S100,S511 je fúzní protein s B1 doménou proteinu G, který díky svému hydrofilnímu charakteru napomáhá rozpustnosti proteinu. Tento konstrukt navíc obsahuje histidinovou kotvu, díky které ho lze oddělit ze směsi bakteriálních proteinů opět pomocí niklové chelatační chromatografie. Purifikace probíhala dle postupu v kapitole 5.7 začínající na straně 32. Jelikož CaMKK2 v přítomnosti imidazolu precipituje, protein je při eluci rovnou ředěn dialyzačním pufrům v poměru, CaMKK2:pufr, jedna ku dvěma. Následuje dialýza a štěpení TEV proteasou, které probíhá při 4 °C přes noc, přičemž CaMKK2 má snadno odštěpitelnou histidinovou kotvu oproti proteinu 14-3-3. Kontrola štěpení je provedena pomocí 12% SDS-PAGE (složení gelu viz Tabulka 5.5 na straně 22) a výsledek štěpení je znázorněn na Obrázku 6.17.



Obrázek 6.17 - 12% SDS- polyakrylamidový gel po štěpení CaMKK2-S100,S511 pomocí TEV proteasy při 4°C přes noc.. Značení: M-Standard molekulových vah, 1 - Odebrán vzorek před štěpením, 2- odebrán vzorek po štěpení. Obě frakce jsou zředěny dialyzačním pufrům. Purifikace z 8 litrů. Vzorky na gel obsahují 10 μ l zředěného proteinu a 2 μ l vzorkovacího pufru.

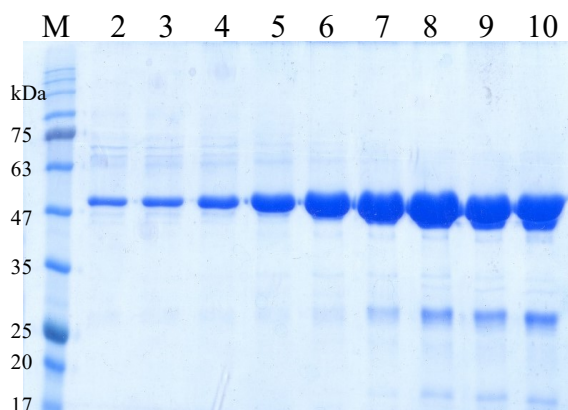
Úspěšné odštěpení histidinové kotvy lze snadno určit z posunu proteinu na 12% SDS-polyakrylamidovém gelu.

Pro oddělení proteinu od agregátů, TEV proteasy a jiných nečistot je zapotřebí provést gelovou permeační chromatografii. V tomto případě byla využita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg, průtok byl nastaven na 2 ml/min a sběr frakcí byl po 1,5 ml. Průběh chromatografie lze pozorovat na Obrázku 6.18.



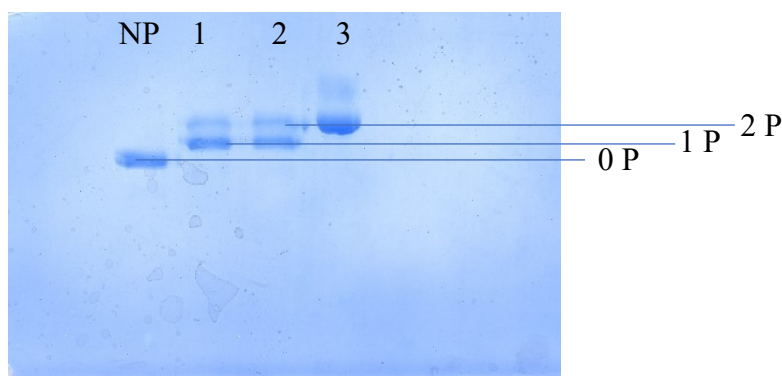
Obrázek 6.18 - Průběh gelové permeační chromatografie při použití kolony HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg a při průtoku 2 ml/min. Frakce byly sbírány po 1,5 mililitru.

Po eluci následovala 12% SDS-PAGE pro kontrolu čistoty proteinu (viz Obrázek 6.19).



Obrázek 6.19 - 12% gel po SDS-PAGE. Purifikace z 8 litrů buněčných kultur. M – standard molekulových vah. Vzorky 2-10 jsou tvořeny 10 μ l proteinu a 2 μ l vzorkovacího pufru.

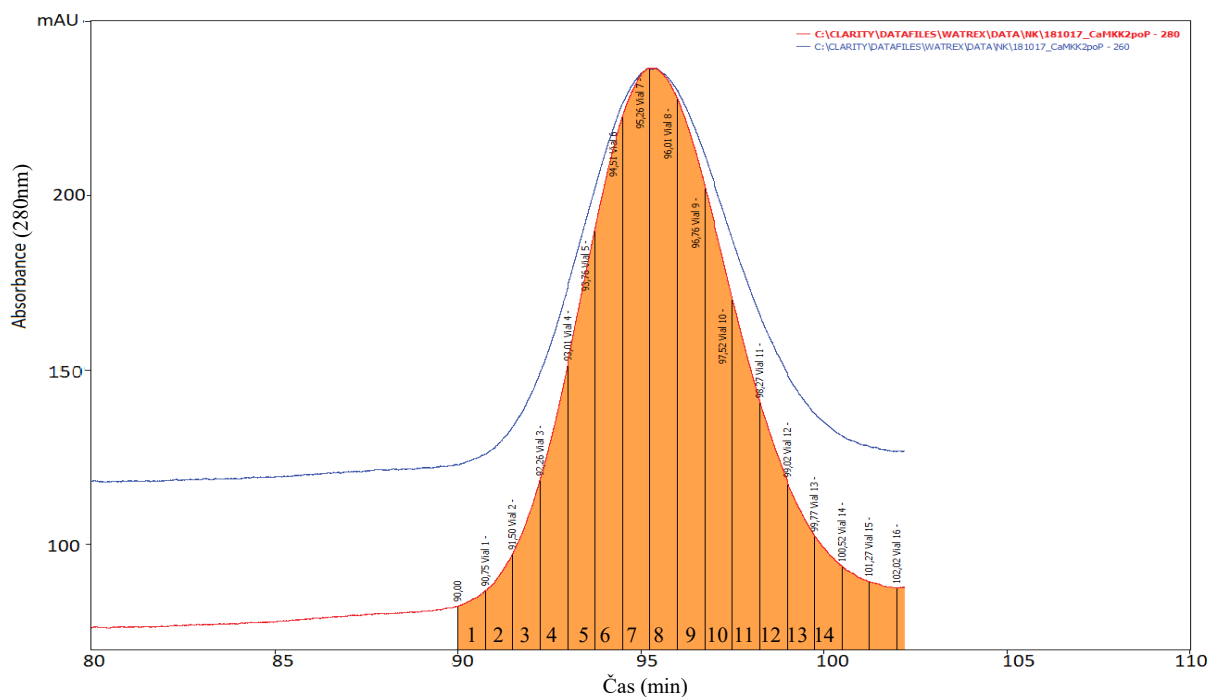
Výtěžek nefosforylovaného proteinu byl 4 mg z frakcí 1-5. Před fosforylací byl proteinu nejdříve zakoncentrován na objem 2 ml. Směs pro fosforylační reakci obsahovala 750 μ M ATP, 20mM MgCl₂, 40 μ M CaMKK2 a 2684 U PKA/mg CaMKK2. Závislost koncentrace proteinu na fosforylaci je obsažena v kapitole 6.5.2-3. CaMKK2 byla inkubována s PKAčPKAč 4 hodiny při 30 °C a přes noc v 7 °C. Následující den bylo zapotřebí provést kontrolu fosforylace CaMKK2 pomocí elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu obsahující phos-tag (viz Obrázek 6.5-4). Složení tohoto gelu je uvedeno v Tabulce 5.6 na straně 22.



Obrázek 6.20 - 12% SDS-PAGE obsahující 50 μ M phos-tag. Trvání elektroforézy 3 hodiny a 20 minut v ledu při napětí 180 V. NP - 4 μ M CaMKK2 s proteinkinasou A bez ATP. 1- kontrola, která zobrazuje CaMKK2 plně fosforylovanou na S100, ale pouze částečně na S511. 2- Fosforylovaná CaMKK2 po 40 minutách. 3- Fosforylovaná CaMKK2-S100,S511 po 4 hodinách ve 30 °C a přes noc v 7 °C. 0 P – Nefosforylovaná CaMKK2-S100,S511, 1 P – Fosforylovaná CaMKK2-S100,S511 pouze na jednom serinu. 2 P – Fosforylovaná CaMKK2-S100,S511 na Ser100 i na Ser511.

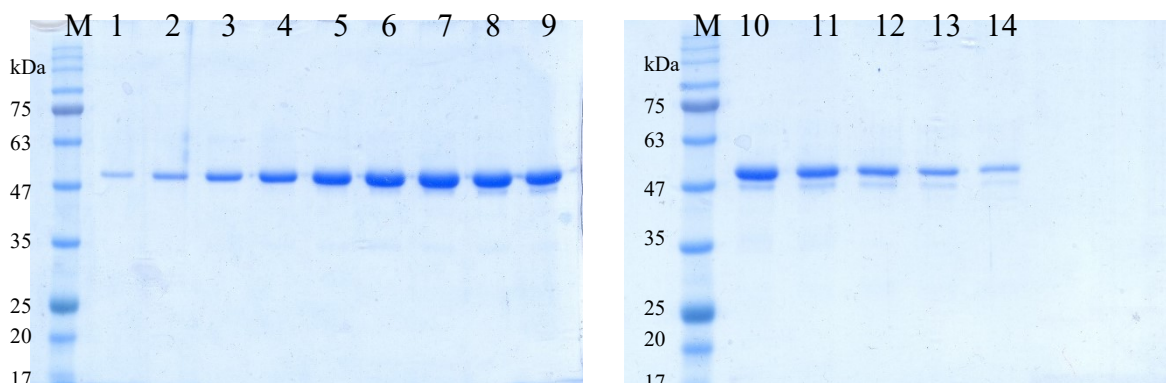
Z Phos-tag gelu lze pozorovat, že CaMKK2-S100,S511 byla plně fosforylována na obou serinech. Dokonce nastala fosforylace i na jiných místech (viz Obrázek 6.20).

Po fosforylaci proteinu je zapotřebí provést druhou gelovou permeační chromatografii pro odstranění reziduálního ATP a PKA. K tomuto účelu je použita kolona HiLoad superdex 26/600 200 pg. Průběh druhé chromatografie při průtoku 2 ml/min je vizualizován na Obrázku 6.21.



Obrázek 6.21 Chromatogram z gelové permeační chromatografie při použití kolony HiLoad superdex 26/600 200 pg s průtokem 2 ml/min. Červeně Absorbance při 280 nm. Modře absorbance při 260 nm.

Poté následovala 12% SDS-PAGE pro kontrolu čistoty proteinu (viz Obrázek 6.22). Frakce 1-14 obsahují 10 μ l proteinu a 2 μ l vzorkovacího pufru.



Obrázek 6.22-12% SDS-PAGE po druhé gelové permeační chromatografii. M - Standard molekulových vah, frakce 1-14 obsahují 10 μ l proteinu a 2 μ l vzorkovacího pufru.

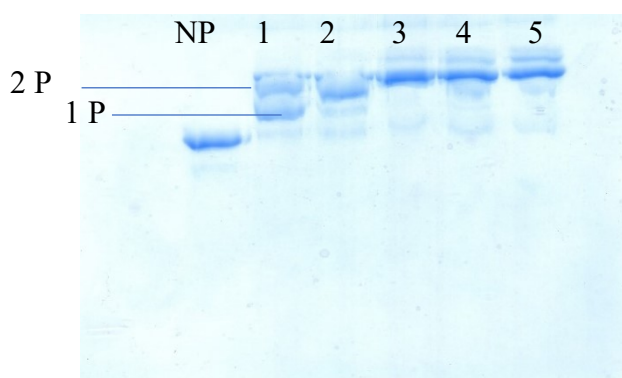
Na základě 12% SDS-PAGE byly sloučeny frakce 1-8. Průměrný výtěžek CaMKK2-S100,S511 činí 4 mg před fosforylací a 2 mg po fosforylaci z 8 litrů bakteriálních kultur. Tento malý výtěžek je způsoben C-terminální degradací, kvůli kterému dochází k odštěpení flexibilního C-konce (patrné především ve frakcích 9-14, viz obr.6.22). Tato kratší forma CaMKK2 by přispívala k heterogenitě vzorků při dalších experimentech a proto je nutné její množství omezit minimum.

6.5.1 Optimalizace fosforylace pro CaMKK2-S100S511

Jedním z hlavních cílů této práce bylo optimalizovat fosforylační protokol pro CaMKK2-S100,S511. Pokud k fosforylaci CAMKK2 použijeme běžně používaný fosforylační protokol (170 U PKA, čemu odpovídá přibližně 2,4 μg PKA na mg CaMKK2) dojde pouze ke kompletní fosforylaci Ser100, ale pouze k částečné fosforylaci Ser511. Pro vizualizaci fosforylačních reakcí a stanovení optimální koncentrace PKA pro kompletní fosforylaci Ser100 i Ser511 byl použit SDS polyakrylamidový gel obsahující phos-tag.

Pro optimální separaci různých fosforylačních forem CaMKK2 bylo nutné nalézt vhodnou kombinaci mezi koncentrací akrylamidu, koncentrací látky phos-tag, dobou elektroforézy a elektrickým napětím, při němž bude elektroforéza probíhat. Po předchozích zkušenostech byl vybrán 12% gel s 50 μM phos-tagem, pod napětím 180 V a dobou elektroforézy minimálně 3,5 hodiny. Dalším krokem bylo nalezení optimálního množství jednotek U PKA na 1 mg proteinu. Jedna jednotka PKA (U) je definována jako množství enzymu potřebného pro přenesení 1pmol fosfátu na kasein během jedné minuty v pufru obsahující Tris-HCl (pH =7,4), 20mM octan hořečnatý a 0,2mM ATP při 30°C.

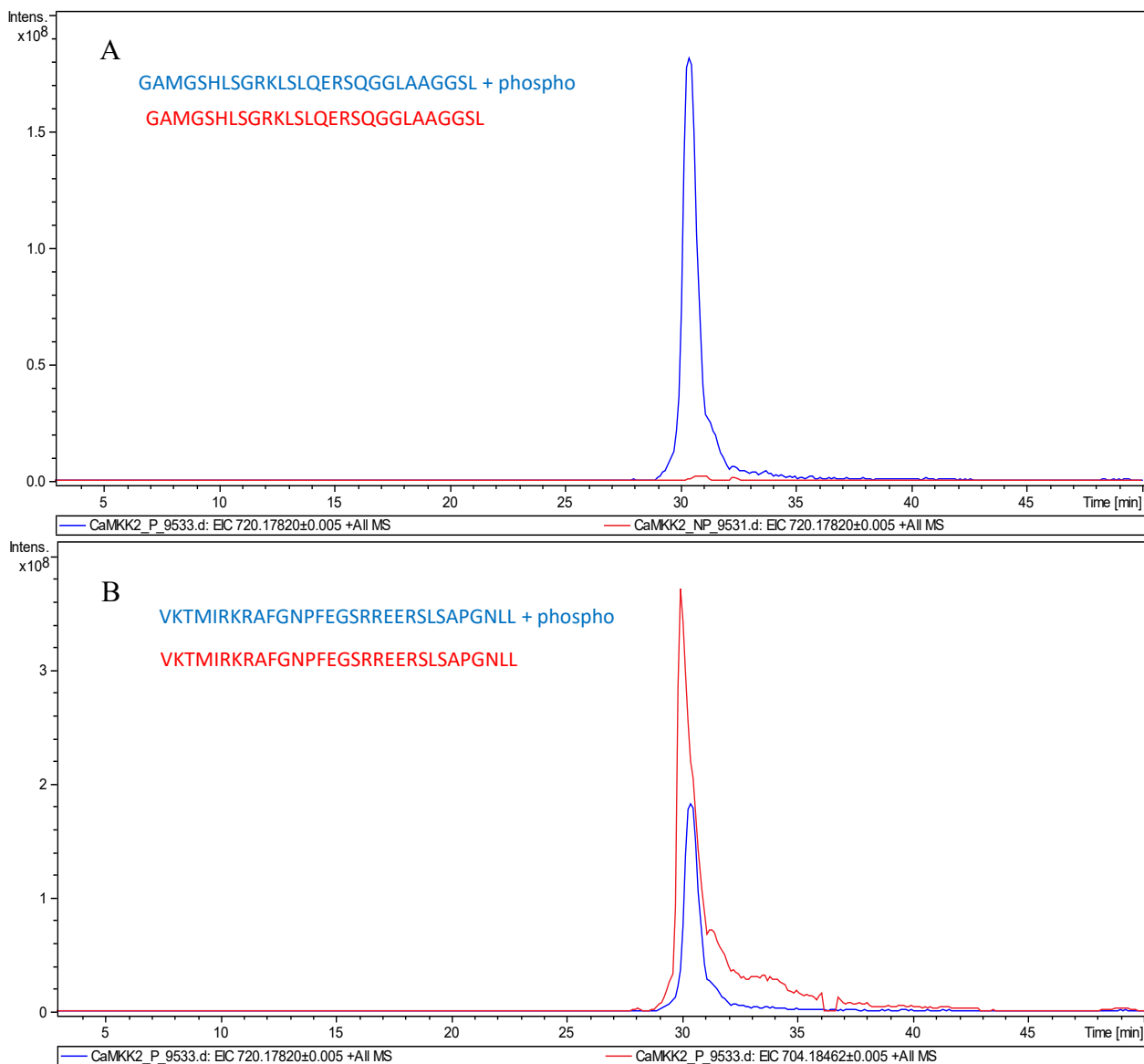
V prvních experimentech byla testována fosforylace CaMKK2-S100,S511 s PKA o různých koncentracích. Reakční objem činil 200 μl a vzorek obsahoval 4 μM CaMKK2-S100,S511, 750 μM ATP, 20mM MgCl_2 a proteinkinasu A o koncentraci 11,2; 18,7; 37,4; 60,0 a 74,7 μg PKA/mg CaMKK2. Výsledky fosforylačních reakcí jsou vizualizovány na Obrázku 6.23.



Obrázek 6.23 - Přiřazené zóny odpovídající fosforylaci podle hmotnostně spektrometrické analýzy. 1 P CaMKK2 obsahující fosfátovou skupinu pouze na serinu 100. 2 P CaMKK2 fosforylovaná na serinu 100 i 511. Byla použit 12% SDS-PAGE obsahující 50 μM phos.tag.

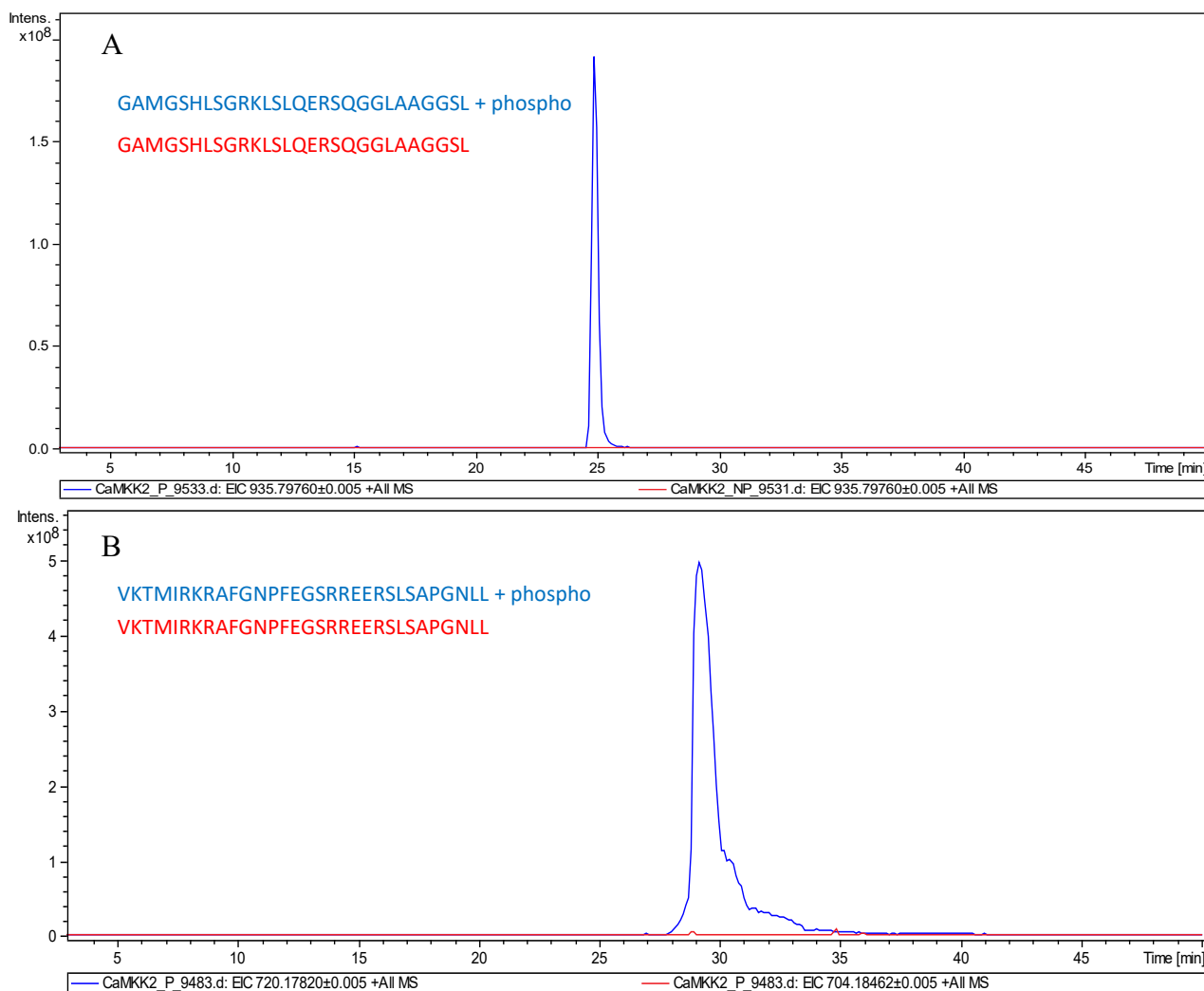
Z Obrázku 6.24 lze pozorovat dvě zóny s různou migrační rychlostí, příslušící CaMKK2 fosforylované pouze na jednom serinu a CaMKK2 fosforylované na Ser100 i na Ser511. Vzorky v drahách 3-5 se už neliší a pravděpodobně odpovídají fosforylované CaMKK2-S100,S511 na Ser100 a Ser511. Pro potvrzení úrovně fosforylace byly vzorky 1 a 3 podrobeny hmotnostně spektrometrické analýze pomocí hmotnostního spektrometru s iontově cyklotronovou celou - 15T solariX FT-ICR (Bruker Daltonics).

Výstup LC-MS analýzy vzorku 1 je vizualizována na Obrázku 6.24 na straně 50.



Obrázek 6.24 - Výstup z LC-MS analýzy vzorku číslo 1. A - Modře znázorněn eluční profil peptidu GAMGSHLSGRKLSLQERSQGGLAAGGSL obsahujícího Ser100 s fosfátovou skupinou. Červeně eluční profil téhož peptidu bez fosfátové skupiny. B - Modře znázorněn eluční profil peptidu VKTMIRKRAFGNPFEGSRREERSLSAPGNLL obsahujícího Ser511 s fosfátovou skupinou. Červeně eluční profil téhož peptidu bez fosfátové skupiny.

Z Obrázku 6.24 je patrné, že Ser511 není zcela nafosforylovaný, což je v souladu i s analýzou pomocí phos-tag gelu na Obrázku 6.23. Na Obrázku 6.25 na straně 51 je uvedena analýza vzorku obsahující 4 μ M CaMKK2 fosforylovanou PKA o koncentraci 2684U PKA/mg CaMKK2 (37,4 μ g PKA/mg CaMKK2).

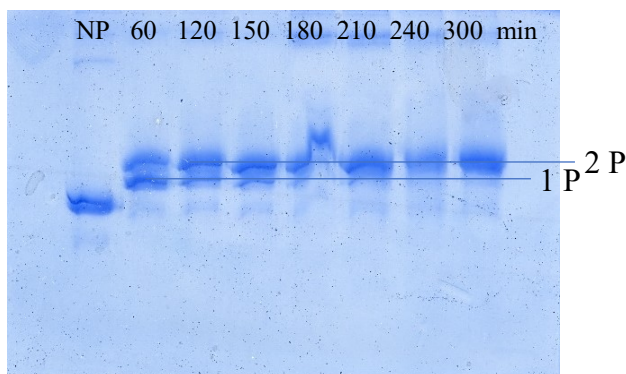


Obrázek 6.25 - Výstup z LC-MS analýzy vzorku číslo 3. A - Modře znázorněn eluční profil peptidu GAMGSHLSGRKLSLQERSQGGLAAGGSL obsahujícího Ser100 s fosfátovou skupinou. Červeně eluční profil téhož peptidu bez fosfátové skupiny. B - Modře znázorněn eluční profil peptidu VKTMIRKRAFGNPFEGSRREERLSAPGNLL obsahujícího Ser511 s fosfátovou skupinou. Červeně je eluční profil téhož peptidu bez fosfátové skupiny.

Na rozdíl od vzorku 1, vzorek 3 má plně fosforylovaný Ser100 i Ser511. Optimální koncentrace PKA byla tedy stanovena na 2684 U PKA/mg CaMKK2, což odpovídá 37,4 μg PKA/mg CaMKK2. K dosažení kvantitativní fosforylace na obou serinech je tedy zapotřebí až 16x více proteinkinasy A než v případě fosforylace pouze na Ser100.

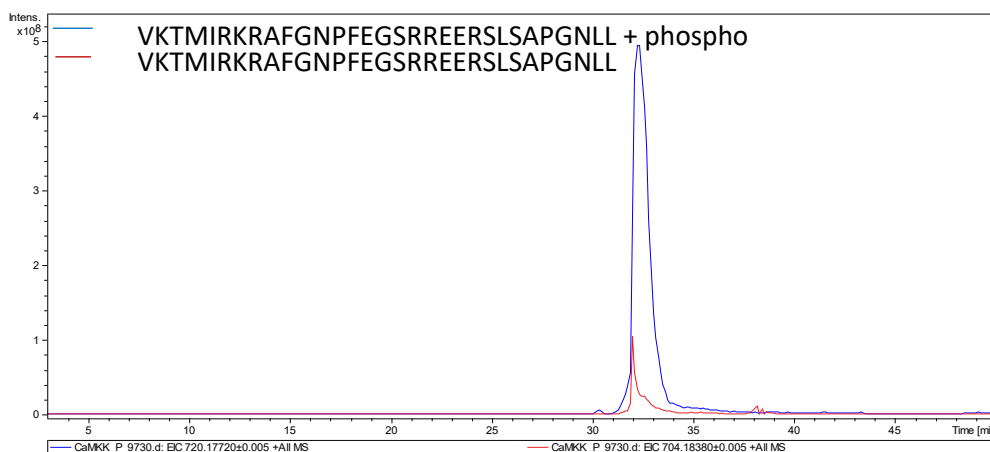
6.5.2 Fosforylace CaMKK2-S100,S511 závislá na době a koncentrace CaMKK2

V další fázi bylo nutné optimalizovat dobu inkubace, při které dochází ke kompletní fosforylaci Ser511. Tento experiment byl proveden v přítomnosti 4 μ M CaMKK2, 750mM ATP, 20mM MgCl₂ a 2684U PKA/mg CaMKK2. Vizualizace fosforylační reakce v závislosti na čase viz Obrázek 6.26.



Obrázek 6.26 - Průběh fosforylace v závislosti na čase. Byla použita 12% SDS-PAGE obsahující 50 μ M phos.tag. Vzorky na gel obsahovaly 20 μ l reakční směsi a 4 μ l 5x pufru pro přípravu vzorků. Elektroforéza probíhala 3,5 hodiny v přítomnosti ledu. NP – nefosforylovaná CaMKK2.S100,S511. Následující vzorky obsahovaly reakční směs ukončenou po 60, 120, 150, 180, 210, 240 a 300 minutách.

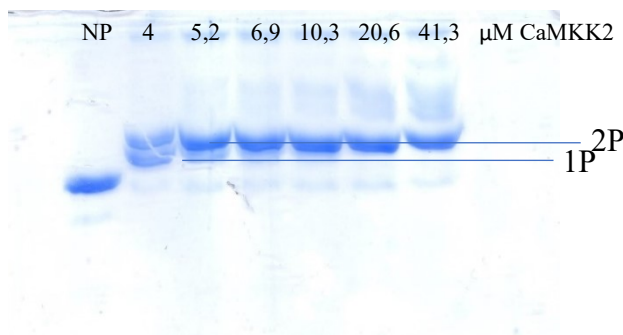
Jelikož hmotnostně spektrometrická analýza prokázala oba fosforylované seriny po 300 minutách, byl zvolen na hmotnostní analýzu vzorek po době inkubace 240 minut při 30 °C. Výsledek hmotnostně spektrometrické analýzy pro Ser511 je zobrazen na Obrázku 6.27.



Obrázek 6.27- Výstup z LC-MS analýzy vzorku obsahující reakci ukončenou po 240 minutách. Modře znázorněn eluční profil peptidu VKTMIRKRAFGNPFEGSRREERSLSAPGNLL obsahujícího Ser511 s fosfátovou skupinou. Červeně eluční profil téhož peptidu bez fosfátové skupiny.

Z výsledků LC-MS analýzy lze pozorovat, že Ser511 je téměř kompletně fosforylován. Poté byla pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50 μ M phos-tag vizualizována závislost fosforylace na koncentraci CaMKK2 ve směsi. Byl sledován efekt objemu reakční směsi, přičemž koncentrace ATP a MgCl₂ byla vždy stejná a zůstávalo zachováno látkové množství PKA a CaMKK2-S100,S511. Kvůli zpomalení fosforylace v reakční směsi byla použita koncentrace PKA 2000 U na miligram CaMKK2. Pro tento experiment bylo použito 39,5 μ g CaMKK2,

750mM ATP, 20mM MgCl₂ a 2000 U PKA/mg CaMKK2. Doba inkubace reakční směsi při 30 °C byla 4 hod. Výsledky fosforylačních reakcí lze pozorovat na Obrázku 6.28.

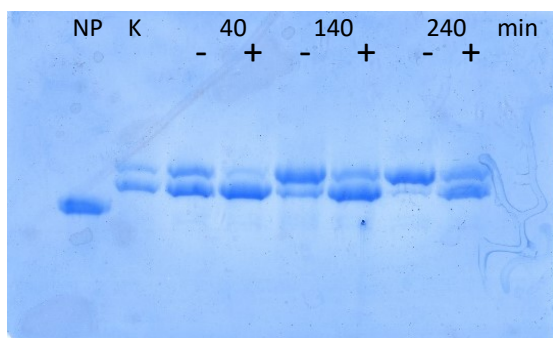


Obrázek 6.28 - Výsledek fosforylačních reakcí v závislosti na koncentraci CaMKK2. Bylo použito 39,5 μg CaMKK2, 750mM ATP, 20mM MgCl₂ a 2000 U PKA/mg CaMKK2. Doba inkubace fosforylační reakce při 30°C probíhala 4 hodiny. Pro vizualizaci výsledků byla použita 12% SDS-PAGE obsahující 50μM phos-tag.

Z Obrázku 6.28 je patrné, že rychlejší fosforylace CaMKK2 probíhá při nižších objemech reakční směsi, tedy při vyšších koncentracích CaMKK2..

6.5.3 Fosforylace CaMKK2-S100S511 v přítomnosti CaM

Další testovanou možností jak ovlivnit účinnost fosforylace byla fosforylace v přítomnosti kalmodulinu nebo DAPK2. Fosforylace CaMKK2-S100,S511 v přítomnosti Ca²⁺/CaM byla vizualizována pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50μM phos-tag včetně časové závislosti (viz Obrázek 6.29). Fosforylační směs obsahovala 750μM ATP, 20mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 4μM CaM a 4μM CaMKK2.

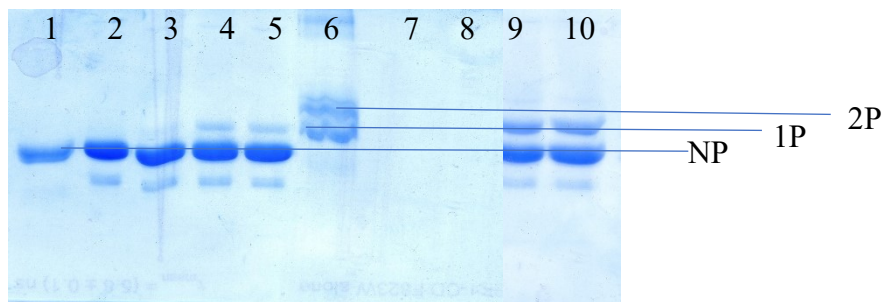


Obrázek 6.29 - Fosforylace CaMKK2 po 40, 140 a 240 minutách. Znaménko – znázorňuje reakční směs bez CaM. Znaménko + znázorňuje reakci s CaM.

Z gelu na Obrázku 6.29 lze pozorovat, že kalmodulin brání fosforylaci Ser511. Toto pozorování lze vysvětlit tím, že vazebné místo kalmodulinu se nachází v blízkosti Ser511, čímž může docházet ke sterickému bránění a snížení přístupnosti místa pro PKA.

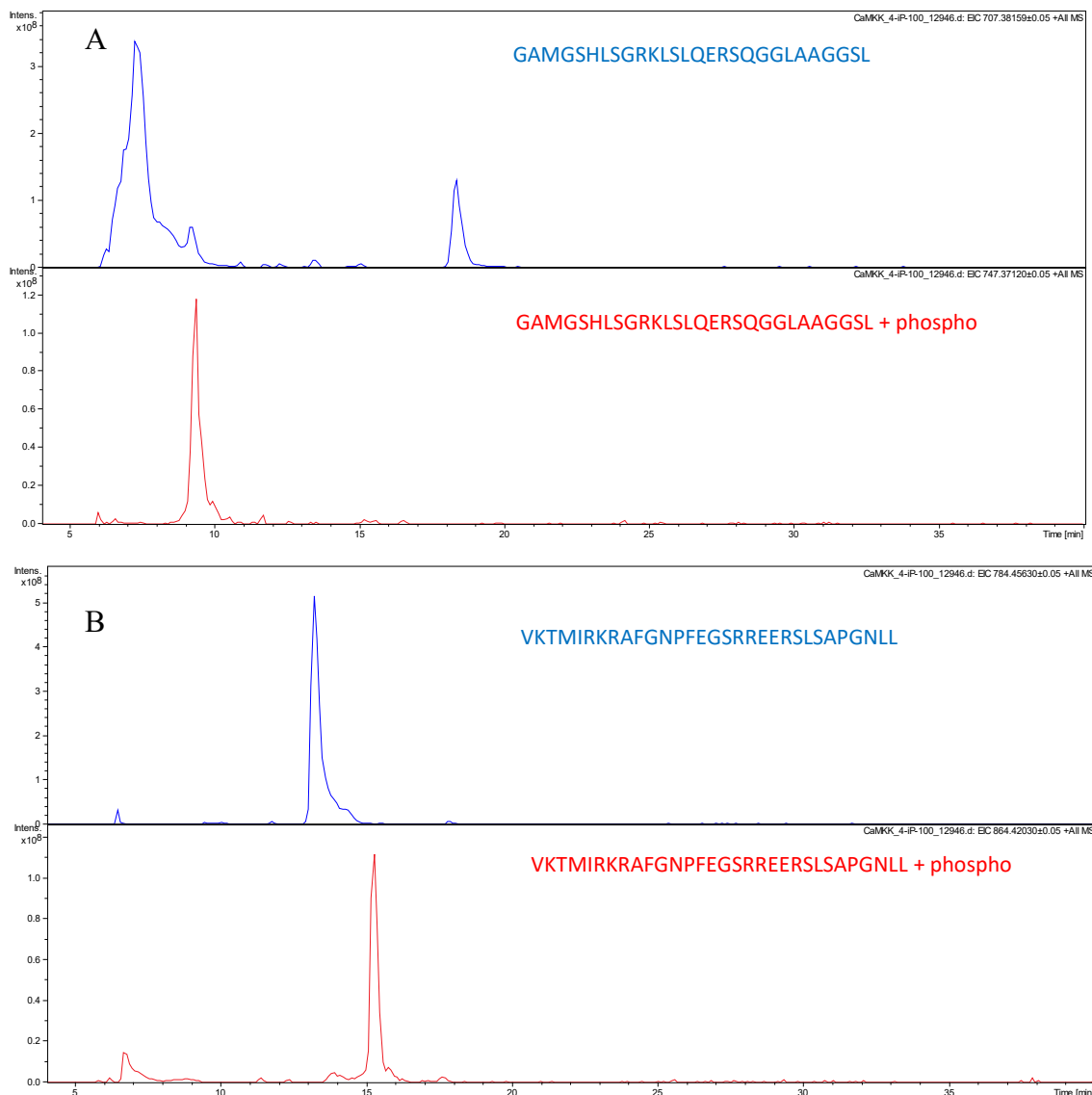
6.5.4 Fosforylace CaMKK2-S100,S511 v přítomnosti CaM pomocí DAPK2

Předchozí studie naznačily, že proteinkinasa DAPK se také může podílet na fosforylaci Ser511 [28]. Reakční směs obsahovala 4μM CaMKK2, 4 μM kalmodulin, 1 mM CaCl₂, 750μM ATP, 20mM MgCl₂ a různou koncentraci DAPK2. Výsledek fosforylační reakce byl vizualizován na pomoci 12% SDS-PAGE obsahující 50μM phos-tag (viz Obrázek 6.30 na straně 54).



Obrázek 6.30 - Fosforylace CaMKK2 pomocí DAPK2. 1 – Nefosforylovaná CaMKK2-S100,S511 s kalmodulinem, 2- Nefosforylovaná CaMKK2-S100,S511 s kalmodulinem a DAPK2 o koncentraci 2,3 µg DAPK2/mg CaMKK2, Frakce 3-9 obsahují už ATP. Koncentrace DAPK2 ve frakci 3-5 byla 0,7; 1,5; 2,3 µg DAPK2/mg CaMKK2. Frakce šest obsahovala kontrolu obsahující CaMKK2 s pouze jedním fosforylovaným serinu a částečně i s fosforylovanými Ser100 a Ser511.. Frakce 7-10 obsahují fosforylační reakci s DAPK2 o koncentraci 14,4; 28,9; 43,4; 63,8 µg DAPK2/mg CaMKK2.

Jak lze pozorovat z Obrázku 6.30, CaMKK2 není plně fosforylována a pouze z části obsahuje fosforylovaný pouze jeden serin. Následně vzorek obsahující DAPK2 o koncentraci 63,8 µg /mg CaMKK2 byl poslán na hmotnostně spektrometrickou analýzu, jejíž výsledek lze vidět na Obrázku 6.31.

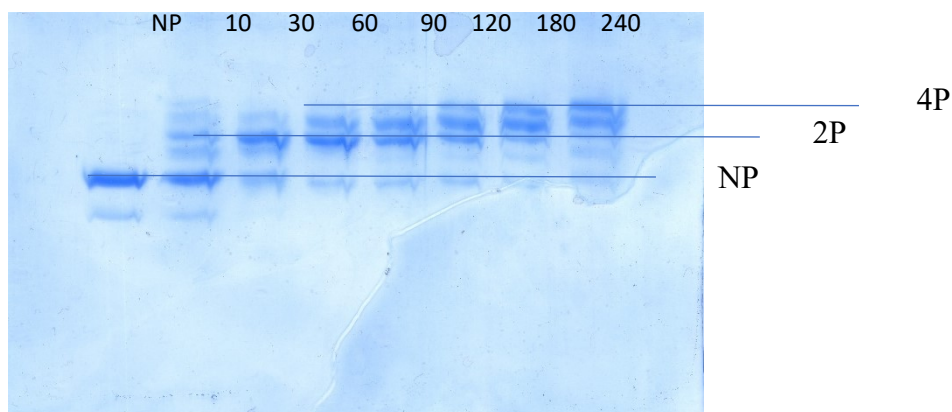


Obrázek 6.31 - Výsledky z LC-MS analýzy. A – Signál z peptidu obsahující Ser100. Modře signál nefosforylovaného serinu. Červeně signál serinu s fosfátovou skupinou. B – Signál z peptidu obsahující Ser511. Modře signál nefosforylovaného serinu. Červeně signál serinu s fosfátovou skupinou.

Z výsledků je patrné, že CaMKK2-S100,S511 je fosforylovaná na obou serinech pouze částečně. Proto byla fosforylace v přítomnosti DAPK2 vyloučena.

6.5.5 Fosforylace CaMKK2 D330A

Jako poslední byla vyzkoušena fosforylace 4 μ M CaMKK2-D330A se čtyřmi fosforylačními místy. Byla použita koncentrace 2684U PKA/mg CaMKK2-D330A.



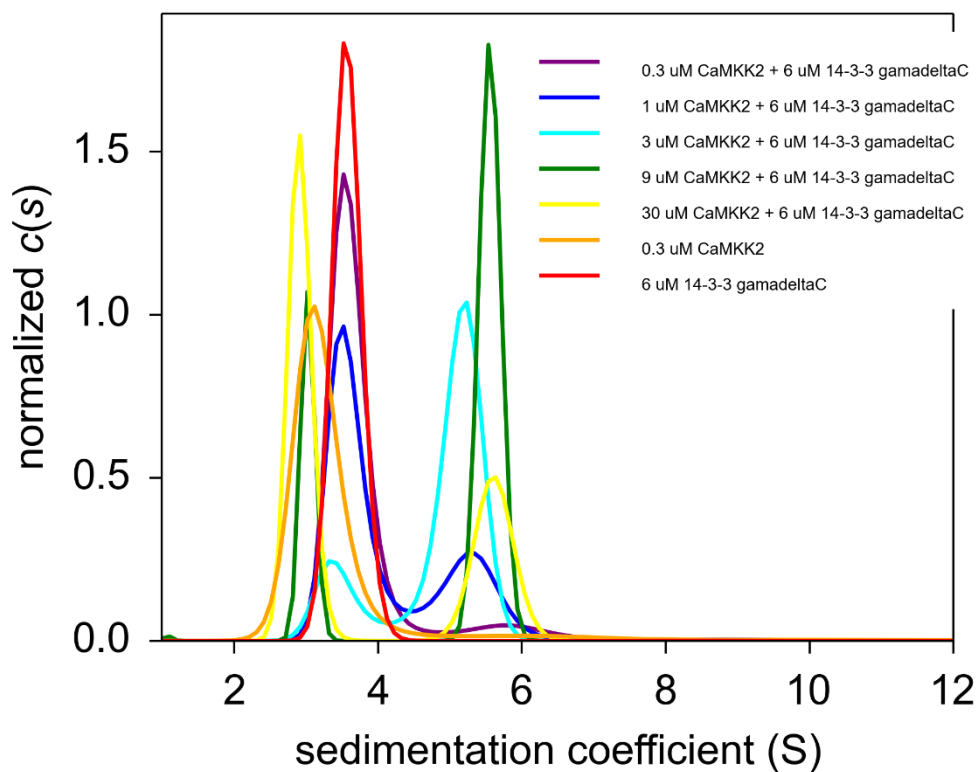
Obrázek 6.32 - Fosforylace CaMKK-D330A. Z phos-tag gelu lze vypočítat postupnou fosforylaci všech 4 fosforylačních míst.

Z obrázku 6.32 je patrné, že pro nafosforylování všech 4 míst je potřeba většího množství PKA nebo prodloužení inkubace.

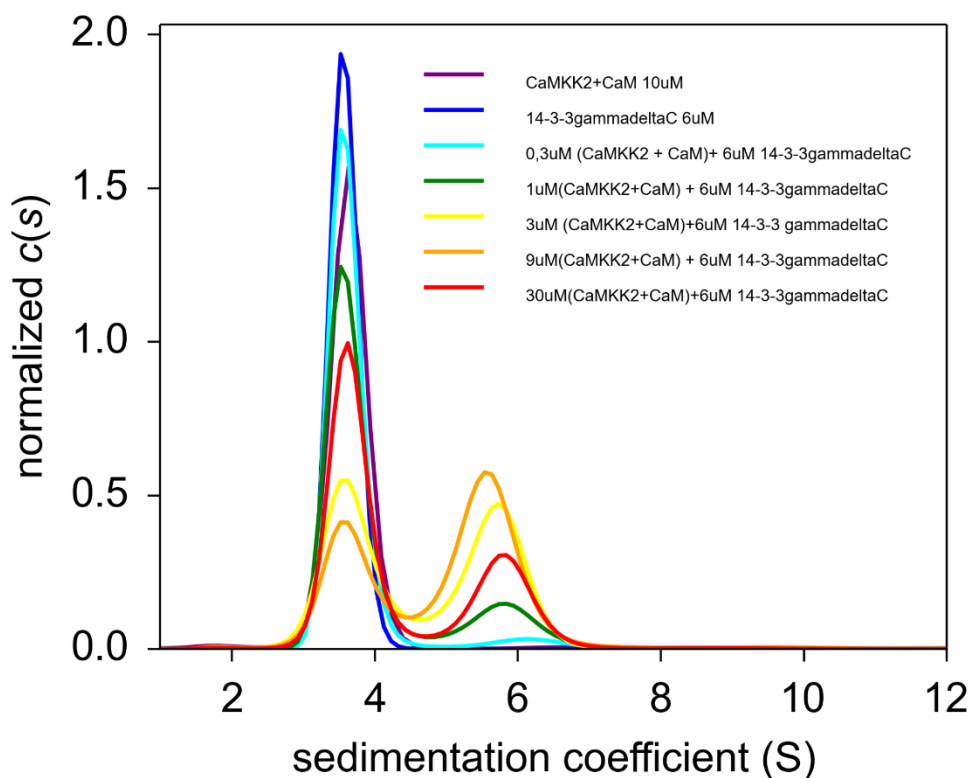
6.6 Analytická ultracentrifugace

Pro charakterizaci stability a stechiometrii komplexu mezi fosforylovanou CaMKK2-S100,S511 a proteinem 14-3-3 γ Δ C byla použita analytické ultracentrifugace, metoda sedimentační rychlosti. K měření byla použita analytická centrifuga ProteomLabTM XL-I (Beckman Coulter, USA). Měření a vyhodnocení provedla Mgr. Olívia Petřalská, Ph.D

Experiment byl proveden při konstantní koncentraci proteinu 14-3-3 γ Δ C a různých koncentracích proteinu CaMKK2-S100,S511. Na Obrázku 6.33 na straně 56, je vynesena série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů komplexu pro jednotlivé body titrace. Z Obrázku na straně 56 je vidět posun sedimentačního koeficientu komplexu k vyšším hodnotám oproti sedimentačním koeficientům jednotlivých proteinů, což dokazuje jeho tvorbu. Analýza dále ukázala, že CaMKK2-S100,S511 s proteinem 14-3-3 γ Δ C interaguje v poměru 1:2 a pro tento komplex byla odhadnuta zdánlivá disociační konstanta $K_D = 125 \pm 15$ nM. Dále byla provedena titrace proteinu 14-3-3 γ Δ C kalmodulinem a CaMKK2-S100,S511. Z Obrázku 6.34 na straně 56 je patrné, že sedimentační koeficient pro komplex kalmodulin:CaMKK2 je totožný se sedimentačním koeficientem proteinu 14-3-3 γ Δ C. Avšak sedimentační koeficient komplexu CaMKK2-S100,S511:kalmodulin:protein 14-3-3 γ Δ C je větší než sedimentační koeficient samotného proteinu 14-3-3, ale i větší než v komplexu CaMKK2:protein 14-3-3 γ Δ C, což dokazuje tvorbu ternárního komplexu v poměru 1:1:2. Zdánlivá disociační konstanta pro tento komplex byla stanovena na $K_D = 300 \pm 40$ nM.



Obrázek 6.33 - Série normalizovaných spojitéch distribucí sedimentačních koeficientů komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S100,S511. 14-3-3 $\gamma\Delta$ C mělo konstantní koncentraci 6 μ M a koncentrace pCaMKK2-S100,S511 se pohybovaly v rozsahu 0,3–30 μ M



Obrázek 6.34 - Série normalizovaných spojitéch distribucí sedimentačních koeficientů komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2-S100,S511:CaM. 14-3-3 $\gamma\Delta$ C mělo fixní koncentraci 6 μ M a koncentrace komplexu pCaMKK2-S100,S511:CaM se pohybovaly v rozsahu 0,3–30 μ M. Vyhodnoceno v programu SEDFIT, Graf byl vytvořen v programu Gussi.

7 Diskuze

Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasy (CaMKK) jsou serin/threonin kinasy, které se účastní vápníkové signální dráhy, přičemž u savců byly popsány dvě isoformy CaMKK, CaMKK1 a CaMKK2. Při zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů dochází k aktivaci CaMKK prostřednictvím vazby komplexu Ca^{2+} /kalmodulin na C-koncový segment CaMKK, což uvolní autoinhibici přerušením interakcí autoinhibičního segmentu s aktivním centrem kinasy. Aktivované CaMKK následně fosforylují a aktivují proteinkinasy CaMK1 a CaMK4 a v případě CaMKK2 i AMPK [19, 22, 29].

Aktivita CaMKK je dále regulována prostřednictvím fosforylace cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA). PKA fosforyluje několik reziduí včetně Ser100 a Ser511. Tato rezidua jsou vysoce konzervovaná a v izoformě CaMKK1 zprostředkovávají interakci s proteinem 14-3-3, což má za následek výrazné snížení aktivity CaMKK1 [31]. Nedávné studie naznačily, že v případě tvorby komplexu CaMKK2 s proteinem 14-3-3 nedochází k inhibici, jako u isoformy CaMKK1, nýbrž aktivita fosforylované CaMKK2 se v komplexu dokonce mírně zvýšila. Přesná úloha proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK2 tak zůstává stále nejasná. Nicméně další experimenty naznačily, že protein 14-3-3 by mohl chránit CaMKK2 před defosforylací threoninu Thr145, jejíž fosforylace udržuje CaMKK2 v inhibovaném stavu [32]. Pro další studium CaMKK2:14-3-3 komplexu a zejména pro jeho strukturní analýzu je nutné připravit CaMKK2, která bude plně fosforylována na Ser100 a Ser511, tedy obou 14-3-3 vazebných motivech. Cílem této práce bylo optimalizovat protokol pro fosforylaci CaMKK2 a charakterizovat komplex tvořený proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ a CaMKK2-S100,S511 obsahující plně fosforylované 14-3-3 vazebné motivy pomocí analytické ultracentrifugace.

Nejdříve bylo nutné připravit všechny potřebné proteiny: CaMKK2-S100,S511, CaM, 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$, TEV proteasu a cAMP-dependentní proteinkinasa A. Všechny tyto proteiny byly úspěšně exprimovány v bakteriálním expresním systému a purifikovány. Množství a čistota připravených CaMKK2-S100,S511 (Obrázek 6.22, str. 48), CaM (Obrázek 6.10, str. 43) a 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ (Obrázek 6.16, str. 45) byly dostačující pro následující experimenty. Také byla připravena aktivní forma TEV proteasy a PKA, jejíž kinasová aktivita byla srovnatelná s komerční PKA (Obrázek 6.7 na str. 41). Následovala optimalizace fosforylačního protokolu CaMKK2-S100,S511 pomocí PKA. Výsledky fosforylačních reakcí byly vizualizovány pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50 μM phos-tag. Pro kontrolu byly vzorky ještě podrobeny hmotnostně-spektrometrické analýze. Výsledná koncentrace PKA pro kompletní fosforylaci CaMKK2 na obou serinech (Ser100 a Ser511) byla stanovena na hodnotu 37,4 μg PKA/mg CaMKK2-S100,S511.

U fosforylované CaMKK2-S100,S511 byla následně studována její interakce s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ v přítomnosti i nepřítomnosti CaM pomocí analytické ultracentrifugace metodou sedimentační rychlosti. Výsledky těchto měření ukázaly, že stechiometrický poměr jednotlivých proteinů v komplexu CaMKK2-S100,S511:protein 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ odpovídá poměru 1:2 (tedy jedna molekula CaMKK2 interaguje s dimerem proteinu 14-3-3) (Obrázek 6.33 str. 56) a dále byla stanovena zdánlivá disociační konstanta tohoto komplexu ($K_D = 125 \pm 15$ nM).

Zároveň byla studována interakce CaMKK2-S100,S511 v přítomnosti obou regulačních partnerů, kalmodulinu i proteinu 14-3-3. Molární stechiometrie ternárního komplexu odpovídá poměru 1:1:2 (CaMKK2-S100,S511:CaM:dimer 14-3-3 Δ C) (Obrázek 6.32, str. 56). Zdánlivá disociační konstanta pro tento komplex byla odhadnuta na $K_D = 300 \pm 40$ nM.

Tyto experimenty ukázaly, že připravená fosforylovaná CaMKK2-S100,S511 tvoří stabilní komplex s proteiny CaM a 14-3-3 Δ C, jejichž struktura bude následně studována pomocí metod SAXS, chemického zesílení spojeného s MS, H/D výměny spojené s MS a případně i proteinové krystalografie.

8 Závěr

- Bylo připraveno miligramové množství aktivní cAMP-dependentní proteinkinasy A a TEV proteasy.
- Bylo připraveno miligramové množství kalmodulinu a proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C
- Bylo připraveno miligramové množství lidské Ca²⁺/kalmodulin-dependentní kinasy 2 (rezidua 93-517), obsahující mutace T145A, D330A, S495A
- Pomocí phos-tag SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie byl optimalizován fosforylační protokol pro CaMKK2-S100,S511
- Pomocí analytické ultracentrifugace byla ověřena stechiometrie komplexu mezi fosforylovanou CaMKK2-S100,S511 a proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C a mezi fosforylovanou CaMKK2-S100,S511, kalmodulinem a proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C
- Pomocí analytické ultracentrifugace byla stanovena zdánlivá disociační konstanta mezi fosforylovanou CaMKK2-S100,S511 a proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C

9 Literatura

- [1] SOFROVÁ a kol. Biochemie Základní kurz. Nakladatelství Karolinum, 2005, 88 ISBN: 80-7184-936-7.
- [2] HANKS, S K a T HUNTER. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. The FASEB Journal [online]. 1995, **9**(8), 576–596. ISSN 0892-6638, 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.9.8.7768349
- [3] PAUL, Manash K. a Anup K. MUKHOPADHYAY. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. International Journal of Medical Sciences [online]. 2004, 101–115. ISSN 1449-1907. Dostupné z: doi:10.7150/ijms.1.101
- [4] MANNING, G., D. B. WHYTE, R. MARTINEZ, T. HUNTER a S. SUDARSANAM. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. Science, New Series. 2002, **298**(5600), 1912-1916+1933-1934.
- [5] ZHANG, Jianming, Priscilla L. YANG a Nathanael S. GRAY. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer [online]. 2009, **9**(1), 28–39. ISSN 1474-175X, 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2559
- [6] VIJAYAN, R. S. K., Peng HE, Vivek MODI, Krisna C. DUONG-LY, Haiching MA, Jeffrey R. PETERSON, Roland L. DUNBRACK a Ronald M. LEVY. Conformational Analysis of the DFG-Out Kinase Motif and Biochemical Profiling of Structurally Validated Type II Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry [online]. 2015, **58**(1), 466–479. ISSN 0022-2623, 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm501603h
- [7] Protein Kinases: Human Protein Kinases Overview | CST [online]. [vid. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://en.cellsignal.de/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-human-protein-kinases-overview/kinases-human-protein/>
- [8] TREIBER, Daniel K. a Neil P. SHAH. Ins and Outs of Kinase DFG Motifs. Chemistry & Biology [online]. 2013, **20**(6), 745–746. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2013.06.001
- [9] FILL, Michael a Julio A. COPELLO. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. Physiological Reviews [online]. 2002, **82**(4), 893–922. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00013.2002
- [10] CATTERALL, William A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. Annual Review of Cell and Developmental Biology [online]. 2000, **16**(1), 521–555. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
- [11] LLINÁS, R a M SUGIMORI. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. The Journal of Physiology [online]. 1980, **305**(1), 171–195. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1980.sp013357
- [12] NAKAGAWASAI, Osamu, Hiroshi ONOGI, Satoru MITAZAKI, Atsushi SATO, Kenya WATANABE, Hiroko SAITO, Shigeo MURAI, Kota NAKAYA, Manabu MURAKAMI, Eiki TAKAHASHI, Koichi TAN-NO a Takeshi TADANO. Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the N-type Ca²⁺ channel $\alpha 1B$

- subunit. *Behavioural Brain Research* [online]. 2010, **208**(1), 224–230. ISSN 01664328. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbr.2009.11.042
- [13] CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, **3**(8), a003947–a003947. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a003947
- [14] NEWCOMB, Robert, Balazs SZOKE, Andrew PALMA, Gang WANG, Xiao-hua CHEN, William HOPKINS, Ruth CONG, Jim MILLER, Laszlo URGE, Katalin TARCZY-HORNOCH, Joseph A. LOO, David J. DOOLEY, Laszlo NADASDI, Richard W. TSIEN, José LEMOS a George MILJANICH. Selective Peptide Antagonist of the Class E Calcium Channel from the Venom of the Tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* [online]. 1998, **37**(44), 15353–15362. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi981255g
- [15] ZHANG, Quan, Martin BENGTSSON, Chris PARTRIDGE, Albert SALEHI, Matthias BRAUN, Roger COX, Lena ELIASSON, Paul RV JOHNSON, Erik RENSTRÖM, Toni SCHNEIDER, Per-Olof BERGGREN, Sven GÖPEL, Frances M ASHCROFT a Patrik RORSMAN. R-type Ca²⁺-channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nature Cell Biology* [online]. 2007, **9**(4), 453–460. ISSN 1465-7392, 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1563
- [16] NIMMRICH, V a G GROSS. P/Q-type calcium channel modulators: P/Q-type calcium channel blockers. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2012, **167**(4), 741–759. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02069.x
- [17] MARCELO, Kathrina L., Anthony R. MEANS a Brian YORK. The Ca²⁺/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2016, **27**(10), 706–718. ISSN 10432760. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2016.06.001
- [18] PyMOL | pymol.org [online]. [vid. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://pymol.org/2/>
- [19] KYLAROVA, Salome, Katarina PSENAKOVA, Petr HERMAN, Veronika OBSILOVA a Tomas OBSIL. CaMKK2 kinase domain interacts with the autoinhibitory region through the N-terminal lobe including the RP insert. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2018, **1862**(10), 2304–2313. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2018.07.025
- [20] O'BRIEN, Matthew T., Jonathan S. OAKHILL, Naomi X. Y. LING, Christopher G. LANGENDORF, Ashfaque HOQUE, Toby A. DITE, Anthony R. MEANS, Bruce E. KEMP a John W. SCOTT. Impact of Genetic Variation on Human CaMKK2 Regulation by Ca²⁺-Calmodulin and Multisite Phosphorylation. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [vid. 2019-04-18]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep43264
- [21] TOKUMITSU, Hiroshi, Naomi TAKAHASHI, Koh ETO, Shigetoshi YANO, Thomas R. SODERLING a Masa-aki MURAMATSU. Substrate Recognition by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase: ROLE OF THE ARG-PRO-RICH INSERT DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, **274**(22), 15803–15810. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.22.15803
- [22] GERNER, Lisa, Steffi MUNACK, Koen TEMMERMAN, Ann-Marie LAWRENCE-DÖRNER, Hüseyin BESIR, Matthias WILMANN, Jan Kristian JENSEN, Bernd

- THIEDE, Ian G. MILLS a Jens Preben MORTH. Using the fluorescent properties of STO-609 as a tool to assist structure-function analyses of recombinant CaMKK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2016, **476**(2), 102–107. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.045
- [23] RACIOPPI, Luigi a Anthony R. MEANS. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2: Roles in Signaling and Pathophysiology. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012, **287**(38), 31658–31665. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R112.356485
- [24] SABBIR, Mohammad Golam. Loss of Ca²⁺/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2 Leads to Aberrant Transferrin Phosphorylation and Trafficking: A Potential Biomarker for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2018, **5** [vid. 2019-04-18]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2018.00099
- [25] CAO, Wenguang, Muhammad SOHAIL, Guodong LIU, Jeremy A. KOUMBA-DINGA, Vincent G. LOBO a Jiuyong XIE. Differential effects of PKA-controlled CaMKK2 variants on neuronal differentiation. *RNA Biology* [online]. 2011, **8**(6), 1061–1072. ISSN 1547-6286, 1555-8584. Dostupné z: doi:10.4161/rna.8.6.16691
- [26] TOJKANDER, Sari, Katarzyna CIUBA a Pekka LAPPALAINEN. CaMKK2 Regulates Mechanosensitive Assembly of Contractile Actin Stress Fibers. *Cell Reports* [online]. 2018, **24**(1), 11–19. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.06.011
- [27] JIN, Lingtao, Jaemoo CHUN, Chaoyun PAN, Avi KUMAR, Guojing ZHANG, Youna HA, Dan LI, Gina N. ALESI, Yibin KANG, Lu ZHOU, Wen-Mei YU, Kelly R. MAGLIOCCA, Fadlo R. KHURI, Cheng-Kui QU, Christian METALLO, Taofeek K. OWONIKOKO a Sumin KANG. The PLAG1-GDH1 Axis Promotes Anoikis Resistance and Tumor Metastasis through CamKK2-AMPK Signaling in LKB1-Deficient Lung Cancer. *Molecular Cell* [online]. 2018, **69**(1), 87-99.e7. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2017.11.025
- [28] PENFOLD, Lucy, Angela WOODS, Phillip MUCKETT, Alexander Yu. NIKITIN, Tera R. KENT, Shuai ZHANG, Rebecca GRAHAM, Alice POLLARD a David CARLING. CAMKK2 Promotes Prostate Cancer Independently of AMPK via Increased Lipogenesis. *Cancer Research* [online]. 2018, **78**(24), 6747–6761. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0585
- [29] GREEN, Michelle F., John W. SCOTT, Rohan STEEL, Jonathan S. OAKHILL, Bruce E. KEMP a Anthony R. MEANS. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase β Is Regulated by Multisite Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(32), 28066–28079. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.251504
- [30] MACDONALD, Amber F., Ahmed BETTAIEB, Dallas R. DONOHOE, Dina S. ALANI, Anna HAN, Yi ZHAO a Jay WHELAN. Concurrent regulation of LKB1 and CaMKK2 in the activation of AMPK in castrate-resistant prostate cancer by a well-defined polyherbal mixture with anticancer properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2018, **18**(1) [vid. 2019-04-18]. ISSN 1472-6882. Dostupné z: doi:10.1186/s12906-018-2255-0

- [31] ICHIMURA, Tohru, Masato TAOKA, Yasukazu HOZUMI, Kaoru GOTO a Hiroshi TOKUMITSU. 14-3-3 Proteins directly regulate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase α through phosphorylation-dependent multisite binding. *FEBS Letters* [online]. 2008, **582**(5), 661–665. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2008.01.037
- [32] PSENAKOVA, Katarina, Olivia PETRVALSKA, Salome KYLAROVA, Domenico LENTINI SANTO, Dana KALABOVA, Petr HERMAN, Veronika OBSILOVA a Tomas OBSIL. 14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2018, **1862**(7), 1612–1625. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2018.04.006
- [33] FU, Haiyan, Romesh R. SUBRAMANIAN a Shane C. MASTERS. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2000, **40**(1), 617–647. ISSN 0362-1642, 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617
- [34] YANG, X., W. H. LEE, F. SOBOTT, E. PAPAGRIGORIOU, C. V. ROBINSON, J. G. GROSSMANN, M. SUNDSTROM, D. A. DOYLE a J. M. ELKINS. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(46), 17237–17242. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0605779103
- [35] ROSENQUIST, Magnus, Paul SEHNKE, Robert J. FERL, Marianne SOMMARIN a Christer LARSSON. Evolution of the 14-3-3 Protein Family: Does the Large Number of Isoforms in Multicellular Organisms Reflect Functional Specificity? *Journal of Molecular Evolution* [online]. 2000, **51**(5), 446–458. ISSN 0022-2844. Dostupné z: doi:10.1007/s002390010107
- [36] WILKER, Erik W., Robert A. GRANT, Stephen C. ARTIM a Michael B. YAFFE. A Structural Basis for 14-3-3 σ Functional Specificity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(19), 18891–18898. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M500982200
- [37] AITKEN, Alastair. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. nedatováno, 18.
- [38] BRIDGES, D. a G. B. G. MOORHEAD. 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Science Signaling* [online]. 2005, **2005**(296), re10–re10. ISSN 1945-0877, 1937-9145. Dostupné z: doi:10.1126/stke.2962005re10
- [39] YAFFE, Michael B, Katrin RITTINGER, Stefano VOLINIA, Paul R CARON, Alastair AITKEN, Henrik LEFFERS, Steven J GAMBLIN, Stephen J SMERDON a Lewis C CANTLEY. The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* [online]. 1997, **91**(7), 961–971. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80487-0
- [40] URANO, Tomohiko, Tomoyuki SAITO, Tohru TSUKUI, Masayo FUJITA, Takayuki HOSOI, Masami MURAMATSU, Yasuyoshi OUCHI a Satoshi INOUE. Efp targets 14-3-3j for proteolysis and promotes breast tumour growth. 2002, **417**, 5.

- [41] ZANUSSO, G., M. FIORINI, A. FARINAZZO, M. GELATI, M. D. BENEDETTI, S. FERRARI, A. Dalla LIBERA, S. CAPALDI, H. L. MONACO, N. RIZZUTO a S. MONACO. Phosphorylated 14-3-3 ζ protein in the CSF of neuroleptic-treated patients. *Neurology* [online]. 2005, **64**(9), 1618. Dostupné z: doi:10.1212/01.WNL.0000160397.81314.84
- [42] ExPASy - ProtParam tool [online]. [vid. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://web.expasy.org/protparam/>
- [43] SupremeRun & LightRun Sequencing Services [online]. [vid. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/>
- [44] ACD/ChemSketch for Academic and Personal Use :: ACD/Labs.com [online]. [vid. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- [45] IRENA NĚMCOVÁ a kol. Spektrometrické analytické metody II. 1998. Nakladatelství Karolinum, 1998, 38-44. ISBN: 80-7184-586-8.
- [46] LEBOWITZ, Jacob, Marc S. LEWIS a Peter SCHUCK. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science* [online]. 2009, **11**(9), 2067–2079. ISSN 09618368. Dostupné z: doi:10.1110/ps.0207702
- [47] Downloads - Sednterp [online]. [vid. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Downloads>
- [48] sedfit 12.52 for Windows 10 free download on 10 App Store. 10 App Store [online]. [vid. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://www.10appstore.net/sedfit1252/software.html>
- [49] MBR Software [online]. [vid. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>