

# Univerzita Karlova

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Biofyzikální chemie



**Bc. Nicola Koupilová**

Strukturní charakterizace lidské proteinkinasy CaMKK2 a jejich interakcí s vazebnými partnery

Structural characterization of human protein kinase CaMKK2 and its interactions with binding partners

Diplomová práce

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

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha, 2021

## **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, 18. 06. 2021

Podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za jeho vedení, cenné rady a jeho čas věnovaný této práci. Poděkovat bych chtěla i RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. a ostatním kolegům, kteří mi vždy ochotně poradili s jakýmkoliv problémem, motivovali mě, rozebírali se mnou moje problémy ohledně práce a diskutovali jejich řešení. Speciálně bych zmínila RNDr. Olívii Petrvalskou, Ph.D., která vedla AUC měření a naučila mě vyhodnocovat data, a Mgr. Martinu Mikulů, jež se mnou sdílela trápení vyhodnocování dat z malouhlového rozptylu rentgenového záření, byla se mnou v dobrém i zlém a podporovala mě po celou dobu mého studia.

RNDr. Petr Pompach, Ph.D. nejenže provedl a vyhodnotil veškeré MS analýzy mých vzorků, ale také mi věnoval čas a velice trpělivě odpovídal na mé otázky. Toho si velice vážím a mockrát mu děkuji, že mě uvedl do problematiky MS analýzy, konzultoval se mnou výsledky z analýz a výsledný model.

Ve své bakalářské práci jsem poděkovala Ing. Zdeňce Brandové, která mě naučila mít ráda přírodovědné obory a byla pro mě velkou oporou, proto bych jí ráda poděkovala i zde. Její vliv na moji osobnost a kariéru je velký a já jsem velice ráda, že mi ukázala tuto cestu.

Na závěr děkuji své rodině a svému příteli za podporu v průběhu celého studia, že to se mnou vydrželi, i když jsem byla občas nesnesitelná, obzvlášť, když něco nevyšlo, a za jejich motivaci to nevzdat.

## Abstrakt

Ca<sup>2+</sup>/kalmmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa 2 (CaMKK2) patří do rodiny serin/threonin proteinkinasy, které se účastní vápníkové signální dráhy. Při zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů dochází k aktivaci kalmodulinu (CaM), který následně aktivuje své vazebné partnery, mezi které patří CaMKII, CaMKIII, CaMKK1 a CaMKK2. CaMKK2 následně aktivuje prostřednictvím fosforylace proteinkinasy CaMKI, CaMKIV a AMP-dependentní kinasu, AMPK.

Přirozeně se v buňkách CaMKK2 vyskytuje v autoinhibovaném stavu, který je způsobený sterickým bráněním aktivního místa autoinhibiční doménou. Při vazbě s kalmodulinem dochází k odklonění autoinhibiční domény a tím ke zpřístupnění aktivního místa. Po aktivaci dochází u CaMKK k autofosforylaci a tím ke zvýšení aktivity. Negativní regulace je způsobena fosforylací cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA) a GSK3. Pro CaMKK1 i CaMKK2 byla identifikována místa, která jsou fosforylována PKA. Dvě z nich jsou součástí vazebného motivu pro proteiny 14-3-3. Předchozí studie ukázaly, že protein 14-3-3 udržuje fosforylovanou CaMKK2 v inhibovaném stavu tím, že brání defosforylaci S495, který blokuje vytvoření vazby s kalmodulinem. Nicméně je nejasné, jestli je to jediná úloha proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK2.

Hlavním cílem této diplomové práce byla optimalizace protokolu pro fosforylaci lidské CaMKK2 (rezidua 93-517) obsahující čtyři PKA fosforylační místa, Ser100, Thr145, Ser495 a Ser511, a následně charakterizovat komplex proteinu CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C pomocí analytické ultracentrifugace metodou sedimentační rychlosti, chemickým zesíťením spojeným s MS, vodík-deuteriovou výměnou spojenou s MS a malouhlovým rozptylem rentgenového záření.

Pomocí analytické ultracentrifugace byla stanovena zdánlivá disociační konstanta pro komplex CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Chemické zesíťení poskytlo informaci o vzájemné orientaci proteinů, vodík-deuteriová výměna poskytla informaci, které oblasti jsou ovlivněny vazbou, a malouhlový rozptyl rentgenového záření společně s počítačovým modelováním poskytly základní strukturní parametry, tvar molekulových obálek a vytvoření přibližného modelu, který je v souladu s předchozími experimenty.

## Abstract

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) belongs to the serine/threonine protein kinase family, which is involved in the calcium signaling pathway. The increase of intracellular calcium concentration induces the activation of calmodulin (CaM), which then activates its binding partners including CaMKII, CaMKIII, CaMKK1 and CaMKK2. CaMKK2 activates CaMKI, CaMKIV and AMP-dependent kinase, AMPK, by phosphorylation.

CaMKK2 is naturally present in cells in an autoinhibited state, which is caused by the steric hindrance of the active site by the autoinhibitory domain. When calmodulin binds to the calmodulin-binding domain, the autoinhibitory domain is removed and the active site becomes accessible. Upon activation, CaMKK2 undergoes autophosphorylation, which increases its enzyme activity. Negative regulation of CaMKK2 is mediated by cAMP-dependent protein kinase A (PKA)- and GSK3-dependent phosphorylation. Sites phosphorylated by PKA have been identified for both CaMKK1 and CaMKK2. Two of them are also motifs recognized by scaffolding 14-3-3 proteins. Previous studies have shown that the 14-3-3 protein binding maintains phosphorylated CaMKK2 in an inhibited state by blocking the dephosphorylation of S495, which prevents the binding to calmodulin. However, it is unclear if it is the only role of the 14-3-3 protein in the regulation of CaMKK2.

The main goal of this master thesis was to optimize the protocol for the phosphorylation of human CaMKK2 (residues 93-517), which contains four phosphorylation sites (Ser100, Thr145, Ser495 and Ser511) and to characterize the CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C protein complex by analytical ultracentrifugation-sedimentation velocity method, chemical crosslinking coupled to MS, hydrogen-deuterium exchange coupled to MS and small angle X-ray scattering.

The apparent dissociation constant of the CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C complex was determined by analytical ultracentrifugation, chemical crosslinking provided information about the mutual orientation of both proteins. The hydrogen-deuterium exchange provided information about areas which are affected by the complex formation, and the small-angle X-ray scattering together with computer modeling provided the basic structural parameters of the complex, its molecular envelope, and an approximate model consistent with previous experiments.

# Obsah

1.	Literární úvod .....	9
1.1.	Proteinkinasy a fosfatasy .....	9
1.2.	Vápníková signální dráha .....	11
1.2.1	Kalmodulin (CaM) .....	12
1.2.2	CaMK, CaMKK a AMPK .....	13
1.3.	Proteiny 14-3-3 .....	17
2.	Cíle práce .....	19
3.	Chemikálie .....	20
4.	Přístroje a příslušenství .....	21
5.	Metody .....	22
5.1.	Expres a purifikace proteinů .....	22
5.2.	Elektroforézy .....	24
5.2.1	SDS-PAGE .....	24
5.2.2	Nativní elektroforéza .....	25
5.2.3	Phos-tag SDS-PAGE .....	26
5.3.	Expres a purifikace kalmodulinu (CaM) .....	27
5.3.1	Expres kalmodulinu .....	27
5.3.2	Sonikace .....	27
5.3.3	Chromatografie založená na hydrofobních interakcích .....	27
5.3.4	Velikostně-vylučovací chromatografie (SEC) .....	28
5.4.	Expres a purifikace proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C .....	29
5.4.1	Expres proteinu .....	29
5.4.2	Sonikace .....	29
5.4.3	Niklová afinitní chromatografie .....	29
5.4.4	Aniontově-výměnná chromatografie .....	30
5.4.5	Velikostně-vylučovací chromatografie .....	31
5.5.	Expres a purifikace CaMKK2 D330A .....	32
5.5.1	Expres proteinu a lyzace buněk .....	32
5.5.2	Sonikace .....	32
5.5.3	Niklová afinitní chromatografie .....	33

5.5.4	Velikostně-vylučovací chromatografie.....	33
5.5.5	Fosforylace CaMKK2 D330A.....	34
5.5.6	Velikostně-vylučovací chromatografie po fosforylaci.....	34
5.5.7	Expres a purifikace CaMKK2 T145A D330A S495A.....	35
5.5.8	Fosforylace .....	35
5.6.	Strukturní analýza proteinů a komplexů .....	36
5.6.1	LC-MS analýza fosforylovaných míst a jejich defosforylace v přítomnosti i nepřítomnosti proteinu 14-3-3 $\gamma$ DC.....	36
5.6.2	Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti .....	38
5.6.3	Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií.....	41
5.6.4	Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií.....	42
5.6.5	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) .....	43
5.6.6	Počítačové modelování .....	45
6.	Výsledky.....	47
6.1.	Expres a purifikace CaM .....	47
6.2.	Expres a purifikace 14-3-3 $\gamma$ DC .....	49
6.3.	Expres a purifikace CaMKK2 D330A a T145A D330A S495A .....	52
6.3.1	Fosforylace CaMKK2.....	54
6.3.2	Velikostně vylučovací chromatografie po fosforylaci .....	55
6.4.	Biofyzikální a strukturní charakterizace proteinů a komplexů.....	57
6.4.1	Nativní elektroforéza .....	57
6.4.2	Analýza defosforylace pomocí Phos-tag SDS-PAGE a LC-MS analýzy .....	58
6.4.3	Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií.....	61
6.4.4	Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti .....	63
6.4.5	H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií.....	66
6.4.6	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) .....	70
6.4.7	Strukturní modelování binárního komplexu .....	75
7.	Diskuze .....	79
8.	Závěr .....	82
9.	Reference .....	83
10.	Přílohy.....	88

# Seznam zkratek

AI médium.....	autoindukční médium
ATP.....	adenosin-5'-trifosfát
APS.....	peroxodisíran amonný
AUC.....	analytická ultracentrifugace
CaM.....	kalmodulin
CaMK.....	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní proteinkinasa
CaMKK.....	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa
CBD.....	kalmodulin vazebná doména
DSS.....	disukcinimidyl suberát
DSG.....	disukcinimidyl glutarát
DTT.....	4-dithiotreitol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA.....	kyselina ethylendiamintetraoctová
H/D výměna.....	vodík-deuteriová výměna
HEPES.....	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
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
SAXS.....	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SDS.....	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE.....	elektroforéza s SDS polyakrylamidovým gelem
SEC.....	velikostně-vylučovací chromatografie (z ang. <i>size-exclusion</i> )
TCEP.....	tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED.....	tetramethylethylendiamin
TEV proteasa.....	Tobacco etch virus proteasa
TRIS.....	tris(hydroxymethyl)aminomethan
βME.....	β-merkaptoethanol

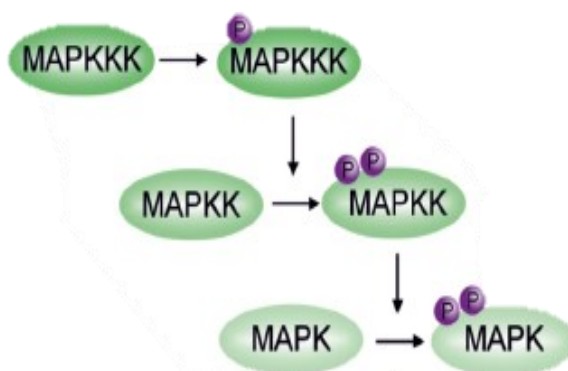


# 1. Literární úvod

## 1.1. Proteinkinasy a fosfatasy

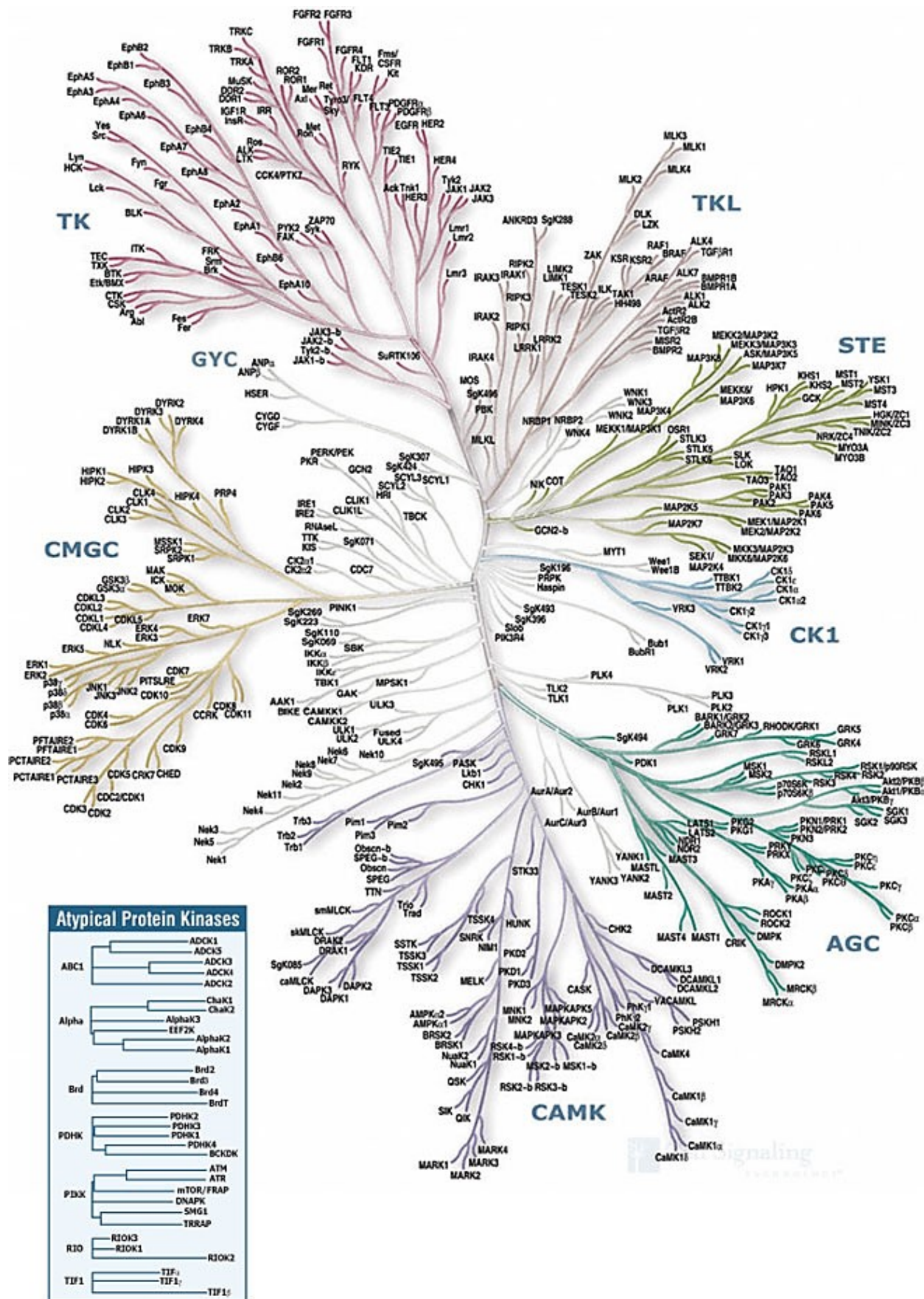
Proteiny jsou velice důležité pro náš život a můžeme je dělit podle jejich tvaru, funkcí nebo složení. Podle jejich funkce je můžeme dále rozdělit na stavební, zajišťující pohyb, transportní či katalytické. Většinu biochemických dějů v těle mají na starost enzymy, které patří do skupiny katalytických proteinů. Ty dále lze dělit podle jejich mechanismu působení na 7 tříd, oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy, ligasy a translokasy. Některé z nich způsobují fosforylaci a nazývají se kinasy. Opačný proces, tedy defosforylaci, způsobují fosfatasy, které patří mezi hydrolasy. Proteinkinasy patří do třídy transferas a účastní se posttranslační modifikace proteinů, při níž přenášejí fosfátovou skupinu za spotřeby ATP. Běžně se fosfátová skupina přenáší na serin, threonin či tyrosin vazbou přes kyslík, ale v některých případech dochází k fosforylaci přes N-vazbu, při níž je fosfátová skupina přenesena na arginin, histidin nebo lysin. Význam fosforylace spočívá v aktivaci nebo inhibici daného substrátu, a tudíž přenesení signálu. Kromě přenesení fosfátové skupiny odlišnou kinasou je možná i tzv. autofosforylace, kdy kinasa fosforyluje sama sebe [1].

Až 2 % genomu eukaryotních buněk je tvořeno geny proteinkinasy a jen malé množství kinas je konstantně aktivních [2]. Většina kinas je regulována pomocí interakcí s dalšími enzymy. V dnešní době je známé, že kinasy jsou také aktivované i kinasami kinas a ty jsou aktivované kinasami kinas kinas, jako je například v MAPK signální dráze (Obrázek 1.1) [3].



**Obrázek 1.1** - Část MAPK signální dráhy. Fosforylovaná MAPKKK aktivuje fosforylací MAPKK a ta následně MAPK stejným mechanismem. MAPK z angl. mitogen-activated protein kinases. Převzato z [3].

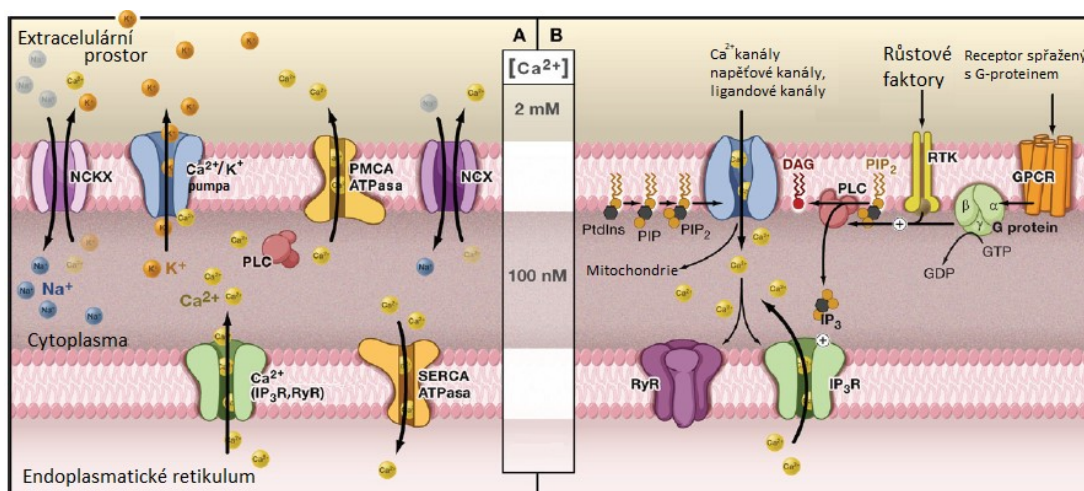
Některé z kinas se objevují napříč všemi eukaryotními systémy, některé jsou specifické pro daný systém [2]. Kinasy se řadí do rodin podle sekvenční podobnosti. Lidský kinom (Obrázek 1.2 na straně 10) obsahuje 8 rodin eukaryotních kinas, mezi které patří i rodina CaMK. Součástí této rodiny je protein CaMKK2, studovaný v této práci, který se účastní vápníkové signální dráhy [4].



**Obrázek 1.2** - Schéma lidského kinomu. Lidský kinom obsahuje 8 rodin eukaryotních proteinkinas a 7 rodin atypických kinas. Mezi typické patří: tyrosin kinasy (TK), tyrosine kinase-like (TKL), homology kvasinkových kinas Sterile 7/MEK, Sterile 11/20 (STE), kasein kinasy 1 (CK1), proteinkinasy A, C, G (AGC),  $Ca^{2+}$ /kalmodulin-dependentní kinasy – (CaMK), CDK, MAPK, GSK, CDLK a RGC kinas (CMGC). Převzato z [4].

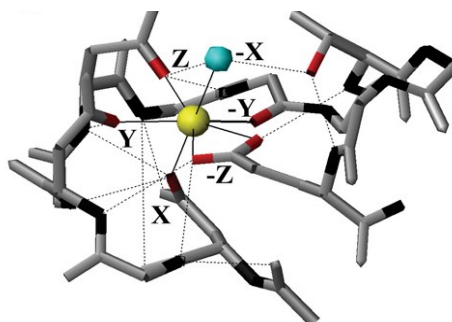
## 1.2. Vápníková signální dráha

Podobně jako fosfátová skupina, vápenaté kationty mění strukturu a elektrostatický náboj bílkovin, tudíž se proteiny, které vážou vápník, účastní signálních drah a mají většinou efekt právě na kinasy nebo fosfatasy. Koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů mimo buňku je přibližně  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>, kdežto uvnitř buňky  $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>. Regulace kationtů je zprostředkována pomocí vápníkových kanálů, které se třídí do různých skupin podle typu přenosu. Kanály řízené napětím se dále dělí na L-, N-, P-, Q-, R- a T-typ, podle typu buněk, kde se nachází. Dále existují kanály, které jsou řízeny pomocí vazby ligandu, např. inositoltrifosfátové receptory ( $\text{IP}_3$ ) a ryanodinové receptory (RyR). Další systém, který přispívá ke změně koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , jsou iontové pumpy, příkladem je  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$  nebo  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  pumpa. Výsledkem všech těchto příspěvků je přísně řízená regulace iontů jak v intracelulárním prostoru, tak v konkrétních organelách buňky (Obrázek 1.3). V důsledku zvýšení koncentrace vápenatých iontů v mezibuněčném prostoru vznikne signál, který se následně přenáší z proteinů až k cílovému substrátu [5].



**Obrázek 1.3** - Regulace intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  (žlutě) v buňce [5]. A - Regulace koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách při klidové fázi. B - Regulace koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce při vápníkové signalizaci – dochází k zvýšení koncentrace v intracelulárním prostoru pomocí aktivování napěťových kanálů a otevření  $\text{IP}_3\text{R}$  receptoru.

V proteinech je vápník zachycen pomocí šesti až sedmi karboxylových skupin ve tvaru pentagonální bipyramidy (Obrázek 1.4). K zachycení vápenatých kationtů dochází v oblasti tzv. EF-motivu, který je tvořen uspořádáním helix-otočka-helix. Jedním z nejvíce prostudovaných proteinů, které váží vápník, je kalmodulin [5–8].

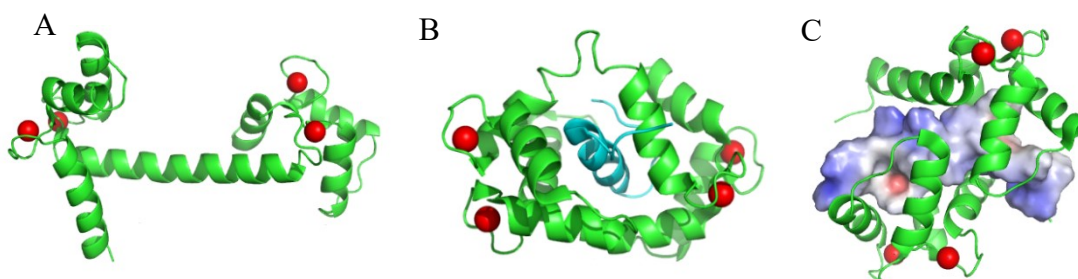


**Obrázek 1.4** -  $\text{Ca}^{2+}$  kation vázaný v EF motivu: Vápenatý kation (žlutě) je stabilizován pomocí 6 aminokyselin a vody (modře) ve tvaru pentagonální bipyramidy. Červeně jsou značeny kyslíky [7].



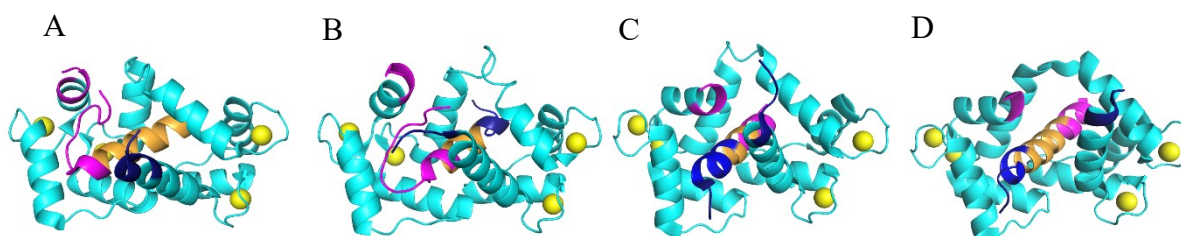
### 1.2.1 Kalmodulin (CaM)

Kalmodulin je malý protein o velikosti přibližně 17 kDa, který se vyskytuje napříč všemi eukaryotními systémy a jeho struktura je vysoce konzervovaná. Prostřednictvím vazby reguluje řadu různých proteinů včetně fosfatů a kinas. Kalmodulin obsahuje čtyři EF motivy, které jsou vazebnými místy pro vápenaté kationty s  $\mu\text{M}$  afinitou. Vazba  $\text{Ca}^{2+}$  způsobuje odhalení hydrofobních aminokyselin (Obrázek 1.5A) a díky tomu se kalmodulin dokáže selektivně vázat na své vazebné partnery. Vazebné místo pro kalmodulin není přesně definované sekvencí aminokyselin, ale je tvořeno  $\alpha$ -helixem, který je z části kladně nabitý a obsahuje hydrofobní aminokyseliny (Obrázek 1.5B a 1.5C) [9]. Dva EF motivy se nalézají na N-koncovém laloku, dva na C-koncovém laloku. Tyto dva laloky jsou spojeny centrálním  $\alpha$ -helixem tvořeným osmi otočkami, což způsobuje flexibilitu daného proteinu.



**Obrázek 1.5** - Struktury kalmodulinu. Červeně jsou značeny čtyři atomy vápenatých kationtů. A - Struktura samotného kalmodulinu, PDB: 1CLL. B - Kalmodulin ve vazbě s peptidem CaMKK2 (modře) (PDB:1CKK). C - Znárodnění elektrostatických sil peptidu CaMKK2. Modrá barva odpovídá kladnému náboji, červená zápornému náboji, bílá – hydrofobním aminokyselinám. Vizualizace pomocí programu PyMOL [10].

U kalmodulin-dependentních kinas a kalmodulin-dependentních kinas kinas (CaMK a CaMKK) se kalmodulin-vazebné místo překrývá s autoinhibiční doménou. Po navázání  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinu dochází k přerušení interakce autoinhibiční domény s aktivním místem a kinasy mohou předat signál dál prostřednictvím aktivace jejich substrátů. V případě CaMK1 a CaMK2 je orientace navázaného kalmodulinu opačná než u peptidu CaMKK1 (Obrázek 1.6), což naznačuje, že kalmodulin může mít i jinou funkci [11].



**Obrázek 1.6** - Kalmodulin (světle modře) s navázanými čtyřmi vápenatými kationty (žlutě) v komplexu s peptidy. A - CaMKK z hádátka obecného (PDB: 1IQ5) B - krysí CaMKK1 (PDB:1CKK) C) CaMKII (PDB:3GP2) D - CaMK1 (PDB:1MXE). Modře N-konec. Fialově C-konec. Orientace kalmodulinu je neměnná. Vizualizováno v aplikaci PyMOL [10].

Kalmodulin prostřednictvím svých vazebných partnerů ovlivňuje transport iontů, osmotický tlak, růst buněk a buněčnou smrt, autofagii, skládání proteinů, jejich fosforylaci a defosforylaci, svalové kontrakce, genovou expresi etc. Při jeho dysregulaci dochází k rakovině a dalším onemocněním [12].

### 1.2.2 CaMK, CaMKK a AMPK

CaMK je označení pro  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní kinasy a CaMKK je označení pro kinasy těchto kinas, které patří do rodiny serin/threonin kinas a jejich kinasová aktivita je závislá na přítomnosti kalmodulinu. Do rodiny CaMK patří CaMKI, CaMKII, CaMKIII (známá jako eEF-2K) a CaMKIV. Do rodiny CaMKK patří CaMKK1 (CaMKK $\alpha$ ) a CaMKK2 (CaMKK $\beta$ ). Všechny tyto kinasy jsou tvořeny kinasovou doménou, která obsahuje ATP-vazebné místo, kalmodulin-vazebnou doménou a autoinhibiční doménou (u CaMKIII není tato informace známá). Kromě toho CaMKII obsahuje i doménu, která je odpovědná za oligomerní stav, proto se CaMKII jako jediná vyskytuje ve formě dodekameru. Pro všechny CaMK kinasy je typická autoinhibice, která je způsobena autoinhibiční doménou, jež interaguje s místem, kde se váže substrát.

Při zvýšení hladiny vápenatých kationtů v buňce dochází k vazbě CaM, která způsobuje uvolnění autoinhibiční domény a zpřístupnění vazebného místa pro daný substrát. Dále u CaMKII, CaMKIII, CaMKIV, CaMKK1 a CaMKK2 dochází k autofosforylaci, jež má za následek zvýšení aktivity enzymu a u CaMKII dochází také ke zvýšení afinity ke kalmodulinu. Zatímco CaMKII je závislá pouze na vazbě kalmodulinu, CaMKI a CaMKIV potřebují pro svou aktivaci ještě CaMKK, která fosforyluje jejich threonin v aktivní smyčce.

Kalmodulin-vazebné místo také obsahuje druhé fosforylační místo, které brání vazbě kalmodulinu a přispívá tak k inhibici enzymatické aktivity. Přítomnost různých fosforylačních míst, jež mají funkci aktivovat či inhibovat enzym, má za následek přísně řízenou enzymatickou aktivitu a tudíž pomáhá vytvořit konkrétní signál [13].

CaMKK1 a CaMKK2 jsou v katalytické doméně přibližně ze 70 % sekvenčně podobné. Oba proteiny obsahují oblast bohatou na proliny, díky níž vyhledávají své substráty, CaMKI a CaMKIV, avšak CaMKK2 ještě navíc aktivuje AMPK. Obě tyto kinasy jsou fosforylované cAMP-dependentní proteinkinasa A (PKA), díky níž zůstávají v inhibovaném stavu, a obě tyto kinasy interagují s proteinem 14-3-3 [14, 15].

AMP-aktivovaná proteinkinasa neboli AMPK je kinasa citlivá na změny poměru koncentrací AMP:ATP v buňce. Při nadbytku AMP je schopna potlačit děje, které spotřebovávají ATP. Dále její aktivitu zvyšuje fosforylace na pozici T172, která je zprostředkovávaná pomocí proteinkinasy LKB1 a CaMKK2. Na rozdíl od kalmodulin-dependentních kinas není závislá na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, ale pouze na autonomní aktivitě CaMKK2. Aktivita AMPK způsobená fosforylací T172 je daleko vyšší, než aktivita AMPK způsobená vazbou AMP, tudíž komplex CaMKK2/AMPK je tak dále regulován přítomností  $\text{Ca}^{2+}$ , nikoli AMP, což naznačuje funkci CaMKK2 jako molekulárního přepínače mezi CaMKK2/CaMK a CaMKK2/AMPK dráhou [16].

Při dysfunkci CaMKIV bylo pozorováno zhoršení motorických vlastností a paměti. CaMKI je důležitá pro růst axonů a dendritů, tudíž CaMK a CaMKK jsou důležité při vývoji mozku. Při jejich dysfunkci byla pozorována onemocnění jako schizofrenie, bipolární porucha, deprese a další neurologická onemocnění, proto poskytují velké pole působnosti a jsou intenzivně studovány. Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní signální dráha je znázorněna na Obrázku 1.8, str. 16.

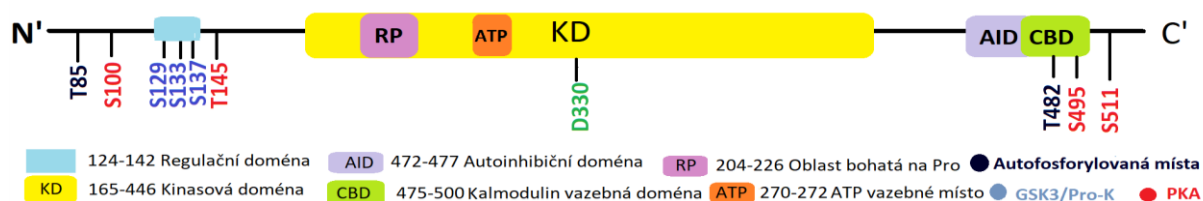
### Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa 2 (CaMKK2)

Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa 2 (CaMKK2) neboli CaMKKβ patří do rodiny serin/threonin kinas a je přímo aktivována kalmodulinem. Existuje 7 transkripčních variant, které jsou přepsány do šesti isoform. V isoformách 5-6 chybí kalmodulin-vazebná doména [17]. Mezi její substráty patří CaMKI, CaMKIV a AMPKα. K nejvyšší expresi dochází v mozku a ovlivňuje regulaci glukózy a náladu. Při její dysregulaci dochází například k schizofrenii či rakovině [18].

#### Struktura a regulace CaMKK2

Lidská CaMKK2 je tvořena 588 aminokyselinami, na rozdíl od lidské CaMKK1, která jich má pouze 505. Podle dosavadních poznatků se CaMKK2 skládá ze tří domén (Obrázek 1.7): z dvou regulačních domén a kinasové domény, která obsahuje oblast bohatou na argininy/proliny (RP) a ATP vazebné místo. První regulační doména se nalézá na N-konci, druhá na C-konci a skládá se z autoinhibiční domény a kalmodulin-vazebné domény a je typická pro všechny CaMK kinasy.

Pro všechny kinasy je typický DFG motiv, který se vyskytuje v aktivní smyčce a jehož fosforylací se kinasa aktivuje. V případě CaMKK2 se nalézá DFG motiv v oblasti D330-G332 [19].



**Obrázek 1.7** Doménová struktura CaMKK2. CaMKK2 je pozitivně regulována vazbou kalmodulinu a vlastní autofosforylací na T85 a T482. Naopak negativní regulace spočívá ve fosforylaci PKA vazebných míst (označeny červeně) či fosforylaci v regulační doméně na N-konci (aminokyseliny označené modře).

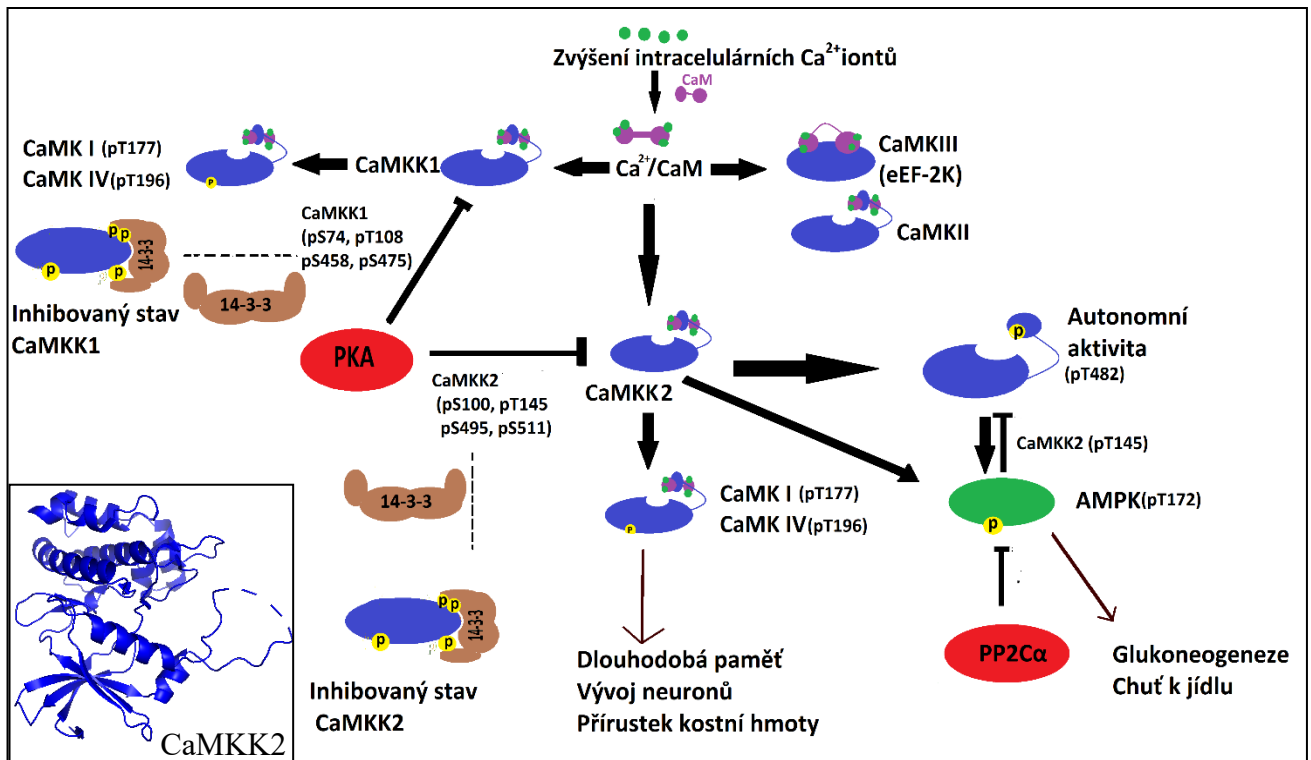
CaMKK2 se přirozeně vyskytuje v neaktivní formě způsobené vlastní autoinhibicí, zapříčiněné sterickým bráněním aktivního místa autoinhibiční doménou na C-konci. Po navázání kalmodulinu v oblasti kalmodulin-vazebného místa, které se částečně překrývá právě s autoinhibiční doménou, je tato doména odkloněna od aktivního místa a následuje autofosforylace na T85 a T482, což má za následek zvýšení aktivity. Aktivní CaMKK2 je dále regulována fosforylací v regulační doméně, kde GSK3 a CDK5 fosforylují S129, S133 a S137, jež má za následek potlačení autonomní aktivity a vede ke správnému vývoji axonů [16, 18, 20].

Ke snížení aktivity dochází také fosforylací PKA fosforylačních míst, což jsou S100, T145, S495 a S511. Efekt fosforylace těchto míst byl prvně popsán u CaMKK1 [21]. Fosforylovaný S495 blokuje vazbu s kalmodulinem a fosforylovaný S100 a S511 zprostředkovávají vazbu s proteinem 14-3-3, který chrání fosforylovaný S495 před defosforylací, a tudíž před předčasnou aktivací CaMKK2 [22]. Oblast bohatá na argininy a proliny je následně důležitá pro rozpoznání CaMKI a CaMKIV a tudíž pro jejich aktivaci. CaMKI a CaMKIV jsou tedy závislé na přítomnosti CaMKK2 i CaM, na druhou stranu AMPK je závislá pouze na autonomní aktivitě CaMKK2. Při fosforylaci T482 u CaMKK2 dochází k aktivaci AMPK, která následně fosforyluje T145 u CaMKK2 a tak zajišťuje aktivitu CaMKK2 závislou na přítomnosti kalmodulinu [23].

### **Biologická funkce**

V současné době přibývá lidí, kteří mají problém s obezitou, která souvisí se špatným metabolismem cukrů. Zhoršení tohoto efektu má za následek cukrovku 2. typu. Obezita koreluje se sníženou hladinou vápenatých kationtů v intracelulárním prostoru buňky, přičemž následně dochází k jejich uvolnění z endoplazmatického retikula, což má za následek aktivování kalmodulinu a kalmodulin-dependentních kinas. Dosavadní studie ukazují, že CaMKK2 reguluje prostřednictvím AMPK hladinu cukru v těle. Myši, které přišly o gen exprimující CaMKK2, si udržovaly standardní hladinu inzulínu i po dobu vystavení stresům jako hladovění, překrmění a nízkotučným dietám. To naznačuje, že role CaMKK2 v pankreatu spočívá v regulaci odpovědi organismu na hladinu inzulínu. Při sedavém režimu a nadbytku živin dochází ke zvýšené hladině CaMKK2, jež aktivuje AMPK, což způsobí vyšší hladinu leptinů, které stimulují absorpci a uskladnění lipidů do tkání a snižují citlivost na inzulín, což následně vede k obezitě a cukrovce 2. typu. Zvýšená hladina cukru může také vyvolat oxidační stres, což ovlivňuje i správný růst kostí. Regulace CaMKK2 by tak mohla být cenným terapeutickým cílem, jak pro řešení obezity a cukrovky 2. typu, tak pro správnou regeneraci kostí [24, 25].

CaMKK2 má nejvyšší expresi v mozku, a tudíž je spojována s neurodegenerativními chorobami jako je například Alzheimerova choroba. Její exprese souvisí s regulací transferinů, které udržují stabilní hladinu železitých kationtů prostřednictvím CaMKIV. Špatná regulace transferinů způsobí nahromadění železa v mozku, což vede k poškození neuronů [26, 27]. CaMKK2 je také spojována s rakovinou prostaty [28].



**Obrázek 1.8** -  $\text{Ca}^{2+}$  signální dráha. Při zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v intracelulárním prostoru buňky dochází k aktivaci kalmodulinu, který následně aktivuje CaMKII, CaMKIII, CaMKK1 a CaMKK2. Následně CaMKK1 a CaMKK2 aktivují prostřednictvím fosforylace CaMKI, CaMKIV a AMPK což následně ovlivňuje růst a vývoj nervových buněk či regulaci hladiny cukru v těle. Vlevo dole je struktura kinasové domény, která je vizualizována pomocí aplikace PyMOL. PDB: 5UY6.

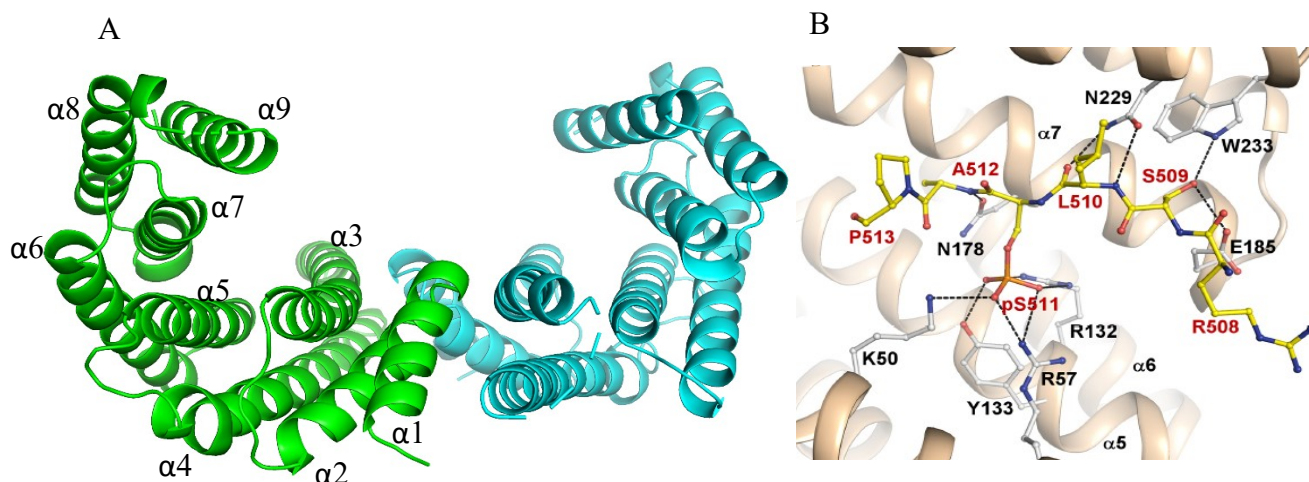


### 1.3. Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 získaly svůj název z migrační a eluční pozice na dvourozměrné DEAE-celulosové chromatografii a z migrační pozice na škrobové elektroforéze. Jsou velice konzervované a jsou exprimovány ve všech eukaryotických systémech. Devět savčích isoform je pojmenováno dle řecké abecedy –  $\alpha$  (fosforylovaná  $\beta$ ),  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (fosforylovaná  $\gamma$ ),  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  a dále kvasinky obsahují dvě isoformy, Bmh1 a Bmh2. Všechny proteiny 14-3-3 vytváří stabilní homo či heterodimery. Molekulová hmotnost protomeru se pohybuje okolo 30 kDa a jejich izoelektrický bod leží v kyselé oblasti, okolo hodnoty 4 až 5 [29].

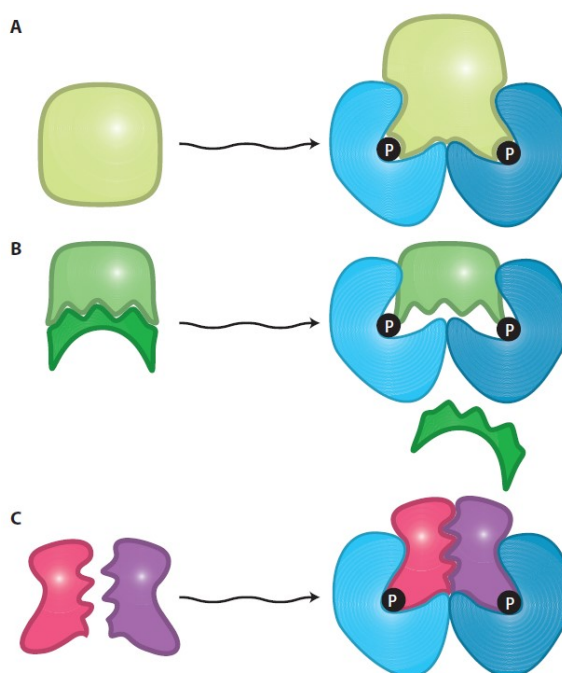
Protomery proteinů 14-3-3 se skládají z 9  $\alpha$ -helixů, které jsou navzájem v antiparalelní poloze, v dimeru následně utváří dva žlábký, které jsou typické pro vazbu s jejich partnery či ligandy (Obrázek 1.9A). Dimer má tvar kalichu, kde vnitřní část tvoří převážně konzervované aminokyseliny. Zatímco  $\alpha$ -helixy 3 a 5 jsou tvořeny polárními aminokyselinami,  $\alpha$ -helixy 7 a 9 spíše hydrofobními.

Proteiny 14-3-3 vážou pouze nestrukturovaný peptid obsahující fosforylovaný serin či threonin. Vazba je stabilizovaná pomocí solných můstků a vodíkových vazeb. Například u proteinu 14-3-3 $\zeta$  se této vazby účastní K49, R56 a R127, díky čemuž vznikají solné můstky, a také Y128, který vytváří vodíkovou vazbu [29]. Byly nalezeny tři základní typy motivů pro vazbu s proteinem 14-3-3: RSXpSXP, RXXXpSXP a pS/pT(X<sub>1-2</sub>)-COOH, kde pS představuje fosfoserin, R je arginin, P je prolin a X je jakákoliv aminokyselina. Avšak je zajímavé, že ne všechny proteiny interagující s proteinem 14-3-3 tuto sekvenci mají [30–32]. Jeden z vazebných partnerů je i protein CaMKK2, jež obsahuje na svém N-konci a C-konci fosforylovaný serin. Na N-konci CaMKK2 se nachází peptid o sekvenci RKLpSLQER, který byl vykrystalizován s proteinem 14-3-3 $\zeta$ , ačkoliv se nejedná o typický motiv, a peptid RSLpSAP, který se nalézá na C-konci a který je typickým motivem pro vazbu s proteinem 14-3-3, byl vykrystalizován s proteinem 14-3-3 $\gamma$  (Obrázek 1.9B) [21].



**Obrázek 1.9** – A - Struktura proteinu 14-3-3 $\gamma$  ve formě dimeru (PDB:6FEL), vizualizováno v programu PyMOL [10]. Každý protomer je tvořen devíti helixy. B - interakce peptidu CaMKK2 obsahující fosforylovaný S511 s proteinem 14-3-3 $\gamma$ , převzato z [21].

Ačkoli je známo, v jakých místech proteiny interagují s proteiny 14-3-3, u některých vazeb není zcela jasná funkce. Bylo zjištěno, že protein 14-3-3 ovlivňuje své vazebné partnery různými mechanismy, které byly zatím rozděleny do tří základních skupin. Prvním z nich je ovlivnění aktivity vazebného partnera, buď blokováním jeho aktivního místa, udržením vazebného partnera v inhibovaném stavu nebo ovlivněním či stabilizací jeho struktury (Obrázek 10A). Tento mechanismus byl popsán v případě Raf-1, kde protein 14-3-3 udržuje Raf-1 v neaktivním stavu do doby, než by měl být aktivován. Poté protein 14-3-3 změní svou úlohu a stabilizuje aktivní konformaci [29]. Dalším mechanismem regulace je zakrytí/odkrytí či odstranění signalizační sekvence, který byl pozorován u histondeacetylasy (HDAC) (Obrázek 10B). Když HDAC je fosforylována, dochází k vazbě s proteinem 14-3-3, přičemž dochází k expozici nukleární exportní sekvence (NES) a HDAC je tak exportován do cytoplazmy. Třetí funkcí je podpora interakce mezi dvěma proteiny. Protein 14-3-3 vytvoří vazbu s dvěma proteiny, tím utvoří preferovanou pozici a proteiny tak mezi sebou mohou lépe interagovat (Obrázek 10C). Příkladem tohoto mechanismu je vytvoření komplexu proteinu 14-3-3, GSK (glukogensythasa kinasa) a Tau. GSK tak může lépe a efektivněji fosforylovat protein Tau [33].



**Obrázek 1.10** - Mechanismy působení proteinu 14-3-3 na své vazebné partnery: A – zablokování vazebného místa, či protekce fosforylovaného místa před defosforylací. B- Odkrytí signalizační sekvence. C - Podpora interakce mezi dvěma proteiny. Převzato z [33].

Ačkoli je známo mnoho mechanismů, jak protein 14-3-3 ovlivňuje své vazebné partnery, není mnoho informací, jak je regulován protein 14-3-3. Jednou z možných regulací je jeho fosforylace. Studie naznačily, že fosforylovaný S184 blokuje interakci proteinu 14-3-3 s jeho vazebným partnerem. Ačkoli mnoho isoform je si podobných a mohou se tedy navzájem zastupovat, isoforma  $\sigma$  se od ostatních mírně liší jak sekvenčně, tak i její dimerní formou, jelikož zastupuje pouze homodimer [33].

## 2. Cíle práce

- Příprava lidské  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependetní proteinkinasy kinasy 2 (rezidua 93-517), obsahující mutace T145A, D330A, S495A.
- Příprava lidské  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependetní proteinkinasy kinasy 2 (rezidua 93-517), obsahující mutaci D330A.
- Optimalizace fosforylačního protokolu CaMKK2 D330A cAMP-dependetní proteinkinasou A.
- Příprava kalmodulinu a proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$  (rezidua 1-234).
- Strukturní a biofyzikální charakterizace komplexu CaMKK2:14-3-3 $\Delta\text{C}$ .

### 3. Chemikálie

1,4-dithiothreitol .....	Sigma-Aldrich, USA
ATP .....	Sigma-Aldrich, USA
akrylamid/bisakrylamid 30% ROTIPHORESE® (37,5 : 1) .....	Carl Roth, Německo
ampicilin .....	Carl Roth, Německo
azid sodný .....	Penta, ČR
Black Protein Ladder .....	Cebiosys, ČR
Blue Protein Ladder .....	Cebiosys, 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
chelating Sepharose® Fast Flow .....	Sigma-Aldrich, USA
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
lysosym .....	Carl Roth, Německo
médium Luria-Bertani .....	Carl Roth, Německo
metanol .....	Penta, ČR
phenyl sepharosa CL-4B .....	GE Healthcare, USA
phos-tag™ AAL-107 .....	NARD
persulfát amonný .....	Sigma-Aldrich, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards .....	Bio-Rad, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards .....	Bio-Rad, USA
proteinfosfatasa 1, katalytická podjednotka, isoforma α .....	Sigma-Aldrich, USA
Q sepharosa Fast Flow .....	GE Healthcare, USA
sírán nikelnatý .....	Penta, ČR
tetramethylethylendiamin .....	Carl Roth, Německo
TRIS .....	Carl Roth, Německo
TRIS-hydrochlorid .....	Carl Roth, Německo
trypton .....	Carl Roth, Německo
β-merkptoethanol .....	Carl Roth, Německo

## 4. Přístroje a příslušenství

900ml centrifukační kyvety.....	Carl Roth, Německo
Analytická váha 420-3NM.....	Kern, Německo
Automatické pipety Eppendorf .....	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5804R .....	Eppendorf, Německo
Centrifuga Hermle Z323K.....	Hermle, Německo
Centrifuga MiniSpin® .....	Eppendorf, Německo
Centrifuga Sigma 8K.....	Sigma, Německo
Dialyzační membrána, typ 27/32 (cut off 14000) .....	Carl Roth, Německo
Filtrační nástavec na injekční stříkačky SPARTAN 13/0,45 .....	WHATMAN, UK
Filtrační nástavec na injekční stříkačky SPARTAN 30/0,45 .....	WHATMAN, UK
Filtrační souprava PSF .....	P-LAB, ČR
Filtr membránový .....	WHATMAN, UK
FPLC .....	Watrex, ČR
HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg .....	GE Healthcare, USA
HiLoad 26/600 Superdex® 200 pg .....	GE Healthcare, USA
Injekční stříkačky Omnifix, 3 ml Luer Lock .....	B.Braun, Německo
Inkubátor Gallenkamp Orbital Incubator .....	Gemini BV, Holandsko
Inkubátor Multitron Infors NB-205 .....	AG, Švýcarsko
Kolonka pro afinitní chromatografii.....	Bio-rad, USA
Koncentrátor VivaspinTurbo.....	Biovendor, ČR
Magnetická míchačka Variomag.....	P-Lab, ČR
Mikrozkumavky, 1,5ml.....	P-Lab, ČR
Mikrozkumavky, 1,5ml.....	iBioTech, ČR
Mikrozkumavky, 2 ml.....	iBioTech, ČR
NanoPhotometer P-Class P 300 .....	IMPLEN, Německo
peristaltická pumpa Ecoline.....	Ismatec, Německo
Peristaltická pumpa Rotarus.....	VWR, USA
pH metr 3505 Jenway .....	P-Lab, ČR
ProteomLab™ XL-I analytická centrifuga .....	Beckman Coulter, USA
Sonikátor Q700 .....	QSonica, USA
Termoblok .....	Grant, UK
Vertikální elektroforesa .....	Bio-Rad, USA
Vodní lázeň SSB Aqua Pro .....	Grant, UK
Zdroj napětí pro elektroforézu .....	Bio-Rad, USA

## 5. Metody

Cílem této práce je exprese a purifikace několika proteinů a strukturní charakterizace komplexů, které tvoří.

### 5.1. Exprese a purifikace proteinů

Existuje mnoho strategií pro expresi proteinů. Důležité je vhodně zvolit expresní systém (např. savčí, hmyzí či bakteriální buňky), správný kmen a vektor, který ještě může obsahovat tzv. kotvu pro následnou selektivní separaci proteinu. Dále je možné měnit médium, teplotu, dobu trvání exprese atd. Při vhodné kombinaci všech parametrů lze dosáhnout poměrně dobrého výtěžku. V této práci byly proteiny exprimovány v buňkách *E.coli* a při expresi proteinů byly použity dva typy médií, LB médium a autoindukční médium (Tabulka 5.1). Plasmidy v buňkách obsahují *lac* operon, který je blokován represorem. Jakmile se na represor naváže 1,6-allolaktosa, dochází k uvolnění represoru a probíhá transkripce, translace a tudíž i exprese. Při použití LB média je potřeba indukovat buňky pomocí isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactosidem (IPTG), který nahrazuje 1,6-allolaktosu, a tím je buňkám dán pokyn pro expresi proteinu. Při použití autoindukčního média se volí jiná strategie. Autoindukční médium je pro buňky šetrnější, lépe vyhovuje jejich metabolismu a je vhodné pro méně rozpustné proteiny, jelikož exprese je pomalejší a samovolná. Nejdůležitější rozdíl ve složení médií je ten, že autoindukční médium obsahuje laktosu, která se dále zpracovává v buňkách na 1,6-allolaktosu a tím dochází k přirozenému odstranění represoru [34].

**Tabulka 5.1** - Složení médií pro *E.coli*.

LB Médium pro E. Coli (1l)		Autoindukční médium (1l)
LB Broth (Luria/Miller)	25 g	1% pepton
Deionizovaná voda	1 l	0,5% kvasinkový extrakt
		50mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		50mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		25mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		2mM MgSO <sub>4</sub>
		0,5% glycerol
		0,05% glukosa
		0,2% $\alpha$ -laktosa

Exprimované proteiny mohou zůstat v buňkách nebo se vylučovat do médií. Pokud protein zůstává v buňkách, je potřeba rozrušit buněčnou stěnu buď mrazem, tlakem, ultrazvukem či enzymaticky. Následně je potřeba oddělit cílený protein od ostatních. K tomuto účelu se často

používá afinitní chromatografie, která umožňuje oddělit cílový protein díky přítomnosti tzv. kotvy. Jednou z nejčastějších kotev je tzv. histidinová kotva, což je motiv po sobě jdoucích 6-8 histidinů. Tato kotva způsobuje vazbu proteinu na stacionární fázi kolony prostřednictvím dvojmocných kationtů, např.  $\text{Ni}^{2+}$ . Navázaný protein lze potom od stacionární fáze oddělit pomocí imidazolu, který se na stacionární fázi váže podobným způsobem jako postranní řetězce histidinu. Aby se na sepharosu nenašly i ostatní proteiny obsahující histidiny, je sepharosa zprvu promyta malou koncentrací imidazolu.

Afinity různých proteinů k sepharose se liší, tudíž se koncentrace imidazolu v promývacím pufu musí pro každý protein optimalizovat. Dalším krokem je odstranění této kotvy pomocí proteasy. Nejčastěji se používá TEV proteasa či thrombin. Posledním krokem je oddělení proteinu od agregátů a proteasy pomocí velikostně-vylučovací chromatografie, což je separační metoda umožňující dělit molekuly podle jejich velikosti a tvaru. Stacionární fáze je tvořena porézním gelem, který může být tvořen z dextranu, agarosy atd. Molekuly, jejichž průměr je menší než průměr pórů, vnikají difuzním pohybem do vnitřních prostor, v důsledku čehož jsou na koloně zadržovány déle než velké molekuly, které jsou nerušeně unášeny proudem mobilní fáze a vylučují se z kolony dříve. Molekuly větší než tzv. vylučovací limit gelu nejsou v koloně zadržovány vůbec. U některých proteinů lze využít jejich odlišné fyzikální vlastnosti i pro jiné typy chromatografií. V této práci je například využita vlastnost kalmulinu expandovat své hydrofobní aminokyseliny při hydrofobní interakční chromatografii či hodnota isoelektrického bodu (pI) proteinu 14-3-3 ležící v kyselé oblasti pH při iontové chromatografii. Čistota proteinů, úspěšnost štěpení a tvorba komplexů jsou dále ověřovány pomocí SDS-PAGE a nativní elektroforézy, v případě fosforylace je využita Phos-tag SDS-PAGE.

## 5.2. Elektroforézy

### 5.2.1 SDS-PAGE

Čistota proteinu je vizualizována pomocí SDS-PAGE. Podle velikosti proteinu jsou používány různé koncentrace akrylamidu v gelu. V této práci jsou využity 18%, 15% a 12% polyakrylamidové gely (Tabulka 5.2).

**Tabulka 5.2** - Složení gelů pro SDS-PAGE.

<b>X% separační akrylamidový SDS gel</b>	<b>Celkem 10 ml</b>
Akrylamid/bisakrylamid 30% ROTIPHORESE® (37,5 : 1)	X/3 ml
4x Separací pufr obsahující SDS	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	7,5-X/3 ml
10% Persulfát amonný	50 µl
TEMED	5 µl

<b>Zaváděcí akrylamidový SDS gel</b>	<b>Celkem 2 ml</b>
Akrylamid/bisakrylamid 30% ROTIPHORESE® (37,5 : 1)	0,3 ml
4x Zaváděcí pufr s SDS	0,52 ml
dH <sub>2</sub> O	1,18 ml
10% Persulfát amonný	24 µl
TEMED	2 µl

<b>4x Separací pufr</b>	<b>4x Zaváděcí pufr</b>
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	0,5M Tris-HCl, pH 6,8
0,4% SDS	0,4% SDS
dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O

Elektroforéza rozděluje proteiny dle jejich elektromigrační rychlosti, jež závisí na náboji a velikosti proteinů. Aby proteiny nebyly separovány podle jejich náboje (pI), ale podle velikosti jejich monomerních jednotek, je zapotřebí sjednotit hustotu a velikost náboje. Pro tento účel se využívá SDS, který se nalézá jak v gelu, tak i v mobilní fázi a ve vzorkovacím pufru (Tabulka 5.3), jenž obsahuje redukční prostředí. Vzorky jsou dále zahřívány na teplotu 90 °C po dobu 5 minut, aby byly zdenaturovány. Při SDS-PAGE tak všechny proteiny migrují k anodě. Mobilní fáze obsahuje Tris-glycinový pufr (Tabulka 5.3). SDS elektroforézy probíhaly při 200 V po dobu 1 hodiny.

**Tabulka 5.3** - Složení 5x vzorkovacího pufru a 10x Tris-glycinového pufru.

<b>5x Vzorkovací pufr</b>	<b>10x Tris-glycinový pufr</b>
60mM Tris-HCl, pH = 6,8	0,24M Tris báze
5% β-merkapt ethanol	1,9M Glycin
0,1% bromfenolová modř	1% SDS
25% glycerol	dH <sub>2</sub> O
5% SDS	
dH <sub>2</sub> O	



### 5.2.2 Nativní elektroforéza

Pro analýzu tvorby komplexů se využívá nativní elektroforéza v redukujícím či neredukujícím prostředí. Jelikož je v této práci studován komplex s proteinem 14-3-3, které má pI kolem hodnoty 5, mobilní fáze má pH přibližně 8. Byly vyzkoušeny dva druhy nativních 12% gelů, Tris-borátový a Tris-glycinový, jejichž složení obsahuje Tabulka 5.4.

**Tabulka 5.4** - Složení pufrů a gelů pro nativní elektroforézy.

<b>12% Tris-borátový gel</b>		<b>Celkem 7,6 ml</b>
Akrylamid/bisakrylamid 30% ROTIPHORESE® (37,5 : 1)		3 ml
10x TBE		0,75 ml
dH <sub>2</sub> O		3,7 ml
10% Persulfát amonný		50 µl
TEMED		5 µl

<b>12% Tris-glycinový gel</b>		<b>Celkem 7,6 ml</b>
Akrylamid/bisakrylamid 30% ROTIPHORESE® (37,5 : 1)		3 ml
10x Tris-glycinový pufr		0,52 ml
dH <sub>2</sub> O		1,18 ml
10% Persulfát amonný		24 µl
TEMED		2 µl

<b>10x TBE pH=8,5</b>	<b>10x Tris-glycinový pufr pH=8,7</b>
0.9M Tris báze	250 mM Tris
0,9M kyselina boritá	1,9M Glycin
30mM EDTA	dH <sub>2</sub> O
dH <sub>2</sub> O	

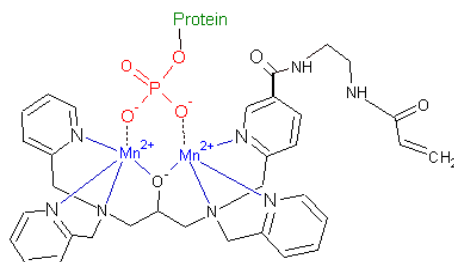
<b>5x Vzorkovací pufr</b>
1x TBE/ 1x Tris-glycin
30% glycerol
0,1% Bromfenolová modř
dH <sub>2</sub> O

Všechny nativní elektroforézy probíhaly při napětí 140 V po dobu 4,5 hodin za neustálého chlazení ledem.

### 5.2.3 Phos-tag SDS-PAGE

Část této práce se zabývá optimalizací fosforylačního protokolu pro CaMKK2 D330A, jež obsahuje čtyři fosforylační místa (S100, T145, S495, S511). Jedna z možností detekce fosforylovaného stavu je pomocí hmotnostní spektrometrie, ale jedná se o náročnou metodu, proto byla vyvinuta metoda elektroforézy. Pomocí této metody lze detekovat různé fosforylační stavy, avšak nelze určit, která rezidua jsou fosforylována.

Princip této metody spočívá v přítomnosti látky nazvané phos-tag<sup>TM</sup> AAL-107 (Obrázek 5.1) v polyakrylamidovém gelu. Tato látka na sebe váže koordinačně manganaté kationty, které dále interagují s fosfátovou skupinou, což má za následek zpomalení migrace proteinů, jež tuto skupinu obsahují, v gelu. Zpomalení je přímo úměrné počtu fosfátových skupin, tudíž protein, který neobsahuje žádnou fosfátovou skupinu, má nejvyšší migrační rychlost, protein, který obsahuje nejvíce těchto skupin, je nejpomalejší. Rozlišení lze ovlivnit procentuálním množstvím akrylamidu, koncentrací manganatých kationtů či koncentrací Phos-tagu [35].



**Obrázek 5.1** – Phos-tag vázající fosforylovaný protein. Struktura Phos-tag<sup>TM</sup> AAL-107 je vyobrazena černě. Fosfátová skupina je označena červeně. Obrázek byl vytvořen v programu ChemSketch [35].

Pro analýzu CaMKK2 D330A byla využita 12% SDS-PAGE obsahující 75 $\mu$ M phos-tag a pro analýzu CaMKK2 T145A D330A S495A byl použit 50 $\mu$ M phos-tag. Elektroforéza probíhala při 170 V po dobu 4,5 hodin za neustálého chlazení ledem. Složení separačního gelu obsahuje Tabulka 5.5. Složení zaváděcího gelu je stejné jako při SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24).

**Tabulka 5.5** - Složení separačního SDS polyakrylamidového gelu s 50 a 75 $\mu$ M phos-tag.

#### 12% Separační polyakrylamidový phos-tag gel

	75 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Akrylamid/Bis-akrylamid	4 ml	4 ml
1,5M Tris-HCl (pH=8,8)	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3,15 ml	3,15 ml
5mM Phos-tag	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l
10mM MnCl <sub>2</sub>	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
10% Persulfát amonný	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l
Celkový objem	10 ml	10 ml

### 5.3. Exprese a purifikace kalmodulinu (CaM)

Kalmodulin je relativně malý protein o hmotnosti 17 kDa, jehož extinkční koeficient má hodnotu  $2980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  při 280 nm. Při purifikaci je použita metoda hydrofobní interakční chromatografie, která využívá jeho schopnost odhalovat hydrofobní aminokyseliny v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Kalmodulin byl transformován do vektoru pET3a s rezistencí na ampicilin v buňkách BL21(DE3).

#### 5.3.1 Exprese kalmodulinu

Buněčná kultura byla inkubována v 5 ml LB média (Tabulka 5.1, strana 22), které obsahovalo ampicilin o koncentraci  $100 \mu\text{g/ml}$ , po dobu 15 hodin při 190 rpm a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  v orbitálním inkubátoru. Následně byla přenesena do 900 ml čerstvého LB média obsahujícího ampicilin a kultivace probíhala 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  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po dosažení hodnoty  $\text{OD}_{600}$  přibližně  $0,6 \text{ cm}^{-1}$  bylo přidáno IPTG o finální koncentraci  $100 \mu\text{mol/dm}^3$  a kultivace pokračovala po dobu 20 hodin. Poté byly buněčné kultury centrifugovány v 900ml kyvetách při  $2073 \times g$  při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut. Každá peleta byla resuspendována v 40 ml lyzačního pufru (Tabulka 5.6), a zmrazena při teplotě  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabulka 5.6** - Složení lyzačního pufru pro kalmodulin.

#### Lyzační pufr pro CaM

---

50mM Tris-HCl, pH = 7,5

2mM EDTA

2mM  $\beta$ -merkaptoethanol

dH<sub>2</sub>O

#### 5.3.2 Sonikace

Po rozmrazení buněčné kultury bylo přidáno PMSF o finální koncentraci  $0,1 \text{ mmol/dm}^3$  a buňky byly inkubovány s lysozymem o koncentraci  $10\,000 \text{ U/ml}$  po dobu 15 minut. Poté byly buňky vystaveny ultrazvuku, který probíhal v pravidelných pulzech trvajících 5 s a doba mezi jednotlivými pulzy trvala 17 s. Čistý čas působení ultrazvuku bez pauz byl 15 minut. Výkon se pohyboval mezi hodnotami 50-60 W. Poté byl roztok centrifugován při  $19561 \times g$  po dobu 45 minut při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , a následně byl do supernatantu přidán chlorid vápenatý o finální koncentraci  $5 \text{ mmol/dm}^3$ .

#### 5.3.3 Chromatografie založená na hydrofobních interakcích

Chromatografie založená na hydrofobních interakcích (HIC) využívá matici obsahující aromatické hydrofobní skupiny, v tomto případě se jednalo o fenyl-sepharosu CL-4B. Hydrofobní části proteinu interagují s hydrofobní sepharosou, aby byl omezen styk s polárním rozpouštědlem. Interakce proteinu s matricí je ovlivněna právě polaritou rozpouštědla. Čím

větší je iontová síla mobilní fáze, tím silnější je interakce proteinu s matricí. Následně je protein vyloučen z kolony snížením iontové síly mobilní fáze nebo změnou pH, popřípadě lze použít detergent narušující vazby mezi matricí a proteinem.

Jak už bylo zmíněno, kalmodulin odkrývá svá hydrofobní rezidua po vazbě s  $\text{Ca}^{2+}$ . Toho je využito právě při této chromatografii. Byly použity 4 ml matrice Phe-Sepharosy CL-4B pro purifikaci proteinu ze 4 l buněčných kultur. Matrice byla promyta 15 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  a poté 60 ml pufru A. Následovala adsorpce kalmodulinu, poté byla matrice promyta 40 ml pufru B, a 60 ml pufru C. Eluce proteinu byla provedena 20 ml pufru D, který obsahuje EDTA, jež na sebe naváže  $\text{Ca}^{2+}$ , což způsobí ukrytí hydrofobních reziduí a přerušení interakce proteinu s matricí. Složení pufrů je uvedeno v Tabulce 5.7. Následně byla kolona regenerována promytím vodou, 20 ml NaOH a uchována ve 20% ethanolu při 4 °C.

**Tabulka 5.7** - Složení pufrů pro HIC.

	<b>Pufr A</b>	<b>Pufr B</b>	<b>Pufr C</b>	<b>Pufr D</b>
Tris-HCl, pH = 7,5	50mM	50mM	50mM	50mM
NaCl	100mM	100mM	500mM	100mM
CaCl <sub>2</sub>	5mM	1mM	1mM	-----
EDTA	-----	-----	-----	1,5mM

Čistota proteinu byla zkontrolována pomocí 18% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24). Vzorky obsahovaly 10  $\mu\text{l}$  proteinu a 2  $\mu\text{l}$  5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Frakce obsahující protein o dostatečné čistotě byly sloučeny a protein byl zakonzentrován na 2 ml pomocí koncentrátoru VivaSpin Turbo MWCO 10 kDa, a byla provedena velikostně-vylučovací chromatografie pro odstranění agregátů a jiných nečistot.

#### 5.3.4 Velikostně-vylučovací chromatografie (SEC)

Při této chromatografii byla použita kolona HiLoad® 26/600 Superdex® 75 pg a průtok mobilní fáze (Tabulka 5.8) byl 2 ml/min.

**Tabulka 5.8** - Složení mobilní fáze pro SEC.

<b>Pufr pro SEC</b>
20mM Tris-HCl, pH =7,5
150mM NaCl
1mM CaCl <sub>2</sub>
10% glycerol

Čistota proteinu byla ověřena 18% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24). Vzorky obsahovaly 10  $\mu\text{l}$  proteinu a 2  $\mu\text{l}$  5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Frakce obsahující protein byly sloučeny, zakonzentrovány na koncentraci 1 mg/ml a zmrazeny.

## 5.4. Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C

Protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C je označen pro protein 14-3-3 $\gamma$  zkrácený o C-konec (1-234). V nativním stavu je zastoupen dimerní formou o velikosti přibližně 54 kDa, extinkční koeficient protomeru je roven 31860 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> při 280 nm. Pro expresi byly vybrány buňky *E.coli* BL21(DE3) a vektor pET15b obsahující histidinovou kotvu. Pro purifikaci byla využita afinitní, iontově-výměnná a velikostně-vylučovací chromatografie.

### 5.4.1 Exprese proteinu

Nejprve byly buňky kultivované v 5 ml LB média (složení viz Tabulka 5.1, strana 22), které obsahovalo ampicilin o koncentraci 100  $\mu$ g/ml, po dobu 18 hodin při 190 rpm a 37 °C v inkubátoru Shaking Incubator NB-205. Poté bylo těchto 5 ml přidáno do 900 ml čerstvého LB média s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a dále inkubováno v orbitálním inkubátoru Multitron při 37 °C a 210 rpm do OD<sub>600</sub> = 0,5 cm<sup>-1</sup>. Následně byla teplota snížena na 30 °C a po dosažení hodnoty OD<sub>600</sub> = 0,9 bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 100  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>. Inkubace pokračovala při této teplotě po dobu 20 hodin a následně byly kultury centrifugovány v 900ml kyvetách při 4 °C po dobu 20 minut při 2073 x g . Každá peleta byla resuspendována ve 40 ml lyzačního pufru (Tabulka 5.9) a zmražena v - 80 °C.

**Tabulka 5.9** - Složení lyzačního pufru pro protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C.

#### Lyzační pufr

1x PBS
10mM imidazol
1M NaCl
4mM $\beta$ ME

### 5.4.2 Sonikace

Po rozmražení buněk bylo přidáno PMSF o finální koncentraci 100  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup> a přibližně 10 000 U/ml lysozymu. Inkubace s lysozymem probíhala 15 minut při 4° C a následně byly buňky vystaveny ultrazvuku. Čas trvání pulsů byl nastaven na 10 s. Pauza mezi jednotlivými pulzy trvala 30 s a celkový čas působení ultrazvuku byl 20 minut. Následně byla suspenze centrifugována při 19561 x g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Pro další postup byl použit supernatant.

### 5.4.3 Niklová afinitní chromatografie

Při niklové afinitní chromatografii byly použity 4 ml matrice Chelating Sepharosy Fast Flow pro purifikaci proteinu ze 2 litrů buněčných kultur. Matrice byla promyta 15 ml dH<sub>2</sub>O, 20 ml 0,1M NiSO<sub>4</sub>, 15 ml dH<sub>2</sub>O a 15 ml pufru E. Následovala adsorbce sonikátu na matrici, a poté byla matrice promyta 300 ml promývacího pufru. Pro eluci navázaného proteinu bylo použito 20 ml pufru F. Složení pufrů pro niklovou afinitní chromatografii je uvedeno v Tabulce 5.10 na straně 30. Kolonka byla dále regenerována 20 ml roztoku, který obsahoval 0,5M EDTA a 0,5M NaCl, 20 ml dH<sub>2</sub>O, a nakonec 20% ethanolem, ve kterém se uchovává při 4 °C.

**Tabulka 5.10** -Složení pufrů pro afinitní niklovou chelatační chromatografii pro protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C.

Pufr E	Pufr pro promytí	Pufr F (pH = 8)	10x PBS (pH = 7,4)
1x PBS	1x PBS	1x PBS	1,36M NaCl
500mM NaCl	500mM NaCl	500mM NaCl	26,8mM KCl
20mM imidazol	60mM imidazol	600mM imidazol	81mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2mM $\beta$ ME	2mM $\beta$ ME	2mM $\beta$ ME	17,6mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Čistota proteinu byla vizualizována 15% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24), přičemž vzorky obsahovaly 2  $\mu$ l proteinu, 8  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Frakce, které obsahovaly protein, byly sjednoceny a protein byl dialyzován v pufru bez soli (Tabulka 5.11). Po dvou hodinách dialýzy byla změřena koncentrace proteinu a byla přidána TEV proteasa o množství 400 U/mg proteinu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C. Aktivita purifikované proteasy při koncentraci 0,838 mg/ml byla vypočítána přibližně na 8 U/ $\mu$ l na základě porovnání aktivity komerční TEV proteasy. Následovala dialýza ve stejném pufru po dobu 15 hodin ve 4°C. Poté byla provedena kontrola štěpení pomocí 15% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24), vzorek obsahoval 2  $\mu$ l proteinu, 8  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Po úspěšném štěpení následovala aniontově-výměnná chromatografie.

**Tabulka 5.11** - Složení dialyzačního pufru před aniontově-výměnnou chromatografií.

#### Dialyzační pufr

---

20mM Tris-HCl, pH=7,5  
 2mM EDTA, pH=8  
 10% glycerol  
 2mM DTT

#### 5.4.4 Aniontově-výměnná chromatografie

Hodnota izoelektrického bodu proteinu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C je přibližně 5,14, díky čemuž mohla být využita aniontově-výměnná chromatografie. Při vyšším pH mobilní fáze než pI proteinu získává protein záporný náboj. Při chromatografii byla použita kolona 10/50 s Q sepharosou, která obsahuje kvarterní aminy, jež interagují právě s anionty a záporně nabitými proteiny. Průtok byl po celou dobu 1 ml/min. Kolona nejprve byla promyta puftrem B pro odstranění nečistot, následně puftrem A, který neobsahuje žádnou sůl (Tabulka 5.12 na straně 31). Protein byl na matici nanesen v mobilní fázi 2% pufru B v pufru A. Pro eluci proteinu byl použit koncentrační gradient pufru B, který trval 20 minut. Po 20 minutách byl tedy pufr B zastoupen ze 100 %. Každá odebraná frakce měla objem 0,5 ml. Čistota proteinu obsaženého v jednotlivých frakcích

byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24), přičemž vzorky obsahovaly 3  $\mu$ l proteinu, 7  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Poté byly frakce obsahující protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C sloučeny a roztok byl zakonzentrován na objem 2 ml použitím koncentrátoru VivaSpin Turbo MWCO 30 kDa. Následovala velikostně-vylučovací chromatografie.

**Tabulka 5.12** - Složení pufrů pro aniontově-výměnnou chromatografii.

Pufr A	Pufr B
50mM Tris-HCl, pH =8	50mM Tris-HCl, pH =8
1mM DTT	1mM DTT
	1M NaCl

#### 5.4.5 Velikostně-vylučovací chromatografie

Při velikostně-vylučovací chromatografii byla použita kolona HiLoad<sup>®</sup> 26/600 Superdex<sup>®</sup> 75 pg. Složení mobilní fáze je uvedeno v Tabulce 5.13. Průtok byl nastaven na 2 ml/min a objem sbíraných frakcí byl 1,5 ml. Jelikož se protein 14-3-3 vyskytuje pouze v dimerním stavu, začátek sběru proteinu byl nastaven na hodnotu, která by odpovídala 60kDa proteinu.

**Tabulka 5.13** - Složení pufru pro velikostně-vylučovací chromatografii.

Pufr pro SEC
50mM Tris-HCl, pH =7,5
150mM NaCl
1mM EDTA
10% glycerol
5mM DTT

Čistota proteinu byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24). Vzorek obsahoval 4  $\mu$ l proteinu, 6  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Frakce obsahující čistý protein byly sloučeny, byla stanovena koncentrace a protein byl rozdělen do frakcí po 1,5 ml. Před dalším použitím byl protein uchován při teplotě - 80 °C.

## 5.5. Exprese a purifikace CaMKK2 D330A

Zkratka CaMKK2 D330A značí protein Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní proteinkinasu kinasu 2 obsahující rezidua 93-517, ve kterém byla nahrazena kyselina asparagová na pozici 330. aminokyseliny v nativním číslování alaninem, přičemž tento konstrukt obsahuje čtyři fosforylační místa (S100, T145, S495 a S511). Molekulová hmotnost tohoto konstruktu je přibližně 48 kDa a jeho molární extinkční koeficient při 280 nm odpovídá hodnotě 28880 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> za předpokladu, že všechny cysteiny jsou v redukované formě. Protein byl exprimován v buňkách *E.coli*, konkrétně v kmenu BL21(DE3), který obsahuje upravený vektor pRSFDuet-1. Kromě rezistence na kanamycin tento vektor obsahuje histidinovou kotvu a GB1 protein, jenž zvyšuje rozpustnost proteinu. U CaMKK2 D330A byla pozorována větší degradace na C-konci na rozdíl od konstruktu CaMKK2 T145A D330A S495A, kde tento jev byl pozorován také, ale v mnohem menší míře.

### 5.5.1 Exprese proteinu a lyzace buněk

Buňky byly inkubovány v 5 ml LB média (Tabulka 5.1, strana 22), které obsahovalo kanamycin o finální koncentraci 100 µg/ml, po dobu 15 hodin při 190 rpm a 37 °C v orbitálním inkubátoru. Následně se 5 ml narostlé kultury přeneslo do čerstvého LB média (Tabulka 5.1, strana 22), které obsahovalo kanamycin o koncentraci 100 µg/ml. Buňky byly inkubovány v orbitálním inkubátoru Multitron při 37 °C a 210 rpm po dobu 4 hodin do přibližné hodnoty OD<sub>600</sub> = 0,4 cm<sup>-1</sup>, poté byla teplota snížena na 12 °C a při OD<sub>600</sub> = 0,6 cm<sup>-1</sup> bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 100 µmol/dm<sup>3</sup>. Následně inkubace pokračovala při snížené teplotě přes noc přibližně 16 hodin. Poté byly kultury centrifugovány v 900ml kyvetách při 2073 x g a 4 °C po dobu 20 minut. Každá peleta byla resuspendována v 50 ml lyzačního pufru (složení Tabulka 5.14) a suspenze byla zmrazena při teplotě - 80 °C.

**Tabulka 5.14** - Složení lyzačního pufru pro CaMKK2 D330A.

#### Lyzační pufr

---

1x PBS
10mM imidazol
1M NaCl
4mM βME

### 5.5.2 Sonikace

Po rozmražení buněk bylo do roztoku přidáno PMSF o finální koncentraci 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> a následovala inkubace po dobu 10 minut s lysozymem o finální koncentraci 20 000 U/ml ve 4 °C. Následně byly buňky vystaveny ultrazvuku při 4 °C a roztok byl po celou dobu v ledu. Vždy bylo vystaveno ultrazvuku 80 ml roztoku, který působil po dobu 10 minut celkového času, přičemž jednotlivé pulzy trvaly 3 s a doba mezi jednotlivými pulzy byla nastavena na 17 s. Tento postup se opakoval, dokud veškerý roztok nebyl ultrazvuku vystaven. Výkon pulzů se pohyboval okolo



50-60 W. Poté byl roztok centrifugován při 19561 x g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Dále se pracovalo s proteinem v supernatantu.

### 5.5.3 Niklová afinitní chromatografie

Pro niklovou afinitní chromatografii byly použity 2 ml matrice Chelating Sepharose Fast Flow pro purifikaci proteinu ze 4 litrů buněčných kultur. Sepharosa byla promyta 15 ml dH<sub>2</sub>O, 20 ml 0,1M NiSO<sub>4</sub>, 15 ml dH<sub>2</sub>O a 15 ml pufru E. Následovala adsorpce proteinu na matrici, a poté byla matrice promyta 300 ml promývacího pufru. Pro eluci navázaného proteinu bylo použito 8 ml pufru F a protein se sbíral do 7 ml pufru E. Složení pufrů obsahuje Tabulka 5.15. Sepharosa byla regenerována 20 ml roztoku, který obsahoval 0,5M EDTA a 0,5M NaCl, 20 ml dH<sub>2</sub>O a nakonec 20% ethanolem, ve kterém se uchovává při 4 °C.

**Tabulka 5.15** – Složení pufrů pro niklovou afinitní chromatografii CaMKK2 D330A.

Pufr E	Pufr pro promytí	Pufr F (pH = 8)	10 x PBS (pH = 7,4)
1x PBS	1x PBS	1x PBS	1,36M NaCl
0,5M NaCl	0,5M NaCl	0,5M NaCl	0,0268M KCl
20mM imidazol	50mM imidazol	400mM imidazol	0,081M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2mM βME	2mM βME	2mM βME	0,0176M KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Následně probíhala dialýza přes noc po dobu přibližně 12-15 hodin při 7 °C, přičemž se k proteinu přidala TEV proteasa o množství 8000 U. Složení dialyzačního pufru obsahuje Tabulka 5.16. Poté byla provedena kontrola štěpení pomocí 12% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24), vzorek obsahoval 10 μl proteinu a 2 μl 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Dále následovala velikostně vylučovací-chromatografie.

**Tabulka 5.16** – Složení dialyzačního pufru pro CaMKK2 D330A.

Dialyzační pufr
50mM Tris-HCl, pH= 8
2mM EDTA, pH=8
10% glycerol
2mM DTT

### 5.5.4 Velikostně-vylučovací chromatografie

Protein, který byl získán ze 4 litrů buněčné kultury, byl zakoncentrován na objem 2 ml pomocí koncentrátoru VivaSpin Turbo MWCO 30 kDa. Pro CaMKK2 D330A byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg. Rychlost průtoku byla nastavena na 2 ml/min a frakce byly sbírány po 1,5 ml. Složení pufru pro velikostně-vylučovací chromatografii je uvedeno v Tabulce 5.17, na straně 34.

**Tabulka 5.17** - Složení pufru pro velikostně-vylučovací chromatografii.

<b>Pufř pro SEC</b>
50mM Tris-HCl, pH=8
0,5M NaCl
5mM DTT
10% glycerol

Kvůli degradaci na C-konci byla velikostně-vylučovací chromatografie opakována ještě třikrát. Pokaždé byla ověřena čistota pomocí 12% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24) a frakce, které obsahovaly protein s dostatečnou čistotou, byly sloučeny. Vzorek pro SDS-PAGE obsahoval 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Po sloučení frakcí se stanovila proteinová koncentrace a následně byl protein zmražen v - 80 °C nebo fosforylován.

#### 5.5.5 Fosforylace CaMKK2 D330A

Pro fosforylaci CaMKK2 D330A byla použita cAMP-dependentní proteinkinasa A (PKA) v přítomnosti 750 $\mu$ M ATP, 20mM MgCl<sub>2</sub>. Jelikož CaMKK2 D330A obsahuje čtyři místa určená k fosforylaci, bylo zapotřebí optimalizovat fosforylační protokol. Výchozím bodem pro optimalizaci byl fosforylační protokol pro CaMKK2 T145A D330A S495A, který byl popsán v mé bakalářské práci [36]. Výsledné množství potřebné PKA pro nafosforylování všech čtyř míst bylo stanoveno na 2000 U/mg CaMKK2 D330A při fosforylaci přibližně 60 $\mu$ M CaMKK2 D330A v objemu 2 ml. Reakční směs byla inkubována při 30 °C po dobu 4 hodin. Průběhy fosforylačních reakcí byly vizualizovány pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 75 $\mu$ M phos-tag (Tabulka 5.5 na straně 26). Pro ověření fosforylace byla provedena ještě LC-MS analýza. Následně byla provedena velikostně-vylučovací chromatografie pro odstranění ATP a PKA.

#### 5.5.6 Velikostně-vylučovací chromatografie po fosforylaci

Pro fosforylovaný protein byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 200 pg. Protein byl zakoncentrován na 2 ml, průtok činil 2 ml/min a frakce byly sbírány po 1,5 ml. Následovala kontrola čistoty pomocí 12% SDS-PAGE. Následně byl protein uchován při - 80 °C, nebo byl rovnou použit k experimentu. Vzhledem k degradaci na C-konci byl protein maximálně jednou zmražen a rozmražen. Složení pufru pro velikostně-vylučovací chromatografii obsahuje Tabulka 5.18.

**Tabulka 5.18** – Složení pufru pro velikostně-vylučovací chromatografii po fosforylaci CaMKK2 D330A.

<b>Pufř pro SEC</b>
50mM Tris-HCl, pH=7,5
0,5M NaCl
5mM DTT
10% glycerol

### 5.5.7 Exprese a purifikace CaMKK2 T145A D330A S495A

Exprese a purifikace CaMKK2 T145A D330A S495A se lišila pouze ve dvou krocích. Pro expresi proteinu byl použit stejný expresní systém, pouze narostlé kultury v 5ml zkumavkách byly přeneseny po 2,5 ml do čerstvých 900 ml autoindukčního média obsahujícího kanamycin o koncentraci 280 µg/ml (Tabulka 5.1, strana 22). Po dosažení hodnoty  $OD_{600} = 0,4$  byla teplota snížena na 18 °C a dále byla kultura inkubována při této teplotě přes noc, po dobu 14-16 hodin. Následná purifikace proteinu, od kroku lyzace buněk až po krok zmražení při - 80 °C, probíhala podle postupu již popsaného v kapitole 5.5.1, strana 32 až 5.5.4, strana 34. Vzhledem k menší degradaci na C-konci byly zapotřebí pouze dvě velikostně-vylučovací chromatografie pro protein purifikovaný ze 4 l narostlé kultury.

### 5.5.8 Fosforylace

Pro fosforylaci CaMKK2 T145A D330A S495A bylo použito 2684 U PKA na 1 mg proteinu v přítomnosti 750µM ATP a 20mM MgCl<sub>2</sub>. Objem reakční směsi byl 2 ml a koncentrace CaMKK2 se pohybovala mezi 40-60 µmol/dm<sup>3</sup>. Reakční směs byla inkubována při 30 °C po dobu 4 hodin. Průběh fosforylace byl vizualizován pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50µM phos-tag (Tabulka 5.5 na straně 26). Následně byla provedena velikostně-vylučovací chromatografie pro oddělení ATP a PKA od proteinu. Průběh chromatografie byl stejný jako u CaMKK2 D330A. Čistota proteinu byla vizualizována pomocí 12% SDS-PAGE (Tabulka 5.2, strana 24) , kde vzorek byl tvořen 10 µl proteinu a 2 µl 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Byla změřena proteinová koncentrace a protein byl uchován při - 80 °C a nebo hned použit pro strukturní charakterizaci. Vzhledem k degradaci byl protein maximálně jednou zmražen a rozmražen.

## 5.6. Strukturní analýza proteinů a komplexů

### 5.6.1 LC-MS analýza fosforylovaných míst a jejich defosforylace v přítomnosti i nepřítomnosti proteinu 14-3-3 $\gamma$ ΔC

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která slouží k určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty.

Spektrometr se skládá z ionizátoru (iontového zdroje), kde se látka ionizuje, 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). Poslední částí je detektor, z něhož data posléze zpracovává počítač a výstupem je hmotnostní spektrum.

Ionizátory je obvyklé dělit podle množství dodané energie na tvrdé (při dodání vysoké energie vznikne z neutrální molekuly ion a následuje další fragmentace, příkladem je ionizace nárazem elektronů – EI) nebo měkké, kde dodaná energie stačí většinou pouze na vytvoření iontu z neutrální molekuly. Mezi měkké ionizátory patří například elektrosprejová ionizace (ESI) nebo chemická ionizace, CI, kde je primárním zdrojem proud elektronů jako v případě EI, ale energie není přenášena přímo na analyzovanou látku, jde přes tzv. reakční médium.

Elektrický analyzátor rozděluje na základě kinetické energie analytu. Dráha iontu, který se dostane do homogenního elektrického pole je tímto polem zakřivována. Poloměr dráhy iontu je dán jeho kinetickou energií a intenzitou elektrického pole. Průchod analyzátozem je tedy možný při vhodné kombinaci iontů o určité kinetické energii a intenzity pole. Magnetický hmotnostní analyzátor rozděluje monoenergetický svazek iontů na základě hodnoty poměru hmotnosti iontu a jeho náboje,  $m/z$ . Rozdělení látky podle poměru  $m/z$  vyplývá z rovnice pro kinetickou energii iontu 5.1 a z rovnice pro výpočet Lorentzovy síly 5.2. Dosazením rovnice 5.1 do rovnice 5.2 se získá tzv. rovnice hmotnostního spektrometru (rovnice 5.3).

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = zV \quad (\text{rovnice 5.1})$$

$$F_L = Bzv = mv^2/r \quad (\text{rovnice 5.2})$$

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (\text{rovnice 5.3})$$

( $E_k$  je kinetická energie iontu,  $m$  je hmotnost iontu,  $v$  je rychlost iontu,  $z$  je náboj iontu,  $V$  je akcelerační napětí iontového zdroje,  $F_L$  je Lorentzova síla,  $B$  je magnetická indukce a  $r$  je poloměr dráhy iontu).

Dalším analyzátozem může být iontová past, což je zařízení umožňující s pomocí elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Je tvořen vstupní a výstupní elektrodou kruhového průřezu a prstencovou středovou elektrodou. Obě krajní elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu je přivedeno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty, které se dostanou do vnitřního prostoru jsou nuceny se pohybovat po uzavřených kruhových

drahách. S rostoucí amplitudou vkládaného napětí se postupně ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí vnitřní prostor iontové pasti směrem k detektoru. Dále existují kvadrupólový analyzátor a průletový analyzátor (z angl. *time of flight*, *TOF*) [37].

Pro sledování úrovně fosforylace byly vzorky podrobeny hmotnostně spektrometrické analýze v servisním středisku Centra molekulární struktury v BIOCEVu. Analýzu provedl RNDr. Petr Pompach, Ph.D pomocí hmotnostního spektrometru s iontově cyklotronovou celou - 15T solariX FT-ICR (Bruker Daltonics). Před analýzou byl protein štěpen na koloně s imobilizovaným pepsinem a vzniklé peptidy byly následně separovány na koloně s obrácenou fází C18, která byla spojena s elektrosprejem hmotnostního spektrometru, který pracoval v pozitivním, na datech závislém módu. Získaná data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics) a programu Mascot.

### Příprava vzorků

Příprava fosforylovaného proteinu CaMKK2 D330A je popsána v kapitole 5.5.5. na straně 34. Defosforylace probíhala v přítomnosti či nepřítomnosti proteinu 14-3-3 $\gamma$ ΔC. Reakční směs je uvedena v Tabulce 5.19, celkový objem reakční směsi byl 600  $\mu$ l. Aktivita proteinfosfatasy 1 (1,25U/ $\mu$ l) je přibližná, jelikož fosfatasa byla již předtím rozmražená a zmražená. Bylo přibližně použito 98 mU/ $\mu$ g CaMKK2 D330A.

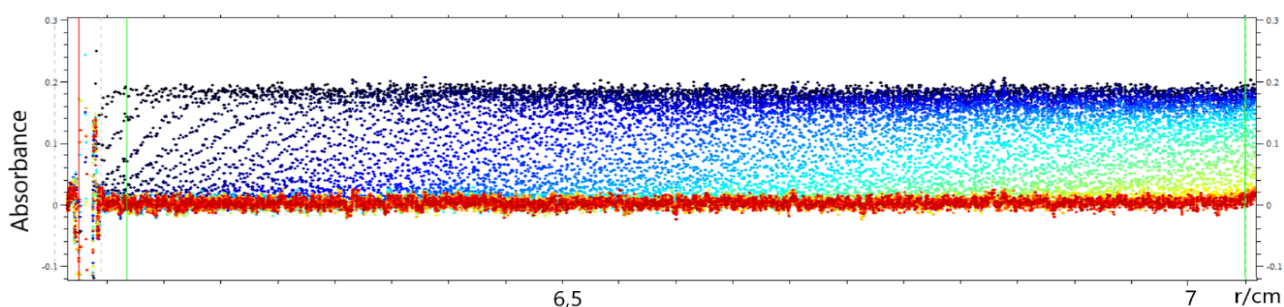
**Tabulka 5.19** - Reakční směs pro defosforylací CaMKK2 D330A.

Defosforylace v nepřítomnosti 14-3-3 $\gamma$ ΔC	Defosforylace v přítomnosti 14-3-3 $\gamma$ ΔC
8 $\mu$ M CaMKK2 D330A	8 $\mu$ M CaMKK2 D330A
-----	24 $\mu$ M 14-3-3 $\gamma$ ΔC
1mM MnCl <sub>2</sub>	1mM MnCl <sub>2</sub>
50mM HEPES, pH=7,5	50mM HEPES, pH=7,5
100mM NaCl	100mM NaCl
2mM DTT	2mM DTT
0,01% NP-40	0,01% NP-40
18 U Proteinfosfatasa1 (1,25U/ $\mu$ l)	18 U Proteinfosfatasa1 (2,5U/ $\mu$ l)
V = 600 $\mu$ l	V = 600 $\mu$ l

Z reakční směsi bylo vždy odebráno 120  $\mu$ l v časových intervalech: 0, 20, 150, 240 a 360 minut. Průběh reakce byl vizualizován 75 $\mu$ M Phos-tag 12% SDS-PAGE (Tabulka 5.5, strana 26). Vzorek obsahoval 15  $\mu$ l proteinu a 4  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru (Tabulka 5.3, strana 24). Vzorky v bodech 0 a 240 minut byly předány na LC-MS analýzu.

### 5.6.2 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti

Analytická centrifuga se používá k získání sedimentačního koeficientu, hydrodynamického poloměru a ke zjištění hmotnosti analyzované částice či disociační konstanty. Existují dva typy metod při použití AUC, metoda sedimentační rychlost a sedimentační rovnováhy. Pomocí metody sedimentační rovnováhy lze získat molekulovou hmotnost a disociační konstantu. Při metodě sedimentační rovnováhy je na vzorek aplikována odstředivá síla, jež nezapříčiní úplnou sedimentaci částice, a po nějaké době se síla působící směrem ke dnu vyrovná s difuzní. Rozhraní koncentrace se po dosažení rovnováhy už dál v čase nemění. Metoda sedimentační rychlosti (SV) využívá násobně vyšší odstředivou sílu, která následně způsobuje pohyb makromolekul směrem ke dnu květy, a vzniká tak koncentrační rozhraní, jež je sledováno v čase, přičemž z rychlosti posunu rozhraní je získán sedimentační koeficient  $s$ . Vlivem difuze se toto rozhraní v závislosti na čase mění, z čehož lze následně určit difuzní koeficient  $D$  (Obrázek 5.2). Tato metoda umožňuje určit oligomerní stav proteinů či stechiometrii heterogenních interakcí [38, 39].



**Obrázek 5.2** - Závislost absorpance vzorku na vzdálenosti od osy otáčení v čase. Černě a modře jsou data sbíraná na počátku experimentu, žlutě jsou data naměřená u konce experimentu. Vytvořeno v programu SEDFIT [48].

Při centrifugaci se uplatňují tři různé síly, vztlaková  $F_{vz}$  (rovnice 5.4), frikční  $F_f$  (rovnice 5.5) a centrifugační  $F_c$  (rovnice 5.6), přičemž centrifugační síla jde proti vztlakové a frikční. Základem pro výpočet sedimentačního koeficientu je Svedbergova rovnice, která je odvozena ze stavu, kdy při konstantní rychlosti jsou všechny síly při centrifugaci v rovnováze (rovnice 5.7 na straně 39).

$$F_{vz} = -m\bar{v}\rho_{roz}\omega r^2 \quad (\text{rovnice 5.4})$$

$$F_f = -fv \quad (\text{rovnice 5.5})$$

$$F_c = m\omega r^2 \quad (\text{rovnice 5.6})$$

V rovnicích 5.1-5.3 je  $m$  hmotnost částice,  $\omega$  je úhlová rychlost rotoru,  $r$  je vzdálenost makromolekuly od osy rotace,  $\rho_{roz}$  je hustota rozpouštědla ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $f$  je frikční koeficient,  $v$  je rychlost sedimentace makromolekuly,  $\bar{v}$  je specifický objem makromolekuly ( $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ ).

$$f\vec{v} = m\omega r^2 - m\omega r^2\bar{v}\rho_{roz.} = m\omega r^2(1 - \bar{v}\rho_{roz.}) \quad (\text{rovnice 5.7})$$

Definice sedimentačního koeficientu makromolekul,  $s$ , je dána Svedbergovou rovnicí (rovnice 5.8), kterou dostaneme po úpravě z rovnice 5.7:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1-\bar{v}\rho_{roz.})}{f} = \frac{mN_A D(1-\bar{v}\rho_{roz.})}{RT} = \frac{MD(1-\bar{v}\rho_{roz.})}{RT}, \quad (\text{rovnice 5.8})$$

kde  $M$  je relativní molekulová hmotnost makromolekuly (Da),  $N_A$  je Avogadrova konstanta,  $D$  je difuzní koeficient,  $R$  je univerzální plynová konstanta a  $T$  je termodynamická teplota. Jednotka sedimentačního koeficientu je Svedberg (S) a je rovna  $10^{-13}$  sekund.

Pohyb sedimentačního rozhraní v čase popisuje tzv. Lammova rovnice (rovnice 5.9).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ rD \frac{\partial c}{\partial r} - cS\omega^2 r^2 \right] \quad (\text{rovnice 5.9})$$

Pro získání řešení sad Lammových rovnic slouží programy pro analýzu dat získaných metodou sedimentační rychlosti [38].

### Měření

Pro všechna měření byla použita centrifuga ProteomLab™ XL-I (Beckman Coulter, USA). Data byla sbírána při  $141\,995 \times g$  a  $20\text{ °C}$  při vlnové délce 280 nm. Měření a vyhodnocení provedla RNDr. Olívia Petřalská, Ph.D. Pufr použitý při měření AUC je uveden v Tabulce 5.20.

#### **Tabulka 5.20** - Pufr pro SV-AUC.

Pufr
50mM Tris-HCl, pH=7,5
150mM NaCl
1mM TCEP

Vzhledem k tomu, že u CaMKK1 byla pozorována dimerizace [40], byl tento proces zkontrolován také u CaMKK2 D330A. Koncentrace CaMKK2 D330A pro tento experiment jsou uvedeny v Tabulce 5.21.

#### **Tabulka 5.21** - Koncentrace CaMKK2 D330A při SV-AUC.

Koncentrace CaMKK2 D330A
11 $\mu\text{M}$
45 $\mu\text{M}$
160 $\mu\text{M}$

Dále bylo studováno, jestli fosforylace na T145 a S495 nezpůsobuje významnou změnu ve struktuře porovnáním sedimentačního a frikčního koeficientu CaMKK2 T145A D330A S495A a CaMKK2 D330A. Koncentrace CaMKK2 jsou uvedeny v Tabulce 5.22. Složení pufru pro SV-AUC je uveden v Tabulce 5.20 na straně 39.

**Tabulka 5.22** - Koncentrace konstruktů CaMKK2 pro porovnání sedimentačního a frikčního koeficientu v důsledku fosforylovaného T145 a S495.

Konstrukt	Koncentrace
CaMKK2 T145A D330A S495A	20 $\mu$ M
CaMKK2 D330A	20 $\mu$ M

Následně byla změřena titrace proteinu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C proteinem CaMKK2 D330A a tvorba komplexu byla porovnána s tvorbou komplexu CaMKK2 T145A D330A S495A. Pufr byl stejný jako v předchozích měřeních. Koncentrace proteinů jsou obsaženy v Tabulce 5.23.

**Tabulka 5.23** - Molární poměry proteinů ve vzorcích pro analytickou centrifugaci.

CaMKK2 pS100, pT145, pS495, pS511: protein 14-3-3
0,06 $\mu$ M : 1,2 $\mu$ M (1:20)
0,2 $\mu$ M : 1,2 $\mu$ M (1:6)
0,6 $\mu$ M : 1,2 $\mu$ M (1:2)
1,8 $\mu$ M : 1,2 $\mu$ M (3:2)
6,0 $\mu$ M : 1,2 $\mu$ M (5:1)
20 $\mu$ M CaMKK2

## Vyhodnocení

Distribuce sedimentačních koeficientů byly získány pomocí programu SEDFIT, přičemž byly použity hodnoty viskozity a hustoty pufru získané programem SEDNTERP [41]. Hodnota viskozity byla stanovena na 0,010312 St (1 Stokes = 1 cm<sup>2</sup>/s) a hodnota hustoty byla stanovena na 1,0058 g/cm<sup>3</sup>. Následně byla data vyhodnocena v programu SEDFIT [42]. Výsledné distribuce sedimentačních koeficientů byly vyneseny v programu Gussi [43] a distribuční funkce byly normalizovány podle plochy pod křivkou. Zdánlivá disociační konstanta byla stanovena v programu SEDPHAT metodou globálního modelování.



### 5.6.3 Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií

Jednou z metod pro strukturní analýzu je metoda chemického zesítení spojená s hmotnostní spektrometrií, která využívá činidla, jež spojují konkrétní funkční skupiny proteinů. Každé síťovací činidlo je jinak dlouhé. Pro analýzu komplexů byla použita síťovací činidla reagující s primárními aminy lysinů – disukcinimidyl glutarát (DSG, ~ 7,7 Å), a disukcinimidyl suberát (DSS, ~ 11,4 Å). Tato činidla také kromě primárních lysinů interagují s hydroxylovými skupinami serinů a threoninů. Vzdálenosti  $\alpha$ -Ca reziduí spojených prostřednictvím činidla DSG odpovídají maximální vzdálenosti 20 Å, v případě DSS až 25 Å.

Pro tuto analýzu byl použit konstrukt CaMKK2 T145A D330A S495A. Jednotlivé koncentrace před přidáním činidel jsou uvedeny v Tabulce 5.24. Před analýzou byla puštěna nativní elektroforéza pro kontrolu kvality vzorků. Vzorky byly dále zpracovány v servisním středisku Strukturní hmotnostní spektrometrie v Biotechnologickém ústavu AV ČR ve Vestci RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D. následujícím způsobem. Vzorky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 22 °C v 50násobném molárním nadbytku činidel DSS a DSG a následně redukovány pomocí dithiothreitolu a alkylovány iodoacetamidem. Poté byl ke vzorkům přidán trypsin v molárním poměru vzorek:trypsin 1:20. Po inkubaci přes noc při 37°C byly vzniklé peptidy injektovány automatickým dávkovacím zařízením na odsolovací kolonu (Luna Omega 5 $\mu$ m Polar C18 100Å 20x0.3 mm, Phenomenex) při průtokové rychlosti 20  $\mu$ l/min. Následně byly peptidy separovány na analytické koloně s reverzní fází (Luna Omega 3 $\mu$ m Polar C18 100Å 150x0.3 mm, Phenomenex), která byla vytemperována na 50 °C a spojena přímo s hmotnostním spektrometrem FT-ICR (15T solariX, Bruker Daltonics, USA) s elektrosprejem. Peptidy byly eluovány průtokovou rychlostí 10  $\mu$ l/min acetonitrilovým gradientem 10-45 % B po dobu 19 minut. Mobilní fáze A se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí a 2% acetonitrilu ve vodě a mobilní fáze B z 0,1% kyseliny mravenčí a 98% acetonitrilu ve vodě. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu tandemové analýzy. Pro získání a zpracování dat byl použit program ftmsControl 2.1.0 a DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA). Zesíťované peptidy byly identifikovány pomocí programu StavroX.

Alternativně byla část vzorků po inkubaci se síťovacími činidly odebrána a separována pomocí NuPAGE Bis-Tris gradientového gelu (4-12%). Zóny odpovídající zesíťovaným proteinům byly vyříznuty a zpracovány pro hmotnostně spektrometrickou analýzu obdobně jako je uvedeno výše.

**Tabulka 5.24** - Koncentrace proteinů pro experiment chemického zesítení před přidáním činidel a složení pufru pro tento experiment.

	c [ $\mu$ M]	c [mg/ml]	Pufr pro XL-MS
CaM	80,5	1,36	50mM HEPES, pH =7,5
CaMKK2	35,3	1,7	5mM CaCl <sub>2</sub>
14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C (protomer)	71,2	1,9	150mM NaCl
CaMKK2:14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C (1:2)	17	1,7	10% glycerol
CaMKK2:14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C:CaM (1:2:1)	11,4	1,35	2mM TCEP

#### 5.6.4 Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

Při vodík-deuteriové výměně (H/D výměna) dochází k výměně amidového vodíku v hlavním řetězci za deuterium, přičemž se sleduje množství inkorporace deuteria. Tento proces je ovlivněn pH roztoku, přístupností rozpouštědla a vodíkovými vazbami. Pokud je tento proces analyzován hmotnostní spektrometrií, lze získat deuteriční profil. Jestliže dochází ke změně profilu v daném časovém okamžiku v přítomnosti ligandu/vazebného partnera, lze předpokládat, že tato místa jsou ovlivněna vazbou. Tato metoda slouží ke studiu protein-protein nebo protein-ligand interakcí. H/D výměna neidentifikuje pouze oblast, která je interakcí ovlivněna, ale také ukáže, jaký efekt má tato interakce na strukturu. Například pokud procento zastoupení deuteria je zprvu malé a po vazbě se dostupnost zvýší, znamená to, že byla tato část uvolněna či zpřístupněna. Pokud je pozorovaný opačný efekt, dochází buď k vazbě v dané oblasti, nebo může dojít i k iniciovanému vzniku struktury v nestrukturované oblasti.

Vzorky byly dále zpracovány v servisním středisku Strukturní hmotnostní spektrometrie v Biotechnologické ústavu AC ČR ve Vestci RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D. Předmětem studie byla CaMKK2 D330A a protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Koncentrace vzorků před zředěním je uvedena v Tabulce 5.25. Kvůli nerozpustnosti CaMKK2 D330A nemohly být použity vyšší koncentrace. Vzorky byly 10x zředěny v deuteričním pufru složeném z 50mM Tris-HCl (pD = 7,1), 150mM NaCl, 10% glycerolu a 1mM TCEP a odebíraly se v triplicátech po 50  $\mu$ l v časových intervalech 20 s, 2 min, 20 min a 2 h. Reakce byla zastavena přidáním 50  $\mu$ l 1M glycinu (pH 2,3) a zmražením v kapalném dusíku.

Před analýzou byly vzorky rozmrazeny a nanoseny na kolonu s imobilizovaným pepsin či nepethesinem-2. Po 3 minutách štěpení a odsolování na koloně Luna Omega 5 $\mu$ m Polar C18 100 $\text{\AA}$  20 $\times$ 0.3 mm (Phenomenex), byly vzniklé peptidy separovány na koloně s reverzní fází (Luna Omega 1,6  $\mu$ m Polar C18 100 $\text{\AA}$  100 $\times$ 1.0 mm, Phenomenex), která byla propojena s FT-ICR hmotnostním spektrometrem (15TsolariX, Bruker Daltonics, Billerica, USA) pracujícím v pozitivním režimu. Pro separaci byl použit lineární gradient 10-35% pufru B po dobu 12 min. Pufr A obsahoval 2% acetonitril a 0,4% kyselinu mravenčí ve vodě. Pufr B obsahoval 95% acetonitril a 0,4% kyselinu mravenčí ve vodě. Štěpení, odsolování a separace byly prováděny v ledové lázni. Data byla zpracována pomocí softwaru DataAnalysis (verze 4.2; Bruker Daltonics) a DeutEX.

**Tabulka 5.25** - Koncentrace vzorků pro H/D výměnu před zředěním.

Vzorek	Koncentrace
CaMKK2 D330A	74 $\mu$ M
14-3-3 $\gamma\Delta$ C (dimer)	86,3 $\mu$ M
CaMKK2 D330A:14-3-3 $\gamma\Delta$ C (1:2)	76,7 $\mu$ M

### 5.6.5 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Malouhlový rozptyl rentgenového záření neboli SAXS (z ang. *small angle X-ray scattering*) je metoda s nízkým rozlišením, která poskytuje informaci o tvaru, hmotnosti a gyračním poloměru biomakromolekul. Měření probíhá v roztoku a lze měřit látky o velikosti několik kDa, až po látky s velikostí GDa. Pomocí této metody lze měřit i dynamiku či kinetiku systému [44]. V kombinaci s dalšími metodami, například ve spojení s hmotnostní analýzou, NMR, cryo-EM, je součástí integračního počítačového modelování.

Tato metoda patří do metod kontrastních, tudíž je zapotřebí při měření mít stejný pufr jako ten, ve kterém se nalézá protein. Princip měření spočívá v rozptýlených elektronech, které vytvoří difrakční obrazec, jenž v sobě nese strukturální informace vzorku (Obrázek 5.3). Informace o tvaru molekuly se měří pod úhlem  $0,03^\circ$ - $5^\circ$ , přičemž detektor je vzdálen od vzorku 1,5 m a více. Výsledná intenzita je funkcí všech mezielektronových vzdáleností uvnitř molekuly a je definována dle rovnice 5.10, pokud se jedná o homogenní monodisperzní vzorek, kde spolu částice neinteragují.

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr, \quad (\text{rovnice 5.10})$$

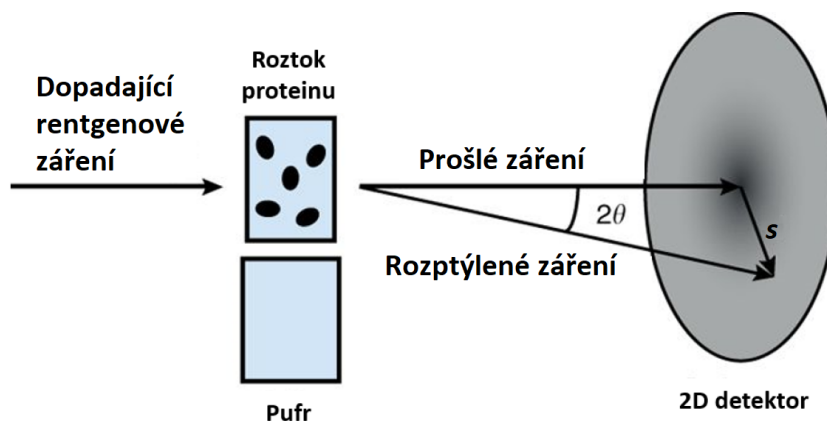
kde  $r$  je vzdálenost dvou elektronů,  $D_{max}$  je maximum těchto vzdáleností a  $s$  je velikost rozptylového vektoru, která je definována vztahem

$$s = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda}, \quad (\text{rovnice 5.11})$$

kde  $2\theta$  je rozptylový úhel a  $\lambda$  je vlnová délka rentgenového záření [45, 46].

Guinierova aproximace, což je závislost  $\ln(I)$  na  $s^2$ , platí a nabývá lineárního tvaru (rovnice 5.12) pouze v oblasti  $s \cdot R_g < 1,3$ , kde  $R_g$  značí gyrační poloměr rozptylující částice. Linearita této závislosti se využívá pro odhalení agregátů a zhodnocení celkové kvality vzorku. Ze směrnice této závislosti je dopočítán gyrační poloměr rozptylující částice,  $R_g$ , a extrapolací na nulový úhel je dopočítána  $I(0)$ .

$$\ln \frac{I(s)}{I(0)} = -\frac{s^2 R_g^2}{3} \quad (\text{rovnice 5.12})$$



Obrázek 5.3 - Princip měření malouhlového rozptylu. Převzato a upraveno z [46].

Pro měření vzorků pomocí rentgenového záření byla použita metoda spojená s velikostně-vylučovací chromatografií, tzv metoda SEC-SAXS.

Jako zdroj rentgenového záření byl použit synchrotron, který se nalézá na pracovišti P12, spravovaném Evropskou laboratoří pro molekulární biologii na okruhu Petra III (DESY, Hamburg, Německo). Pro tento experiment byl využit konstrukt CaMKK2 T145A D330A S495A. Koncentrace proteinů při vstupu na kolonu a složení pufru pro analýzu jsou uvedeny v Tabulce 5.26. Poměr pCaMKK2:14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C byl 1:2, pCaMKK2:14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C:CaM 1:2:1 a CaM:CaMKK2 1:1. Snímání rozptylu bylo nastaveno po 0,5 s. Pro oddělení agregovaných proteinů byla použita kolona Superdex<sup>®</sup> 200 Increase 5/150 GL, objem vzorku činil 100  $\mu$ l.

**Tabulka 5.26** - Koncentrace proteinů při vstupu na kolonu a pufr pro SEC-SAXS.

Vzorek	<i>c</i> (mg/ml)	<i>Pufr pro vzorky bez CaM</i>	<i>Pufr pro vzorky s CaM</i>
14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C	6,0	50mM Tris-HCl, pH=7,5	50mM Tris-HCl, pH=7,5
CaM	9,4	150mM NaCl	150mM NaCl
CaMKK2	10,2	1mM TCEP	1mM TCEP
CaMKK2:CaM	15,1	3% glycerol	3% glycerol
pCaMKK2:14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C	26,3		1mM CaCl <sub>2</sub>
pCaMKK2:14-3-3:CaM	23,5		

Pro zpracování dat byl použit program CHROMIXS [47], kde byla vybrána oblast pufru a analyzovaného vzorku. Následně byla vygenerována rozptylová křivka a vyhodnocovány jednotlivé parametry v programu PRIMUS [48]. Byla zkontrolována kvalita dat pomocí Guinierova výnosu (závislost  $\ln(I)$  na  $s^2$ ), vypočítána molekulová hmotnost, analyzována distribuce vzdáleností, tzv.  $P(r)$  funkce, a z ní byl získán parametr  $D_{MAX}$ . Při vyhodnocování všech parametrů byl kladen důraz převážně na linearitu funkce při Guinierově výnosu a na shodu vypočítané a očekávané molekulové hmotnosti. Posledním analyzovaným prvkem byla flexibilita systému, která je popsána bezrozměrným Kratkyho výnosem.

Získaná data byla následně použita pro počítačové modelování. Všechny aplikace použité pro vyhodnocení dat ze SEC-SAXS a následně pro počítačové modelování byly dostupné z balíčku ATSAS [49].

### 5.6.6 Počítačové modelování

Počítačové modelování probíhalo v aplikacích z ATSAS balíčku [49]. Je dobré zdůraznit, že se jedná pouze o model z dat s nízkým rozlišením. Pro výpočet modelu byly použity programy DAMMIN a CORAL. Následně model z CORALu byl pomocí programu SUPCOMB superimponován do molekulové obálky z DAMMINu.

#### DAMMIN

DAMMIN vytváří molekulovou obálku pomocí tzv. dummy reziduí, což jsou sférické částice, které tvoří zprvu jednu velkou kulovou částici a který následně podle algoritmu tyto částice odebrává tak, aby tvar teoretické křivky odpovídal naměřené rozptylové křivce. Program DAMMIN byl spuštěn v online režimu. Jako vstupní data pro DAMMIN byly vloženy soubory obsahující  $P(r)$  funkci, přičemž údaje z rozptylové křivky byly omezeny rozptylovým vektorem do hodnoty  $7/R_g$ , kde  $R_g$  je gyrační poloměr vypočítán z Guinierova výnosu. Každý výpočet byl opakován 20x, následně byly pomocí programu DAMSEL porovnány modely, a ty, které se více lišily, byly vyloučeny. Dále byl pomocí programu DAMAVER vytvořen filtrovaný model z porovnávaných struktur, které nebyly vyloučeny.

#### CORAL (z ang. *Complexes with random loops*)

CORAL [50] využívá již vyřešené struktury s vysokým rozlišením jednotlivých proteinů, které jsou vzájemně orientovány tak, aby co nejlépe odpovídaly získaným experimentálním datům. Chybějící části jsou nahrazeny rezidui, která jsou propojená a zastupují tak hlavní řetězec. Dalším kritériem, které je možné do výpočtu zahrnout, je přidání meziatomových vzdáleností konkrétních reziduí.

#### **Příprava struktur pro modelování v programu CORAL**

Pro vytvoření modelu byl použit homologní model CaMKK2, struktura proteinu 14-3-3 $\gamma$  vykrytalizovaná s peptidem CaMKK2 na C-konci (PDB: 6FEL) a peptid na N-konci vykrytalizovaný s proteinem 14-3-3 $\zeta$  (PDB: 6EWW). Struktury 6FEL a 6EWW byly dány do překryvu a byly uloženy jednotlivé části: protein 14-3-3 $\gamma$ , peptid CaMKK2 obsahující aminokyseliny 97-104 a peptid CaMKK2 obsahující aminokyseliny 508-513, tak aby v jednom žlábků 14-3-3 byl jeden peptid a v druhém druhý peptid.

Protein CaMKK2 v rozsahu 161-463 aminokyselin byl vytvořen s využitím homologního modelování v programu EASY MODELLER prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. pomocí spojení dvou struktur značených pod kódem PDB: 5UY6 a 6CMJ [51].

Kromě struktur jednotlivých domén a proteinů byla vstupní data tvořena rozptylovou křivkou vymezenou hodnotami  $s$  v rozsahu  $0,052-2,5 \text{ nm}^{-1}$  a dále souborem obsahujícím data z chemického zesíťení, kde byl nastaven parametr vzdáleností mezi  $\text{Ca-Ca}$  identifikovaných spojených reziduí na  $30 \text{ \AA}$ .

Modely byly vyhodnoceny na základě shody teoretické rozptylové křivky vypočítané z modelu programem CRY SOL s experimentálními daty. Míra shody je vyjádřena pomocí parametru  $\chi^2$  dle rovnice 5.13 na straně 46.

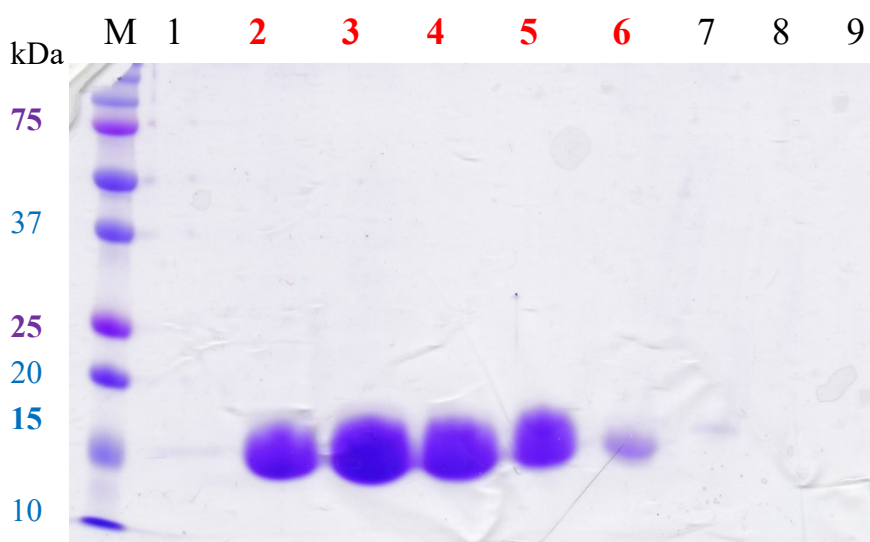
$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum \left[ \frac{I(s)_{exp.} - cI(s)_{vypoč.}}{\sigma(s)} \right]^2, \quad (\text{rovnice 5.13})$$

kde  $I(s)_{exp.}$  je intenzita naměřená během experimentu,  $I(s)_{vypoč.}$  je hodnota intenzity spočítaná z daného modelu,  $c$  je škálovací faktor,  $\sigma(s)$  je experimentální chyba a  $N$  je počet bodů.

## 6. Výsledky

### 6.1. Exprese a purifikace CaM

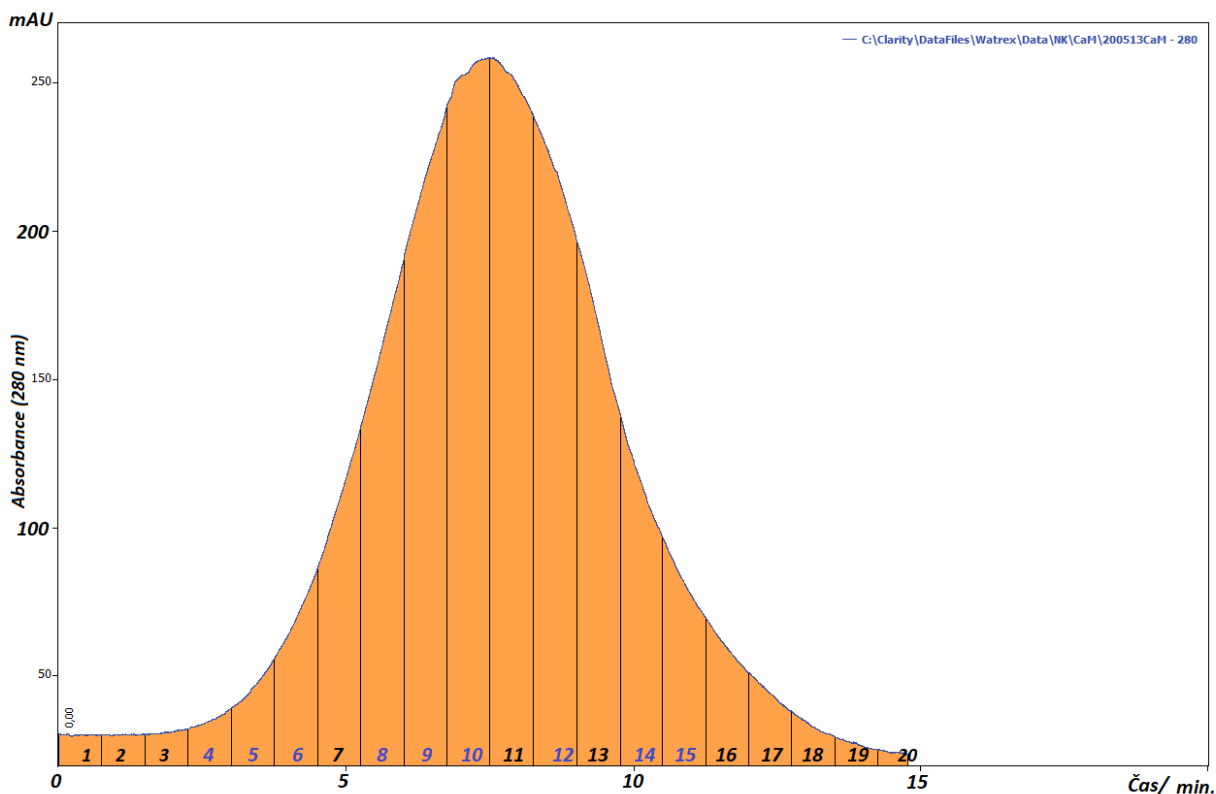
Kalmodulin byl exprimován v buňkách *E.coli*, které byly kultivovány v LB médiu. Výsledky, které jsou zde uvedeny, jsou získány ze 4 litrů buněčných kultur. Exprese a purifikace kalmodulinu je detailně popsána v kapitole 5.3, která začíná na straně 27. Při purifikaci byla využita hydrofobní interakční chromatografie. Matrice byla tvořena Phenyl sepharosou, přičemž kalmodulin v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  s touto maticí interaguje. Kalmodulin byl poté eluován pufrům, který obsahoval EDTA. EDTA váže  $\text{Ca}^{2+}$ , což má za následek zakrytí hydrofobních aminokyselin kalmodulinu a tedy vyloučení CaM z kolony. Čistota proteinu byla ověřena pomocí 18% SDS-PAGE (Obrázek 6.1). Vzorek v jedné jamce obsahoval 10  $\mu\text{l}$  proteinu a 2  $\mu\text{l}$  5x vzorkovacího pufru. Kalmodulin má přibližnou velikost 15 kDa.



**Obrázek 6.1** - 18% SDS-PAGE. Vzorky po hydrofobní interakční chromatografii. M – Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (4  $\mu\text{l}$ ), 1-9 - Vzorky frakcí po hydrofobní chromatografii. Vzorek byl tvořen 10  $\mu\text{l}$  proteinu a 2  $\mu\text{l}$  5x vzorkovacího pufru. Frakce, které byly sloučeny, jsou označeny červeně.

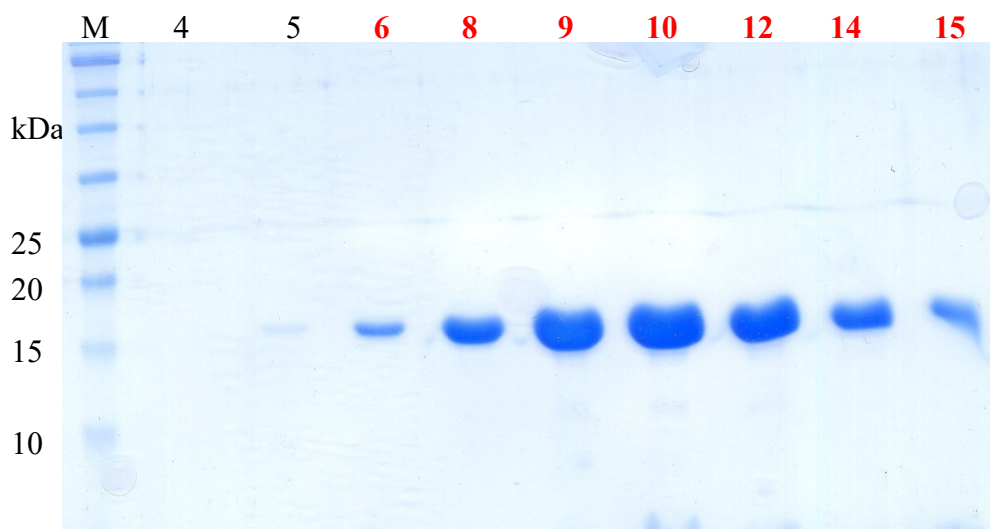
Jak lze vidět, čistota proteinu je dostatečná, ale hydrofobní interakční chromatografie neodděluje protein od agregátů, proto následovala velikostně-vylučovací chromatografie.

Pro velikostně-vylučovací chromatografii byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg, mobilní fáze je uvedena v Tabulce 5.8, na straně 28. Průtok byl 2 ml/min a sběr začal po 160 ml od nanesení proteinu na kolonu po 1,5 ml. Průběh chromatografie od začátku sběru lze vidět na Obrázku 6.2 na straně 48.



**Obrázek 6.2** - Průběh velikostně-vylučovací chromatografie od začátku sběru proteinu po uplynutí 80 minut od nanesení kalmodulinu na kolonu. Frakce, které byly použity pro 18% SDS-PAGE, jsou označeny modře. Absorbance byla měřena při 280 nm.

Kalmodulin má hodnotu extinkčního koeficientu velmi nízkou ( $\epsilon_{280} = 2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), proto hodnoty absorbance při 280 nm jsou též nízké. Pro kontrolu čistoty byla provedena 18% SDS-PAGE (Obrázek 6.3), kde vzorek obsahoval 10  $\mu\text{l}$  proteinu a 2  $\mu\text{l}$  5x vzorkovacího pufru. Vzorky o dostatečné čistotě (6-15) byly sjednoceny a zmraženy při  $-80^\circ\text{C}$ . Výtěžek ze 4 litrů buněčných kultur byl přibližně 15 mg.



**Obrázek 6.3** - 18% SDS-PAGE po velikostně-vylučovací chromatografii. M - Precision Plus Protein™ All Blue (4 $\mu\text{l}$ ). Vzorek 4-15 obsahoval 10  $\mu\text{l}$  proteinu a 2  $\mu\text{l}$  5x vzorkovacího pufru. Frakce, které byly sloučeny a zmraženy jsou označeny červeně.



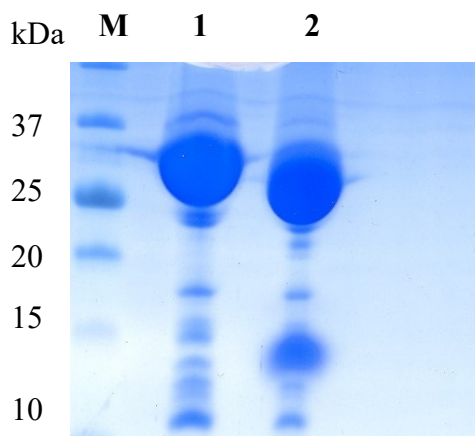
## 6.2. Exprese a purifikace 14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C

Protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C, o velikosti dimerní jednotky 54 kDa, byl exprimován v buňkách *E.coli*, které byly kultivovány v LB médiu. Získané výsledky jsou z purifikace 2 litrů buněčných kultur. Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C je detailně popsána v kapitole 5.4 od strany 29. Protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C obsahuje histidinovou kotvu, která byla využita pro niklovou chelatační chromatografii. Vzorky po této chromatografii byly vizualizovány pomocí 15% SDS-PAGE (Obrázek 6.4), přičemž vzorek obsahoval 2  $\mu$ l proteinu, 8  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru.



**Obrázek 6.4** - Pomocí 15% SDS-PAGE byla vizualizována čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii. M - Blue Protein Ladder (4 $\mu$ l), 1-9 - Vzorky po niklové chelatační chromatografii. Vzorek byl tvořen 2  $\mu$ l proteinu, 8  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Všechny získané frakce byly sloučeny pro aniontově-výměnnou chromatografii.

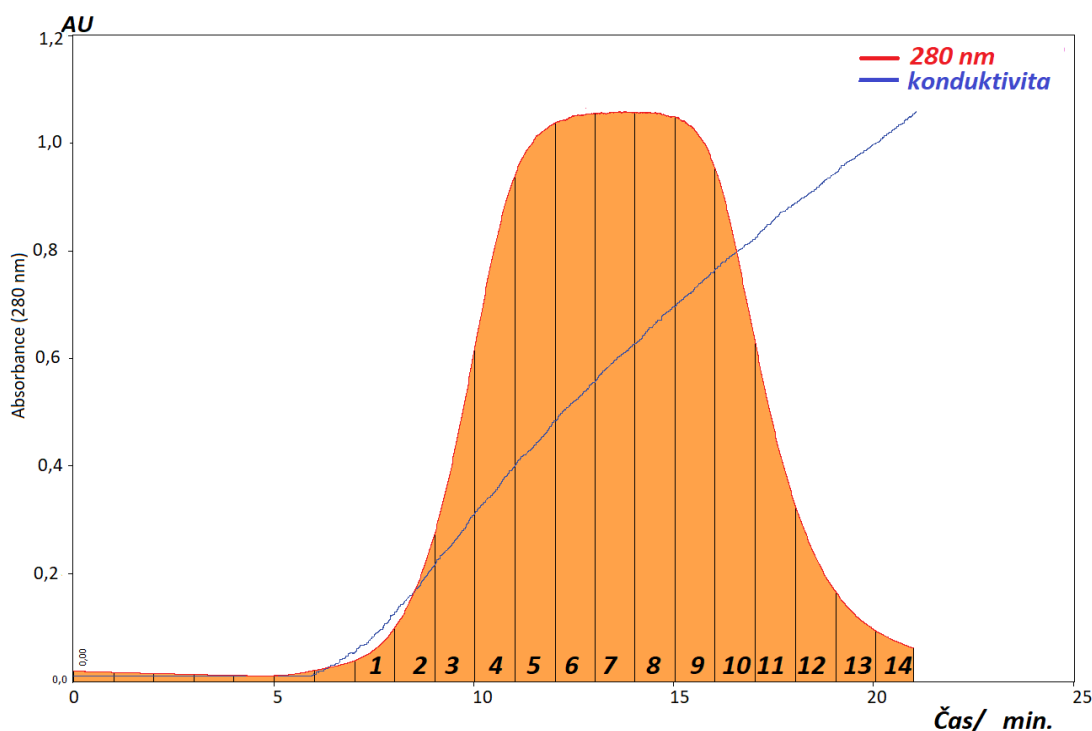
Všechny frakce byly sloučeny. Před následující chromatografií byla odštěpena histidinová kotva s GB1 proteinem pomocí TEV proteasy. Štěpení probíhalo přes noc ve 4 °C. Proces štěpení byl vizualizován 15% SDS-PAGE (Obrázek 6.5). Vzorky obsahovaly 2  $\mu$ l proteinu, 8  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru.



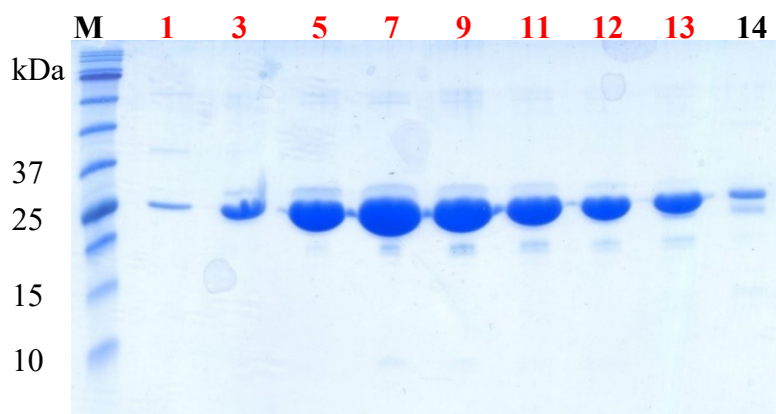
**Obrázek 6.5** - Proces štěpení TEV proteasou vizualizovaný pomocí 15% SDS-PAGE. M - Precision Plus Protein™ All Blue (4 $\mu$ l), 1 – vzorek před štěpením, 2 – vzorek po štěpení. Vzorky obsahovaly 2  $\mu$ l proteinu, 8  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru.

Po úspěšném odštěpení histidinové kotvy (Obrázek 6.5 na straně 49) bylo využito kyselého izoelektrického bodu proteinu 14-3-3 $\gamma$ ΔC, který je přibližně roven 5, což umožňovalo využít aniontově-výměnnou chromatografii. Matrice byla tvořena Q sepharosou, složení pufru je na straně 31, Tabulka 5.12. Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Každá jímáná frakce obsahovala 1 ml vzorku. Protein byl nanesen na kolonu v 2% pufru B v pufru A. Eluce probíhala zvyšováním koncentrace pufru B, kde gradient 2%-100% pufru B trval 20 minut (Obrázek 6.6).

Pro kontrolu čistoty byla použita 15% SDS-PAGE (Obrázek 6.7). Vzorky obsahovaly 3  $\mu$ l proteinu, 7  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Frakce, jež obsahovaly protein, byly sloučeny (označeny červeně na Obrázku 6.7) a pro oddělení agregovaného proteinu a zbylých nečistot byla použita velikostně-vylučovací chromatografie.

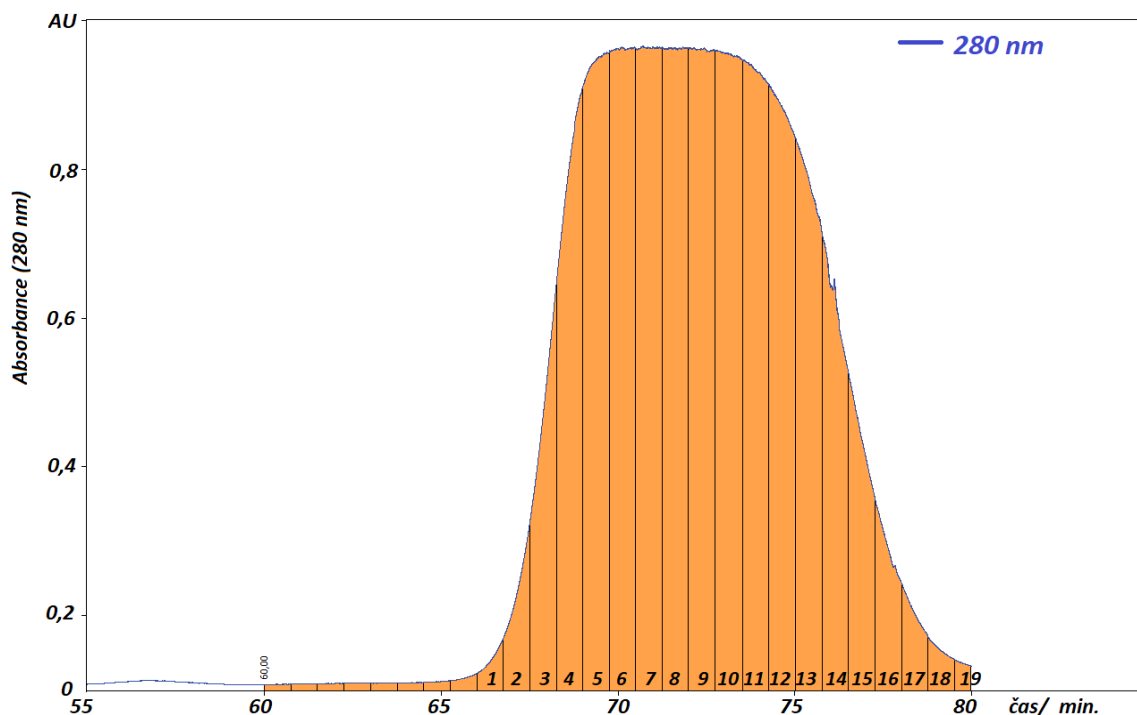


**Obrázek 6.6** - Průběh aniontově-výměnné chromatografie. Gradient soli z 20mM na 1M NaCl trval 20 minut. Konduktivita je označena modře, absorbance proteinu při 280 nm je značena červeně.



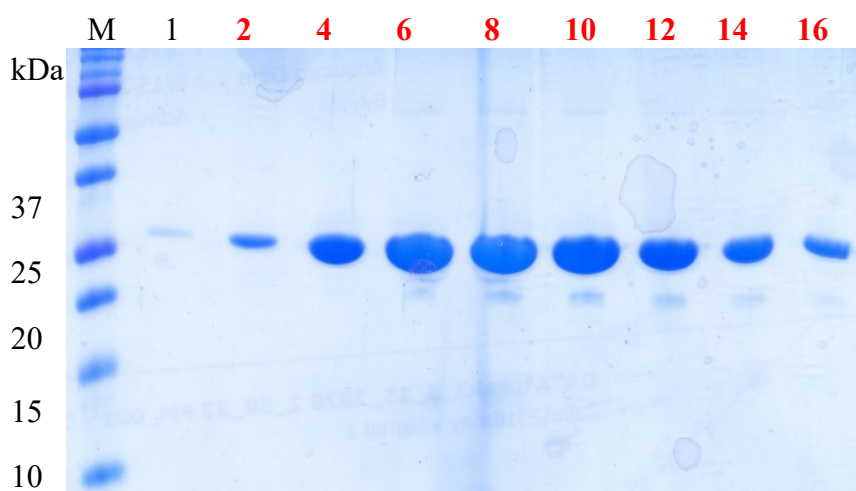
**Obrázek 6.7** - 15% SDS-PAGE pro kontrolu čistoty proteinu po aniontově-výměnné chromatografii. Vzorky 1-14 obsahovaly 3  $\mu$ l proteinu, 7  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. M - 6  $\mu$ l Black Protein Ladder (Cebiosys). Frakce, které byly sloučeny a použity pro SEC, jsou označeny červeně.

Pro velikostně-vylučovací chromatografii byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 75 pg. Mobilní fáze je uvedena v Tabulce 5.13, na straně 31, průtok byl 2 ml/min a každá sebraná frakce obsahovala 1,5 ml proteinu. Sběr začal po 120 ml od nanesení proteinu na kolonu (Obrázek 6.8).



**Obrázek 6.8** - Průběh velikostně-vylučovací chromatografie. Sběr frakcí začal po 120 ml od nanesení proteinu na kolonu. Objem frakce byl 1,5 ml, průtok činil 2 ml/min.

Následovala 15% SDS-PAGE pro zjištění finální čistoty proteinu (Obrázek 6.9). Vzorek obsahoval 4  $\mu$ l proteinu, 6  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru.

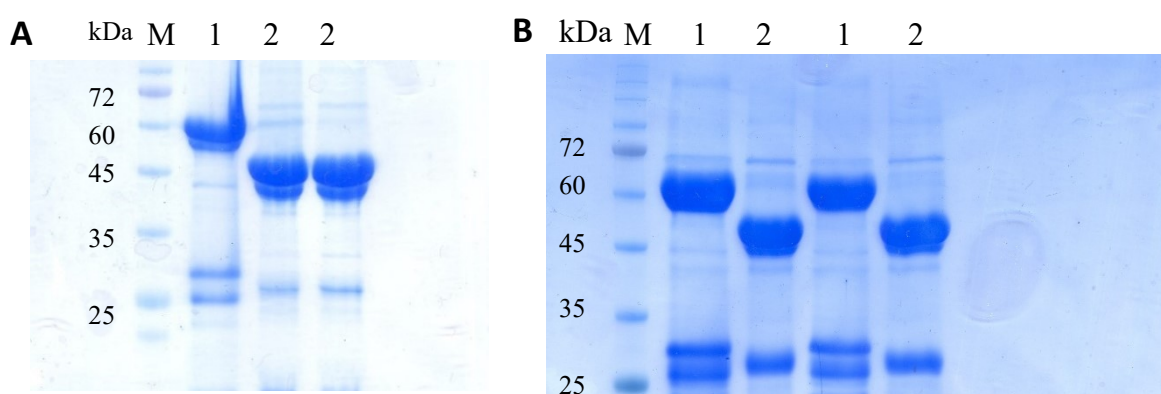


**Obrázek 6.9** - Finální 15% SDS-PAGE po velikostně-vylučovací chromatografii. M - Precision Plus Protein™ All Blue (4 $\mu$ l), Vzorek 1-16 obsahoval 4  $\mu$ l proteinu, 6  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Frakce, které byly sloučeny, a zmrazeny jsou označeny červeně.

Celkový výtěžek ze 2 litrů kultury bylo 30 mg proteinu 14-3-3 $\gamma$ ΔC.

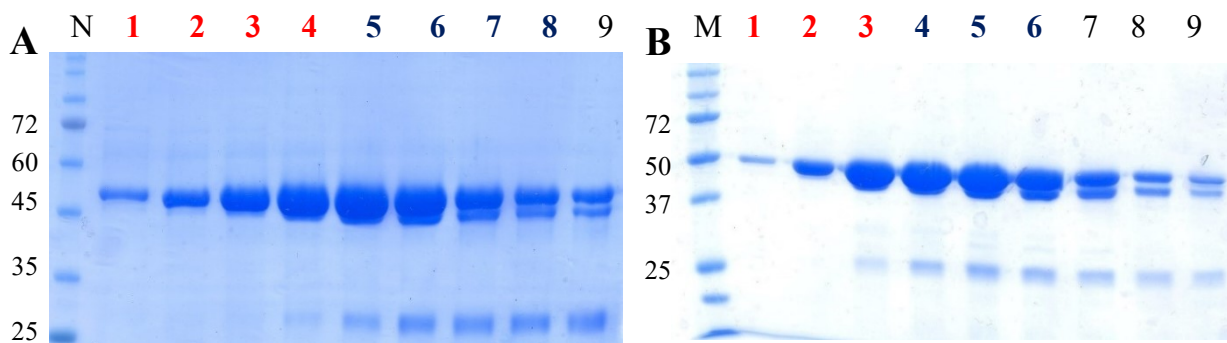
### 6.3. Expres a purifikace CaMKK2 D330A a T145A D330A S495A

Konstrukt CaMKK2 (93-518) o přibližné velikosti 48 kDa byl exprimován v buňkách *E.coli*, které byly kultivovány v případě D330A v LB médiu a v případě T145A D330A S495A v autoindukčním médiu. Získané výsledky jsou z purifikace 8 litrů buněčných kultur. Expres a purifikace proteinu CaMKK2 je detailně popsána v kapitole 5.5 od strany 32. Konstrukty CaMKK2 obsahovaly histidinovou kotvu, která byla využita pro niklovou chelatační chromatografii. Pro 8 litrů buněčných kultur byly provedeny dvě niklové chelatační chromatografie. Eluce probíhala přímo do pufru E a následovalo odštěpení histidinové kotvy s GB1 proteinem pomocí TEV proteasy. Pro kontrolu štěpení následovala 12% SDS-PAGE (Obrázek 6.10), přičemž vzorek obsahoval 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru.

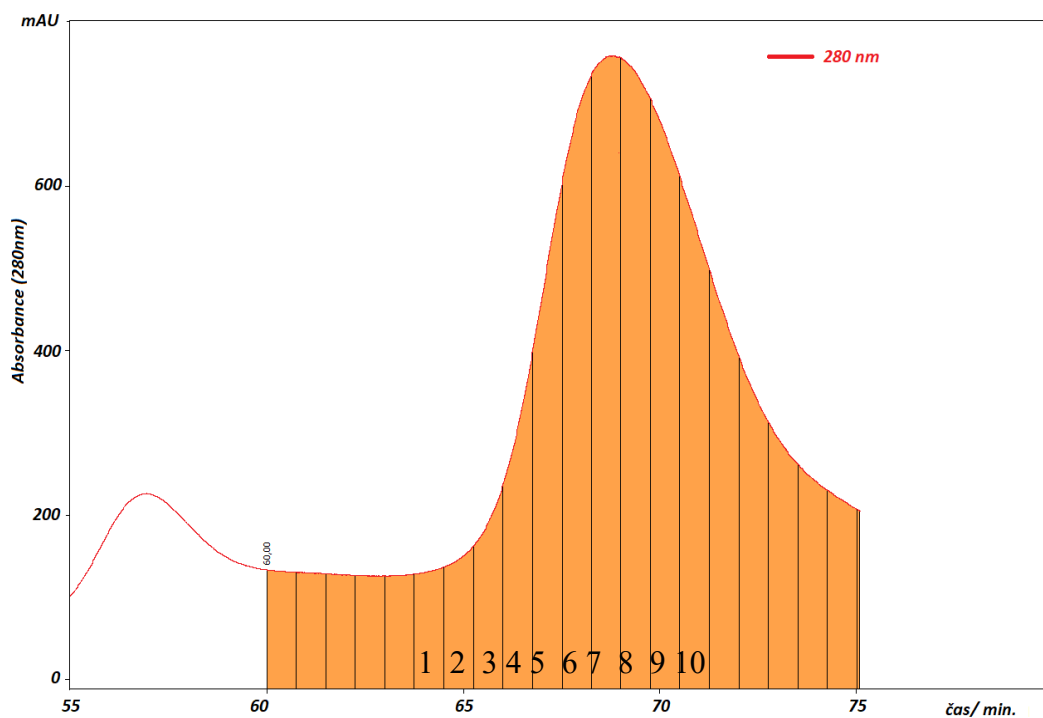


**Obrázek 6.10** - Kontrola štěpení TEV proteasou pomocí 12% SDS-PAGE. M – 4  $\mu$ l Black Protein Ladder (Cebiosys). Vzorek 1 je odebraný vzorek před štěpením, 2 je vzorek po štěpení. Vzorky byly složeny z 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. A – štěpení konstruktu CaMKK2 D330, B – štěpení konstruktu CaMKK2 T145A D330A S495A.

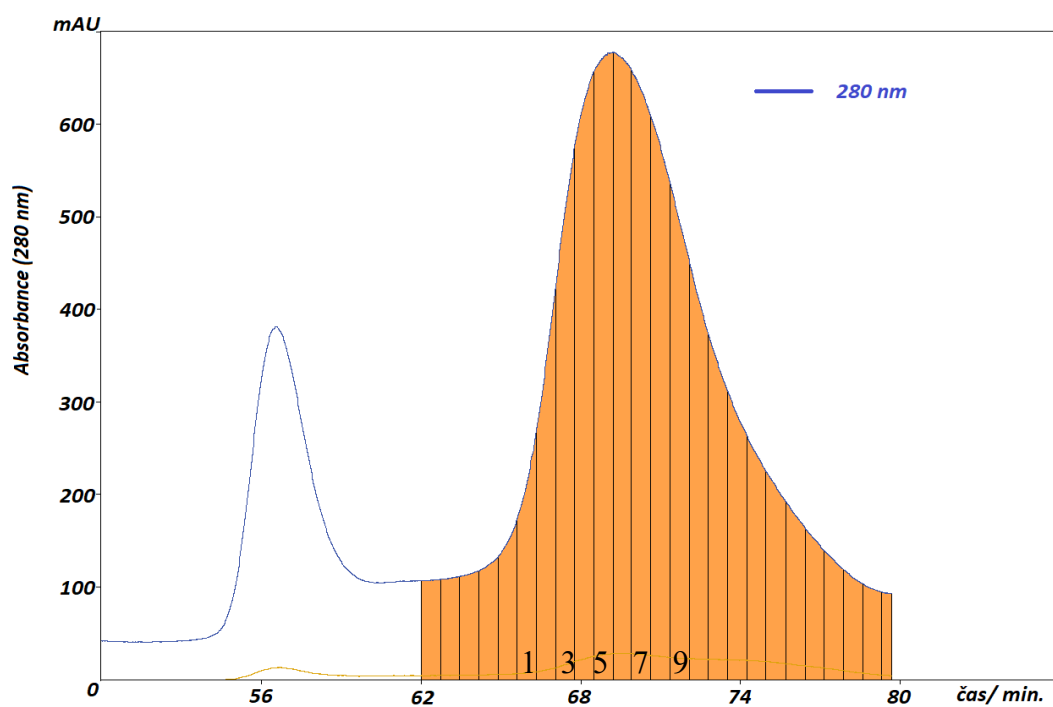
Po štěpení následovala velikostně-vylučovací chromatografie, při které byla použita kolona HiLoad 75 26/600 pg, průtok 2 ml/min, sběr frakcí začal po 120 minutách od nanesení proteinu na kolonu, po 1,5 ml. Průběh chromatografie lze vidět na Obrázku 6.12 a 6.13 na straně 53. Následovala 12% SDS-PAGE (Obrázek 6.11) a vzorky, které obsahovaly protein s degradací, byly sloučeny a byla opakovaná velikostně-vylučovací chromatografie. Pro 8 litrů buněčné kultury obsahující CaMKK2 T145A D330A S495A byla provedena velikostně vylučovací chromatografie 3-4x. Pro konstrukt D330A celkem 6-8x.



**Obrázek 6.11** - Výsledky 12% SDS-PAGE po první velikostně-vylučovací chromatografii. A - CaMKK2 T145A D330A S495A; B - CaMKK2 D330A. M - Precision Plus Protein™ All Blue (4 $\mu$ l), N - 4 $\mu$ l Black Protein Ladder (Cebiosys). Vzorek 1-9 obsahuje 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Červeně jsou označeny frakce, které byly sloučeny a zmrazeny, modře jsou označeny vzorky, které byly sloučeny pro další velikostně-vylučovací chromatografii.



**Obrázek 6.12** - Průběh první velikostně-vylučovací chromatografie CaMKK2 T145A D330A S495A.

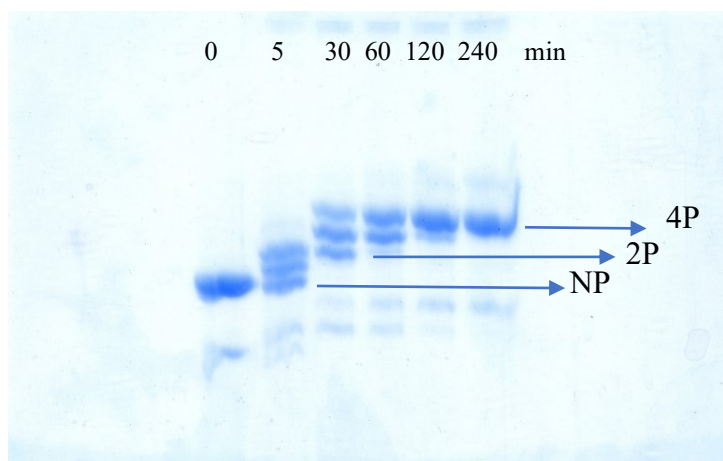


**Obrázek 6.13** - Průběh první velikostně-vylučovací chromatografie CaMKK2 D330A.

Celkový výtěžek nefosforylovaného proteinu z 8 litrů buněčné kultury odpovídá pro CaMKK2 D330 4 mg, pro CaMKK2 T145A D330A S495A 8 mg.

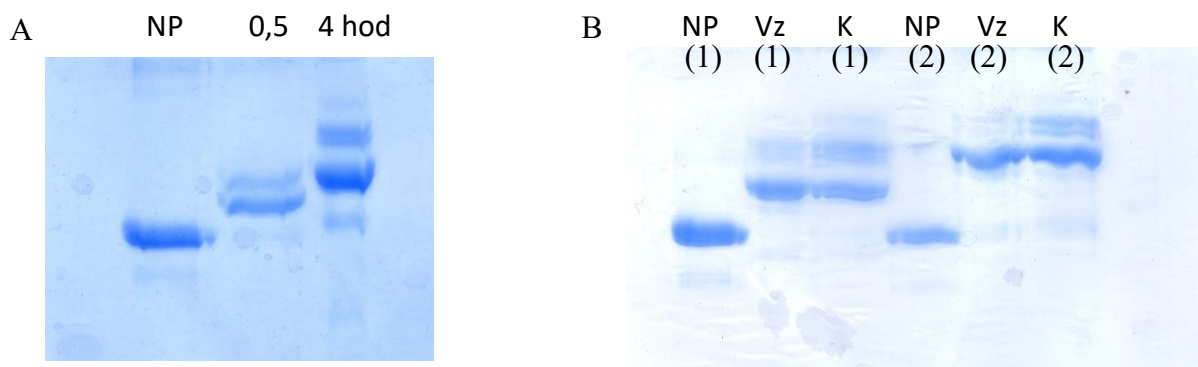
### 6.3.1 Fosforylace CaMKK2

Optimalizace fosforylačního protokolu pro CaMKK2 D330A se odvíjela od fosforylace CaMKK2 T145A D330A S495A. Množství c-AMP dependentní proteinkinasy A určené k fosforylaci 1 mg CaMKK2 D330A bylo stanoveno na 2000 U pro 4 $\mu$ M CaMKK2 D330A při 30 °C po dobu 4 hodin. Průběh fosforylace byl vizualizován pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 75 $\mu$ M Phos-tag, která probíhala za neustálého chlazení po dobu 4,5 hodin při 180 V (Obrázek 6.14).



**Obrázek 6.14** – Průběh fosforylace je vizualizován pomocí 75 $\mu$ M Phos-tag 12% SDS-PAGE, která probíhala za neustálého chlazení po dobu 4,5 hodiny při 180 V. Vzorek obsahoval 10  $\mu$ l reakční směsi a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Reakční směs obsahovala 4 $\mu$ M CaMKK2 D330A, 2000 U PKA na 1 mg CaMKK2, 750 $\mu$ M ATP a 20mM MgCl<sub>2</sub>. Celkový objem směsi byl 200  $\mu$ l.

Fosforylace CaMKK2 T145A D330A S495A probíhala v přítomnosti PKA, jejíž množství potřebné k fosforylaci bylo 2684 U pro jeden miligram 4 $\mu$ M CaMKK2 T145A D330A S495A při 30 °C po dobu 4 hodin. Průběh fosforylace byl vizualizován pomocí 12% SDS-PAGE obsahující 50 $\mu$ M Phos-tag, která probíhala za neustálého chlazení po dobu 4,5 hodiny při 180 V (Obrázek 6.15 A). Porovnání fosforylačních stavů CaMKK2 2P a 4P pomocí 75 $\mu$ M Phos-tag 12% SDS-PAGE je vizualizována na Obrázku 6.15B.



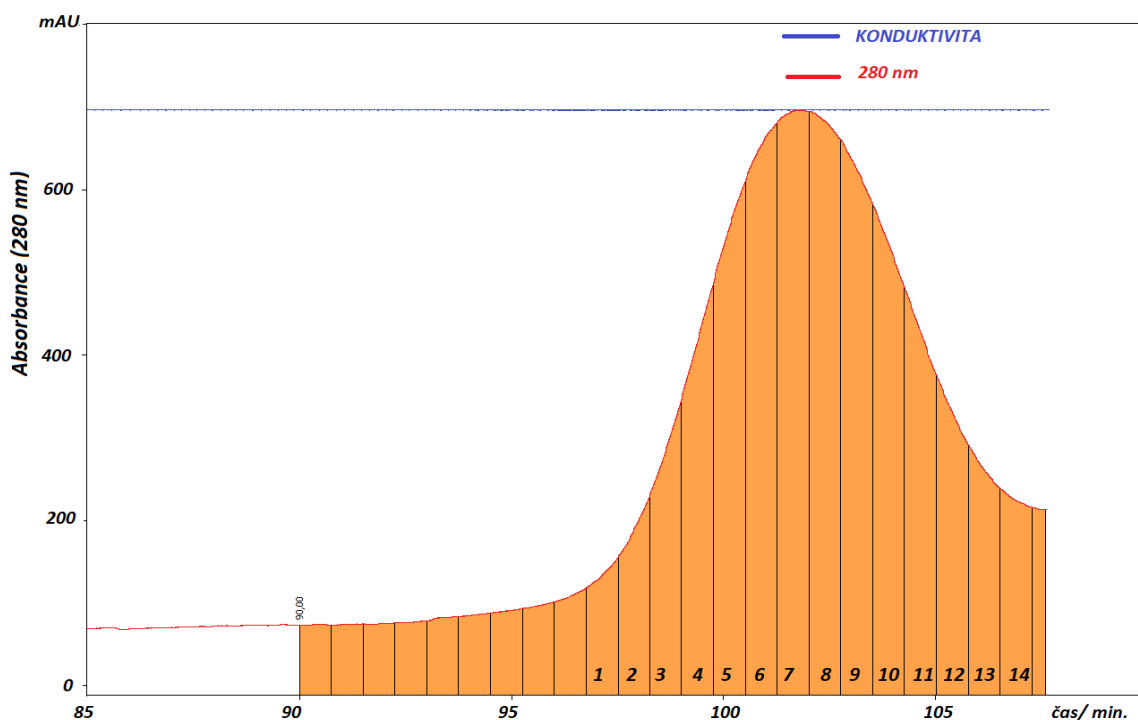
**Obrázek 6.15** – 50 $\mu$ M Phos-tag 12% SDS-PAGE. NP-kontrola nefosforylovaného proteinu. A - průběh fosforylace CaMKK2 T145A D330A S495A. B – porovnání fosforylovaného stavu purifikované CaMKK2 T145A D330A S495A (1) a CaMKK2 D330A (2). K – kontrola plně fosforylovaného proteinu CaMKK2. Vz – fosforylovaný stav purifikovaného proteinu.

Po fosforylaci následovala velikostně-vylučovací chromatografie pro oddělení PKA a ATP.

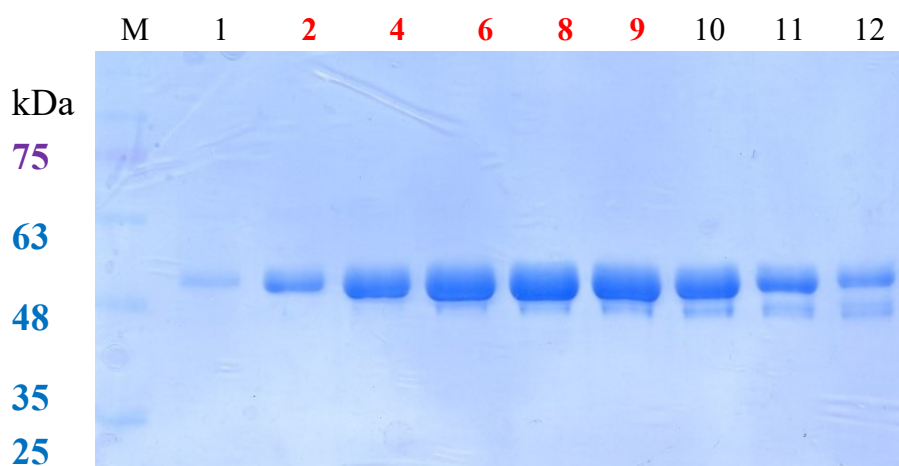


### 6.3.2 Velikostně vylučovací chromatografie po fosforylaci

Pro oddělení PKA a ATP pomocí velikostně-vylučovací chromatografie byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex® 200 pg. Chromatografie probíhala při průtoku 2 ml/min, sběr frakcí byl nastaven po 180 ml od nanesení proteinu na kolonu, každá frakce obsahovala 1,5 ml proteinu. Průběh chromatografií lze vidět na Obrázku 6.16 a 6.18 na straně 56. Následně byla provedena 12% SDS-PAGE (Obrázek 6.17 a 6.19 na straně 56) a vzorky o dostatečné čistotě byly sloučeny, změřeny, a buď zmraženy, nebo rovnou použity pro nadcházející experiment.

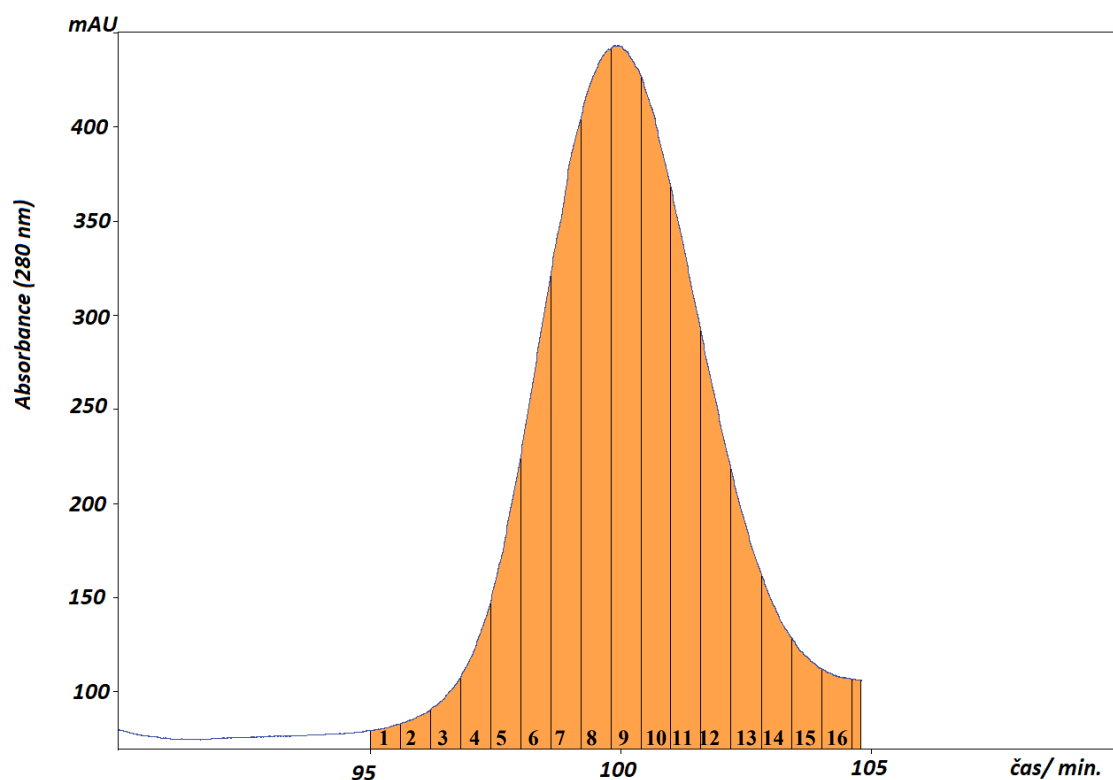


**Obrázek 6.16** - Průběh velikostně-vylučovací chromatografie po fosforylaci CaMKK2 T145A D330A S4995A.

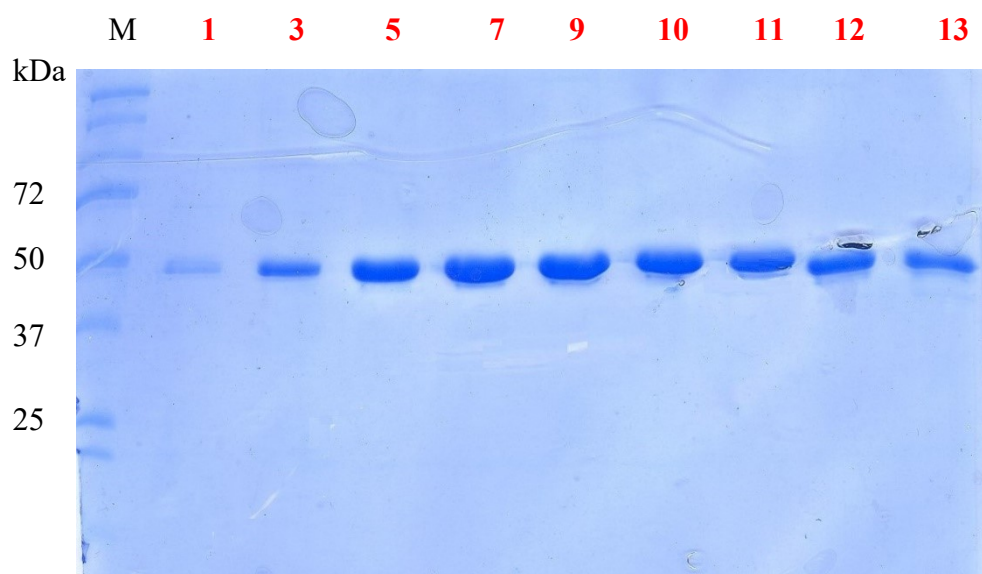


**Obrázek 6.17** - 12% SDS-PAGE po chromatografii CaMKK2 T145A D330A S495A. M - 2  $\mu$ l Black Protein Ladder (Cebiosys). Vzorky 1-12 obsahují 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Červeně jsou označeny vzorky, které byly sloučeny a zmraženy.

Z 8 litrů buněčné kultury bylo získáno přibližně 4 mg fosforylované CaMKK2 T145A D330A S495A.



**Obrázek 6.18** - Průběh chromatografie po fosforylaci CaMKK2 D330A.



**Obrázek 6.19** - Čistota proteinu vizualizovaná pomocí 12% SDS-PAGE. M – 4  $\mu$ l Black Protein Ladder (Cebiosys). Vzorek 1-9 obsahuje 10  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru. Červeně jsou označeny vzorky, které byly sloučeny a zmrazeny.

Typický výtěžek fosforylovaného proteinu CaMKK2 D330A z 8 litrů narostlé buněčné kultury byl v rozmezí 1-2 mg.

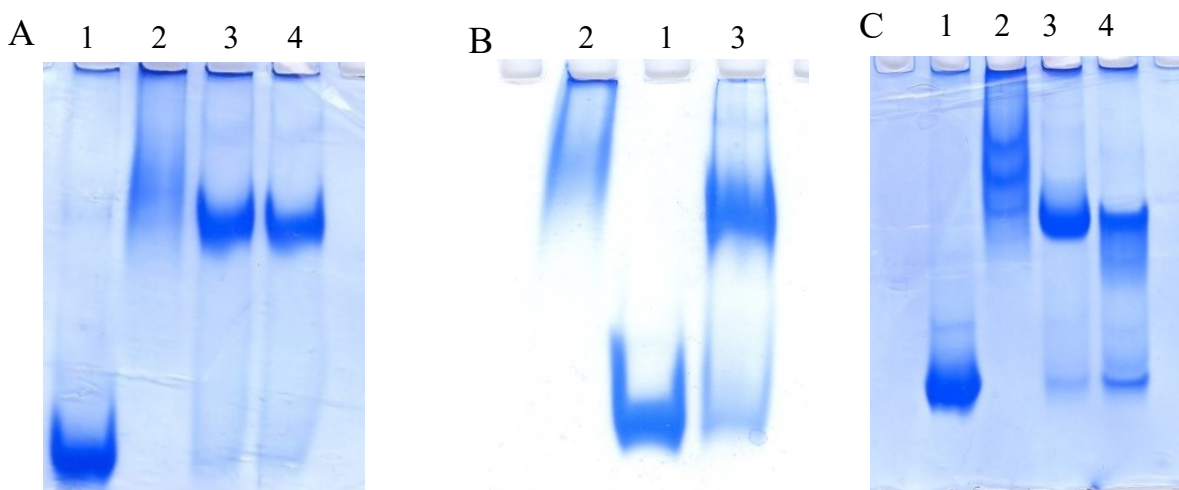


## 6.4. Biofyzikální a strukturní charakterizace proteinů a komplexů

Pro biofyzikální a strukturní charakterizaci byly použity metody LC-MS (kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní analýzou), XL-MS (chemické zesílení spojené s hmotnostní analýzou), H/D-MS (vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní analýzou), SV-AUC (analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti) a SEC-SAXS (velikostně-vylučovací chromatografie spojená s malouhlovým rozptylem rentgenového záření). Před analýzou vzorků byla vždy provedena nativní elektroforéza.

### 6.4.1 Nativní elektroforéza

Pomocí nativní PAGE můžeme studovat tvorbu komplexu. Je to rychlá a levná metoda, a je vhodná pro kontrolu vzorku před náročnějšími a dražšími experimenty, obzvláště pokud si nejsme jistí, jestli se komplex v daném pufru utváří. Na Obrázku 6.20 lze sledovat tvorbu komplexů pro jednotlivé experimenty.



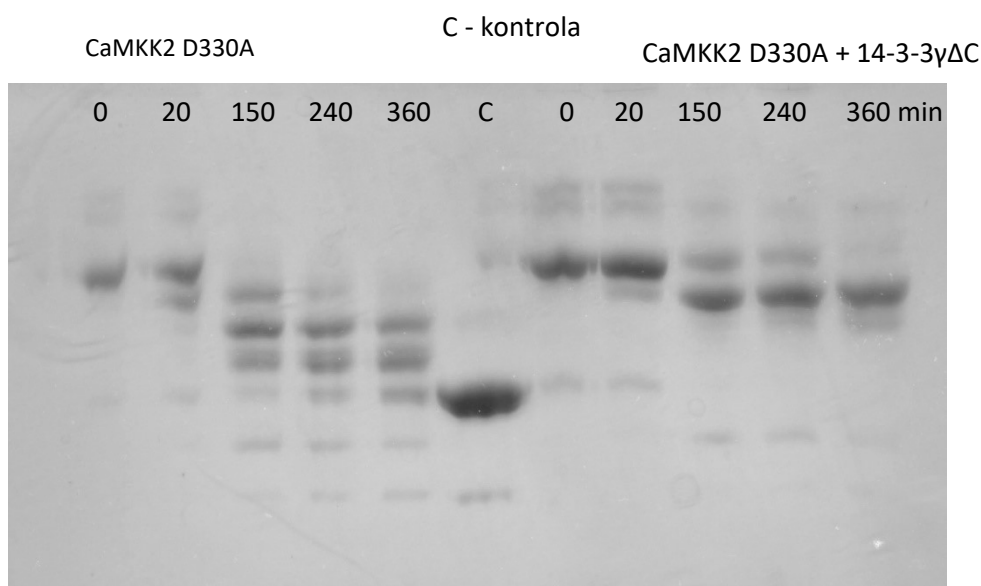
**Obrázek 6.20** - Nativní gely před jednotlivými experimenty. Vzorek 1 je protein 14-3-3, vzorek 2 pCaMKK2, vzorek 3 je komplex pCaMKK2:14-3-3  $\gamma\Delta C$  a vzorek 4 je pCaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta C$ :CaM. A - 12% TBE nativní gel před SAXS, složení pufru ve vzorku: 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM DTT, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10% glycerol. B - 12% Tris-glycinový nativní gel před H/D výměnou a SV-AUC, složení pufru ve vzorku: 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM DTT, 10% glycerol. C - 12% Tris-glycinový gel před chemickým zesílením, složení pufru ve vzorku: 50mM HEPES, pH=7,5, 0,5mM NaCl, 5mM DTT, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10% glycerol. Pro chemické zesílení a SAXS byl použit konstrukt CaMKK2 T145A D330A S495A, pro H/D výměnu a AUC byl použit konstrukt CaMKK2 D330A.

Z gelů lze pozorovat, že vzorky byly v pořádku a komplex se vždy utvořil. Následně byly vzorky použity pro jednotlivé experimenty.

#### 6.4.2 Analýza defosforylace pomocí Phos-tag SDS-PAGE a LC-MS analýzy

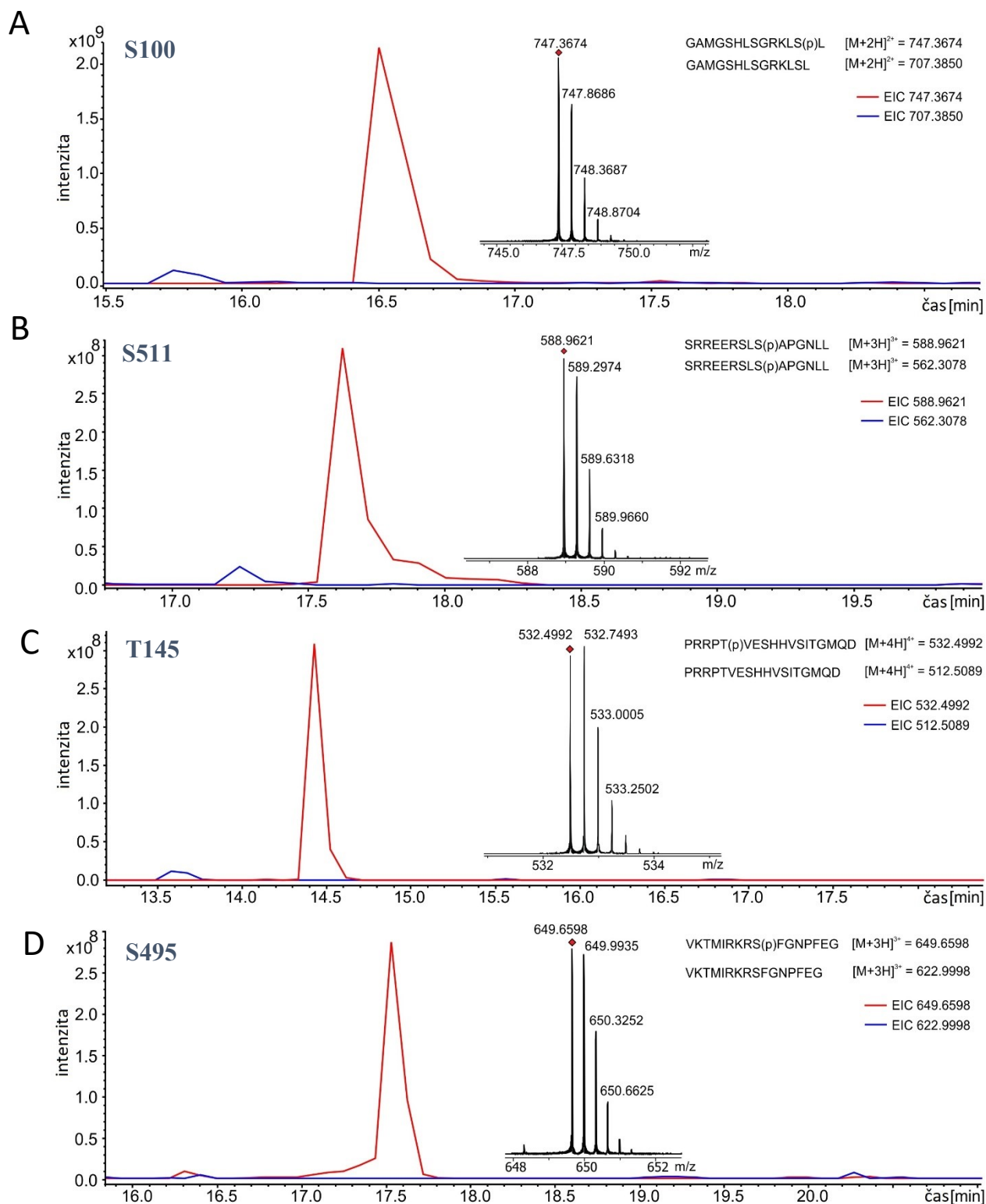
CaMKK2 D330A obsahuje čtyři PKA fosforylační místa, jimiž jsou S100, T145, S495 a S511, z nichž S100 a S511 se účastní vazby s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Tato vazba způsobila u CaMKK1 snížení její kinasové aktivity, ale pro CaMKK2 nebyl zjištěn žádný efekt. Jelikož se protein 14-3-3 váže v blízkosti kalmodulin-vazebného místa, je možné, že zabraňuje navázání kalmodulinu a tedy i následné aktivaci. Vzhledem k tomu, že protein 14-3-3 se váže pouze na fosforylovaná místa, lze předpokládat, že při tvorbě komplexu proteinu pCaMKK2:14-3-3 jsou fosforylovaná i místa S495 a T145. Je-li S495 fosforylován, kalmodulin nedokáže aktivovat CaMKK2, a tudíž není spuštěna signální kaskáda. Pokud protein 14-3-3 udržuje tento serin fosforylovaný, mohl by tak chránit CaMKK2 před předčasnou aktivací.

Pro ověření této role proteinu 14-3-3 byla CaMKK2 D330A plně fosforylována a následně defosforylována fosfatasou v přítomnosti i nepřítomnosti proteinu 14-3-3  $\gamma\Delta$ C. Složení pufrů a množství jednotlivých proteinů je uvedeno v tabulce 5.19 na straně 37. Tento experiment byl vizualizován pomocí Phos-tag 12% SDS PAGE, která umožňuje rozlišit různé fosforylační stavy proteinů (Obrázek 6.21), a následně byla provedena LC-MS analýza.

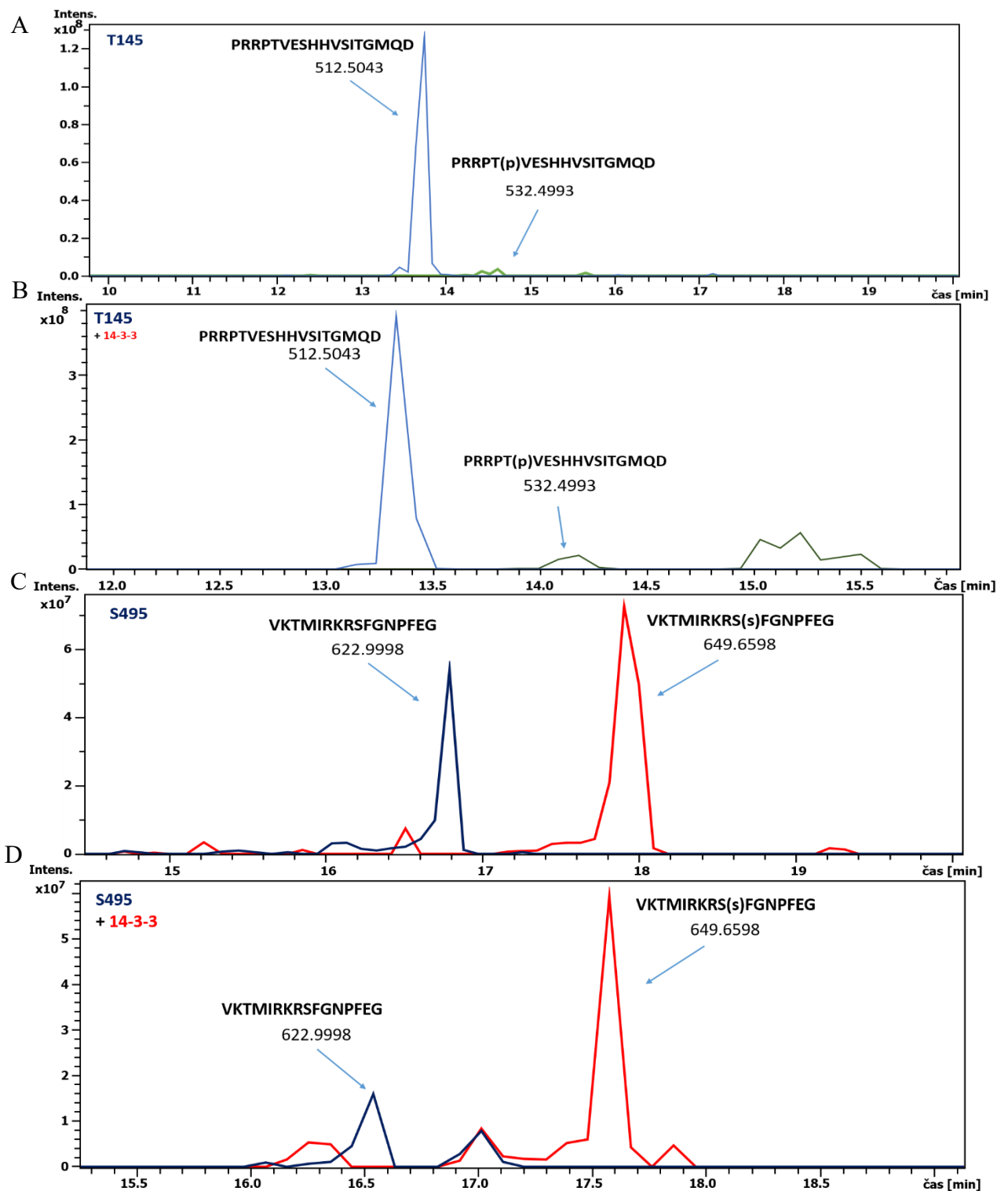


**Obrázek 6.21** – Průběh defosforylace vizualizovaný na 75 $\mu$ M Phos-tag 12% SDS gelu. Nanáška do jamek byla 80 pmol CaMKK2 D330A a 240 pmol 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Jelikož protein 14-3-3 není fosforylovaný a jeho velikost je 27 kDa, není vidět na gelu. Vzorky byly odebrány v průběhu defosforylace v čase 0, 20, 150, 240 a 360 minut. C značí nefosforylovanou CaMKK2 D330A.

Z gelu lze vidět, že v čase 0 je CaMKK2 plně nafosforylovaná. Toto potvrzuje i LC-MS analýza (Obrázek 6.22 na straně 59). Také lze pozorovat, že protein 14-3-3  $\gamma\Delta$ C zpomaluje defosforylaci tří fosforylačních míst, mezi které s jistotou patří místa účastníci se vazby (S100, S511) a následně T145 nebo S495. Pro zjištění posledního residua, jehož defosforylace je zpomalena, byla použita LC-MS analýza, pro niž byl vybrán vzorek po 240 minutách defosforylace (Obrázek 6.23 na straně 60).



**Obrázek 6.22** – Eluční profily při LC-MS analýze fosforylované CaMKK2 D330A v čase 0 minut. A - analýza peptidu obsahujícího serin na pozici 100. B - analýza peptidu obsahujícího threonin na pozici 511. C - analýza peptidu obsahující threonin na pozici 145 a D - analýza peptidu obsahujícího serin na pozici 495. Jak je z grafů vidět, všechna čtyři místa jsou plně fosforylována a množství nefosforylovaných peptidů je zanedbatelné.



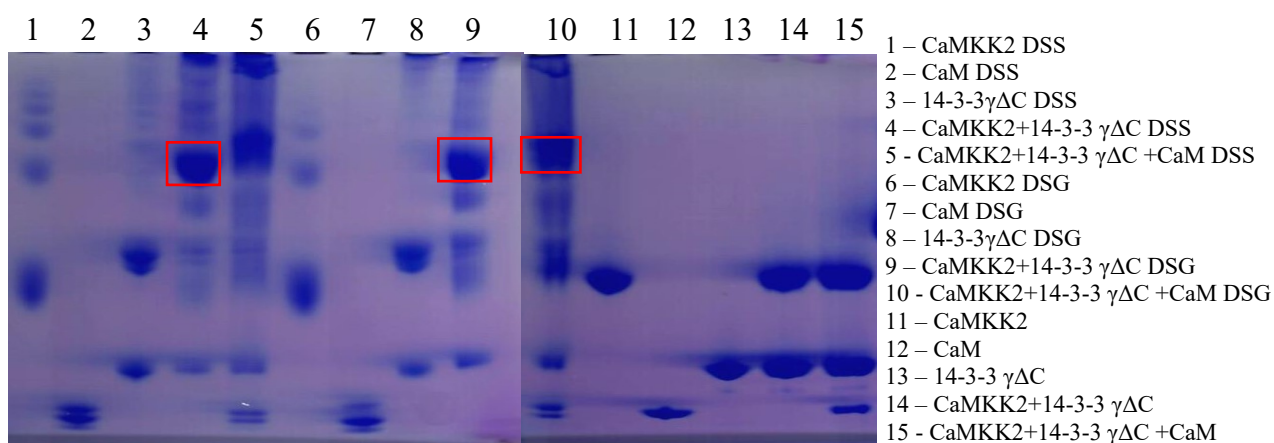
**Obrázek 6.23** – Eluční profily při LC-MS analýze fosforylovaných peptidů po 240 minutách defosforylace v přítomnosti či nepřítomnosti proteinu 14-3-3. A - analýza peptidu obsahujícího threonin na pozici 145 v nepřítomnosti proteinu 14-3-3. B - analýza peptidu obsahujícího threonin na pozici 145 v přítomnosti proteinu 14-3-3. C - analýza peptidu obsahujícího serin na pozici 495 v nepřítomnosti proteinu 14-3-3. D - analýza peptidu obsahujícího serin na pozici 495 v přítomnosti proteinu 14-3-3.

Z Obrázku 6.23 lze vyčíst, že defosforylace serinu 495 je zpomalena v přítomnosti proteinu 14-3-3 $\Delta$ C, tudíž role proteinu 14-3-3 by mohla být protekce tohoto místa před defosforylací a tím zabránění předběžné aktivaci CaMKK2. Tato funkce proteinu 14-3-3 byla následně potvrzena (LANGENDORF, 2020) [22]. Dále byl komplex analyzován pomocí XL-MS.

### 6.4.3 Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií

Pro zjištění vzájemné orientace proteinu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C a CaMKK2 byl proveden experiment chemického zesítení spojeného s hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu byla použita činidla, která přednostně reagují s primárními aminy, ale také interagují s OH skupinou (DSG a DSS). Pufir pro tento experiment a jednotlivé koncentrace proteinů jsou uvedeny v Tabulce 5.24 na straně 41.

Tato analýza byla provedena s využitím dvou přístupů. První MS analýza se prováděla přímo z roztoku, druhá z gradientového gelu (Obrázek 6.24). Pro analýzu z roztoku byly odebrány vzorky, které odpovídají sloupci 9 a 10 v Obrázku 6.24. Pro analýzu z gelu byly vyříznuty a analyzovány části gelu, které jsou označeny na obrázku červeným obdélníkem.



**Obrázek 6.24** - 4-12% gradientový gel. Vzorky 11-15 jsou kontroly proteinů bez přidaného zesíťovacího činidla. 1-10 jsou vzorky po inkubaci s činidlem DSS (vzorky 1-5) a DSG (6-10).

Z gelu lze vidět čistotu proteinů (sloupec 11-15) pro tuto analýzu a tvoření oligomerů v přítomnosti síťovacích činidel. Výsledky XL-MS analýzy lze vidět v Tabulce 6.1 na straně 62, která obsahuje nalezené spojené peptidy. CaMKK2 obsahuje na N-konci rezidua GAMGS z histidinové kotvy. Tyto aminokyseliny se v nativní formě CaMKK2 nevyskytují, ale v Tabulce 6.1 na straně 62 jsou označeny jako G88-S92. Nalezená spojení byla následně zahrnuta do počítačového modelování, jehož výsledek pro binární komplex je na Obrázku 6.41 na straně 78.

**Tabulka 6.1** - Přehled všech identifikovaných spojených peptidů. Bez pozadí jsou zobrazeny peptidy analyzované z roztoku, v šedém pozadí jsou nalezené peptidy analyzované z gelu.

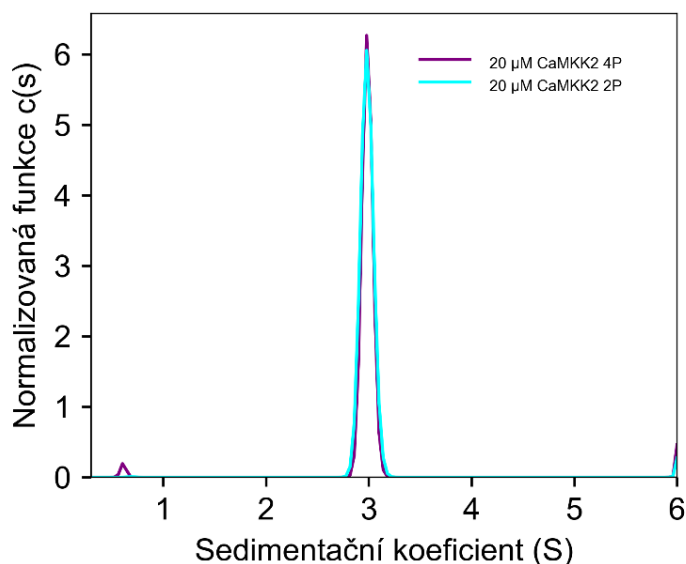
čínidlo	[M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	chyba (ppm)	peptidy		Rezidua		poznámka
			CaMKK2	14-3-3 γΔC	CaMKK2	14-3-3γΔC	
DSG	4369.096	-0.08	G88-R97	T199-R227	S92	S215	
	4369.096	-0.05	G88-R97	T199-R227	S95	S215	
	4076.043	0.17	K364-K369	T199-R227	K364	S215	
	3926.01	-0.13	K200-K203	T199-R227	K200	T210	
	2773.341	-0.37	G88-R97	V62-K77	S92	S64	
	2773.342	0.01	G88-R97	V62-K77	S95	S64	
	2773.342	0.11	G88-R97	V62-K77	S92	K69	
	4526.25	-0.09	I395-K403	T199-R227	S400	S215	redukovaný Cys
	4526.249	-0.30	I395-K403	T199-R227	S400	S215	redukovaný Cys
	1842.932	0.54	G88-R97	K78-R83	S92	K78	
DSS	4427.138	0.00	G88-R98	T199-R227	S92	S215	oxidovaný Met
	4411.142	-0.23	G88-R99	T199-R227	S92	S215	

čínidlo	[M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	chyba (ppm)	peptidy		Rezidua		poznámka
			CaM	14-3-3 γΔC	CaM	14-3-3γΔC	
DSG	2869.483	1.10	E32-R38	D218-T234	T35	T231	oxidovaný Met

čínidlo	[M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	chyba (ppm)	peptidy		Rezidua		poznámka
			CaMKK2		CaMKK2		
DSG	3667.782	-0.50	T166-K173	R143-Y165	K168	Y165	
	4693.306	0.09	P283-R290	L251-K282	S285	T280	
	3956.959	0.01	I328-K338	G339-K364	S334	S340	
	3649.773	-0.30		T143-K173	T166	K168	redukovaný Cys
	2931.534	-0.30	K364-K369	I402-K420	K364	K403	
	2727.508	0.03		G228-K250	K241	K242	
	4621.234	0.82	S129-R139	P144-K173	S129	S152	
	5479.762	-0.30	K299-R311	I328-R363	K307	S334	
	3529.877	-0.40	K364-K369	I402-K425	K364	K403	
	3125.514	0.01	T166-K168	R143-Y165	T166	Y165	
	2251.059	0.19	V195-K198	L181-K194	S197	Y191	
	4489.259	-0.01	K364-K369	I328-R363	K364	T343	
	5646.758	0.41	G88-R97	L251-R290	0	T280	

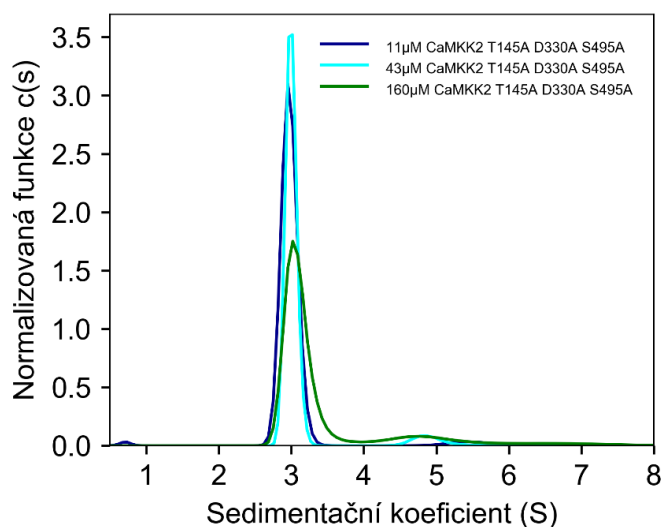
#### 6.4.4 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti

Další důležitou informací bylo, jestli se CaMKK2 D330A výrazně neliší od CaMKK2 T145A D330A S495A. Proto byly porovnány sedimentační koeficienty samotných proteinů (Obrázek 6.25), které následně byly přepočítány pro protein ve vodě při 20 °C (Tabulka 6.2 na straně 65).



**Obrázek 6.25** - Normalizovaná spojitá distribuční funkce sedimentačních koeficientů CaMKK2 2P (fosforylovaná CaMKK2 T145A D330A S495A) a CaMKK2 4P (fosforylovaná CaMKK2 D330A).

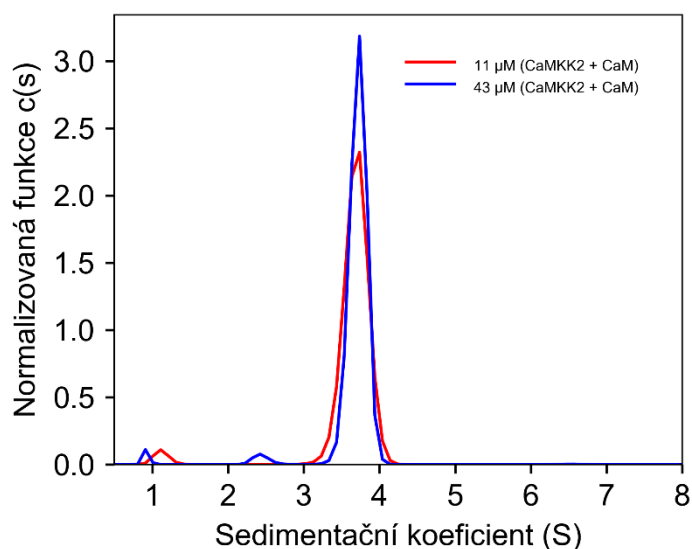
Jak lze vidět na Obrázku 6.25 a v Tabulce 6.2 na straně 65, fosforylovaná místa pT145 a pS495 neovlivňují hydrodynamický poloměr proteinu, což naznačuje, že nedochází k výrazným strukturálním změnám. Z tohoto důvodu byly pro analýzu komplexu CaMKK2:14-3-3 použity oba konstrukty CaMKK2. Následně byla změřena závislost tvorby dimeru na koncentraci (Obrázek 6.26), jelikož tento jev byl zjištěn u CaMKK1. Pro tento experiment byl použit konstrukt NP (nefosforylovaná) CaMKK2 T145A D330A S495A.



**Obrázek 6.26** - Série normalizovaných spojitých distribucí sedimentačních koeficientů CaMKK2 T145A D330A S495A, jež zobrazují závislost tvorby dimeru na koncentraci CaMKK2. U koncentraci 43 a 160 μM CaMKK2 lze pozorovat tvorbu dimerní formy, jejíž sedimentační koeficient se nalézá okolo 5 S.

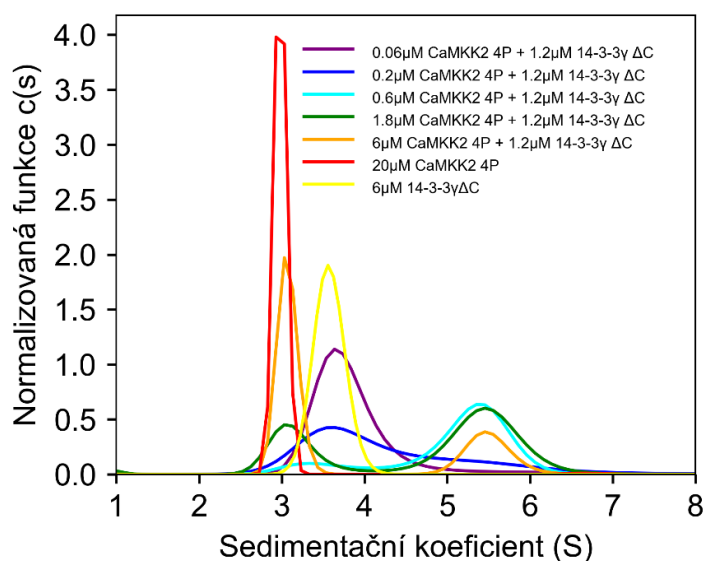


Z Obrázku 6.26 na straně 63 lze vyčíst, že při vyšších koncentracích dochází k tvorbě dimerní formy, avšak ani v jednom experimentu jsme nedosáhli těchto hodnot koncentrace a navíc zastoupení dimerní formy je poměrně zanedbatelné. Také bylo zjištěno, že efekt dimerizace je narušen v přítomnosti kalmodulinu, viz Obrázek 6.27, jelikož není pozorován žádný signál u hodnoty 5 S.



**Obrázek 6.27** - Série spojených distribucí sedimentačních koeficientů komplexů CaM:CaMKK2 T145A D330A S495A. Efekt dimerizace byl narušen v přítomnosti kalmodulinu.

Posledním provedeným experimentem s využitím SV-AUC bylo stanovení zdánlivé disociační konstanty komplexu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C:CaMKK2 D330A pS100 pT145 pS495 pS511 (CaMKK2 4P) pomocí globálního modelování. Pro získání potřebných dat byla provedena titrace proteinu 14-3-3, který měl stálou koncentraci (1,2 $\mu$ M), proteinem CaMKK2, kde použitá koncentrace byla v rozmezí od 0,06 do 6  $\mu$ mol $\cdot$ dm<sup>-3</sup> (Obrázek 6.28).



**Obrázek 6.28** - Série normalizovaných spojených distribucí sedimentačních koeficientů. Protein 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C měl fixní koncentraci 1,2  $\mu$ M a koncentrace CaMKK2 4P se pohybovaly v rozsahu 0,06–6  $\mu$ M.



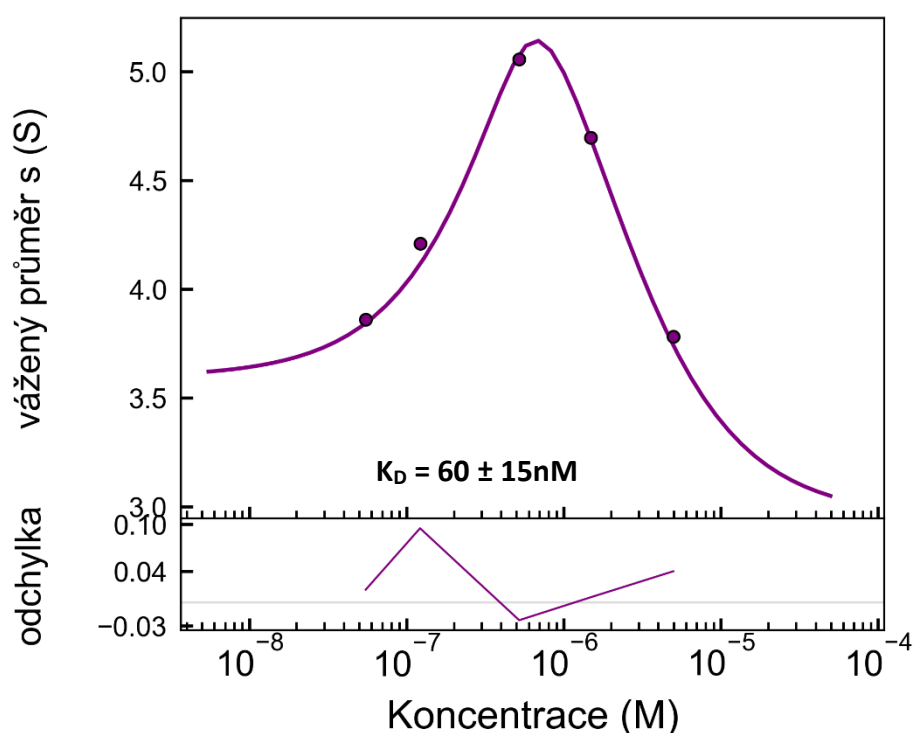
Z jednotlivých distribucí (Obrázek 6.25 na straně 63 a 6.28 na straně 64) byly získány parametry obsažené v Tabulce 6.2, kde lze vidět hodnoty sedimentačních koeficientů přepočítaných pro protein ve vodě při 20 °C a frikční koeficienty proteinů vztahovaných k dokonalé sférické částici.

**Tabulka 6.2** - Hodnoty sedimentačních koeficientů přepočítaných pro protein ve vodě při 20 °C a frikční koeficient proteinu vztahovaný k frikčnímu koeficientu dokonalé sférické částice.

Protein	$s_w$ (20,w)	frikční poměr (protein/sfér.)
14-3-3 $\gamma\Delta C$	3,753 S	1,411
CaMKK2 4P	3,137 S	1,426
CaMKK2 2P	3,134 S	1,426
CaMKK2 4P:14-3-3 $\gamma\Delta C$	5,912 S*	

\*Tato hodnota byla stanovena pro komplex 30 $\mu$ M CaMKK2 2P: 6 $\mu$ M 14-3-3  $\gamma\Delta C$ .

Dále se hodnoty sedimentačních koeficientů v Tabulce 6.2 použily pro upřesnění zdánlivé disociační konstanty pomocí metody globálního modelování. Hodnota zdánlivé disociační konstanty vypočítané z isotermy vytvořené po globálním modelování (Obrázek 6.29) se nalézá v nanomolární oblasti a byla odhadnuta na  $60 \pm 15$ .

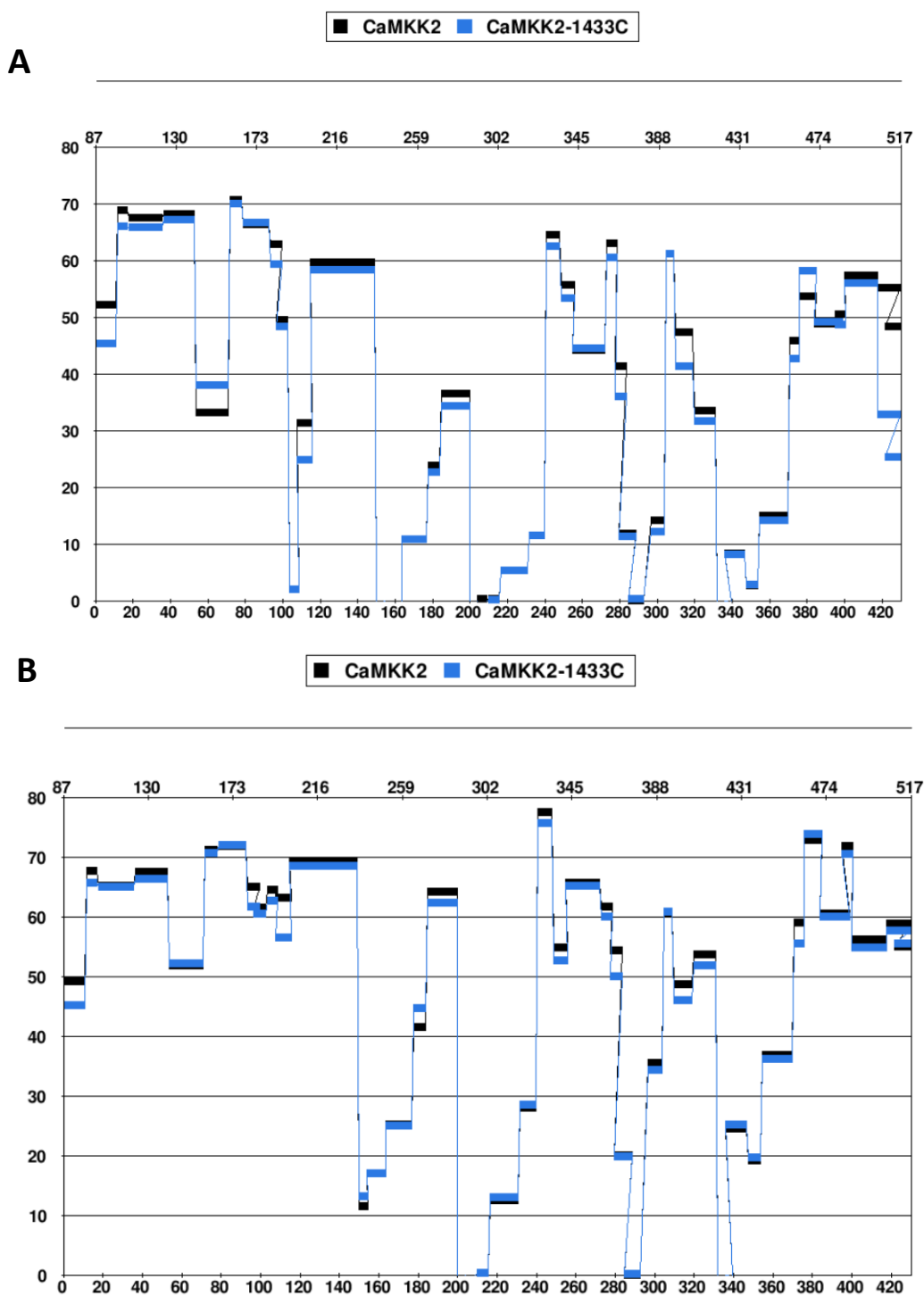


**Obrázek 6.29** - Izoterma vypočítaná ze série normalizovaných spojitéch distribucí komplexů 14-3-3 $\gamma\Delta C$ :CaMKK2 4P

### 6.4.5 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

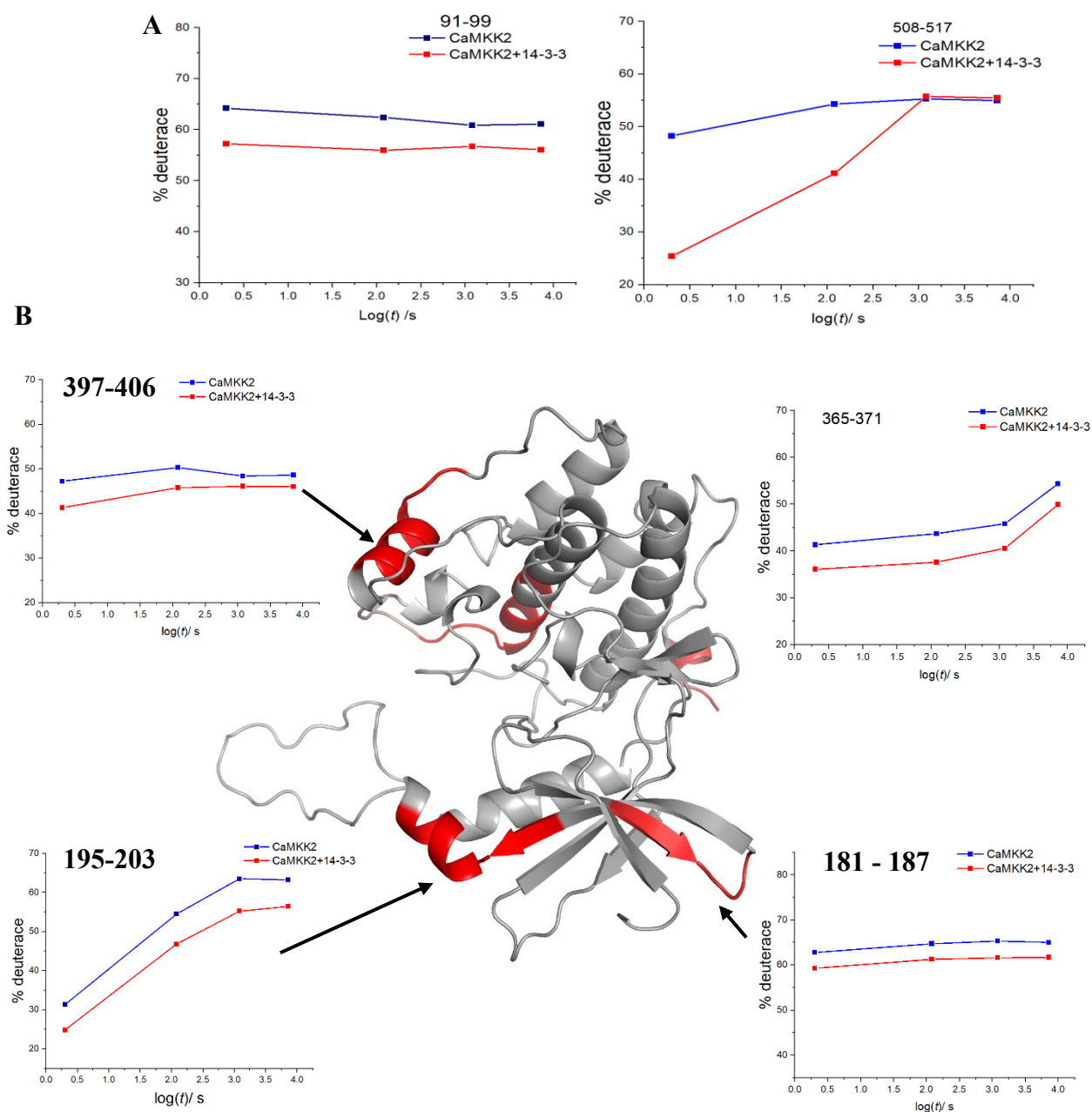
Profil deuterace by mohl napomocť otázky, která část proteinu CaMKK2 je ovlivněna vazbou proteinu 14-3-3 a jestli vazba nezpůsobuje strukturální změny. Vzorčky byly odebírány po triplicátech po 20 s, 2 min, 20 min a 2 h. Zprvu byl protein štěpen pepsinem, přičemž po štěpení zůstal peptid o délce 30 aminokyselin na C-konci, proto byl podruhé štěpen neprilysinem 2.

Pokrytí sekvence CaMKK2 jednotlivými peptidy lze vidět v Příloze 2. Obrázek 6.30 znázorňuje změnu deuterálního profilu CaMKK2 po 20 s a 2 hodinách.



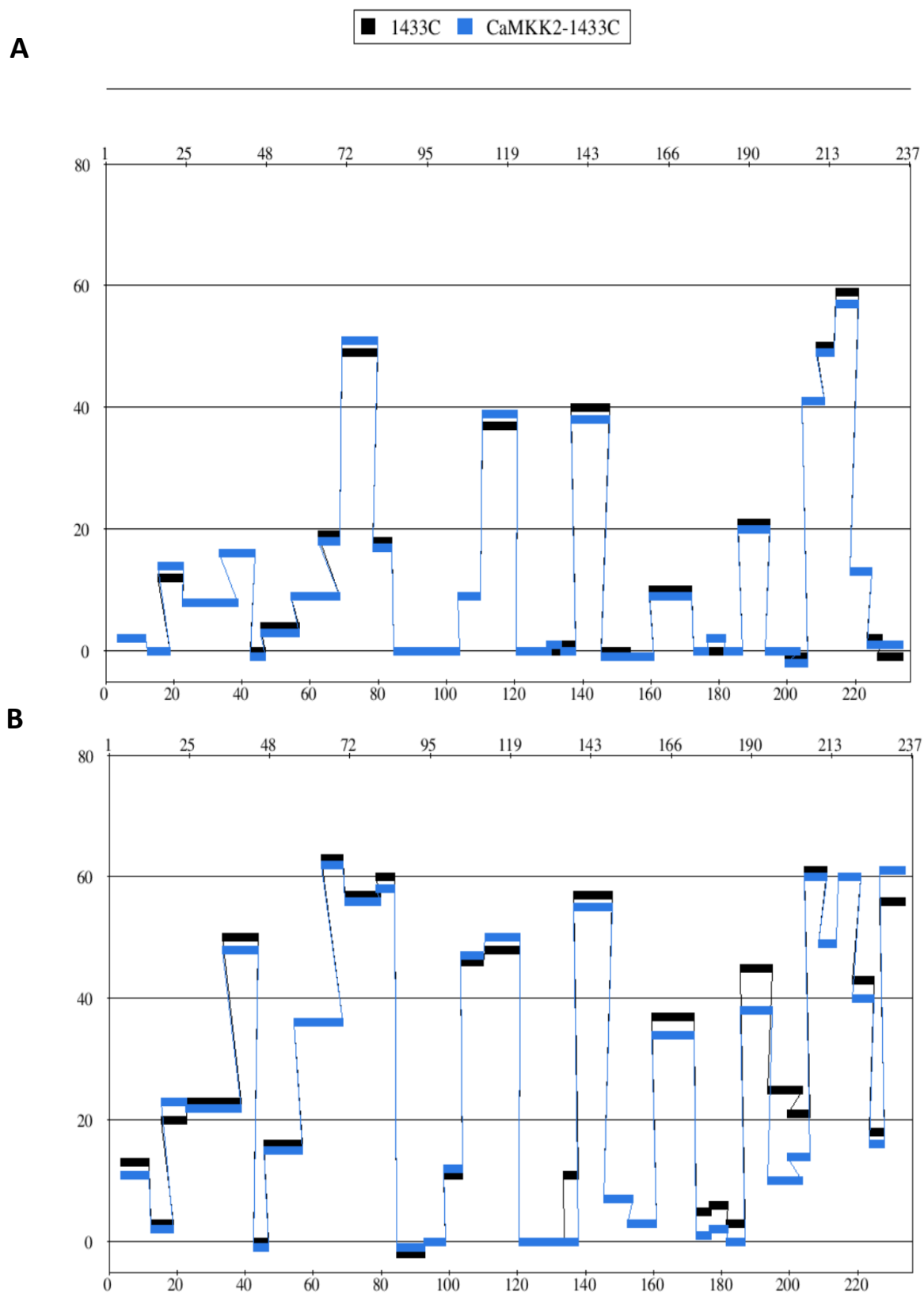
**Obrázek 6.30** - Profil deuterace CaMKK2 (černě) a CaMKK2:14-3-3 (modře) po 20 s a 2 hodinách. Horní osa x popisuje nativní číslování aminokyselin proteinu. Na ose y je vyneseno % deuterace. A - Profil deuterace po 20 s. B - profil deuterace po 2 hodinách.

K největší změně v profilu deuterace CaMKK2 D330A po vazbě s proteinem 14-3-3 $\gamma$ DC dochází na C-konci, kde se tvoří vazba s proteinem 14-3-3 (Obrázek 6.31 A). Další nezanedbatelné změny se nalézají v kinasové oblasti (Obrázek 6.31 B) na místech, kde byly také nalezené spojené peptidy CaMKK2 s proteinem 14-3-3 $\gamma$ DC a to konkrétně u peptidu 195-203, kde byl spojen K200, peptidu 365-371, který se nalézá v blízkosti K364 a v úseku 397-406, kde bylo nalezeno spojené reziduum S400. Také byla pozorována změna deuterace v peptidu obsahující T145 (137-154), který je důležitý pro regulaci aktivity CaMKK2 a 458-472, což je oblast těsně před autoinhibiční doménou, kde v oblasti 458-463 byla pozorována protekce (snížení deuterace o 3 %), ale v oblasti 463-472 deprotekcce (zvýšení deuterace o 4,5 % po 20 s).

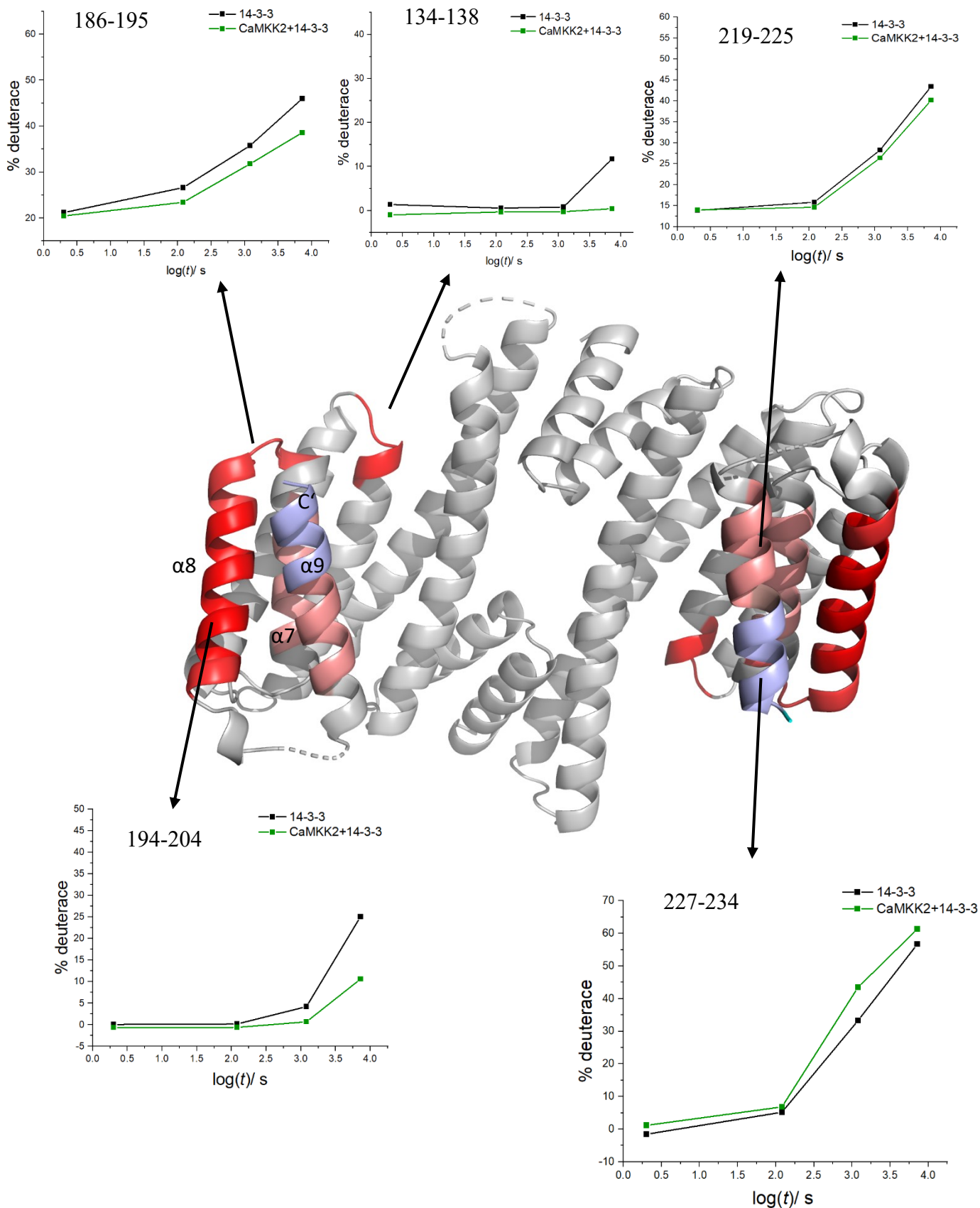


**Obrázek 6.31**– Kinetika deuterace CaMKK2. A – Největší změny deuterace probíhaly v místech vazby (peptid 91-99 a peptid 508-517). B – Mírná změna deuterace byla nalezená i v oblastech, kde byly nalezená spojená rezidua (K200, K364 a S400). Červeně jsou označeny oblasti, jejich rozdíl v deuteraci v čase 20 s činil 3-6,5 %.

Narozdíl od deuteričního profilu CaMKK2, u proteinu 14-3-3 nedochází během prvních 20 s k výrazné změně deuterace, avšak po 2 hodinách jsou vidět změny zejména v oblasti  $\alpha 8$  helixu (Obrázek 6.32 a 6.33 na straně 69).



**Obrázek 6.32** - Profil deuterace proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C (černě) a CaMKK2:14-3-3 (modře) po 20 s a 2 hodinách. Horní osa x popisuje nativní číslování aminokyselin proteinu. Na ose y je vyneseno % deuteriace. A - Profil deuteriace po 20 s. B – profil deuteriace po 2 hodinách.



**Obrázek 6.33** - Kinetika deuterační nejvíce ovlivněných peptidů proteinu 14-3-3 $\gamma$ ΔC. Nejvíce byl ovlivněn  $\alpha$ -helix 8. Červeně jsou označeny oblasti, kde po vazbě s CaMKK2 docházelo k protekci a rozdíl v deuterační po 2 hodinách činil 10-15%. Slabší červenou (např. oblast 186-195) jsou označena místa, kde docházelo po vazbě k protekci a přístup se snížil o 5-10%. Růžově jsou označena místa, kde přístup rozpouštědla byl snížen o 3-5%. Světle modře (oblast 227-234) je označena pro oblast, kde došlo k deprotekcii (zvýšení přístupu rozpouštědla) o 4,5 %.

### 6.4.6 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Pro zjištění strukturních parametrů komplexů byl použit maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS), který se řadí mezi strukturní metody s nízkým rozlišením. Výstupem této metody je naměřená závislost intenzity rozptýleného rentgenového záření na  $s$ . Z rozptylových dat lze získat hodnoty gyračního poloměru ( $R_g$ ), molekulové hmotnosti ( $M_w$ ), Porodův objem ( $V_p$ ) a maximální vzdálenost mezi atomy ( $D_{MAX}$ ). Jelikož je tato metoda velice citlivá na agregáty ve vzorku, je spojena s velikostně-vylučovací chromatografií, která odděluje agregáty od vzorků, tzv. SEC-SAXS.

Prvním krokem ve zpracování naměřených dat bylo vybrat oblasti „pufry“ a „vzorku“ v rámci elučního profilu v programu CHROMIXS (Obrázek 6.34 na straně 71), a následně byly vygenerovány rozptylové křivky (Obrázek 6.35 na straně 72). Poté byla zkontrolována kvalita dat pomocí Guinierova výnosu (Obrázek 6.36 na straně 73) a vypočítána molekulová hmotnost částic v programu PRIMUSQT (Tabulka 6.3). Následoval výpočet distribuce vzdáleností, tzv.  $P(r)$  funkce (Obrázek 6.38 na straně 74), z níž byl získán i parametr  $D_{MAX}$ . Kvalita získaných dat byla hodnocena na základě linearitu funkce při Guinierově výnosu a shodě vypočítané a očekávané molekulové hmotnosti. Poslední analyzovanou vlastností částic byla jejich flexibilita, která byla vyhodnocena z bezrozměrného Kratkyho výnosu rozptylových dat (Obrázek 6.37 na straně 73).

SAXS měření byla provedena pro konstrukt CaMKK2 T145A D330A S495A. Poměr pCaMKK2:14-3-3 byl 1:2, CaM:CaMKK2 1:1 a pCaMKK2:14-3-3:CaM 1:2:1. Koncentrace proteinů při vstupu na kolonu jsou uvedeny v Tabulce 6.3. Při separaci před vlastním SAXS měřením byla použita kolona Superdex® 200 Increase 5/150 GL, objem vzorku činil 100  $\mu$ l.

**Tabulka 6.3** - Získané strukturní parametry ze SAXS

Vzorek	$c$ (mg/ml)	$R_g^1$ [nm]	$I(0)^1$	$R_g^2$ [nm]	$I(0)^2$	$D_{MAX}$ (nm)	$V_p$ [nm <sup>3</sup> ]	Interval $M_w^3$ (kDa)	$M_w$ calc. (kDa)	$M_w$ exp (kDa)
14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C	6	2.8 $\pm$ 0.5	26270 $\pm$ 16	2.84 $\pm$ 0,01	26290 $\pm$ 13	8.39	76.1	49,3-53,7 (93.00%)	50,9	54,3
CaM	9,4	2.2 $\pm$ 0.2	10625 $\pm$ 9	2.22 $\pm$ 0.01	10680 $\pm$ 11	6.85	41.6	13,8-16,5 (94.83%)	14,8	16,8
CaMKK2	10,2	2.8 $\pm$ 0.3	12957 $\pm$ 20	2.94 $\pm$ 0.01	13060 $\pm$ 24	11	81.9	45,2-50,3 (95.07%)	47,7	48,0
CaMKK2:CaM	15,1	3.7 $\pm$ 0.1	36723 $\pm$ 37	3.76 $\pm$ 0,01	36930 $\pm$ 38	13.5	101	61,6-71,5 (91,89%)	65,5	64,8
pCaMKK2:14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C	26,3	3.6 $\pm$ 0.0	115051 $\pm$ 41	3.64 $\pm$ 0,01	115300 $\pm$ 45	13.1	152.8	92,7-106,9 (97,72%)	101,0	102,3
CaMKK2:14-3-3:CaM	23,5	4.3 $\pm$ 0.5	85627 $\pm$ 79	4.3 $\pm$ 0,01	85640 $\pm$ 66	15.5	216	111,3-127,5 (91,78%)	118,8	119,1

<sup>1</sup> Vypočítané hodnoty z Guinierova výnosu

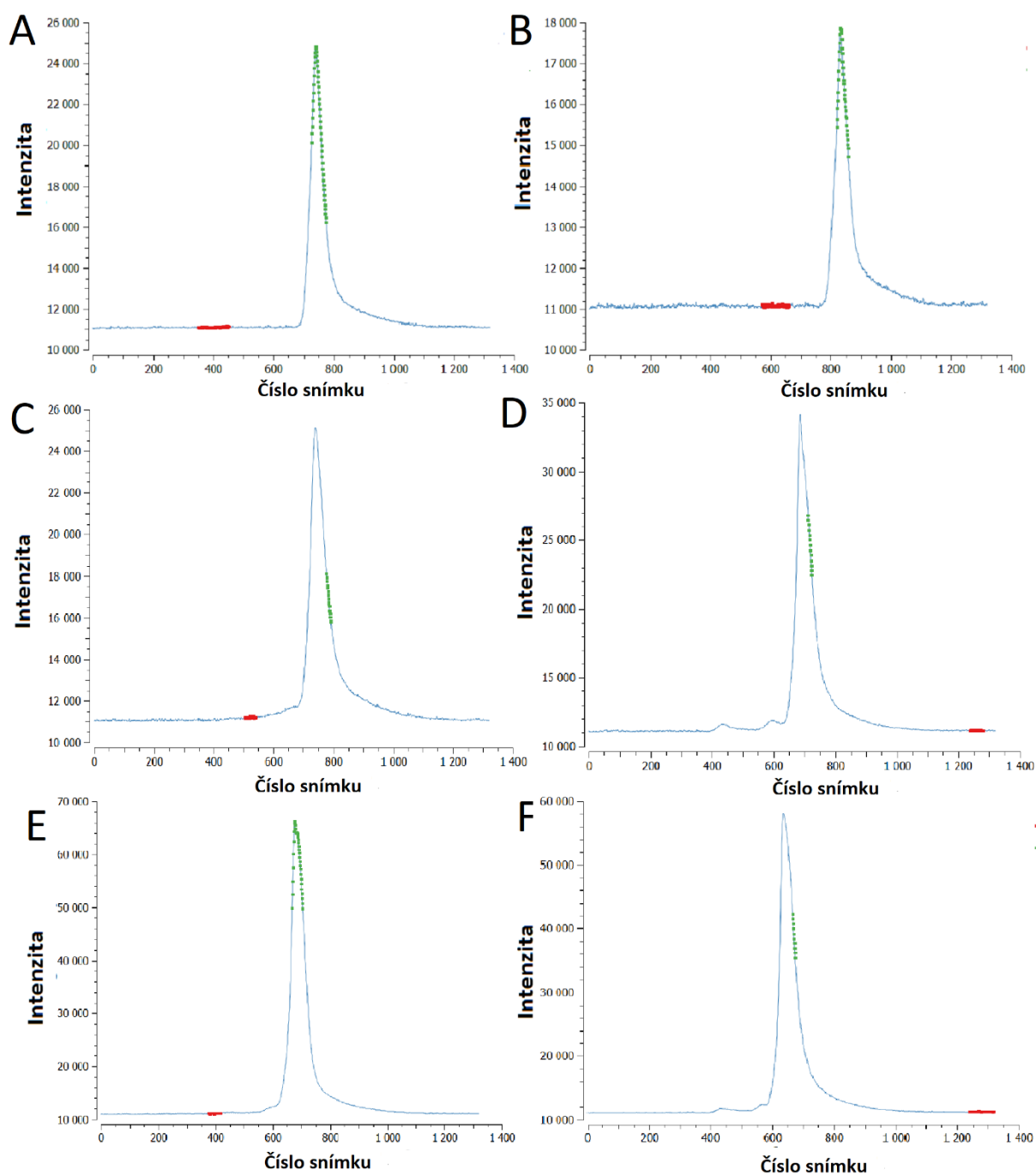
<sup>2</sup> Vypočítané hodnoty z  $P(r)$  funkce

<sup>3</sup> V závorce se udává pravděpodobnost  $M_w$  vzorku v daném intervalu

$M_w$  calc – Vypočítaná molekulová hmotnost dle Bayesovské statistiky

$M_w$  exp – Očekávaná molekulová hmotnost

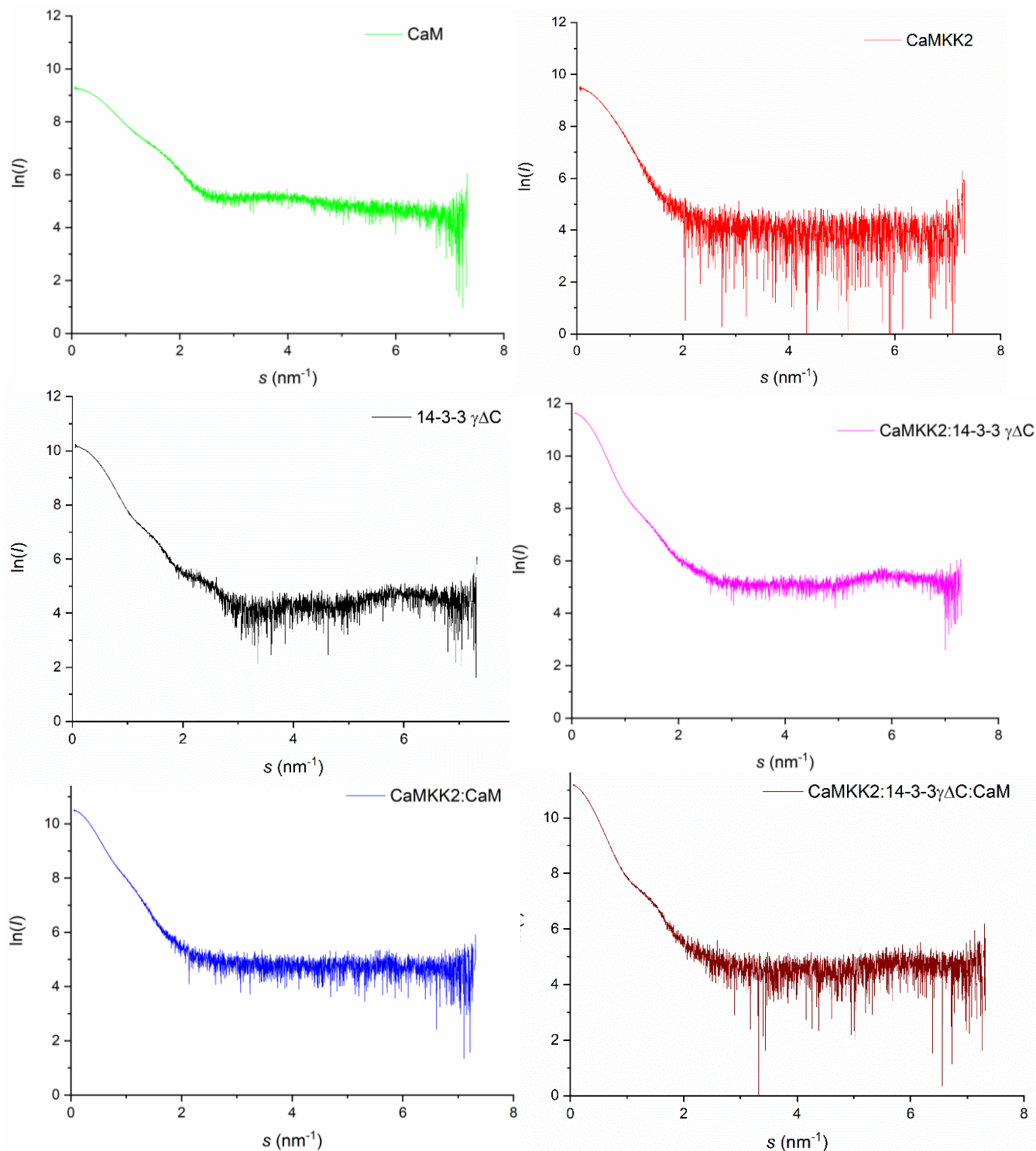
$c$  – koncentrace proteinu při vstupu na kolonu



**Obrázek 6.34** -Eluční profily jednotlivých vzorků. Červeně – vybraná oblast pufru. Zeleně – vybraná oblast vzorku pro analýzu. A – Eluční profil proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta C$ , B - CaM, C - CaMKK2, D - CaMKK2:CaM, E- CaMKK2:14-3-3  $\gamma\Delta C$ , F- CaMKK2:14-3-3  $\gamma\Delta C$ :CaM.

V elučních profilech lze vidět mírné množství agregátů, kromě elučního profilu proteinu 14-3-3 $\gamma C$  a CaM. Vzhledem k tomu, že SAXS je velice citlivá metoda na agregáty, byla vybrána pro analýzu pravá strana píků. Následně byly vygenerované jednotlivé rozptylové křivky.

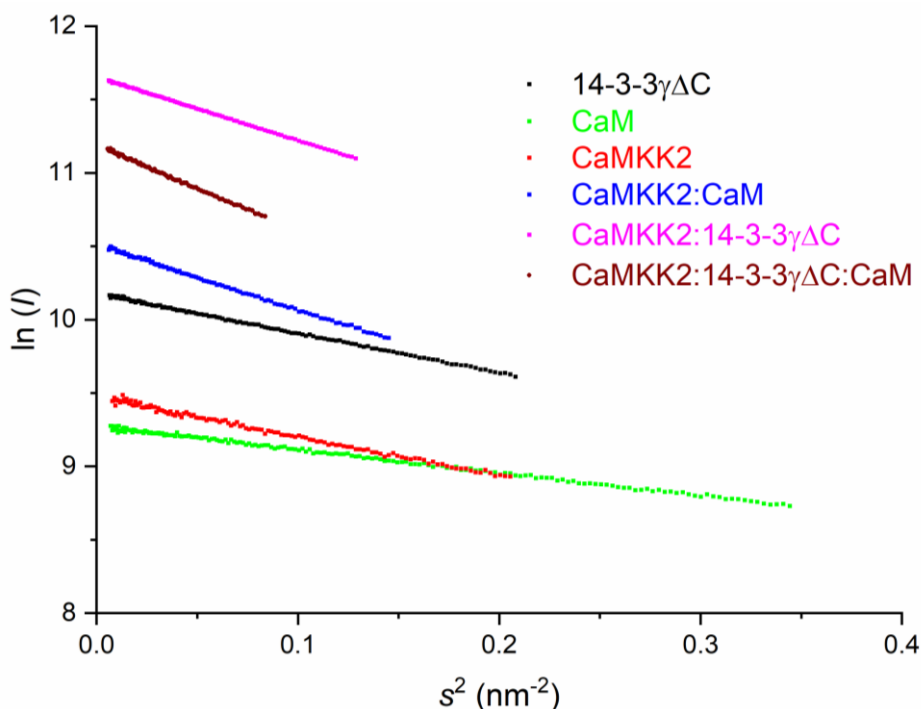




**Obrázek 6.35** - Vygenerované rozptylové křivky z vybraných částí elučních profilů.

Z Obrázku 6.35 lze pozorovat, že nejvyšší šum obsahuje vzelek CaMKK2, což je očekávané, vzhledem k vybrané oblasti s nízkou intenzitou, viz eluční profil na Obrázku 6.34C. Pro modelování byla použita pouze část křivky do oblasti  $2,5 \text{ nm}^{-1}$ , jelikož tato oblast nese informaci o tvaru molekuly a neobsahuje šum.

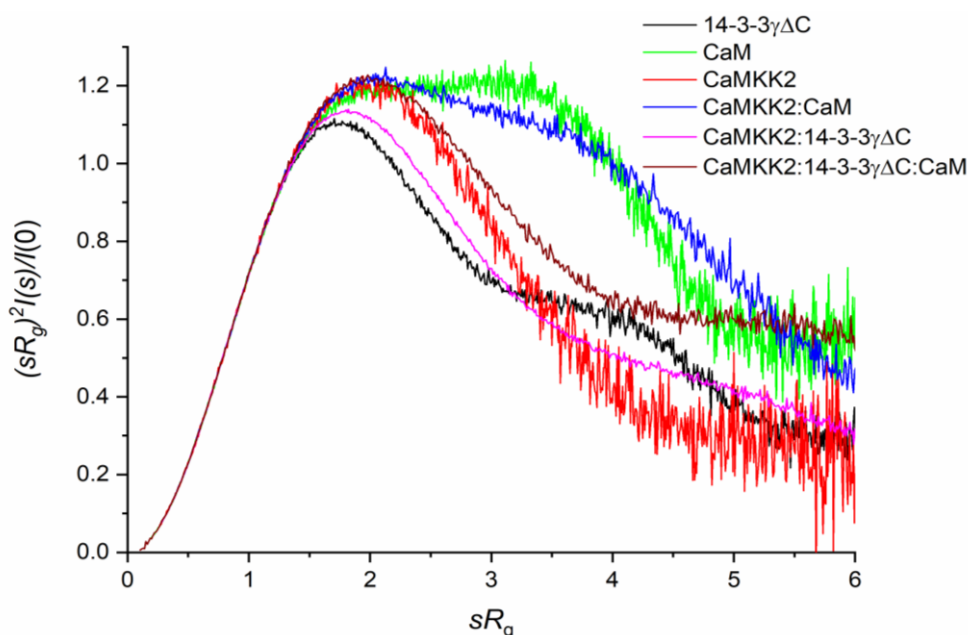




**Obrázek 6.36** - Guinierův výnos rozptylových dat. Linearita značí kvalitu dat.

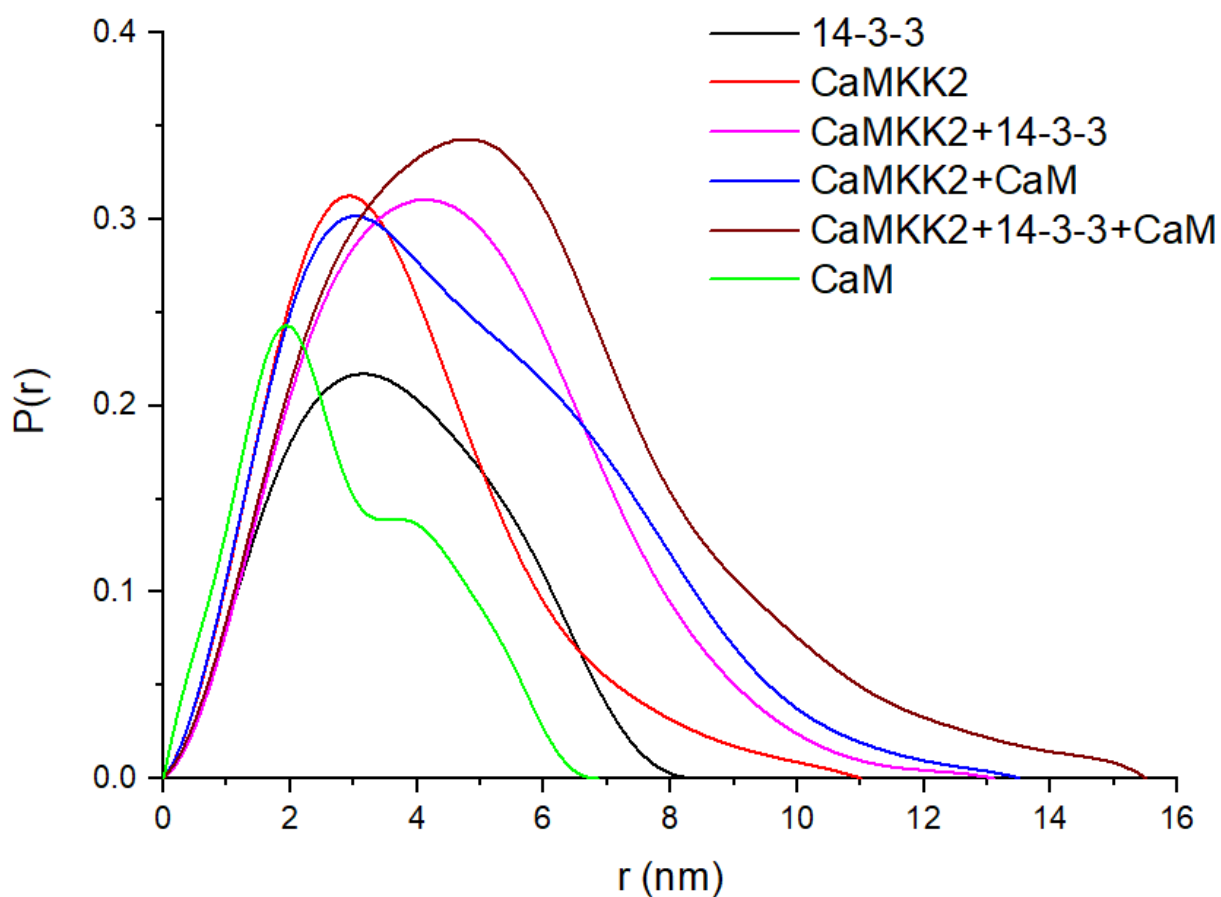
Linearita křivek ukazuje, že se jedná o kvalitní data. Rozsah křivek se zmenšuje s rostoucím  $R_g$ , jelikož lineární závislost při Guinierově výnosu platí v oblasti, kdy  $sR_g \ll 1$  pro globulární proteiny. Ze směrnice těchto přímk je vypočítán gyrační poloměr.

O flexibilitě systému vypovídá Kratkyho výnos (Obrázek 6.37). Pro rigidní globulární proteiny odpovídá hodnota  $sR_g$  pro maximum 1,73 a hodnota na ose y by měla být 1,1 [52]. Z Obrázku 6.37 je patrné, že zatímco je protein 14-3-3 rigidní (hodnota osy x v maximum proteinu 14-3-3 je 1,77 a na ose y 1,12), CaMKK2 je flexibilnější (posunutí vrcholu píku směrem k vyšším hodnotám  $sR_g$ ), ale při tvorbě komplexu CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C dochází ke snížení flexibility oproti volné CaMKK2.



**Obrázek 6.37** - Bezrozměrný Kratkyho výnos rozptylových dat.

Z rozptylové křivky je možné vypočítat tzv.  $P(r)$  funkci, jež popisuje distribuci vzdáleností elektronů v molekule (Obrázek 6.38).  $P(r)$  funkci lze následně využít pro rekonstrukci molekulové obálky (např. pomocí programu DAMMIN). Ačkoli má CaMKK2 nižší  $M_w$  v porovnání s dimerní formou proteinu 14-3-3, její  $D_{MAX}$  má vyšší hodnotu, což odráží její větší rozvolněnost, což je v souladu s Kratkyho výnosem.



**Obrázek 6.38** -  $P(r)$  funkce, která udává distribuci vzdáleností mezi elektrony v molekule.

#### 6.4.7 Strukturní modelování binárního komplexu

Pro tzv. „rigid-body“ modelování komplexu byla použita získaná data z maloúhlového rozptylu rentgenového záření a chemického zesíťení.

Pro výpočet byl použit program CORAL, kde výchozími daty byly: rozptylová křivka, data z chemického zesíťení a krystalové struktury jednotlivých proteinů. Pro komplex CaMKK2:14-3-3 bylo vytvořeno 65 počátečních pozic (lišících se vzájemnou orientací dimeru 14-3-3 a kinasové domény CaMKK2) a pro každou pozici bylo provedeno 10 výpočtů.

Na Obrázku 6.39 na straně 76 lze vidět dva nejlepší modely (s nejvyšší shodou s experimentálními SAXS daty) komplexu pCaMKK2:14-3-3 získané pomocí programu CORAL. Z modelů lze vidět, že komplex může zaujímat více konformací, které se liší orientací kinasové domény CaMKK2 vůči dimeru 14-3-3. Vzdálenosti mezi C $\alpha$  atomy vybraných residuí CaMKK2 a 14-3-3 z CORAL modelů, jsou uvedeny v Tabulce 6.4 na straně 76. Jak lze vidět z Obrázku 6.40, N- a C-koncové 14-3-3 vazebné motivy CaMKK2 byly ukotveny při modelování ve vazebných žlábkách proteinu 14-3-3. Flexibilní segmenty, které se nacházejí mezi kinasovou doménou a jednotlivými 14-3-3 vazebnými motivy jsou modelovány pomocí řetězce tzv. dummy reziduí. Každé dummy reziduum nahrazuje právě jednu aminokyselinu, která chybí v krystalové struktuře. Na Obrázku 6.40 na straně 77 je znázorněna superimpozice modelu komplexu s nejnižší hodnotou  $\chi^2$  (1,20) s molekulovou obálkou vypočítanou pomocí programu DAMMIN. Je zřejmé, že oba modely mají podobný tvar. Shoda CORAL modelu komplexu s daty získanými metodami chemického zesíťení a H/D výměny je znázorněna na Obrázku 6.41 na straně 78. Zobrazený model je konzistentní pouze se dvěma nalezenými chemickými propojeními (vzdálenost mezi příslušnými C $\alpha$  atomy je menší než 20 Å), třetí propojení vysvětluje druhý model s alternativní polohou kinasové domény (Obrázek 6.39B na straně 76). Model komplexu na Obrázku 6.41 na straně 78 je obarven dle výsledků H/D výměny. Oblasti, kde byla pozorována protekce (tedy nižší deuterace po vytvoření komplexu) jsou obarveny v případě proteinu 14-3-3 modře a v případě CaMKK2 červeně. Lze si všimnout, že oblasti s pozorovanou nižší deuterací se nacházejí v rámci či blízko predikovaného interakčního povrchu.

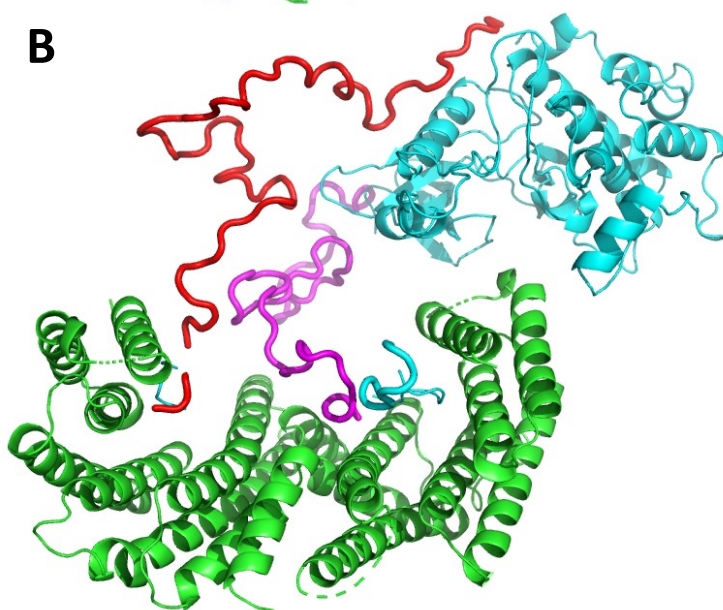
**Tabulka 6.4** - Vzdálenosti mezi  $C\alpha$  atomy vybraných residuí CaMKK2 a 14-3-3 z CORAL modelů s nejnižší hodnotou  $\chi^2$ . Vybraná residua jsou ty, které byly identifikovány v intermolekulárních propojeních v experimentech chemického zesítění. Vzdálenosti jsou uvedeny v Å. Tabulka uvádí pouze propojení mezi 14-3-3 a kinasovou doménou CaMKK2.

CaMKK2:14-3-3	CORAL model A	CORAL model B
$\chi^2$	1,20	1,42
K200 <sub>CaMKK2</sub> -T210 <sub>14-3-3</sub>	38,8	10,9
K200 <sub>CaMKK2</sub> -S215 <sub>14-3-3</sub>	34,9	11,4
K364 <sub>CaMKK2</sub> -S215 <sub>14-3-3</sub>	12,3	37,4
S400 <sub>CaMKK2</sub> -S215 <sub>14-3-3</sub>	13,5	33,1

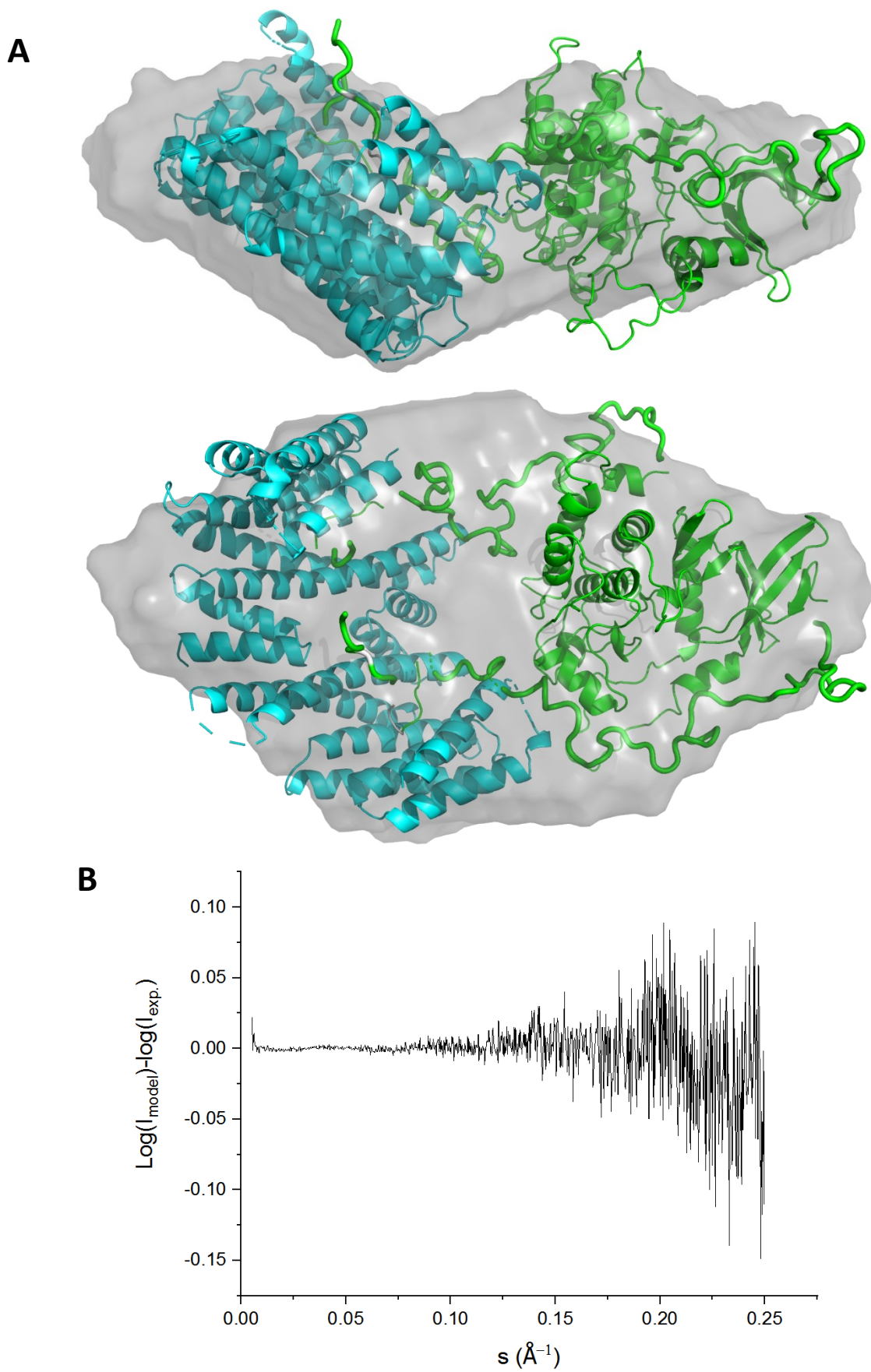
**A**



**B**



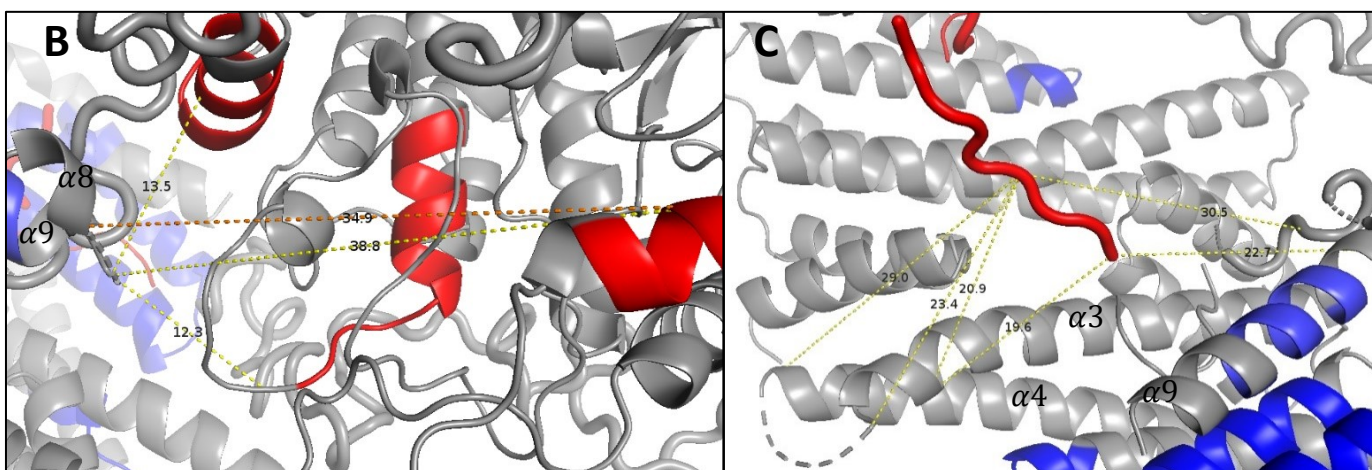
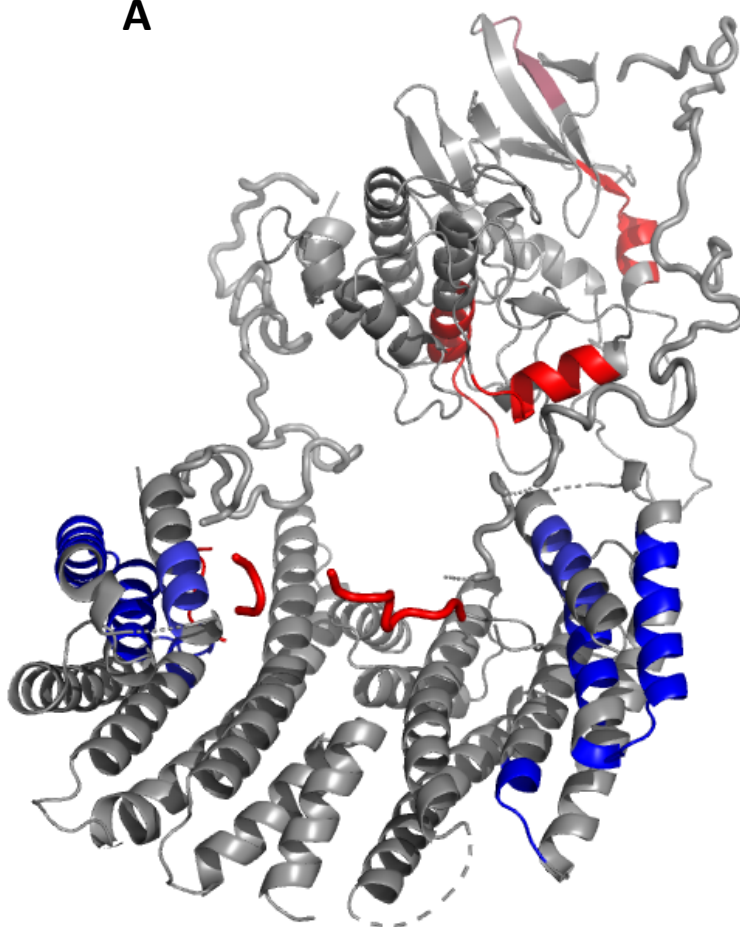
**Obrázek 6.39** - Vypočítané modely komplexu CaMKK2:14-3-3. Zeleně je označen protein 14-3-3 $\gamma$ Δc ve formě dimeru, modře kinasová doména CaMKK2, červeně C-koncový flexibilní úsek modelovaný pomocí dummy residuí a fialově je označen N-konec.



**Obrázek 6.40** - A - Model komplexu CaMKK2 vytvořený v programu CORAL (Obrázek 6.40 A).  $\chi^2 = 1.4222$ . Modře je zobrazen protein 14-3-3 $\gamma$ DC v dimerní formě (6FEL). Zeleně je zobrazena CaMKK2 vytvořená pomocí homologního modelování s domodelovanými flexibilními segmenty. Model je vložen do vypočítané molekulové obálky pomocí programu SUPCOMB. B – Rozdíl vypočítaných intenzit modelu od naměřených v logaritmické škále v závislosti na rozptylovém vektoru.



**A**



**Obrázek 6.41** – Model komplexu CaMKK2:14-3-3 z Obrázku 6.40A. A – Červeně jsou znázorněny změny při H/D výměně na CaMKK2, modře na proteinu 14-3-3. B – Žlutě je znázorněno spojení mezi Ca - Ca K200<sub>CaMKK2</sub>-T210<sub>14-3-3</sub>, oranžově mezi K200-S215, kde je vzdálenost 42,5 Å, mezi K364-S215 je vzdálenost 17,7 Å a mezi S400-S215 je vzdálenost 13,2 Å. C - Žlutě jsou znázorněny Ca- Ca vzdálenosti mezi aminokyselinami, jež byly spojeny během chemického zesílení na N - konci CaMKK2. Spojené aminokyseliny CaMKK2-14-3-3 jsou vzdáleny od sebe: S92-S215 30,5 Å, S95 od S215 je vzdálen 22,7 Å, S92 od S64 je vzdálen 20,9 Å, S95 od S64 je vzdálen 19,6 Å a S92 od K78 je vzdálen 29 Å a S92 - K69 je 23,4 Å.

## 7. Diskuze

Základní stavební jednotkou těla je buňka a pro její správný vývoj a její správnou funkci je potřebná přísná regulace jednotlivých komponent, které se v ní nalézají a mezi které patří i vápenaté kationty. Pro udržování stabilní hladiny vápenatých kationtů slouží různé kanály, které jsou ovlivněny buď napětím (např. L-, N-kanál), přítomností ligandu (např. inositoltrifosfátový receptor), či přítomností konkrétních iontů (Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> kanál) [5].

Při zvýšení koncentrace intracelulárních vápenatých kationtů dochází k aktivaci kalmodulinu a tím je aktivována kalmodulin-dependentní signální dráha, jejíž součástí je i Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní kinasa kinasa 2, zkráceně CaMKK2. Při aktivaci CaMKK2 kalmodulinem dochází k odklonění autoinhibičního segmentu od aktivního místa a k autofosforylaci na T85 a T482, v důsledku čehož se zvýší její aktivita. Dále se signál přenesse na její substráty CaMKI, CaMKIV a AMPK prostřednictvím fosforylace, která způsobuje jejich aktivaci. AMPK je následně zodpovědná za regulaci energie v buňce a funkce CaMK jsou spojovány s růstem axonů. Dysfunkce jednotlivých komponent v této signální dráze je spojena například s bipolární poruchou, schizofrenií či ztrátou citlivosti na inzulin, což vede k obezitě [24, 25, 53]. Studie naznačily, že by CaMKK2 mohla sloužit jako molekulární přepínač mezi signální dráhou CaMKK2/CaMK a CaMKK2/AMPK. Tento závěr podporuje zejména skutečnost, že k aktivaci AMPK není vyžadována přítomnost kalmodulinu, nýbrž postačuje pouze autonomní aktivita CaMKK2 [16], a dále pro aktivaci CaMK musí být přítomná oblast bohatá na argininy a proliny (RP), která tyto substráty rozpoznává. Avšak přesný mechanismus regulace není doposud znám.

Jak už bylo zmíněno, CaMKK2 se za normálních okolností vyskytuje v buňce v inhibovaném stavu, který je způsobený autoinhibiční doménou. Při navázání kalmodulinu se autoinhibovaný segment odkloní a kinasa se stává aktivní. Aby nedocházelo k předčasné aktivaci CaMKK2, autoinhibiční stav by mohl být stabilizován proteinem 14-3-3, vzhledem k přítomnosti dvou 14-3-3 vazebných motivů na N-konci a C-konci. Vazebný motiv na C-konci se nalézá těsně za kalmodulin-vazebným místem a vazebný motiv na N-konci se nalézá před první regulační oblastí. Aby se protein 14-3-3 mohl navázat, musí být ve vazebném místě přítomný fosforylovaný serin či threonin. Tato místa jsou obvykle fosforylována cAMP-dependentní proteinkinásou A (PKA) a jsou nestrukturovaná [29].

V CaMKK2 se nalézají celkem čtyři aminokyseliny fosforylované PKA, jimiž jsou S100, T145, S495 a S511, z nichž S100 a S511 zprostředkovávají vazbu s proteinem 14-3-3. T145 je také fosforylován AMPK, což má za následek potlačení autonomní aktivity, což způsobí aktivitu CaMKK2 závislou pouze na kalmodulinu [23]. Bylo naznačeno, že fosforylovaný S495 brání ve vazbě kalmodulinu [21]. Jak bylo v této práci dokázáno *in vitro*, protein 14-3-3 opravdu brání v defosforylaci S495 a tím brání předčasné aktivaci CaMKK2 (Obrázek 6.21 na straně 58 a Obrázek 6.23 na straně 60). Stejně výsledky byly potvrzeny a publikovány v roce 2020 [22].

Abychom pochopili úplnou roli proteinu 14-3-3 při regulaci CaMKK2, je zapotřebí znát stavbu komplexu. Jelikož kvůli velikosti systému nelze využít metody jako jsou NMR a kryo-EM, je nejlepším způsobem, jak charakterizovat komplex, proteinová krystalografie. Avšak hledání optimálních podmínek je časově náročné a není ani zajištěn úspěch krystalizace, proto byl v této práci komplex zkoumán pomocí metody analytické ultracentrifugace, malouhlového rozptylu rentgenového záření, vodík-deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií a chemickým zesílením spojeným s hmotnostní spektrometrií.

Pro studium komplexů bylo zapotřebí připravit proteiny CaMKK2 D330A, CaMKK2 T145A D330A S495A, kalmodulin a protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Proteiny byly exprimovány v *E. coli* a byly purifikovány pomocí hydrofobní interakční chromatografie, aniontově-výměnné chromatografie, niklové chelatační chromatografie a velikostně-vylučovací chromatografie. Při purifikaci CaMKK2 D330A docházelo k vyšší degradaci na C-konci, proto byly experimenty provedeny s oběma konstrukty. Následně u proteinu CaMKK2 D330A došlo k optimalizaci fosforylačního protokolu pro čtyři místa, která jsou fosforylovaná PKA. Zajímavé je, že množství PKA potřebné pro fosforylaci čtyř míst je menší než pro fosforylaci dvou míst, S100 a S511. Tento efekt je možné vysvětlit tím, že by se S495 fosforyloval dříve a vlivem fosfátové skupiny by došlo k mírné strukturní změně a zlepšení přístupnosti pro S511.

Pomocí AUC bylo zjištěno, že oba tyto konstrukty mají skoro stejný sedimentační koeficient a stejný frikční koeficient (Tabulka 6.2 na straně 65), tudíž fosforylovaný T145 a S495 neovlivňují výrazně terciární strukturu.

Dále pomocí této metody byla zjištěna mírná dimerizace CaMKK2 při vyšších koncentracích (Obrázek 6.26 na straně 63), avšak při přidání kalmodulinu tento efekt nebyl pozorován (Obrázek 6.27, strana 64). Posledním experimentem byla zjištěna zdánlivá disociační konstanta komplexu CaMKK2 4P:14-3-3 $\gamma\Delta$ C s hodnotou  $K_D = 60 \pm 15$  nM (Obrázek 6.29 na straně 65).

Chemické zesílení poskytlo informaci o aminokyselinách, které jsou si prostorově nejbližší. Všechny propojené aminokyseliny jsou uvedeny v Tabulce 6.1 na straně 62. Výsledkem byla nalezená spojení mezi N-koncem CaMKK2 se třemi aminokyselinami proteinu 14-3-3 a jednou oblastí proteinu 14-3-3 spojenou se třemi aminokyselinami CaMKK2 (Obrázek 6.41 na straně 78 CORAL modelu). Tím byla získána přibližná orientace proteinů vůči sobě.

Pomocí H/D výměny bylo zjišťováno, jaké oblasti CaMKK2 jsou ovlivněny vazbou proteinu 14-3-3. Největší změny byly dle očekávání zjištěny v oblasti vazebných míst. Přestože se vazebné místo S100 fosforyluje *in vitro* lépe, největší změna v deuteraci byla pozorována v oblasti obsahující vazebné místo S511. Tento jev může být vysvětlen tím, že zatímco oblast obsahující S511 představuje klasický 14-3-3 vazebný motiv, S100 je součástí atypického 14-3-3 vazebného motivu. Dále H/D výměna v souladu s daty z chemického zesílení ukázala mírné změny deuterace v oblastech, kde byly nalezeny propojené aminokyseliny a to zejména v oblasti  $\alpha$ -helixu 8 a  $\alpha$ -helixu 9 proteinu 14-3-3 a v oblasti  $\beta$ 5,  $\alpha$ B,  $\alpha$ F,  $\alpha$ G CaMKK2. Výsledky jsou vizualizovány na stranách 66 a 68.



Poslední metodou pro zjištění tvaru komplexu byl maloúhlový rozptyl rentgenového záření. Strukturní parametry získané touto metodou jsou uvedeny v Tabulce 6.3 na straně 70. Na základě těchto dat byla vypočítána filtrovaná molekulová obálka pro komplex pCaMKK2:14-3-3. Za využití programu CORAL a již vyřešených struktur CaMKK2 (PDB: 5UY6, 6CMJ) a proteinu 14-3-3 (PDB: 6EWW, 6FEL) byly vypočítány modely pomocí tzv. „rigid-body“ modelováním. Dva modely s nejnižším  $\chi^2$ , které byly v souladu s nalezenými peptidovými spojeními vypovídají o dvou možných konformacích vytvořeného komplexu pCaMKK2:14-3-3. Model s nejvyšší shodou byl následně vložen do vypočítané molekulové obálky (Obrázek 6.39 a Obrázek 6.40 na straně 76 a 77).

Jak lze z modelu pozorovat, N-konec a C-konec CaMKK2 je ukotven ve žlábkách tvořených dimerem proteinu 14-3-3. Vzdálenosti mezi aminokyselinami odpovídající nalezeným spojeným peptidům jsou v předkládaném modelu v některých případech větší, než bychom předpokládali vzhledem k použitému zesíťovacímu činidlu. Tento jev lze vysvětlit částečnou flexibilitou systému, která již byla naznačena získanými parametry z Kratkyho výnosu (Obrázek 6.37 na straně 73). Jelikož se nabízí více orientací kinasové domény vůči proteinu 14-3-3 a nebyl pozorován výrazný efekt protekce RP domény při H/D výměně, lze vyloučit možnost, že by protein 14-3-3 stericly bránil tuto doménu a tím by byl preferován signál CaMKK2/AMPK.

Na druhou stranu, ze SAXS měření vyplývá, že ačkoli kinasová doména CaMKK2 může být díky N- a C-flexibilním segmentům vzdálena od proteinu 14-3-3, preferuje být v jeho bezprostřední blízkosti. Toto tvrzení také podporují jak data z H/D výměny, tak vytvoření intermolekulárních spojených peptidů při experimentu chemického zesílení. Vazba proteinu 14-3-3 tak může pravděpodobně vyvolávat menší konformační změny v kinasové doméně.

Navzdory absenci struktury komplexu CaMKK2:14-3-3 o vysokém rozlišení se v této práci podařilo za využití integračního přístupu získat model tohoto komplexu. Tento model byl vytvořen kombinací biofyzikálních metod a strukturních metod s nízkým rozlišením následovanou „rigid-body“ modelováním. Pro zjištění detailů interakce CaMKK2 a proteinu 14-3-3 a vyvození funkčních důsledků by bylo zapotřebí získat strukturu komplexu s vysokým rozlišením (např. proteinovou krystalografií) a zároveň podpořit tvrzení *in vivo* experimenty.

Protein CaMKK2 je dobré studovat, jelikož by regulace tohoto proteinu mohla ovlivnit přístup k léčení obezity a cukrovky 2. typu. K tomu by mohlo napomoci také studium komplexu CaMKK2:14-3-3, v němž protein 14-3-3 s jistotou udržuje CaMKK2 v inhibovaném stavu v důsledku protekce fosforylovaného serinu 495 před defosforylací. V dnešní době už jsou studovány inhibitory této kinas, mezi které patří i inhibitor STO-609, a dále jsou studovány ligandy, které stabilizují komplex CaMKK2:14-3-3, mezi které patří Fusicocciny [54]. Dále by bylo dobré studovat mechanismus preference přenosu signálu z CaMKK2 na CaMK nebo AMPK. Stále existuje příliš mnoho nezodpovězených otázek týkajících se CaMKK2, ale málo odpovědí.

## 8. Závěr

- Byly připraveny lidské Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní proteinkinasy kinasy 2 (oblast 93-517), obsahující mutace T145A D330A S495A a mutaci D330A o dostatečné čistotě a v dostatečném miligramovém množství.
- Pomocí Phos-tag SDS-PAGE a LC-MS analýzy byl optimalizován fosforylační protokol pro CaMKK2 D330A.
- Bylo připraveno miligramové množství kalmodulinu a proteinu 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C (oblast 1-234) s dostatečnou čistotou.
- Pomocí analytické ultracentrifugace byla stanovena zdánlivá disociační konstanta mezi fosforylovanou CaMKK2 D330A a proteinem 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C.
- Proteiny a komplexy byly analyzovány pomocí metod malouhlového rozptylu rentgenového záření spojeného s velikostně-vylučovací chromatografií, chemického zesíťení a vodík-deuteriové výměny.
- Získaná data byla použita pro vytvoření „rigid-body“ modelu komplexu CaMKK2:14-3-3 pomocí počítačového modelování.
- Získané výsledky ukazují, že CaMKK2 fosforylovaná na S100 a S511 a protein 14-3-3 vytvářejí kompaktní komplex, ve kterém jsou oba dva fosfomotivy CaMKK2 navázány do vazebných žlábků obou protomerů proteinu 14-3-3, přičemž kinasová doména CaMKK2 se nachází v těsné blízkosti povrchu proteinu 14-3-3. To naznačuje, že interakce s proteinem 14-3-3 může nejen chránit CaMKK2 před defosforylací, ale také může indukovat strukturní změny v katalytické doméně CaMKK2.

## 9. Reference

- [1] MURRAY, Robert K., ed. *Harper's illustrated biochemistry*. 26. ed. New York, NY: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003. A Lange medical book. ISBN 978-0-07-138901-3.
- [2] RUBENSTEIN, Eric M. a Martin C. SCHMIDT. Mechanisms Regulating the Protein Kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* [online]. 2007, **6**(4), 571–583. ISSN 1535-9778, 1535-9786. Dostupné z: doi:10.1128/EC.00026-07
- [3] JAGODZIK, Przemysław, Małgorzata TAJDEL-ZIELINSKA, Agata CIESLA, Małgorzata MARCZAK a Agnieszka LUDWIKOW. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2018, **9**, 1387. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.01387
- [4] Human Protein Kinases Overview. *Cell Signaling Technology* [online]. [vid. 2021-03-06]. Dostupné z: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/human-protein-kinases-overview>
- [5] CLAPHAM, David E. Calcium Signaling. *Cell* [online]. 2007, **131**(6), 1047–1058. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- [6] CATTERALL, William A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> 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
- [7] GIFFORD, Jessica L., Michael P. WALSH a Hans J. VOGEL. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal* [online]. 2007, **405**(2), 199–221. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20070255
- [8] BLUMOVÁ, Barbora. VÝZNAM SIGNALIZACÍ REGULOVANÝCH VÁPENATÝMI IONTY V PROGRESI NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ. Bakalářská práce, 2014, 38.
- [9] TIDOW, Henning a Poul NISSEN. Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *FEBS Journal* [online]. 2013, **280**(21), 5551–5565. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.12296
- [10] *PyMOL* | [pymol.org](http://pymol.org) [online]. [vid. 2021-03-06]. Dostupné z: <https://pymol.org/2/>
- [11] 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
- [12] BERCHTOLD, Martin W. a Antonio VILLALOBO. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2014, **1843**(2), 398–435. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.021
- [13] TAKEMOTO-KIMURA, Sayaka, Kanzo SUZUKI, Shin-ichiro HORIGANE, Satoshi KAMIJO, Masatoshi INOUE, Masayuki SAKAMOTO, Hajime FUJII a Haruhiko BITO.

- Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2017, **141**(6), 808–818. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1111/jnc.14020
- [14] FUJIWARA, Yuya, Yoshinori KAWAGUCHI, Tomohito FUJIMOTO, Naoki KANAYAMA, Masaki MAGARI a Hiroshi TOKUMITSU. Differential AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Recognition Mechanism of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2016, **291**(26), 13802–13808. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M116.727867
- [15] ICHIMURA, Tohru, Masato TAOKA, Yasukazu HOZUMI, Kaoru GOTO a Hiroshi TOKUMITSU. 14-3-3 Proteins directly regulate Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\alpha$  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
- [16] RACIOPPI, Luigi a Anthony R MEANS. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2: Roles in Signaling and Pathophysiology. 2012, **287**(38), 9.
- [17] HSU, Li-Sung, Gen-Der CHEN, Liang-Shong LEE, Chin-Wen CHI, Jan-Fang CHENG a Jeou-Yuan CHEN. Human Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase  $\beta$  Gene Encodes Multiple Isoforms That Display Distinct Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(33), 31113–31123. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M011720200
- [18] O'BRIEN, Matthew T. Impact of Genetic Variation on Human CaMKK2 Regulation by Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin and Multisite Phosphorylation. *Scientific Reports*. 2017, 11.
- [19] HANKS, Steven K a Tony HUNTER. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, 1995, 21.
- [20] GREEN, Michelle F., John W. SCOTT, Rohan STEEL, Jonathan S. OAKHILL, Bruce E. KEMP a Anthony R. MEANS. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase  $\beta$  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
- [21] 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
- [22] LANGENDORF, Christopher G., Matthew T. O'BRIEN, Kevin R. W. NGOEI, Luke M. MCALOON, Urmi DHAGAT, Ashfaqu HOQUE, Naomi X. Y. LING, Toby A. DITE, Sandra GALIC, Kim LOH, Michael W. PARKER, Jonathan S. OAKHILL, Bruce E. KEMP a John W. SCOTT. CaMKK2 is inactivated by cAMP-PKA signaling and 14-3-3 adaptor proteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2020, **295**(48), 16239–16250. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA120.013756
- [23] TAKABATAKE, Shota, Yusei FUKUMOTO, Satomi OHTSUKA, Naoki KANAYAMA, Masaki MAGARI, Hiroyuki SAKAGAMI, Naoya HATANNO a Hiroshi TOKUMITSU. Phosphorylation and dephosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase

- kinase  $\beta$  at Thr144 in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2020, **525**(1), 251–257. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.02.056
- [24] MARCELO, Kathrina L., Thomas RIBAR, Christopher R. MEANS, Anna TSIMELZON, Robert D. STEVENS, Olga ILKAYEVA, James R. BAIN, Susan G. HILSENBECK, Christopher B. NEWGARD, Anthony R. MEANS a Brian YORK. Research Resource: Roles for Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase 2 (CaMKK2) in Systems Metabolism. *Molecular Endocrinology* [online]. 2016, **30**(5), 557–572. ISSN 0888-8809, 1944-9917. Dostupné z: doi:10.1210/me.2016-1021
- [25] WILLIAMS, Justin N. a Uma SANKAR. CaMKK2 Signaling in Metabolism and Skeletal Disease: a New Axis with Therapeutic Potential. *Current Osteoporosis Reports* [online]. 2019, **17**(4), 169–177. ISSN 1544-1873, 1544-2241. Dostupné z: doi:10.1007/s11914-019-00518-w
- [26] SABBIR, Mohammad Golam. Loss of Ca<sup>2+</sup>/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**, 99. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2018.00099
- [27] SABBIR, Mohammad Golam. CAMKK2-CAMK4 signaling regulates transferrin trafficking, turnover, and iron homeostasis. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2020, **18**(1), 80. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/s12964-020-00575-0
- [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] 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
- [30] 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
- [31] 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
- [32] GANGULY, S., J. L. WELLER, A. HO, P. CHEMINEAU, B. MALPAUX a D. C. KLEIN. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences* [online]. 2005, **102**(4), 1222–1227. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0406871102
- [33] 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
- [34] DYČKOVÁ, Michaela. Srovnání produkce rekombinantních proteinů v klasickém a autoindukčním mediu. Bakalářská práce, 2012, 48.
- [35] *ACD/ChemSketch for Academic and Personal Use :: ACD/Labs.com* [online]. [vid. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- [36] *Příprava lidské Ca<sup>2+</sup>/kaldmodulin-dependentní proteinkinasy kinasy 2 fosforylované na Ser100 a Ser511* [online]. [vid. 2021-03-13]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/207451/>
- [37] IRENA NĚMCOVÁ A KOL. *Spektrometrické analytické metody II*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-586-8.
- [38] 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
- [39] COLE, James L., Jeffrey W. LARY, Thomas P. MOODY a Thomas M. LAUE. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. In: *Methods in Cell Biology* [online]. B.m.: Elsevier, 2008 [vid. 2021-03-14], s. 143–179. ISBN 978-0-12-372520-2. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(07)84006-4
- [40] MIKULŮ, Martina. *Studium struktury komplexů proteinu 14-3-3 s CaMKK1 a CaMKK1:Ca<sup>2+</sup>/CaM*. Diplomová práce, 2020
- [41] *Downloads - Sednterp* [online]. [vid. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Downloads>
- [42] 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>
- [43] *MBR Software* [online]. [vid. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>
- [44] PETOUKHOV, Maxim V. a Dmitri I. SVERGUN. Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2013, **45**(2), 429–437. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2012.10.017
- [45] BROSEY, Chris A a John A TAINER. Evolving SAXS versatility: solution X-ray scattering for macromolecular architecture, functional landscapes, and integrative structural biology. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2019, **58**, 197–213. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2019.04.004

- [46] SKOU, Soren, Richard E GILLILAN a Nozomi ANDO. Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nature Protocols* [online]. 2014, **9**(7), 1727–1739. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2014.116
- [47] PANJKOVICH, Alejandro a Dmitri I SVERGUN. CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small-angle X-ray scattering data. *Bioinformatics* [online]. 2018, **34**(11), 1944–1946. ISSN 1367-4803, 1460-2059. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btx846
- [48] KONAREV, Petr V., Vladimir V. VOLKOV, Anna V. SOKOLOVA, Michel H. J. KOCH a Dmitri I. SVERGUN. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* [online]. 2003, **36**(5), 1277–1282. ISSN 0021-8898. Dostupné z: doi:10.1107/S0021889803012779
- [49] *ATSAS online - BioSAXS group - EMBL Hamburg* [online]. [vid. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online/>
- [50] PETOUKHOV, Maxim V., Daniel FRANKE, Alexander V. SHKUMATOV, Giancarlo TRIA, Alexey G. KIKHNEY, Michal GAJDA, Christian GORBA, Haydyn D. T. MERTENS, Petr V. KONAREV a Dmitri I. SVERGUN. New developments in the *ATSAS* program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* [online]. 2012, **45**(2), 342–350. ISSN 0021-8898. Dostupné z: doi:10.1107/S0021889812007662
- [51] BHUSAN, Kuntal Kumar. *kuntal-bhusan/BioinforMatikz* [online]. 2020 [vid. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://github.com/kuntal-bhusan/BioinforMatikz>
- [52] *Kratky analysis — BioXTAS RAW 2.1.1 documentation* [online]. [vid. 2021-06-15]. Dostupné z: [https://bioxtas-raw.readthedocs.io/en/latest/tutorial/s1\\_kratky.html](https://bioxtas-raw.readthedocs.io/en/latest/tutorial/s1_kratky.html)
- [53] SCOTT, John W. Autophosphorylation of CaMKK2 generates autonomous activity that is disrupted by a T85S mutation linked to anxiety and bipolar disorder. *Scientific Reports*. 2015, 10. DOI: 10.1038/srep14436
- [54] LENTINI SANTO, Domenico, Olivia PETRVALSKA, Veronika OBSILOVA, Christian OTTMANN a Tomas OBSIL. Stabilization of Protein–Protein Interactions between CaMKK2 and 14–3–3 by Fusicoccins. *ACS Chemical Biology* [online]. 2020, **15**(11), 3060–3071. ISSN 1554-8929, 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/acscchembio.0c00821
- [55] KAVAN, Daniel a Petr MAN. MStools—Web based application for visualization and presentation of HXMS data. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2011, **302**(1–3), 53–58. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2010.07.030



## 10. Přílohy


**Příloha 1 - Sekvence lidské proteinkinasy CaMKK2. Zeleně jsou označeny místa fosforylované cAMP-dependentní proteinkinásou A.**

```

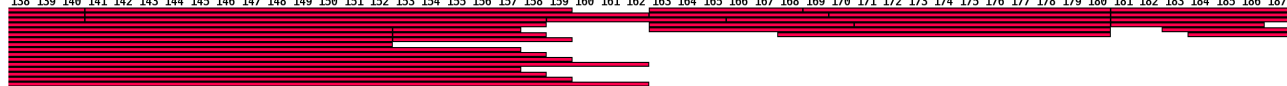
cacctctccggtcgcaagctgtctctgcaagagcgggtcccagggtgggctggcagccggt
 93 H L S G R K L S L Q E R S Q G G L A A G 112
ggcagcctggacatgaacggacgctgcatctgcccgtccctgcccactcaccgcgcagc
113 G S L D M N G R C I C P S L P Y S P V S 132
tccccgcagtcctcgccctcggtgccccggcgccgacagtggagtctcaccacgtctcc
133 S P Q S S P R L P R R P T V E S H H V S 152
atcacgggtatgcaggactgtgtgcagctgaatcagtataccctgaaggatgaaattgga
153 I T G M Q D C V Q L N Q Y T L K D E I G 172
aagggctcctatgggtgtcgtcaagttggcctacaatgaaaatgacaatacctactatgca
173 K G S Y G V V K L A Y N E N D N T Y Y A 192
atgaaggtgctgtccaaaaagaagctgatccggcaggccggctttccacgtgcacctca
193 M K V L S K K K L I R Q A G F P R R P P 212
ccccgaggcaccggccagctcctggaggctgcatccagcccaggggccccattgagcag
213 P R G T R P A P G G C I Q P R G P I E Q 232
gtgtaccaggaaattgccatcctcaagaagctggaccaccccaatgtggtgaagctggtg
233 V Y Q E I A I L K K L D H P N V V K L V 252
gaggtcctggatgaccccaatgaggaccatctgtacatgggtgttcgaactggtcaaccaa
253 E V L D D P N E D H L Y M V F E L V N Q 272
gggcccgtgatggaagtgccaccctcaaaccactctctgaagaccaggcccgtttctac
273 G P V M E V P T L K P L S E D Q A R F Y 292
ttccaggatctgatcaaagcatcgagtacttacactaccagaagatcatccaccgtgac
293 F Q D L I K G I E Y L H Y Q K I I H R D 312
atcaaaccttccaacctcctggctcggagaagatgggcacatcaagatcgctgacctttggt
313 I K P S N L L V G E D G H I K I A D F G 332
gtgagcaatgaattcaagggcagtgacgcgctcctctccaacaccgtgggcacgcccgcc
333 V S N E F K G S D A L L S N T V G T P A 352
ttcatggcacccgagtcgctctctgagaccgcgaagatcttctctgggaaggccttgat
353 F M A P E S L S E T R K I F S G K A L D 372
gtttgggccatgggtgtgacactatactgctttgtctttggccagtgccattcatggac
373 V W A M G V T L Y C F V F G Q C P F M D 392
gagcggatcatgtgtttacacagtaagatcaagagtcaggccctggaatttccagaccag
393 E R I M C L H S K I K S Q A L E F P D Q 412
cccgacatagctgaggacttgaaggacctgatcaccctgatgctggacaagaaccccgag
413 P D I A E D L K D L I T R M L D K N P E 432
tcgaggatcgtggtgccggaatcaagctgcaccctgggtcacgaggcatggggcggag
423 S R I V V P E I K L H P W V T R H G A E 452
ccgttgccgtcggaggatgagaactgcacgctggctcgaagtgactgaagaggaggtcgag
453 P L P S E D E N C T L V E V T E E E V E 472
aactcagtcaaacacattcccagcttggcaaccgtgatcctggtgaagaccatgatacgt
473 N S V K H I P S L A T V I L V K T M I R 492
aaacgctcctttgggaaccattcgagggcagccggcgggaggaacgctcactgtcagcg
493 K R S F G N P F E G S R R E E R S L S A 512
cctggaaacttgctc
513 P G N L L
```

**Příloha 2- Pokrytí sekvence CaMKK2 D330A vytvořenými peptidy při štěpení NEP2 pro H/D výměnu. Vytvořeno online v programu Draw Map [55].**


G A M G S H L S G R K L S L Q E R S Q G G L A A G G S L D M N G R C T C P S L P Y S P V S S P O S S  
88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137



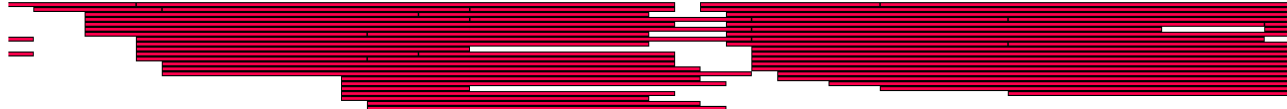
P R L P R R P T V E S H H V S I T G M Q D C V Q L N Q Y T L K D E I G K G S Y G V V K L A Y N E N D  
138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187




N T Y Y A M K V L S K K K L I R Q A G F P R R P P P R G T R P A P G G C I Q P R G P I E Q V Y Q E I  
188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237



A I L K K L D H P N V V K L V E V L D D P N E D H L Y M V F E L V N Q G P V M E V P T L K P L S E D  
238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287



Q A R F Y F Q D L I K G I E Y L H Y Q K I I H R D I K P S N L L V G E D G H I K I A A F G V S N E F  
288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337




K G S D A L L S N T V G T P A F M A P E S L S E T R K K I F S G K A L D V W A M G V T L Y C F V F G Q  
338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387



C P F M D E R I M C L H S K I K S Q A L E F P D Q P D I A E D L K D L I T R M L D K N P E S R I V V  
388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437



P E I K L H P W V T R H G A E P L P S E D E N C T L V E V T E E E V E N S V K H I P S L A T V T L V  
438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487



K T M I R K R S F G N P F E G S R R E E R S L S A P G N L L  
488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517

