

3052

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Diplomová práce



**Využití lanthanoidové luminiscenční
spektroskopie ke studiu vazby dvojmocných
kationtů na 14-3-3 proteiny**

Bc. Pavla Strnadová

Školitel: **Doc. RNDr. Tomáš Obšil, PhD.**

Garant: **Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.**

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Tomáše Obšila, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne 5. května 2008

Pavla Strnadová

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. za odborné rady a velkou trpělivost. Stejně tak i celému kolektivu Fyziologického ústavu Akademie Věd ČR v Krči za přátelský kolektiv a laboratorní zázemí. Zvláště bych chtěla jmenovat kolegyni Bc. Lucii Kohoutovou, se kterou jsem spolupracovala při mnohých pokusech, a RNDr. Jana Šilhána, jemuž vděčím za velmi cenné praktické rady.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mě podporovali v celém mém studiu a byli mi vždy velkou oporou.

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretická část	7
2.1. Proč 14-3-3 a proč tak mnoho isoform?	7
2.1.2. Struktura 14-3-3 proteinů	9
2.1.3. Funkce 14-3-3 proteinů	11
2.2.1. Význam iontů kovů	14
2.2.2. Interakce iontů kovů s proteiny	14
2.2.3. Vazba iontů kovů na 14-3-3 proteiny	17
2.3.1. Lanthanoidová luminiscenční spektroskopie	20
2.3.2. Tb ³⁺ – isomorfní luminiscenční analog Ca ²⁺ , Mg ²⁺	21
2.3.3. Försterův rezonanční přenos energie	22
2.3.4. Využití lanthanoidové luminiscenční spektroskopie ke zjištění vazebných míst dvojmocných kationtů na 14-3-3 proteinech	24
3. Cíle práce	27
4. Praktická část	28
4.1. Materiál a přístroje	28
4.1.1. Použité chemikálie	28
4.1.2. Laboratorní přístroje	29
4.1.3. Ostatní použité materiály	29
4.2. Metody	31
4.2.1. Expresce 14-3-3 proteinů	31
4.2.2. Sklizení buněk	32
4.2.3. Sonikace buněk	32
4.2.4. Chelatační chromatografie	33
4.2.5. SDS elektroforéza	34

4.2.6. Dialýza	35
4.2.7. Aniontová chromatografie	36
4.2.8. Měření koncentrace proteinu	37
4.2.9. Thrombinové štěpení	37
4.2.10. Koncentrování proteinu	38
4.2.11. Gelová permeační chromatografie	38
4.2.12. Dialýza pro odstranění EDTA	39
4.2.13. Zjištění vazebných míst titrací Tb ³⁺	39
4.2.14. Vytěsnění iontů terbia - vazba dvojmocných kationtů	40
4.2.15. Vazba bis-ANS na 14-3-3A – detekce konformační změny	41
4.3. Výsledky	42
4.3.1. Exprese 14-3-3 proteinů	42
4.3.2. Chelatační chromatografie	42
4.3.3. Aniontová chromatografie	44
4.3.4. Měření koncentrace	47
4.3.5. Thrombinové štěpení	48
4.3.6. Gelová permeační chromatografie	48
4.3.7. Zjištění vazebných míst titrací Tb ³⁺	51
4.3.8. Vytěsnění iontů terbia-vazba dvojmocných kationtů	53
4.3.9. Vazba bis-ANS na 14-3-3A – detekce konformační změny	57
5. <i>Diskuze</i>	59
6. <i>Závěr</i>	63
7. <i>Použitá literatura</i>	64
Seznam zkratk	68

1. Úvod

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem vazby iontů kovů na 14-3-3 proteiny. Samotný název této proteinové rodiny je velice svérázný a neoznačuje ani žádnou šifru ani jednoduchou početní úlohu.

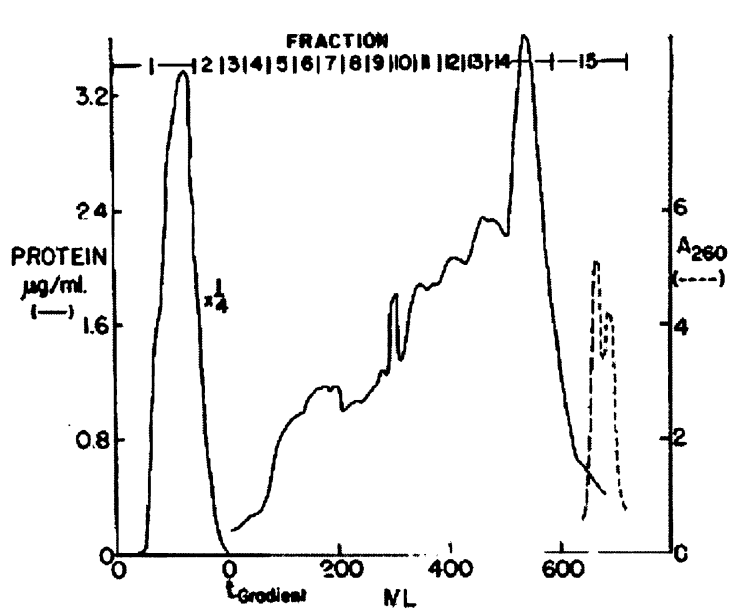
I přes dlouholetý výzkum 14-3-3 proteinů ještě stále nejsou plně objasněny všechny jejich funkce, vlastnosti ani mechanismus vlivu na jejich vazebné partnery. 14-3-3 proteiny interagují a ovlivňují funkci stovek dalších proteinů, čímž patří mezi klíčové regulační bílkoviny eukaryotických buněk od kvasinek až po člověka.

Význam této rodiny proteinů je velice zásadní. S postupným objevováním dalších a dalších rysů jsou tyto proteiny spojovány s chorobami, které stojí v popředí vědeckého „bádání“, k nimž patří například rakovina, poruchy metabolismu, různé neurodegenerativní choroby, jako Alzheimerova a Parkinsonova choroba nebo Creutzfeldtova-Jakobova nemoc. To staví tyto proteiny do ústředního zájmu mnoha laboratoří a firem, díky jejichž výzkumu se dostáváme v poznávání této rodiny proteinů stále dál.

2. Teoretická část

2.1. Proč 14-3-3 a proč tak mnoho isoformem?

Za originální název vděčí tato rodina proteinů panu Moorovi a Perezovi, kteří již v roce 1967 při analýze proteinů mozkové tkáně různých druhů živočichů (krysa, králík, skot) objevili skupinu malých (cca 30 kDa) kyselých proteinů [1]. Číselné označení vyplývá z píku na chromatogramu z DEAE-celulosity (viz obrázek č.1) a z jejich migrační pozice po následné analýze frakcí při škrobové elektroforéze. Při tomto pokusu se objevila i další označení proteinů, jako například 15-4-1, 4-4-2. Avšak pro 14-3-3 proteiny se toto označení stalo jejich názvem [2].



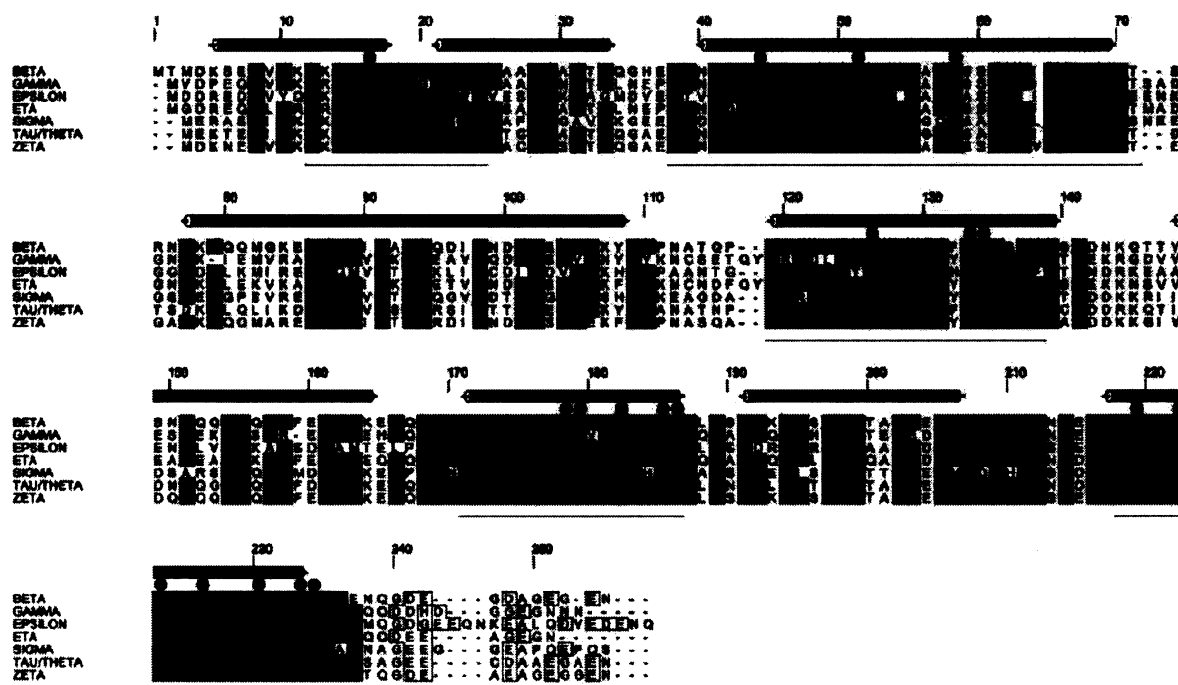
Obr. č. 1 – Chromatogram DEAE-celulosity z r. 1965 [3].

Od této doby uplynulo již hodně času a tyto proteiny se dostaly do popředí vědeckého zájmu. Po dalším studování se zjistilo, že se vyskytují téměř u všech eukaryotických organizmů, zatímco u prokaryotických organizmů o nich není zmínka [4]. Dosud byly nalezeny u savců, hmyzu, rostlin, kvasinek, ryb a obojživelníků, a vždy jsou přítomny v několika isoformách [5]. Mnoho z jejich vlastností již bylo odhaleno, ale stále je zde nezodpovězená otázka, proč všechny

výše zmiňované organizmy exprimují relativně vysoký počet velmi podobných isoformem.

Lidských isoformem bylo dosud identifikováno 7, jsou označovány písmeny řecké abecedy β , γ , ϵ , σ , τ , ζ , η . Nejvíce se vyskytují v mozku, kde tvoří až 1% všech rozpustných proteinů [7,11]. V rostlinné říši je tento počet proměnlivější. Nejlépe je pravděpodobně prostudován výskyt 14-3-3 u huseníčka rolního, *Arabidopsis thaliana*, který má 15 genů pro 14-3-3 proteiny, zatím však bylo exprimováno pouze 12 isoformem [6]. Tyto isoformy se označují GF14 ϵ , ι , κ , λ , μ , ν , \omicron , π , Φ , χ , ψ , ω , kde písmena GF vycházejí z anglického termínu *General Factor* [7]. Kvasinky jsou obdařeny pouze dvěma isoformami, které se označují BMH1, BMH2. Tyto isoformy se shodují v 93% aminokyselinové sekvence [8].

Zajímavým faktem je velmi vysoká míra sekvenční konzervovanosti všech isoformem, převážně v oblastech důležitých pro tvorbu dimeru, stabilizaci terciární struktury a ve vazebném místě (viz kapitola 2.1.2), a to nejen mezi sebou v rámci jednoho organismu, ale i napříč různými druhy. Míra sekvenční shody je vidět na obr. č 2.

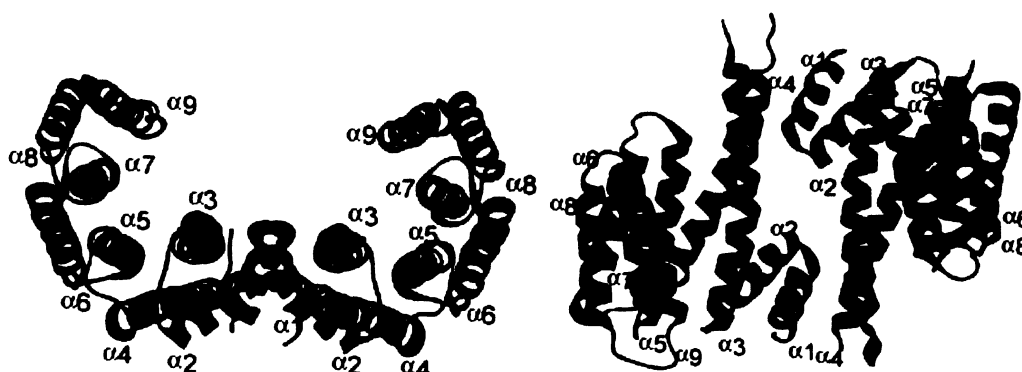


Obr. č. 2 – Sekvenční srovnání lidských isoformem 14-3-3 proteinů [10]. Stejné aminokyseliny jsou na obrázku podbarveny tmavě a ty, které tvoří α -helixy mají nad sebou příslušný symbol.

Vysoký počet exprimovaných isoformů (nejedná se o tzv. splicing varianty, jsou to samostatné geny umístěné na různých chromozomech) naznačuje, že jednotlivé isoformy by mohly specificky interagovat pouze s určitými ligandy. Tato tzv. isoformová vazebná specifita je stále předmětem živé diskuse a pro řadu vazebných partnerů již byla prokázána. Mechanismus isoformové vazebné specifity je však stále nejasný, protože aminokyseliny, které se podílejí na vazbě ligandů, patří mezi nejvíce konzervované [9].

2.1.2. Struktura 14-3-3 proteinů

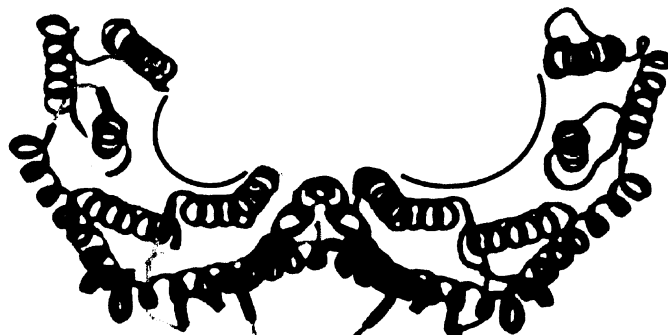
Molekuly 14-3-3 proteinů, jejichž velikost je 28-33 kDa, tvoří homo-, nebo hetero- dimery. Každý monomer se skládá z 9 antiparalelních α -helixů oddělených krátkými ohyby (loopy). Čtyři N-terminální α -helixy tvoří vazebné rozhraní dimeru s centrálním otvorem, jak je patrné z obr. č. 3 [11,20].



Obr. č. 3 – Krystalová struktura lidské isoformy 14-3-3 σ [12]. Tato isoforma tvoří homodimer. Jednotlivé monomery mají vyznačeny α -helixy a jsou označeny červeně a modře.

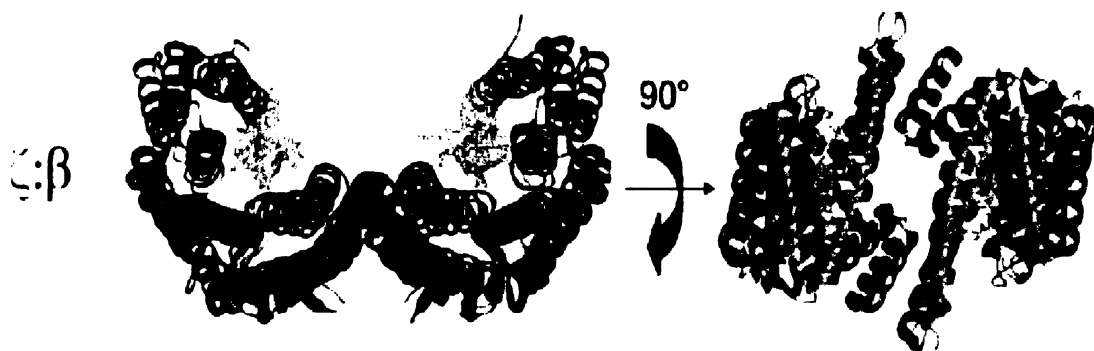
Různé typy isoformů preferují tvorbu homodimerů, jak je tomu v případě lidské isoformy 14-3-3 σ a γ , a jiné zase heterodimerů (dimer dvou různých isoformů), těm dávají přednost např. lidská isoforma ϵ , kvasinkové isoformy BMH1 a BMH2 [13,17].

Každý monomer obsahuje amfifilní žlábek, který představuje vazebné místo pro ligand. Změna ve struktuře po navázání ligandu je uvedena na obr. č. 4. V dnešní době je známo již přes 200 vazebných partnerů této rodiny [11,14]. Každý dimer také může interagovat se dvěma vazebnými partnery současně [11].



Obr. č. 4 – Krystalová struktura 14-3-3 apo- β isoformy [15]. Naznačená struktura vazebného žlábků (černá čára), který se může individuálně měnit podle vazby ligandu.

Nejvariabilnější částí molekuly je bezpochyby C-terminální konec, který chybí ve všech krystalových strukturách 14-3-3 proteinů (díky vysoké flexibilitě není pozorovatelný pomocí difrakce), a o jehož funkci se hodně spekuluje. Jednou z teorií je, že v nepřítomnosti ligandu se může nacházet ve vazebném místě a tak působit jako autoinhibitor [16]. Na obrázku č. 5 je porovnání krystalových struktur vybraných lidských isoform s navázaným ligandem.



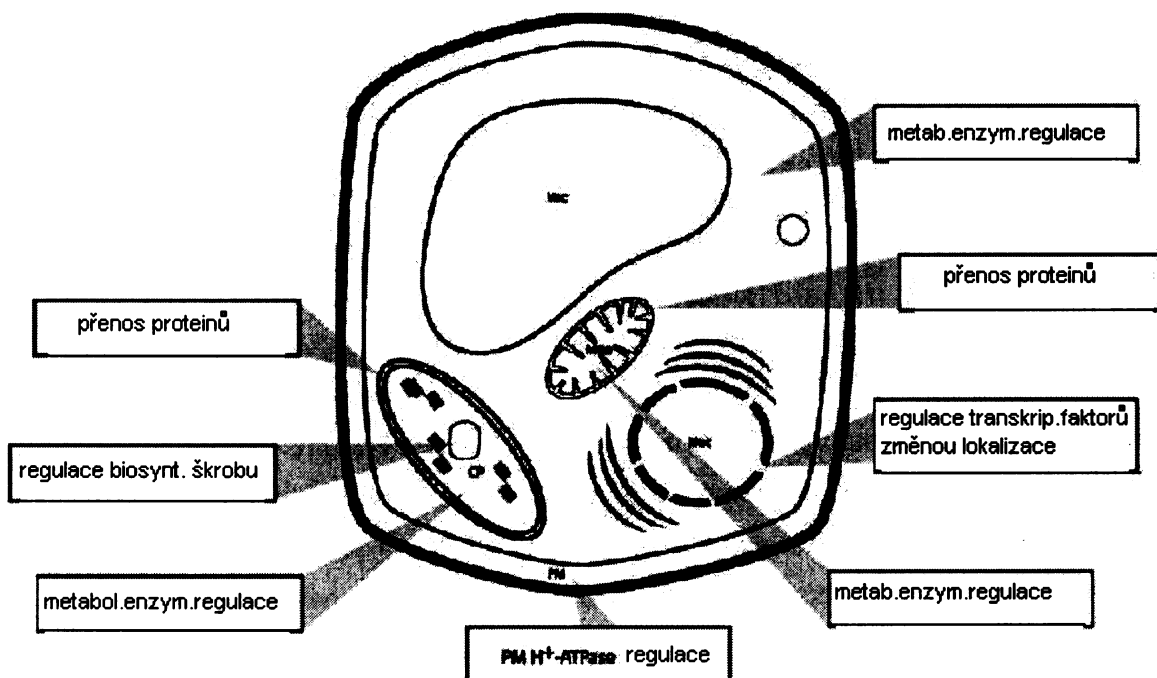
Obr. č. 5 – Porovnání krystalových struktur lidských isoform 14-3-3 ζ a 14-3-3 β s navázanými peptidy [17]. Zeleně je vyznačena isoforma 14-3-3 ζ , fialově isoforma 14-3-3 β a žlutě pak navázaný peptid.

Objevil se i názor, že C-terminální konec by mohl částečně formovat desátý α -helix, převážně s kyselým profilem, což bylo ověřeno teoretickou predikcí i pomocí CD-spektroskopie [18].

Určité isoformy se také vyskytují ve fosforylované podobě. Jedná se konkrétně o posttranslační *in vivo* modifikaci isoformem 14-3-3 β a ζ . Místem fosforylace je Ser¹⁸⁵ a zodpovědná je za to JNK kinasa, která reaguje na motiv Ser-Pro-X-Lys. Poměr fosforylované formy k nefosforylované je v mozku 1:1 a na dimer molekuly 14-3-3 proteinu se vyskytuje jedna molekula fosfátu [19].

2.1.3. Funkce 14-3-3 proteinů

Díky vysokému počtu vazebných partnerů 14-3-3 proteiny ovlivňují téměř všechny procesy a děje v buňce. Kontrolují buněčný cyklus, růst, diferenciaci, transkripci, apoptózu a jsou nedílnou součástí signálních drah [14]. Není tedy divu, že se v buňce vyskytují snad na všech místech (viz obr. č. 6) [25].



Obr. č. 6 - Lokalizace 14-3-3 proteinů v buňce [25].

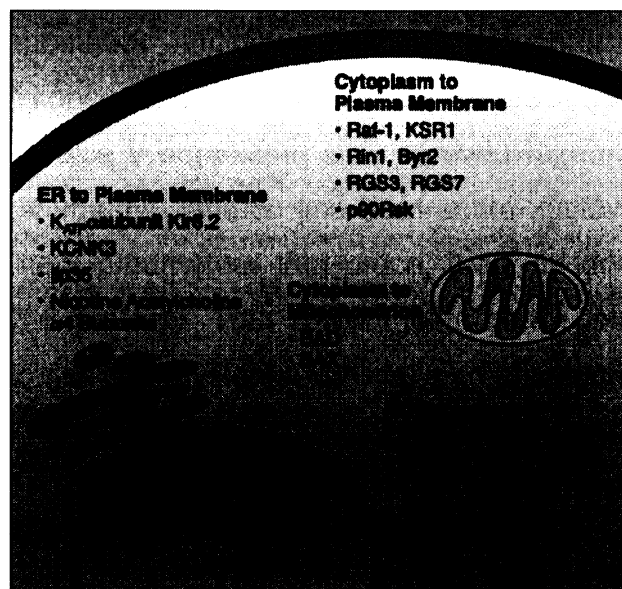
První zmínky o významu této rodiny sahají do r. 1988, kdy byla zjištěna vazba na tryptofan a tyrosinhydroxylasu [21]. Od této doby bylo již publikováno přes 200 vazebných partnerů 14-3-3 proteinů. Většina ligandů obsahuje specifický vazebný motiv: **Arg(Ser/X)XpSerXPro** nebo **ArgXXXpSerXPro**, kde X značí libovolnou aminokyselinu a pSer fosforylovaný serin [22]. Každý dimer 14-3-3 proteinu je tedy schopný vázat dva peptidy s tímto motivem, jak je tomu na obr. č. 5 (strana č. 5), nebo jeden ligand, který obsahuje dva tyto motivy, jako na obr. č. 7 [23]. Pokud daný ligand obsahuje dva výše zmiňované vazebné motivy, jeho afinita ke 14-3-3 proteinu se zvýší až 30 krát [24]. Jsou však známy i nefosforylované ligandy, jako například exoenzym S nebo nefosforylované syntetické rekombinantní peptidy, jako například peptid R18 [1,20].



Obr. č. 7 – Krystalová struktura komplexu 14-3-3 ζ :pAANAT1-201 [11]. Homodimer 14-3-3 ζ je vyznačen zeleně, pAANAT1-201 hnědě. Fosforylovaný Thr³¹ je zbarven žlutě.

Mechanismus, kterým 14-3-3 proteiny ovlivňují funkci svých vazebných partnerů, je několikový. Mohou ovlivňovat schopnost protein-proteinové interakce vazebného partnera, jak je tomu v případě vazby 14-3-3 na protein BAD [20]. Dalším druhem regulace je ovlivnění buněčné lokalizace vazebného partnera, tzn. zadržení proteinu v buněčném jádře nebo v cytoplazmě. Příkladem je vazba 14-3-3 proteinu na lidskou telomerasu TERT [1], nebo naopak fosforylací indukované

zadržení FOXO transkripčních faktorů v cytoplazmě [26]. Příklady proteinů, jejichž buněčná lokalizace je regulována prostřednictvím vazby 14-3-3 proteinu jsou shrnuty na obrázku č. 8.



Obr. č. 8 – Lokalizace a vazební partneři 14-3-3 proteinů [1].

14-3-3 proteiny jsou významnými regulačními elementy celé řady buněčných procesů. Proto samy podléhají velmi komplexní regulaci. Pro funkci 14-3-3 proteinu je klíčová jejich dimerní struktura, jelikož pouze dimery 14-3-3 proteinů jsou schopny regulovat funkce řady vazebných partnerů. Proto jedním ze způsobů regulace je narušení tvorby dimerů prostřednictvím fosforylace serinového zbytku, který se nachází na rozhraní monomerů [63]. Isoformy 14-3-3 proteinů obsahují ještě další dvě fosforylační místa (např. Ser¹⁸⁴ a Thr²³² v lidské isoformě ζ) [28]. Oba tyto zbytky se nacházejí v těsné blízkosti vazebného místa a jejich fosforylace ovlivňuje vazebné schopnosti 14-3-3 proteinů.

2.2.1. Význam iontů kovů

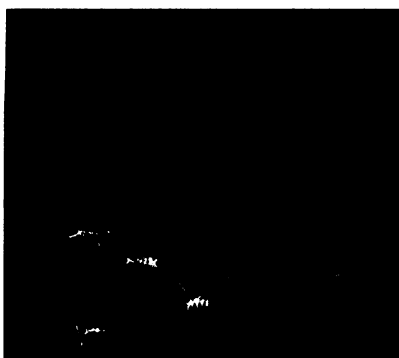
Biogenní ionty kovů tvoří nedílnou součást každého organismu. Mezi nejvýznamnější zástupce patří například Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ . Mnohé z nich se vyskytují v organizmech volně, kde se účastní různých signálních procesů (přenos nervového vzruchu), dále mohou svou klíčovou přítomností v proteinové struktuře napomáhat určitým reakcím (cytochrom-c-oxidasa) nebo pouze zvýšením své koncentrace nastartují celou kaskádu reakcí (proteosyntéza).

Jejich funkce v organismu jsou opravdu různorodé. Mnohé z nich jsou již detailně prozkoumány, zatímco jiné nám zatím zůstávají skryté. Podrobný výčet jejich funkcí není předmětem této práce, tudíž mi dovoluňte přejít rovnou k jejich vztahu s 14-3-3 proteiny. Toto spojení ještě není úplně jasné, a tak se nejprve zaměřím na to, jak tato myšlenka vznikla, a co přivedlo vědce na tuto spojitost.

2.2.2. Interakce iontů kovů s proteiny

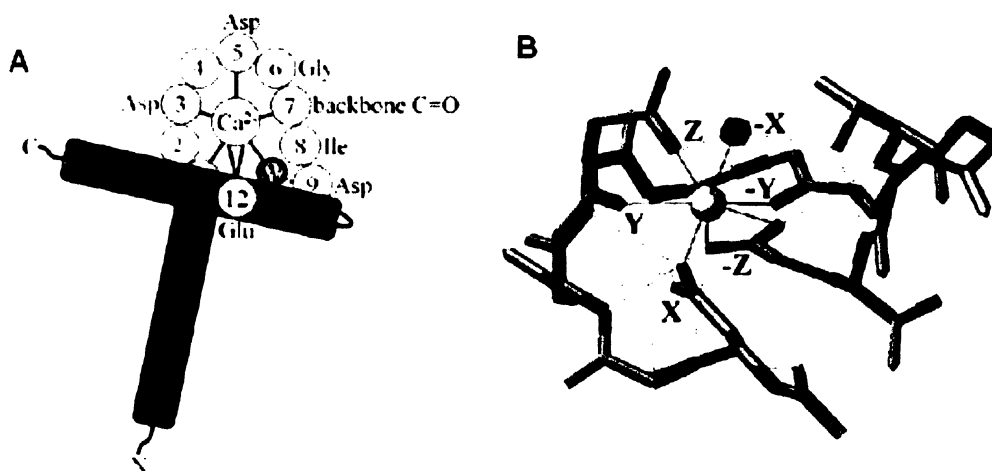
Ionty kovů mohou s proteiny interagovat několika způsoby. Tato práce se zabývá koordinací iontů s proteinovým řetězcem, jehož terciární struktura je uspořádána do motivu tzv. EF-ruky (EF-hand), která je pro vazbu iontu klíčová. Tento motiv se dá popsat typem sekundární struktury jako **helix-ohyb-helix** a připodobňuje se k postavení ukazováku a palce, z něhož vychází i anglický výraz: EF-hand.

Koordinaci iontu s tímto uspořádáním proteinového řetězce si můžeme představit podle obrázku č. 9 na následující straně [30]. Nejznámějším příkladem proteinu, který obsahuje tento vazebný motiv je dozajista calmodulin, jehož spojitost s ionty vápníku je známa již dlouho [31].



Obr. č. 9 – PC model vazby Ca^{2+} a GF14w [29]. Oranžově je znázorněn proteinový řetězec a červeně koordinovaný ion vápníku.

Přesné složení tohoto motivu tak dlouho známé není, ale dnes je již podrobně prozkoumán hlavně díky krystalografii. Vápenaté kationty preferují koordinaci do pentagonální bipyramidy [32]. V ohybu kanonického EF-hand motivu je standardně Ca^{2+} koordinován sedmi ligandy. Pět těchto ligandů pochází z devíti postranních řetězců aminokyselin v ohybu a dva zbývající z karboxylových skupin aminokyselin z α -helixů, jak naznačuje obr. č. 10.



Obr. č. 10 (A) Schematický diagram koordinace Ca^{2+} . Modře jsou vyznačené proteinové ligandy, zeleně Gly, který zajišťuje flexibilitu ohybu a tmavě modře potom molekula vody.

(B) Koordinace Ca^{2+} do pentagonální bipyramidy v kanonickém motivu EF-hand calmodulinu. NH v páteři řetězce jsou označeny černě a atomy kyslíku v postranních řetězcích červeně [32].

Jak je zřejmé z obr. č. 10B (str. č. 10), tři ze čtyř koordinačních ligandů jsou karboxylové skupiny z postranních negativně nabitých aminokyselin a čtvrtá je z hlavního řetězce ohybu v motivu EF-hand. V tabulce č. 1 jsou pak shrnuty důležité pozice a typy aminokyselin, které se v tomto uspořádání mohou nacházet. Chelatující aminokyseliny z ohybu můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupina tvoří planární pozici a druhá terciární geometrii, předepsanou osami, aby tvořily pentagonální bipyramidu: 1(+X), 3(+Y), 5(+Z), 7(-Y), 9(-X), 12(-Z). Celá tato oblast je ještě stabilizována celou sítí vodíkových vazeb důležitých pro celkové uspořádání a stabilitu [33].

Důležitou pozici v celkovém uspořádání má konzervovaný glycin, který zaujímá šestou pozici v ohybu, a na obr. č. 10 A (str. č. 10) je vyznačen světle zeleně. Díky němu se celé uspořádání může potočit až o 90° a tím umožní zbývajícím vazebným ligandům dostat Ca^{2+} do správné koordinační pozice [34,35].

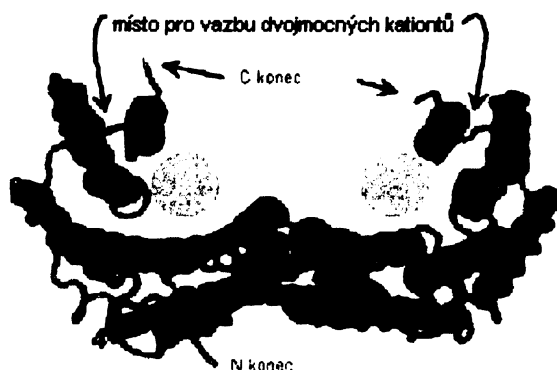
pozice v EF-loopu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
koordinační ligand	X *		Y *		Z *		-Y bb		-X *			-Z *2
nejčastější AMK	Asp 100%	Lys 29%	Asp 70%	Gly 50%	Asp 32%	Gly 90%	Thr 20%	Ile 60%	Asp 32%	Phe 20%	Glu 20%	Glu 92%
další možné AMK		Ala Gln Thr Val Ile Ser Glu Arg	Asn	Lys Arg Asn	Ser Asn		Phe Lys Gln Tyr Glu Arg	Val Leu	Ser Thr Glu Asn Gly Gln	Tyr Ala Thr Leu Glu Lys	Asp Lys Ala Pro Asn	Asp

Tab. č. 1 – Aminokyselinová sekvence EF-ohybu [32]. Procenta označují četnost výskytu v tomto motivu, značka sc označuje koordinaci s postranním řetězcem aminokyseliny a bb s hlavní páteří řetězce, * určuje ligandy poskytující koordinaci s molekulou vody, zkratka AMK = aminokyselina.

Výše popsaný motiv se může do určité míry měnit. Potom se nejedná o kanonický typ, ale tzv. pseudo motiv EF-hand. Jedním z příkladů může být záměna glutamátu za aspartát ve dvanácté pozici, čímž se zmenší vzdálenost mezi aminokyselinou a chelatovaným iontem vápníku. Tento motiv EF-hand je tedy kompaktnější a menší než standardní kanonický typ a to má za následek určitou specifitu pro koordinaci iontů hořčíku [32,36].

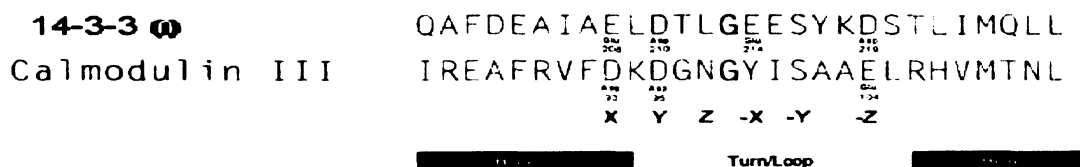
2.2.3. Vazba iontů kovů na 14-3-3 proteiny

Ionty kovů jako jsou Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} (tzv. dvojmocné kationty) se mohou vázat na 14-3-3 proteiny podobně jako v případě calmodulinu, jak je popsáno výše. Obsahují totiž podobný vazebný motiv EF-hand. Jedná se konkrétně o ohyb 8, který se nachází mezi osmým a devátým α -helixem [29]. Na obr. č. 11 je tato oblast vyznačena.



Obr. č. 11 – Struktura 14-3-3 proteinů s vyznačenými místy pro vazbu dvojmocných kationtů, která se nachází v oblasti mezi 8. a 9. α -helixem [25]. Hnědé kruhy znázorňují místo pro vazbu ligandu.

Schopnost 14-3-3 proteinů vázat ionty kovů byla zatím prokázána pouze u rostlinných isoform, hlavně u isoformy z *Arabidopsis thaliana* GF14 ω , kdy bylo upozorněno na podobnost ohybu 8 s motivem EF-hand, jak ukazuje obr. č. 12 [29].



Obr. č. 12 – Srovnání aminokys. sekvence motivu EF-hand v calmodulinu a 14-3-3 GF14 ω [29].

Vazbou dvojmocných kationtů na 14-3-3 proteiny dochází pravděpodobně ke konformační změně, která způsobuje zvýšení povrchové hydrofobicity. K podobnému efektu dochází i v případě snížení pH z 7,5 na 6,5, kdy dochází k částečné protonaci kyselých aminokyselin v EF-ohybu (ohyb 8). Tento jev byl zaznamenán v případě, kdy vazbou kationtů na 14-3-3 proteiny došlo k deaktivaci komplexu 14-3-3 s enzymem fosfonitrátreduktasou (pNR:14-3-3) [37].

Redukce nitrátu na nitrit, kterou zabezpečuje enzym nitrátreduktasa, je důležitý krok asimilace dusíku u rostlin. Nitrit je pak dále nitritreduktasou redukován na amoniak. Prevencí proti akumulaci toxického nitritu je fosforylace nitrátreduktasy, což má za následek vazbu 14-3-3 proteinu a následnou inhibici aktivity nitrátreduktasy. Tento druh regulace byl pozorován např. u isoform izolovaných z ječmene. Při pH 7,5 vyžaduje vazba 14-3-3 proteinu na nitrátreduktasu *in vitro* přítomnost určitých polyaminů nebo milimolární koncentraci dvojmocných kationtů Ca^{2+} , Mg^{2+} [38,41].

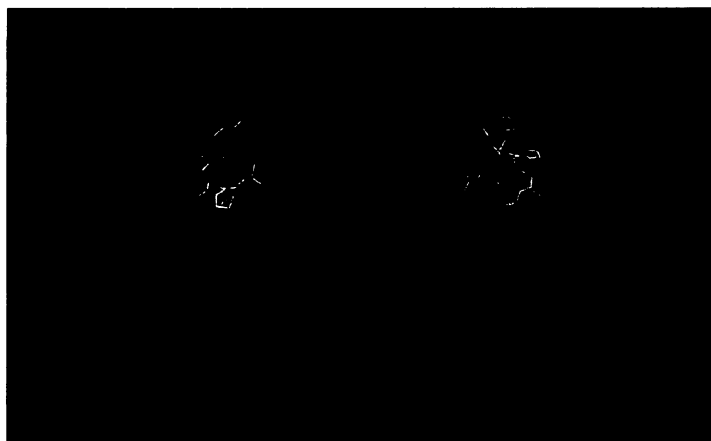
Spekuluje se, že interakce dvojmocných kationtů s ohybem 8 může ovlivňovat konformaci 14-3-3 proteinu, díky níž se vazebný žlábek stává přístupnější pro vazebné ligandy. Přítomnost dvojmocných kationtů tedy pravděpodobně stimuluje vazbu 14-3-3 proteinu na nitrátreduktasu [38]. Kromě dvojmocných kationtů i polyaminy mohou ovlivňovat vazebné vlastnosti 14-3-3 proteinů. Byl studován vliv polyaminů spermin, spermidin a kadaverin, přičemž zejména spermin velmi účinně stimuloval interakci mezi 14-3-3 proteinem a nitrátreduktasou. Důležitá je v tomto případě přítomnost alespoň jedné sekundární aminové skupiny v molekule polyaminu [39].

Jak již bylo výše uvedeno v centrální pozici EF-ohybu je v případě calmodulinu obsažen glycin. Stejně tak je tomu i u několika isoform *Arabidopsis thaliana*, např. 14-3-3 ω , ϕ , υ , ν , ψ , χ , κ , λ . Glycin jakožto atypická aminokyselina zde svojí flexibilitou může zajišťovat změnu ve struktuře C-konce a současně i zvýšení flexibility samotného EF-ohybu. Zajímavé bezesporu také je, že se glycin v této pozici vyskytuje pouze u rostlin a to jenom v některých isoformách, a naopak nikdy nebyl zjištěn u isoform ostatních organismů jako u člověka, kvasinky, potkana ani u zástupců z říše hub a třídy ryb [40].

Další studie na toto téma se zaměřily na vazbu několika typů isoform *Arabidopsis thaliana* z různých fylogenetických větví a syntetických peptidů.

Sekvence peptidů byly odvozeny od *Arabidopsis* nitrátreduktasy (NR) a protonové pumpy (AHA2) z plazmatické membrány. Fosforylace AHA2 a následná interakce se 14-3-3 proteiny probíhá optimálně v přítomnosti Mg^{2+} [42]. Výsledky potvrzují, že každá isoforma vykazovala zvýšenou vazbu s AHA2 se zvyšující se koncentrací Ca^{2+} i Mg^{2+} . Změny v koncentracích dvojmocných kationtů mají tedy vliv na K_D (disociační konstanta) komplexů 14-3-3 proteinu s vazebnými partnery. Zároveň je zde navrhováno i zdůvodnění jemných rozdílů mezi jednotlivými isoformami, které souvisí s výše uvedenou teorií uspořádání variabilního C – konce do desátého α -helixu [43].

Dosavadní informace, které o tomto problému pojednávají, se všechny soustřeďují na rostlinné isoformy. Výjimkou je krystalová struktura lidské isoformy 14-3-3 σ , která obsahuje jeden kation vápníku. Tento kation se nachází na konci čtvrtého α -helixu, což by naznačovalo, že tato vlastnost 14-3-3 proteinů se netýká pouze rostlinné říše a že by mohlo být více míst, kam by se dvojmocné kationty eventuálně mohly vázat [44]. Je však nutno podotknout, že sigma isoforma se ve všech parametrech velmi liší od ostatních isidorem, a proto ji nelze brát jako modelový příklad. Podle této krystalové struktury jsem vyrobila obr. č. 13 (s použitím programu PyMOL).



Obr. č. 13 – Isoforma 14-3-3 σ s navázaným fosfopeptidem Cdc25C a iontem Ca^{2+} . Kation vápníku je zde označen červeně a fosfopeptid Cdc25C žlutě.

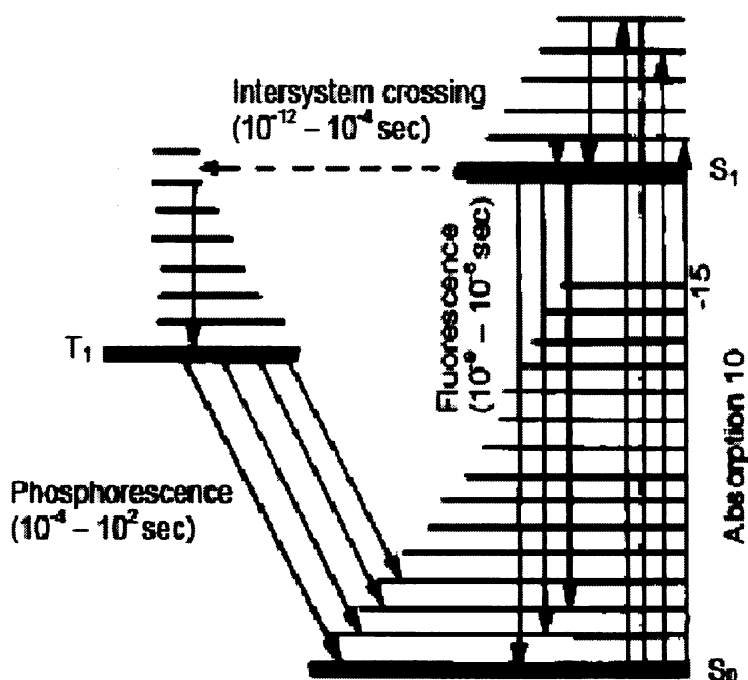
Koncentrace Ca^{2+} v buňkách se pohybuje v rozmezí 0,1–10 μM . Hospodaření s ionty kovů zajišťuje systém endoplazmatického a sarkoplazmatického retikula [32].

Z výše uvedených poznatků se tedy nabízí otázka, zda koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} a jejich proměnlivá hladina v různých organelách má nějaký vliv na funkci 14-3-3 proteinů. Některé poznatky již k tomuto tématu máme, ale na kompletní odpověď na tuto otázku si budeme ještě muset zřejmě počkat.

2.3.1. Lanthanoidová luminiscenční spektroskopie

Již v roce 1942 objevil Weissman zvláštní vlastnost komplexu s ionty europia a to schopnost absorpce ultrafialového světla a následné vyzáření světla ve viditelné oblasti. Postupem času se zjistilo, že celkem patnáct prvků od lanthanu až po lutecium mají tuto výjimečnou vlastnost. Tyto prvky mají elektronovou konfiguraci : $4f^{0-15} 5d^{0-10} s^{1-2}$ a valenční elektrony pocházejí z orbitalu 4f, jsou tedy blíže k jádru a navíc ještě stíněné ostatními elektrony.

Vodné roztoky těchto prvků vykazují velmi slabou fosforescenci, těžko detekovatelnou pro běžný spektrofluorimetr. Pouze jejich ionty, které jsou chelatovány ligandy, jsou schopné absorpce ultrafialového světla, následné excitace a velice silné fosforescence. Detailní průběh je zachycen na obr. č. 14 (na následující straně). Chelatovaný ligand (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+}) – konkrétně nepárové elektrony z 4f orbitalu jsou excitovány v případě Tb^{3+} do excitačního stavu $^5\text{D}_4$ ultrafialovým zářením a následně pomocí mezisystémového přechodu (tzv. intersystem crossing) přechází do kvantového stavu $^7\text{F}_5$ a pak do stavu základního, při němž dochází k emisi fosforescence [45,46].



Obr. č. 14 – Znárodnění fosforescence u lanthanů na Jablonského diagramu [50].

Mezi největší výhody tohoto procesu patří dlouhá doba života. Zatímco u organických fluorescentních sond je doba života řádově v nanosekundách, u lanthanidů se pohybujeme v mikrosekundách. Další výhodou je velice ostrý emisní pík v rozmezí 10 – 20 nm a bezesporu také velký Stokesův posuv (často přes 250 nm), díky kterému nedochází k samozhášení, jež se také občas vyskytuje u organických fluorescentních sond (fluorescein, rhodamin). Jsou tedy velice vhodné pro aplikaci v biochemii jako takové, již díky jednoduchému použití, velice široké aplikaci, vysoké citlivosti, jednoduché detekci a v neposlední řadě bez přítomnosti radioaktivity [45].

2.3.2. Tb³⁺ – isomorfní luminiscenční analog Ca²⁺, Mg²⁺

Jako nejlepší zástupce z prvků s výše uvedenými vlastnostmi byly pro detekci vazebných míst vápníku a hořčíku vybrány ionty Tb³⁺. Důvody byly následující. Všechny tyto prvky (Ca, Mg, Tb) se vyskytují v koordinačních číslech 6 a 8. Díky lanthanoidové kontrakci mají ionty terbia i podobný iontový poloměr a

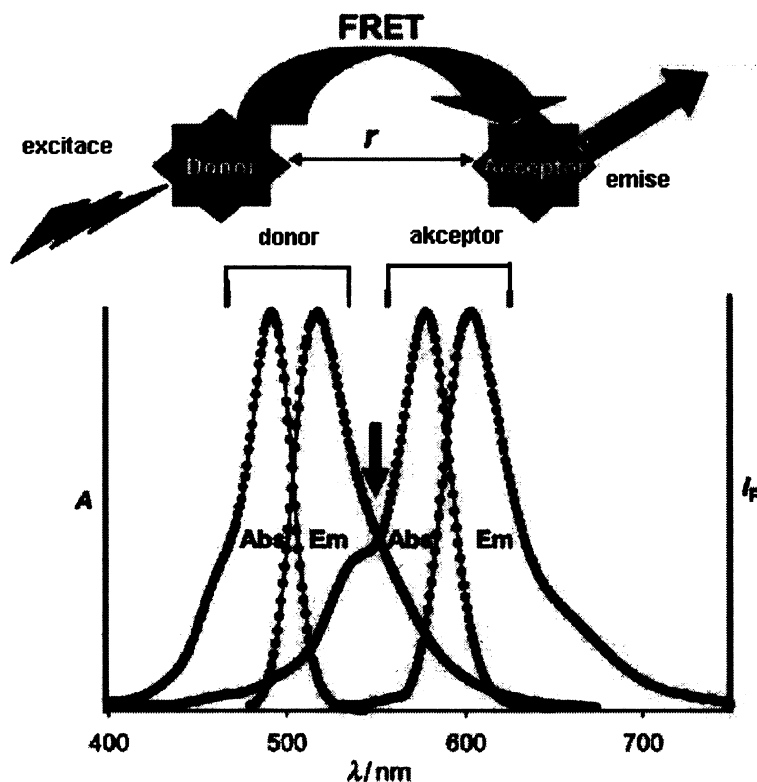
dalším společným rysem je preference kyslíkového atomu jako donorové skupiny. Všechny tyto informace jsou shrnuty v tab. č. 2. Kyslíkový atom ať už nabitý nebo bez náboje je vhodnější než atom dusíku. V neposlední řadě je to vysoká emisní intenzita po vazbě terbia na proteinový řetězec ve vodných roztocích, díky níž je potřebná koncentrace Tb³⁺ v roztoku pouze 10⁻⁵ M [47].

Protonové číslo	Ion	Poloměr iontu při koordinačním čísle/Å	
		6	8
47	La ³⁺	1,06	1,18
60	Nd ³⁺	1,00	1,12
20	Ca ²⁺	1,00	1,12
65	Tb ³⁺	0,92	1,04
71	Lu ³⁺	0,85	0,97
12	Mg ²⁺	0,72	0,89

Tab. č. 2 – *Vlastnosti prvků* [47]. Iontový poloměr je uveden pro koordinační čísla 6 a 8.

2.3.3. Försterův rezonanční přenos energie

Fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie (FRET) je znám již přes padesát let a má širokospektré uplatnění. Nutností, aby tento jev mohl nastat, je přítomnost donoru (fluoroforu), jehož excitací do vyššího energetického stavu dojde k přenosu energie na akceptor díky dlouhému rozsahu dipól-dipólové interakce. Akceptor musí být schopen přijmout energii o vlnové délce emise donoru, jak naznačuje schéma na obr. č. 15 na následující straně [48].



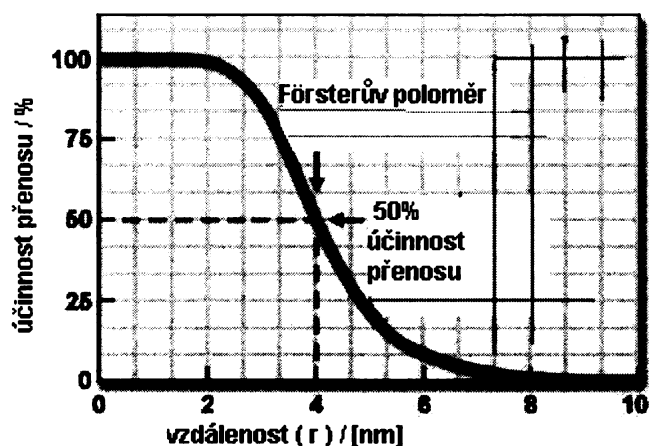
Obr. č. 15 – Schéma Försterova rezonančního přenosu [48]. Zkratkami Abs je zde rozuměna absorpce a Em je označena emise, šipka znázorňuje překryv emise donoru a absorpce akceptoru, díky kterému může k rezonančnímu přenosu docházet, r je vzdálenost donoru a akceptoru

Důležitá je také vzájemná vzdálenost donoru a akceptoru, na kterou je přenos energie možný. Tato vzdálenost se pohybuje kolem 10-100Å a závisí na molekule donoru a akceptoru. S touto vzdáleností souvisí i další veličina, a to kritický Försterův poloměr (R_0). R_0 je vzdálenost mezi donorem a akceptorem, při které dochází k 50 % účinnosti přenosu energie. Účinnost přenosu energie se vypočítá podle vzorce, který je uveden na obr.č. 16, stejně tak je tam uveden i výpočet pro vzdálenosti mezi donorem (D) a akceptorem (A) [48].

$$\varphi = 1 - (\tau_{DA} / \tau_D) \quad r = R_0 \cdot \sqrt[6]{1 / \varphi - 1}$$

Obr. č. 16 – Vzorce pro výpočet účinnosti přenosu a vzdálenosti mezi D a A [57]. τ_{DA} označuje dobu života donoru v přítomnosti akceptoru a τ_D dobu života donoru.

Z uvedeného vzorce vyplývá, že vzdálenost (r) donoru a akceptoru klesá s šestou mocninou. K účinnému přenosu energie mezi donorem a akceptorem dochází ve vzdálenosti 0,5 – 1,5 násobku R_0 , jak je patrné z grafu na obr. č. 17 [50].

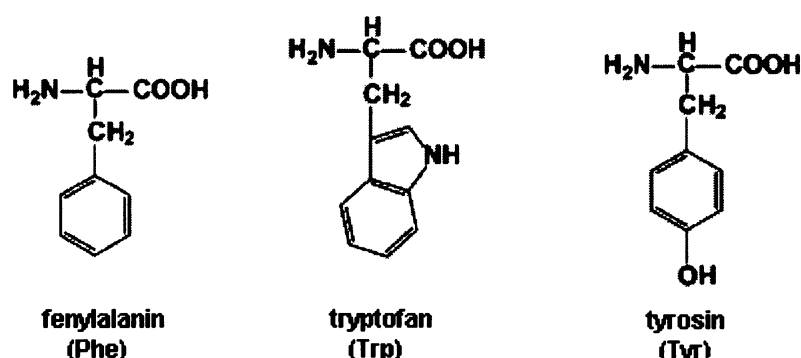


Obr. č . 17 – Účinnost Försterova přenosu energie [49].

2.3.4. Využití lanthanoidové luminiscenční spektroskopie ke zjištění vazebných míst dvojmocných kationtů na 14-3-3 proteinech

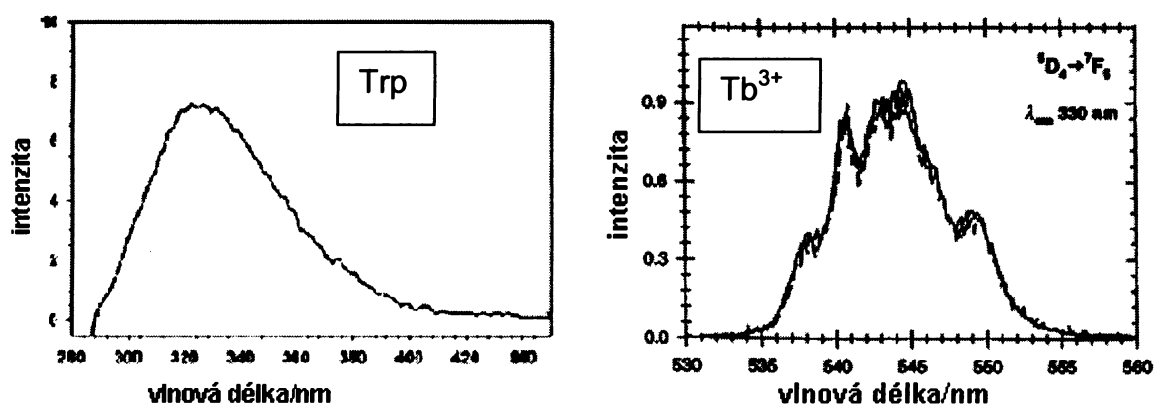
Jak jsem již výše uvedla, vhodným reprezentantem iontů vápníku a hořčíku jsou ionty terbia (Tb^{3+}). Pokud se tedy tyto ionty na protein vážou (např. do motivu EF-hand), kov je chelatován postranními řetězci aminokyselin a tudíž může dojít k excitaci nepárových elektronů z 4f orbitalu. Po jejich vrácení do základního stavu pak můžeme detekovat fosforescenční záření [47]. Tato metoda se již osvědčila v mnoha příkladech charakterizace DNA, RNA [54], stejně tak i proteinů, například u calmodulinu [51], oncomodulinu [52], fibrinogenu [53], ale i samotných 14-3-3 proteinů, jejich rostlinných isoform [38,41].

Pro zjištění lokalizace vazby dvojmocných kationtů se používá metody FRET. Využívají se k tomu aromatické kyseliny, které jsou znázorněny na obr. č. 18.



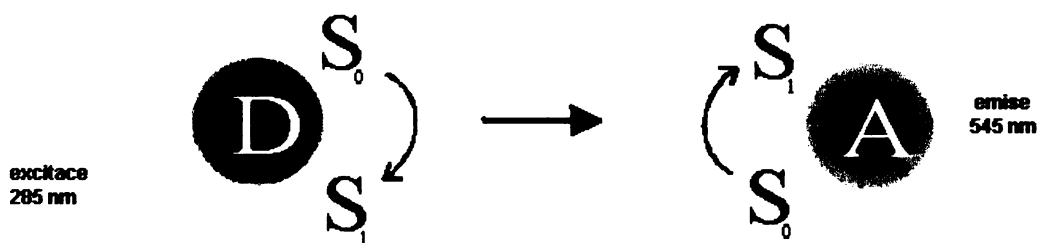
Obr. č. 18 – Aromatické aminokyseliny [48].

Aromatické aminokyseliny jsou přirozenými fluorofory a jejich obrovskou výhodou je jejich endogenní přítomnost v proteinech popř. jejich zanesení pomocí cílené mutagenese. Jejich silné absorpce světla o vlnové délce (λ) kolem 280 nm a následné emise světla o $\lambda = 320 - 360$ nm se v tomto případě využívá pro excitaci iontů terbia [48]. Emisní spektra iontů terbia a tryptofanu jsou znázorněna na obr. č. 19.



Obr. č. 19 – Emisní spektrum tryptofanu (vlevo) a iontů terbia (vpravo) [55,56]. Excitace Trp byla 295 nm a excitace Tb^{3+} 330 nm.

Pomocí tohoto důmyslného mechanismu – excitací aromatických aminokyselin světlem o vlnové délce 285 nm dojde pomocí metody FRET k přenosu energie na ionty Tb^{3+} , které jsou chelatovány proteinovým řetězcem a v dostatečné vzdálenosti k aromatickým kyselinám. Tb^{3+} zachytí emitované světlo o $\lambda = 350$ nm a excitují se volné elektrony v 4f orbitalech. Jejich následnou relaxací do základního stavu se emituje záření o $\lambda = 545$ nm, které můžeme detekovat na fluorimetru [47]. Systém je naznačen na obr. č. 20. Ona dostatečná vzdálenost je charakterizována veličinou R_0 , která se pro tento konkrétní případ pohybuje kolem 3,8 - 4,2 Å. K přenosu energie z donoru (v tomto případě aromatické aminokyseliny) na akceptor (chelatované ionty Tb^{3+}) dojde na vzdálenost kolem 6 Å [57].



Obr. č. 20 – Schéma metody FRET mezi donorem ($D = \text{arom.aminokys.}$) a akceptorem ($A = Tb^{3+}$).

3. Cíle práce

1. Exprese a purifikace vybraných isoform 14-3-3 proteinů:
 - isoforma 14-3-3A z ječmene (*Hordeum vulgare*)
 - isoforma 14-3-3ζ z člověka (*Homo sapiens sapiens*)
 - isoforma BMH2 z kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*)
2. Vypracování metody umožňující studium vazby dvojmocných kationtů pomocí lanthanoidové (Tb^{3+}) luminiscenční spektroskopie.
3. Ověření vazby iontů Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} u rostlinné isoformy 14-3-3A z ječmene.
4. Testování vazby iontů Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} u lidské isoformy 14-3-3ζ, jako zástupci živočišné říše, a na druhé straně u kvasinkové isoformy BMH2, zástupci z nejjednoduššího eukaryotického organismu, kde se 14-3-3 proteiny vyskytují.
5. Pomocí měření s fluorescenční sondou bis-ANS indikovat možnou konformační změnu, ke které dochází vazbou dvojmocných kationů na 14-3-3 proteiny.

4. Praktická část

4.1. Materiál a přístroje

4.1.1. Použité chemikálie

akrylamid	Sigma, USA
ampicilin	Sigma, USA
bacto yeast extract (kvasničný extrakt)	Carl Roth GmbH, Německo
bis-ANS (4,4'-bis (1-anilinonaftalen-8-sulfonát))	Fluka, Švýcarsko
CaCl ₂	Lachema a.s., Neratovice
Coomassie modř R250	Lachema a.s., Neratovice
DTT (dithiotreitol)	Carl Roth GmbH, Německo
EDTA	Duchefa biochemie, Holandsko
ethanol	Lachema a.s., Neratovice
glycerol	Lachema a.s., Neratovice
imidazol	Carl Roth GmbH, Německo
isopropylalkohol	Sigma, USA
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Německo
kyselina chlorovodíková	Lachema a.s., Neratovice
kyselina octová	Lachema a.s., Neratovice
2-sulfanylethanol	Carl Roth GmbH, Německo
lysozym	Serva, USA
MgCl ₂	Lachema a.s., Neratovice
methanol	Lachema a.s., Neratovice
MnCl ₂	Lachema a.s., Neratovice
NaCl	Penta, Chrudim
n-dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, USA
NiSO ₄ . 7H ₂ O	Lachema a.s., Neratovice

peroxidisíran amonný	Sigma, USA
TbCl ₃	Aldrich, USA
temed (N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH, Německo
thrombin	Sigma, USA
Tris (tris (hydroxymethyl) aminoethan)	Carl Roth GmbH, Německo

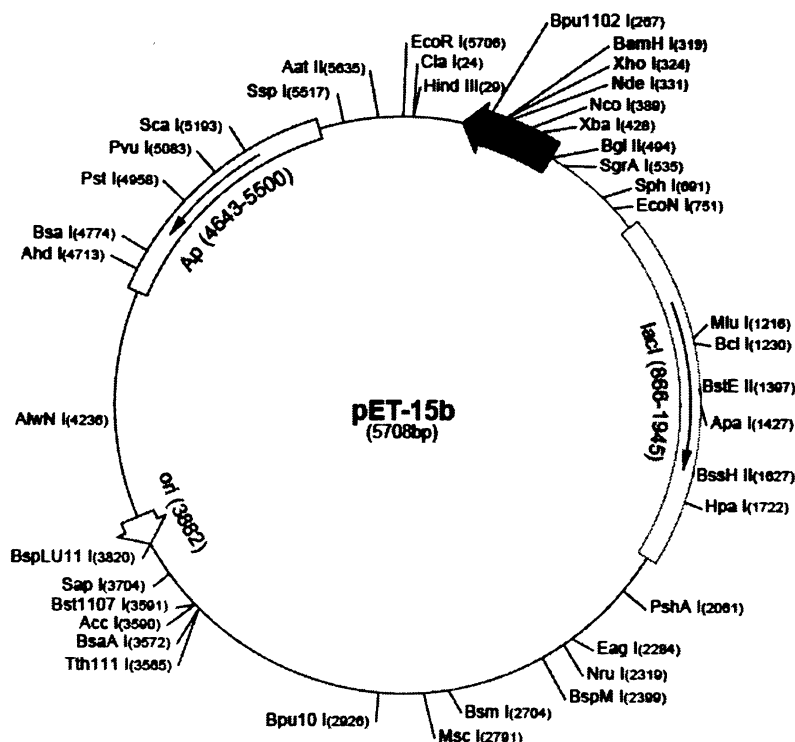
4.1.2. Laboratorní přístroje

- * Centrifuga – Biofuge 28 RS, rotor č. 3746, Heraeus Sepatech, Německo
- * Centrifuga – Sorval RC – 5B, rotor GSA
- * Centrifuga – Eppendorf 5804R, Německo
- * Elektroforéza pro SDS – Biorad, Itálie
- * Fluorimetr – PC1, ISS, USA
- * Chromatografie – FPLC – AKTA, Amersham Biosciences, Švédsko
- * Laboratorní váhy – HF – 200g, AND
- * Ohříváč vzorků pro SDS elektroforézu - Eta 2107
- * Peristaltická pumpa – Ismatec, Švýcarsko
- * pH metr – Jen Way 3505, Felsted, Velká Británie
- * Sonikátor – Ultrasonic procesor, Cole Parmer, USA
- * Sonikátor – Misonix sonicator 3000, Cole Parmer, USA
- * Třepačka – Orbita Icubator, Gallenkap, Velká Británie
- * Třepačka - Infors HT Multitron, Infors, Švýcarsko
- * UV-VIS absorpční spektrofotometr – Agilent 8453, Agilent, USA
- * Vortex – Zx3, Velp Scientifica, Itálie
- * Zdroj pro SDS elfo – Consort E143, Belgie

4.1.3. Ostatní použité materiály

- * bakteriální buňky – *Escherichia coli* BL21 (DE3), Stratagene, USA
- * dialyzační střevo (Mw cut off 8000) – Spektrum Laboratorium Inc.
- * koncentrátoři – Centricon Millipore, USA

- * filtry 0,45 μm – New England Biolabs, USA
- * filtry – Rotilabo 0,45 μm , Carl Roth GmbH, Německo
- * injekční stříkačky pro filtraci vzorků – Chirana T. Injecta a.s., SR
- * kolona – Q Sepharosa, Amersham Biosciences, Švédsko
- * kolona – Superdex 75, Amersham Biosciences, Švédsko
- * křemenné kyvety – Agilent, USA
- * laboratorní sklo – Simax, ČR
- * náplň do kolony – chelatující sepharosa, Amersham Biosciences, Švédsko
- * pipety – Eppendorf, Německo
- * plazmid – pET-15b, Novagen, Německo
- * plazmid - pRSETC, Invitrogen, USA
- * proteinový standard molekulových vah - Bio – Rad, USA
- * rukavice – Beromed GmbH Hospital Products
- * špičky pro pipety – INSET, Praha

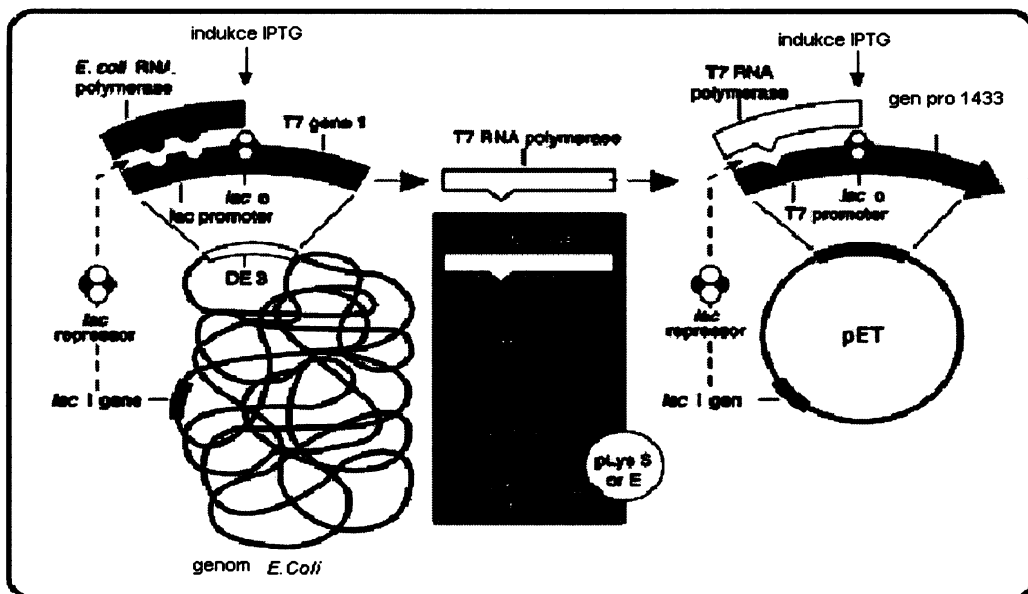


Obr. č. 21 - Plazmid pET-15b [58]. Schéma vektoru pET-15b, který obsahuje na N-konci histidinovou kotvu, štěpné místo pro thrombin a tři klonovací místa.

4.2. Metody

4.2.1. Expresa 14-3-3 proteinů

K tomuto typu exprese jsem použila kmen buněk *E. coli* BL21 (DE3), které v sobě již obsahovaly vektor pET-15b. Tento vektor ve svém genomu obsahuje gen pro 14-3-3 protein, rezistenci na ampicilin a současně gen pro T7 RNA polymerasu, jenž je pod kontrolou promotoru p_{lac} . Přidání induktoru - 0,2 M IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) uvolňuje *lac* - represor z *lac* - operátoru a zároveň z T7 promotoru. Tímto uvolněním dochází k tvorbě T7 RNA polymerasy, která následně zajistí transkripci genu pro 14-3-3 protein. Tento systém je znázorněn na obr. č. 22.



Obr. č. 22– Princip exprese proteinů v buňkách *E. coli* [59].

V případě exprese 14-3-3 ζ WT (z anglického „wild type“ divoký typ) a kvasinkové isoformy BMH2 jsem měla k dispozici glycerolový koncentrát výše zmíněných buněk s příslušným vektorem. V případě ječmenné isoformy 14-3-3A se jednalo o stejný typ buněk, ale vektor v nich byl pRSETC.

K velké produkci jsem si přes noc nechala narůst buňky v 5 ml sterilního LB média s finální koncentrací ampicilinu 100 $\mu\text{g/ml}$. Takto byly buňky ponechány v třepačce při teplotě 37 °C a při 220 rpm. Následující den jsem zaočkovala buněčnou suspenzí sterilní LB médium (1 l), koncentrace ampicilinu byla opět 100 $\mu\text{g/ml}$. Podmínky pro nárůst zůstaly stejné. Nárůst byl sledován pomocí absorpce o vlnové délce 600 nm. Jako referenční vzorek sloužilo čisté sterilní LB médium. Při hodnotě optické absorpance $A_{600} = 0,6 - 0,8$ jsem provedla indukci přidavkem 2,5 ml 0,2 M IPTG. Následně jsem upravila podmínky pro nárůst na 30 °C a 200 rpm. Podmínky byly pro všechny isoformy stejné, ale lišilo se množství LB média.

Zásobní roztok ampicilinu – 100 mg/ml v dvakrát destilované vodě

LB médium – 10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto – yeast extrakt, 10 g NaCl, pH = 7,4 (doplněno na objem 1 l destilovanou vodou)

4.2.2. Sklizení buněk

Po zhruba 10 hodinách jsem buňky sklízela centrifugací při teplotě 4 °C, 30 minutách a 3500 rpm (centrifuga Sorval RC – 5B, rotor GSA). Poté jsem pelety rozsuspendovala ve 40 ml lyzačního pufru za pomoci Vertexu. Všechny operace s buňkami jsem prováděla na ledu (4 °C) a s předchlazeným pufrem. Poté jsem buňky zamrazila do – 20 °C.

Lyzační pufr – 1 x PBS, 1 M NaCl, 4 mM 2-sulfanylethanol, 2 mM imidazol

PBS pufr (1x) – 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4

4.2.3. Sonikace buněk

Po rozmrazení buněk jsem do viskózního roztoku přidala lysozym (100 $\mu\text{g/ml}$) a nechala inkubovat za stálého míchání 30 min při teplotě 4 °C.

Následně jsem buněčnou kulturu podrobila sonikaci (čistý čas 30 min). Puls trval 10 s a 20 s bylo nastaveno pro chlazení. Poté jsem sonikát centrifugovala ve vyvážených kyvetách při 13500 rpm, 60 min, 4 °C (centrifuga Biofuge 28 RS, rotor č. 3746, Heraens). Supernatant, ve kterém je rozpuštěn 14-3-3 protein, je možno buď zamrazit nebo rovnou nanést na kolonu pro chelatační chromatografii.

4.2.4. Chelatační chromatografie

Tento krok využíváme díky vlastnosti fúzního proteinu, který obsahuje z vektoru pET-15b histidinovou kotvu (tzv. His-Tag). Pomocí této kotvy se 14-3-3 protein naváže na chelatající sepharosu, která obsahuje navázané Ni²⁺ ionty. Objem kolony je 8 ml chelatající sepharosy a k usnadnění průtoku jsem využila peristaltickou pumpu, jejíž průtok byl stanoven na 5 ml/min. Je však možné tento krok provádět i vsádkově. Postup je znázorněn v tabulce č. 3. Při posledním kroku, eluci 14-3-3 proteinu, jsem nepoužívala peristaltickou pumpu.

pořadí	objem/ml	činidlo
1	20	H ₂ O
2	20	promývací roztok
3	20	H ₂ O
4	60	1M NiSO ₄
5	20	H ₂ O
6	20	pufr E
7	vše	sonikát
8	400	10% pufr F v pufru E
9	20	pufr F - eluce 14-3-3
10		regenerace kolony

Tab. č. 3 – Postup při chelatační chromatografii.

14-3-3 protein jsem jímala po 1,5 ml do 13 mikrozkušavek a z jednotlivých frakcí jsem odebrala 15 µl jako vzorek pro SDS elektroforézu.

Nutná je regenerace kolony, jež se skládá ze tří kroků. Nejprve se na kolonu aplikuje promývací roztok, poté voda a nakonec 20% ethanol, ve kterém je poté kolona uchovávána.

Na základě vyhodnocení gelu z SDS elektroforézy jsem vybrala frakce, které obsahují nejvíce 14-3-3 proteinu a ty jsem podrobila dialýze (kap. 4.2.6.) při 4 °C přes noc. Po vyzvednutí se protein může zamrazit nebo pokračovat v dalším kroku purifikace – aniontové chromatografii.

Promývací roztok – 50 mM EDTA, 1 M NaCl

Pufr E – 1 x PBS pufr, 0,5 M NaCl, 2 mM 2-sulfanylethanol, 1 mM imidazol

Pufr F – 1 x PBS pufr, 0,5 M NaCl, 2 mM 2-sulfanylethanol, 0,6 M imidazol, 10% glycerol a upravit na pH = 8

Dialyzační pufr – 20 mM Tris-HCl pH = 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM dithiotreitol (DTT), 10% glycerol

4.2.5. SDS elektroforéza

Tento krok slouží k vizualizaci proteinu, určení čistoty a zastoupení proteinu v jednotlivých frakcích. Používala jsem vertikální akrylamidovou elektroforézu, aparatura je od firmy BioRad, a 12% akrylamidový gel, jenž má dělicí schopnost přibližně 15 – 60 kDa. Celý proces probíhá v denaturujícím prostředí.

Nejprve jsem si připravila separační gel a po jeho navrstvení mezi skla jsem aplikovala isopropanol pro srovnání gelu do roviny. Po ztuhnutí gelu a odstranění isopropanolu jsem naaplikovala zaostřovací gel, do kterého jsem vložila hřebínek.

Na přípravu vzorků jsem použila odebrané množství z jednotlivých frakcí a přidala jsem k nim 5 µl vzorkového pufru. Takto připravené vzorky jsem nechala na vodní lázni 2 minuty při teplotě 95 – 100 °C a následně aplikovala na ztuhlý gel spolu s 6 µl proteinového standardu molekulových vah.

SDS elektroforéza probíhala ve vodícím pufru, kde byla vystavena proudu 100 mA cca 55 min (dokud nanesené vzorky nedospěly ke konci separačního gelu). Následně jsem oddělila gel od aparatury a umístila na 20 min do barvicí lázně, která byla přehřívána na 60 °C. Takto obarvený gel jsem nechala odbarvit v

odbarvovacím roztoku, který jsem také mírně zahřála a nechala působit 30 min. Z takového gelu jsou již výsledky viditelné, ale pro dokonalé odbarvení doporučuji odbarvovací roztok několikrát vyměnit a s dokumentací počkat do dalšího dne. Oba roztoky působí současně i jako fixační. K dokumentaci gelu je pak vhodné použít skener.

Vzorkový roztok – 0,6 ml 1 M Tris-HCl pH = 6,8, 2,5 ml glycerolu, 2 ml 10% (w/v) SDS, 0,5 ml 2-sulfanylethanol, 1 ml 1% (w/v) bromfenolové modři, 3,4 ml H₂O (5 x koncentrovaný – takto aplikován ke vzorkům)

Vodící pufr pro SDS elektroforézu – 30 g Tris-HCl, 144 g glycinu, 10 g SDS (10 x koncentrovaný)

Barvicí roztok – 1 g Coomassie Blue R-250, 450 ml methanolu, 100 ml ledové kyseliny octové, 450 ml destilované vody

Odbarvovací roztok – 100 ml methanolu, 100 ml ledové kyseliny octové, 800 ml destilované vody

12% separační gel – 3 ml akrylamidu/bisakrylamidu, 1,87 ml pufru pro separační gel, 75 µl 10% (w/v) SDS, 2,5 ml H₂O, 75 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného, 8 µl TEMEDu

12% zaostřovací gel – 0,5 ml akrylamidu/bisakrylamidu, 0,93 ml pufru pro zaostřovací gel, 37,5 µl 10% (w/v) SDS, 2,25 ml H₂O, 75 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného, 8 µl TEMEDu

Pufr pro separační gel – 1,5 M Tris-HCl pH = 8,8, pH upraveno 35% HCl

Pufr pro zaostřovací gel – 0,5 M Tris-HCl pH = 6,8, pH upraveno 35% HCl

4.2.6. Dialýza

Po každém purifikačním kroku: chelatační, ionexová chromatografie, následuje dialýza. Tu jsem prováděla v dialyzačním střevě od firmy Spektrum Laboratories Inc. Dialyzační pufrы jsou uvedeny u jednotlivých kapitol, při kterých jsem dialýzu prováděla. Dialýza vždy probíhala za stálého míchání při teplotě 4 °C přes noc. Všeobecně platí, že pokud dialyzační pufr obsahuje glycerol, můžeme

následně vyzvednuté vzorky zamrazit. Dialyzační pufr také slouží jako referenční vorek při měření koncentrace proteinu (viz kapitola 4.2.8.).

4.2.7. Aniontová chromatografie

14-3-3 proteiny jsou kyselou rodinou proteinů a jejich pI se pohybuje kolem 4,7 – 4,8. Proto jsem pro tento krok purifikace použila kolonu Tricorn 5/50 s náplní Q-sepharosy (Amersham Biosciences), jejíž objem je 1 ml. Pracovala jsem s přístrojem FPLC AKTA a obsluhovala jsem ho pomocí komerčně dodávaného programu Unicorn 4.11.

Před nasazením kolony jsem celý systém ekvilibrovala puftrem E. Poté jsem nechala i kolonu ekvilibrovat puftrem E a to až do ustálení absorpce ($\lambda = 280$ nm) a konduktivity. Následně jsem na kolonu aplikovala 100% gradient (pufr F) pro odstranění případných nečistot. Následně jsem opět nechala kolonu ekvilibrovat puftrem E. Průtoková rychlost byla 0,7 ml/min.

Na takto připravenou kolonu jsem nadávkovala protein po 2 ml, který jsem předtím přefiltrovala. Protein jsem eluovala pomocí lineárního gradientu iontové síly 0% - 100% elučním puftrem F. Frakce jsem sbírala po 0,5 – 1 ml. Pomocí sledování absorpce při $\lambda = 280$ nm víme, které frakce obsahují náš protein a opět jsem pro vizualizaci použila SDS elektroforézu.

Jako vzorky pro SDS elektroforézu slouží 10 μ l odebraných z jednotlivých frakcí a 5 μ l vzorkového roztoku (viz kapitola 4.2.5.). Po vyhodnocení gelu jsem vybrané vzorky podrobila dialýze při 4 °C přes noc proti dialyzačnímu pufru (viz níže).

Pufr E – 50 mM Tris-HCl pH = 8,0, 1 mM dithiotreitol (DTT), (nutná filtrace)

Pufr F – 50 mM Tris-HCl pH = 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT, (nutná filtrace)

Dialyzační pufr – 20 mM Tris-HCl pH = 7,5, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 2 mM DTT

4.2.8. Měření koncentrace proteinu

Měření koncentrace proteinu je možné vždy po jednotlivých purifikačních krocích. Ke štěpení thrombinem je zcela nutné, abychom věděli, kolik je této serinové proteasy zapotřebí.

Jelikož 14-3-3 proteiny obvykle obsahují dva tryptofany a několik tyrosinů, jako možnost se tedy nabízí měření absorbance při $\lambda = 280$ nm. Toto měření jsem prováděla na spektrofotometru Agilent. Jako referenční vzorek jsem použila dialyzační pufr. Koncentraci jsem poté vypočítala podle Lambertova–Beerova zákona. Absorpční molární koeficient i molární hmotnost se zjistí na online serveru Expsy [60].

4.2.9. Thrombinové štěpení

Tento krok slouží k odstranění histidinové kotvy. Ta byla součástí vektoru pET–15b. Štěpné místo thrombinu je znázorněno na obr. č. 23.



Obr. č. 23 – Aminokyselinová sekvence s vyznačeným štěpným místem thrombinu.

Thrombin je serinová proteasa izolovaná z lidské plazmy (EC 3.4.21.5), proto je nutné při práci s ním používat ochranné rukavice. Použila jsem 5 jednotek thrombinu na mg proteinu.

Toto štěpení jsem aplikovala pouze při přípravě isoformy 14-3-3 ζ . Další isoformy jsem purifikovala bez odštěpení histidinové kotvy, protože je známo, že přítomnost této kotvy neovlivňuje vazebné vlastnosti 14-3-3 proteinů a dále se nachází daleko od studovaného ohybu 8. Pro sledování štěpícího procesu jsem po

dvou, čtyřech a sedmi hodinách odebrala 5 μ l vzorku pro vizualizaci na SDS elektroforézu.

Jako vzorky pro SDS elektroforézu sloužilo odebraných 5 μ l roztoku proteinu, 10 μ l vody a 5 μ l vzorkového roztoku (viz kapitola 4.2.5.).

4.2.10. Koncentrování proteinu

Tento krok je nutný z praktických důvodů. Následným purifikačním krokem je gelová permeační chromatografie. Rozlišovací schopnost této metody závisí na objemu nastříkovaného vzorku (tento objem by se měl pohybovat v rozmezí 0,5 - 4% celkového objemu kolony, což v našem případě bylo 24 ml).

Pro zkoncentrování roztoku proteinu jsem použila komerčně dodávané koncentrátoři Centricon Ym – 10 (Millipore, USA). Koncentrátoři obsahují membránu, která je schopna propustit molekuly do určité molekulové hmotnosti. Tato veličina se u monomeru 14-3-3 proteinů pohybuje okolo 17 000 g/mol a membrána u tohoto typu je propustná pro molekuly do 10 000 kDa.

Centrifugaci jsem prováděla na centrifuze Eppendorf 5804R a probíhala při teplotě 4 °C, 3500 rpm a 10 – 15 min, opakovaných podle potřeby.

4.2.11. Gelová permeační chromatografie

Při gelové chromatografii jsem používala stejný přístroj jako v případě aniontové chromatografie (viz kapitola 4.2.7.) a kolonu Superdex 75 od firmy Amersham Biosciences. Pro gelovou filtraci se používá pouze jeden vodící pufr a rychlost průtoku byla 0,7 ml/min.

Před nanesením vzorku je opět nutná ekvilibrace kolony vodícím pufrém a filtrace vzorku. Pro dobré dělicí schopnosti kolony je vhodné nanášet maximálně 2 ml vzorku nebo je potom nutné postup opakovat. Proto je vhodné vzorek předtím zkoncentrovat (viz kapitola 4.2.10.).

Frakce jsem jímala po 0,5 ml a z frakcí, jež obsahují 14-3-3 protein podle píku na chromatografickém záznamu jsem odebrala 10 μ l pro vyhodnocení na

SDS elektroforéze (viz kapitola 4.2.5). K tomuto objemu opět přidáme 5 μ l vzorkového roztoku.

Frakce, které obsahují čistý protein poté můžeme zamrazit, nejlépe do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, jelikož vodící pufr obsahuje glycerol. Po těchto purifikačních krocích je většinou 14-3-3 protein vhodný pro následná měření. Je tedy zapotřebí protein charakterizovat pomocí určení koncentrace (viz kapitola 4.2.8.) a celkového výtěžku. Jelikož bylo v mém případě zapotřebí odstranit EDTA, je tato charakterizace vhodná až po finální dialýze (viz kapitola 4.2.12.). Pokud by protein nebyl dostatečně čistý, můžeme kroky jako aniontovou chromatografií zvláště pak gelovou permeační chromatografií opakovat.

Vodící pufr – 20 mM Tris-HCl pH = 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM dithiotreitol (nutná filtrace)

4.2.12. Dialýza pro odstranění EDTA

Pro následná měření, tedy zjištění možných vazebných míst Ca^{2+} , Mg^{2+} u 14-3-3 proteinů, je nutné se zbavit EDTA. Přítomnost tohoto činidla by zajisté ovlivnila výsledky měření. Proto jsem všechny vyizolované isoformy 14-3-3 proteinů podrobila finální dialýze pro odstranění EDTA a tím tedy eliminovala možnost zkreslených výsledků.

Dialyzační pufr – 20 mM Tris-HCl pH = 7,5, 1 mM dithiotreitol, 10% glycerol

4.2.13. Zjištění vazebných míst titrací Tb^{3+}

Jak jsem již uvedla v teoretickém úvodu, ionty terbia jsou vhodným vazebným analogem iontů vápníku a hořčíku. Díky jeho luminiscenčním vlastnostem jsme však schopni vazbu na protein detekovat. Díky tomu, že jsou ionty terbia chelátovány v dostatečné blízkosti tyrosinu a tryptofanu, dojde zde k přenosu energie (FRET). Jako donor slouží aromatická kyselina a akceptorem

jsou chelatované ionty terbia. Pokud tedy pozorujeme signál při vlnové délce 545 nm (emise chelatovaných iontů terbia), můžeme předpokládat, že se ionty na protein navázaly a to v dostatečné blízkosti nutné pro přenos energie. To je tedy ukazatelem, že 14-3-3 protein obsahuje vhodná vazebná místa jak pro ionty vápníku tak pro ionty hořčíku.

Samotné měření jsem prováděla na fluorimetru PC1 a jako vzorek jsem použila přefiltrovaný dialyzační pufr (viz kapitola 4.2.12.) s isoformou 14-3-3 proteinu ve finální koncentraci 2 μM . Celkový objem činil 1 ml. K této směsi jsem titrovala ionty terbia (5 mM zásobní roztok TbCl_3). Excitace byla nastavena na 285 nm, kdy absorbuje tyrosin i tryptofan. Emise byla měřena při 545 nm. Naměřená intenzita byla vždy korigována na objem 1 ml.

Ionty terbia jsem titrovala až do hodnoty naměřené intenzity, která se neměnila, popř. se měnila málo. Tímto způsobem jsem zjistila, jaká koncentrace iontů terbia je zapotřebí k obsazení všech vhodných vazebných míst.

Ionty terbia, které nejsou navázané na protein a tedy nejsou chelatovány, by neměly emitovat záření. Tento hypotetický podíl na výsledcích jsem eliminovala odečtením intenzity, kterou jsem naměřila stejnými přídávky iontů terbia do 1 ml roztoku dialyzačního pufru (viz kapitola 4.2.12.) bez přítomnosti 14-3-3 proteinu.

4.2.14. Vytěsnění iontů terbia - vazba dvojmocných kationtů

Díky postupu uvedeném v předešlé kapitole jsem zjistila koncentraci iontů terbia nutných k saturaci vazebných míst na 14-3-3 proteinech. Pokud by se tedy dvojmocné kationty (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) na 14-3-3 proteiny byly schopny navázat, přídávky těchto iontů by způsobovaly snižování intenzity naměřené při saturaci proteinu ionty terbia. Pokud by ke snižování intenzity nedošlo, znamenalo by to, že se dvojmocné kationty na protein nevážou nebo se, i přes všechnu podobnost s ionty terbia, váží jinak.

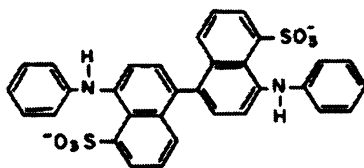
Samotné měření jsem prováděla na stejném přístroji. Tentokrát vzorek obsahoval přefiltrovaný dialyzační pufr (viz kapitola 4.2.12.), 2 μM 14-3-3 protein a

přídavek 5 mM TbCl₃, který byl nutný k saturaci vazebných míst. Objem tohoto vzorku činil 1 ml.

Přefiltrované zásobní roztoky dvojmocných kationtů byly 1 M CaCl₂, MgCl₂ a MnCl₂. Excitace byla 285 nm a emise detekována při 545 nm. Dvojmocné kationty jsem přidávala opět do stagnace naměřené intenzity. Ta byla korigována na objem 1 ml.

4.2.15. Vazba bis-ANS na 14-3-3A – detekce konformační změny

Sondu bis-ANS, celým názvem 4,4'-bis(1-anilinonaftalen-8-sulfonát), vynalezl G. Weber a jeho společnost již v roce 1969. Jedná se o sondu, která silně fluoreskuje v hydrofobním prostředí a téměř vůbec ve vodě. Její vzorec je uveden na obrázku níže [61].



Obr.č. 24 – Vzorec sondy bis-ANS [61].

Tuto sondu jsem používala k detekci konformační změny, jež nastává v důsledku vazby kovu na rostlinnou isoformu 14-3-3A. Samotné měření jsem opět prováděla na fluorimetru PC1. Excitace byla nastavena na 385 nm a emise na 485 nm, což odpovídá excitaci a emisí této sondy. Kyveta obsahovala roztok 2 μM 14-3-3A, 1 μM roztok této sondy a dialyzační pufr (viz kapitola 4.2.12.). Celý vzorek měl objem 1 ml a i na tento objem byla korigována naměřená intenzita.

4.3. Výsledky

4.3.1. Exprese 14-3-3 proteinů

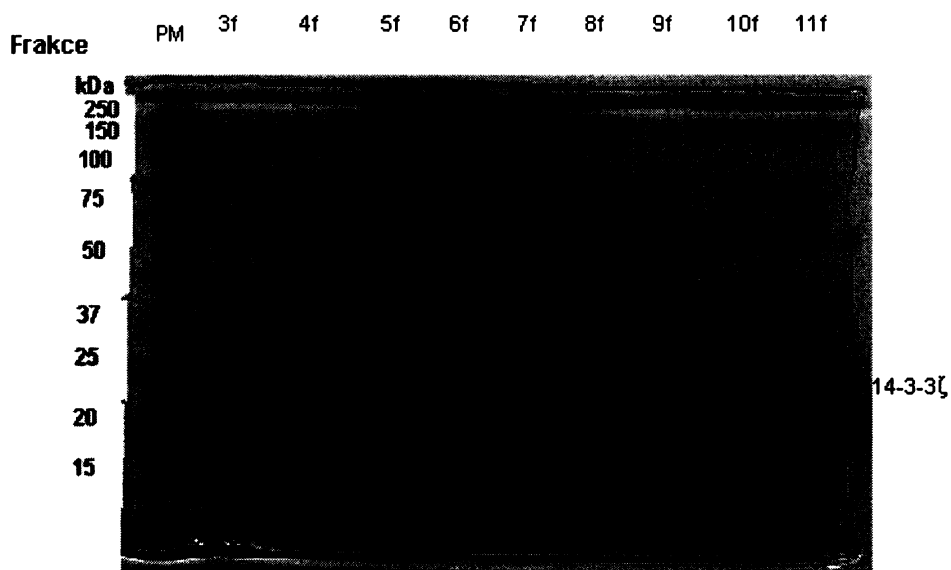
Pro své experimenty jsem exprimovala tři různé isoformy 14-3-3 proteinů. Zástupce rostlinných isoform 14-3-3A se vyskytuje v ječmeni. Tato isoforma byla exprimována v celkovém množství 6 l LB média. Příkladem lidské isoformy byla 14-3-3 ζ , která se velice dobře exprimuje, a proto bylo celkové množství LB média 2 l. Posledním zástupcem byla kvasinková isoforma BMH2, kterou jsem exprimovala ve 3 l LB média.

4.3.2. Chelatační chromatografie

14-3-3 proteiny pocházely z vektoru pET-15b, takže na N-konci obsahovaly navíc šest po sobě jdoucích histidinů, které tvoří histidinovou kotvu, tzv. His-Tag. Tato kotva má vysokou afinitu k nikelnatým kationtům (Ni^{2+}), kterou využíváme v případě této chelatační chromatografie. Fúzní protein se tedy zachytí na navázané ionty niklu. Zbavení nečistot se provede aplikací 66 mM koncentrací imidazolu na kolonu. Samotný fúzní protein je pak eluován puřem F s 6 M koncentrací imidazolu.

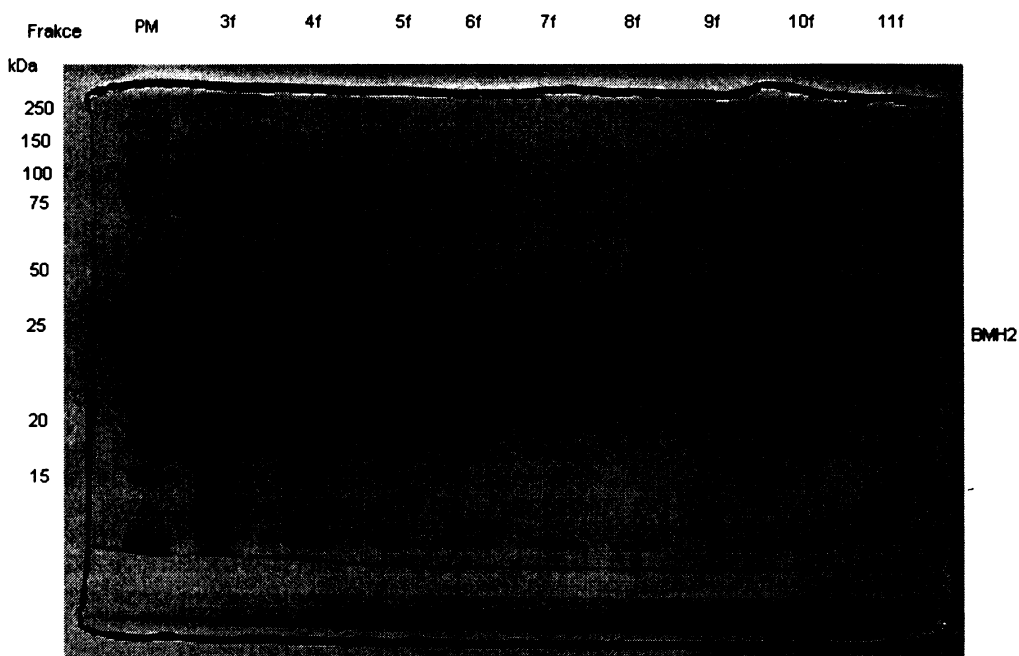
Pomocí postupu uvedeným v kapitole 4.2.4. jsem vyeluovala celkem 13 frakcí po objemu 1 – 1,5 ml. Pro vizualizaci nečistot a zastoupení proteinu v jednotlivých frakcí jsem frakce 3 – 11 podrobila SDS elektroforéze (postup viz kapitola 4.2.5.). Záznamy gelů jsou na obrázcích níže na následující straně. Postup pro všechny isoformy byl více méně identický.

Vybrané frakce s vysokým obsahem 14-3-3 proteinu jsem následně po zhodnocení gelu sloučila a podrobila dialýze (viz kapitola 4.2.6.). V případě lidské isoformy 14-3-3 ζ (obr. č. 24) jsem sloučila všechny frakce, které byly vizualizovány při SDS elektroforéze, u kvasinkové BMH2 frakce 2 – 8 (obr.č. 25), u 14-3-3A pak frakce 3 – 5 (obr. č. 26).

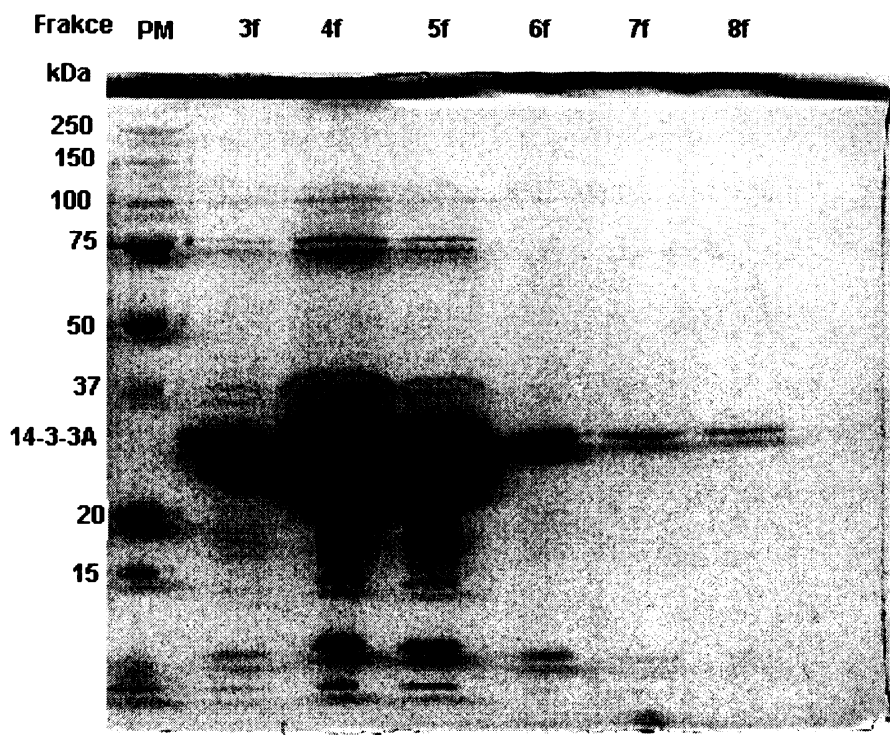


Obr. č. 24 – Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi 14-3-3 ζ po chelatační chrom. (PM označuje proteinový standard molekulových vah, 3f pořadí eluované frakce).

V případě isoformy 14-3-3 ζ byl obsah proteinu ve frakcích opravdu vysoký. V případě šesté frakce byla koncentrace proteinu tak vysoká, že gel ztratil dělicí schopnost.



Obr. č. 25 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi BMH2 po chelatační chrom. (PM označuje proteinový standard molekulových vah, 3f pořadí eluované frakce).



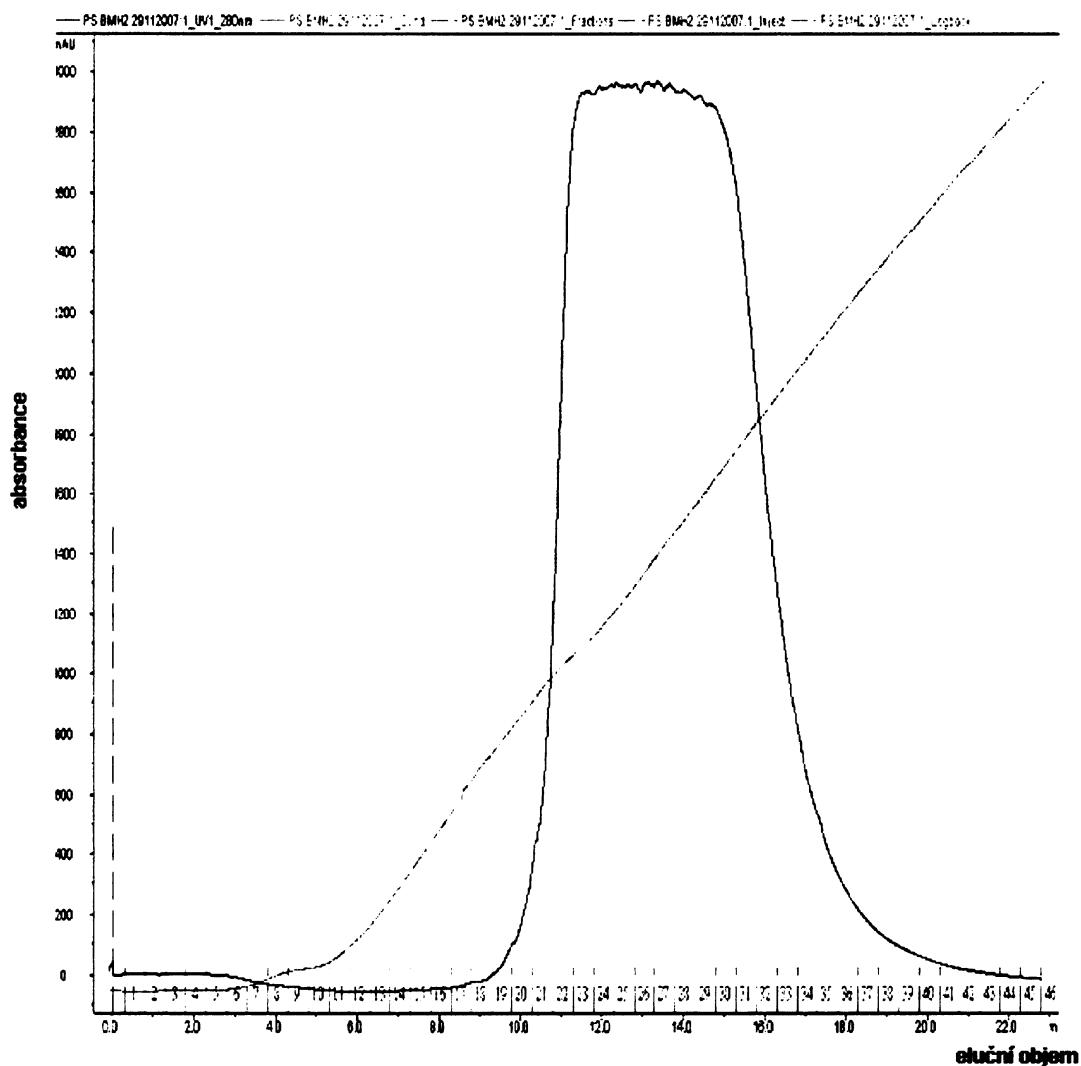
Obr. č. 26 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi 14-3-3A po chelatační chrom. (PM označuje proteinový standard molekulových vah, 3f pořadí eluované frakce).

4.3.3. Aniontová chromatografie

Tato metoda je vhodná pro 14-3-3 proteiny, jelikož jejich isoelektrický bod se pohybuje v kyselé oblasti a tudíž se na kolonu naplněnou Q-Sepharosou spolehlivě zachytí. Isoelektrický bod lidské isoformy je 4.73, rostlinné 4.83 a kvasinkové 4.82 [60].

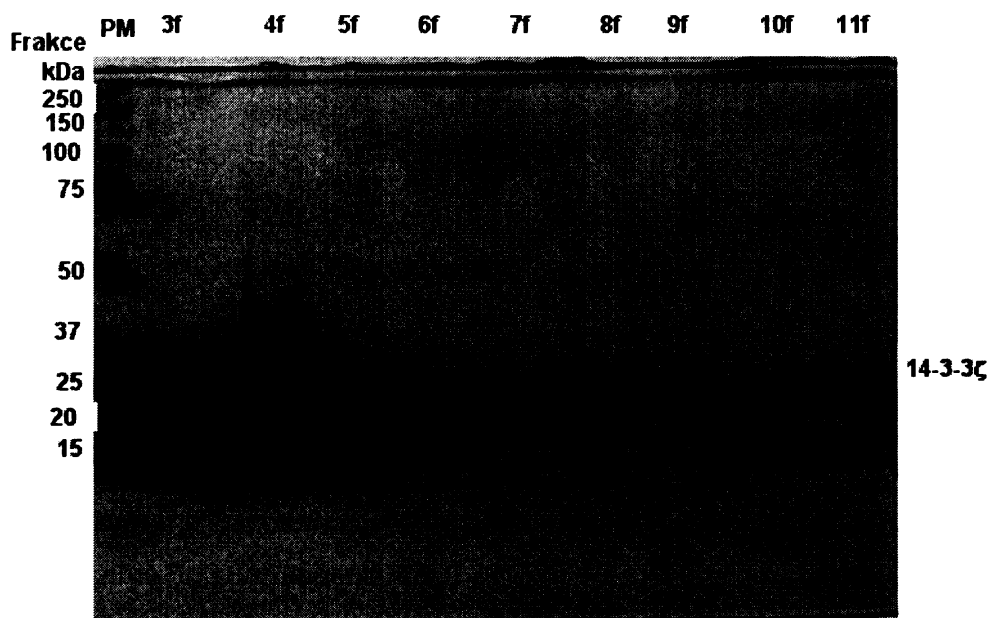
Filtrované vzorky po dialýze jsem nanasla na kolonu v několika nástřících po objemu 2 ml. Následně jsem zachycené proteiny eluovala vzrůstajícím gradientem iontové síly. Gradient byl nastaven od 0 – 100% pufru F. Záznam eluce je zdokumentován na chromatogramu na obrázku č. 27 na následující straně. Je zde znázorněn gradient iontové síly i eluované frakce, které jsem jímala po 0,5 – 1 ml (podle druhu proteinu). Samotný chromatogram zde předkládám pouze jeden (obr. č. 27), jelikož se od sebe moc neliší, a jedná se o záznam

z izolace kvasinkové isoformy BMH2. „Zubatost“ píku v maximu je vysvětlitelná velkým množstvím proteinu a neschopnosti detekce absorbance.

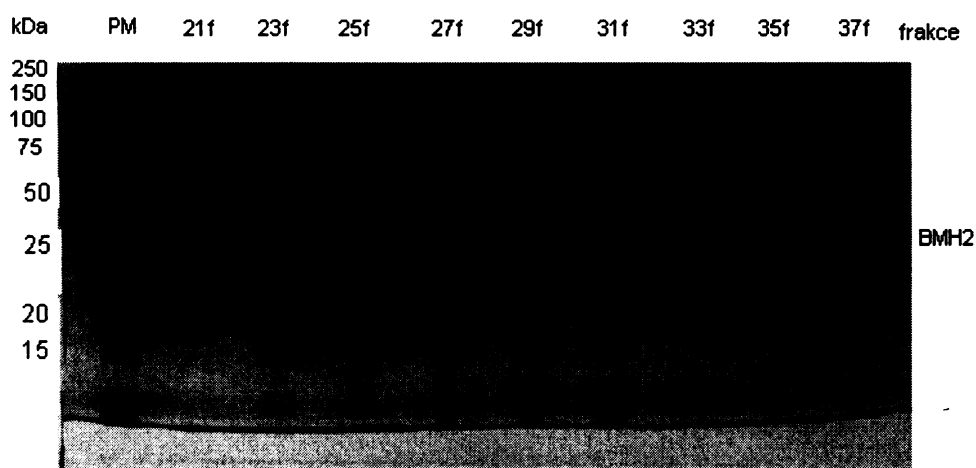


Obr. č. 27 – Chromatogram eluce proteinu BMH2 po aniontové chromatografii. Červeně jsou vyznačeny jímáné frakce po 0,5 ml, khaki barva značí gradient iontové síly a modrá monitoruje absorbanci při $\lambda = 280$ nm.

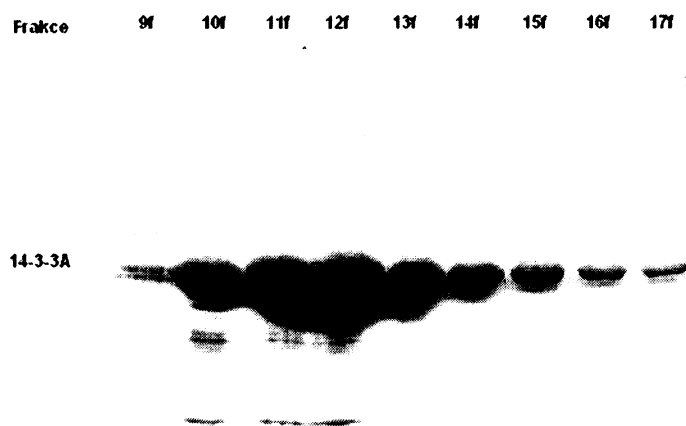
Níže jsou uvedeny obrázky gelů po SDS elektroforéze, v tomto případě již pro každý protein. Vzorky byly odebrány z frakcí, které podle píku na chromatogramu obsahovaly největší množství 14-3-3 proteinu.



Obr. č. 28 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi 14-3-3 ζ po aniontové chrom. (PM označuje proteinový standard molekulových vah, 3f pořadí eluované frakce).



Obr.č. 29 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi BMH2 po aniontové chrom. (PM označuje proteinový standard molekulových vah, 21f pořadí eluované frakce).



Obr.č. 30 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi 14-3-3A po aniontové chrom. (9f označuje pořadí eluované frakce, na gelu není viditelný použitý proteinový stand. mol. vah).

Vybrané frakce s největším zastoupením proteinu jsem sloučila a podrobila dialýze přes noc (viz kapitola 4.2.6.).

4.3.4. Měření koncentrace

Po purifikačních krocích je možné vždy změřit koncentraci proteinu, abychom měli informaci o jeho celkovém množství. Tato informace je také důležitá pro nás, abychom věděli, jaké množství můžeme následně nanést na kolonu, abychom dostali dobré rozdělení.

Před štěpením thrombinu je tento krok nezbytný, jelikož potřebujeme vědět, jaké množství této proteasy je nutné pro odštěpení histidinové kotvy. Dále zde uvádím charakterizaci jednotlivých isoform. Důležité vlastnosti, rozhodující pro samotný postup purifikace, jsem shrnula do tabulky. Informace jsem čerpala ze serveru EXPASY [60].

Isoforma	pI	$M_{r280nm} / g.mol^{-1}$	$\epsilon / M^{-1}cm^{-1}$
14-3-3ζ	4,73	27745,1	0,992
14-3-3A	4,83	29351,9	0,988
BMH2	4,82	31061,3	0,930

Tab. č. 4 – Charakteristika jednotlivých 14-3-3 isoform.

4.3.5. Thrombinové štěpení

Toto štěpení jsem prováděla pouze s lidskou isoformou 14-3-3 ζ . Postup je naznačen v kapitole 4.2.9. Záznam samotného štěpení uvádím na obrázku č. 31. Je zde jasně vidět, že většina proteinu se rozštěpila již během prvních dvou hodin.

Thrombin i histidinovou kotvu jsem posléze odstranila gelovou chromatografií.



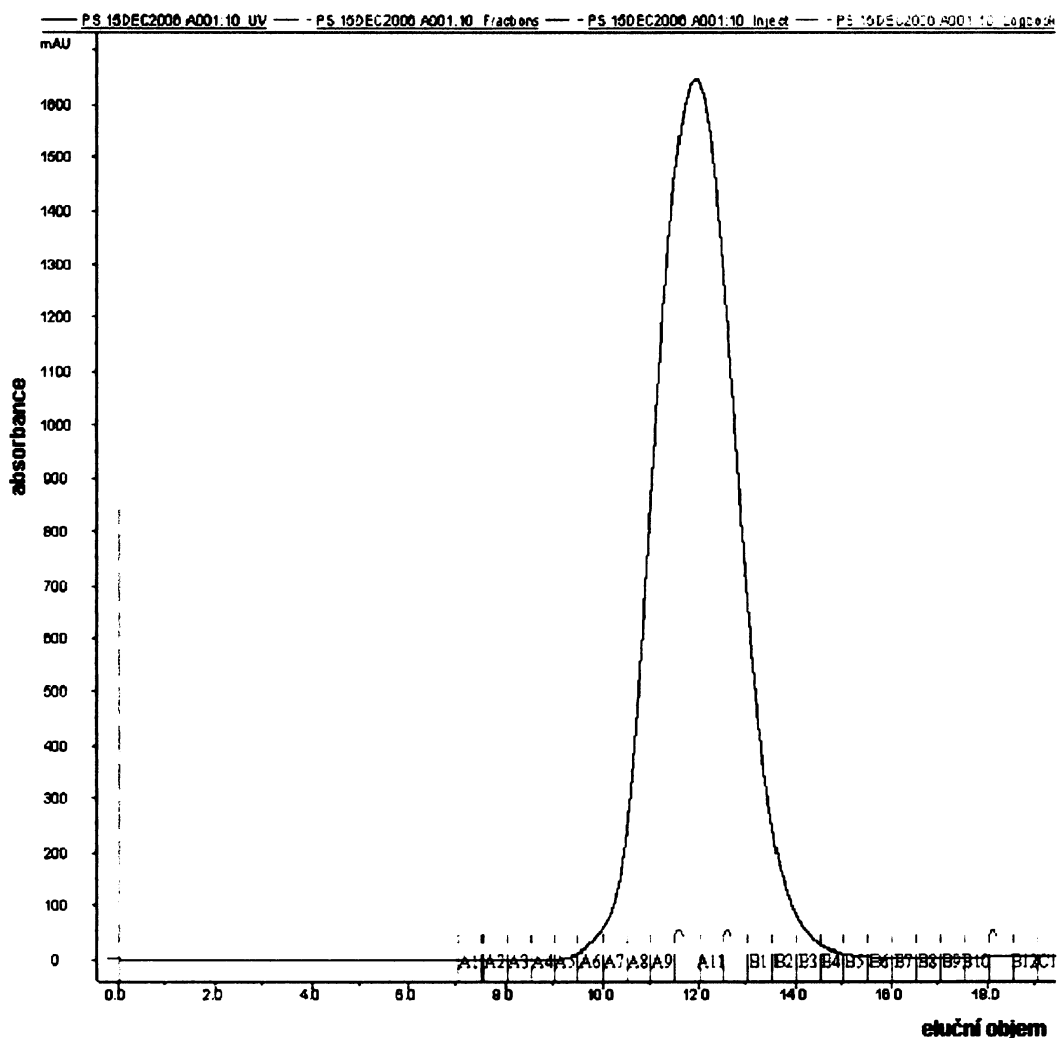
Obr. č. 31 – Thrombinové štěpení 14-3-3 ζ isoformy. Označení frakcí: (0t) před přidavkem thrombinu, (2t) po dvou hodinách, (4t) po čtyřech hodinách, (7t) po sedmi hodinách, PM označuje proteinový standard molekulových vah.

4.3.6 Gelová permeační chromatografie

Jako poslední krok purifikace jsem prováděla gelovou permeační chromatografií, v případě lidské isoformy pro odstranění thrombinu a histidinové kotvy. Tento krok se začleňuje pro odstranění možných agregátů. Využila jsem kolonu s náplní Superdex75 od firmy Amersham Biosciences.

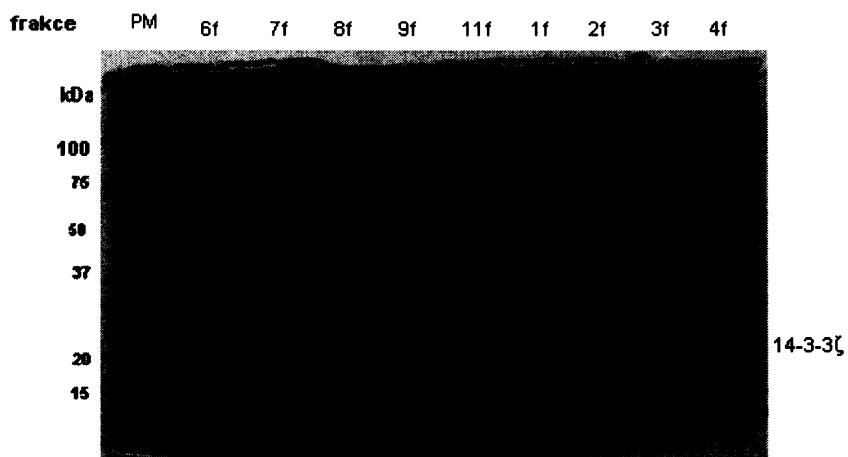
Nejprve je zapotřebí protein zkoncentrovat (viz kapitola 4.2.10.) na 2 ml, které musíme předem přefiltrovat a následně aplikovat na kolonu. Samotný průběh

je zachycen na chromatogramu proteinu 14-3-3 ζ na obrázku č. 32. Podle tohoto záznamu jsem odebrala z jednotlivých frakcí s největším zastoupením proteinu vzorky na SDS elektroforézu. Stejně jsem postupovala i v případě ostatních isoformů.

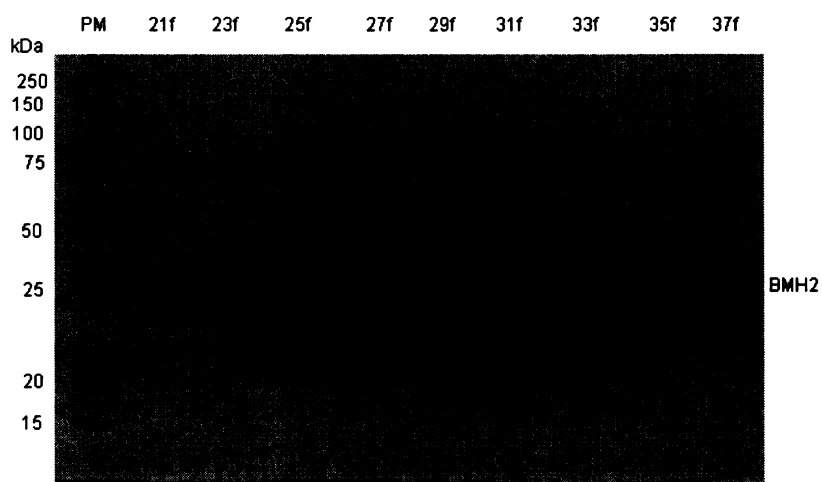


Obr. č. 32 – Chromatogram gelové permeační chromatografie 14-3-3 ζ . Červeně jsou vyznačeny jímáné frakce po 1 ml, modrá monitoruje absorbanci při $\lambda = 280$ nm.

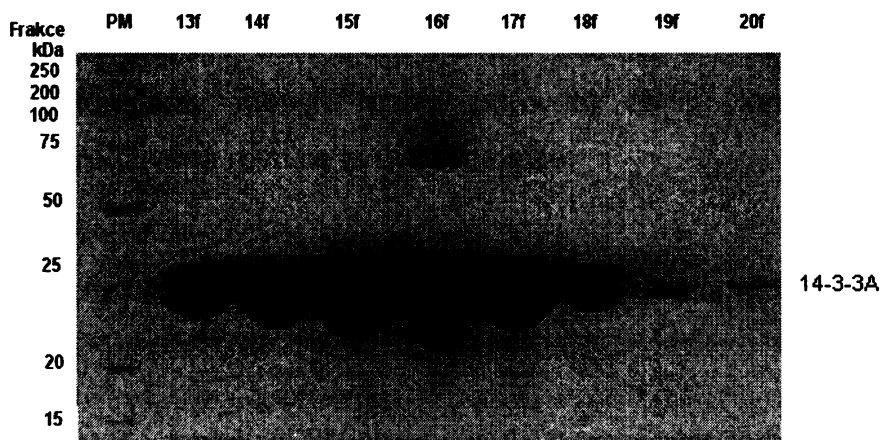
Na následující straně uvádím výsledné fotografie z gelů po SDS elektroforéze s vyznačenými frakcemi (horní část obrázku) a velikostmi proteinového standardu molekulových vah (na pravé straně).



Obr. č. 33 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi 14-3-3 ζ po gelové perm. chrom.



Obr. č. 34 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi BMH2 po gelové perm. chrom .



Obr. č. 35 - Fotografie 12% gelu z SDS elektroforézy s frakcemi 14-3-3A po gelové perm. chrom.

Frakce s největším zastoupením 14-3-3 proteinů jsem následně nechala dialyzovat proti dialyzačnímu pufru (viz kapitola 4.2.12.), abych ze vzorků odstranila EDTA, která by mohla zkreslit další výsledky. Do tabulky jsem shrnula množství vyizolovaných isoformem.

Isoforma	množství LB média / l	množství proteinu / mg	množství proteinu na 1 l LB média / mg
14-3-3ζ	2	20,8	10,4
14-3-3A	6	8,5	1,42
BMH2	3	20,1	6,7

Tab. č. 5 – Tabulka výtěžků jednotlivých isoformem 14-3-3 proteinů.

4.3.7. Zjištění vazebných míst titrací Tb³⁺

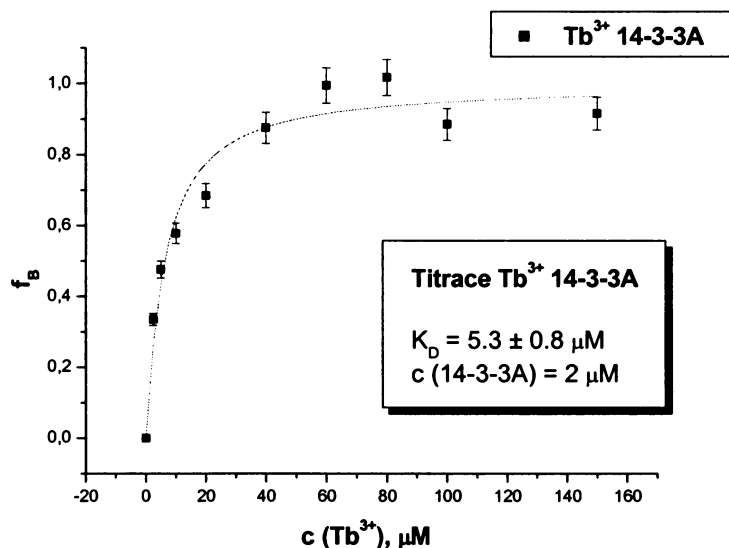
Tato metoda je známa již dlouho a její využití je pro biochemii opravdu přínosem. Postupem z kapitoly 4.2.13. jsem nejprve ověřila vazbu terbia u rostlinné isoformy 14-3-3A, která již byla dříve publikována pro isoformy z *Arabidopsis thaliana* [37]. Po úspěšných výsledcích se tedy objevila otázka, zda mají tuto vlastnost i ostatní isoformy a tudíž jsem tentýž postup aplikovala i na lidskou isoformu, zástupce 14-3-3ζ, a kvasinkovou isoformu BMH2.

Samotné výsledky jsem vyhodnocovala za pomoci vědeckého programu Origin 6.0. Naměřená data jsem fitovala pomocí rovnice (4.1) pro výpočet disociační konstanty, abych mohla porovnat afinitu iontů terbia k různým isoformám. Používaná rovnice je uvedena níže.

$$f_B = \left(\frac{1}{2c}\right) \sqrt{K_D + c + x - (K_D + x + c)^2 - 4cx} \quad (4.1)$$

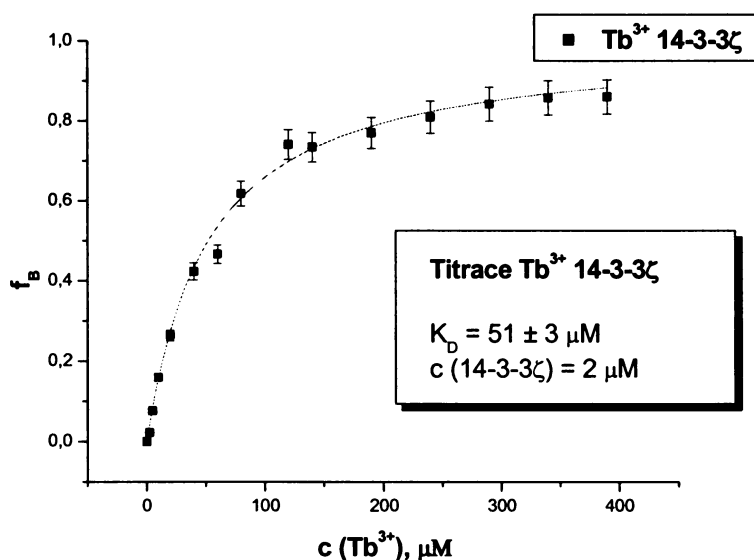
Veličina f_B označuje frakci proteinu s navázaným terbiem (nabývá hodnot od 0 – 1). K_D představuje disociační konstantu komplexu protein / Tb³⁺ a c koncentraci proteinu v kyvetě během titrace. V mém případě jsem pro všechny

isoformy používala 2 μM , abych pak mohla výsledky porovnat. Body vynesené ve výsledných grafech odpovídají aritmetickým průměrům ze tří nezávislých měření. Graf titrace Tb^{3+} na rostlinnou isoformu 14-3-3A je znázorněn na grafu č. 1.



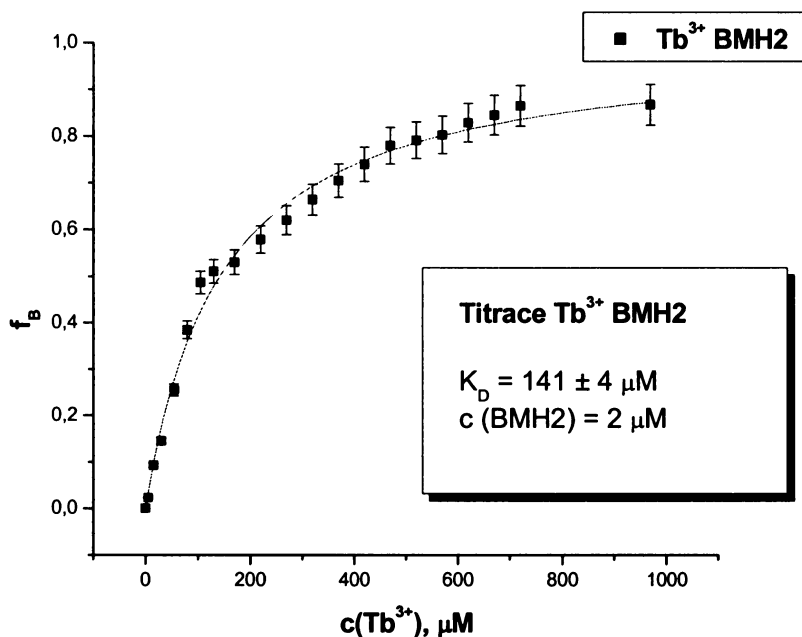
Graf. č. 1 – Titrace Tb^{3+} na 14-3-3A. Na ose x je vynesena koncentrace TbCl_3 v kvetě, na ose y je vynesen vazebný faktor f_B , K_D je vypočtena pomocí rovnice (4.1) uvedené na straně 51. Jedná se o průměr ze třech měření.

Graf titrace Tb^{3+} na lidskou isoformu 14-3-3 ζ je znázorněn na grafu č. 2.



Graf. č. 2 – Titrace Tb^{3+} na 14-3-3 ζ . Na ose x je vynesena koncentrace TbCl_3 v kvetě, na ose y je vynesen vazebný faktor f_B , K_D je vypočtena pomocí rovnice (4.1) uvedené na straně 51. Jedná se o průměr ze třech měření.

Graf titrace Tb^{3+} na kvasinkovou isoformu BMH2 je znázorněn na grafu č. 3.



Graf. č. 3 – *Titrace Tb^{3+} na BMH2*. Na ose x je vynesena koncentrace $TbCl_3$ v květi, na ose y je vynesena vazebný faktor f_B , K_D je vypočtena pomocí rovnice (4.1) uvedené na straně 51. Jedná se o průměr ze třech měření.

Výsledné hodnoty jsem shrnula v tabulce č. 7. Chyba, která je zde uvedena odpovídá chybě fitu.

Isoforma	$K_D Tb^{3+} / \mu M$
14-3-3A	$5,3 \pm 0,8$
14-3-3 ζ	51 ± 3
BMH2	141 ± 4

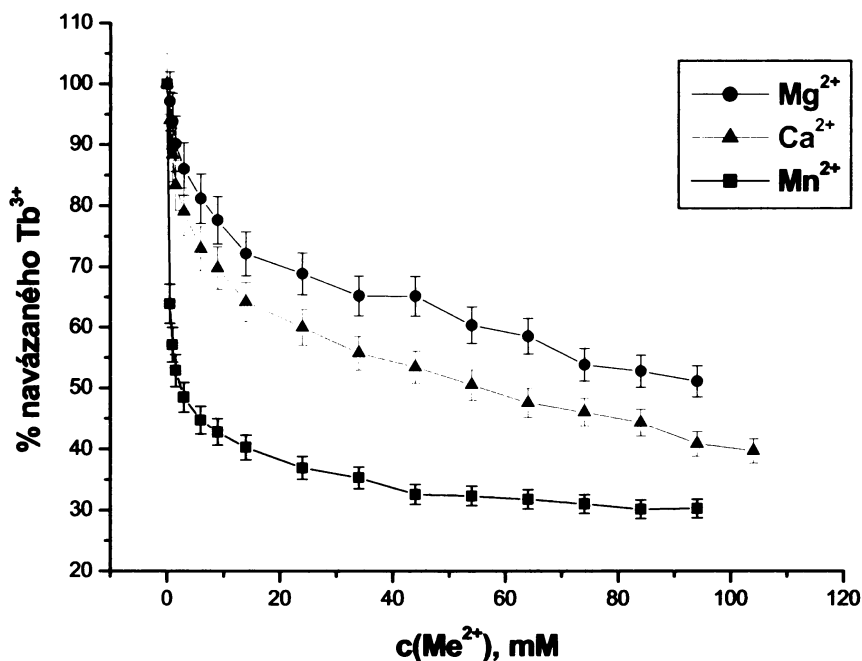
Tab. č. 5 – *Tabulka naměřených disociačních konstant 14-3-3 proteinů.*

4.3.8. Vytěsnění iontů terbia-vazba dvojmocných kationtů

Předchozí metodou, titrací ionty terbia, jsem zjistila potřebnou koncentraci Tb^{3+} k obsazení všech možných vazebných míst na 14-3-3 proteinech. Pokud by se tedy dvojmocné kationty (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) na tyto proteiny vázaly do stejných míst jako vhodný luminiscenční analog Tb^{3+} , měla bych pozorovat snižování

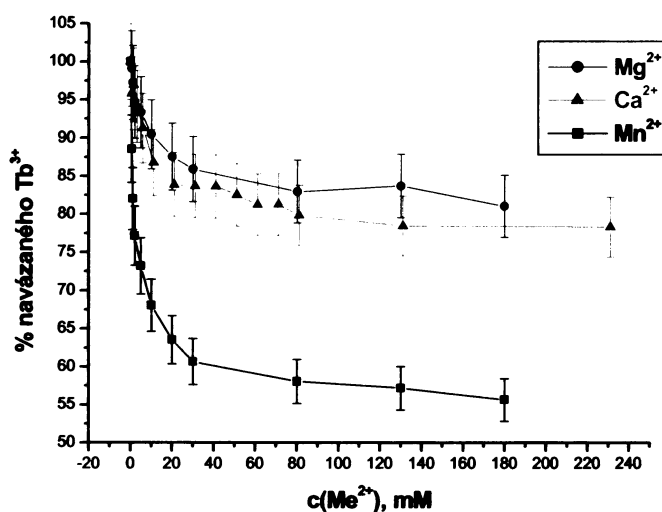
intenzity, a to důsledkem vytěsňování iontů Tb^{3+} , které by již nebyly chelatovány proteinovým řetězcem. Volné ionty terbia plovoucí v roztoku tak nejsou schopny být akceptorem při přenosu energie (FRET) od aromatických kyselin.

Naměřená data jsem vyhodnotila opět pomocí programu Origin 6.0. Výsledky jsou zaznamenány pomocí grafu znázorňující procenta vytěsněných iontů terbia. Výsledky naměřené pro ječmennou isoformu 14-3-3A jsou vyneseny na grafu č. 4.



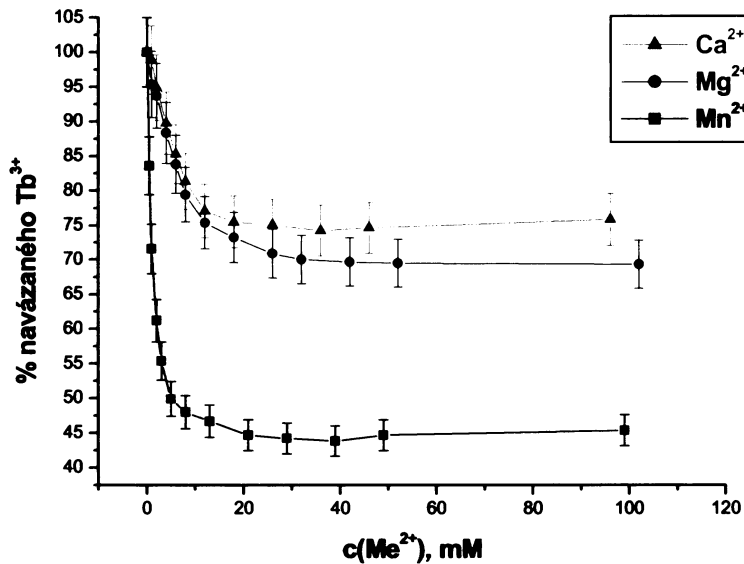
Graf č. 4 – Vytěsnění Tb^{3+} z 14-3-3A. Graf ukazuje pokles luminiscence Tb^{3+} v důsledku jeho vytěsnění z komplexu se 14-3-3A. Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květi, na ose y jsou vynesena procenta navázaného Tb^{3+} .

Výsledky pro lidskou isoformu 14-3-3 ζ jsou vyneseny na grafu č. 5.



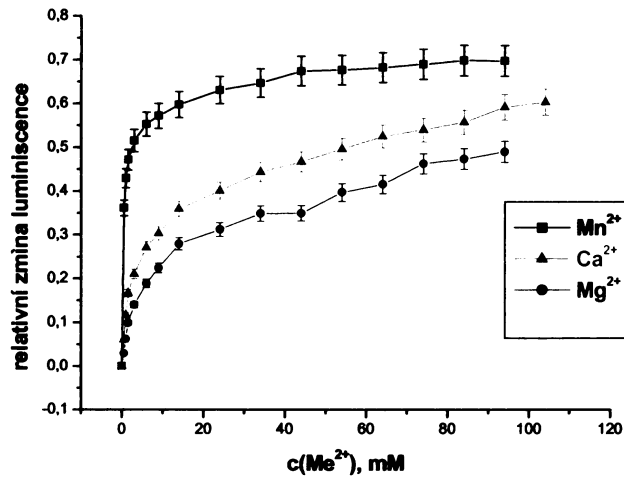
Graf č. 5 – Vytěsňování Tb³⁺ z 14-3-3 ζ . Graf ukazuje pokles luminiscence Tb³⁺ v důsledku jeho vytěsňování z komplexu se 14-3-3 ζ . Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květi, na ose y jsou vynesena procenta vytěsňování.

Výsledky pro kvasinkovou isoformu BMH2 jsou vyneseny na grafu č. 6.



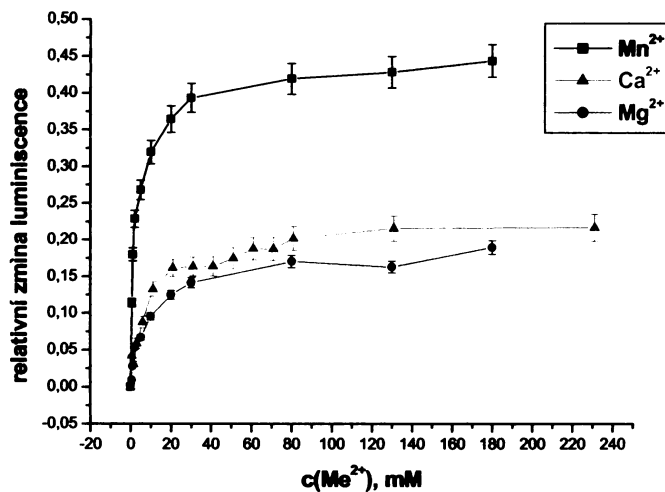
Graf č. 6 - Vytěsňování Tb³⁺ z BMH2. Graf ukazuje pokles luminiscence Tb³⁺ v důsledku jeho vytěsňování z komplexu se 14-3-3 ζ . Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květi, na ose y jsou vynesena procenta vytěsňování.

Na následujících grafech číslo 7-9 jsou vynesena ta stejná data, ale ve formě závislosti relativní změny intenzity luminiscence Tb^{3+} $((I_0 - I(c))/I_0)$, kde I_0 je intenzita na počátku titrace a $I(c)$ je intenzita naměřená při koncentraci dvojmocného kationtu c na koncentraci dvojmocných kationtů. Vliv vazby dvojmocných kationtů na 14-3-3A je vyneseno na grafu č. 7.



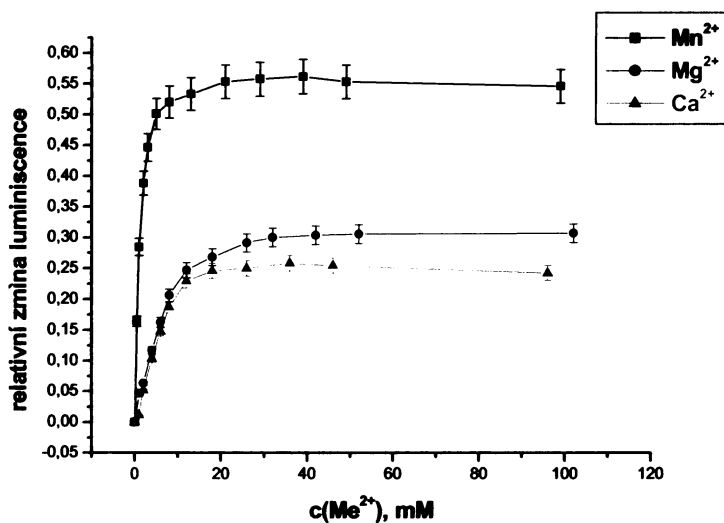
Graf č. 7 – Afinita dvojmocných kationtů ke 14-3-3A. Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květi, na ose y je vynesena relativní intenzita.

Vliv vazby dvojmocných kationtů ke 14-3-3 ζ je vyneseno na grafu č. 8.



Graf č. 8 – Afinita dvojmocných kationtů ke 14-3-3 ζ . Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květi, na ose y je vynesena relativní intenzita.

Vliv vazby dvojmocných kationtů k BMH2 je vyneseno na grafu č. 9.

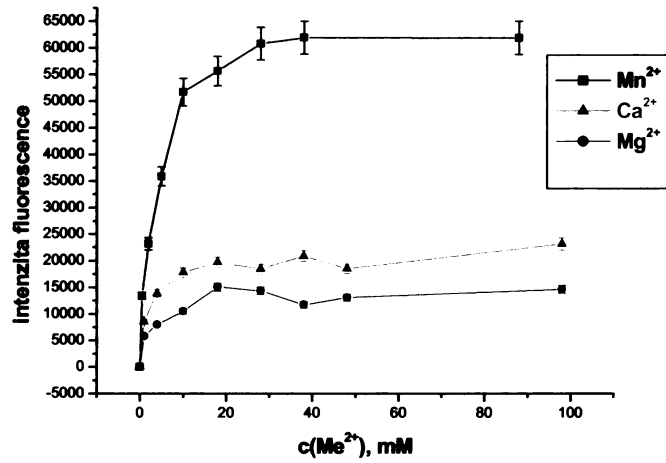


Graf č. 9 – Afiinita dvojmocných kationtů k BMH2. Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květetě, na ose y je vynesena relativní intenzita.

4.3.9. Vazba bis-ANS na 14-3-3A – detekce konformační změny

Detekcí nárůstu intenzity emise sondy bis-ANS v případě ječmenné isoformy 14-3-3A jsem zjistila, že vazbou dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) dochází ke zvýšení povrchové hydrofobicity.

Tento jev jsem též zjišťovala i u ostatních isoform, ale ani v případě lidské isoformy 14-3-3 ζ ani v případě kvasinkové isoformy BMH2 jsem nenaměřila reprodukovatelné výsledky, takže na grafu č. 10 uvádím pouze výsledky z měření rostlinné isoformy 14-3-3A. Graf jsem sestrojila v programu Origin 6.0.



Graf. č. 10 – *Nárůst intenzity fluorescence bis-ANS jakožto indikace konformační změny proteinu.*
 Na ose x je vynesena koncentrace dvojmocných kationtů v květě, na ose y pak naměřená intenzita fluorescence sondy bis-ANS.

5. Diskuze

Tato diplomová práce se věnuje studiu interakcí různých isoform 14-3-3 proteinu s dvojmocnými kationty. V problematice studia 14-3-3 proteinů je tato tematika značně opomíjena. Avšak strukturní studie publikované v posledních letech naznačují, že dvojmocné kationty mohou hrát důležitou roli v modulaci interakcí mezi 14-3-3 proteiny a jejich vazebnými partnery [64]. Proto jsem se rozhodla této problematice více věnovat.

Prvním cílem této diplomové práce byla příprava tří různých isoform 14-3-3 proteinů, a to ječmenné isoformy 14-3-3A, lidské isoformy 14-3-3 ζ a kvasinkové (*S. cerevisiae*) isoformy BMH2. Touto izolací jsem se seznámila s různými typy purifikačních metod, jako je chelatační, aniontová a gelová permeační chromatografie. Lidská isoforma 14-3-3 ζ i kvasinková BMH2 se velice dobře exprimovaly. U všech izolovaných isoform se mi podařilo purifikaci dosáhnout dostatečné čistoty pro další měření. Následně jsem u takto připravených isoform studovala jejich interakce s různými kationty pomocí luminiscenční spektroskopie.

Druhým cílem této práce bylo studium interakcí připravených isoform 14-3-3 proteinů s dvojmocnými kationty. Pro sledování těchto interakcí byla vybrána metoda založená na sledování změn luminiscence kationtů Tb³⁺ navázaných na protein. Kationty Tb³⁺ se velmi dobře váží do vazebných míst Mg²⁺ a Ca²⁺ a zároveň mají vhodné luminiscenční vlastnosti, které umožňují sledovat jejich interakci s proteiny. Luminiscence iontů Tb³⁺ je excitována prostřednictvím rezonančního přenosu energie (tzv. FRET) z aromatických aminokyselin (Tyr a Trp). Při těchto experimentech tedy excitujeme fluorescenci aminokyselin Tyr a Trp a z těchto fluoroforů následně dochází k přenosu energie na ty ionty Tb³⁺, které jsou navázané na protein a nacházejí se tedy dostatečně blízko k těmto aminokyselinám. Volné ionty Tb³⁺ v roztoku excitovány nejsou, a proto jejich luminiscenci nevidíme.

Nejprve jsem ověřila vazbu kationtů terbia Tb³⁺ na rostlinnou isoformu 14-3-3A. U rostlinných isoform již byla tato metoda úspěšně použita skupinou G. Athwala a výsledky byly publikovány [37]. Konkrétně byla studována vazba terbia i ostatních dvojmocných kationtů u rostlinné isoformy GF14 ω z *Arabidopsis*

thaliana. V případě ječmenné isoformy 14-3-3A jsem postupovala obdobným způsobem. V případě ověření vazby dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+}) jsem použila alternativní přístup. Abych mohla pozorovat interakci jednotlivých dvojmocných kationtů se 14-3-3 proteiny, sledovala jsem vytěsňování navázaných iontů Tb^{3+} zvyšující se koncentrací dvojmocných kationtů. Stejnou informaci jsem získala i dalším způsobem a to titrací 14-3-3 proteinu roztokem TbCl_3 v přítomnosti dvojmocných kationtů (5 mM CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2), které se již na protein navázaly [37]. Tento postup jsem také prováděla, abych vyloučila možnost narušení struktury 14-3-3 proteinů v přítomnosti vysokých koncentrací iontů terbia Tb^{3+} (tato data nejsou v této diplomové práci uvedena). Tato měření potvrdila, že v přítomnosti 5 mM kationtů Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+} je vazba Tb^{3+} signifikantně nižší (důsledek kompetice kationtů o vazebné místo). Jako kontrola zde sloužila titrace samotného 14-3-3 proteinu roztokem TbCl_3 v nepřítomnosti dvojmocných kationtů.

Vazba dvojmocných kationtů na rostlinné isoformy 14-3-3 proteinů je již známa několik let a je znám i vliv této vazby na funkci těchto proteinů. Konkrétně se jedná o ovlivnění inhibice aktivity nitrátreduktasy regulovanou prostřednictvím 14-3-3 proteinů, která je v případě vazby dvojmocných kationtů účinnější [38].

Koncentrace vápenatých kationtů se u rostlin pohybuje v rozmezí 0,1 – 10 μM a vápník je pátým nejrozšířenějším prvkem, po uhlíku, vodíku, kyslíku a draslíku. Největší množství se nachází v centrální vakuole, cytoplazmatická hladina Ca^{2+} je menší. Transport vápenatých kationtů probíhá difúzí a zajišťují ho cytoplazmatické přenašeče, plazmodezmata [32].

Mé výsledky ukázaly, že ječmenná isoforma 14-3-3A je také schopna vázat ionty Mg^{2+} a Ca^{2+} podobně jako rostlinná isoforma GF14 ω [37]. Athwal a kol. [37] dosáhli v případě titrace GF14 ω ionty Tb^{3+} v přítomnosti 5 mM CaCl_2 , MgCl_2 přibližně 35% redukce intenzity luminiscence vzhledem ke kontrolní hodnotě (titrace Tb^{3+} v nepřítomnosti dvojmocných kationtů). Já jsem v podobném experimentu (založeném na vytěsňování Tb^{3+} iontů dvojmocnými kationty) dosáhla přibližně 30% redukce intenzity luminiscence Tb^{3+} (viz. graf č.4 na straně 54). U této isoformy jsem také byla schopna detekovat konformační změnu indukovanou vazbou kationtů na 14-3-3 protein. Pozorovala jsem nárůst intenzity fluorescence sondy bis-ANS jako funkce koncentrace dvojmocných kationtů. Sonda bis-ANS se

váže na hydrofobní povrchy, proto lze nárůst intenzity interpretovat jako důkaz konformační změny způsobené vazbou kationtů.

Interakce savčích či kvasinkových isoform 14-3-3 proteinu s dvojmocnými kationty nebyly zatím ještě nikým studovány. Získané výsledky ukazují, že jak lidská isoforma 14-3-3 ζ , tak i kvasinková isoforma BMH2 dvojmocné kationty váží, ale pravděpodobně s podstatně nižší afinitou než rostlinná isoforma 14-3-3A (posuzována jednak podle schopnosti vázat ionty Tb³⁺ a dále podle schopnosti vytěsnění navázaných iontů Tb³⁺, viz. grafy č. 2, 3, 5, 6 na straně 52, 53, 55). U těchto isoform jsem také měřila vazbu bis-ANS a předběžná data naznačují, že i u těchto isoform dochází ke konformační změně v důsledku vazby dvojmocných kationtů. Tato data jsem v této práci neuvedla, protože se jedná zatím pouze o předběžné výsledky, které ještě bude nutno ověřit.

Experimenty s rostlinnou isoformou GF14 ω ukázaly, že vazebné místo pro dvojmocné kationty se nachází v oblasti ohybu 8 [40]. Tento ohyb obsahuje sekvenci, která připomíná tzv. EF-hand motiv. Jedná se o jediné experimentálně potvrzené místo pro dvojmocné kationty u 14-3-3 proteinů. Pozorovaná vazebná afinita iontů Ca²⁺ a Mg²⁺ pro toto místo není příliš vysoká a vzhledem k cytozolické koncentraci těchto iontů nebude *in vivo* v tomto místě k vazbě Ca²⁺ nebo Mg²⁺ s největší pravděpodobností docházet. Je však nutné si uvědomit, že sekvence ohybu 8 nemusí reprezentovat celé vazebné místo pro dvojmocné kationty. Je velmi pravděpodobné, že kompletní vazebné místo se vytváří až se vznikem komplexu 14-3-3 proteinu s vazebným partnerem. Ohyb 8 se těchto interakcí účastní a takto vzniklé vazebné místo (či místa) mohou vázat dvojmocné kationty s podstatně vyšší afinitou [64].

Jak má měření, tak i výsledky publikované jinými skupinami ukázaly, že ani jeden kov není schopen zredukovat intenzitu luminiscence na výchozí hodnotu [37,65]. Nejúspěšnější jsou v tomto případě ionty manganu, které nejsou tolik náročné na geometrické uspořádání pro možnou koordinaci, jak je tomu v případě iontů vápníku a hořčíku, a váží se s největší afinitou. Podstata této nevytěsnitelné terbiové luminiscence je zatím nevysvětlena. Je možné, že se jedná o ionty Tb³⁺, které jsou prostřednictvím nespecifických elektrostatických sil navázané někde na povrchu proteinu v blízkosti aromatických aminokyselin, čímž dochází k jejich excitaci. Tyto ionty však nejsou navázané do specifických vazebných míst, a proto

je nelze vytěsnit. Toto je však pouze spekulace, pro kterou nemám žádné experimentální důkazy.

Dalším pokračováním tohoto projektu by mohla být mutageneze klíčových aminokyselin v ohybu 8, které jsou důležité pro koordinaci iontů. Touto mutagenezí bychom eliminovali koordinaci ve vazebném místě. To by se projevilo sníženou intenzitou při titraci terbiem v porovnání s řetězcem bez mutace.

6. Závěr

1. Úspěšně jsem exprimovala a vyperifikovala ječmennou isoformu 14-3-3A s výtěžkem 1,42 mg / 1 l LB média, lidskou isoformu 14-3-3 ζ s výtěžkem 10,4 mg / 1 l LB média a kvasinkovou isoformu BMH2 s výtěžkem 6,7 mg / 1 l LB média.
2. Dokázala jsem, že všechny tři připravené isoformy jsou schopny vázat ionty Tb³⁺.
3. Zjistila jsem, že ječmenná isoforma 14-3-3A váže ionty Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ s podobnou afinitou jako isoforma GF14 ω z huseníčku rolního. Dále jsem zjistila, že vazba těchto dvojmocných kationtů způsobuje konformační změnu molekuly 14-3-3A.
4. Ukázala jsem, že lidská isoforma 14-3-3 ζ a kvasinková isoforma BMH2 také váží ionty Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺. V případě těchto isoform je však vazba dvojmocných kationtů podstatně slabší než u ječmenné isoformy 14-3-3A.

7. Použitá literatura

- 1) Dougherty, M.K., Morrison, D.K.: J. Cell Sci. 117, 1875-1884 (2004)
- 2) Sehne, P.C., DeLille, J.M., Ferl, R.J.: Plant Cell, 339-354 (2002)
- 3) Moore, B.W., McGregor, D.: J. Biol. Chem. 240, 1647-1653 (1965)
- 4) Ferl, R.J., Manak, M.S., Reyes, M.F.: Gen. Biol. 3 (7), 3010,1-3010,7 (2002)
- 5) Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A.: FEBS Letters 368, 55-58 (1995)
- 6) Rosenquist, M.: Braz. J. Med. Biol. Res. 36, 403-408 (2003)
- 7) Comparot, S., Lingiah, G., Martin, T.: J. Exp. Bot. 54, 595-604 (2003)
- 8) Lottersberger, F., Panza, A., Lucchini, G., Piatti, S., Longhesei, M.P.: Genetics 106, 661-675 (2006)
- 9) Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R.J., Sommarin, M., Larsson, Ch.: J. Mol. Evol. 51, 446-458 (2000)
- 10) Yaffe M.B.: FEBS Letters 513, 53-57 (2002)
- 11) Obsil, T., Girlando, R., Klein, D.C., Granuly, C., Dyda, F.: Cell 105, 257-267 (2001)
- 12) Benzinger, A., Popowicz, G.M., Joy, J.K., Majumdar, S., Holak, T.A., Hermeking, H.: Cell Res. 15, 219-227 (2005)
- 13) Wilker, E.W., Grant, R.A., Artim, S.C., Yaffe, M.B.: J. Biol. Chem. 280, 18891-18898 (2005)
- 14) Mhaweck, P.: Cell Res. 15, 228-236 (2005)
- 15) Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundström, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M.: P. Natl. Acad. Sci. USA 103, 17237-17242 (2006)
- 16) Silhan, J., Obsilova, V., Vecer J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T.: J. Biol. Chem. 279, 49113-49119 (2004)
- 17) Gardino, A.K., Smerdon, S.J., Yaffe, M.B.: Semin. Cancer. Biol. 16, 173-182 (2006)
- 18) Shen, W., Clark, A.C., Huber, S.C.: Plant J. 34, 473-484 (2003)
- 19) Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Patel, Y.: J. Biol. Chem. 270, 5706-5709 (1995)

- 20) Tzivion, G., Avruch, J.: *J. Biol. Chem.* 277, 3061-3064 (2002)
- 21) Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y.: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7084-7088 (1988)
- 22) Rubio, M.P., Geraghty, K.M., Wong, B.H.C., Wood, N.T., Campbell, D.G., Morrice N., Mackintosh, C.: *Biochem. J.* 379, 395-408 (2004)
- 23) Tyivion, G., Avruch, J.: *J. Biol. Chem.* 277, 3061-3064 (2002)
- 24) Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, Smerdon, S.J., Cantley, L.C.: *Cell* 91, 961-971 (1997), citace dle 1)
- 25) Sehne, P.C., DeLille J.M., Ferl, R.J.: *Plant Cell* 14, 339-354 (2002)
- 26) Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., Obsil, T.: *Biochemistry* 44, 11608-11617 (2005)
- 27) Tzivion, G., Luo, Z., Avruch, J.: *J. Biol. Chem.* 275, 29772-29778 (2000)
- 28) Aitken A.: *Plant Mol. Biol.* 50, 993-1010 (2002), citace dle 63)
- 29) Guihua, L., Sehne, P.C., Ferl, R.J.: *Plant Cell* 6, 501-510 (1994)
- 30) Lee, L., Corson, D.C., Sykes, B.D.: *Biophys. J.* 47, 139-142 (1985)
- 31) Fullmert, C.S., Wasserman, R.H.: *J. Biol. Chem.* 256, 5669-5674 (1981)
- 32) Gifford, J.L., Walsh, M.P., Vogel, H.J.: *Biochem. J.* 405, 199-221 (2007)
- 33) Strynadka, N.C., James, M.N.: *Annu. Rev. Biochem.* 58, 951-998 (1989) citace dle 32)
- 34) Godzik, A., Sander, C.: *Protein Eng.* 2, 589-596 (1989) citace dle 32)
- 35) Yan, B.X., Sun, Y.Q.: *J. Biol. Chem.* 272, 3190-3194 (1997)
- 36) Cook, W.J., Ealick, S.E., Babu, Y.S., Cox, J.A., Vijay-Kumar, S.: *J. Biol. Chem.* 266, 652-656 (1991)
- 37) Athwal, G.S., Huber, J.L., Huber, S.C.: *Plant Cell Physiol.* 39, 1065-1072 (1998)
- 38) Sinnige, M.P., Roobeek, I., Bunney, T.D., Visser, A.J.W.G., Mol, J.N.M., de Boer, A.H.: *Plant J.* 44, 1001-1009 (2005)
- 39) Athwal, G.S., Huber, S.C.: *Plant J.* 29, 119-129 (2002)
- 40) Sehne, P.C., Laughner, B., Cardasis H., Powell, D., Ferl, R.J.: *Plant Physiol.* 140, 647-660 (2006)
- 41) Athwal, G.S., Huber, J.L., Huber, S.C.: *Plant Physiol.* 118, 1041-1048 (1998)

- 42) Fullone, M.R., Visconti, S., Marra, M., Fogliano, V., Aducci, P.: J. Biol. Chem. 273, 7698-7708 (1998) citace dle 43)
- 43) Manak, M.S., Ferl, R.J.: Biochemistry 46, 1055-1063 (2007)
- 44) wolker, E.W., Grant, R.A., Artim, S.C., Yaffe M.B.: J. Biol. Chem. 280, 18891-1898 (2005)
- 45) http://www.dojindo.com/newsletter/review_matsumoto.html 2.2.2008
- 46) Miller, T.L., Bennett, L.W., Spatz, D.S.: Ohio J. Sci. 86 (4), 140-143 (1986)
- 47) Brittain, H.G., Richardson F.S., Martin, R.B.: J. Amer. Chem. Soc. 98, 8255-8260, (1976)
- 48) Sapsford, K.E., Berti, L., Medintz, I.L.: Angew. Chem. Int. Ed. 45, 4562-4588 (2006)
- 49) <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fret/images/fretintrofigure6.jpg> 2.2.2008
- 50) Perkin Elmer: An Introduction to Phosphorescence Spectroscopy (2000)
- 51) Mulqueen, P., Tingey, J.M., Horrocks, W. DeW. Jr.: Biochemistry 24, 6639-6645 (1985)
- 52) Hogue, Ch.W.V., MacManus, J.P., Barville, D., Szabo, A.G.: J. Biol. Chem. 267, 13340-13347 (1992)
- 53) Dang, Ch.V., Ebert, R.F., Bell, W.R.: J. Biol. Chem. 260, 9713-9719 (1985)
- 54) Allen, J.E., McLendon, G.L: Biochem. Biophys. Res. Commun. 349, 1264-168 (2006)
- 55) <http://www.nature.com/emboj/journal/v19/n6/images/7592235f7.jpg> 3.2.2008
- 56) <http://www.rsc.org/ej/P2/2001/b104796p/b104796p-f2.gif> 3.2.2008
- 57) Reynaldo, L.P., Villafranca, J.J., Horrocks, W.DeW. Jr.: Protein Sci. 5, 2532-2544 (1996)
- 58) Novagen: pET-15b Vector TB045 12/98 – obr. vektoru
- 59) Novagen: Catalog, 178 (2004/2005)
- 60) <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> 8.2.2008
- 61) Gilroy, S., Bethke, P.C., Jones, R.L.: J. Cell Sci. 106, 453-462 (1993)
- 62) Takashi, R., Tunomura, Y., Morales, M.F.: Biochemistry 74, 2334-2338 (1977)

- 63) Aitken, A.: *Semin. Cancer. Biol.* 16, 162-172 (2006)
- 64) Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J.L., Oecking, C.: *Mol. Cell* 25, 427-40 (2007)
- 65) Obsil, T., Hofbauerova, K., Teisinger J.: *FEBS Lett.* 457, 311-315 (1999)

Seznam zkratek

14-3-3 protein.....	bílkovina ovlivňující funkci mnoha nitrobuňčných proteinů
Å.....	angström (jednotka délky $1 \cdot 10^{-10}$ m)
Amp.....	antibiotikum ampicilin
bis-ANS.....	4,4'- bis (1-anilinaftalen-8-sulfonát)
Cdc25C.....	peptid odvozený od fosfatasy Cdc25C
Da (Daltony).....	jednotky hmotnosti.(Jeden Da představuje molární hmotnost atomu vodíku, tj. přibližně $1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
DEAE.....	diethylaminoethyl
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
EF-hand.....	motiv 2' struktury proteinů (helix-ohxb-helix)
EDTA.....	kyselina ethylendiamintetraoctová
FPLC.....	fast protein liquid chromatography
FRET.....	fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie
IPTG.....	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
JNK.....	kinasa
M.....	jednotka koncentrace, ekvivalentní molární koncentrací ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
pAANAT.....	fosforylovaná forma serotonin N-acetyltransferasy
RNA.....	ribonukleová kyselina
SDS.....	dodecylsulfát sodný
TEMED.....	N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin
TERT.....	katalytická podjednotka telomerasy
Tris.....	tris (hydroxymethyl) aminoethan
w/v.....	hmotnostní zlomek

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka