

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Studium strukturních rozdílů mezi isoformami 14-3-3 proteinů

Study of Structural Differences among 14-3-3 Protein Isoforms

Diplomová práce

Chemie životního prostředí

Školitel: doc. RNDr Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2010

Bc. Eva Macáková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D., za trpělivost, cenné rady a pomoc poskytnutou ohledně mé práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Laboratoře biofyzikální chemie na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK a všem členům Oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zvláště bych ráda poděkovala Mgr. Daně Veisové, RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. a Ing. Janu Teisingerovi, CSc. za pomoc a rady poskytnuté během mé práce.

Dále bych ráda poděkovala prof. Martinu Hofovi, Dr. rer. nat. DSc. z Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR a jeho skupině za spolupráci, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zejména bych chtěla poděkovat Mgr, Janu Sýkorovi, Ph.D., se kterým jsem na své práci spolupracovala.

Ráda bych poděkovala své rodině a svému příteli za podporu a pochopení v průběhu svého studia. Speciální dík patří mému kamarádovi Bc. Janu Hájkovi za pomoc s grafickou úpravou diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Obsah

Seznam zkratek	1
1 ÚVOD	3
2 Teoretická část	4
2.1 14-3-3 proteiny.....	4
2.2 Struktura 14-3-3 proteinů.....	4
2.2.1 Obecné vlastnosti	4
2.2.2 Motivy pro vazbu 14-3-3 proteinů	6
2.2.3 C-koncový segment.....	7
2.2.4 Ohyby mezi helixy H1-H9.....	9
2.3 Isoformy 14-3-3 proteinů	11
2.3.1 Isoformy 14-3-3 proteinů v organismech.....	12
2.4 Funkce 14-3-3 proteinů	13
2.4.1 Vazba proteinů 14-3-3 s vazebným partnerem	13
2.4.2 Regulace 14-3-3 proteinů.....	16
3 Cíle práce	18
4 Praktická část	19
4.1 Materiál	19
4.1.1 Chemikálie	19
4.1.2 Materiál	20
4.2 Přístroje	21
4.3 Metody	23
4.3.1 Transformace kompetentních buněk.....	23
4.3.2 Kultivace buněk v 5 ml LB média	24
4.3.3 Isolace plasmidové DNA	24

4.3.4 Horizontální agarosová elektroforesa	25
4.3.5 Sekvence DNA	25
4.3.6 Heterologní exprese proteinů v E. coli.....	26
4.3.7 Sonikace buněk	26
4.3.8 Niklová chelatační chromatografie	27
4.3.9 Aniontová chromatografie	28
4.3.10 Gelová permeační chromatografie	29
4.3.11 Vertikální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).....	29
4.3.12 Dialýza	31
4.3.13 Zakoncentrování roztoku proteinů	31
4.3.14 Stanovení koncentrace proteinů	31
4.3.15 Používané peptidy	32
4.3.16 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	33
4.3.17 Stacionární měření intenzity fluorescence-vazebná esej	35
5 Výsledky	38
5.1 Exprese a purifikace proteinů	38
5.1.1 Niklová chelatační chromatografie	38
5.1.2 Aniontová chromatografie	41
5.1.3 Gelová permeační chromatografie	45
5.2 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	49
5.3 Měření excitačních a emisních spekter peptidu pRaf-259	50
5.4 Stacionární měření intenzity fluorescence-vazebná esej	51
6 Diskuse.....	55
6.1 Exprese a purifikace proteinů	55
6.2 Fluorescenční korelační spektroskopie	56
6.3 Stacionární měření intenzity fluorescence	57

6.4 Srovnání výsledků z metod FCS a stacionárního měření intenzity fluorescence	57
7 Závěr	59
8 Seznam použité literatury.....	60

Seznam zkratek

14-3-3A G216S	ječmenná isoforma A s mutací na pozici 216 kde má místo glycinu serin
14-3-3A WT	ječmenná isoforma A, divoký typ (z anglického wild type)
14-3-3ζ S207G	lidská isoforma ζ s mutací na pozici 207 kde má místo serinu glycin
14-3-3ζ WT	lidská isoforma ζ, divoký typ (z anglického wild type)
AANAT	serotonin <i>N</i> -acetyltransferasa (z angl. arylalkylamine <i>N</i> -acetyltransferase)
Ahx	6-aminohexanová kyselina
BAD	protein „Bcl-2-associated death promoter
Bcr	protein s kinasovou aktivitou (z angl. breakpoint cluster region)
CD81	protein „cluster of differentiation 81“
DEAE	diethylaminoethyl
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina (z angl. ethyldiamintetraacetic acid)
FITC	fluoresceinisothiokyanát
H8-H9	ohyb mezi helixy H8 a H9
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktosid
NLS	jaderný lokalizační signál
PBS	fosfátový pufr se solí

pRaf-259	fosforylovaný peptid odvozený od vazebného místa kolem S259 Raf-1 kinasy
Raf	homolog myšského virového onkogenu leukémie v-raf-1
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolution per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	vertikální akrylamidová elektroforesa v redukujícím prostředí dodecylsíránů sodného
TBE	pufr obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

Proteiny 14-3-3 jsou regulační proteiny, které se vyskytují v mnoha isoformách napříč všemi eukaryotickými organismy. Vážou mnoho různých substrátů, čímž regulují celou řadu buněčných dějů včetně buněčného cyklu, transkripce, kontroly genové exprese či programované buněčné smrti. Proteiny 14-3-3 jsou vysoce konzervované i v rámci mezidruhových isoform a mají mnoho různých funkcí v závislosti na různých druzích vázaného substrátu, hlavním mechanismem je buď změna aktivity, nebo vnitrobuněčné lokalizace vazebného partnera proteinu 14-3-3. Proteiny 14-3-3 vážou mnoho druhů ligandů, které se účastní mnoha různých signálních drah [1]. Způsob regulace vazebných vlastností proteinů 14-3-3 je stále předmětem výzkumu.

Molekuly proteinu 14-3-3 mají dimerní strukturu a každý monomer je tvořen devíti antiparalelními α -helixy, celková struktura dimeru je velmi rigidní. Přesto mají proteiny 14-3-3 veliké množství vazebných partnerů a různé isoformy vykazují různou vazebnou specifitu [2].

V této práci jsem se zaměřila na studium vlastností ohybu mezi osmým a devátým α -helixem (tzv. H8-H9 ohyb) u vybraných savčích a rostlinných isoform. Tato práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Lucie Kohoutové, která byla obhájena na katedře biochemie v roce 2008 [3].

2 Teoretická část

2.1 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou rodina regulačních kyselých proteinů, které se nacházejí ve všech eukaryotických organismech [4]. Tím, že mění konformaci svých vazebných partnerů, se účastní mnoha biologicky důležitých procesů, jako regulace buněčného cyklu, metabolismu, apoptosy a kontroli genové transkripce [4, 5].

Název pro 14-3-3 proteiny vznikl podle elučního a migračního vzorce při dvou dimensionální DEAE-celulosové chromatografii a škrobové gelové elektroforese [6]. Mají velikost 28 až 33 kDa a tvoří dimery. 14-3-3 proteiny jsou vysoce konzervované napříč velkým množstvím eukaryotických druhů, z nichž mnoho organismů exprimuje více isoformem.

Je známo více než tři sta proteinů, které interagují s 14-3-3 včetně různých protein-kinas (PKC, Raf, KSR, Bcr, ASK 1), receptorových proteinů (glukokortikoidový receptor, GABA receptor, insulin-like růstový faktor), enzymů (tyrosin a tryptofan hydroxylasy, nitrátoreduktasa, serotonin *N*-acetyl transferasa), molekuly podporující strukturu (IRS-1, calmodulin), proteiny regulující buněčný cyklus a kontrolující genovou expresi (TATA box vazebné proteiny) a proteiny které kontrolují průběh apoptosy (BAD, A20) [1]. Mnoho interakcí však stále zůstává neobjasněno.

2.2 Struktura 14-3-3 proteinů

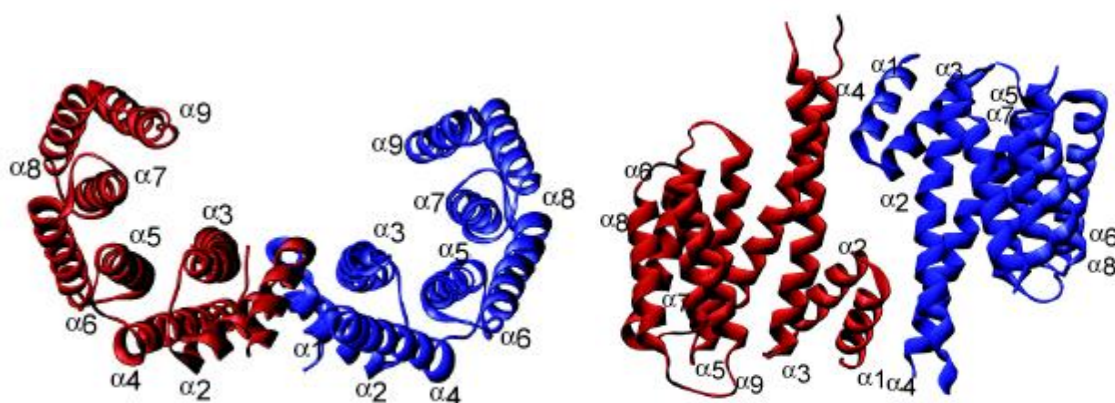
2.2.1 *Obecné vlastnosti*

Všechny terciární a kvarterní struktury lidských isoformem už byly vyřešeny [7]. Z rostlinných isoformem byla doposud vyřešena pouze struktura 14-3-3-like protein z *Nicotiana tabacum* [8] a několik 14-3-3 proteinů bylo vykrytalizováno pouze s jejich vazebným partnerem, případně od něj odvozeným peptidem [7, 8, 9, 10, 11].

Monomery 14-3-3 proteinů jsou tvořeny devíti antiparalelními helixy, které jsou označovány H1-H9. Helixy jsou propojeny různě dlouhými ohyby. Helixu H1 předchází různě dlouhý N-koncový segment a za helixem H9 následuje C-koncový segment. Zboku připomíná monomer písmeno L [7].

Molekuly 14-3-3 proteinů se vyskytují jako dimery [12]. Dimery vytváří elektrostatické a hydrofobní interakce mezi aminokyselinami z helixů H1 a H2 z jednoho monomeru a aminokyselinami z helixů H3 a H4 druhého monomeru, homodimer pak z boku připomíná písmeno U [7]. Spojením dvou monomerů vzniká prostor, který je asi 35 Å široký, 35 Å hluboký a asi 20 Å vysoký. V dimeru jsou dva vazebné žlábký, do kterých se vážou ligandy a jsou orientovány naproti sobě [7]. Homodimer má osu symetrie C₂ [13]. Aminokyseliny, ležící uvnitř vazebného žlábký, jsou zakonzervované napříč isoformami, zatímco na povrchu dimeru, N-koncovém segmentu, C-koncovém segmentu a v některých ohybech se aminokyseliny značně liší [14].

Dimery se rozdělují na homodimery (dimer ze dvou stejných isoform), které se vyskytují např. u lidských isoform 14-3-3 σ a γ a heterodimery (dimer ze dvou různých isoform), kterým dávají přednost např. lidská isoforma ϵ , nebo kvasinkové isoformy BMH1a BMH2 [7, 12].



Obr. 2.2.1.1: Krystalová struktura homodimeru isoformy 14-3-3 σ .

Na obrázku jsou vyznačené jednotlivé helixy ($\alpha 1$ - $\alpha 9$), jeden monomer je zobrazen červeně a druhý modře [15].

2.2.2 Motivy pro vazbu 14-3-3 proteinů

Na 14-3-3 proteiny se vazební partneři vážou nejen přes sekvenci obsahující fosforylovaný serin nebo threonin [9, 13, 16, 17], ale byla nalezena i řada nefosforylovaných vazebných partnerů [8, 10]. Všichni vazební partneři využívají k vazbě zakonzervovaný vazebný žlábek.

Vazebný žlábek je tvořen helixy H3, H5, H7 a H9, z nichž helixy H3 a H5 obsahují především polární, a helixy H7 a H9 hlavně hydrofobní aminokyseliny [14]. Interakci s fosforylovaným serinem nebo threoninem zprostředkovávají tři pozitivně nabitě aminokyseliny, které jsou zakonzervované v jednom místě vazebného žlábků. Vazebný žlábek využívají všichni vazební partneři 14-3-3 proteinů [7].

Ligandy se dělí na čtyři vazebné typy podle sekvence zodpovědné za vazbu ke 14-3-3 proteinu.

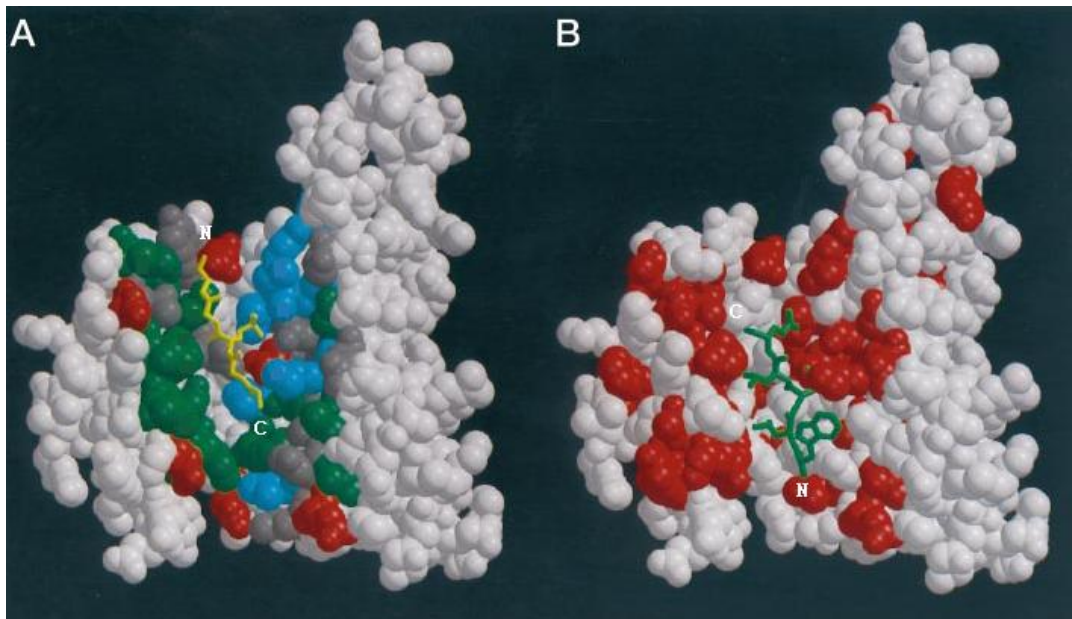
Typ I (elektrostatické interakce) má sekvenci RSX(pS/pT)XP, kde X je libovolná aminokyselina a pS/pT je fosforylovaný serin nebo threonin. Tuto sekvenci obsahuje např. Raf-1 kinasa nebo nitrátreduktasa [18].

Typ II (elektrostatické interakce) má sekvenci RX(Y/F)X(pS/pT)XP, kde X je libovolná aminokyselina a pS/pT je fosforylovaný serin nebo threonin [17]. Prolin na pozici +2 od fosforylovaného serinu nebo threoninu pravděpodobně zajišťuje pohyb peptidového řetězce ven z vazebného žlábků. Tuto sekvenci obsahuje např. serotonin *N*-acetyltransferasa [19].

Typ III (elektrostatické interakce) má sekvenci p(S/T)X₁₋₂-COOH, kde X je libovolná aminokyselina [20]. Tato sekvence se vyskytuje např. u H⁺-ATPasy nebo serotonin *N*-acetyltransferasy a zahrnuje fosforylované i nefosforylované C-koncové sekvence proteinů [9, 19, 20, 21].

Typ IV (hydrofobní interakce) je vazba peptidu odvozeného od ExoS s ADP-ribosyl transferasovou aktivitou z *Pseudomonas aeruginosa*. Jeho N-koncový segment je ohnut z vazebného žlábků a jeho sekvence probíhá opačně než sekvence většiny ligandů [8].

Kromě čtyř výše uvedených typů je známa ještě vazba s uměle syntetizovaným nefosforylovaným peptidem R18 přes sekvenci WLDLE, který je ve vazebném žlábků orientován opačně než většina ostatních ligandů [8, 10].



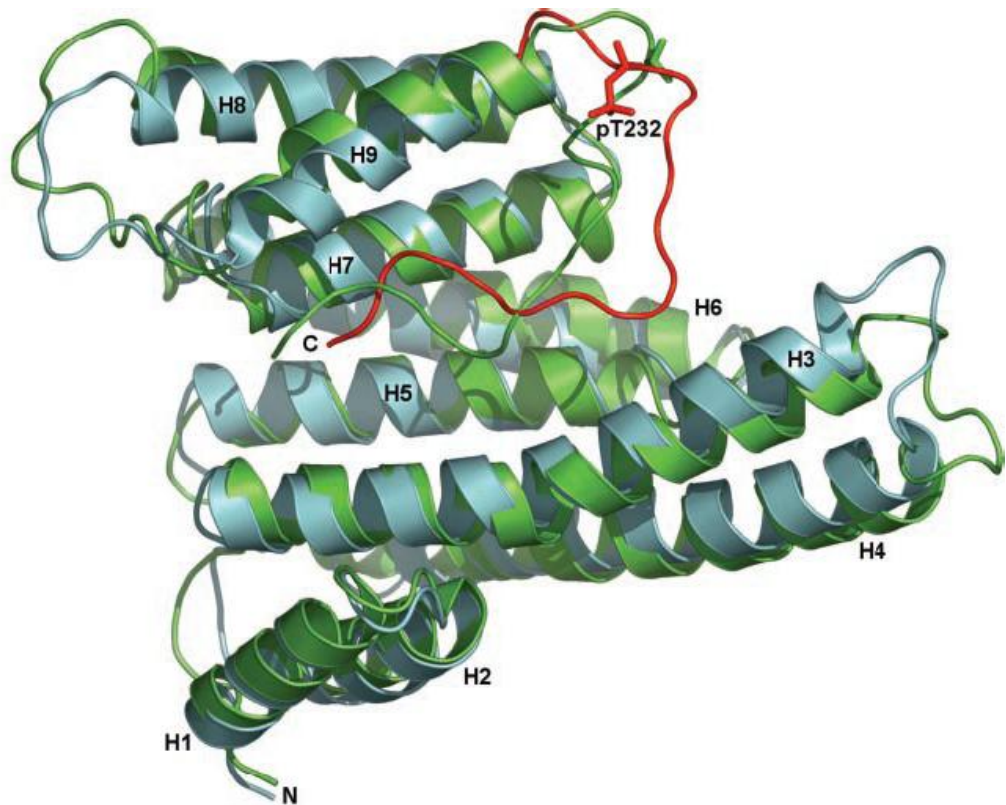
Obr. 2.2.2.1: Vazebný žlábek monomeru 14-3-3 ζ s navázanými peptidy pRaf-259 (A) a R18 (B).

Monomery jsou znázorněny v kuličkové reprezentaci, peptidy v tyčinkové reprezentaci. U peptidů je vyznačen N a C-konec.

- A) Ve vazebném žlábků jsou barevně odlišeny aminokyseliny (modré-basické, červené-kyselé, zelené-hydrofóbní, tmavě šedé-polární). Peptid pRaf-259 je znázorněn žlutě, zobrazen je jen hlavní řetězec a fosforylovaný serin.
- B) Ve vazebném žlábků jsou červeně vyznačeny konzervované aminokyseliny. Motiv WLDLE z peptidu R18 je označen zeleně [10].

2.2.3 C-koncový segment

Za helixem H9 ihned následuje různě dlouhý řetězec aminokyselin, který se ve své sekvenci nejvíce liší napříč isoformami. Tato oblast nevykazuje žádnou elektronovou densitu v krystalových strukturách, nejspíš proto, že C-koncový segment je velice pohyblivý a zaujímá velké množství konformací, což způsobuje neuspořádanost v krystalu (obr. 2.3.1) [14, 22]. Mnoho studií ukázalo, že otáčením se zpět do místa vazby peptid-protein může C-konec fungovat jako molekulový regulátor vazby 14-3-3-ligand [23]. Variabilita v C-koncovém segmentu je považována za jednu z příčin specifity isoform 14-3-3 proteinů.



Obr. 2.2.3.1: C-koncový segment (označený červeně).

Pozice C-koncového segmentu je v tomto případě ovlivněna fosforylací Thr232 [22].

C-koncový segment se značně odlišuje mezi isoformami jak sekvencí, tak různou délkou. Savčí isoformy mají C-konec kratší než rostlinné i kvasničné isoformy [24]. Kromě krystalografie byl C-koncový segment zkoumán také fluorescenčním měřením a molekulárně dynamickými simulacemi, které ukázaly, že C-konec je uložený ve vazebném žlábků, odkud je vytěsněn ligandem [14, 25], čímž se změní jeho konformace a pohyblivost [24]. To také ukazuje, že C-koncový segment má funkci autoinhibitoru a zabraňuje nevhodnému ligandu navázání se do vazebného žlábků [24, 25, 26].

Při odstranění 20 aminokyselin z C-koncového segmentu se zlepšila inhibice fosforylované nitrát reduktasy u 14-3-3 ω , odstranění dalších pěti aminokyselin způsobilo naopak neschopnost nitrátreduktasu inhibovat [27]. C-koncový segment je tedy ovlivňován posttranslačními modifikacemi jako je zkrácení řetězce, a dále zprostředkovává interakce s ostatními buněčnými faktory a tím ovlivňuje aktivitu 14-3-3 proteinů [28].

Při odstranění C-koncového segmentu ze 14-3-3ζ byl protein schopen vázat se na Raf1 a BAD s mnohem větší afinitou než v původní, nezkrácené formě [24]. U isoformy 14-3-3c z tabáku také došlo ke zlepšení afinity k vazebnému partnerovi sacharose-6-fosfátsynthase při odstranění části C-koncového segmentu [29]. Liu et al. zkoumali C-konec u lidských isoform a ukázali, že např. u lidské isoformy 14-3-3τ se při odstranění patnácti aminokyselin z C-koncového segmentu vazba s Raf-1 kinasou a Cbl proteinem naopak zhorší, ale při odstranění jenom dvou nebo pěti aminokyselin zůstala afinita neovlivněna [30], stejně jako odstranění devíti aminokyselin z C-koncového segmentu 14-3-3η neovlivnilo vazbu k Raf-1 kinase a Bcr proteinu [31].

U ječmenné isoformy 14-3-3A dochází k odstranění části C-koncového segmentu přirozeně. Deset nebo dvanáct aminokyselin je odštěpeno při klíčení embrya a v rostlině jsou potom přítomny obě formy 14-3-3 proteinu, jejichž zastoupení se liší v různých částech rostliny. U dalších ječmenných isoform nebylo toto štěpení pozorováno [28].

2.2.4 Ohyby mezi helixy H1-H9

Spolu s C-koncovým segmentem a N-koncovým segmentem jsou některé ohyby mezi helixy rovněž mezi jednotlivými isoformami odlišné, což vede k isoformové specifitě.

Ohyb H1-H2 je zakonzervovaný u všech isoform, rostlinných i savčích [7].

Ohyb H2-H3 se mezi isoformami liší sekvencí aminokyselin i délkou [32].

Ohyb H3-H4 je odlišný u lidských isoform, kde se v helixu H3 u některých isoform vyskytuje fosforylační místo Ser58. Fosforylace na místě Ser58 byla objevena u isoform 14-3-3β, 14-3-3η a 14-3-3ζ [5]. Fosforylace na tomto místě způsobuje, že se rozpadá dimer na monomery, toto fosforylační místo tedy leží na rozhraní monomerů [33].

Ohyb H4-H5 je konzervovaný napříč isoformami. U lidské isoformy 14-3-3σ byl objeven kation, vázaný přes histidinový zbytek tohoto ohybu. Na stejném místě se histidin nachází i u rostlinných isoform [12].

Ohyb H5-H6 je konzervovaný u vyšších rostlin.

Ohyb H6-H7 je konzervován u vyšších rostlin i u kvasinek. Podle reakcí s protilátkami se předpokládá, že se ohyby H5-H6 a H6-H7 liší mezi isoformami ze dvou evolučních skupin z huseníčku rolního [34].

Ohyb H7-H8 je důležitý zejména pro lidské isoformy. Nachází se zde fosforylační místo Ser184, na kterém je fosforylován 14-3-3 ζ , 14-3-3 β a 14-3-3 σ [5].

Ohyb H8-H9 bude popsán v samostatné kapitole.

Ohyb H9 předchází variabilnímu C-koncovému segmentu. U lidských isoform 14-3-3 ζ a 14-3-3 τ se zde nachází fosforylační místo T232/S232. Toto místo může být fosforylováno kaseinkinasou I α nebo Bcr kinasou [35, 36] a tato fosforylace ovlivňuje konformaci C-koncového segmentu 14-3-3 ζ [22]. K fosforylaci místa Ser234 dochází u kvasničných isoform a také některých rostlinných isoform [37].

2.2.4.1 Ohyb H8-H9

Ohyb H8-H9 se nachází blízko vazebného žlábků. Ohyb obsahuje motiv „EF hand-like“, což znamená helix-otáčka-helix, u tohoto ohybu je však motiv otočený. Ohyb H8-H9 je nejdelší ze všech ohybů 14-3-3 proteinů, tvoří ho 12 aminokyselin o sekvenci: LD(T/S)L(G/S/N)E(E/D)SYKDS. V přítomnosti aminokyselinového zbytku G, S nebo N se jednotlivé isoformy liší, všechny tři najdeme u rostlinných isoform, zatímco u lidských se vyskytuje jen serinový nebo asparaginový aminokyselinový zbytek.

Ohyb H8-H9 dokáže vázat ionty kovů. Tento jev byl potvrzen u 14-3-3 ω z huseničky rolního [26, 27] a je pravděpodobné, že se vyskytuje i u dalších isoform. Přítomnost kationtů Ca²⁺ a Mg²⁺ ovlivňuje vazbu peptidů odvozených od nitrátoreduktasy a H⁺-ATPasy z plazmatické membrány, kdy s rostoucí koncentrací kationtů roste afinita k ligandům. Pro inhibici nitrátoreduktasy isoformou hv 14-3-3A je přítomnost dvoumocného kationtu nutná, zatímco ostatní ječmenné isoformy (hv 14-3-3B a hv 14-3-3C) inhibují nitrátoreduktasu i bez přítomnosti dvoumocných kationtů [18].

Lze předpokládat, že vazba dvoumocného kationtu do ohybu H8-H9 zapříčiní strukturní změny 14-3-3 proteinu, při kterých dojde ke změně konformace C-koncového segmentu [26, 27, 34]. Protože v ječmenné isoformě 14-3-3A se v H8-H9 ohybu vyskytuje glycinový zbytek, uvažuje se, zda to neovlivňuje strukturní změny [34].

Kromě iontů kovů se do H8-H9 ohybu vážou i samostatné ligandy. Bylo ukázáno, že H8-H9 ohyb se podílí na vazbě serotonin-*N*-acetyltransferasy (AANAT) [9], peptidu odvozeným od ExoS [8] a bylo ukázáno, že 14-3-3 σ se skrz ohyb H8-H9 účastní na vazbě ligandu Cdc25C [27].

U ječmenných isofořem byla pozorována specifita jednotlivých isofořem k nitrátreduktase. Hv 14-3-3A, která v H8-H9 ohybu obsahuje na místě 216 glycinový zbytek, nitrátreduktasu téměř neinhoboala na rozdíl od isofořem hv 14-3-3B a hv 14-3-3C, které mají na místě 216 serinový zbytek. Když byl cílenou mutagenezí do hv 14-3-3A vnesen serin na místo G216, vedlo to u této isoformy ke srovnatelné schopnosti inhibice nitrátreduktasy jako u druhých dvou isofořem [18]. U savčích isofořem se glycin v H8-H9 ohybu nevyskytuje, což by mohlo znamenat, že přítomnost této aminokyseliny může hrát roli ve specifitě rostlinných isofořem [34].

Bylo experimentálně prokázáno, že H8-H9 ohyb ovlivňuje specifitu isofořem [18, 12, 13, 29, 32, 43], ačkoli veškeré molekulární mechanismy nejsou známy.

2.3 Isoformy 14-3-3 proteinů

14-3-3 proteiny se vyskytují ve všech eukaryotických organismech, na rozdíl od organismů prokaryotických, ve kterých nebyly objeveny žádné [38]. 14-3-3 proteiny se nalézají napříč celým spektrem eukaryotických organismů, od kvasinek přes rostliny až po savce, a v každém organismu je exprimováno více isofořem. Isoformy si bývají většinou velice podobné, ačkoli se nejedná o tzv. sestřihové (splicing) varianty, naopak isoformy jsou kódovány geny na různých chromozomech [38]. Proč existuje takové množství navzájem si tolik podobných isofořem zůstává stále otázkou.

Mezi všemi isoformami napříč všemi organismy existuje vysoká konzervovanost ve vazebném místě, místech pro tvorbu dimeru a stabilizaci terciární struktury. Ve vztahu ke svým ligandům jsou isoformy většinou vysoce specifické. Rozdíly mezi isoformami způsobuje jejich odlišná struktura. Isoformy se liší v zastoupení aminokyselin, díky kterým se liší i rozeznávání a afinita k různým ligandům [12, 17, 18]. Na specifitě se podílí i tvorba heterodimerů či homodimerů, protože v heterodimerech je možno více kombinací a tím pádem je více možností ve specifitě k ligandům [12]. Další způsob ovlivňování specifity isofořem jsou posttranslační modifikace 14-3-3 proteinů, jako např. odštěpování části C-koncového segmentu [28], nebo fosforylace v molekule 14-3-3 proteinů [36, 40].

U některých isofořem bylo zjištěno, že mají podobné vazebné vlastnosti vůči ligandům, např. u *Drosophily melangoster* může nadprodukovaná isoforma 14-3-3ζ částečně nahradit isoformu 14-3-3ε, jejíž nedostatek by mohl vést ke smrti embrya [41],

podobné vlastnosti mají i některé lidské isoformy [13]. Častěji se však isoformy liší v afinitě ke stejnému vazebnému ligandu, jak je tomu u rostlinných i lidských isoform [12, 18]. Z lidských isoform se nejvíce odlišuje 14-3-3 σ , která nedokáže tvořit heterodimery, zatímco většina ostatních isoform ano [18].

2.3.1 Isoformy 14-3-3 proteinů v organismech

Isoformy 14-3-3 proteinů se vyskytují ve všech eukaryotických organismech. Dvě jsou přítomny u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které se označují BMH1 a BMH2 [42] a shodují se v 93% aminokyselinové sekvence. Nejvíce isoform bylo objeveno v rostlinné říši, a to u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), u kterého je známo 13 isoform, ale genů, kódujících 14-3-3 proteiny u něj bylo nalezeno 15 [34, 43].

V této práci jsem se zabývala lidskými a ječmennými isoformami, které jsou popsány níže.

U člověka bylo zatím identifikováno sedm isoform, které se označují písmeny řecké abecedy β , γ , ϵ , ζ , η , τ a σ . Vyskytují se hlavně v mozku, kde tvoří až 1% ze všech rozpustných proteinů. Od isoform β a ζ se v mozku vytvářejí jejich fosforylované formy, které vznikají fosforylací Ser184 (podle isoformy ζ) a označují se α a δ [5, 9]. 14-3-3 proteiny se vyskytují i v jiných tkáních, např. isoforma 14-3-3 σ se vyskytuje v epitheliálních buňkách a je tkáňově specifická. Tato isoforma má spojitost s rakovinou [44]. V T-buňkách imunitního systému se vyskytuje isoforma 14-3-3 τ , která se v malé míře vyskytuje i v mozku [5].

Ječmen *Hordeum vulgare* obsahuje pět isoform, které se označují velkými písmeny A, B, C, D a E. Obsah těchto isoform se liší v různých částech rostliny. Isoformy se liší ve vazbě k určitým ligandům, např. 14-3-3A není téměř schopný inhibovat nitrát reduktázu narozdíl od ostatních ječmenných isoform, což může být způsobeno rozdílnou aminokyselinovou sekvencí v ohybu H8-H9 [18]. Na obrázku 2.3.1.1 je sekvencí srovnání lidských a ječmenných isoform.

```

14-3-3A_WT  MSTAEATREENVYMAKLAEQAEERYEEMVEFMEKVAKTADV GELTVEERNLLSVAYKNVIG
14-3-3Z_WT  -----MDKNELVQKAKLAEQAEERYDDMAACMKSVTEQG--AELSNEERNLLSVAYKNVVG
              : * * * * * : * : * : * : * * : * * * * * : *
14-3-3A_WT  ARRASWRIISSIEQKEESRGNEAYVASIKEYRTRIETELSKICD GILKLLDShLVPSATA
14-3-3Z_WT  ARRSSWRVWSSIEQKTEG--AEKKQQMAREYREKIETELRDICND VLSLLEKFLIPNASQ
              *** : *** : * * * * * : * : * * * * * : * * : * * * * * : * * : *
14-3-3A_WT  AESKVFYLYLKMKG DYHRYLAEFKAGAERKEAAENTLVAYKSAQDIALADLP THPIRLGLA
14-3-3Z_WT  AESKVFYLYLKMKG DYVRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQEAFEISKKEMQPTHP IRLGLA
              ***** : * * * * * : * : * * * : * : * : * : * : * : * * * * *
14-3-3A_WT  LNFSVFYVEILNSPDRACNLAKQAFDEAIAELDSLGEESYKDS TLMQLLRDNLTLWTSD
14-3-3Z_WT  LNFSVFYVEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDS TLMQLLRDNLTLWTSD
              ***** : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
14-3-3A_WT  NAEEGGDEIKEAASKPEGE GHS
14-3-3Z_WT  TQGEAEAGEGGEN-----
                                ↑

```

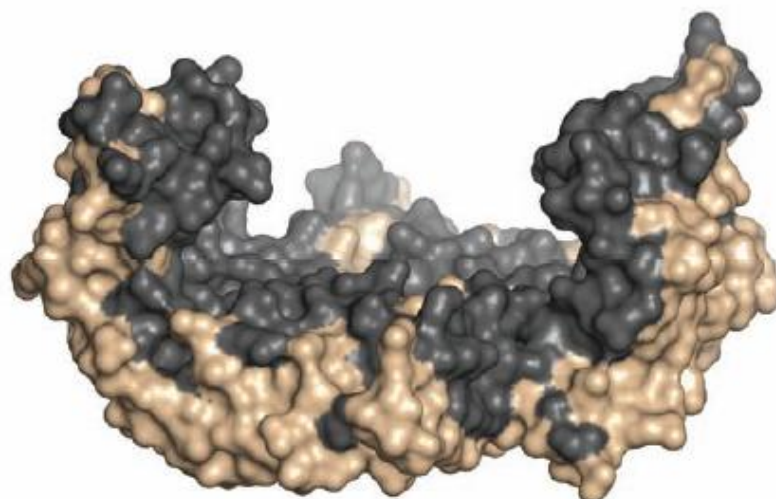
Obr. 2.3.1.1: Srovnání sekvencí u isoform hv 14-3-3A WT a 14-3-3ζ WT.

Glycin na pozici 216 u ječmenné isoformy 14-3-3A WT a serin na pozici 207 u lidské isoformy 14-3-3 ζ WT (oba zbytky se nacházejí v ohybu H8-H9) jsou označeny šipkou. Hvězdička pod sekvencí označuje shodné aminokyseliny, tečka a dvojtečka označují aminokyseliny s podobnými vlastnostmi.

2.4 Funkce 14-3-3 proteinů

2.4.1 Vazba proteinů 14-3-3 s vazebným partnerem

Kromě flexibilního C-koncového segmentu jsou molekuly 14-3-3 proteinů velice rigidní, což je způsobeno zakonzervovanou aminokyselinovou sekvencí a nevazebnými interakcemi mezi helixy, konzervované části jsou vidět na obr 2.4.1.1. Molekuly 14-3-3 proteinů tvoří dimery, což je zřejmě velice důležité pro jejich funkci, respektive afinitu k ligandům.

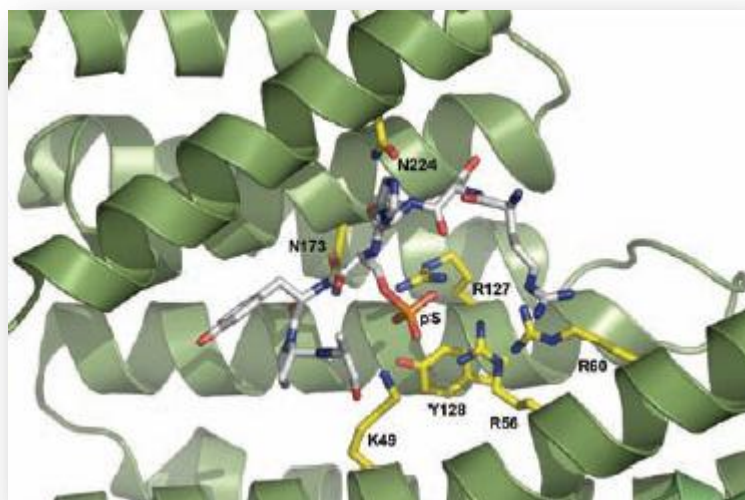


Obr. 2.4.1.1: Struktura lidské isoformy 14-3-3 ζ s vyznačenými konzervovanými částmi.

Aminokyseliny konzervované napříč všemi isoformami jsou vyznačeny tmavě šedou barvou [2].

Detailní analýza krystalů fosfopeptidu navázaného na 14-3-3 protein a následné hledání v peptidových knihovnách ukázaly dva základní motivy zodpovědné za interakce mezi 14-3-3 proteiny a jejich vazebnými partnery. První motiv se nazývá mode 1 a má sekvenci RSXpSXP, druhý motiv, mode 2 má sekvenci RX(Y/F)XpSXP (X je jakákoli aminokyselina s výjimkou cysteinu) [13, 16, 17].

Fosforylovaný serin či threonin se váže na vazebného partnera v amfipatických žlábcích na okraji centrálního kanálu dimeru, čímž se dostane do konformace hlavního řetězce [10, 13, 17]. Fosfátová skupina fosfoserinu a fosfothreoninu je navázána solnými můstky na postranní řetězce R56, R127 a K49 a vodíkovou vazbou na hydroxylovou skupinu Y128 [17]. Změnu ve směru řetězce způsobuje prolinový zbytek ve fosfopeptidu (obr 2.4.1.2) [12].



Obr. 2.4.1.2: Detail krystalové struktury lidské isoformy 14-3-3 ζ , ve které je navázán fosfopeptid ARSHpSYPA.

Fosfopeptid je zobrazen v tyčinkové reprezentaci [2].

Mnoho vazebných partnerů obsazuje více než jeden vazebný motiv 14-3-3 proteinu. V dimeru jsou přítomny dva vazebné žlábký, což znamená, že může vázat dva fosforylované motivy najednou, takže vazba s ligandem je efektivnější [45, 46]. Peptid, který obsahuje dva 14-3-3 vazebné motivy váže až třicetkrát lépe než peptid s pouze jedním vazebným motivem [17]. Na základě těchto výsledků byl navržen model pro vazbu 14-3-3 protein-ligand, kde se ligand naváže pomocí tzv. hlavního vazebného motivu, který je oproti ostatním motivům dominantní k jedné monomerní podjednotce 14-3-3 proteinu. Potom se připojují slabší sekundární motivy ke druhé podjednotce. Tímto způsobem se další podjednotky mohou vázat do míst, která jsou nepřístupná v monomerně vázané formě [1].

Podle Bridgese a Moorheada se funkce 14-3-3 proteinů dělí do tří módů činnosti, které jsou popsány níže.

2.4.1.1 Změna konformace vazebného partnera

Díky rigidnímu charakteru dimeru může molekula 14-3-3 působit jako místo, na kterém se mění konformace vazebného partnera-proteinu. To platí zejména pro enzymy, u kterých změna konformace může ovlivnit jejich enzymové vlastnosti [47].

Příkladem tohoto typu regulace je 14-3-3 protein-dependentní aktivace serotonin N-acetyltransferasy (AANAT) [9, 48]. Tento enzym je ve své nenavázané formě téměř neúčinný, protože má velice nízkou afinitu k substrátu. Fosforylovaný 14-3-3 protein se váže a stabilizuje AANAT v místě, které je důležité ve vazbě k substrátu. Tato strukturní stabilizace zvýší afinitu k substrátu a aktivuje enzym [9].

2.4.1.2 Odkrývání či zakrývání specifické sekvence vazebného partnera

14-3-3 proteiny dokážou maskovat důležitá místa na povrchu cílového proteinu. Několik vazebných partnerů (FOXO transkripční faktory) například obsahuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS), která je velice podobná 14-3-3 vazebnému motivu. Navázání 14-3-3 proteinu inhibuje interakci mezi NLS a důležitými jadernými procesy, čímž blokuje jadernou lokalizaci těchto proteinů [49, 50, 51].

2.4.1.3 Stimulace protein-protein interakcí

Molekula 14-3-3 proteinu může působit jako stabilizující molekula, když ukotví dva různé proteiny u sebe, čímž stimuluje protein-protein interakce. Jeden monomer 14-3-3 naváže první protein a jiná podjednotka naváže druhý protein. Jako příklad těchto interakcí lze uvést interakci mezi Tau a glykogen syntas-kinasou 3β , nebo Ron receptor tyrosin kinasu a $6\beta 4/6\beta 1$ integrin [52, 53].

2.4.2 Regulace 14-3-3 proteinů

14-3-3 proteiny jsou exprimovány ve všech tkáních (kromě isoformy 14-3-3 σ , která se exprimuje pouze v ephitetálních buňkách) a vážou se k cílovým vazebným partnerům s podobnou afinitou. Vazebné vlastnosti 14-3-3 proteinů jsou regulovány post-translačními modifikacemi, zejména fosforylací, a vázáním kofaktorů [47, 54, 55].

2.4.2.1 Fosforylace 14-3-3 proteinů

Ze všech post-translačních modifikací je fosforylace nejlépe prozkoumána a je nejlépe objasněným mechanismem regulace [5, 56]. Mezi isoformami nejsou fosforylační místa zakonzervovaná, což znamená, že fosforylace může jednotlivé isoformy regulovat specificky. Fosforylace probíhá pomocí několika serin/threonin kinas na čtyřech místech 14-3-3 proteinů [5, 54, 56]. Dvě fosforylační místa jsou umístěna na povrchu dimeru, jsou to Ser58 a Ser63 (číslováno podle 14-3-3ζ), přičemž Ser58 určuje utváření 14-3-3 monomeru [33, 58], což může mít vliv na funkci proteinu. Další dvě fosforylační místa, Ser184 a Ser/Thr232, se nacházejí v blízkosti vazebného žlábků a jejich fosforylace vede ke snížení schopnosti vázat ligandy [22, 35, 40, 59].

Fosforylační místo Ser/Thr232 se nachází na C-koncovém segmentu, který se nejspíš účastní regulace vazby s ligandem [14, 24]. Struktura C-koncového segmentu je stále neznámá, protože vzhledem k velké flexibilitě regionu není vidět na krystalových strukturách [9, 13, 14, 17, 60].

Na mnoha isoformách bylo ukázáno, že fosforylují přednostně na místě Ser/Thr232. Například 14-3-3ζ a 14-3-3τ jsou fosforylovány na místě Ser/Thr232 kasein kinasou Iα [35], nefosforylovaný 14-3-3ζ se váže na Raf-1 kinasu a v případě fosforylace se vazba inhibuje [61]. Při fosforylaci Ser/Thr232 dochází také k inhibici vazby fosopeptidu na C-koncový segment.

2.4.2.2 Nefosforylované vazebné motivy

Některé proteiny interagují s molekulami 14-3-3 proteinů i bez fosforylace. Jedná se např. o Raf kinasu, která se může vázat i místy bohatými na cysteinové zbytky, stejně tak i Bcr kinasu. Mechanismem nezávislým na fosforylaci se váže také peptid R18, který se váže přes sekvenci Asp-Ala-Leu-Asp-Leu. Peptid R18 má vysokou afinitu vůči 14-3-3 proteinům [62].

Vazebné interakce může regulovat také acylace. K té dochází při vazbě CD81 na 14-3-3ε [63]. Tento signální protein je tak může být regulován 14-3-3 proteinem v závislosti na redoxním potenciálu buňky.

3 Cíle práce

- 1) Provést heterologní expresi v bakteriích *E. coli* a následnou purifikaci proteinů:
 - ječmenné isoformy hv 14-3-3A WT
 - ječmenné isoformy hv 14-3-3A s mutací G216S
 - lidské isoformy 14-3-3ζ WT
 - lidské isoformy 14-3-3ζ s mutací S207G

- 2) Porovnat disociační konstanty komplexů výše uvedených proteinů s peptidem pRaf-259 označeným sondou ATTO, metodou fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

- 3) Porovnat disociační konstanty komplexů výše uvedených proteinů s peptidem pRaf-259, značeným sondou FITC, metodou stacionárního měření intenzity fluorescence

4 Praktická část

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

β -merkapto ethanol	Roth (Karlsruhe, SRN)
agarosa	Roth (Karlsruhe, SRN)
akrylamid	Roth (Karlsruhe, SRN)
ampicilin	Biotika (Slovenská L'upča, Slovenská republika)
boritá kyselina.....	Lachema (Neratovice, Česká republika)
bovine serum albumine	Sigma Aldrich (USA)
bromfenolová modř.....	Sigma (St. Louis, USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth (Karlsruhe, SRN)
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema (Neratovice, Česká republika)
1,4-dithiothreitol (DTT).....	Roth (Karlsruhe, SRN)
dodecylsulfát sodný (SDS)	Roth (Karlsruhe, SRN)
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného	Lachema (Neratovice, Česká republika)
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	Roth (Karlsruhe, SRN)
ethanol.....	Lachema (Neratovice, Česká republika)
ethidium bromid.....	Sigma (St. Louis, USA)
glycerol	Penta (Chrudim, Česká republika)
glycin	Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemsko)
heptahydrát síranu nikelnatého	Penta (Chrudim, Česká republika)
hydroxid sodný	Lachema (Neratovice, Česká republika)

chlorid draselný.....	Lachema (Neratovice, Česká republika)
chlorid sodný.....	Penta (Chrudim, Česká republika)
chlorovodíková kyselina	Lachema (Neratovice, Česká republika)
imidazol	Roth (Karlsruhe, SRN)
IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktosid)	Roth (Karlsruhe, SRN)
isopropanol.....	Lachema (Neratovice, Česká republika)
LB Agar (Luria/Miller).....	Roth (Karlsruhe, SRN)
LB Medium (Luria/Miller)	Roth (Karlsruhe, SRN)
lysozym	Serva (Heidelberg, SRN)
methanol.....	Lachema (Neratovice, Česká republika)
N, N'-metylen-bis-akrylamid.....	Roth (Karlsruhe, SRN)
octová kyselina	Lachema (Neratovice, Česká republika)
peptid pRaf-259 značený ATTO.....	ATTO-TEC(Siegen, SRN)
peptid pRaf-259 značený FITC.....	EZBiolab (Westfield, USA)
peroxodisíran amonný.....	Roth (Karlsruhe, SRN)
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Roth (Karlsruhe, SRN)
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth (Karlsruhe, SRN)

4.1.2 Materiál

dialyzační membrána (typ 27/37) (cut off 14000)	Roth (Karlsruhe, SRN)
<i>E.coli</i> kmen BL21(DE3)	Stratagene (La Jolla, USA)
filtry Rotilabo-Spritzenfilter (PVDF) (0,45 μ m)	Roth (Karlsruhe, SRN)
Chelating Sepharose Fast Flow.....	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit.....	Genomed (Löhne, SRN)
kolony pro HPLC.....	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
koncentrátor Centrion	Millipore (USA)

křemenné kvivety	Agilent (Santa Clara, USA)
kvivety Lab-Tek Chambered Coverglass	Schoeller (SRN)
Lambda DNA-HindIII Digest	
(standard pro agarosovou elektroforesu)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
6x Loading Dye Solution	Fermentas (Burlington, Kanada)
MonoQ Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
nylonové filtry (0,45 µm)	Whatman (New Jersey, USA)
Precision Plus Protein Standards (pro SDS-PAGE)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Superdex 75 prep grade	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)

4.2 Přístroje

Analytické váhy R160P	Sartorius (Goettingen, SRN)
Centrifuga 5804 R (rotor A-4-44)-zakoncentrování proteinů	Eppendorf (Hamburg, SRN)
Centrifuga Biofuge 28 RS (rotor 3746)-sonikát	Heraeus Sepatech (Hanau, SRN)
Centrifuga K80 (rotor S6/6,6)-centrifugace buněk	MLW (Leipzig, SRN)
Detektor PE SPAD	Perkin Elmer (Kanada)
epifluorescenční konfokální mikroskop	
MicroTime 200	(PicoQuant, SRN)
Horizontální agarová elektroforesa	Omni-Bio (Brno, Česká republika)
HPLC AKTA	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
Iluminátor UVT 14-M	Herolab (Weisloch, SRN)
Imerzní objektiv (1.2 NA 60x)	Olympus (Japonsko)
Inkubátor	Melag (Berlín, SRN)
Magnetická míchačka Variomag Maxi, Komet	Thermo Scientific (Waltham, USA)
MasterCycler personal	Eppendorf (Hamburg, SRN)
Peristaltická pumpa	Ismatec (Glattbrugg, Švýcarsko)

pH metr JenWay 3505	Felsted (Velká Británie)
Pulsní diodový laser (LDH-P-C-470, 470 nm).....	PicoQuant (SRN)
Sada optických filtrů.....	Omega Optical (USA)
Sonikátor Sonicator3000 Misonix	Cole-Parmer (Vernon Hills, USA)
Spektrofluorimetr Photon Counting Spektrofluorimetr PC1	ISS (Champaign, USA)
Spektrofotometr Agilent 8453	Agilent (Santa Clara, USA)
Třepačka HT Multitron.....	Infors (Bottmingen, Švýcarsko)
Vertikální polyakrylamidová elektroforesa	BioRad (Hercules, USA)
Vortex Zx3.....	Velp Scientifica (Milán, Itálie)
Zdroj pro horizontální elektroforesu.....	Omni-Bio (Brno, Česká republika)
Zdroj pro vertikální elektroforesu Consort EV243.....	Sigma-Aldrich (USA)

4.3 Metody

4.3.1 Transformace kompetentních buněk

Roztok plasmidové DNA o objemu 1 μ l byl přidána ke 30 μ l kompetentních buněk, v tomto případě k *E. coli* kmen BL21(DE3). Buňky byly inkubovány 20 minut na ledu při teplotě 0°C. Potom se buňky ponořily na 45 sekund do vodní lázně o teplotě 42°C (teplotní šok způsobí rozrušení buněčných stěn) a potom se inkubovaly 2 minuty opět při 0°C. Následně k nim bylo přidáno 0,5 ml LB média a byly inkubovány v třepačce za konstantního třepání 180 rpm při 37°C po dobu jedné hodiny. Nakonec byly buňky přeneseny na misku s agarem, který obsahoval antibiotikum ampicilin ve finální koncentraci 100 μ g/ml, které působí jako selekční faktor (tento kmen buněk je vůči ampicilinu resistantní.) Buňky na agarové misce byly inkubovány 12-16 hodin v inkubátoru o teplotě 37°C.

Misky se skladují při 4°C a zabezpečeny proti vyschnutí. Pro dlouhodobé skladování buněk slouží glycerolové roztoky.

4.3.1.1 LB médium

LB médium je výživné médium určené pro růst bakterií a to zejména *Escherichia coli*. Využívá se hlavně k přípravě plasmidové DNA a rekombinantních proteinů. Připravuje se z 25 g LB média (10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl), které se doplní do 1 l vodou, následně se upraví pH na 7,4 a LB médium se vysterilizuje.

4.3.1.2 LB agarové misky

Misky s agarovým gelem se připravují z 35 g LB agaru (10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl a 15 g agaru), do 1 l se doplní destilovanou vodou a nechají se vysterilizovat. Po ochlazení se přidá ampicilin do finální koncentrace 100 μ g/ml a roztok se rozlije na Petriho misky v množství 15 ml na misku.

4.3.1.3 Glycerolový roztok

Pro dlouhodobé skladování buněk se připravuje glycerolový roztok. Přes noc narostlá bakteriální kultura o objemu 700 μ l se smíchá s 300 μ l sterilního glycerolu a uchovává se při -80°C .

4.3.2 Kultivace buněk v 5 ml LB média

Buňky je třeba namnožit v 5 ml LB média, aby mohla být provedena izolace plasmidové DNA, připraven glycerolový roztok buněk nebo přenesení kultury do většího množství LB média za účelem exprese rekombinantního proteinu.

Z LB agarové misky s narostlými koloniemi bakterií byla sterilním platinovým očkem přenesena kolonie do zkumavky s 5 ml LB média a ampicilinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Buňky byly inkubovány v třepačce za konstantního třepání 180 rpm po dobu 12-16 hodin při teplotě 37°C .

4.3.3 Isolace plasmidové DNA

Z buněk kultivovaných přes noc v 5 ml LB média byla provedena izolace plasmidové DNA pomocí soupravy JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN) podle návodu výrobce.

Nejdříve byla k buňkám přidána RNAsa. Potom byly buňky lysovány roztokem NaOH a SDS a neutralizovány octanem sodným, díky čemuž došlo k precipitaci proteinů a chromatinové DNA, které byly odstraněny centrifugací. Následně byl supernatant nanesen na kolonku se silikátovým filtrem a centrifugován, plasmidová DNA se navázala na filtr. Kolonka byla promyta 2x ethanolem (roztoky GX a G4) a plasmidová DNA byla poté eluována TE pufrem ohřátým na teplotu 65°C . Plasmidová DNA byla v TE pufru zamražena a skladována při teplotě -20°C .

Centrifugace byla prováděna při 16 100 g.

Složení používaných pufrů dle výrobce:

G1: 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A

G2: 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

G3: acetát a guanidin chlorid

GX: guanidin chlorid, ethanol

G4: ethanol, NaCL, EDTA, Tris-HCl

TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1mM EDTA

4.3.4 Horizontální agarosová elektroforesa

Horizontální agarosová elektroforesa se používá pro kontrolu kvality, čistoty a celkové velikosti plasmidové DNA.

1% agarosový gel byl převrstven 1x TBE pufrém. Do jamek, vzniklých vyndáním hřebínku byly nanášeny vzorky (5 µl izolované plasmidové DNA smíchané s vodou a s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrém 6x Loading Dye Solution, Fermentas) a standard molekulových hmotností (různě dlouhé molekuly DNA o známé velikosti) smíchaný s vodou a 6x koncentrovaným vzorkovým pufrém. Elektroforesa probíhala při 70 V 45 minut. Gel byl následně barven 10 minut v roztoku ethidium bromidu a nakonec krátce odbarven ve vodě.

Složení roztoků:

1x TBE pufr: 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 90 mM H₃BO₃, 2mM EDTA (pH 8,0)

Ethidium bromid: 0,01% (w/v) ethidium bromid

4.3.5 Sekvence DNA

Pro ověření správné sekvence v plasmidu byly vzorky předány Dr. J. Felsbergovi v laboratoři Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., kde byla provedena sekvenace dideoxynukleotidovou metodou.

4.3.6 Heterologní exprese proteinů v *E. coli*

Expres rekombinantních proteinů byla prováděna bakteriích *E. coli*, kmen BL21(DE3). Tento kmen nese ve svém bakteriochromosomu gen pro T7 RNA-polymerasu, který je řízený lac-operonem. Jako induktor se přidává IPTG (isopropyl- β -D-galaktosid), který uvolní lac-represor z lac-operátoru, čímž dojde k indukci exprese T7 RNA-polymerasy. Ta rozpoznává T7 promotor, kterým je v pET-15b vektoru řízena exprese proteinu.

Kultura bakterií byla inkubována přes noc v 5 ml LB média. Poté byla přenesena do bane s 1 l LB média a ampicilinem v koncentraci 100 μ g/ml a inkubována za konstantního třepání 200 rpm při teplotě 37°C. Průběžně se měřila absorbance při vlnové délce 600 nm. Při dosažení absorbance 0,8 byla provedena indukce IPTG, a to do koncentrace 0,5 mM. Expres probíhala asi 16-20 hodin.

Buňky byly následně centrifugovány 30 minut při 3600 rpm, za teploty 4°C. Pelety byly resuspendovány ve 2x lyzačním pufru a následně zamraženy, aby došlo k rozrušení buněčných stěn před sonikací.

Na pelety ze 6 l LB média bylo použito asi 150 ml lyzačního pufru.

Složení pufrů:

2x lyzační pufr: 1x PBS pH 7,4, 1 M NaCl, 2 mM imidazol, 4 mM β -merkapt ethanol

1x PBS pufr: 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH upravit na 7,4

4.3.7 Sonikace buněk

Suspenze buněk v 2x lyzačním pufru se nechala rozmrazit a potom se k ní přidal lysozym do finální koncentrace 100 μ g/ml. Suspenze byla inkubována 30 minut za stálého míchání ve 4°C. Následně byly buňky sonikovány na sonikátoru Sonicator3000 Misonix (Cole-Parmer, USA), teplota byla udržována na 0°C. Sonikace probíhala s 5 pulzy s amplitudou 3,5 (48 W) a 25 s ponechány bez sonikace, tento cyklus do celkových 20 minut sonikace. V průběhu byla sonikace několikrát přerušena a suspenze promíchána.

Následně byl sonikát centrifugován 45 minut při 13500 rpm a při teplotě 4°C. Proteiny byly rozpuštěny v supernatantu, který byl použit jako základní materiál při purifikaci proteinu. Supernatant byl skladován v -20°C pro krátkodobé skladování, pro dlouhodobé skladování v -80°C.

4.3.8 Niklová chelatační chromatografie

Jedná se o chelatační chromatografii, při které se naváže Ni^{2+} na chelatující Sepharosu. Na konci rekombinantního proteinu je umístěna tzv. histidinová kotva, což je šest histidinů v řadě za sebou, které se vážou k nikelnatým kationtům chelatovaným iminoacetátem vázaným na Sepharosu.

Kolonka byla naplněna chelatující Sepharosou a promyta vodou. Pro skladování se promývala 20% roztokem ethanolu.

Kolonka se promývala následovně:

1. 10-15 ml vody
2. 50 ml 0,1M NiSO_4
3. 10 ml vody
4. 40 ml pufru E
5. supernatant získaný centrifugací po sonikaci
6. 100-200 ml pufru E
7. 100 ml 10% pufru F v pufru E
8. Eluce 100% pufrém F

Při krocích 1. – 7. byla používána peristaltická pumpa, při posledním kroku byly proteiny eluovány pufrém F bez použití peristaltické pumpy. Eluát se jímá do zkumavek eppendorf po rysku, tzn. do 1,5 ml, celkem bylo jímáno deset frakcí. Kolonka byla chlazená buničinou navlhčenou vodou.

Následně byla provedena SDS-PAGE (kap. 4.3.11) pro kontrolu čistoty proteinů. Vybrané frakce se spojily a byla provedena dialýza proti pufru pro dialýzu vzorků eluovaných při niklové chromatografii. Roztok proteinů byl dále purifikován.

Složení pufrů:

Pufr E (promývací): 1xPBS, 0,5 M NaCl, 1 mM imidazol, 2 mM β -merkapt ethanol, pH nesmí být nižší než 7,4

Pufr F (eluční): 1xPBS, 0,5 M NaCl, 0,6 M imidazol, 2 mM β -merkapt ethanol, 10%(w/v) glycerol

Pufr pro dialýzu vzorků eluovaných při chelatační chromatografii:

20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, 10%(w/v) glycerol, 1 mM DTT

4.3.9 Aniontová chromatografie

Náplň kolony u aniontové chromatografie tvoří Mono-Q Sepharosa. 14-3-3 proteiny jsou kyselé, při pH 8,0 který se používá v aniontové chromatografii mají tedy záporný náboj a vážou se na kvarterní amonium Mono-Q Sepharosy.

Aniontová chromatografie byla prováděna na přístroji AKTAprimeTM (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC, náplň kolony byla Mono-Q Sepharosa (Amersham Biosciences, Švédsko). Program Unicorn 4.11 nebo 5.01, dodávaný spolu s přístrojem, sloužil k vyhodnocování dat.

Kolona se ekvilibrovala pufrém HQ-E pH 8,0 a poté na ní byl nanášen vzorek při průtokové rychlosti 1 ml/min. Následně byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl (od 0 M do 1 M NaCl) (pufr HQ-F) do šestinásobku délky kolony. Tlak v koloně byl 0,4 MPa, pufrы byly vychlazeny na 4°C. Frakce byly jímány po 1,5 ml.

Následně byly frakce nanесeny na gel SDS-PAGE (kap. 4.3.11) kvůli kontrole čistoty. Roztok proteinů byl dále purifikován.

Složení pufrů:

Pufr HQ-E: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM DTT

Pufr HQ-F: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT

4.3.10 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie slouží k odstranění nečistot, zejména agregátů proteinů, které se nahromadily během předchozích purifikačních kroků.

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na přístroji AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC, na kterém byla připojena kolona Superdex 75 10/300 ((Amersham Biosciences, Švédsko). Na vyhodnocování dat byl používán program Unicorn 4.11 nebo 5.01, který se dodává spolu s přístrojem. Na kolonu Superdex 75 10/300 může být nástřik maximálně 0,5 ml, vzorek musel být tedy před gelovou permeační chromatografií zakoncentrován.

Kolona byla nejdříve promyta vodou a následně ekvilibrována pufrem při průtokové rychlosti 0,5 ml/min, dokud se neustálila vodivost. Poté bylo na kolonu nanášeno 0,5 ml vzorku. Dělení vzorku probíhalo ve stejném pufru jako ekvilibrace kolony při rychlosti 0,5 ml/min. Pufr byl vychlazen na 4°C, tlak v koloně byl 0,5 MPa. Frakce byly jímány po 0,6 ml.

Následně byly frakce nanášeny na gel SDS-PAGE (kap. 4.3.11), kde byla provedena kontrola čistoty. Vybrané frakce proteinů byly spojeny a zamrazeny. Dlouhodobě se proteiny uchovávají při -80°C.

Složení pufru: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT

4.3.11 Vertikální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Vertikální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí SDS byla prováděna po každém purifikačním kroku z důvodu kontroly čistoty proteinů a výběru vhodných frakcí.

Po sestavení aparatury byl připraven 15% separační gel, který se nalil mezi skla a převrstvil se isopropanolem. Asi po dvaceti minutách byl gel zpolymerován, isopropanol se vylil a jeho zbytky byly vysáty filtračním papírem. Poté byl na separační gel nalit gel zaostřovací, do kterého se vložil hřebínek. Po zpolymerování byl hřebínek opatrně vyjmut.

Do žlábků po hřebínku byl nanesen standard molekulových hmotností (Bio-Rad, USA), který obsahuje fragmenty o molekulové hmotnosti 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa a vzorky, připravené smícháním s vodou a 5x vzorkovým pufrům a povařené asi 5 minut ve vodní lázni.

Elektroforesa probíhala při 200 V asi 1 hodinu. Po skončení byl gel opatrně sundán, asi 15 minut barven v ohřátém barvicím roztoku a potom odbarven v odbarvovacím roztoku.

Složení gelů a roztoků:

Separční gel (15%):

3,75 ml směsi akryl/bis-akrylamid, 2 ml pufru pro separční gel, 1,75 ml vody, 75 μ l 10% peroxodisíranu amonného, 8 μ l TEMED

Zaváděcí gel (4%):

0,5 ml směsi akrylamid/bis-akrylamid, 1 ml pufru pro zaváděcí gel, 2,25 ml vody, 75 μ l 10% peroxodisíranu amonného, 8 μ l TEMED

Směs akrylamid/bis-akrylamid:

29,2 g akrylamidu, 0,8 g bis-akrylamidu, doplnit vodou do 100 ml

Pufr pro separční gel:

75 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 4 ml 10% SDS, 21 ml vody

Pufr pro zaváděcí gel:

50 ml Tris-HCl (pH 6,8), 4 ml 10% SDS, 46 ml vody

Vzorkový pufr (5x koncentrovaný):

0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 5 ml 50% glycerolu, 2 ml 10% SDS, 0,5 ml β -merkapt ethanolu, 1 ml 10% bromfenolové modři, 0,9 ml vody

Pufr pro elektroforesu (1x):

25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glycin, 0,1% SDS

Barvicí roztok:

1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml methanolu, 100 ml ledové kyseliny octové, 450 ml vody

Odbarvovací roztok:

100 ml methanolu, 100 ml ledové kyseliny octové, 800 ml vody

4.3.12 Dialýza

Dialýza byla prováděna v případě potřeby převést proteiny do jiného pufru, případně pro odfiltrování nízkomolekulárních látek. Prováděla se v dialyzační membráně (cut off 14000) proti 1 l příslušného pufru při teplotě 4°C přes noc za stálého míchání.

4.3.13 Zakoncentrování roztoku proteinů

Zakoncentrování vzorku bylo prováděno ultrafiltrací v koncentrátoru Centricon (Millipore, USA) (cut off 10000) při 3500 rpm a při 4°C. Čas byl zvolen tak, aby roztok dosáhl požadované koncentrace.

4.3.14 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace se stanovovala absorbcí roztoků na spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent, USA). Roztoky byly vhodně naředěny a jejich absorbance se měřila při vlnové délce 280 nm. Poté byla z hodnoty absorbance vypočtena koncentrace pomocí hodnot molárních absorpčních koeficientů (tabulka 1), které byly vypočteny pomocí programu ProtParam tool na serveru www.expasy.org.

Proteiny s histidinovou kotvou	Molární absorpční koeficient při vlnové délce 280 nm [dm³.g⁻¹.cm⁻¹]	Relativní molekulová hmotnost
14-3-3ζ WT	0,924	29777,2
14-3-3ζ S207G	0,925	29747,2
hV14-3-3A WT	1,075	33491,4
Hv14-3-3A G216S	1,074	5,04

Tabulka 1: Údaje o 14-3-3 proteinech získané ze serveru www.expasy.org

4.3.15 Používané peptidy

V této diplomové práci jsem používala peptidy pRaf-259 značený dvěma různými fluorescenčními sondami. První byl na N-konci značený fluoresceinisothiokyanátem (FITC), který je vázaný přes 6-aminohexanovou kyselinu (Ahx). Jeho sekvence byla FITC-Ahx-LSQRQRST(pS)TPNVH MV, kde pS značí fosforylovaný serin.

Druhý peptid byl na N-konci značený sondou ATTO488 a jeho sekvence byla Atto488-LSQRQRST-pS-TPNVH-Nle-V-Amid, kde Nle značí Norleucin a pS je fosforylovaný serin.

4.3.15.1 Určení koncentrace peptidů

Koncentrace peptidů se určovala spektrometricky. Navážka peptidu byla rozpuštěna v pufru a poté změřena absorbance při 492 nm. Z hodnoty absorbance byla pomocí molárního absorpčního koeficientu vypočtena přesná koncentrace. Molární absorpční koeficienty peptidů jsou uvedeny v tabulce 2.

Peptid	Molární absorpční koeficient peptidu při 492 nm (FITC) a 501 nm (ATTO) [$M^{-1} cm^{-1}$]
pRaf-259 značený sondou FITC	78000
pRaf-259 značený sondou ATTO	90000

Tabulka 2: Údaje o používaných peptidech 1

4.3.15.2 Měření emisních a excitačních spekter peptidu pRaf-259

Emisní a excitační spektra byla měřena na spektrofluorimetru PC1 při 22°C a nastavení lampy na 13 A. Peptid byl naředěn stejným pufrům jako pufr ve kterém byly uchovávány roztoky proteinů, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Na měření byla použita 1 ml křemenná kyveta.

Emisní spektrum peptidu pRaf-259 bylo změřeno nejdříve od 500 nm do 600 nm s excitační vlnovou délkou 490 nm. Potom bylo změřeno od 500 nm do 650 nm s excitační vlnovou délkou 490 nm. Šířka štěrbin byla 1,2 mm.

Excitační spektrum peptidu pRaf-259 bylo změřeno od 300 nm do 500 nm s emisní vlnovou délkou 530 nm a potom od 400 nm do 510 nm s emisní vlnovou délkou 530 nm. Šířka štěrbin byla 1,2 mm, u všech měření byly použity polarizační filtry.

4.3.16 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Ve fluorescenční korelační spektroskopii se využívá konfokální mikroskop. Princip metody je sledování časových fluktuací intenzity fluorescence, které jsou způsobeny difuzním pohybem molekul a které pocházejí z malé ohniskové oblasti mikroskopu.

K měření se používají molekuly označené fluorescenčními sondami (některé organické látky, systémy konjugovaných dvojných vazeb atd.) Sledují se vzorky s řádově nanomolární koncentrací označených molekul, protože detekční objem mikroskopu je asi

jeden femtolitr. Díky tomu se v tomto objemu vyskytuje průměrně jedna fluorescenčně označená molekula.

Způsob, jak molekuly do detekčního objemu přicházejí a jak ho opouštějí se projeví na fluktuálním signálu. Z časově proměnlivého fluorescenčního signálu se potom udělá statistická analýza, ze které lze určit průměrnou dobu, po kterou molekula zůstává v detekčním objemu, koncentraci dané látky a difuzní koeficient. Touto metodou se dá určovat například sbalování proteinů a nukleových kyselin, navázání substrátu na protein nebo protein-proteinové interakce.

Velkou roli při fluorescenční korelační spektroskopii hraje fluorescenční barvivo, které musí být dostatečně fotostabilní aby vydrželo vysokou intenzitu světla v ohnisku mikroskopu, důležitý je také vysoký účinný průřez absorpce a kvantový výtěžek fluorescence. Pro fluorescenční korelační spektroskopii se používají např. barvy ze skupiny Alexa s různými excitačními a vlnovými délkami, rhodaminy, cyaniny a fluorescenční proteiny. V této diplomové práci jsme používali peptid pRaf-259 značený fluorescenční sondou ATTO.

Jako experimentální zařízení se používá invertovaný konfokální fluorescenční mikroskop. Laserový paprsek excitačního světla je soustředěn do zkoumaného vzorku a fluorescence excitovaných molekul je snímána objektivem, ze kterého je posléze oddělena od excitačního záření pomocí dichroického zrcadla a emisních filtrů. Konfokální štěrbina (pinhole), která má průměr 40-100 μm , je umístěna v detekční části optické dráhy a blokuje světlo, které nepochází z oblasti ohniskové roviny. Velikost detekčního objemu je tedy 0,3-1,0 femtolitrů.

Statistická analýza fluktuací fluorescenčního signálu slouží k určení pohybu jednotlivých molekul. Ze signálu se určí tzv. autokorelační funkce $G(\tau)$ (rovnice 1), která ukazuje, jak souvisí intenzita fluorescence s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě τ , tzn. jak rychle se fluorescenčně označená molekula pohybuje. [64]

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{[Rovnice 1]}$$

kde „ $\langle \rangle$ ” označují průměrnou hodnotu v čase, $F(t)$ intenzitu fluorescence a δ značí okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty.

FCS měření bylo prováděno na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR na invertovaném epifluorescenčním konfokálním mikroskopu MicroTime 200

(PicoQuant, SRN). Byla použita konfigurace s pulsním diodovým laserem (LDH-P-C-470, 470 nm, PicoQuant, SRN), s 80 pikosekundovými pulsy při 40 MHz. Průměrný výkon laseru byl nastaven na 6 μ W. Fluorescence byla oddělována od excitačního záření pomocí sady optických filtrů (čistící filtr 470/10, dichroické zrcadlo 470 DRLP a částečně propustný filtr 515/50 (Omega Optical, USA)). Excitační záření bylo fokusováno vodným imersním objektivem (1.2 NA, 60 \times) (Olympus, Japonsko). Fotony byly detekovány pomocí PE SPAD (Perkin Elmer, Kanada). Přístroj PicoHarp 300 (PicoQuant, SRN) zaznamenával pohyb fotonů v TTTR modu, čímž umožnil softwaru korelaci a rekonstrukci průběhu autokorelační funkce.

Ve skleněné kyvetě se stěnami nasycenými albuminem byl roztok pufru o složení 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol a 5 mM DTT a v něm rozpuštěný peptid označený sondou ATTO v koncentraci asi 2 nM. Peptid je velmi malý, proto i difuzní čas molekuly byl velice nízký. K roztoku se postupně titroval protein až do koncentrace asi 10 μ M. Protein se vázal na peptid a tento komplex se pohyboval mnohem pomaleji, tj. s mnohem vyšším difuzním časem než samotný peptid. U každého proteinu se změřilo 5-7 bodů o zvyšující se koncentraci.

Zpracování výsledků probíhalo v programu Microcal Origin 6.0 (Microcal Software). Frakce navázaného peptidu byla vynášena do grafu proti koncentraci proteinu. Získaná křivka byla fitována pomocí rovnice 2, ze které se získala hodnota disociační konstanty K_D

$$f_B = \frac{f_{B_{max}} \cdot [14-3-3]}{K_D + [14-3-3]} \quad \text{[Rovnice 2]}$$

kde f_B je frakce navázaného peptidu, $f_{B_{max}}$ je nasycená frakce navázaného peptidu, [14-3-3] je koncentrace 14-3-3 proteinu a K_D je disociační konstanta.

4.3.17 Stacionární měření intenzity fluorescence-vazebná esej

Tato metoda je založena na zhášení fluorescence FITC při vazbě peptidu na protein 14-3-3. Do kyvety byl napipetován roztok pufru s fluorescenčně značeným peptidem, v tomto případě to byl peptid pRaf-259 na N-konci značený sondou FITC. Intenzita fluorescence samotného peptidu je vysoká. Do kyvety je postupně titrován protein, až do koncentrace asi 10 μ M, který se váže na peptid, takže vzniká komplex značený

fluorescenční značkou FITC. Po navázání peptidu na protein dochází ke snížení kvantového výtěžku (intenzity) fluorescence.

Stacionární měření intenzity fluorescence bylo prováděno na spektrofluorimetru PC1 při 22°C. Lampa přístroje byla nastavena na 13 A, excitační vlnová délka byla 490 nm a emisní vlnová délka byla 530 nm. Počet iterací byl 15 a doba akumulace signálu byla 3 s.

Měření probíhalo v 1 ml křemenné kyvetě. Do kyvety byl napipetován pufr o složení 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol a 5 mM DTT, ve kterém byly uchovávány proteiny. Koncentrace peptidu při měření byla 50–300 nM, koncentrace zásobních roztoků proteinů byla 110–150 µM.

Roztok pufru a peptidu byl promíchán a po dvou minutách inkubace byla změřena hodnota intenzity fluorescence roztoku peptidu I_{\max} . Potom byl do roztoku postupně titrován protein. Po každém přidavku se roztok promíchal pipetou, nechal dvě minuty inkubovat a poté byla změřena hodnota intenzity fluorescence I_{obs} . Takto bylo změřeno 13 bodů na titrační křivce, vše při teplotě 22°C. Hodnoty intenzity fluorescence a celkových intenzit byly zaznamenávány pomocí programu Vinci 1.6.SP5, který byl dodán k přístroji.

Dále byly výsledky zpracovávány pomocí programů LabDat_v1.6 (autor Jan Kohout), Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation) a Microcal Origin 6.0 (Microcal Software). Pomocí programu LabDat_v1.6 byly vypočteny průměrné hodnoty z patnácti měření intenzity fluorescence. Hodnoty změny intenzity fluorescence ΔI byly vypočteny jako rozdíl průměrné hodnoty intenzity fluorescence samotného peptidu I_{\max} a průměrných hodnot intenzity fluorescence I_{obs} . Jako hodnota minimální intenzity fluorescence byla použita hodnota I_{\min} , tedy nejmenší hodnota intenzity fluorescence v sérii měření. Do grafu se vynášela frakce navázaného peptidu (rovnice 3) proti koncentraci 14-3-3 proteinu.

$$f_B = \frac{(I_{\max} - I_{\text{obs}})}{(I_{\max} - I_{\min})} \quad \text{[Rovnice 3]}$$

Křivka získaná z grafu frakce navázaného peptidu f_B proti koncentraci 14-3-3 proteinu byla fitována rovnicí 4, ze které se získala hodnota K_D .

$$f_B = \frac{[peptid]}{2} \cdot \left(K_D + [peptid] + [1433] - \sqrt{(K_D + [1433] + [peptid])^2 - 4 \cdot [peptid] \cdot [1433]} \right) \quad \text{[Rovnice 4]}$$

kde [peptid] značí koncentraci peptidu v kyvetě, [14-3-3] koncentraci proteinu 14-3-3 v kyvetě. K_D je disociační konstanta.

5 Výsledky

5.1 Exprese a purifikace proteinů

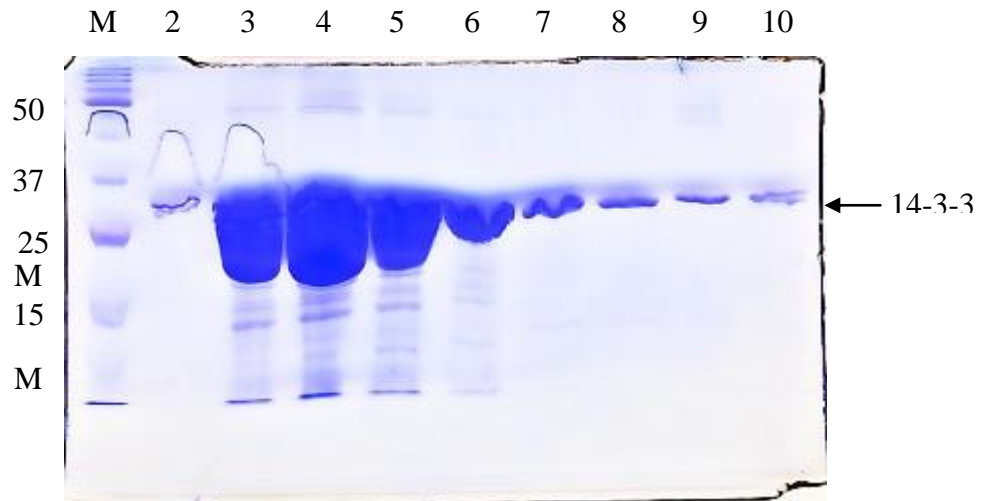
Proteiny 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ S207G, hv 14-3-3A WT a hv 14-3-3A G216S byly připravovány z glycerolových roztoků buněk *E. coli* kmen BL21(DE3) (kap. 4.3.1.3). Exprese rekombinantních proteinů byla prováděna v buňkách BL21(DE3) vždy v šesti litrech LB média (kap. 4.3.6). Dále byla prováděna sonikace (kap. 4.3.7) ze které se postoupilo k dalším purifikačním krokům.

5.1.1 Niklová chelatační chromatografie

Supernatant, získaný sonikací a následnou centrifugací, byl purifikován nejdříve niklovou chelatační chromatografií (kap. 4.3.8). Na kolonu byl nanášen supernatant vždy ze 6 l LB média. Bylo jímáno vždy deset frakcí po 1,5 ml, jejichž čistota a kvalita se zjišťovala nanášením na gel SDS-PAGE (kap. 4.3.11).

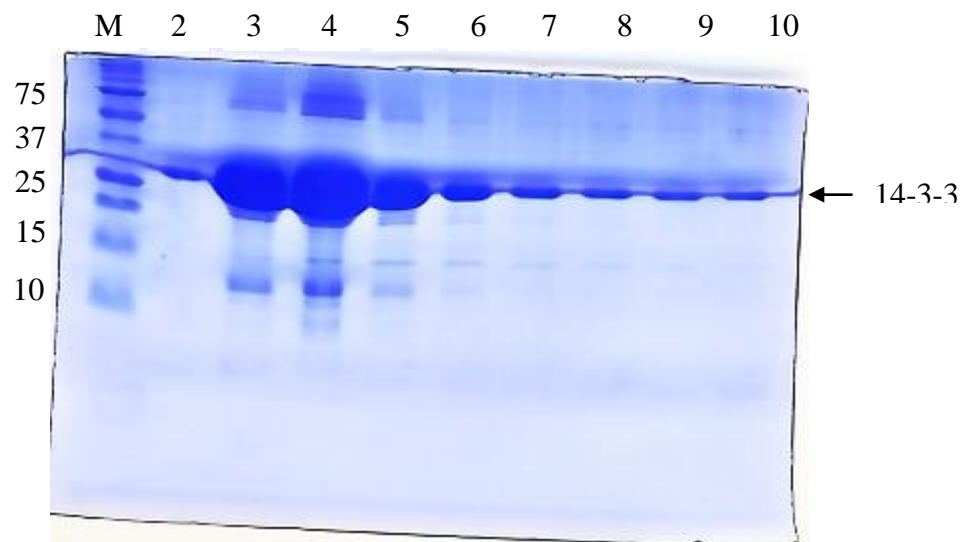
Na gel byly vždy nanášeny frakce 2-10. U proteinů 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ S207G, hv 14-3-3A WT a hv 14-3-3A G216S bylo naneseno vždy 5 μ l vzorku zachyceného z eluce pufrem F smíchaných s 10 μ l vody a 5 μ l barvícího pufru. Výsledky z 15% SDS-PAGE ukázaly, že odpovídající proteiny se nacházejí mezi 25 a 37 kDa, což je odpovídající molekulová hmotnost těchto fúzních proteinů s histidinovou kotvou. Pro každý protein je níže ukázán gel pouze z jedné purifikace (obr. 5.1.1.1, 5.1.1.2, 5.1.1.3 a 5.1.1.4).

Frakce, které byly vyhovující z hlediska množství a čistoty požadovaného 14-3-3 proteinu byly spojeny a dialyzovány proti pufru bez NaCl (kap. 4.3.12) kvůli následné aniontové chromatografii. Použité frakce pro protein 14-3-3 ζ WT byly 2-5, pro 14-3-3 ζ S207G 2-5, pro hv 14-3-3A WT 2-4 a pro hv 14-3-3A G216S frakce 2-5 (obr. 5.1.1.1, 5.1.1.2, 5.1.1.3 a 5.1.1.4).



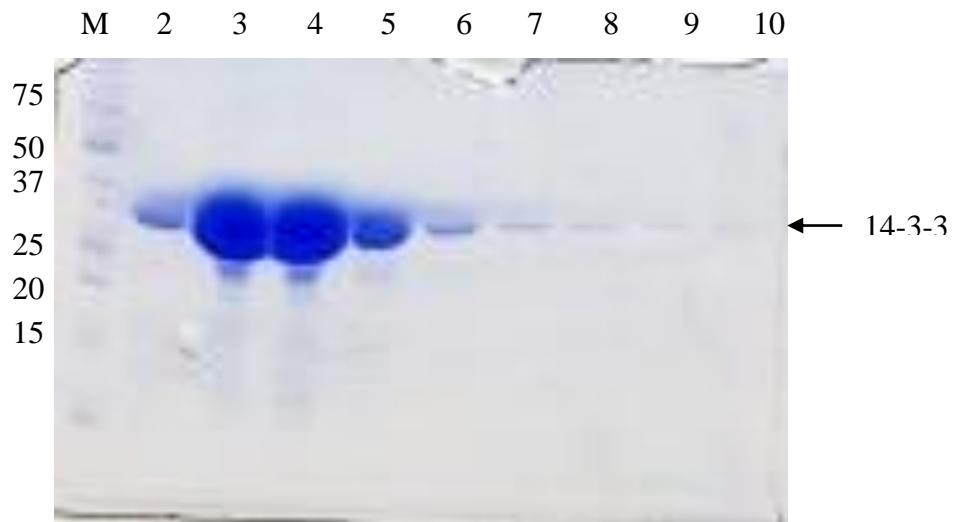
Obr. 5.1.1.1: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3 ζ WT po niklové chelatační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 2-10 jsou frakce 2-10. Šipka označuje 14-3-3 protein.



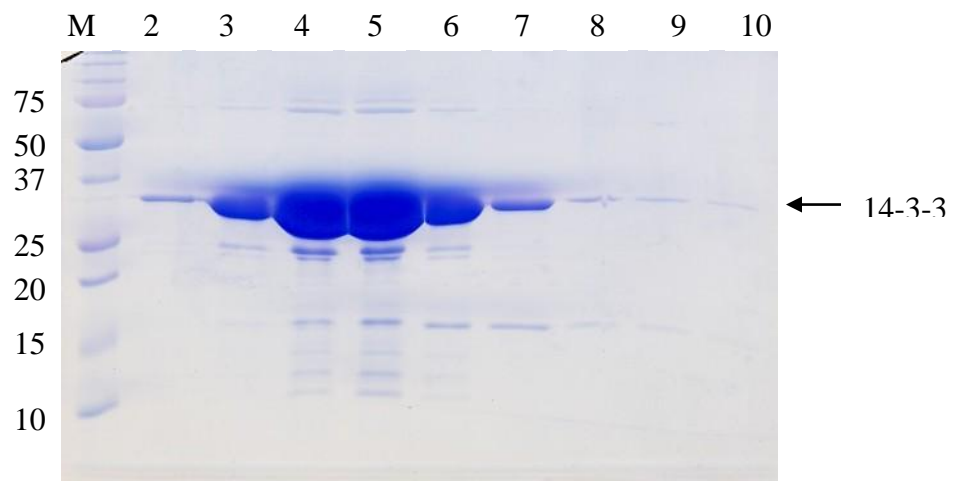
Obr. 5.1.1.2: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3 ζ S207G po niklové chelatační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 2-10 jsou frakce 2-10. Šipka označuje 14-3-3 protein.



Obr. 5.1.1.3: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3A WT po niklové chelatační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 2-10 jsou frakce 2-10. Šipka označuje 14-3-3 protein.



Obr. 5.1.1.4: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3A G216S po niklové chelatační chromatografii.

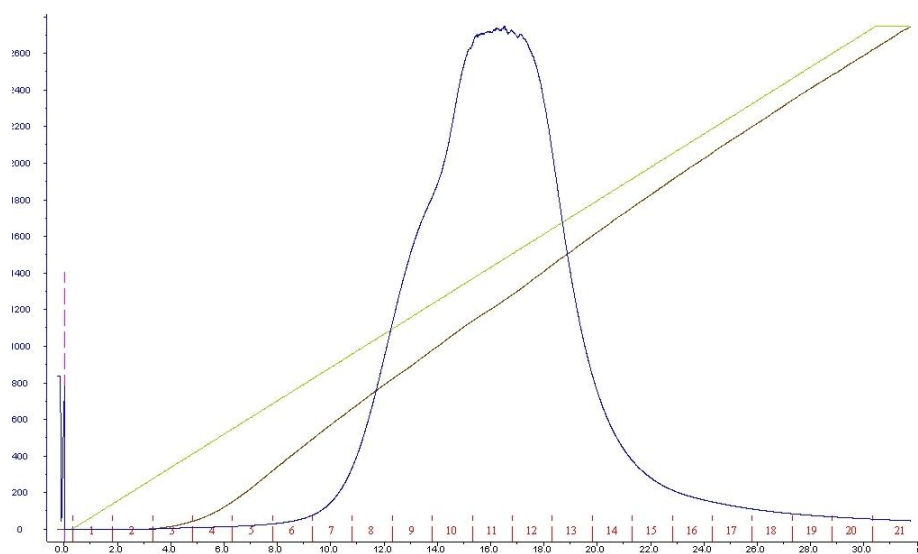
Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 2-10 jsou frakce 2-10. Šipka označuje 14-3-3 protein.

5.1.2 Aniontová chromatografie

Při aniontové chromatografii byl na kolonu nanesen vzorek předialyzovaný do pufru bez NaCl. Byly jímány frakce po 1,5 ml a jímání bylo ukončeno, když došlo k eluci veškerého 14-3-3 proteinu (kap. 4.3.9). Na obrázku 5.1.2.1 je ukázán chromatogram z jedné purifikace proteinu 14-3-3 ζ WT.

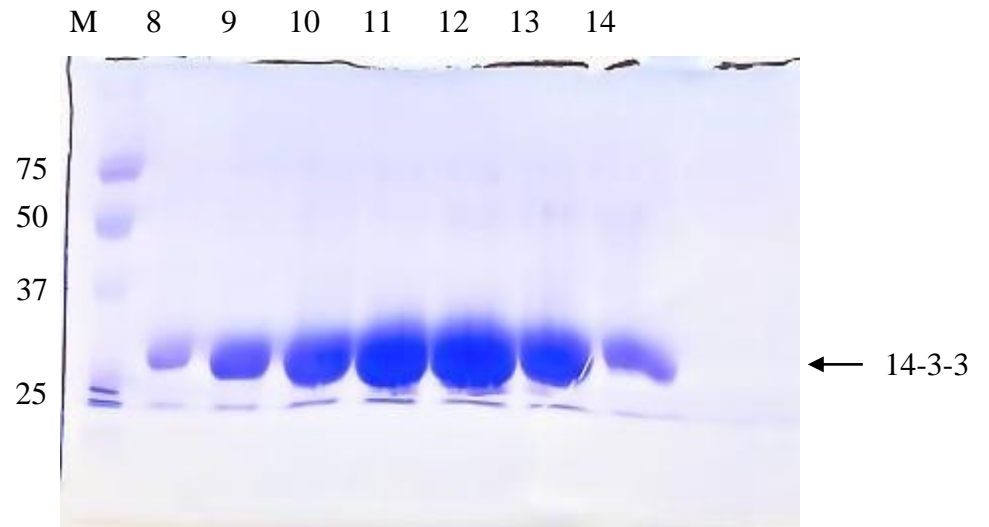
Kontrola čistoty a množství proteinu v jednotlivých frakcích, které odpovídaly elučnímu píku, byla provedena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3.11). Na gel bylo nanášeno vždy 5 μ l vzorku smíchaného s 10 μ l vody a 5 μ l barvicího pufru. U proteinu 14-3-3 ζ WT byly na gel nanášeny frakce 8-14, u proteinu 14-3-3 ζ S207G frakce 7-15, u proteinu hv 14-3-3A WT frakce 8-14 a u proteinu hv 14-3-3A G216S frakce 8-14 (obr. 5.1.2.2, 5.1.2.3, 5.1.2.4 a 5.1.2.5). Výsledky z 15% SDS-PAGE ukázaly, že odpovídající proteiny se nacházejí mezi 25 a 37 kDa, což je odpovídající molekulová hmotnost těchto fúzních proteinů s histidinovou kotvou. Pro každý protein je níže ukázán gel pouze z jedné purifikace.

Frakce, které vyhovovaly množstvím proteinu a jeho čistotou byly spojeny a dále purifikovány gelovou permeační chromatografií. Pro protein 14-3-3 ζ WT byly použity frakce 9-14, pro 14-3-3 ζ S207G frakce 8-14, pro hv14-3-3A WT frakce 8-14 a pro hv 14-3-3A G216S frakce 9-14 (obr. 5.1.2.2, 5.1.2.3, 5.1.2.4 a 5.1.2.5).



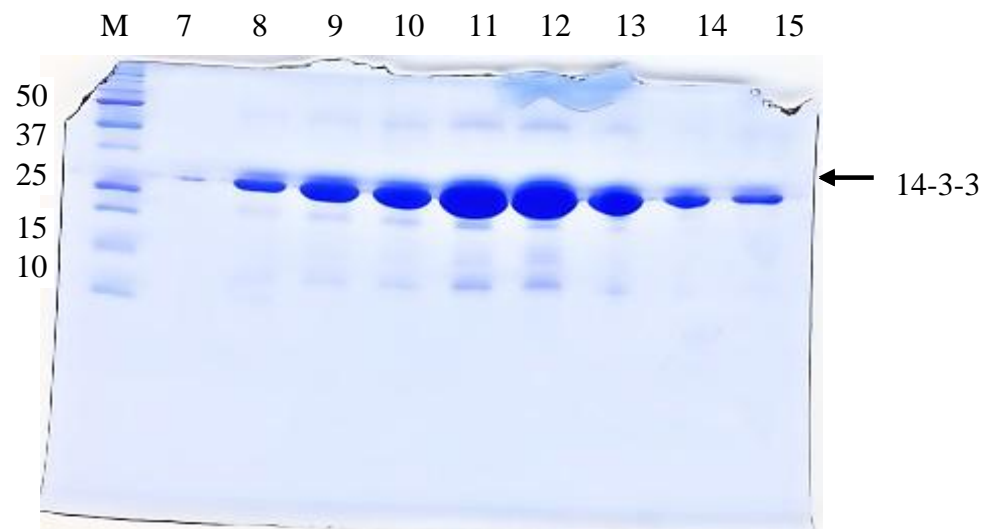
Obr. 5.1.2.1: Chromatogram 14-3-3 ζ WT po aniontové chromatografii.

Na ose x jsou fialově vyznačeny frakce v ml. Na ose y je absorbance při 280 nm uvedena v tisícínách arbitrání jednotky. Modrá křivka je eluční pík, hnědá křivka vodivost a rúžová značí procentuelní zastoupení pufru HQ-F v pufru HQ-E. Na gel byly nanesený frakce 8-14.



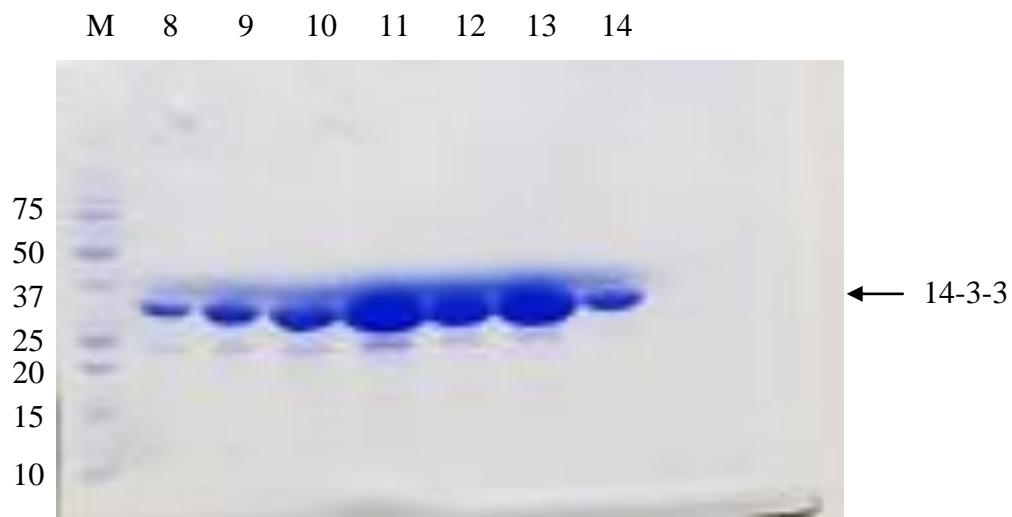
Obr. 5.1.2.2: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3 ζ WT po aniontové chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 8-14 jsou frakce 8-14. Šipka označuje 14-3-3 protein.



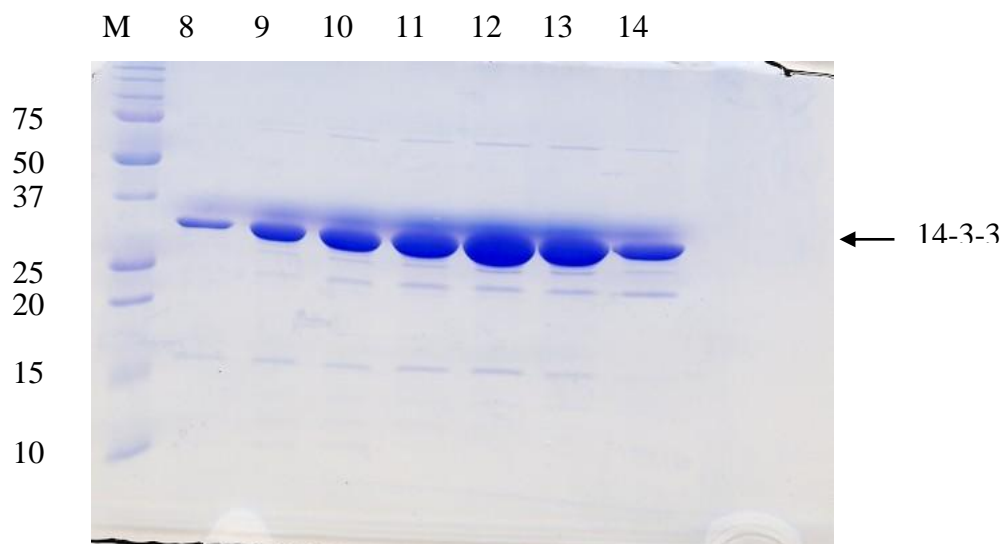
Obr. 5.1.2.3: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3 ζ S207G po aniontové chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 7-15 jsou frakce 7-15. Šipka označuje 14-3-3 protein.



Obr. 5.1.2.4: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3A WT po aniontové chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 8-14 jsou frakce 8-14. Šipka označuje 14-3-3 protein.



Obr. 5.1.2.5: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3A G216S po aniontové chromatografii.

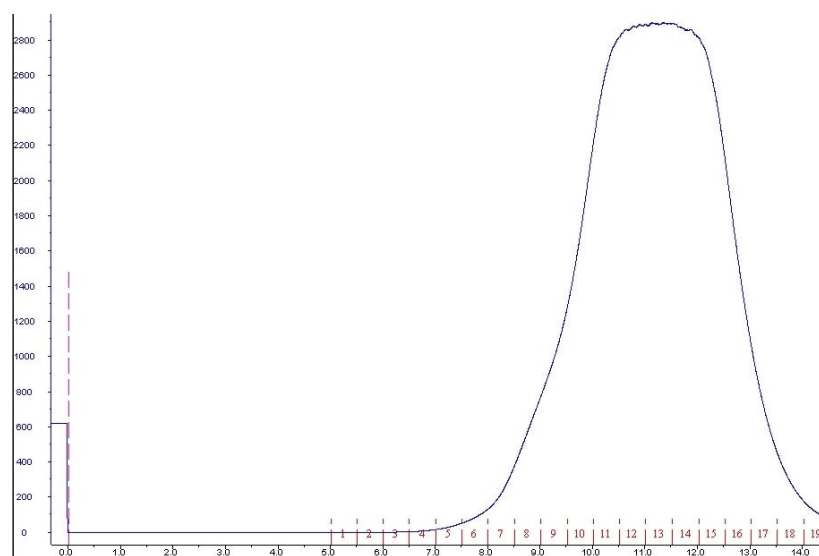
Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 8-14 jsou frakce 8-14. Šipka označuje 14-3-3 protein.

5.1.3 Gelová permeační chromatografie

Na kolonu byl při gelové permeační chromatografii nanášen předem zakoncentrovaný vzorek po 0,5 ml. Byly jímány frakce po 0,6 ml a jímání bylo ukončeno, když došlo k eluci veškerého 14-3-3 proteinu (kap. 4.3.10). Na obrázku 5.1.3.1 je ukázán chromatogram z jedné purifikace proteinu 14-3-3ζ WT.

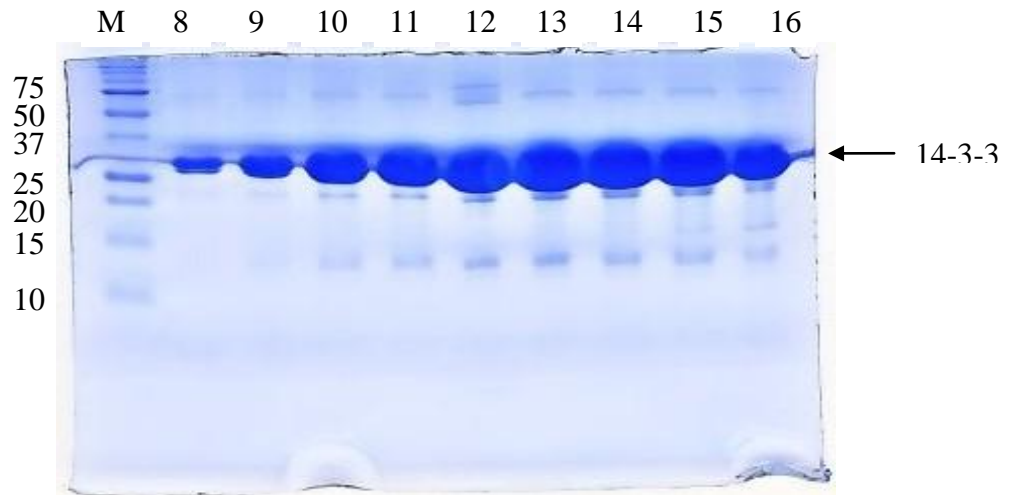
Kontrola čistoty a množství proteinu v jednotlivých frakcích, které odpovídaly elučnímu píku, byla provedena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3.11). Na gel bylo nanášeno vždy 5 μl vzorku smíchaného s 10 μl vody a 5 μl barvicího pufru. U proteinu 14-3-3ζ WT byly na gel nanášeny frakce 8-17, u proteinu 14-3-3ζ S207G frakce 12-20, u proteinu hv 14-3-3A WT frakce 9-17 a u proteinu hv 14-3-3A G216S frakce 8-15 (obr. 5.1.3.2, 5.1.3.3, 5.1.3.4 a 5.1.3.5). Výsledky z 15% SDS-PAGE ukázaly, že odpovídající proteiny se nacházejí mezi 25 a 37 kDa, což je odpovídající molekulová hmotnost těchto fúzních proteinů s histidinovou kotvou. Pro každý protein je níže ukázán gel pouze z jedné purifikace.

Frakce, které vyhovovaly množstvím proteinu a jeho čistotou byly spojeny a dále uchovávány pro měření. Pro protein 14-3-3ζ WT byly použity frakce 9-17, pro 14-3-3ζ S207G frakce 13-19, pro hv14-3-3A WT frakce 11-17 a pro hv 14-3-3A G216S frakce 10-15 (obr. 5.1.3.2, 5.1.3.3, 5.1.3.4 a 5.1.3.5). Po spojení frakcí byla u všech proteinů změřena koncentrace (kap. 4.3.11)



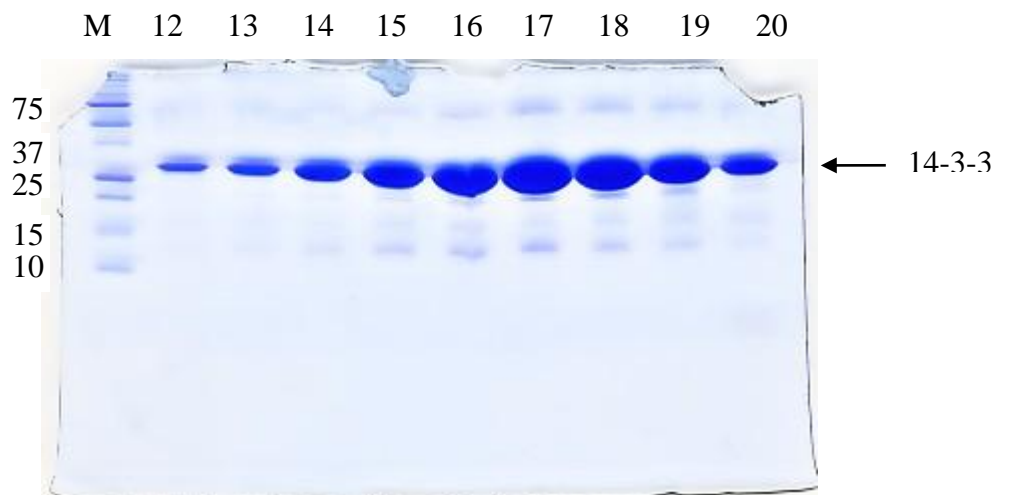
Obr. 5.1.3.1: Chromatogram 14-3-3 ζ WT po gelové permeační chromatografii.

Na ose x jsou fialově vyznačeny frakce v ml. Na ose y je absorbance při 280 nm uvedena v tisících arbitrární jednotky. Modrá křivka je eluční pík. Na gel byly naneseny frakce 8-17.



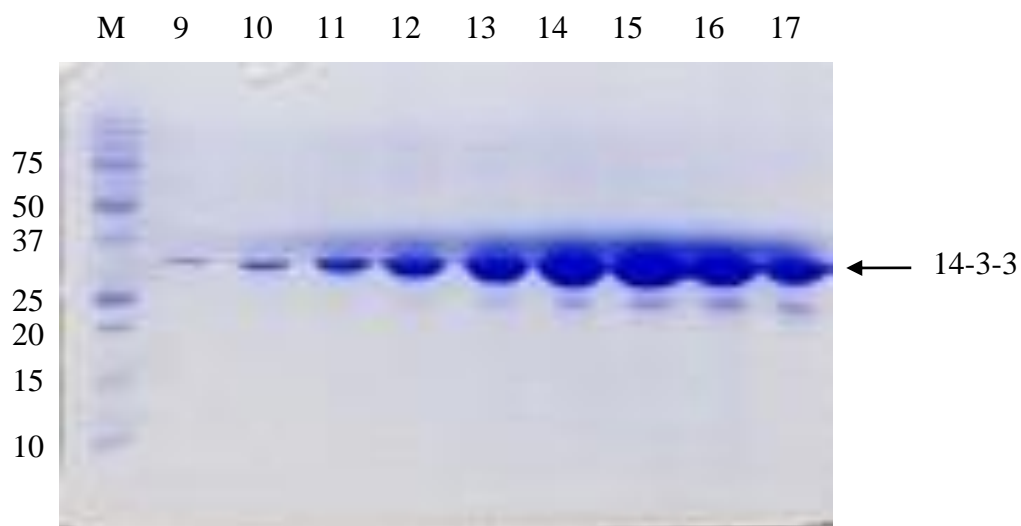
Obr. 5.1.3.2: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3 ζ WT po gelové permeační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 8-16 jsou frakce 8-16. Šipka označuje 14-3-3 protein. Frakce 17 se na gelu nezobrazila.



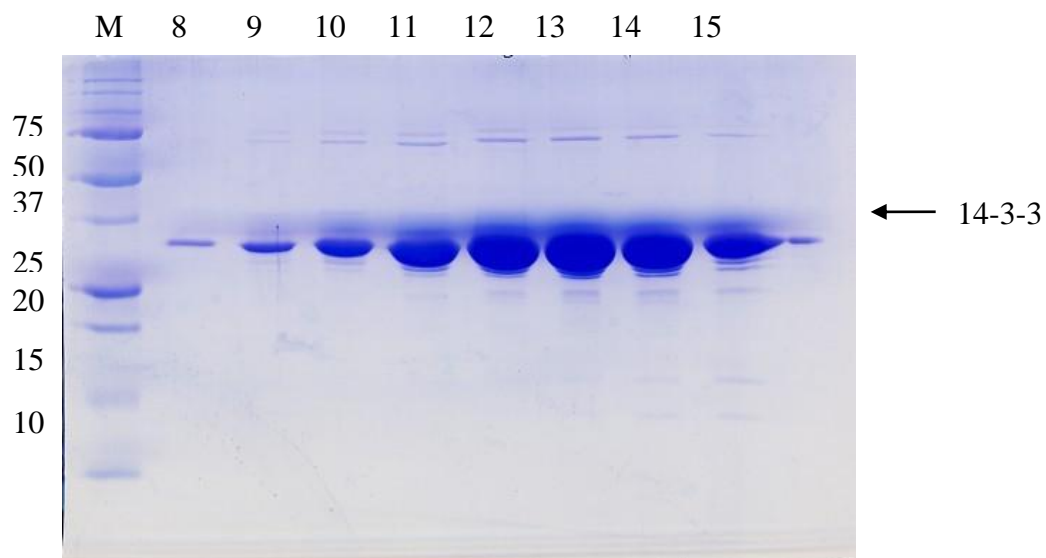
Obr. 5.1.3.3: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3 ζ S207G po gelové permeační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 8-16 jsou frakce 8-16. Šipka označuje 14-3-3 protein.



Obr. 5.1.3.4: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3A WT po gelové permeační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 9-17 jsou frakce 9-17. Šipka označuje 14-3-3 protein.



Obr. 5.1.3.5: Výsledek 15% SDS-PAGE proteinu 14-3-3A G216S po gelové permeační chromatografii.

Kde M je standard relativních molekulových hmotností v 10^3 a dráha 8-15 jsou frakce 8-15. Šipka označuje 14-3-3 protein.

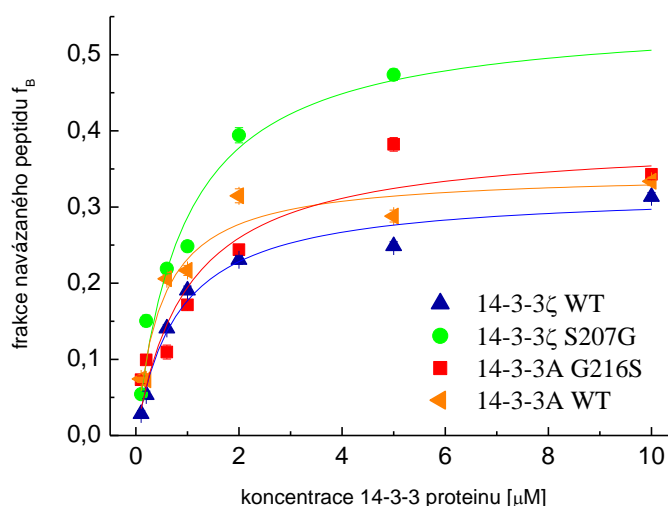
5.2 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Měření na fluorescenčním korelačním spektroskopu byla prováděna podle postupu popsaného v kap. 4.3.16.

K měření byl používán peptid pRaf-259 značený sondou ATTO. Jako první bylo zapotřebí zjistit, zda se tento peptid neadsorbuje na sklo kyvety. Tento jev byl potvrzen, pro další měření bylo tedy zapotřebí nasycit stěny kyvety přes noc albuminem, díky kterému se adsorpce peptidu na sklo výrazně snížila.

Na fluorescenčním korelačním spektroskopu byl nejdřív měřen protein 14-3-3 ζ WT a tato měření se několikrát opakovala. Bylo zapotřebí najít optimální metodu měření, aby nedocházelo k přílišným fluktuacím signálu. Až poté byly proměřeny všechny čtyři proteiny, aby mohla být porovnána jejich K_D . Výsledný graf je ukázán na obrázku 5.2.1, disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 3.

Měření bylo prováděno v pufru 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Koncentrace peptidu v kyvetě byla asi 2 nM.



Obr. 5.2.1: Vazebné křivky peptidu pRaf-259 značeného sondou ATTO-488 a 14-3-3 proteinů

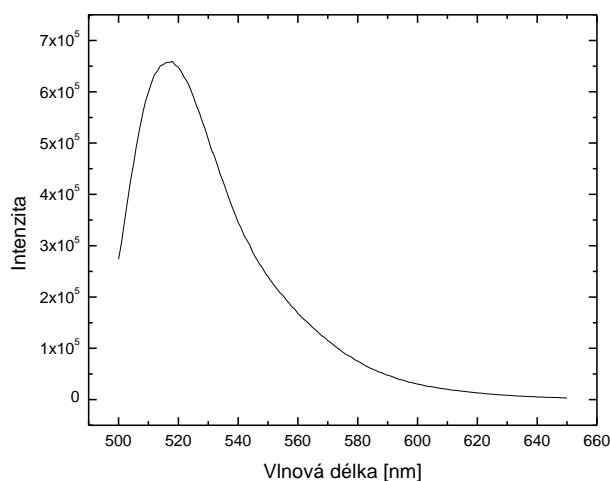
Koncentrace peptidu byla 2 nM, proteiny byly titrovány do koncentrace asi 10 μ M. Na ose x je uvedena koncentrace 14-3-3 proteinů uvedená pro monomer, na ose y frakce navázaného peptidu vypočítaná podle rovnice 3. Výsledné disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 3.

proteiny s histidinovou kotvou	disociační konstanta K_D [μM]
14-3-3 ζ WT	$0,81 \pm 0,05$
14-3-3 ζ S207G	$0,93 \pm 0,05$
14-3-3A WT	$0,49 \pm 0,03$
14-3-3A G216S	$1,00 \pm 0,07$

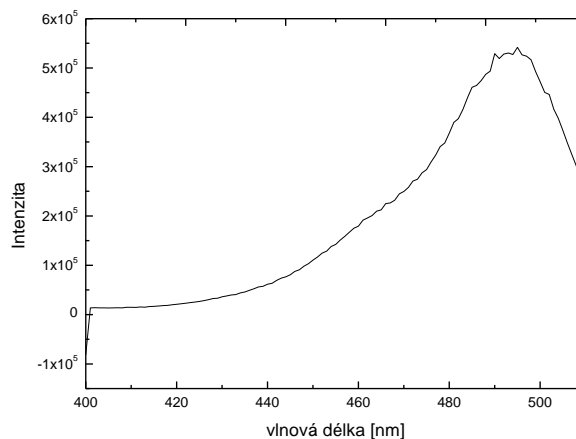
Tabulka 3: Disociační konstanty pro peptid pRaf-259 značený sondou ATTO-488, získané pomocí FCS

5.3 Měření excitačních a emisních spekter peptidu pRaf-259

Měření excitačních a emisních spekter (kap. 4.3.15.2) bylo provedeno se 100 nM peptidem pRaf-259 značeným sondou FITC, který byl rozpuštěn v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Excitační spektrum mělo maximum při 530 nm a emisní spektrum při 490 nm. Spektra jsou ukázána na obrázcích 5.3.1 a 5.3.2.



Obr. 5.3.1: Emisní fluorescenční spektrum peptidu pRaf-259 značeného sondou FITC při excitační vlnové délce 490 nm

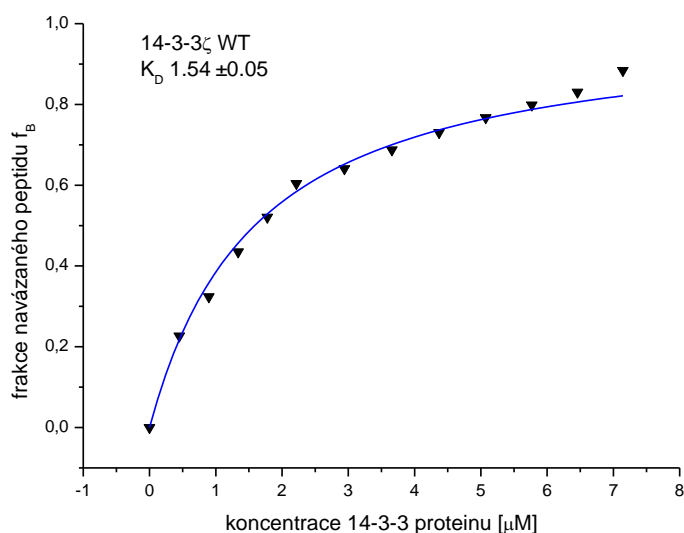


Obr. 5.3.2: Excitační fluorescenční spektrum peptidu pRaf-259 značeného sondou FITC při emisní vlnové délce 530 nm

5.4 Stacionární měření intenzity fluorescence-vazebná esej

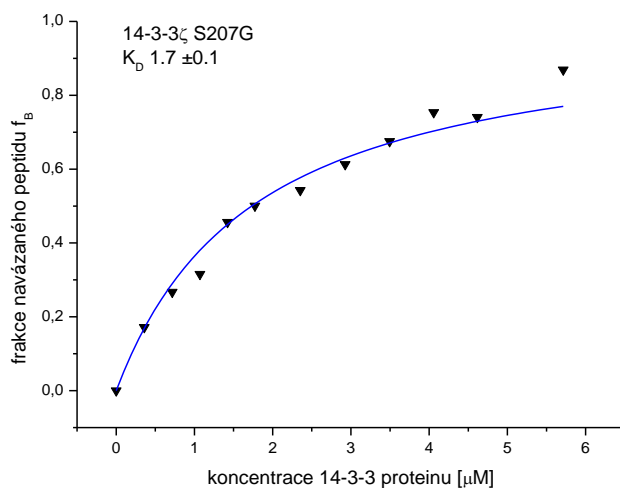
Stacionární měření intenzity fluorescence bylo prováděno podle postupu popsaného v kap. 4.3.17. Vazebné křivky pro všechny proteiny byly měřeny v pufru, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT a 10% (w/v) glycerol.

Koncentrace proteinů se pohybovala od 113 μM do 150 μM . U peptidu se zkoušelo více koncentrací, aby se zjistilo, která má nejlepší vliv na vazebnou křivku. Zkoušené koncentrace byly 50 nM, 100 nM a 300 nM. Jako nejlepší výchozí koncentrace peptidu byla zvolena 100 nM. Výsledné grafy jsou ukázány na obrázcích 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3 a 5.4.4. Disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 4.



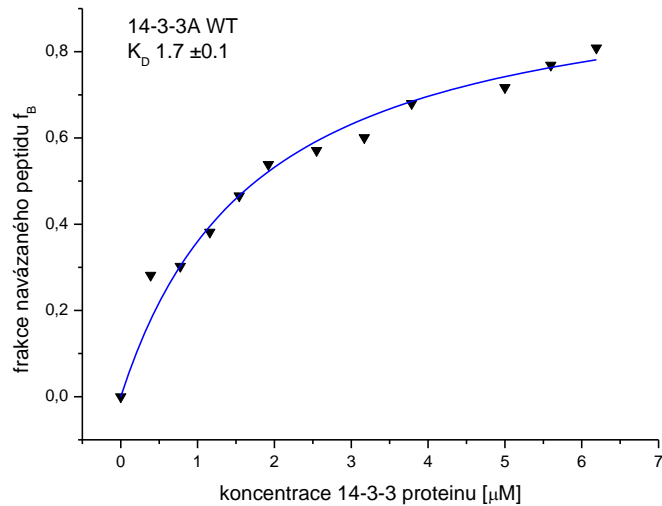
Obr. 5.4.1: Vazebná křivka peptidu pRaf-259 značeného sondou FITC a proteinu 14-3-3 ζ WT.

Koncentrace peptidu byla 100 nM, proteiny byly titrovány do koncentrace asi 10 μ M. Na ose x je uvedena koncentrace 14-3-3 proteinů uvedená pro monomer, na ose y frakce navázaného peptidu vypočítaná podle rovnice 3. Výsledné disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 4.



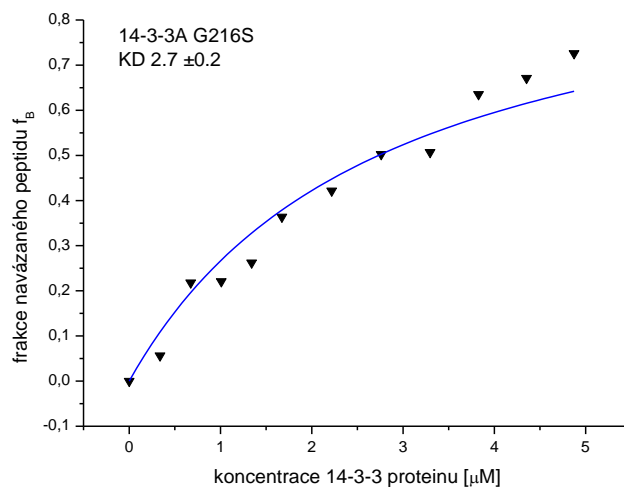
Obr.5.4.2: Vazebná křivka peptidu pRaf-259 značeného sondou FITC a proteinu 14-3-3 ζ S207G.

Koncentrace peptidu byla 100 nM, proteiny byly titrovány do koncentrace asi 10 μ M. Na ose x je uvedena koncentrace 14-3-3 proteinů uvedená pro monomer, na ose y frakce navázaného peptidu vypočítaná podle rovnice 3. Výsledné disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 4.



Obr. 5.4.3: Vazební křivka peptidu pRaf-259 značeného sondou FITC a proteinu 14-3-3A WT.

Koncentrace peptidu byla 100 nM, proteiny byly titrovány do koncentrace asi 10 μ M. Na ose x je uvedena koncentrace 14-3-3 proteinů uvedená pro monomer, na ose y frakce navázaného peptidu vypočítaná podle rovnice 3. Výsledné disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 4.



Obr. 5.4.4: Vazební křivka peptidu pRaf-259 značeného sondou FITC a proteinu 14-3-3A G216S.

Koncentrace peptidu byla 100 nM, proteiny byly titrovány do koncentrace asi 10 μ M. Na ose x je uvedena koncentrace 14-3-3 proteinů uvedená pro monomer, na ose y frakce navázaného peptidu vypočítaná podle rovnice 3. Výsledné disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce 4.

proteiny s histidinovou kotvou	disociační konstanta K_D [μM]
14-3-3 ζ WT	$1,54 \pm 0,01$
14-3-3 ζ S207G	$1,7 \pm 0,1$
14-3-3A WT	$1,7 \pm 0,1$
14-3-3A G216S	$2,7 \pm 0,2$

Tabulka 4: Disociační konstanty pro peptid pRaf-259 značený sondou FITC získané pomocí změn stacionární intenzity fluorescence.

6 Diskuse

Tato práce se zaměřila na studium ohybu H8-H9 a jeho možný vliv na vazebné vlastnosti isoform proteinů 14-3-3. Naše motivace vychází z dříve publikovaných prací na toto téma, které ukazovaly, že ječmenná isoforma 14-3-3A má nízkou afinitu k ligandům oproti ostatním ječmenným isoformám kvůli přítomnosti glycinového zbytku v ohybu H8-H9 [16]. Pomocí fluorescenční korelační spektroskopie a stacionárního měření intenzity fluorescence jsme se pokusili tento jev ověřit. Dále jsme stejnými metodami srovnávali, zda dojde ke stejnému jevu, pokud zmutujeme lidskou isoformu 14-3-3ζ tak, aby na pozici 207 byl vnesen místo serinu glycin.

6.1 Exprese a purifikace proteinů

Lidské isoformy 14-3-3 proteinu se exprimovaly velice dobře. Nejlépe se exprimoval protein 14-3-3ζ S207G. Oproti tomu ječmenné isoformy se exprimovaly s nízkým výtěžkem, což mělo za následek i nízký výtěžek purifikace. Pro účely měření bylo proto nutné expresi a purifikaci ječmenných isoform několikrát opakovat, abychom měli proteiny v dostatečném množství.

Při SDS-PAGE po niklové chelatační chromatografii se ukázalo, jaké přibližné množství proteinu dané frakce obsahují a jaké jsou v nich případné nečistoty (kap. 5.1.1). Na některých SDS-PAGE gelech bylo možné pozorovat i slabé proužky, které neodpovídaly molekulové hmotnosti daných proteinů. Tyto nečistoty se dále odstraňovaly při aniontové a gelové permeační chromatografii.

Při aniontové chromatografii se odstraňovaly nečistoty na základě odlišného náboje (kap. 5.1.2). Z výšky píku u chromatogramu se také dalo přibližně určit, jaké množství proteinu se v roztoku nachází. Gely SDS-PAGE ukázaly, že po provedení tohoto purifikačního kroku se čistota proteinů zlepšila.

Gelová permeační chromatografie sloužila k odstranění agregátů, které se vytvořily během předchozích purifikačních kroků (kap. 5.1.3). Poté se proteiny skladovaly při -20°C v pufru s 10% glycerolem. Ten samý pufr byl použit na měření vazebné afinity.

6.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

S měřením disociační konstanty metodou fluorescenční korelační spektroskopie nebylo dosud příliš mnoho zkušeností, bylo tudíž zapotřebí metodu pro toto konkrétní měření optimalizovat. Bylo provedeno mnoho měření, aby se zajistily nejlepší podmínky, jako koncentrace peptidu v jednotlivých kyvetách a optimální koncentrace proteinu. Také bylo zapotřebí zajistit vhodné nastavení aparatury.

Jako první se zjišťovalo, zda se peptid použitý pro měření neadsorbuje na sklo kyvety. Měření fluktuace signálů prováděné po několika minutách se tento jev bohužel potvrdil. Bylo tedy nutné zajistit, aby chyba způsobená adsorpcí neovlivnila měření disociačních konstant proteinů. Stěny použitých kyvet byly tedy přes noc nasyceny albuminem, díky kterému se peptid na sklo téměř neadsorboval. Drobné odchylky v měření však způsoboval fakt, že na stěny každé ze čtyř kyvet, které se používaly na jedno měření, se naadsorboval albumin vždy v trochu jiném množství a signál tak fluktoval pro každý měřený protein nepatrně odlišně. Tato chyba se nedala odstranit použitím jedné kyvety, protože kyvety používané ve fluorescenční korelační spektroskopii jsou velice malé (maximální objem 400 μ l) a téměř není možné je vyplachovat (kvůli naadsorbovanému albuminu), a na každý protein tak musela být použita jiná kyveta. Této chyby se tedy nedalo vyvarovat.

Měření disociačních konstant bylo nejdřív prováděno pouze pro protein 14-3-3 ζ WT a několikrát opakováno pro různé koncentrace peptidu i proteinu. Také bylo nutno zjistit, jaká časová prodleva je zapotřebí aby se z peptidu a přidaného proteinu vytvořil komplex. Nakonec byly vybrány optimální koncentrace a interval po přidání proteinu (2 min) a byly proměřeny křivky pro všechny čtyři proteiny.

Z výsledků fluorescenční korelační spektroskopie vyplynulo, že pro lidské isoformy 14-3-3 ζ WT a 14-3-3 ζ S207 váže mutovaná isoforma o něco hůře než isoforma původní, ve které je přítomen na pozici 207 serin. Stejně to bylo u isoform ječmenných, kde isoforma 14-3-3A WT vázala peptid s dokonce nejvyšší afinitou oproti isoformě s mutací 14-3-3A G216S, u které byla disociační konstanta nejvyšší ze všech čtyř proteinů. Tato zjištění neodpovídají předchozím výzkumům ječmenných isoform, kde bylo prokázáno, že hv 14-3-3A WT s ligandy téměř neinteraguje, zatímco po mutaci glycinu na serin u hv 14-3-3A G216S došlo k výraznému zlepšení vazby [18].

6.3 Stacionární měření intenzity fluorescence

Na fluorimetru PC1 byla původně prováděna měření při kterých se K_D zjišťovala na základě změn stacionární anisotropie fluorescence. Vyhodnocování dat anisotropie fluorescence se však ukázalo jako velice nepřesné z důvodu příliš velké chyby v podílu kvantových výtěžků. Dále se tedy přistoupilo k vyhodnocování dat pomocí naměřených změn stacionární intenzity fluorescence.

Pro měření bylo vyzkoušeno několik koncentrací peptidu pRaf-259 značeného na N-konci sondou FITC, od 50 n do 300 nM, jako nejlepší byla nakonec zvolena koncentrace 100 nM. Jako interval po napipetování a zamíchání proteinu do roztoku pufru s peptidem byl zvolen interval 2 min.

Z naměřených hodnot K_D vyplývá, že nejlepší afinitu k peptidu má původní nezmutovaný protein 14-3-3 ζ WT, zatímco jeho mutovaná forma 14-3-3 ζ S207G má afinitu nižší. Stejný jev se ukázal i u ječmenných isoform, kde protein 14-3-3A WT vázal výrazně lépe než jeho mutant hv 14-3-3A G216S. Opět se tak nepotvrdily výsledky z literatury, kde bylo pozorováno, že protein 14-3-3A WT váže s nejhorší afinitou a jeho mutací G216S afinita k ligandu vzroste [18].

6.4 Srovnání výsledků z metod FCS a stacionárního měření intenzity fluorescence

V rámci srovnání dvou lidských a dvou ječmenných isoform se výsledky z obou metod podobaly. U lidské isoformy 14-3-3 ζ WT byla vždy vazebná afinita vyšší, než u jejího mutantu 14-3-3 ζ S207G. Překvapivě tomu tak bylo i u isoform ječmenných, kde se pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie naměřila pro 14-3-3A WT dokonce nejnižší disociační konstanta (tzn. nejvyšší afinita k ligandu) ze všech čtyř proteinů. Z těchto výsledků vyplývá, že po cílené mutagenězi jak lidských, tak ječmenných isoform, se afinita snížila.

Tyto výsledky se odlišují od výsledků dosažených dříve M. P. Sinnigem a jeho skupinou v laboratoři Vrije Universiteit (Amsterdam, Nizozemí). Plasmidy pro jednotlivé ječmenné isoformy jsme obdrželi z této laboratoře. Když byla v naší laboratoři ověřena

získaná DNA sekvenací, zjistilo se, že protein hv 143-3A WT má na pozici 226 vnesenou další, nežádoucí mutaci (místo isoleucinu threonin). Threonin byl tedy zmutován zpět na isoleucin. Tato mutace může být jedním z důvodů odlišnosti výsledků.

Dalším zajímavým faktem je, že přesto že u lidské a ječmenné isoformy byly provedeny mutace přesně opačné (u 14-3-3ζ se mutoval serin na glycin, u hv 14-3-3A naopak glycin na serin), trend u obou isoformem zůstal stejný, tj. u mutantů se v obou případech afinita k ligandu snížila. Měření a výsledné hodnoty disociační konstanty mohl také ovlivňovat zvolený peptid, který byl odvozen ze sekvence lidské Raf kinasy.

Další otázkou zůstává, jak by hodnoty disociačních konstant mohla ovlivnit přítomnost kationtů Mg^{2+} a Ca^{2+} . Bylo prokázáno, že do ohybu H8-H9 se vážou kationty Mg^{2+} a Ca^{2+} a ovlivňují vazbu s ligandem [18, 26, 27]. V této práci jsme prováděli měření v pufrch bez přítomnosti těchto kationtů. Jak by v případě isoformem 14-3-3ζ WT, 14-3-3ζ S207G, hv 14-3-3A WT a hv 14-3-3A G216S ovlivnila vazbu přítomnost jednoho z výše uvedených kationtů, může být do budoucna předmětem výzkumu.

7 Závěr

- 1) Byla provedena exprese a purifikace následujících proteinů:
 - ječmenné isoformy hv 14-3-3A WT
 - ječmenné isoformy hv 14-3-3A s mutací G216S
 - lidské isoformy 14-3-3ζ WT
 - lidské isoformy 14-3-3ζ s mutací S207G

- 2) Pomocí metody fluorescenčně korelační spektroskopie byla prozkoumána vazba výše zmíněných proteinů a peptidu pRaf-259 značeným sondou ATTO, z naměřených křivek byla vypočtena hodnota K_D pro jednotlivé proteiny.

- 3) Pomocí stacionárního měření fluorescence byla prozkoumána vazba výše zmíněných proteinů a peptidu pRaf-259, značeným sondou FITC, z naměřených křivek byla vypočtena hodnota K_D pro jednotlivé proteiny.

U lidských i ječmenných isoform bylo pozorováno, že po bodové mutaci v H8-H9 ohybu se afinita k vazebnému partnerovi snižuje.

8 Seznam použité literatury

1. Yaffe, M.B.: *FEBS Letters* 513, 53-57 (2002)
2. Obsilova, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., Obsil, T.: *Physiol. Res.* 57, 11-21 (2008)
3. Kohoutová, L.: *Diplomová práce*, PřF UK (2008)
4. Fu, H., Subramanian, R., Masters, S.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-647 (2000)
5. Aitken, A.: *Semin. Cancer Biol.* 16, 162-172 (2006)
6. Moore, B., Perez, V.: *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, 343-359 (1967)
7. Gardino, A.K., Smerdon, S.J., Yaffe, M.B.: *Semin. Cancer Biol.* 16, 173-182 (2006)
8. Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandemeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J.L., Oecking, C.: *Mol. Cell* 25, 427-440 (2007)
9. Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F.: *Cell* 105, 257-267 (2001)
10. Petosa, C., Masters, S.C., Bankston, L.A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., Liddington, R.C.: *J. Biol. Chem.* 273, 16305-16310 (1998)
11. Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundstrom, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17237-17242 (2006)
12. Wilker, E., Grant, R., Artim, S., Yaffe, M.B.: *J. Biol. Chem.* 280, 18891-18898 (2005)
13. Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B.: *Mol. Cell* 4, 153-166 (1999)
14. Liu, D., Bienkowska, J., Collier, C., Fu, H., Liddington, R.: *Nature* 376, 191-194 (1995)
15. Benzinger, A., Popowicz, G.M., Joy, J.K., Majumdar, S., Holak, T.A., Hermeking, H.: *Cell Research* 15, 219-227 (2005)
16. Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S.: *Cell* 84, 889-897 (1996)

17. Yaffe, M.B., Rittiger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C.: *Cell*, 91 961-971 (1997)
18. 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)
19. Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S., Li, M.: *FEBS Letters* 580, 1531-1535 (2006)
20. Ganguly, S., Weller, J.L., Ho, A., Chemineau, P., Malpaux, B., Klein, D.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 1222-1227 (2005)
21. Gu, M., Du, X.: *J. Biol. Chem.* 273, 33465-33471 (1998)
22. Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T.: *J. Biol. Chem.* 279, 4531-4540 (2004)
23. Wang, W., Shakes, D.C.: *J. Mol. Evol.* 43, 384-398 (1996)
24. Truong, A.B., Masters, S.C., Yang, H., Fu, H.: *Proteins* 49, 321-325 (2002)
25. Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T.: *J. Biol. Chem.* 279, 49113-49119 (2004)
26. Shen, W., Clark, C., Huber, S.C.: *Plant J.* 34, 473-484 (2003)
27. Athwal, G.S., Huber, S.C.: *Plant J.* 29, 119-129 (2002)
28. Testerink, C., van Zeijl, M.J., Drumm, K., Palmgren, M.G., Palmgren, M.G., Collinge, D.B., Kijne, J. W., Wang, M.: *Plant. Mol. Biol.* 50, 535-542 (2002)
29. Börnke, F.: *J. Plant Physiol.* 162, 161-168 (2005)
30. Liu, Y.C., Elly, C., Yoshida, H., Bonnefoy-Berard, N., Altman, A.: *J. Biol. Chem.* 271, 14591-14595 (1996)
31. Ichimura, T., Ito, M., Itagaki, C., Takahashi, M., Horigome, T., Omata, S., Ohno, S., Isobe, T.: *FEBS Letters* 413, 273-276 (1997)
32. Schoonheim, P.J., Sinnige, M.P., Casaretto, J.A., Veiga, H., Bunney, T.D., Quatrano, R.S., de Boer, A.H.: *Plant J.* 49, 289-301 (2007)
33. Woodcock, J.M., Murphy, J., Stomski, F.C., Berndt, M.C., Lopez, A.F.: *J. Biol. Chem.* 278, 36323-36327 (2003)
34. Sehnke, P.C., Laughner, B., Cardasis, H., Powell, D., Ferl, R.J.: *Plant Physiol.* 140, 647-660 (2006)
35. Dubois, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhusses, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moelling, K., Aitken, A.: *J. Biol. Chem.* 272, 28882-28888 (1997)
36. Clokie, S.J., Cheung, K.Y., Mackie, S., Marquez, R., Peden, A.H., Aitken, A.: *FEBS J.* 272, 3767-3776 (2005)

37. Dubois, T., Howell, S., Amess, B., Kerai, P., Learmonth, M., Madrazo, J., Chaundri, M., Rittiger, K., Scarabel, M., Soneji, Y., Aitken, A.: *J. Protein Chem.* 16, 513-522 (1997)
38. Ferl, R.J., Manak, M.S., Reyes, M.F.: *Genome Biology* 3 3010,1-3010,7 (2002)
39. Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A.: *FEBS Letters* 368, 55-58 (1995)
40. Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y.: *EMBO J.* 23, 1889-1899 (2004)
41. Acevedo, S.F., Tsigkari, K.K., Grammenoudi, S., Skoulakis, M.C.: *Genetics* 177, 239-253 (2007)
42. van Heusden, G.P., Griffiths, D.J., Ford, J.C., Chin-A-Woeng, T.F., Schrader, P.A., Carr, A.M., Steensma, H.Y.: *Eur. J. Biochem.* 229, 45-53 (1995)
43. Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R.J., Sommarin, M., Larsson, C.: *J. Mol. Evol.* 51, 446-458 (2000)
44. Mhavech, P.: *Cell. Res.* 15, 228-236 (2005)
45. Tzivion, G., Luo, Z, Avruch, J.: *Nature* 394, 88-92 (1998)
46. Tzivion, G., Luo, Z, Avruch, J.: *J. Biol. Chem.* 275, 29972-29778 (2000)
47. Bridges, D., Moorhead, G.B.: *Sci. STKE*, 2004, re10 (2004)
48. Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J.A., Klein, D.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8083-8088 (2003)
49. Graves, P.R., Lovly, C.M., Uy, G.L., Piwnica-Worms, H.: *Oncogene* 20, 1839-1851 (2001)
50. Kao, H.Y., Verdel, A., Tsai, C.C., Simon, C., Juguilon, H., Knochbin, S.: *J. Biol. Chem* 276, 47496-47507 (2001)
51. van der Heide, L.P., Hoekman, M.F., Smidt, M.P.: *Biochem. J.* 380, 297-309 (2004)
52. Argawal-Mawal, A., Qureshi, H.Y., Cafferty, P.W., Yuan, Z., Han, D., Lin, R., Paudel, H.K.: *J. Biol. Chem.* 278, 12722-12728 (2003)
53. Santoro, M.M., Gaudino, G., Marchisio, P.C.: *Dev. Cell* 5, 257-271 (2003)
54. Athwal, G.S., Huber, J.L., Huber, S.C.: *Plant Cell. Physiol.* 39, 1065-1072 (1998)
55. Wurtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A., Oecking, C.: *EMBO J.* 22, 987-994 (2003)
56. Mackintosh, C.: *Biochem. J.* 381, 329-342 (2004)
57. Wilker, E., Yaffe, M.B.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 633-642 (2004)

58. Powel, D.W, Rane, M.J., Joughin, B.A., Kalmukova, R., Hong, J.H., Tidor, B., Dean, W.L., Pierce, W.M., Klein, J.B., Yaffe, M.B., McLeish, K.R.: *Mol. Cell. Biol.* 23, 5376-5387 (2003)
59. Aitken, A., Baxter, H., Dubois, T., Clokie, S., Mackie, S., Mitchell, K., Peden, A., Zemlickova, E.: *Biochem. Soc. Trans.* 30, 351-360 (2002)
60. Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S.J.: *Nature* 376, 188-191 (1995)
61. Rommel, C., Radziwill, G., Lovric, J., Noeldeke, J., Heinicke, T., Jones, D., Aitken, A., Moelling, K: *Oncogene* 12, 609-619 (1996)
62. Wang, B., Yang, H., Liu, Y.C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E., Fu, H.: *Biochemistry* 38, 12499-12504 (1999)
63. Clark, K.L., Oelke, A., Johnson, M.E., Eilert, K.D., Simpson, P.C., Todd, S.C.: *J. Biol. Chem.* 279, 19401-19406 (2004)
64. Beranová, L., Humpolíčková, J., Hof, M.: *Chem. Listy* 103, 125-129 (2009)

