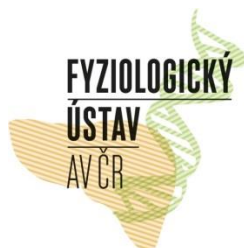


Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Mgr. Miroslava Kopecká

Molekulární mechanismus regulace funkce neutrální trehalasy Nth1

Molecular mechanism of the neutral trehalase Nth1 regulation

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29. 04. 2015

MIROSLAVA KOPECKÁ

Podpis

Identifikační záznam:

KOPECKÁ, Miroslava. *Molekulární mechanismus regulace funkce neutrální trehalasy Nth1*. [Molecular mechanism of the neutral trehalase Nth1 regulation]. Praha, 2015. 151 stran, 3 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Fyziologický Ústav AV ČR, v.v.i. Vedoucí práce Obšilová, Veronika.

Poděkování:

Děkuji především své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení disertační práce, za množství cenných rad týkající se práce v laboratoři a všestrannou pomoc a podporu nejen v oblasti výzkumu.

Můj velký dík patří členům vědeckého týmu RNDr. Petra Nováka, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., RNDr. Petrovi Manovi a Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi za naměření a vyhodnocení vodík/deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií a chemického zesílení.

Dále děkuji prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za pomoc a rady týkající se proteinové krystalografie. Děkuji také členům jeho vědecké skupiny z Katedry fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy RNDr. Lence Řežábkové, Ph.D. a Mgr. Daliborovi Koškovi za naměření a zpracování výsledků analytické ultracentrifugace.

Ing. Pavlíně Ullrichové z Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze děkuji za naměření a zpracování výsledků cirkulárního dichroismu.

Mgr. Janě Škerlové z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. děkuji za pomoc a praktické rady při prvním měření diferenční skenovací fluorimetrie.

Děkuji také Mgr. Jakubovi Ptáčkovi z Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i. za obsluhu robotu Crystal Gryphon při hledání vhodných krystalografických podmínek.

Ostatním studentům a zaměstnancům oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. děkuji za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, prarodičům a Čendovi za všestrannou podporu při mém studiu.

Tato disertační práce byla realizována díky finanční podpoře:

Grantové agentury České republiky, projekt číslo P207/11/0455

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 644313

Tato práce vznikla na oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu, Akademie věd České republiky, v.v.i. Práce je založena na následujících publikacích, jejichž kopie jsou součástí přílohy.

MACAKOVA, E.¹, **KOPECKA, M.**¹, KUKACKA, Z., VEISOVA, D., NOVAK, P., MAN P., OBSIL T., OBSILOVA V. (2013) Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* **1830** (10): 4491 – 4499. (IF²⁰¹³ = 3.829)

¹ rovnocenní první autoři

KOPECKA, M., KOSEK, D., KUKACKA, Z., REZABKOVA, L., MAN, P., NOVAK, P., OBSIL, T., OBSILOVA, V. (2014) Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1. *The Journal of Biological Chemistry* **289** (20): 13948 – 13961. (IF²⁰¹³ = 4.600)

OBSILOVA, V., **KOPECKA, M.**, KOSEK, D., KACIROVA, M., KYLAROVA, S., REZABKOVA, L., OBSIL T. (2014) Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiological Research* **63**, Suppl. 1: 155 – 164. (IF²⁰¹³ = 1.487)

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	1
1 ÚVOD.....	5
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	6
2.1 TREHALOSA	6
2.1.1 Funkce trehalosy	6
2.1.2 Význam trehalosy v kvasinkách rodu <i>S. cerevisiae</i>	8
2.2 TREHALASY.....	8
2.2.1 Hydrolýza trehalosy	9
2.2.2 Lokalizace a vlastnosti kvasničných trehalas.....	9
2.2.3 Isoformy kvasničných trehalas	10
2.2.4 Kvasničná neutrální trehalasa Nth1	11
2.2.5 Funkce kvasničných neutrálních trehalas	12
2.2.6 Primární struktura neutrální trehalosy Nth1	12
2.2.7 Krystalové struktury neutrální trehalosy z <i>E. coli</i>	13
2.2.8 Regulace aktivity neutrální trehalosy Nth1	15
2.2.9 Význam fosforylace při regulaci aktivity Nth1.....	16
2.2.10 Vliv kationtů Ca^{2+} na aktivitu neutrální trehalosy.....	17
2.2.11 Funkce trehalas u savců	20
2.2.12 Možné využití vlastností trehalosy a trehalas v praxi	21
2.3 PROTEINY 14-3-3	22
2.3.1 Isoformy proteinů 14-3-3	22
2.3.2 Velikost a struktura proteinů 14-3-3	22
2.3.3 Variabilní C-konec proteinů 14-3-3	24
2.3.4 Vazebné motivy rozpoznávané proteiny 14-3-3	24
2.3.5 Mechanismus funkce proteinů 14-3-3.....	25
2.3.6 Krystalové struktury proteinů 14-3-3 s plně funkčními vazebnými partnery	28
2.3.7 Interakční dosah způsobený vazbou proteinu 14-3-3.....	30
2.3.8 Nth1 jako vazebný partner proteinů 14-3-3	31
3 CÍLE PRÁCE.....	33
4 POUŽITÝ MATERIÁL	34
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
4.2 OSTATNÍ MATERIÁL	36
4.3 PŘÍSTROJE.....	38
5 EXPERIMENTÁLNÍ METODY	39
5.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH KONSTRUKTŮ.....	39

5.1.1	Klonování konstruktů NTH1 WT	39
5.1.2	Klonování konstruktů NTH1 100–751 a 153–751	42
5.1.3	Klonování konstruktů BMH1 WT a ΔC	42
5.1.4	Horizontální TBE agarosová elektroforéza.....	42
5.1.5	Transformace metodou teplotního šoku.....	43
5.1.6	Izolace plasmidové DNA.....	44
5.1.7	Cílená bodová mutagenese genů NTH1 WT	45
5.1.8	Štěpení templátové DNA	47
5.1.9	Sekvenační analýza DNA	47
5.1.10	Predikce sek. struktury Nth1 a porovnání shody s krystalovou strukturou 2JG0	49
5.2	EXPRES E A PURIFIKACE PROTEINŮ	49
5.2.1	Transformace kompetentních buněk vhodných pro expresi proteinů.....	49
5.2.2	Zásobní roztoky transformovaných bakterií	50
5.2.3	Expres e proteinů	50
5.2.4	Centrifugace a lyze buněk.....	51
5.2.5	Sonikace bakterií.....	51
5.2.6	Niklová chelatační chromatografie	52
5.2.7	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS	53
5.2.8	Dialýza.....	56
5.2.9	Thrombinové štěpení	57
5.2.10	Štěpení TEV proteasou a její příprava	57
5.2.11	Iontově výměnná chromatografie	59
5.2.12	Koncentrování a filtrování proteinů.....	59
5.2.13	Gelová permeační chromatografie	60
5.2.14	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů.....	61
5.2.15	Fosforylace proteinu Nth1	61
5.3	MOLEKULÁRNÍ MODELOVÁNÍ	63
5.4	BIOFYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE	63
5.4.1	Stanovení enzymové aktivity proteinů Nth1.....	63
5.4.2	Analýza proteinů pNth1 D114L a D125L pomocí MS.....	64
5.4.3	Nativní TBE elektroforéza.....	65
5.4.4	Analytická ultracentrifugace.....	66
5.4.5	Cirkulární dichroismus.....	67
5.4.6	Diferenční skenovací fluorimetrie	68
5.4.7	H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií	70
5.4.8	Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií	72

5.4.9	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)	74
5.4.10	Proteinová krystalografie	76
6	VÝSLEDKY	79
6.1	EXPRESSE A PURIFIKACE PROTEINŮ	79
6.1.1	Expresse a purifikace Nth1 WT	79
6.1.2	Expresse a purifikace mutantní formy Nth1 D114L	81
6.1.3	Expresse a purifikace mutantní formy Nth1 D125L	82
6.1.4	Expresse a purifikace Nth1 WT v pRSFDuet-1	84
6.1.5	Expresse a purifikace Nth1 153–751	86
6.1.6	Expresse a purifikace Nth1 100–751	87
6.1.7	Expresse a purifikace proteinů Bmh1 WT	88
6.1.8	Expresse a purifikace proteinů Bmh1 ΔC M237Stop.....	90
6.2	BIOFYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE	92
6.2.1	Stanovení enzymové aktivity pNth1 WT	93
6.2.2	Stanovení enzymové aktivity mutantních forem pNth1.....	94
6.2.3	Ověřování vazby proteinů Bmh1 na pNth1 pomocí nativní TBE elektroforézy.....	95
6.2.4	Studium vlivu kationtů Ca ²⁺ na stabilitu komplexu pNth1:Bmh1	97
6.2.5	Sedimentační analýza mutantních forem pNth1	98
6.2.6	Cirkulární dichroismus.....	99
6.2.7	Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF)	102
6.2.8	Pozorování změn struktury pNth1 pomocí H/D výměny spojené s MS	103
6.2.9	Pozorování změn struktury proteinů Bmh1 pomocí H/D výměny spojené s MS	108
6.2.10	Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií	111
6.2.11	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)	115
6.2.12	Předpokládaný mechanismus aktivace Nth1.....	119
6.2.13	Diferenční skenovací fluorimetrie proteinů Nth1 153–751 a Nth1 100–751	120
6.2.14	Krystalizace konstruktů Nth1 153–751	122
6.2.15	Krystalizace konstruktů Nth1 100–751	123
6.2.16	Krystalizace komplexu pNth1 WT:Bmh1 ΔC M237Stop	125
7	DISKUSE.....	127
8	ZÁVĚR	131
9	SOUHRN	132
10	SUMMARY	134
11	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	136
12	PŘÍLOHY.....	151

Seznam zkratek

14-3-3	označení rodiny kyselých regulačních proteinů
A	absorbance
AANAT	serotonin-N-acetyltransferasa
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
Ath1	kyselá trehalasa 1
ATP	adenosintrifisfát
AUC	analytická ultracentrifugace
Bicin	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycin
BIS-TRIS	2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol
BL21(DE3)	kmen bakterií <i>Escherichia coli</i>
Bmh1, Bmh2	kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 (z angl. Brain modulosignalin homologue)
<i>c</i>	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
Ca–Ca	vzdálenost/spojení mezi α -uhlíky
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	cirkulární dichroismus
cDNA	DNA vytvořená reverzní transkripcí buněčné mRNA
C-konec	konec proteinu obsahující skupinu -COOH
<i>c(S)</i>	kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů
Dcs1	enzym odstraňující čepičku z konce mRNA
DD	dvojitě naštěpený (z angl. double digest)
DEAE	diethylaminoethyl
D_{max}	nejdelší vzdálenost v rámci molekuly [nm]
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosid trifosfát (z angl. deoxynucleoside triphosphate)
DSF	diferenční skenovací fluorimetrie (z angl. differential scanning fluorimetry)
DSG	homobifunkční síťovací činidlo disukcinimidyl glutarát
DSS	homobifunkční síťovací činidlo disukcinimidyl suberát
DTT	1,4-dithiothreitol (redukční činidlo)
EC	klasifikace enzymů (z angl. Enzyme Commission)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
FOXO	transkripční faktor
FPLC	kapalinová chromatografie pro separaci proteinů (z angl. fast protein liquid chromatography)
H1–9	označení α -helixů proteinu Bmh1 (H1 až H9)
H/D	vodík/deuteriová výměna
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (z angl. high pressure liquid chromatography)
GF14c	isoforma rýžového proteinu 14-3-3
Glc	glukosa
Hd3a	typ florigenu
$I(0)$	intenzita rozptýleného rentgenového záření v přímém směru (při nulovém úhlu)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
$I(s)$	intenzita rozptýleného rentgenového záření
k_{cat}	číslo přeměny [s^{-1}]
K_d	rovnovážná disociační konstanta [$mol\ dm^{-3}$]
<i>K. lactis</i>	kvasinky rodu <i>Kluyveromyces lactis</i>
K_m	Michaelisova konstanta [$mol\ dm^{-3}$]
l	délka optické dráhy [cm]
LB	název kultivačního média podle Luria a Bertani
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
MM_{exp}	molekulové hmotnosti rozpuštěných látek určené pomocí SAXS
MES	2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina
MRE	průměrná reziduální elipticita (z angl. mean residue ellipticity) [$deg\ cm^2\ dmol^{-1}\ res^{-1}$]
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
M_w	relativní molekulová hmotnost
N-konec	konec proteinu obsahující skupinu $-NH_2$
N_R	počet aminokyselinových zbytků v proteinu
Nth1, Nth2	kvasničný enzym neutrální trehalasa 1, neutrální trehalasa 2
ot./min	počet otáček za minutu

OsFD1	transkripční faktor
<i>p. a.</i>	k analytickým účelům (z latinského <i>pro analysi</i>)
PBS	fosfátový pufr obsahující NaCl a KCl
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PDB	databáze proteinových struktur (z angl. Protein Data Bank)
Pdc	fosducin
pET-15b	označení typu plasmidu
pET-32b	označení typu plasmidu
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
$P(r)$	distribuční funkce vzdáleností
pRSFDuet-1	označení typu plasmidu
Q_{MRW}	průměrná reziduální elipticita [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{res}^{-1}$]
R_g	gyrační poloměr [nm]
RGS3	regulátor G-proteinové signalizace
RNA	ribonukleová kyselina
RTG	rentgenové záření
<i>s</i>	rozptylový vektor
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření (z angl. small angle X-ray scattering)
<i>S. cerevisiae</i>	kvasinky rodu <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacril Amide Gel Electrophoresis)
<i>S. pombe</i>	kvasinky rodu <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TBE	pufr obsahující Tris-HCl, boritou kyselinu a EDTA
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
T_m	teplota tání [°C]
TOP10	kmen bakterií <i>Escherichia coli</i>
Tre37A	enzym neutrální trehalasa pocházející z bakterií <i>Escherichia coli</i>
Tris	tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV/VIS	ultrafialová oblast/viditelná oblast (z angl. ultraviolet/visible)
VDM	inhibitor trehalas validoxylamin A

v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
WT	nativní forma rekombinantního proteinu (z angl. wild type)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
w/w	hmotnost/hmotnost (z angl. weight/weight)
ε	molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
θ_{obs}	elipticitu měřená při CD spektroskopii [mdeg]
2θ	úhel rozptylu rentgenového záření
λ	vlnová délka [nm]

1 Úvod

Předkládaná disertační práce je součástí dlouhodobého projektu laboratoře RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D., který se zabývá studiem enzymu neutrální trehalasy (Nth1, EC 3.2.1.28) pocházejícího z kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*. V rámci tohoto projektu byl již dříve studován mechanismus regulace enzymové aktivity Nth1 v závislosti na její fosforylaci a vazbě kvasničných proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2). V průběhu tvorby této práce jsem se zabývala úlohou kationtů Ca^{2+} při aktivaci Nth1, protože přesný molekulární mechanismus této interakce nebyl doposud objasněn. Dále jsem se věnovala studiu strukturní podstaty celého procesu regulace aktivity Nth1 prostřednictvím proteinů Bmh1 a/nebo kationtů Ca^{2+} .

Enzym Nth1 hraje důležitou roli v obranných reakcích kvasinek vůči nepříznivým vlivům, jako jsou změny teplot, působení oxidativního stresu nebo toxických látek. Při tomto procesu Nth1 hydrolyzuje neredukující disacharid trehalosu za vzniku dvou molekul glukosy. Trehalosa slouží i v mnoha jiných organismech jako zásobní sacharid a univerzální ochrana vůči stresu. Aktivita enzymu Nth1 je regulována fosforylací pomocí proteinkinasy PKA a následnou vazbou proteinů Bmh1 a Bmh2. K regulaci aktivity také přispívá vazba kationtů Ca^{2+} na Ca-vazebnou doménu Nth1. Tato doména se nachází na N-koncové části proteinu Nth1 a obsahuje tzv. EF-hand motiv $\text{D}^{114}\text{TDKNYQITIED}^{125}$, který je konzervovaný mezi velkým množstvím Ca-vazebných proteinů.

Doposud nebyla vyřešena žádná struktura neutrální trehalasy pocházející z eukaryotního organismu. Naše data poskytují ucelený strukturní pohled na mechanismus aktivace kvasničného enzymu Nth1 a tak mohou sloužit k lepšímu porozumění metabolismu trehalosy a trehalas, ale i k pochopení úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci dalších enzymů.

2 Literární přehled

2.1 Trehalosa

Trehalosa (α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosid, viz obrázek 2.1, str. 9) je neredukující disacharid, který byl poprvé izolován v roce 1832 z námelu žita (Wiggers 1832). Své pojmenování trehalosa získala v roce 1858, kdy ji Marcellin Berthelot izoloval jako sladkou substanci (trehala manna) obsažené v kokonech brouků nosatců (Wyatt a Kalf 1956). V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* byla trehalosa objevena v roce 1925 (Koch a Koch 1925). Tento disacharid byl dále nalezen v buňkách rostlin, bakterií, hub, hmyzu a různých bezobratlých živočichů, ale nebyl doposud nalezen u žádného ze savců (Elbein 1974; Thevelein 1984).

Jedním z mechanismů produkce trehalosy je její syntéza z UDP-glukosy a glukosa-6-fosfátu pomocí dvoustupňové reakce katalyzované komplexem trehalosa-6-fosfátsynthasy a trehalosa-6-fosfátfosfatasy (Vandercammen et al. 1989; Londesborough a Vuorio 1991). Produkce trehalosy je dále indukována nepříznivými životními podmínkami, jako jsou sucho, vysoké nebo naopak nízké teploty, oxidativní stres nebo působení nejrůznějších toxických chemikálií.

Nashromážděná trehalosa při stresových podmínkách patrně chrání proteiny a buněčné membrány před poškozením. Navíc může také v některých buňkách fungovat jako signální nebo regulační molekula, která spojuje metabolismus trehalosy s transportem glukosy a glykolýzou. U několika druhů bakterií (především u aktinomycet) byla trehalosa objevena v jejich buněčných stěnách, kde byla součástí několika různých glykolipidů (Elbein et al. 2003).

2.1.1 Funkce trehalosy

Hladiny trehalosy v buňkách se mění v závislosti na fázi jejich růstového cyklu, přísunu živin a vnějších vlivech životního prostředí. U hmyzu je trehalosa hlavní složkou hemolymfy a hrudních svalů a je spotřebovávána především při létání (Becker et al. 1996). V případě houbových spor jsou obsah trehalosy a její hydrolyza rozhodující při klíčení, kdy je využívána jako zdroj uhlíku a produkovaná glukosa jako zdroj energie (Rousseau et al. 1972; Thevelein 1984).

Při studiu anhydrobiotických organismů, které dokáží přežít bez vody desítky let, bylo objeveno, že jejich společným znakem jsou vysoké koncentrace trehalosy uvnitř buněk. Do skupiny takovýchto organismů patří některé rostliny, kvasinky, spory hub, ale také

mikroskopičtí živočichové jako hlístice, vířníci a cysty artémií (Leopold 1986; Crowe et al. 1984, 1992). Při výzkumu kvasinkových kultur nacházejících se v tzv. log-fázi, které obsahují nízké koncentrace trehalasy, bylo zjištěno, že tyto kvasinky jsou velice citlivé k dehydrataci. Naproti tomu kvasinky, které se nacházely ve stacionární fázi svého růstového cyklu, ve které jsou koncentrace trehalosy vyšší, projevily vyšší schopnost přežití dehydratace. Tato schopnost byla lepší při vyšších koncentracích nashromážděné trehalosy (Gadd et al. 1987). Následně bylo prokázáno, že schopnost přežití v přítomnosti trehalosy není závislá na fázi růstu, ve které se testované kvasinky nacházejí. Kvasinky nacházející se v log-fázi vystavené teplotnímu šoku začaly okamžitě syntetizovat trehalosu a tím zvýšily svoji schopnost přežít následnou dehydrataci (Hottiger et al. 1987). Schopnost anhydrobiotických organismů přežít během dehydratace patrně spočívá v dovednosti trehalosy stabilizovat fosfolipidovou dvojvrstvu buněčných membrán (Crowe et al. 1984; Rudolph et al. 1990). Trehalosa má také ochranný stabilizující vliv na labilní proteiny během procesu jejich sušení. Mechanismus vazby na proteiny je patrně podobný mechanismu vazby na membrány – trehalosa se váže pomocí vodíkových vazeb mezi jejími hydroxylovými skupinami a polárními aminokyselinovými zbytky proteinů (Carpenter a Crowe 1989).

Při studiu kvasinek rodu *S. cerevisiae* bylo prokázáno, že podněty, které spouštějí tzv. odezvu teplotního šoku, také vyvolávají akumulaci trehalosy. Důležité *in vivo* a *in vitro* studie prokázaly, že trehalosa chrání buňky kvasinek před negativními vlivy vysokých teplot tím, že stabilizuje struktury proteinů a chrání je před denaturací a agregací denaturovaných proteinů (Bell et al. 1992; Singer a Lindquist 1998b).

Další důležitou vlastností trehalosy je její schopnost chránit buňky před negativními vlivy kyslíkových radikálů. Pokud není přítomna trehalosa, nejsou buněčné proteiny chráněny a dochází vlivem těchto radikálů k jejich poškození (Benaroudj et al. 2001).

Při výzkumu mutantních forem bakterií *E. coli*, které nebyly schopné produkovat trehalosu, se ukázalo, že tyto bakterie při teplotě 4 °C umírají mnohem rychleji než jejich přirozené formy. Další studie prokázaly, že ochlazení bakteriálních buněk z teploty 37 °C na teplotu 16 °C způsobilo osmkrát vyšší nárůst nitrobuňkové hladiny trehalosy (Kandror et al. 2002).

Další rolí trehalosy tentokrát v říší rostlin je její funkce jako signální molekuly nebo růstového faktoru. Trehalosa nebo její metabolity patrně funguje u rostlin jako regulátor růstu, jak bylo potvrzeno při výzkumu především u rostlin rodu *Arabidopsis*, kdy byla exprese genů spouštějících syntézu trehalosy doprovázena různými defekty ve vývoji a růstu těchto rostlin (Vogel et al. 1998; Müller et al. 1999, 2001).

Trehalosa byla také nalezena v buněčných stěnách některých bakterií, jako jsou například mykobakterie nebo korynebakterie. Právě u těchto druhů je trehalosa základní složkou

glykolipidů jejich buněčné stěny (Lederer 1976). Nejvíce známý a široce studovaný je trehalosový lipid nazývaný cord-faktor (dimykolát trehalosy), který je součástí buněčných stěn bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Tento glykolipid je považován za hlavní toxickou složku buněčné stěny mykobakterií a je zodpovědný za její nízkou propustnost a s tím spojenou vysokou rezistenci těchto bakterií k příslušným léčivům (Brennan a Nikaido 1995).

2.1.2 Význam trehalosy v kvasinkách rodu *S. cerevisiae*

V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* je trehalosa jedním z hlavních zásobních sacharidů a zaujímá 1 % až více než 23 % sušiny v závislosti na růstových podmínkách a fázi buněčného cyklu. Trehalosa se hlavně hromadí v průběhu období s potlačeným růstem např. během nedostatku dusíku, síry nebo fosforu (Lillie a Pringle 1980). Mnoho studií potvrdilo souvislost mezi obsahem trehalosy v kvasničných buňkách a jejich odolností vůči teplotním extrémům, dehydrataci a cyklickému zamrazování a rozmrazování. Autoři těchto studií předpokládají, že primární funkce trehalosy v kvasinkách patrně nespočívá v úloze energetické rezervy, ale v její úloze při ochraně buněčných membrán a proteinů při nízkých stavech intracelulární vody (Crowe et al. 1984; Attfield 1987; Hottiger et al. 1987; Wiemken 1990). Schopnost trehalosy chránit proteiny před denaturací a ochrana dalších buněčných složek *in vitro*, koreluje s ochrannou funkcí proti nejrůznějším environmentálním stresům *in vivo* (Hottiger et al. 1994; De Virgilio et al. 1994). Mnoho dalších studií ukázalo, že hromadění trehalosy indukované subletálními stresy (omezení přísunu živin, dehydratace, nepříznivé změny teploty a tlaku nebo přítomnost toxických chemikálií) nebo nadměrnou expresí enzymu trehalosasyntasy, umožňuje lepší přežití kvasinek za extrémních podmínek (Thevelein 1984; Ribeiro et al. 1997; Singer a Lindquist 1998b, 1998a; Nwaka a Holzer 1998; Soto et al. 1999).

2.2 Trehalasy

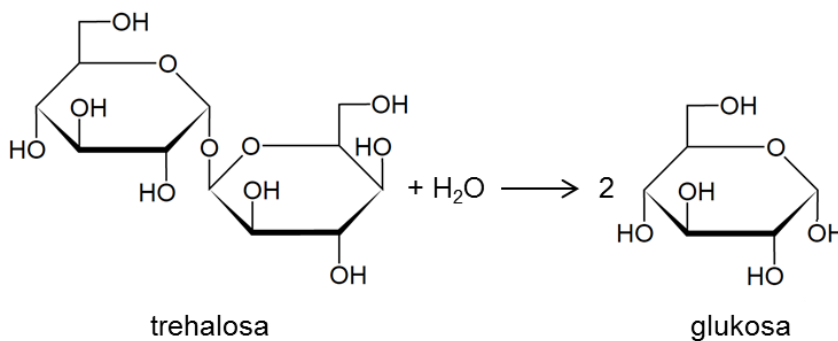
V roce 1893 byl v *Aspergillus niger* poprvé objeven enzym hydrolyzující disacharid trehalosu a nedlouho poté německý chemik Hermann Emil Fischer popsal enzym katalyzující hydrolýzu trehalosy v kvasinkách rodu *S. cerevisiae* (Fischer 1895; Elbein et al. 2003). Trehalasy byly zařazeny do rodiny glykosidových hydrolas označované číslem 37 a v EC systému jim byl přiřazen kód 3.2.1.28. Dodnes byly trehalasy (α,α -trehalosa-1-C-glukohydrolasy) identifikovány v mnoha dalších organismech od hub a rostlin až po živočišnou říši (Elbein 1974). U savců včetně člověka byla trehalasa nalezena v membránách střevních klků a také v proximálních tubulech ledvin (Dahlqvist 1968; Bergoz 1971; Yoneyama a Lever 1987). Trehalasy jsou jednoznačně velice významnými enzymy. Porovnání těchto enzymů

pocházejících z různých organismů odhalilo vysokou konzervovanost primárních sekvencí v rámci evolučního vývoje (Kopp et al. 1993, 1994; Nwaka a Holzer 1998).

V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* může být trehalosa hydrolyzována třemi různými enzymy: neutrálními trehalasami Nth1 a Nth2 nebo kyselou trehalasou Ath1. Námi studovaná neutrální trehalasa Nth1 se nachází v cytosolu a své maximální enzymové aktivity dosahuje při pH = 7,0. Hydrolýza trehalosy je u kvasinek rozhodující například pro úspěšné zotavení z následků teplotního šoku, po dlouhých obdobích sucha nebo při působení různých toxických chemikálií (Wera et al. 1999; Elbein et al. 2003).

2.2.1 Hydrolýza trehalosy

Hydrolýza disacharidu trehalosy (α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosid) na dvě molekuly glukosy (viz obrázek 2.1) je velice významná a často dokonce životně důležitá v mnoha životních funkcích různých organismů, jako je například klíčení houbových spor, obnovení růstu klidových buněk nebo získání energie pro let hmyzu (Nwaka a Holzer 1998; Becker et al. 1996). Právě trehalasy katalyzují hydrolýzu jedné ze dvou glykosidových vazeb tohoto disacharidu, přičemž dochází k inverzi anomerní konfigurace (Defaye et al. 1983).



Obrázek 2.1: Hydrolytické štěpení trehalosy (α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosid) na dvě molekuly glukosy katalyzované trehalasami.

2.2.2 Lokalizace a vlastnosti kvasničných trehalas

Při výzkumu lokalizace enzymu trehalasy a jeho substrátu trehalosy v kvasinkách bylo zjištěno, že po porušení a centrifugaci jejich protoplastu, trehalasa zůstane rozpuštěná v supernatantu na rozdíl od trehalosy, která zůstane v peletě. Tato skutečnost byla vysvětlena předpokladem, že se trehalosa patrně váže na cytoplazmatickou membránu a enzym trehalasa nikoliv (Souza a Panek 1968).

Následně bylo prokázáno, že neutrální trehalasa se nachází v buněčném cytosolu a permanentně aktivní kyselá trehalasa se nachází ve vakuolách (van Solingen a van der Plaats

1975; Wiemken a Schellenberg 1982; Keller et al. 1982). Kyselá trehalasa Ath1 je maximálně aktivní při pH = 4,5 na rozdíl od neutrální trehalasy, jejíž fosforylovaná forma má pH optimum při pH = 7 (Londesborough a Varimo 1984; Mittenbühler a Holzer 1988). V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* je aktivita neutrální trehalasy regulována množstvím cAMP v jejich buňkách, což se děje prostřednictvím fosforylace pomocí cAMP-dependentní proteinkinasy (PKA) (van der Plaats 1974; van Solingen a van der Plaats 1975; Ortiz et al. 1983; Uno et al. 1983; App a Holzer 1989).

Při porovnávání vlastností kvasničných trehalas s trehalasami z jiných organismů bylo zjištěno, že ostatní trehalasy jsou patrně méně regulovatelné a že jejich pH optimum je většinou kyselé. Navíc doposud nebyla u žádné z nich prokázána kontrola aktivity prostřednictvím fosforylace pomocí PKA. Příkladem mohou být trehalasy z bakterií *E. coli* (Gutierrez et al. 1989; Tourinho-dos-Santos et al. 1994), ze samčích přídatných pohlavních žláz potměníka moučného (Takiguchi et al. 1992), ze středního střeva larev bource morušového (Su et al. 1993), z cvrčka domácího (Teo a Woodring 1993) a z ledvin a resorpčních buněk tenkého střeva králíků (Galand 1984; Ruf et al. 1990).

2.2.3 Isoformy kvasničných trehalas

V roce 1993 byl u kvasinek rodu *S. cerevisiae* poprvé popsán gen *NTH1* (Kopp et al. 1993) a dále byl objeven i jeho N-koncový přesah obsahující potenciální fosforylační místa pro PKA (Wolfe a Lohan 1994; Kopp et al. 1994).

Následně byl popsán také gen *NTH2*, který je vysoce homologní s genem *NTH1*, ale jehož funkce je doposud nepřilíši objasněna (Wolfe a Lohan 1994; Nwaka et al. 1995). *NTH1* a *NTH2* jsou tedy dva rozdílné geny, přičemž gen *NTH2* je ze 72 % shodný s nukleotidovou sekvencí genu *NTH1* a protein produkovaný na základě genu *NTH2* je ze 77 % identický s aminokyselinovou sekvencí proteinu Nth1. Protein Nth2 také obsahuje N-koncový přesah a případná fosforylační místa pro PKA (Kopp et al. 1994; Wolfe a Lohan 1994). Při delecí genu *NTH2* v kvasinkách rodu *S. cerevisiae* nebyl pozorován žádný dramatický vliv na metabolismus trehalosy – neprokázaly se žádné změny trehalasové aktivity ani změny v koncentraci trehalosy. Naproti tomu se však objevila horší schopnost reakce na teplotní šok (Nwaka et al. 1995). Bylo také zjištěno, že enzymová aktivita Nth2 se zvyšuje v přítomnosti extracelulární trehalosy (Jules et al. 2008).

Kyselá trehalasa Ath1 je kódována genem *ATH1* a pojmenovaná díky svému nižšímu pH optimu (maximální enzymové aktivity dosahuje při pH = 4,5). Ath1 vykazuje pouze nízkou sekvenční homologii s Nth1 a je důležitá při růstu kvasinek na médiích obsahujících trehalosu jako zdroj uhlíku (Nwaka et al. 1996a).

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, porovnání aminokyselinových sekvencí trehalas z různých organismů odhalilo, že kvasničné neutrální trehalasy Nth1 a Nth2 (z kvasinek rodu *S. cerevisiae* a *K. lactis*) se od sekvencí z ostatních organismů liší výrazně delší N-koncovou oblastí (Nwaka a Holzer 1998). Toto prodloužení N-koncové oblasti má svůj význam při regulaci aktivity těchto dvou enzymů cAMP-dependentní fosforylací pomocí PKA a následnou vazbou kvasničných proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2) (Uno et al. 1983; Ortiz et al. 1983; van der Plaats 1974; Panni et al. 2008; Veisova et al. 2012).

2.2.4 Kvasničná neutrální trehalasa Nth1

V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* byl enzym hydrolyzující trehalosu poprvé identifikován v roce 1895 (Fischer 1895). Avšak až téměř o sto let později v roce 1982 byla popsána inaktivní forma trehalasy (tzv. zymogen) a bylo odhaleno, že aktivita tohoto enzymu je závislá cAMP-dependentní fosforylací (Thevelein 1984). Bylo také zjištěno, že defosforylace vypurifikované fosforylované Nth1 pomocí alkalické fosfatasy způsobuje kompletní deaktivaci Nth1, zatímco refosforylace inkubací s PKA a ATP způsobuje obnovení aktivity Nth1 (App a Holzer 1989).

Jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách, neutrální trehalasa Nth1 se nachází v cytosolu na rozdíl od kyselých trehalas Ath1, která byla lokalizována ve vakuolách (Londesborough a Varimo 1984). Při prvních purifikacích a separacích na nedenaturujícím gelu vykazovala Nth1 molekulovou hmotnost 160 kDa a v případě separace pomocí denaturující SDS-PAGE byla její hmotnost stanovena na přibližně 80 kDa (App a Holzer 1989).

Při testování substrátové specifity byla vhodným substrátem pro enzym Nth1 pouze trehalosa. Testované disacharidy cellobiosu, maltosu, laktosu, sacharosu, rafinosu a melibiosu tento enzym nehydrolyzoval. První stanovená Michaelisova konstanta (K_m) enzymu Nth1 pro trehalosu byla 35 mM a její nízká hladina byla zdůvodněna tím, že trehalosa zaujímá 23 % kvasničné sušiny. Předpokládá se tedy, že trehalasa má velkou fyziologickou důležitost při udržování nebo snižování koncentrace trehalosy v buňkách kvasinek (Dellamora-Ortiz et al. 1986; App a Holzer 1989).

Při dalších studiích kinetiky procesu hydrolýzy trehalosy bylo zjištěno, že K_m pNth1 pro trehalosu v přítomnosti proteinu 14-3-3, při pH = 7,5 a teplotě 30 °C dosahuje hodnoty 8 ± 1 mM a že číslo přeměny (k_{cat}) je rovno 71 ± 4 s⁻¹ ($k_{cat}/K_m = 8,9$ s⁻¹ mM⁻¹). Tyto hodnoty jsou srovnatelné s dalšími dříve publikovanými hodnotami K_m , které se pohybovaly v rozmezí 5 až 10 mM (Avigad et al. 1965; Londresborough a Varimo 1984; Dellamora-Ortiz et al. 1986). Při měřeních probíhajících za stejných podmínek, ale v přítomnosti kationtů Ca²⁺ o výsledné koncentraci 5 mM, byla hodnota K_m rovna $3,6 \pm 0,7$ mM a hodnota k_{cat} rovna 42 ± 2 s⁻¹ (k_{cat}/K_m

= 11,7 s⁻¹ mM⁻¹). Tyto výsledky prokázaly, že vazba proteinu 14-3-3 výrazně zvyšuje číslo přeměny pNth1 (přibližně 11×) a ve srovnání s aktivitou pNth1 indukovanou pouze přítomností kationtů Ca²⁺. Navíc při testech pomocí AUC bylo prokázáno, že kationty Ca²⁺ neovlivňují monomerní stav proteinu Nth1 a tak vyšší aktivita naměřená v současné přítomnosti proteinů 14-3-3 a kationtů Ca²⁺ nemůže souviset se změnou oligomerního stavu Nth1 (Veisova et al. 2012).

2.2.5 Funkce kvasničných neutrálních trehalas

V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* je neutrální trehalasa Nth1 velice významným enzymem, protože bylo dokázáno, že trehalosa v nich působí jako regulátor metabolismu a ovlivňuje také aktivitu klíčových enzymů, jako je například hexokinasa (Nwaka a Holzer 1998). Přerušením vegetačního klidu různých kvasinkových a houbových spor pomocí teplotního šoku (Van Assche et al. 1972) nebo přidavku glukosy (van der Plaats 1974; Thevelein et al. 1982) dochází k prudkému vzrůstu aktivity trehalasy. Přičemž aktivace trehalasy glukosou je reverzibilní proces (Thevelein a Jones 1983).

Po teplotním šoku se zvyšuje exprese *NTH1* genu a to se projevuje jak na hladině příslušné mRNA, tak i v intenzitě enzymové aktivity Nth1. Současně se zvyšuje exprese trehalosynthasy a simultánně vzrůstá koncentrace trehalosy (Nwaka et al. 1995, 1996b). Tyto zdánlivě marné cyklické přeměny trehalosy během teplotního stresu jsou patrně nezbytné pro udržení konstantní koncentrace glukosy v cytosolu (Hottiger et al. 1987). Předpokládá se, že glukosa získaná z trehalosy může být nezbytná pro přežití teplotního šoku (Nwaka et al. 1995, 1996b). Navíc trehalosa během vysokých teplot udržuje proteiny a membrány v jejich nativním stavu a snižuje agregaci proteinů. Avšak pro úplnou obnovu po teplotním šoku je nutná také degradace trehalosy (Singer a Lindquist 1998b).

Expresí genu *NTH1* je také indukována chemickými stresy vyvolanými chemikáliemi, jako jsou H₂O₂ (oxidativní stres), cykloheximid (inhibice proteosyntézy), CuSO₄ a NaAsO₂ (toxické chemikálie). Je tedy možné předpokládat účast Nth1 na obranných mechanismech proti vlivu oxidativního stresu a toxických látek. Naproti tomu přítomnost NaCl nezpůsobuje žádný vzrůst její exprese a aktivity Nth1, z čehož vyplývá, že se nepodílí na procesech odpovídajících za osmotický stres (Zähringer et al. 1997).

2.2.6 Primární struktura neutrální trehalasy Nth1

Primární struktura neutrální trehalasy Nth1 pocházející z kvasinek rodu *S. cerevisiae* je charakteristická dvěma konzervovanými doménami a neuspořádaným N-koncem, který se liší od N-konců neutrálních trehalas pocházejících z jiných organismů a navíc obsahuje klíčová

fosforylační místa. Prostřednictvím PKA jsou fosforylované čtyři serinové zbytky S20, S21, S60 a S83 (App a Holzer 1989; Kopp et al. 1993, 1994; Nwaka et al. 1995; Veisova et al. 2012). V N-koncové části jsou současně umístěny také specifické vazebné motivy pro protein 14-3-3, zahrnující příslušné fosforylované seriny (Panni et al. 2008; Veisova et al. 2012). Naproti tomu katalytická doména (sekvence 163–721) obsahující aktivní centrum enzymu je mezi jednotlivými neutrálními trehalasami vysoce konzervována (Amaral et al. 1997). Schéma primární struktury enzymu Nth1 se nachází na obrázku 2.2.



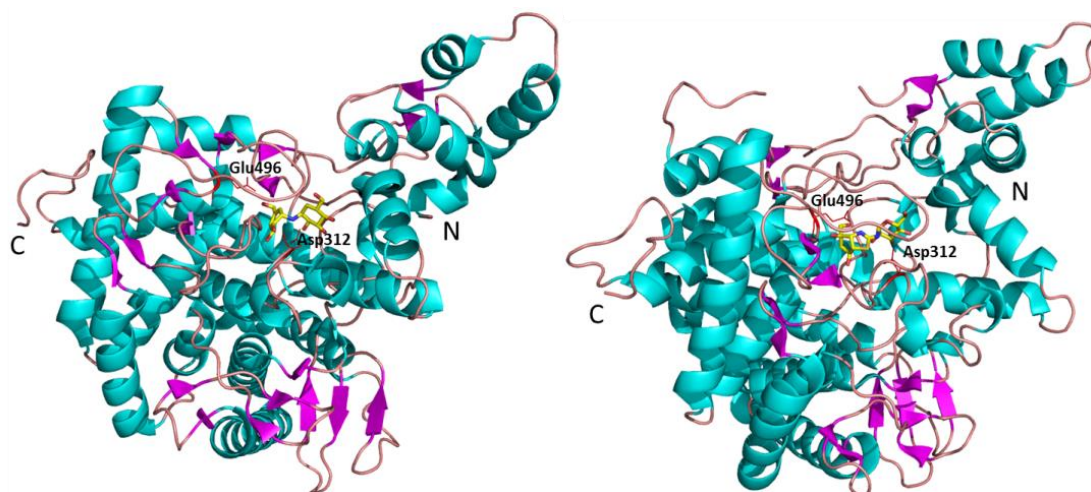
Obrázek 2.2: Schéma primární struktury neutrální trehalasy Nth1 pocházející z kvasinek rodu *S. cerevisiae*. N-koncová část Nth1 (oranžová barva) obsahuje čtyři fosforylační místa pro PKA (S20, S21, S60 a S83). Relativní pozice vazebných míst pro vazbu proteinu 14-3-3 jsou S60 a S83. Na stejném konci se nachází i konzervovaná Ca-vazebná doména (modrá barva), která nese vazebné místo pro kationty Ca^{2+} tzv. EF-hand motiv (sekvence D114–D125). Vysoce konzervovaná katalytická doména (sekvence 163–721) je vyznačena zeleně.

Další doménou Nth1 je konzervovaná Ca-vazebná doména (sekvence 105–135), která se nachází na N-konci tohoto enzymu a obsahuje vazebné místo pro kationty Ca^{2+} . Tento Ca-vazebný motiv je svou strukturou velice podobný místům, která obsahují i jiné enzymy vážící vápník. Typickým motivem těchto proteinů je tzv. EF-hand motiv (sekvence 114–125, viz kapitola 2.2.10, str. 17) (Davis et al. 1986; Babu et al. 1988; Geiser et al. 1991; Amaral et al. 1997; Eck et al. 1997; Soto et al. 1999; Franco et al. 2003).

2.2.7 Krystalové struktury neutrální trehalasy z *E. coli*

Přestože bylo v rodině glykosidových hydrolas 37 (GH37) klasifikováno přibližně 130 otevřených čtecích rámců, doposud byla uveřejněna trojrozměrná struktura pouze jednoho enzymu z této rodiny. Touto strukturou je krystalová struktura periplasmatické trehalasy Tre37A pocházející z bakterií kmene *E. coli* (viz obrázek 2.3, str. 14), která vznikla v rámci vývoje a výzkumu trehalasových inhibitorů – potenciálních nových insekticidů (Gibson et al. 2007).

Struktura trehalasy Tre37A obsahuje tzv. $(\alpha/\alpha)_6$ barel – strukturu podobnou strukturám dalších α -thoroidálních glykosidas, jako jsou například GH94 chitobiosa-fosforylasa (Hidaka et al. 2004), GH15 glukoamylasa (Aleshin et al. 1994) nebo GH65 maltosa-fosforylasa (Egloff et al. 2001). Všechny tyto enzymy patří do rodiny glukoamylas a katalyzují reakce spočívající v inverzi anomerní konfigurace substrátu, stejným způsobem jakým funguje trehalasa Tre37A (Gibson et al. 2007). Jak je vidět na krystalové struktuře trehalasy Tre37A její aktivní centrum je ukryté uvnitř její celkové struktury. Proto je pro přístup substrátu a odchod produktu z aktivního centra enzymu pravděpodobně nutná výrazná konformační změna celé této oblasti.



Obrázek 2.3: *Stužková reprezentace krystalové struktury Tre37A v komplexu validoxylaminem A (VDM) (2JF4, vlevo) a v komplexu s 1-thiatrehazolinem (2JG0, vpravo). Aminokyselinové zbytky, které zastávají roli kyseliny (Asp312) a báze (Glu496) při hydrolýze substrátu jsou znázorněny červenou barvou. Pro tvorbu obrázků byly použity program PyMOL (www.pymol.org) a struktury 2JF4 a 2JG0 z PDB (Gibson et al. 2007).*

Obě struktury posloužily také při výzkumu mechanismu hydrolýzy trehalosy prostřednictvím trehalas. Jak již bylo popsáno v kapitole 2.2.1 (viz str. 9) glykosidová hydrolýza je spojená s inverzí anomerní konfigurace a probíhá podle kanonického mechanismu, který zahrnuje nukleofilní útok substrátu molekulou vody. Předpokládá se, že zbytek kyseliny asparagové (Asp312) hraje při hydrolytické reakci roli kyseliny a zbytek kyseliny glutamové (E496) naopak roli Brønstedovy zásady (Defaye et al. 1983; Gibson et al. 2007).

2.2.8 Regulace aktivity neutrální trehalasy Nth1

Aktivita Nth1 je regulována kombinovaným vlivem několika faktorů: vazbou kationtů Ca^{2+} (Franco et al. 2003), aktivací pomocí fosforylace cAMP-dependentní proteinkinasy (PKA) (Ortiz et al. 1983; Uno et al. 1983), následnou vazbou kvasničných proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2) (Zähringer et al. 1997; Panni et al. 2008; Veisova et al. 2012), inhibicí vazby proteinu 14-3-3 proteinem Dcs1 (Liu et al. 2002; De Mesquita et al. 2003; Schepers et al. 2012) a také například koncentrací celulární glukosy (Pernambuco et al. 1996).

V roce 1984 bylo prokázáno, že neutrální trehalasa Nth1 pocházející z kvasinek rodu *S. cerevisiae* potřebuje pro svoji aktivitu kationty Ca^{2+} nebo Mn^{2+} , na rozdíl od kyselá trehalasy Ath1 (Londesborough a Varimo 1984). Regulace enzymové aktivity neutrální trehalasy prostřednictvím kationtů Ca^{2+} byla odhalena v roce 2003 také u kvasinek rodu *S. pombe* (Franco et al. 2003), kdy byl u těchto kvasinek objeven konzervovaný Ca-vazebný motiv, který je rovněž přítomný u kvasinek rodu *S. cerevisiae* (viz kapitola 2.2.10, str. 17).

Ovlivňování aktivity Nth1 prostřednictvím fosforylace pomocí PKA je dobrým příkladem reciproké regulace degradace a syntézy. Při tomto procesu je trehalosa-6-fosfatasyntetasa inaktivována cAMP-dependentní fosforylací a znovu aktivována defosforylací (Panek et al. 1987). Což je v souladu s degradací trehalosy pomocí neutrální trehalasy aktivované cAMP-dependentní fosforylací a inaktivované defosforylací (van Solingen a van der swar 1975; Londesborough a Varimo 1984; Ortiz et al. 1983; App a Holzer 1989)

Výzkum prováděný van Heusdenem mezi roky 2006 a 2009 potvrdil, že se v buňkách kvasinek rodu *S. cerevisiae* se nacházejí dva typy genů pro proteiny 14-3-3 (*BMH1* a *BMH2*), které jsou vysoce homologní a také esenciální ve většině laboratorních kmenů (van Heusden a Steensma 2006; van Heusden 2009). Studium vlivu proteinů 14-3-3 na aktivitu pNth1 prokázalo, že vazba proteinů 14-3-3 výrazně zvyšuje aktivitu pNth1. A zároveň bylo zjištěno, že aktivace proteinem 14-3-3 je mnohem účinnější než aktivace kationty Ca^{2+} (viz kapitoly 2.2.10 a 2.3.8, str. 17 a str. 31) (Veisova et al. 2012).

K dalšímu zásadnímu průlomu při studiu regulace aktivity Nth1 došlo při *in vivo* pokusech, kdy byl identifikován také jiný regulační mechanismus aktivace trehalasy, který neprobíhal prostřednictvím proteinů 14-3-3. Byla nalezena souvislost mezi proteinem Dcs1 (enzym odstraňující čepičku z konce mRNA) a inhibicí aktivity fosforylované pNth1. Enzym Dcs1, jehož molekulární hmotnost je cca 40 kDa, nejen že inhibuje aktivitu pNth1, ale také patrně reguluje její expresi a tak funguje jako preventivní opatření zbytečné cyklické syntézy a degradace trehalosy. Předpokládá se, že vazba proteinu Dcs1 na pNth1 brání vazbě proteinu

14-3-3 na pNth1 a tím blokuje její aktivaci (Liu et al. 2002; De Mesquita et al. 2003; Schepers et al. 2012).

Při výzkumu dvou signálních drah závislých na koncentraci glukosy, které se mezi sebou liší závislostí na fosforylaci glukosy, bylo objeveno, že tyto dvě dráhy v sobě zahrnují také aktivaci enzymu trehalasy (Pernambuco et al. 1996).

2.2.9 Význam fosforylace při regulaci aktivity Nth1

V kvasinkách rodu *S. cerevisiae* je aktivita neaktivního zymogenu trehalasy iniciována fosforylací pomocí cAMP-dependentní proteinkinasy (PKA) (van der Plaats 1974; van Solingen a van der Plaats 1975; Ortiz et al. 1983; Uno et al. 1983; App a Holzer 1989). App a Holzer jako první dokázali izolovat a charakterizovat čistý enzym neutrální trehalasy a identifikovali serin, jako aminokyselinu fosforylovanou pomocí PKA (App a Holzer 1989). Bylo prokázáno, že cAMP-dependentní proteinkinasa (PKA) v kvasničném extraktu zvyšuje enzymovou aktivitu trehalasy (Uno et al. 1983; App a Holzer 1989). Dále bylo prokázáno, že Nth1 obsahuje 17 potenciálních míst pro PKA a že její aktivace souvisí s fosforylací více než jednoho serinového zbytku. Jako klíčové byly označeny S20, S21 a S83 (Wera et al. 1999).

Analýza fosfoproteinů z buněčného lyzátu kvasinek rodu *S. cerevisiae* pomocí MS odhalila serinové zbytky S21, S23 a S83, jako místa fosforylovaná *in vivo*. S23 byl přitom označen jako cíl jiné proteasy než PKA (Ficarro et al. 2002).

Při rozsáhlém výzkumu významu proteinů 14-3-3 bylo odhaleno, že mnoho jejich vazebných partnerů je fosforylováno na několika aminokyselinových zbytcích najednou. Velmi často jsou poté při interakci s proteinem 14-3-3 zahrnuty současně dva takové fosforylované vazebné motivy (Yaffe 2002). Bylo prokázáno, že i Nth1 je fosforylována pomocí PKA na několika místech a následně interaguje s kvasničnými proteiny 14-3-3, což vede k její aktivaci donedávna neobjasněným mechanismem (Panni et al. 2008). V první studii se předpokládalo, že interakce mezi pNth1 a proteiny 14-3-3 je zprostředkována fosforylací serinových zbytků S21 a S23 pocházejících z N-koncové části Nth1 (Panni et al. 2008). Tato hypotéza byla vyvrácena studiemi prováděnými v naší laboratoři, která jako klíčová fosforylační místa odhalila S60 a S83. Rozdílné závěry první studie byly pravděpodobně zapříčiněny jiným metodickým přístupem, při kterém byly pro výzkum vazby pNth1 na protein 14-3-3 používány pouze krátké syntetické fosfopeptidy. Naproti tomu při experimentech prováděných v naší laboratoři byly použity jedno nebo dvojitě fosforylované mutantní formy pNth1, přičemž délka testovaného enzymu odpovídala jeho přirozené formě (Veisova et al. 2012).

V době, kdy ještě nebyla identita a role jednotlivých míst fosforylovaných pomocí PKA odhalena, byla publikována další práce, kde byly k objasnění těchto neznámých použity také fosfospecifické protilátky. Ty pak prokázaly, že aktivace trehalasy prostřednictvím glukosy a dusíku *in vivo* je spojena s fosforylací S21 a S83. Je nutné poznamenat, že v této studii nebyly použity fosfospecifické protilátky anti-pSer20 a anti-pSer60, protože nedokázaly rozlišit mezi fosforylovanou a nefosforylovanou formou Nth1 (Schepers et al. 2012).

Analýza fosforylovaného enzymu Nth1 pomocí MS (provedena naší skupinou) odhalila na neuspořádaném N-konci tohoto rekombinantního proteinu čtyři serinové zbytky (S20, S21, S60 a S83) fosforylované pomocí PKA *in vitro* (Veisova et al. 2012). Význam jednotlivých fosforylačních míst byl následně studován pomocí cílené bodové mutagenese a bylo odhaleno, že serinové zbytky S60 a S83 jsou primárně zodpovědné za aktivaci Nth1 závislou na fosforylaci pomocí PKA a následné vazbě proteinů 14-3-3. Tato skutečnost byla potvrzena jak stanovením enzymové aktivity *in vitro*, tak aktivačními studii prováděnými na mutantních formách *in vivo* (Veisova et al. 2012). Měření enzymové aktivity odhalilo, že pro plnou aktivaci enzymu a pro vazbu proteinu 14-3-3 je nutná fosforylace alespoň jednoho z těchto dvou fosforylačních míst (buď S60 anebo S83).

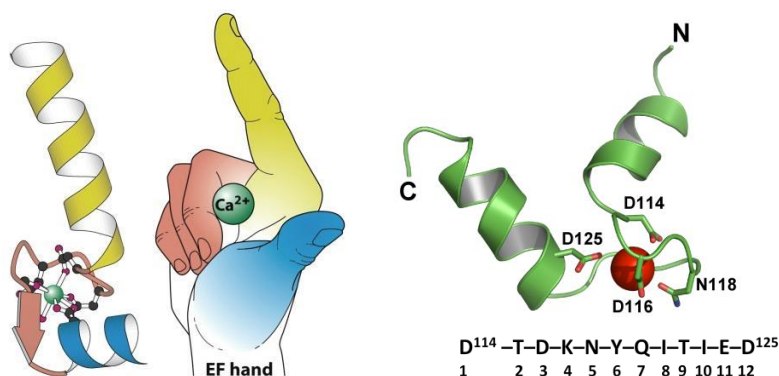
2.2.10 Vliv kationtů Ca^{2+} na aktivitu neutrální trehalasy

Při prvních studiích regulace aktivity neutrální trehalasy Nth1 pocházející z kvasinek rodu *S. cerevisiae*, bylo zjištěno, že aktivita tohoto enzymu je závislá na přítomnosti kationtů Ca^{2+} nebo Mn^{2+} , ne však na přítomnosti kationtů Mg^{2+} a je inhibována přítomností chelatačních činidel, jako jsou EDTA nebo EGTA (Londesborough a Varimo 1984; App a Holzer 1989; Amaral et al. 1997; Soto et al. 1998).

Při podrobnějším zkoumání mechanismu, kterým je při teplotním šoku indukována akumulace trehalosy v kvasinkách rodu *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že v nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} nevykazují Ath1 ani pNth1 téměř žádnou enzymovou aktivitu. Ukázalo se také, že koncentrace kationtů Ca^{2+} potřebná pro dosažení poloviny maximální aktivity se zvyšuje se zvyšující se teplotou. Při teplotě 30 °C byla potřeba přítomnost kationtů Ca^{2+} o koncentraci 1 μM a při teplotě 40 °C musela být koncentrace kationtů Ca^{2+} zvýšena na 20 μM pro dosažení poloviny maximální enzymové aktivity pNth1 (Neves a François 1992).

Dále bylo prokázáno, že aktivace kvasničné neutrální trehalasy za různých podmínek závisí na kationtech Ca^{2+} navázaných přes specifický vazebný motiv (Franco et al. 2003). Tento vazebný motiv se označuje jako EF-hand (viz obrázek 2.4, str. 18, vlevo) a je obsažen v konzervované Ca-vazebné doméně. U kvasinek rodu *S. pombe* zodpovídají za koordinační vazbu vápníku zbytky kyseliny asparagové (D97, D99 a D108) (Franco et al. 2003).

V případě Nth1 z kvasinek rodu *S. cerevisiae* se konzervovaná Ca-vazebná doména tohoto enzymu nachází v oblasti primární sekvence 105–135, tedy na N-konci Nth1. Tzv. EF-hand motiv (sekvence 114–125) (viz obrázek 2.4, vpravo) umístěný v této doméně je svou strukturou velice podobný místům, která obsahují i jiné enzymy vážící vápník (Davis et al. 1986; Babu et al. 1988; Geiser et al. 1991; Amaral et al. 1997; Eck et al. 1997; Soto et al. 1999; Franco et al. 2003). Pro koordinační vazbu kationtu Ca^{2+} jsou patrně klíčové aminokyselinové zbytky umístěné na konzervovaných pozicích tohoto motivu (D114, D116, N118 a D125).



Obrázek 2.4: Uskupení helix-smyčka-helix tzv. EF-hand motiv je konzervované u velkého množství Ca-vazebných proteinů (E-helix žlutě, F-helix modře, kationt Ca^{2+} zeleně). Schéma EF-hand motivu z levé části obrázku bylo převzato z (Berg et al. 2002). Vpravo je stužkový model a primární sekvence EF-hand motivu z Nth1. Pro koordinační vazbu kationtu Ca^{2+} jsou rozhodující aminokyselinové zbytky D114, D116, N118 a D125 umístěné na konzervovaných pozicích tohoto motivu. Model byl vyroben pomocí programu Modeler verze 9.12 (Eswar et al. 2007) na základě struktury EF-hand motivu kalmodulinu (PDB kód 1EXR) (Wilson a Brunger 2000).

Při výzkumu neutrální trehalasy z kvasinek rodu *S. pombe* bylo zjištěno, že na rozdíl od neutrálních trehalas z kvasinek rodu *S. cerevisiae* a *K. lactis*, nezvyšuje svoji enzymovou aktivitu v přítomnosti kationtů Ca^{2+} (Londesborough a Varimo 1984; Amaral et al. 1997; Franco et al. 2003). Avšak stejně jako u trehalas ze zmíněných druhů kvasinek, snižuje svoji aktivitu v přítomnosti chelatačních činidel. Zdá se tedy, že kationty Ca^{2+} jsou v případě neutrální trehalasy z *S. pombe*, spíše esenciální a integrální složkou aktivní formy tohoto enzymu. Při dalším výzkumu tohoto enzymu byla věnována pozornost tzv. EF-hand motivu, který byl objeven nejdříve u neutrálních trehalas z kvasinek rodu *S. cerevisiae* a *K. lactis* (Amaral et al. 1997) a následně i u dalších druhů, kterými byly *S. pombe*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* a *Neurospora crassa* (d' Enfert et al. 1999; Eck et al. 1997; Soto et al.

1998). Nicméně přesná funkce tohoto motivu nebyla objasněna. U známých Ca-vazebných proteinů, jako je například kalmodulin, se tento vazebný motiv vyskytuje často v párech a vyznačuje se kooperativní vazbou kationtů Ca^{2+} . Pokud dojde mutaci zbytků kyselin asparagových na klíčových pozicích tohoto motivu (pozice 1 a 12), je vazba kationtů Ca^{2+} dramaticky snížena, anebo není vůbec možná (Rashidi et al. 1999). Navíc bylo prokázáno, že kyselé aminokyselinové zbytky na pozicích 3, 5, a 9 v EF-hand motivu zastávají také rozhodující roli při vazbě kationtů Ca^{2+} na tento motiv. Při změně aminokyselinových zbytků na těchto pozicích nebo v jejich těsné blízkosti dochází k poklesu afinity pro kationty Ca^{2+} (Starovasnik et al. 1992; Chandra et al. 1994).

Neutrální trehalasy pocházející z různých druhů kvasinek nesou zbytky kyseliny asparagové na konzervovaných pozicích 1, 3 a 12 v rámci svého EF-hand motivu. V případě neutrální trehalasy pocházející z *S. pombe* bylo poprvé fyzicky dokázáno, že se kationty Ca^{2+} opravdu váží na tento enzym (přestože s mnohem menší afinitou, než je tomu například u kalmodulinu). Navíc pomocí cílené bodové mutagenese bylo dokázáno, že se kationty Ca^{2+} váží na neutrální trehalasu opravdu přes zbytky kyselin asparagových, které se nacházejí v EF-hand motivu. V případě neschopnosti vázat kationty Ca^{2+} navíc došlo u neutrální trehalasy pocházející z *S. pombe* ke ztrátě enzymové aktivity. Autoři této studie se na základě dosažených výsledků domnívali, že kationty Ca^{2+} ovlivňují aktivitu trehalasy tím, že jsou nedílnou součástí aktivní formy tohoto enzymu. Jejich hypotéza byla také ve shodě se skutečností, že změny v Ca-vazebném místě měly za následek chybnou oligomerizaci proteinu a ztrátu aktivity (Soto et al. 2002; Franco et al. 2003). Předpokládá se, aktivní forma neutrální trehalasy pocházející z *S. pombe* tvoří dimery nebo trimery (Londesborough a Varimo 1984; Soto et al. 2002). Zdá se tedy, že vazba kationtů Ca^{2+} je prerekvizitou pro *in vivo* aktivaci neutrální trehalasy pocházející z *S. pombe* indukovanou glukosou a stresem. Je také možné, že je tento enzym nejprve fosforylován, ale dokud se na něj nenaváže Ca^{2+} , tak není schopný tvořit oligomerní formy (Franco et al. 2003).

Po zjištění, že aktivace trehalasy způsobená teplotním šokem u kvasinek rodu *S. cerevisiae* je podmíněna odstraněním endogenního inhibitorového proteinu, který patrně brání fosforylaci tohoto enzymu pomocí PKA a jeho následné aktivaci (De Mesquita et al. 2003). Byl navržen model regulace neutrální trehalasy prostřednictvím kationtů Ca^{2+} , který zahrnuje fosforylaci (prostřednictvím Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasy) tohoto proteinu asociovaného s neutrální trehalasou. Tato fosforylace následně indukuje disociaci efektorového proteinu ze struktury neutrální trehalasy a tím umožňuje její fosforylaci prostřednictvím PKA. Je tedy pravděpodobné, že kationty Ca^{2+} při regulaci aktivity neutrální trehalasy pocházející z *S. cerevisiae* fungují v souladu s cAMP-dependentní signální drahou (Souza et al. 2002).

Avšak v případě neutrální trehalasy pocházející z *S. pombe* je mnohem pravděpodobnější, jednoduchá role kationtů Ca^{2+} založená na přímém strukturním vlivu jejich vazby na tento enzym. Bylo také dokázáno, že strukturní integrita Ca-vazebného místa je klíčová pro aktivaci tohoto enzymu vyvolanou stresem (Franco et al. 2003).

Při dalších výzkumech účinků kationtů Ca^{2+} na enzymovou aktivitu Nth1 pocházející z *S. cerevisiae* při *in vitro* pokusech, byla pozorována pouze mírná aktivace pNth1 kationty Ca^{2+} a žádný efekt na vznik oligomerních stavů. Naproti tomu aktivace prostřednictvím proteinů 14-3-3 je mnohem účinnější v porovnání s aktivací prostřednictvím kationtů Ca^{2+} , která je běžným způsobem aktivace u trehalas pocházejících z jiných druhů organismů (Veisova et al. 2012).

Na základě provedených studií byly vysloveny další hypotézy o dvou odlišných mechanismech, jakými je aktivován enzym pNth1 prostřednictvím proteinů 14-3-3 a kationtů Ca^{2+} . Ca-vazebná doména Nth1 obsahující EF-hand motiv vázající kationty Ca^{2+} je umístěna mezi katalytickou doménou tohoto enzymu a N-koncovou nestrukturní oblastí obsahující fosforylační místa pro PKA a vazebné motivy pro protein 14-3-3 (viz obrázek 2.2, str. 13). Díky této poloze Ca-vazebné domény, se přepokládalo, že vazba kationtů Ca^{2+} může nějakým způsobem modulovat interakci mezi proteinem 14-3-3 a pNth1 a ovlivnit tak také enzymovou aktivitu pNth1 (Veisova et al. 2012).

2.2.11 Funkce trehalas u savců

U savců včetně člověka byla trehalasa nalezena v membránách střevních klků (Dahlqvist 1968; Bergoz 1971), kde katalyzuje hydrolýzu trehalosy získané z potravy. Avšak je nutné zdůraznit, že přestože je trehalosa v přírodě prakticky všudypřítomná, dávky trehalosy přijímané potravou jsou velice nízké. Typické servírované porce hub většinou neobsahují více než 6 g tohoto disacharidu (Arola et al. 1999). Role střevních trehalas byla potvrzena zjištěním souvislosti mezi průjmovými onemocněními a trehalosovou deficiencí ve střevech zkoumaných jedinců. Trehalosová deficience byla nalezena například u 8 % grónských Inuitů, ale jinak je ve světové populaci velice vzácná (Madzarovová-Nohejlova 1973; Ruf et al. 1990; Arola et al. 1999; Murray et al. 2000). Snížené aktivity střevní laktasy a trehalasy byly také nalezeny u lidí závislých na nikotinu (Kaura et al. 2001). Vzhledem k malému obsahu trehalosy v potravě byla vyslovena další teorie o možné funkci trehalas a to při inaktivaci patogenů obsahujících trehalosu. Jedním z nich by mohl být toxický trehalosa-6,6'-dimykolát obsažený v buněčné stěně bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (Kohlmeier 2003). Trehalasa byla také nalezena v membránách buněk kartáčového lemu proximálních tubulů ledvin savců, funkce trehalasy v tomto orgánu nebyla doposud plně objasněna. Po nálezů enzymů syntetizujících trehalosu

v ledvinách se předpokládá, že se trehalosa účastní zpětné resorpce glukosy z glomerulárního filtrátu (Sacktor 1968; Yoneyama a Lever 1987).

2.2.12 Možné využití vlastností trehalosy a trehalas v praxi

Akumulace trehalosy v kvasinkách má velký význam pro různé komerční aplikace. Obsah trehalosy v pekařském droždí je kritickým faktorem pro jeho trvanlivost a odolnost. Této skutečnosti je věnována značná pozornost, zejména s ohledem na výrobu instantních sušených kvasnic (Gélinas et al. 1989; Nwaka a Holzer 1998). Akumulace trehalosy také koreluje se zvýšenou schopností přežití kvasinek po dehydrataci nebo zmrazení. Z toho vyplývá potenciálně nižší potřeba obsahu kvasinek ve vysušených nebo mražených těstech (Oda et al. 1986; Gélinas et al. 1989). Genetické eliminace všech trehalas u pekařského droždí by byly pravděpodobně užitečným přínosem. Publikované údaje naměřené s enzymaticky neaktivními formami trehalas Nthl a Athl vykazují u kvasinek vyšší mrazovou toleranci (Van Dijck et al. 1995; Kim et al. 1996).

Kvasinky s neaktivní trehalasou Athl se ukázaly být tolerantnější k ethanolu, což je ustanovilo důležitým kmenem pro výrobu piva (Kim et al. 1996). Rezistence k ethanolu je rozhodující vlastností kvasinek používaných v pivovarnictví a vinařství, protože hladiny alkoholu jsou omezené ethanolovou toxicitou (Benítez et al. 1996).

Schopnost trehalosy zachovávat a stabilizovat určité labilní biologické molekuly (enzymy, protilátky, léčiva) a potraviny *in vitro* ji činí důležitým sacharidem, využitelným zejména v rozvojových tropických zemích, kde chlazení a elektrické napájení jsou nespolehlivé. Patrně by tedy mohla přispět k řešení mnoha ekonomických, zemědělských a zdravotních problémů v těchto zemích (Nwaka a Holzer 1998).

Předpokládaná důležitost trehalosy a její hydrolýzy v životních funkcích hmyzu také inspirovala k syntéze inhibitorů trehalas, které by měly být využity jako insekticidy (Becker et al. 1996; Nwaka a Holzer 1998). Při vývoji inhibitorů trehalas byly navíc vyřešeny první struktury neutrální trehalasy pocházející z bakterií *E. coli* (Gibson et al. 2007).

Kryoprotektivních vlastností trehalosy je využíváno také v lékařství například ke stabilizaci monoklonálních protilátek při jejich lyofilizaci a skladování (Blakeley et al. 1990). Trehalosa se také osvědčila při dlouhodobém skladování a zmrazování hovězích embryí (Saha et al. 1996) a savčích buněk produkujících inzulin (Beattie et al. 1997), kdy prokazatelně zvyšovala následnou životaschopnost zkoumaných embryí i zmíněných buněk. Stabilizační vlastnosti trehalosy byly přínosem i při transplantacích tkáňových tracheálních štěpů prováděných na psech. Štěpy uložené v roztoku obsahujícím 100 mM trehalosu, které byly dlouhodobě skladovány při teplotě $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$, následně vykazovaly nejen lepší životaschopnost, ale také

nevyvolávaly negativní transplantační reakce v nepřítomnosti imunopresivních léčiv (Yokomise et al. 1995, 1996).

U obratlovců, včetně lidí, byla trehalasa nalezena v proximálních tubulech ledvin a proto se někteří vědci domnívají, že může být v budoucnu využita jako diagnostický ukazatel některých onemocnění ledvin (Berger a Sacktor 1970; Niwa et al. 1993). Další autoři navíc předpokládají, že antistresová funkce genů *NTH1* a *NTH2* nebo ochranná funkce trehalosy, mohou najít své využití při léčbě depresí nebo neurodegenerativních onemocnění (Nwaka a Holzer 1998; Kara et al. 2013; Sarkar et al. 2007).

2.3 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 pocházejí z vysoce konzervované rodiny kyselých regulačních proteinů, které pomáhají svým vazebným partnerům zastávat jejich biochemické a buněčné funkce (Liu et al. 1995; Xiao et al. 1995). Ke svému neobvyklému jménu přišly při systematické analýze proteinů v hovězím mozku. Tento protein na gelové permeační chromatografii vyputoval ve 14. frakci a při následné škrobové gelové elektroforéze se nacházel na koordinátách 3.3 (Moore a Perez 1967). Proteiny 14-3-3 ovlivňují prostřednictvím protein-proteinových interakcí vlastnosti a funkce stovek strukturně a funkčně rozdílných proteinů. Tímto způsobem se proteiny 14-3-3 staly klíčovými hráči v mnoha buněčných procesech, jako jsou metabolismus, kontrola buněčného cyklu, apoptóza, regulace transkripce či přenos signálu v buňce. Zatímco některé proteiny jsou díky proteinům 14-3-3 aktivovány a stabilizovány, jiné jsou jimi inaktivovány (Aitken 1996; Fu et al. 2000; Pozuelo Rubio et al. 2004).

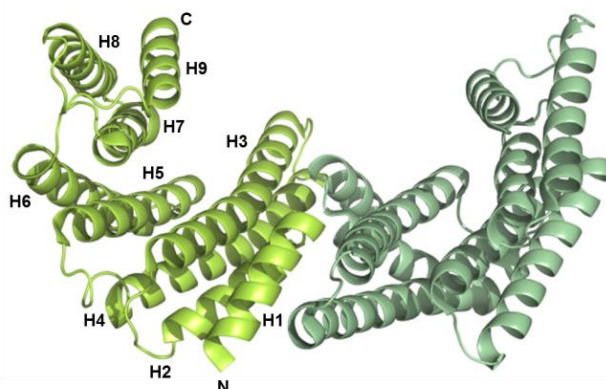
2.3.1 Isoformy proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou exprimovány ve všech eukaryotických buňkách a vyskytují se v několika různých vysoce konzervovaných isoformách. V buňkách rostlin rodu *Arabidopsis* bylo identifikováno 15 různých genů pro proteiny 14-3-3. Buňky savců obsahují celkem sedm isoform proteinu 14-3-3 označenými písmeny řecké abecedy: β , ϵ , η , γ , τ , ζ a σ (Wang a Shakes 1996; Rosenquist et al. 2001). Naproti tomu kvasinky rodu *S. cerevisiae* vlastní jen dva geny pro proteiny 14-3-3 (geny *BMH1* a *BMH2*). Jejich označení je zkratkou anglického názvu Brain Modulosignaling Homologue (van Heusden et al. 1995).

2.3.2 Velikost a struktura proteinů 14-3-3

První krystalové struktury lidských proteinů 14-3-3 ζ a 14-3-3 τ ukázaly, že tyto proteiny mají dimerní charakter a vysoce helikální strukturu. Velikost proteinů 14-3-3 se pohybuje okolo 30 kDa a jedná se o molekuly, které tvoří stabilní homodimery nebo heterodimery (Liu et al.

1995; Xiao et al. 1995). Pouze savčí isoforma 14-3-3 σ upřednostňuje tvorbu homodimerů, jinak všechny známé proteiny 14-3-3 mohou vytvářet jak homodimery, tak heterodimery (Wilker et al. 2005). Každý monomer se skládá z devíti antiparalelních α -helixů (H1–H9), přičemž dimer proteinu 14-3-3 vykazuje specifický pohárkovitý tvar, uprostřed kterého se nachází centrální kanál obsahující dva amfipatické ligand-vazebné žlábký, které jsou tvořeny helixy H3, H5, H7 a H9 (viz obrázek 2.5). Centrální kanál dosahuje přibližně těchto rozměrů: délka 35 Å, šířka 35 Å a hloubka 20 Å (Obsil a Obsilova 2011).



Obrázek 2.5: *Stužková reprezentace krystalové struktury dimeru proteinu 14-3-3 ζ . Každý z monomerů je vybarven jinou barvou. V pravém monomeru jsou vyznačeny názvy jednotlivých α -helixů H1 až H9. Obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL (www.pymol.org) na základě PDB struktury 1IB1 (Obsil et al. 2001).*

Molekula dimeru proteinu 14-3-3 je považována za velice rigidní, což je pravděpodobně následek rozsáhlých interakcí mezi helixy. Doposud nebyly odhaleny žádné podstatné rozdíly při porovnání struktur samotného dimeru proteinu 14-3-3 a jeho komplexu s jiným proteinem. Tato strukturální rigidita či tuhost patrně umožňuje proteinům 14-3-3 fungovat jako jakási platforma nebo podpůrná konstrukce, na které dochází ke změně struktury jejich vazebných partnerů (Yaffe 2002). Je známo, že vysoce konzervované oblasti se nacházejí uvnitř centrálního kanálu, na rozdíl od oblastí variabilních, které jsou umístěny na povrchu proteinu 14-3-3 (Obsil a Obsilova 2011). Nejvíce flexibilní oblastí je C-koncová část, která je také nejvíce variabilní oblastí mezi jednotlivými isoformami 14-3-3. Právě tato oblast je díky své flexibilitě a přítomnosti negativně nabitých aminokyselinových zbytků označována jako klíčová pro regulaci vazebných vlastností isoform proteinů 14-3-3 (Truong et al. 2002; Obsilova et al. 2004; Silhan et al. 2004; Veisova et al. 2010).

V současné době jsou k dispozici struktury všech sedmi lidských isoform proteinů 14-3-3. Přestože struktura těchto isoform je velice podobná jak v případě proteinů 14-3-3 samotných,

tak jejich forem vázaných v proteinových komplexech, byly nalezeny menší změny jejich struktury (Yang et al. 2006; Gardino et al. 2006). Jednotlivé struktury ukázaly rozdíly v relativních pozicích monomerů závisících na změnách úhlu mezi oběma podjednotkami. Díky této flexibilitě mohou dimery proteinů 14-3-3 vázat ligandy různého tvaru a velikosti (Yang et al. 2006).

2.3.3 Variabilní C-konec proteinů 14-3-3

Maximální variabilita sekvencí jednotlivých isoform proteinů 14-3-3 se nachází na C-konci ve flexibilní oblasti dlouhé přibližně 15 až 40 aminokyselinových zbytků. Bylo prokázáno, že zkrácený C-konec proteinu 14-3-3 ζ vykazuje zvýšenou vazebnou afinitu k několika různým testovaným ligandům (Truong et al. 2002). Na základě tohoto zjištění se předpokládá, že C-koncový výběžek funguje jako inhibitor nespecifických interakcí mezi proteiny 14-3-3 a nežádoucími ligandy. Struktura tohoto úseku není známá, protože není součástí žádné ze známých struktur, patrně díky své velké flexibilitě. Předpokládá se, že C-koncový úsek je v nepřítomnosti vhodného ligandu umístěn v ligand-vazebném žlábků (Liu et al. 1995; Truong et al. 2002). Tento předpoklad byl potvrzen spolu se zjištěním, že po vazbě vhodného ligandu je C-koncový úsek vytěsněn ven z vazebného žlábků a jeho pozici ve žlábků nahradí vhodný fosforylovaný ligand (Obsilova et al. 2004; Silhan et al. 2004).

Při výzkumu kvasničných proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2) bylo zjištěno, že se C-konec těchto dvou proteinů výrazně odlišuje od C-konců isoform proteinů 14-3-3 pocházejících ze složitějších eukaryotických organismů. C-konce proteinů Bmh1 a Bmh2 jsou delší a obsahují polyglutaminové úseky neznámé funkce. Bylo prokázáno, že C-koncový úsek proteinů Bmh zaujímá široce otevřenou a nataženou konformaci, která pravděpodobně znemožňuje jeho umístění a složení do ligand-vazebného žlábků (Veisova et al. 2010). Je tedy možné předpokládat, že C-koncová část kvasničných proteinů 14-3-3 díky své velikosti nemůže fungovat jako autoinhibitor, ale plní jinou úlohu.

2.3.4 Vazebné motivy rozpoznávané proteiny 14-3-3

Doposud bylo nalezeno více než 300 proteinů interagujících s proteiny 14-3-3 a mnoho z nich obsahuje více než jeden vazebný motiv pro 14-3-3 proteiny. Navíc přítomnost dvou vazebných žlábků v dimeru molekuly proteinu 14-3-3 umožňuje současné navázání vhodného ligandu skrze dva fosforylační motivy či i navázání dvou různých ligandů. Vazba proteinu 14-3-3 je podmíněna předešlou fosforylací vazebného partnera v oblasti motivu obsahujícího fosforylovatelný serinový nebo threoninový zbytek. Tento motiv je proteinem 14-3-3 specificky rozpoznán a dochází ke vzniku protein-proteinového komplexu (Muslin et al. 1996;

Tzivion et al. 1998). Doposud byly identifikovány tři typy optimálních vazebných motivů, které jsou rozpoznávány proteiny 14-3-3:

- Typ I: R[S/Φ][+]pSXP
- Typ II: RX[S/Φ][+]pSXP
- Typ III: pS-X_{1,2}-COOH

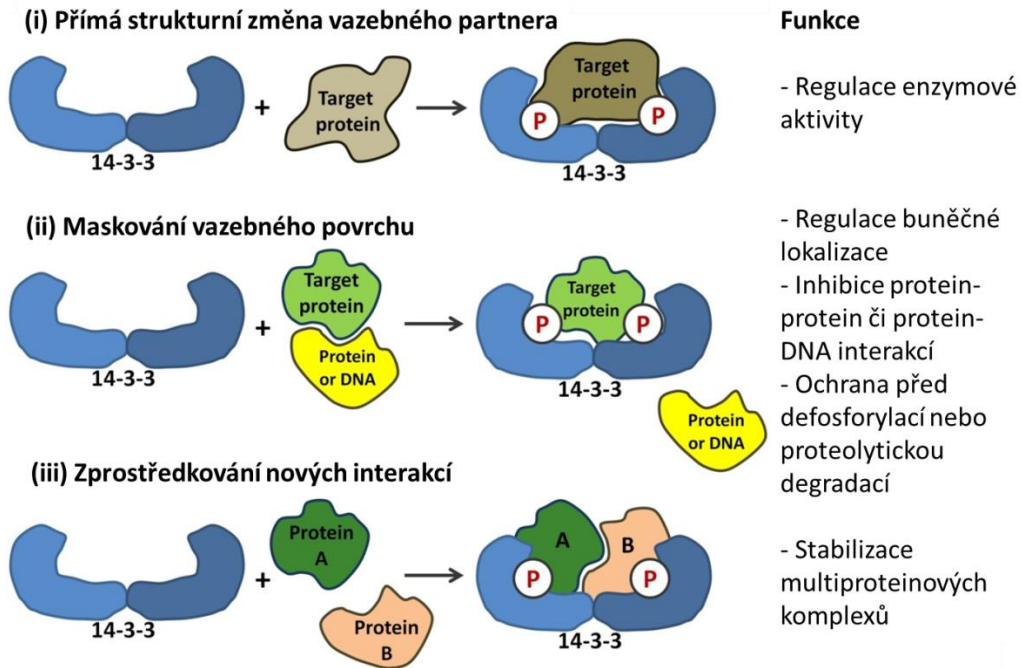
Kde pS je symbolem pro fosforylovaný serinový zbytek pS, Φ značí aromatický aminokyselinový zbytek, + je bazický aminokyselinový zbytek a X znamená jakýkoliv aminokyselinový zbytek s výjimkou cysteinu (Yaffe et al. 1997; Rittinger et al. 1999; Ganguly et al. 2005). Přestože většina známých vazebných partnerů proteinů 14-3-3 nese vazebný motiv obsahující fosforylovaný serinový zbytek, existují také proteiny, které mají místo něj fosforylovaný threoninový zbytek. Příkladem může být serotonin-N-acetyltransferasa (AANAT) (Ganguly et al. 2001; Obsil et al. 2001) nebo transkripční faktor FOXO (Brunet et al. 1999; Obsil et al. 2003). Tyto tři zmíněné typy vazebných motivů nejsou konečným počtem, protože jsou stále objevovány interakce s dalšími proteiny, které obsahují jiné fosforylované i nefosforylované sekvence (Masters et al. 1999; Wang et al. 1999; Johnson et al. 2010).

2.3.5 Mechanismus funkce proteinů 14-3-3

Systematický výzkum funkce proteinů 14-3-3 doposud odhalil účast těchto proteinů v mnoha nejrůznějších biologických procesech prostřednictvím nejrůznějších mechanismů ovlivňujících vlastnosti nebo např. buněčnou lokalizaci svých vazebných partnerů. Dostupné biochemické a strukturní studie umožňují funkční role proteinů 14-3-3 klasifikovat do tří obecně přijímaných skupin (viz obrázek 2.6, str. 26) (Obsil a Obsilova 2011).

První skupina zahrnuje proteiny 14-3-3, které svou vazbou přímo způsobují konformační změnu vazebných partnerů. Tento mechanismus je nejčastěji využíván při regulaci aktivity příslušných vázaných enzymů. Druhá skupina se vyznačuje fyzickou blokáci/ochranou sekvenčně specifických nebo strukturních motivů svých vazebných partnerů. Popsaný proces se často vyskytuje při regulacích buněčné lokalizace nebo inhibici protein-proteinových či protein-ligandových interakcí (např. interakce protein-DNA). Zmíněný mechanismus je také často využíván při ochraně proteinů před defosforylací nebo proteolytickou degradací. Poslední třetí skupina proteinů 14-3-3 vytváří jakousi oporu/základnu pro protein-proteinové interakce svých vazebných partnerů, které je využíváno při stabilizaci multiproteinových komplexů (Fu et al. 2000; Tzivion a Avruch 2002; Aitken et al. 2002; Bridges a Moorhead 2005). Nicméně přesné mechanismy těchto interakcí a regulací jsou ve většině případů doposud neobjasněné. Nevýhodou také je, že většina strukturních dat naměřených na proteinech 14-3-3 pochází

z jejich komplexů s krátkými syntetickými fosfopeptidy a nikoliv např. s plně aktivními enzymy.



Obrázek 2.6.: Obecné mechanismy funkce proteinů 14-3-3. Protein 14-3-3 může: i) indukovat konformační změnu svého vazebného partnera; ii) maskovat specifickou oblast cílového proteinu; nebo iii) zprostředkovat vazbu mezi dvěma různými proteiny. Převzato z (Obsil a Obsilova 2011).

Navzdory velkému počtu vazebných partnerů proteinů 14-3-3, byly doposud publikovány pouze dvě struktury s vysokým rozlišením kompletních protein-proteinových komplexů s proteiny 14-3-3. Jsou jimi komplex 14-3-3ζ:AANAT (Obsil et al. 2001) a komplex rýžového proteinu 14-3-3 (GF14c) se dvěma molekulami florigenu Hd3a (Taoka et al. 2011). Další strukturální informace byly získány nejrůznějšími biofyzikálními studiemi protein-proteinových komplexů s proteiny 14-3-3. Byl takto prostudován například komplex s transkripčním faktorem FOXO4 (Obsilova et al. 2005; Silhan et al. 2009), s proteinem p53 (Rajagopalan et al. 2008; Schumacher et al. 2010), s regulační doménou lidské tyrosinhydroxylasy (TH1R) (Obsilova et al. 2008) nebo s regulátorem G-proteinové signalizace 3 (RGS3) (Rezabkova et al. 2010).

Strukturální, biochemické a bioinformatické studie komplexů tvořených proteiny 14-3-3 vykazují několik společných rysů, které jsou patrně klíčové pro schopnost proteinů 14-3-3 vázat své vazebné partnery a ovlivňovat jejich vlastnosti a funkce. Prvním takovým znakem je

rigidní charakter struktury dimeru proteinu 14-3-3. Druhým znakem je častá přítomnost více vazebných motivů pro proteiny 14-3-3 na jediné molekule jejich vazebného partnera. A třetím, posledním znakem je skutečnost, že tyto motivy se často nalézají uvnitř strukturně neuspořádaných oblastí těchto vazebných partnerů.

Při porovnání známých struktur proteinů 14-3-3 samotných s jejich strukturami v komplexech s fosforylovanými peptidy nebo proteiny, byly pozorovány pouze malé změny struktury proteinů 14-3-3 (Obsil a Obsilova 2011). Tato strukturní rigidita je pravděpodobně následkem rozsáhlé sítě interakcí mezi α -helixy proteinu 14-3-3. Díky tomu mohou proteiny 14-3-3 vytvářet jakousi stabilní nehybnou platformu, na které dochází k formování jejich vazebných partnerů (Yaffe 2002). Dalším společným rysem proteinů 14-3-3 je jejich dimerní struktura, která obsahuje dva antiparalelní ligand-vazebné žlábků. Právě toto uskupení je rozhodující pro správnou funkci proteinů 14-3-3. Bylo objeveno, že mnoho vazebných partnerů proteinů 14-3-3 obsahuje jeden nebo více vazebných motivů, které mohou být současně navázány každý v jednom z ligand-vazebných žlábků dimeru proteinu 14-3-3 (Johnson et al. 2010; Kostecky et al. 2009). Bylo prokázáno, že dvojitě fosforylované peptidy se váží na proteiny 14-3-3 s mnohem vyšší afinitou než totožné peptidy obsahující pouze jeden fosforylovaný motiv (Yaffe et al. 1997; Kostecky et al. 2009). Tyto výsledky podporují hypotézu, že jeden z vazebných motivů může fungovat jako dominantní vazebné místo, které je bezpodmínečně nutné pro vazbu na proteiny 14-3-3 (Yaffe 2002). Druhé místo, vykazující nižší afinitu pro proteiny 14-3-3, je pravděpodobně neschopné samo o sobě tvořit stabilní komplexy s proteiny 14-3-3, ale jeho přítomnost je potřebná ke správné biologické funkci příslušného proteinu navázaného na dimer proteinu 14-3-3. Byla také stanovena minimální vzdálenost deset aminokyselinových zbytků mezi těmito dvěma motivy (Kostecky et al. 2009).

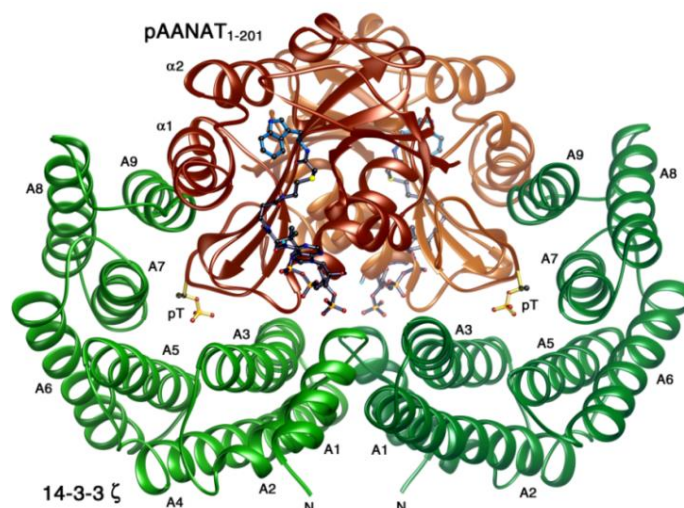
Dimer proteinu 14-3-3 může současně vázat také dva motivy, které jsou od sebe mnohem více vzdálené. Například jako to je v případě dvou funkčních domén transkripčních faktorů FOXO (Brunet et al. 1999; Obsil et al. 2003) nebo u AANAT (Ganguly et al. 2001; Obsil et al. 2001). Takovéto typy interakcí se pravděpodobně vyznačují nejen vznikem vysokoafinitní vazby, ale také umožňují konformační změny a/nebo maskování struktur vazebného partnera (Obsil a Obsilova 2011). Dimerní charakter proteinu 14-3-3 má také důležitý význam při tvorbě protein-proteinových komplexů dvou různých proteinů za pomoci právě proteinů 14-3-3. Krystalové struktury komplexů proteinů 14-3-3 s AANAT (Obsil et al. 2001) a s H^+ -ATPasou (Ottmann et al. 2007) potvrdily, že dimer proteinu 14-3-3 je schopný navázat a umístit ve svém centrálním kanálu dvě molekuly příslušného vazebného partnera (viz obrázky 2.7 a 2.8, str. 29 a str. 30).

Častým společným znakem vazebných partnerů proteinů 14-3-3 je přítomnost vazebných míst pro tyto proteiny uvnitř nestrukturních oblastí jejich sekvencí. Tyto oblasti se nejčastěji nacházejí na C- nebo N-koncích příslušných proteinů nebo také ohraničují jejich funkční domény (Johnson et al. 2010; Bustos a Iglesias 2006; Oldfield et al. 2008). Flexibilita a plastičnost nestrukturních oblastí poskytuje především signálním proteinům mnoho funkčních výhod například schopnost vazby na různé vazebné partnery a/nebo umožňuje jemnou kontrolu jejich vazebné afinity (Dyson a Wright 2002; Wright a Dyson 2009). Dalším důvodem pro účast nestrukturních oblastí ve vazebných interakcích proteinů může být lepší schopnost a dosah pole působnosti při hledání vhodných vazebných partnerů, ve srovnání s kompaktními, dokonale sbalenými proteiny s omezenou flexibilitou jejich konformace (Shoemaker et al. 2000). Přítomnost vazebných motivů pro proteiny 14-3-3 v neuspořádaných oblastech také může souviset s tím, že příslušné proteiny potřebují „pomoc“ proteinů 14-3-3 k dosažení uspořádanější a stabilnější struktury (Bustos a Iglesias 2006). Vznik komplexů doprovázený uspořádáním nestrukturních oblastí do pravidelnějších struktur, by byl patrně entropicky nevýhodný, a proto musí být usnadněn velkým poklesem entalpie. Pro splnění popsáných podmínek je vazba na proteiny 14-3-3 prakticky ideální. Právě tato vazba je ve většině případů zprostředkována tvorbou mnoha polárních kontaktů (např. vodíkových vazeb a solných můstků) mezi fosforylovanými vazebnými motivy pro protein 14-3-3 a ligand-vazebným žlábkem tohoto proteinu (Yaffe et al. 1997; Rittinger et al. 1999).

2.3.6 Krystalové struktury proteinů 14-3-3 s plně funkčními vazebnými partnery

Jedním typem mechanismu účinku 14-3-3 proteinu je vyvolání konformační změny molekuly svého vazebného partnera. K právě takovému jevu dochází v případě vazby proteinu 14-3-3ζ na serotonin-N-acetyltransferasu (AANAT). Tento enzym katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetyloenzymu A (acetyl-CoA) na serotonin, za vzniku N-acetylserotoninu (prekurzoru melatoninu). Volná AANAT je neschopná katalýzy, protože její afinita pro substrát je velice nízká. Po fosforylaci AANAT a následné vazbě proteinu 14-3-3ζ, se afinita tohoto enzymu k substrátu mnohonásobně zvyšuje a tím dochází k aktivaci (Ganguly et al. 2001). Strukturální studie ukázaly, že porovnáním neaktivní AANAT a její aktivní formy s navázaným substrátem dochází ke konformační změně 18 aminokyselinových zbytků umístěných v oblasti dlouhého ohybu struktury pAANAT (Hickman et al. 1999b, 1999a). Tato reorganizace molekuly pAANAT umožňuje jednak navázání acetyl-CoA a dále strukturálně dotváří vazebné místo pro serotonin. Krystalová struktura proteinového komplexu 14-3-3ζ:pAANAT odhalila, že pAANAT je navázána do centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3ζ a je držena na místě

díky rozsáhlým interakcím s ligand-vazebným žlábkem a dalšími částmi centrálního kanálu proteinu 14-3-3 ζ (viz obrázek 2.7) (Obsil et al. 2001). Tyto kontakty zahrnují oblast ohybu pAANAT, která podléhá konformační změně vyvolané vazbou substrátu. Struktura celého komplexu naznačuje, že protein 14-3-3 ζ ovlivňuje strukturu pAANAT tak, aby se uspořádala do konformace umožňující optimální vazbu substrátu. Což také vysvětluje zvýšenou afinitu pro substrát v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ .

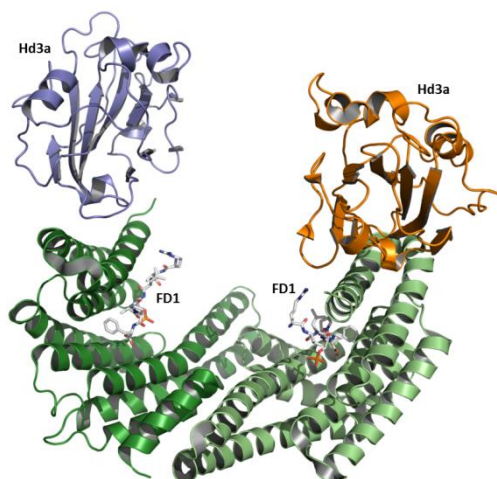


Obrázek 2.7: Stužkový model krystalové struktury komplexu dimeru proteinu 14-3-3 ζ se dvěma molekulami serotonin-N-acetyltransferasy (AANAT). Dimer proteinu 14-3-3 ζ je znázorněn zeleně a struktura fosforylovaného enzymu pAANAT je označena cihlovou barvou. Struktura je v PDB uložena pod kódem 1IB1 a byla převzata z (Obsil et al. 2001).

Enzym AANAT je příkladem proteinu, který obsahuje dva vazebné motivy pro proteiny 14-3-3, které ohraničují jeho funkční katalytickou doménu. První motiv je umístěn na N-konci (sekvence RRHpTLP) a druhý motiv je na C-konci (sekvence RRNpSDR-COOH) (Ganguly et al. 2001, 2005). Strukturní a biochemická data naznačují, že pAANAT se váže na dimer proteinu 14-3-3 ζ při čemž využívá oba zmíněné fosforylované motivy, takže se první váže N-terminální konec a následně i konec C-terminální (Obsil et al. 2001; Ganguly et al. 2005). Je tedy možné předpokládat, že tento mechanismus vyvolává nejen interakce vyznačující se vysokou afinitou, ale také je patrně velice účinným způsobem strukturního a funkčního ovlivnění svého vazebného partnera (Obsil a Obsilova 2011).

Dalším příkladem mechanismu regulace enzymové aktivity prostřednictvím vazby proteinu 14-3-3 je interakce tohoto regulačního proteinu s florigenem Hd3a. Florigen je syntetizován v listech vyšších rostlin a následně transportován do vrcholových částí rostlin, kde indukuje

kvetení. Pro výzkum tohoto, ne úplně pochopeného, mechanismu byl studován komplex florigenu Hd3a s rýžovým proteinem 14-3-3 (GF14c) (viz obrázek 2.8). Výsledky tohoto výzkumu odhalily, že proteiny 14-3-3 zde hrají úlohu intracelulárního receptoru pro florigen (Taoka et al. 2011). V následujících letech bylo prokázáno, že proteiny 14-3-3 umožňují interakci florigenu Hd3a s transkripčním faktorem OsFD1 tím, že váže oba proteiny simultánně. Tvorba ternárního komplexu je klíčová pro vznik květů u rýže (Taoka et al. 2013).



Obrázek 2.8: *Stužkový model krystalové struktury komplexu dimeru rýžového proteinu 14-3-3 (GF14c) se dvěma molekulami florigenu Hd3a. Dimer proteinu 14-3-3 je znázorněn zeleně a struktura fosforylovaných florigenů Hd3a jsou označeny modrou a oranžovou barvou. Pro tvorbu obrázků byl použit program PyMOL (www.pymol.org) a struktura 3AXY z PDB (Taoka et al. 2011).*

2.3.7 Interakční dosah způsobený vazbou proteinu 14-3-3

Interakční rozhraní mezi proteiny 14-3-3 a jejich vazebnými partnery někdy nezahrnuje pouze oblast ligand-vazebného žlábků, kam se váží oblasti obsahující specifické fosforylované vazebné motivy pro proteiny 14-3-3, ale také oblast vně centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3. Je tomu tak například při aktivaci serotonin-N-acetyltransferasy (AANAT) (Ganguly et al. 2001), kdy protein 14-3-3 svojí vazbou zvyšuje aktivitu fosforylované formy tohoto enzymu. Při vazbě proteinu 14-3-3 dochází ke strukturálním změnám AANAT také v blízkosti aktivního centra tohoto enzymu, které je však poměrně vzdálené vazebnému motivu pro protein 14-3-3. K analogickým změnám dochází při vazbě proteinů 14-3-3 na další proteiny zkoumané v našich laboratořích. Jsou jimi Nth1, RGS3 a fosducin (Pdc) (Rezabkova et al. 2010, 2011, 2012; Veisova et al. 2012; Macakova et al. 2013; Kopecka et al. 2014). Změny struktury těchto proteinů vyvolané vazbou proteinu 14-3-3 se také projevují v oblastech poměrně vzdálených

od vazebného motivu pro proteiny 14-3-3. Je tedy možné tvrdit, že interakce mezi proteiny 14-3-3 a jejich ligandy přesahuje oblast ligand-vazebných žlábků tohoto proteinu. Pomocí H/D výměny spojené MS bylo prokázáno, že proteiny 14-3-3 interagují se svými vazebnými partnery i přes oblasti mimo jejich centrální kanál. Jsou to oblasti, které jsou evolučně méně konzervované a nacházejí se na α -helixech H6 a H8 (vně centrálního kanálu). Zahrnutí těchto oblastí při interakcích s proteiny 14-3-3 může být vysvětlením pro pozorovanou specifitu pro jednotlivé isoformy proteinů 14-3-3 při interakci s jejich ligandy. Navíc v případě RGS3 a také Pdc vazba proteinů 14-3-3 stericky blokuje vazebný prostor těchto proteinů a tak inhibuje jejich interakce s jejich dalšími vazebnými partnery. V obou případech tyto sterické blokace ovlivňují stejné oblasti (N-koncovou doménu Pdc a RGS doménu RGS3) (Obsilova et al. 2014).

2.3.8 Nth1 jako vazebný partner proteinů 14-3-3

Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2) jsou vysoce homologní a účastní se regulace rozhodujících fyziologických procesů v kvasinkách (van Heusden a Steensma 2006; van Heusden 2009; Veisova et al. 2010). Proteiny 14-3-3 interagují s Nth1 fosforylovanou pomocí PKA a váží se na její N-terminální oblast (Zähringer et al. 1997; Panni et al. 2008; Veisova et al. 2012). Sedimentační analýza prokázala, že obě kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 tvoří stabilní proteinové komplexy s pNth1 v molárním poměru 1:2 (pNth1:protein 14-3-3) a že disociační konstanta (K_d) tohoto komplexu je přibližně 100 nM. Při měření enzymové aktivity bylo odhaleno, že aktivace pNth1 prostřednictvím vazby proteinů 14-3-3 je mnohem účinnější ve srovnání s aktivací spojenou s vazbou kationtů Ca^{2+} . Navíc měření enzymové aktivity mutantních forem Nth1 *in vitro* a *in vivo* napovídají, že serinové zbytky S60 a S83 primárně zodpovídají za fosforylačně závislou aktivaci Nth1 prostřednictvím proteinů 14-3-3 (Veisova et al. 2012).

Jak bylo popsáno v kapitole 2.3.2 proteiny 14-3-3 mají dimerní strukturu, ve které se nacházejí dva antiparalelní ligand-vazebné žlábků, které proteinům 14-3-3 umožňují současnou vazbu dvou vazebných motivů (Kostecky et al. 2009; Johnson et al. 2010). Je známo, že mnoho vazebných partnerů proteinů 14-3-3 obsahuje dva nebo více vazebných motivů pro tyto proteiny a enzym Nth1 je pravděpodobně jedním z takovýchto případů (Veisova et al. 2012). Minimální vzdálenost mezi dvěma vazebnými motivy pro protein 14-3-3, která umožňuje vazbu příslušného proteinu na dvě vazebná místa proteinu 14-3-3 současně, je deset aminokyselinových zbytků (Kostecky et al. 2009). Z tohoto důvodu je tedy pravděpodobné, že S60 a S83 v Nth1 tvoří právě takový dvojitě fosforylovaný optimální vazebný motiv pro vazbu proteinu 14-3-3. Na druhou stranu je velice pravděpodobné, že dvě další místa

ze sekvence Nth1 S20 a S21, která jsou také fosforylovaná *in vitro* pomocí PKA, vazebný motiv pro protein 14-3-3 nevytvářejí. Důvodem pro toto tvrzení je, že nebyla ještě nikdy pozorována vazba proteinu 14-3-3 na peptid obsahující dva následující nebo velice blízko položené fosforylované aminokyselinové zbytky (Fu et al. 2000). V souladu s touto skutečností bylo i experimentálně potvrzeno, že mutantní formy Nth1 fosforylované na pouze S20 nebo S21 nebo obou dohromady nevykazovaly vysokou afinitu pro proteiny 14-3-3 a navíc u těchto tří mutantních forem byla naměřena velice nízká enzymová aktivita v přítomnosti proteinů 14-3-3. Podobné výsledky byly získané také při aktivačních studiích mutantních forem Nth1 *in vivo*, kdy byla aktivace prokázána pouze u mutantních forem Nth1 S60 a S83, ale ne u S20+S21 (Veisova et al. 2012).

Protože všechna fosforylační místa pro PKA a současně vazebné motivy pro protein 14-3-3 se nacházejí na neuspořádaném N-konci Nth1 vně katalytické domény Nth1 lze předpokládat, že katalytická doména Nth1 a fosforylace pomocí PKA nezvyšují enzymovou aktivitu vlastním přičiněním, ale že aktivace je spíše výsledek strukturálních změn způsobených vazbou proteinu 14-3-3 na enzym Nth1. Tyto změny pravděpodobně ovlivňují strukturu katalytické domény Nth1 a usnadňují tak aktivaci enzymu (Veisova et al. 2012).

3 Cíle práce

Hlavním cílem předložené disertační práce je objasnění molekulárního mechanismu regulace enzymové aktivity neutrální trehalasy (Nth1) ze *Saccharomyces cerevisiae* prostřednictvím kationtů Ca^{2+} a kvasničného proteinu 14-3-3 (Bmh1). Práce se zabývá strukturními změnami na proteinech Nth1 a Bmh1 po vytvoření komplexu v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} . Jako hlavní experimentální přístupy použité ke studiu byly využity cílená bodová mutagenese, měření enzymové aktivity, CD spektroskopie, vodík/deuteriová (H/D) výměna a chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií (MS), malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a krystalografie.

Konkrétní cíle práce byly následující:

- 1) Příprava, exprese a purifikace mutantních forem Nth1.
- 2) Stanovení enzymové aktivity mutantních forem Nth1 v závislosti na přítomnosti kationtů Ca^{2+} a/nebo proteinu Bmh1.
- 3) Určení vlivu jednotlivých mutací na strukturu Nth1 pomocí měření cirkulárního dichroismu a diferenční skenovací fluorimetrie.
- 4) Ověření vazby proteinů Bmh1 na jednotlivé mutantní formy Nth1 pomocí analytické ultracentrifugace a nativní TBE-PAGE.
- 5) Objasnění strukturních změn v rámci molekuly Nth1 pomocí H/D výměny a chemického zesílení spojenými s MS za následujících podmínek:
 - a) Nth1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+}
 - b) Komplex pNth1:Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+}
- 6) Jaký vliv má vazba Ca^{2+} a/nebo pNth1 na strukturní změny v molekule Bmh1?
- 7) Strukturní studie proteinu Nth1, Bmh1 a jejich komplexu pomocí malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS).
- 8) Optimalizace purifikačního protokolu a krystalografických podmínek konstruktů Nth1 100–751, Nth1 153–751 a komplexu obou proteinů pNth1:Bmh1.

4 Použitý materiál

4.1 Použité chemikálie

agarosa – Carl Roth GmbH, Německo

akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo

ampicilin – Sigma-Aldrich, USA

ATP (adenosintrifosfát) – Sigma-Aldrich, USA

azid sodný – Sigma-Aldrich, USA

bacto trypton (pepton) – Carl Roth GmbH, Německo

bacto yeast extract (kvasničný extrakt) – Carl Roth GmbH, Německo

Bicin (N,N-bis-(2-hydroxyethyl)glycin) – Merck KGaA, Německo

bis-akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo

BIS-TRIS – Sigma-Aldrich, USA

bromfenolová modř – Sigma-Aldrich, USA

citronan sodný – Lach-Ner, ČR

Coomassie Brilliant Blue R 250 – Sigma-Aldrich, USA

destilovaná voda vhodná pro PCR – Top-Bio, ČR

dihydrogenfosforečnan draselný – PENTA, ČR

dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát – PENTA, ČR

dodecylsírán sodný (SDS) – Sigma-Aldrich, USA

DTT (1,4-dithiothreitol) – Carl Roth GmbH, Německo

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) – Sigma, USA

EGTA (kyselina ethylenglykoltetraoctová) – Carl Roth GmbH, Německo

ethanol – PENTA, ČR

glycerol – Lach-Ner, ČR

glycin – Carl Roth GmbH, Německo

HEPES – Carl Roth GmbH, Německo

hydrogenfosforečnan disodný dihydrát – PENTA, ČR

hydroxid sodný – Lach-Ner, ČR

chloramfenikol – Sigma-Aldrich, USA

chlorid draselný – Lach-Ner, ČR

chlorid sodný – PENTA, ČR

chlorid vápenatý – PENTA, ČR

imidazol – Carl Roth GmbH, Německo

IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) – bioWORLD, USA
isopropanol – Lach-Ner, ČR
kanamycin – Sigma-Aldrich, USA
kyselina boritá – PENTA, ČR
kyselina citrónová – PENTA, ČR
kyselina chlorovodíková – PENTA, ČR
kyselina kakodylová – Sigma-Aldrich, USA
kyselina octová – PENTA, ČR
Luria-Bertani (LB) agar – Carl Roth GmbH, Německo
Luria-Bertani (LB) médium – Carl Roth GmbH, Německo
 β -merkapt ethanol – Carl Roth GmbH, Německo
MES – Carl Roth GmbH, Německo
methanol – PENTA, ČR
octan amonný – Lach-Ner, ČR
octan sodný – PENTA, ČR
octan vápenatý – PENTA, ČR
PEG 8000 (polyethylenglykol 8000) – Sigma-Aldrich, USA
peroxidisíran amonný (APS) – Sigma-Aldrich, USA
PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid) – Carl Roth GmbH, Německo
síran amonný – Sigma-Aldrich, USA
síran lithný – Sigma-Aldrich, USA
síran nikelnatý (hexahydrát) – PENTA, ČR
TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin) – Sigma-Aldrich, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) – Carl Roth GmbH, Německo
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) – Carl Roth GmbH, Německo
Tris-HCl – Carl Roth GmbH, Německo

Všechny chemikálie byly nejméně čistoty *p.a.*

4.2 Ostatní materiál

Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit – Invitrogen[™], Life Technol., USA
BamHI (20 000 U/ml) – New England BioLabs, USA
Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (High Sub) – GE Healthcare, Švédsko
100× BSA (10 mg/ml) – New England BioLabs, USA
destičky pro krystalografii (24 jamek, visící kapky) – Crystalgen SuperClear[™] Plates,
pregreased – Crystalgen, USA
destičky pro hledání vhodných krystalizačních podmínek pomocí robotu Crystal Gryphon
Intelli-plates[®] 96 (3 well versions, low vol. reservoir, sitting drop) – Art Robbins
Instruments, USA
destičky pro real-time PCR LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 96 – Roche, Švýcarsko
dialyzační membrány z regenerované celulózy – Spectra/Por 4, MWCO 12 – 14 kDa
– Spectrum Laboratories, USA
DNA Ladder 1 kb – Sigma-Aldrich, USA
dNTP mix (10 mM) – Invitrogen[™], Life Technologies, USA
DNA primery – Sigma-Aldrich, USA
DpnI (20 000 U/ml) – New England BioLabs, USA
Escherichia coli kmen BL21(DE3) – Stratagene, USA
Escherichia coli kmen BL21(DE3)RIL – Agilent Technologies, USA
Escherichia coli kmen TOP10 – Invitrogen[™], Life Technologies, USA
Escherichia coli kmen Rosetta(DE3) – Stratagene, USA
fluorescenční barvivo SYPRO[®] Orange, Protein Gel Stain – Sigma-Aldrich, USA
fólie na 96-jamkové krystalografické destičky – ThermalSeal RTST[™] Sealing Films – Excel
Scientific – USA
fólie na destičky na real-time PCR LightCycler[®] 480 Sealing Foil – Roche, Švýcarsko
filtry – SPARTAN 13/0,45 RC – Whatman[™], GE Healthcare, Německo
Gel Loading Solution (6× koncentrované barvivo) – Sigma-Aldrich, USA
GelRED[™] Nucleic Acid Gel Stain 10 000× (ve vodě) – Biotium, USA
Chelating Sepharose[™] Fast Flow – GE Healthcare, USA
inhibitor proteas SIGMA FAST[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free
– Sigma-Aldrich, USA
kolona Superdex[™] 200 10/300 GL – GE Healthcare, Švédsko
kolona Superdex[™] 75 10/300 GL – GE Healthcare, Švédsko
kolona Hiload 26/60 Superdex[™] 200 pg – GE Healthcare, Švédsko

kolona Hiloal 26/60 Superdex™ 75 pg – GE Healthcare, Švédsko
 koncentrátor – Amicon® Ultra, 10 kDa, Millipore, USA
 koncentrátor – Amicon® Ultra, 30 kDa, Millipore, USA
 křemenné kyvety QS 3,00 mm – Hellma, Německo
 křemenné kyvety QS 10,00 mm – Agilent Technologies, USA
 křemenné kyvety pro CD spektroskopii – Starna, USA
 kulatá silikonizovaná krycí sklíčka – VDX, 0,22 mm – Hampton Research, USA
 lysozym (min. 100 000 U/mg) – SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
 MonoS Sepharosa pro kationtově výměnnou chromatografii – Amersham Biosciences, Švédsko
 MonoQ Sepharosa pro aniontově výměnnou chromatografii – Amersham Biosciences, Švédsko
 NcoI (10 000 U/ml) – New England BioLabs, USA
 NdeI (20,000 U/ml) – New England BioLabs, USA
 NotI (10 000 U/ml) – New England BioLabs, USA
 odsolovací kolona Peptide MicroTrap – Michrom Bioresources, USA
 PfuUltra™ HF DNA Polymerase (2,5 U/μl) – Agilent, USA
 10× PfuUltra™ HF DNA polymerase Reaction Buffer – Agilent, USA
 PKA (cAMP-dependentní proteinkinasa) – Promega, USA
 plasmid pET-15b – Invitrogen, USA
 plasmid pET-32b – Novagen, USA
 plasmid pRSFDuet-1 – dar od Mgr. *et* Mgr. Evžena Bouří, PhD., NIH, USA
 Precision Plus Protein Dual Color Standard – Bio-Rad, USA
 10× NEbuffer – New England BioLabs, USA
 10× pufr pro T4 DNA ligasu (s 10 mM ATP) – New England BioLabs, USA
 sada 96 aditiv pro krystalografii – Additive Screen – Hampton Research, USA
 sada pro čištění DNA – GenElute™ PCR Clean-Up Kit – Sigma-Aldrich, USA
 sada pro izolaci DNA z agarosového gelu – GeneJET™ Gel Extraction Kit, Fermentas, EU
 sada pro izolaci plasmidové DNA – Jetquick Plasmid Miniprep spin kit, Genomed
 – GmbH, Německo
 sada 96 krystalografických srážecích roztoků – Crystal Screen 1 a 2 – Hampton Research, USA
 sada 96 krystalografických srážecích roztoků – Index HT – Hampton Research, USA
 sada 96 krystalografických srážecích roztoků – Midas – Molecular Dimensions, UK
 sada 96 krystalografických srážecích roztoků – Morpheus – Molecular Dimensions, UK
 sady 96 krystalografických srážecích roztoků – JCSG I až IV – Qiagen, Nizozemsko
 T4 DNA ligasa (400 000 U/ml) – New England BioLabs, USA
 thrombin (z lidské plasmy) – Sigma-Aldrich, USA

4.3 Přístroje

analytická ultracentrifuga – ProteomLab™ XL-I – Beckman Coulter, USA
centrifuga – centrifugace jednolitrových bakteriálních kultur – 8K, Sigma, Německo
centrifuga – centrifugace destiček před DSF – Z 300, Hermle, Německo
centrifuga – centrifugace sonikátu – Z 323 K, Hermle, Německo
centrifuga – pro mikrozkušavky – Mini Spin Eppendorf, Německo
centrifuga – koncentrování proteinů – Eppendorf 5804 R, Německo
hmotnostní spektrometr ESI-FT-ICR – 9.4 T APEX-Ultra – Bruker Daltonics, USA
horizontální agarosová elektroforéza – Sigma-Aldrich, USA
chromatografie – FPLC-AKTA, Amersham Biosciences, Švédsko
inkubátor (37 °C) – MELAG, Německo
inkubátor (18 °C) – Lovibond, Německo
LightCycler 480 II – Roche, Švýcarsko
peristaltická pumpa – ECOLINE VC-MS/CA4-12, ISMATEC®, Švýcarsko
pH-metr – 3505 pH Meter, Jenway, Velká Británie
robot pro hledání vhodných krystalizačních podmínek – Crystal Gryphon – Art Robbins
Instruments, USA
sonicator® 3000 – Misonix, USA
termoblok – typ BTD, Grant, Velká Británie
termocycler – Mastercycler Personal – Eppendorf, Německo
transiluminátor UVT-14 M – Herolab GmbH, Německo
třepačka bakteriálních kultur – Infors HT Multitron II, Švýcarsko
třepačka na zkumavky – Handy LAB® System, N-BIOTEK, NB-205, Korea
vertikální polyakrylamidová elektroforéza – BIO-RAD, USA
vodní lázeň – Memmert GmbH, Německo
vortex Zx³ – Velp Scientifica, Itálie
zdroj napětí pro elektroforézu – PowerPac™ Basic, BIO-RAD, Singapur
UV-Vis absorpční spektrofotometr – Agilent 8453, Agilent Technologies, USA
spektropolarimetr J-810 pro měření CD spektroskopie – Jasco, Japonsko

5 Experimentální metody

Výzkum proteinů 14-3-3 a neutrální trehalasy Nth1 pocházející z kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* probíhá v laboratoři RNDr. Veroniky Obšilové, PhD. již několik let. Z tohoto důvodu bylo ve většině experimentů možné použít dříve zaklonované konstrukty zmíněných proteinů a připravovat je podle zavedených a optimalizovaných protokolů (Obsil et al. 2001; Obsilova et al. 2004; Veisova et al. 2012).

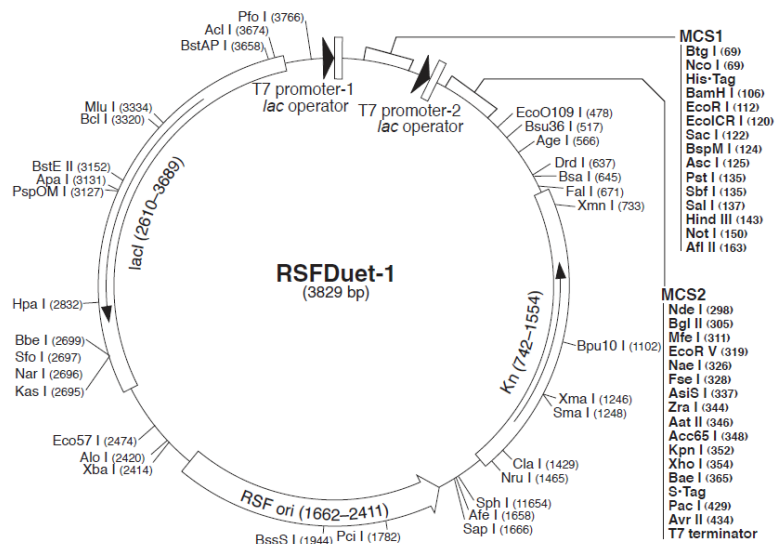
5.1 Příprava expresních konstruktů

Pro výzkum molekulárního mechanismu regulace funkce Nth1 a studium její struktury bylo připraveno několik různých expresních konstruktů jak neutrální trehalasy samotné, tak i jejich vazebných partnerů proteinů Bmh1.

5.1.1 Klonování konstruktů *NTH1* WT

K přípravě většiny proteinů Nth1 WT byl použit konstrukt vyrobený RNDr. Veronikou Obšilovou, PhD. Gen *NTH1* kódující aminokyselinovou sekvenci Nth1 1–751 byl zaklonován do upraveného plasmidu pET-32b (Novagen, USA) pomocí restrikčních endonukleas NcoI a BamHI. Z tohoto plasmidu byla před jeho použitím odstraněna sekvence 81 párů basí následujících po sekvenci kódující šest po sobě následujících histidinů tzv. histidinovou kotvu. Exprimovaný protein Nth1 obsahoval na svém N-konci již zmíněnou histidinovou kotvu, navíc tzv. thioredoxinovou kotvu a místo umožňující odštěpení tohoto úseku pomocí thrombinu. Plasmid byl následně transformován do bakterií *E. coli* kmen Rosetta(DE3) (Stratagene, USA), kde probíhala exprese proteinu Nth1 WT (Veisova et al. 2012).

Z důvodu značně vysoké ceny thrombinu a potřeby produkce Nth1 WT ve větších množstvích určených pro přípravu a následnou krystalizaci komplexu proteinů pNth1:Bmh1 Δ C M237Stop, jsme se rozhodli tento konstrukt umístit do nového plasmidu. Pro tento účel byl vybrán upravený plasmid pRSFDuet-1 (viz obrázek 5.1, str. 40) nesoucí kromě sekvence pro N-koncovou histidinovou kotvu i gen pro vysoce rozpustný protein G_B1 a štěpné místo umožňující odštěpení tohoto konce pomocí snadno a levně vyrobitelné TEV proteasy. Gen *NTH1* (pro aminokyselinovou sekvenci 1–751) byl do tohoto plasmidu zaklonován mezi štěpná místa pro restrikční endonukleasy NcoI a BamHI. Vzhledem k použití stejných restrikčních míst, která byla použita pro zaklonování konstruktů do plasmidu pET-32b, bylo možno insert pouze vyštěpit pomocí daných endonukleas a vložit do nového plasmidu.



ATG AAC AGC AGC **CAT CAC CAT CAT CAC CAC** ATG CAG TAC AAG CTT ATC CTG AAC GGT AAA ACC CTG AAA GGT GAA
 ACC ACC ACC GAA GCT GTC GAC GCT GCT ACC GGG GAA AAA GTT TTC AAA CAG TAC GCT AAC GAC AAC GGT GTT GAC
 GGT GAA TGG ACC TAC GAC GAC GCT ACC AAA ACC TTC ACG GTA ACC GAA
 AAT AAT AAC AAC AAT AAC AAC AAC AAT GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GCC ATG GGA TCC TGC AGG CGG CCG
 C

Obrázek 5.1: Schéma upraveného plasmidu pRSFDuet-1. Při úpravě tohoto plasmidu Mgr. et Mgr. Evženem Bouřou, Ph.D. bylo původní štěpné místo pro restriční endonukleasu *NcoI* zrušeno a nové zavedeno v oblasti C-konce. Na N-konci fúzního proteinu se po expresi v takto upraveného plasmidu nachází histidinová kotva (šest oranžových kodonů pro His) a vysoce rozpustný protein *G_B1* (zelená sekvence nukleotidů). Tento N-koncový úsek je možné z výsledného fúzního proteinu odštěpit pomocí *TEV* proteasy (sekvence, kterou *TEV* rozpoznává, je vyznačena modře se štěpným místem mezi CAG a GGC). Červeně je označena sekvence pro tzv. linker a fialově vyznačená oblast obsahuje štěpná místa pro restriční endonukleasy *NcoI*, *BamHI*, *PstI* a *NotI*. Pro expresi je klíčový T7 promotor, na který nasedá T7 RNA polymerasa. Místem ukončujícím transkripci inzertu *NTH1* je T7 terminátor. *lacI* je sekvence kódující tzv. lac represor, který se váže na DNA plasmidu a blokuje expresi insertu. Tento represor své místo opouští po přidavku IPTG, který tak indukuje expresi cílového proteinu *Nth1*. *Kn* je oblast kódující rezistenci na kanamycin. Mapa plasmidu byla převzata z (<http://www.merckmillipore.cz>).

Štěpení plasmidu i insertu *NTH1* pomocí restričních enzymů *NcoI* a *BamHI* probíhalo přes noc při 37 °C. Reakční směsi byly připraveny podle tabulky 5.1 (viz str. 41). Čištění naštěpeného plasmidu pRSFDuet-1 bylo provedeno pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarosovém gelu v přítomnosti 1× koncentrovaného TBE pufru (postup viz kapitola 5.1.4 str. 42, složení viz tabulky 5.3 a 5.4). 166 µl dvojité naštěpeného (DD) linearizovaného plasmidu spolu s 28 µl 6× koncentrovaného barviva Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich,

USA) bylo nanášeno na gel. Horizontální elektroforéza probíhala po dobu 1 h při napětí 75 V. Po vyjmutí gelu bylo možné pod UV světlem identifikovat zónu obsahující DNA přečištěného plasmidu. Tato oblast byla následně přesně vyříznuta a DNA z ní izolována pomocí komerčně vyráběné sady GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas Life Science, EU). Při extrakci DNA bylo postupováno podle návodu výrobce. Nejdříve byl ke gelu obsahujícím plasmid přidán vazebný pufr v poměru 1:1 (objem v ml : váha gelu v mg). Následně byl gel rozpuštěn při teplotě 50 – 60 °C po dobu přibližně 10 min. Poté byl roztok přemístěn na speciální kolonku, která zachytila plasmidovou DNA. Následně byla zachycená DNA promyta a nakonec eluována pomocí 40 µl destilované vody určené pro PCR přehřáté na teplotu 60 – 70 °C.

Tabulka 5.1: Složení reakčních směsí při štěpení plasmidu *pRSFDuet-1* a insertu *NTH1 WT* pomocí restričních endonukleas *NcoI* a *BamHI*.

Štěpení plasmidu <i>pRSFDuet-1</i>		Štěpení insertu <i>NTH1 WT</i>	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
plasmid <i>pRSFDuet-1</i>	140 µl	insert <i>NTH1</i>	43 µl
10× NE pufr 3	16 µl	10× NE pufr 3	5 µl
<i>NcoI</i> (10 000 U/ml)	4 µl	<i>NcoI</i> (10 000 U/ml)	1 µl
<i>BamHI</i> (20 000 U/ml)	4 µl	<i>BamHI</i> (20 000 U/ml)	1 µl
100× BSA (10 mg/ml)	1,6 µl	100× BSA (10 mg/ml)	0,5 µl

Naštěpený insert *NTH1* byl přečištěn pomocí komerčně vyráběné sady GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, USA). Tato sada umožňuje rychlé přečištění jedno- nebo dvouvláknových PCR produktů od ostatních komponent, jako jsou primery, nukleotidy nebo DNA polymerasa. Nejdříve byla DNA navázána na membránu kolonky a následně vyčištěna pomocí speciálního pufru. Čistá DNA byla eluována vodou pomocí 40 µl destilované vody určené pro PCR přehřáté na teplotu 60 – 70 °C.

Ligace – spojení dvojitě naštěpeného (DD) plasmidu *pRSFDuet-1* s naštěpeným insertem *NTH1 WT*, probíhala pomocí T4 DNA ligasy (New England BioLabs, USA) při laboratorní teplotě po dobu dvou hodin a následně přes noc při teplotě 4 °C (složení ligační směsi viz tabulka 5.2, str. 42). Ligační směs byla transformována do kompetentních bakterií *E. coli* kmen TOP10 (viz kapitola 5.1.5, str. 43), získané kolonie byly zaočkovány do 5 ml tekutého LB média a izolovaná DNA následně doručena k sekvenační kontrole.

Tabulka 5.2: Složení ligační směsi při klonování *NTH1 WT* do plasmidu *pRSFDuet-1*.

Chemikálie	Množství
DD pRSFDuet-1	2 µl
DD insert <i>NTH1 WT</i>	6 µl
10× pufr pro T4 DNA ligasu (s 10 mM ATP)	1 µl
T4 DNA ligasa (400 000 U/ml)	1 µl

5.1.2 Klonování konstruktů *NTH1 100–751* a *153–751*

Pro krystalografické účely byly připraveny dva kratší konstrukty *NTH1 100–751* a *153–751*, které neobsahují DNA pro N-koncovou nestrukturní oblast Nth1. Exprimované fúzní proteiny se skládají z konzervované katalytické domény a Nth1 100–751 navíc obsahuje i Ca-vazebnou doménu.

Oba tyto konstrukty byly zaklonovány RNDr. Veronikou Obšilovou, PhD. do plasmidu pRSFDuet-1 mezi místa pro restriční endonukleasy NcoI a NotI. Tento plasmid umožnil jejich expresi jako fúzních proteinů s N-koncovou histidinovou kotvou, navíc s vysoce rozpustným proteinem G_B1 a štěpným místem, umožňujícím odštěpení přidaného N-konce pomocí TEV proteasy.

5.1.3 Klonování konstruktů *BMH1 WT* a ΔC

Proteiny Bmh1 WT a ΔC M237Stop (konstrukt neobsahující C-koncovou část proteinu) byly exprimovány jako fúzní proteiny obsahující afinitní histidinovou kotvu na svém N-konci. Konstrukt *BMH1 WT* byl již dříve zaklonován RNDr. Veronikou Obšilovou, PhD. do plasmidů pET-15b (Invitrogen, USA) pomocí restričních enzymů NdeI a BamHI a exprimován v bakteriích *E. coli* kmen BL21(DE3) (Stratagene, USA) (Obsil et al. 2001; Obsilova et al. 2004). Konstrukt pro kratší protein Bmh1 ΔC M237Stop byl vytvořen pomocí cílené jednobodové mutagenese. Při tomto procesu byl kodon pro M237 změněn Mgr. Danou Veisovou, PhD. na Stop kodon (Veisova et al. 2010).

5.1.4 Horizontální TBE agarosová elektroforéza

Čištění naštěpených plasmidů, kontrola úspěšnosti PCR reakcí a ligačních reakcí byla prováděna pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarosovém gelu v přítomnosti 1× koncentrovaného TBE pufru (složení viz tabulky 5.3 a 5.4, str. 43). 1% agarosový gel byl připraven z 0,4 g agarosy rozpuštěné ve 40 ml vroucího 1× koncentrovaného TBE pufru a 0,4 µl fluorescenční barvy GelREDTM (Biotium, USA). Nezpolymerovaný gel byl přelit

do speciální formy a byl do něj zaveden hřebínek pro vytvoření jamek na vzorky. 15 μ l vzorku bylo smícháno s 5 μ l 6 \times koncentrovaného barviva Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich, USA) a s 10 μ l vody. Se stejným množstvím barviva bylo smícháno i 5 μ l standardu DNA Ladder 1 kb (Sigma-Aldrich, USA). Následně byl zpolymerovaný gel umístěn do elektroforetické vany naplněné 1 \times koncentrovaným TBE pufrům a do jednotlivých jamek byly umístěny příslušné vzorky. Elektroforéza probíhala po dobu 1 h při napětí 75 V. Pro vizualizaci testované DNA byla použita fluorescenční barva GelREDTM, která byla přidána do gelu ještě před jeho ztuhnutím. Výsledek byl pozorován pomocí UV světla při umístění gelu do transiluminátoru.

Tabulka 5.3: Složení 1% agarosového gelu pro horizontální elektroforézu.

Chemikálie	Množství
agarosa	0,4 g
1 \times TBE pufr	40 ml
barva GelRED TM	0,4 μ l

Tabulka 5.4: Složení 10 \times koncentrovaného TBE pufru o výsledném objemu 500 ml.

Chemikálie	Množství
Tris	54 g
kyselina boritá	27,5 g
0,5 M EDTA (pH = 8,0)	20 ml
destilovaná voda	doplnění do 500 ml

5.1.5 Transformace metodou teplotního šoku

Při přípravě jednotlivých konstruktů *NTH1* a *BMHI* byly pro transformaci pomocí teplotního šoku nejdříve použity buňky *E. coli* kmen TOP10 (InvitrogenTM, Life Technologies, USA), které jsou vhodné pro následnou izolaci plasmidové DNA.

Buňky jsou uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před použitím musejí roztát v lázni s ledem. Po rozmrznutí bylo 30 μ l roztoku bakterií přendáno do plastové mikrozkušavky umístěné v ledové lázni a byly k nim přidány 3 μ l roztoku příslušné plasmidové DNA se zaklonovaným genem pro expresi daného proteinu. Následně byly buňky 20 min inkubovány v ledové lázni za občasných promíchávání. Poté byla mikrozkušavka se směsí vložena na 45 s do vodní lázně předehřáté na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po uplynutí této doby byla mikrozkušavka vrácena na 2 min do nádoby s ledem. Nakonec bylo do zkumavky se směsí přidáno 300 μ l LB média (složení viz tabulka 5.5, str. 44) předehřátého na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následovala inkubace jednu hodinu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a směs byla vyseta na sterilní Petriho misku s pevným LB agarem (složení viz tabulka 5.5, str. 44)

obsahujícím příslušné antibiotikum (viz tabulka 5.6). Výsledné koncentrace jednotlivých antibiotik v kultivačních médiích jsou uvedeny v tabulce 5.7.

Následující den bylo pomocí sterilní kličky přeneseno několik samostatných kolonií do příslušného počtu zkumavek s tekutým LB médiem. Každá zkumavka obsahovala 5 ml LB média spolu s vhodným antibiotikem (viz tabulka 5.6). Zkumavky se směsí média a buněk byly následně kultivovány přes noc na třepačce při teplotě 37 °C a 200 ot./min.

Tabulka 5.5: Složení tekutého a pevného LB média.

Složení 500 ml tekutého LB média		Složení 500 ml pevného LB média 500 ml	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
trypton	5 g	trypton	5 g
kvasničný extrakt	2,5 g	kvasničný extrakt	2,5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
–	–	agar	10 g
destilovaná voda	doplnění do 500 ml	destilovaná voda	doplnění do 500 ml

Tabulka 5.6: Seznam expresních plasmidů transformovaných do bakterií *Escherichia coli* kmen TOP10 a jejich antibiotických rezistencí.

Kmen bakterií <i>E. coli</i>	Plasmid	Resistence vůči antibiotiku
TOP10	pET-15b	ampicilin
TOP10	pET-32b	ampicilin
TOP10	pRSFDuet-1	kanamycin

Tabulka 5.7: Seznam použitých antibiotik a jejich výsledných koncentrací v tekutých a pevných LB médiích.

Antibiotikum	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace
kanamycin	30 mg ml ⁻¹	30 µg ml ⁻¹
ampicilin	100 mg ml ⁻¹	100 µg ml ⁻¹
chloramfenikol	34 mg ml ⁻¹	34 µg ml ⁻¹

5.1.6 Izolace plasmidové DNA

K izolaci plasmidové DNA z 5 ml kultur bakterií *E. coli* kmen TOP10 byla použita komerčně dodávaná sada Jetquick Plasmid Miniprep spin kit (Genomed GmbH, Německo, viz tabulka 5.8, str. 45). Podle instrukcí výrobce bylo v prvním kroku pomocí centrifugace (1 min při 14 000 ot./min) odstraněno LB médium. Získaná peleta usazených buněk byla následně rozpuštěna pomocí 250 µl roztoku G1. Tento roztok obsahoval RNasu A, která degradovala veškerou RNA přítomnou ve vzorku. Lyze buněk bylo docíleno přidáním 250 µl roztoku G2 a

poté byl obsah mikrozkuhavky zneutralizován pomocí 350 μl roztoku G3. Po další centrifugaci byl supernatant pomocí pipety opatrně přemístěn na kolonku a centrifugován 1 min při 14 000 ot./min. Obsah odpadních nádobek byl vylit, kolonky promyty roztokem G4 a znovu centrifugovány 1 min při 14 000 ot./min. Nakonec byly kolonky přendány do čistých mikrozkuhovek a plasmidová DNA do nich eluována pomocí 40 μl destilované vody určené pro PCR předem zahřáté na teplotu 60 – 70 °C.

Tabulka 5.8: Složení roztoků komerčně vyráběné sady pro izolaci plasmidové DNA (*Jetquick Plasmid Miniprep spin kit, Genomed GmbH, Německo*).

Název roztoku	Složení zásobního roztoku
G1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ RNasa A
G2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
G3	octan sodný, guanidinhydrochlorid
G4	ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl

5.1.7 Cílená bodová mutagenese genů *NTH1 WT*

Pro výzkum úlohy kationtů Ca^{2+} v regulaci aktivity Nth1, bylo do struktury Nth1 zavedeno celkem dvanáct jednobodových mutací a to v oblasti Ca-vazebné domény Nth1 (D114L, D114E, D114N, D116L, K117L, N118L, I121L, D125L, D125E a D125N) a v jejím blízkém okolí (D103L a D173L).

Při cílené jednobodové mutagenesi bylo využito polymerasové řetězové reakce (PCR), při které byl za pomoci předem navržených oligonukleotidů (viz tabulka 5.9, str. 46) změněn kodon pro určitou aminokyselinu, za kodon pro aminokyselinu jinou – námi zvolenou. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby na jejich začátcích a koncích byla báze C nebo G a jediný změněný kodon se nacházel přibližně uprostřed jejich cca 30 nukleotidů dlouhé sekvence.

Mutagenezní PCR je většinou velice rychlý a úspěšný mechanismus, který umožňuje změnu jedné nebo více aminokyselin ve výsledném expresním produktu. Průběh reakce byl řízen cyklicky se opakujícími změnami teploty (viz tabulka 5.11, str. 47) uloženými v příslušném programu na přístroji Personal Mastercycler (Eppendorf, Německo). Složení reakčních směsí je uvedeno v tabulce 5.10 na str. 46. Jednotlivé komponenty byly postupně přidávány a míchány v mikrozkuhavkách určených pro PCR. Syntéza nových mutantních DNA byla katalyzována termostabilním enzymem Pfu-UltraTM HF DNA polymerasou (Agilent, USA).

Tabulka 5.9: Oligonukleotidy využité při cílené jednobodové mutagenезi. Šedě označené kodony jsou místy jednobodových mutací.


Název oligonukleotidu	Sekvence 5' → 3'
D103L_up	c ttt atc gaa gat gtc ctt aaa aca ctt aat gaa c
D103L_down	g ttc att aag tgt ttt aag gac atc ttc gat aaa g
D114L_up	cta ctg gct gct gag ctt acc gat aaa aat tat c
D114L_down	g ata att ttt atc ggt aag ctc agc agc cag tag
D114E_up	cta ctg gct gct gag gag acc gat aaa aat tat c
D114E_down	g ata att ttt atc ggt ctc ctc agc agc cag tag
D114N_up	cta ctg gct gct gag aat acc gat aaa aat tat c
D114N_down	g ata att ttt atc ggt att ctc agc agc cag tag
D116L_up	gct gct gag gat acc ctt aaa aat tat cag atc
D116L_down	gat ctg ata att ttt aag ggt atc ctc agc agc
K117L_up	gct gag gat acc gat cta aat tat cag atc acc
K117L_down	ggt gat ctg ata att tag atc ggt atc ctc agc
N118L_up	gag gat acc gat aaa ctt tat cag atc acc atc
N118L_down	gat ggt gat ctg ata aag ttt atc ggt atc ctc
I121L_up	gat aaa aat tat cag ctc acc atc gag gat acc
I121L_down	ggt atc ctc gat ggt gag ctg ata att ttt atc
D125L_up	cag atc acc atc gag ctt acc ggt cca aaa gtt ttg
D125L_down	caa aac ttt tgg acc ggt aag ctc gat ggt gat ctg
D125E_up	cag atc acc atc gag gag acc ggt cca aaa gtt ttg
D125E_down	caa aac ttt tgg acc ggt ctc ctc gat ggt gat ctg
D125N_up	cag atc acc atc gag aat acc ggt cca aaa gtt ttg
D125N_down	caa aac ttt tgg acc ggt att ctc gat ggt gat ctg
D173L_up	cac caa att ttc tta ctt gaa gct cgt ata aac
D173L_down	ggt tat acg agc ttc aag taa gaa aat ttg gtg

Tabulka 5.10: Složení reakční směsi použité pro mutagenезní PCR.

Chemikálie	Množství
10× reakční pufr pro Pfu-Ultra™ HF DNA polymerasu	5 µl
templátová DNA	1 µl
směs dNTP (1,6 µM)	2,5 µl
10 mM primer up	2 µl
10 mM primer down	2 µl
destilovaná voda pro PCR	36,5 µl
PfuUltra™ HF polymerasa (2,5 U/µl)	1 µl

Při teplotě 95 °C došlo k denuraci dvouvláknové templátové DNA a následně při teplotě 51 °C k hybridizaci mutagenezních primerů na komplementární oblasti templátové DNA. K syntéze nových řetězců DNA docházelo při teplotě 68 °C ve směru od konce 5' ke konci 3'. dNTP byly s pomocí PfuUltra™ HF DNA polymerasy připojovány vždy k volnému konci 3' nově vznikajícího vlákna. Po dokončení syntézy byla teplota znovu zvýšena na 95 °C a celý proces syntézy nových vláken DNA byl opakován ve dvaceti cyklech (viz tabulka 5.11).

Tabulka 5.11: Nastavení programu pro mutagenezní PCR.

Teplota	Doba trvání	
95 °C	1 min	
95 °C	30 s	 20× opakováno
51 °C	1 min	
68 °C	12 min	
68 °C	12 min	
4 °C	do vypnutí přístroje	

5.1.8 Štěpení templátové DNA

Po mutagenezním PCR bylo nutné ze vzorků odstranit původní templátovou DNA *NTH1* WT pomocí restriční endonukleasy DpnI. Tento enzym štěpí původní methylovanou DNA (uvnitř sekvence 5'-Gm⁶ATC-3'), ale nechává nepozměněnou nově syntetizovanou DNA, která neobsahuje žádné methylované adeniny.

K 50 µl reakční směsi po mutagenezní PCR bylo přidáno 1,5 µl restriční endonukleasy DpnI. Vzorek byl lehce promíchán a inkubován při teplotě 37 °C po dobu 1,5 h. Po skončení štěpení bylo ze vzorku odebráno 5 µl pro kontrolu pomocí horizontální TBE agarosové elektroforézy (viz kapitola 5.1.4, str. 42) a zbytek vzorku byl zmrazen při teplotě – 21 °C.

Tímto postupem bylo zajištěno, že se při následující transformaci do kompetentních bakterií *E. coli* kmen TOP10 (viz kapitola 5.1.5, str. 43) dostaly většinou jen plasmidy obsahující kompletně zmutovanou DNA. Kultivaci těchto bakterií došlo k namnožení plasmidové DNA nesoucí geny pro mutantní proteiny Nth1. Po následné izolaci plasmidové DNA byla přítomnost jednotlivých mutací ověřena sekvenační analýzou.

5.1.9 Sekvenační analýza DNA

Ověření úspěšnosti cílené jednobodové mutageneze a klonování některých konstruktů bylo provedeno v Laboratoři sekvenace DNA RNDr. Štěpánky Hrdé z PřF UK a ve Středisku sekvenování DNA při MBÚ AV ČR, v.v.i., vedeném Jürgenem Felsbergem, CSc.

5.1.10 Predikce sekundární struktury Nth1 a porovnání shody s krystalovou strukturou 2JG0

Při navrhování konstruktů *NTH1* určených pro proteinovou krystalografii bylo vycházeno z výsledků predikce sekundární struktury kvasničné neutrální trehalasy Nth1 a bylo také přihlíženo k vyřešené krystalové struktuře katalytické domény trehalasy Tre37A z bakterií *E. coli* (Gibson et al. 2007). Právě tato struktura 2JG0 vykazuje 42% sekvenční podobnost a 27% identitu s Nth1 (viz. kapitola 5.3, str. 63).

Pro porovnání obou aminokyselinových sekvencí (2JG0 a Nth1) byl použit internetový program ClustalW2 Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) Pro predikci sekundární struktury Nth1 byl použit internetový program PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Výsledek z obou těchto analýz se nachází na obrázku 5.2 na straně 48.

5.2 Exprese a purifikace proteinů

Pro expresi všech zkoumaných rekombinantních proteinů byly použity expresní systémy bakterií *E. coli*. Díky těmto systémům bylo možné v krátkém časovém úseku a za příznivou cenu vyrábět miligramová množství čistých rekombinantních proteinů Nth1 a Bmh1. Všechny použité kmeny geneticky modifikovaných bakterií *E. coli* obsahovaly gen kódující lac represor a gen pro syntézu T7 RNA polymerasy. Lac represor nasedá na tzv. lac promotor a tím blokuje transkripci T7 RNA polymerasy. V přítomnosti induktoru IPTG dochází k uvolnění lac represoru a ke spuštění syntézy T7 RNA polymerasy, která následně provádí transkripci genu rekombinantního proteinu, který byl původně taktéž blokován lac represorem.

Proteiny Nth1 a Bmh1 použité v popisovaných experimentech byly vyrobeny autorkou této disertační práce na oddělení Proteinových struktur ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i.

5.2.1 Transformace kompetentních buněk vhodných pro expresi proteinů

Pro transformaci byly použity kmeny kompetentních bakterií *E. coli* uvedené v tabulce 5.12 (viz str. 50). Postup transformace plasmidů nesoucích gen pro příslušný fúzní protein byl stejný jako v kapitole 5.1.5 (str. 43). Rozdíl byl pouze v používaných objemech. Ke 45 µl roztoku příslušných kompetentních bakterií *E. coli* byly přidány 2 µl sekvenačně ověřené plasmidové DNA a po teplotním šoku bylo přidáno 450 µl LB média. Po jednohodinové inkubaci při 37 °C a 180 ot./min byly bakterie přes noc kultivovány na sterilních Petriho miskách s pevným LB agarem obsahujícím příslušné antibiotikum (viz tabulka 5.12, str. 50). Složení pevného a tekutého LB média a koncentrace příslušných antibiotik je uveden v kapitole 5.1.5 (str. 43).

Druhý den byly kolonie přeneseny pomocí sterilních plastových klíčků do zkumavek s tekutým LB médiem a příslušným antibiotikem (viz tabulka 5.12). Zkumavky se směsí LB média a buněk byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C a 180 ot./min.

Tabulka 5.12: *Seznam použitých kompetentních buněk Escherichia coli, používaných expresních plasmidů a antibiotických rezistencí.*

Kmen bakterií <i>E. coli</i>	Expresní plasmid	Resistence vůči antibiotiku
BL21(DE3)	pET-15b	ampicilin
BL21(DE3)	pRSFDuet-1	kanamycin
Rosetta(DE3)	pET-32b	ampicilin + chloramfenikol

5.2.2 Zásobní roztoky transformovaných bakterií

Bakterie obsahující plasmid s genem pro příslušný protein byly skladovány v mrazicím boxu v – 80 °C v roztocích obsahujících glycerol o výsledné koncentraci 30 % (v/v). Zásobní roztoky byly připraveny ze 300 µl sterilního glycerolu a 700 µl bakteriální kultury pěstované přes noc v 5 ml sterilního tekutého LB média při teplotě 37 °C, rychlosti třepání 180 ot./min, v přítomnosti příslušného antibiotika (viz tabulka 5.12) o výsledné koncentraci uvedené v tabulce 5.7 (viz str. 44).

5.2.3 Exprese proteinů

Před expresí proteinů ve více litrových množstvích bylo nutné necelý den předem kultivovat bakterie v 5 ml LB média. Z rozmrazeného zásobního roztoku s bakteriemi nesoucími gen pro cílový protein bylo odebráno 5 µl a přeneseno do 5 ml sterilního LB média obsahujícího příslušné antibiotikum (viz tabulka 5.12) o výsledné koncentraci uvedené v tabulce 5.7 (viz str. 44). Růst bakteriální kultury probíhal přes noc při teplotě 37 °C a 180 ot./min.

Druhý den ráno se do předem připravených dvoulitrových nádob obsahujících po jednom litru LB média přidal 1 ml roztoku příslušného antibiotika a následně také 5 ml buněčné kultury inkubované přes noc. Složení tekutých LB médií a koncentrace antibiotik byly popsány v kapitole 5.1.5 (viz str. 43) Nádoby se směsí LB média a buněk byly poté vloženy do inkubátoru. Kde probíhal jejich růst při teplotě 37 °C a 190 ot./min po dobu téměř tří hodin – dokud průběžně měřená optická denzita kultury nedosáhla hodnoty přibližně 0,6 až 0,8 (měřeno při vlnové délce 600 nm, proti čistému LB médiu).

Pro indukci syntézy bílkovin byl použit roztok IPTG o finální koncentraci 0,5 mM. Exprese jednotlivých proteinů probíhala přes noc při 190 ot./min, za různých teplot. Proteiny Nth1 WT,

jejich mutantní formy a konstrukty určené pro krystalografii byly exprimovány při 25 °C. Proteiny Bmh1 byly bakteriemi syntetizovány při 30 °C.

5.2.4 Centrifugace a lyze buněk

Pro odstranění tekutého LB média z bakteriálních kultur byly tyto kultury přelity do jednolitrových plastových kyvet a následně centrifugovány po dobu 20 min za teploty 4 °C při 3 000 ot./min. Po vyjmutí z centrifugy byl vzniklý supernatant přelit do odpadních lahví a kyvety umístěny do nádoby s ledem. Pelety s bakteriemi byly resuspendovány v lyzačním pufru pomocí vortexu (složení viz tabulka 5.13). Na rozpuštění pelet vzniklých centrifugací tří litrů bakteriálních kultur bylo potřeba 100 ml lyzačního pufru. Roztoky bakterií s exprimovaným proteinem byly následně přemístěny do plastových 50 ml zkumavek s víčkem a zmrazeny při teplotě – 80 °C. Takto nízká teplota narušuje soudržnost bakteriálních buněčných stěn a usnadňuje tak následný lyzační proces.

Před rozbíjením buněk pomocí ultrazvuku byly roztoky s bakteriemi rozmrazeny, přelity do skleněné tlustostěnné kádinky a bylo k nim přidáno 10 mg lysozymu (výsledná koncentrace byla přibližně 100 µg ml⁻¹). Tento enzym štěpí peptidoglykany bakteriální buněčné stěny. Inkubace probíhala za stálého míchání, po dobu 30 min, při teplotě 4 °C. K bakteriím obsahujícím proteiny Nth1 byla současně s lysozymem přidána rozpuštěná tableta inhibitoru proteas (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free, Sigma-Aldrich, USA).

Tabulka 5.13: Složení lyzačního pufru a 10× koncentrovaného PBS pufru.

Lyzační pufr		10× koncentrovaný PBS pufr	
Chemikálie	Výsledná koncentrace	Chemikálie	Výsledná koncentrace
10× PBS	1× PBS	KCl	27 mM
NaCl	1 M	NaCl	1,4 M
imidazol	2 mM	Na ₂ HPO ₄	50 mM
β-merkapt ethanol	4 mM	KH ₂ PO ₄	18 mM

5.2.5 Sonikace bakterií

Rozrušení buněčných obalů bakterií bylo dokončeno pomocí tzv. sonikace, při které byly bakteriální buňky vystaveny působení ultrazvuku. Krátce před sonikací byl k bakteriím získaným ze tří litrů LB média přidán 1 ml 0,1 M roztoku PMSF (výsledná koncentrace byla přibližně 1 mM), který inhibuje serinové proteasy. Následně byla kádinka s roztokem bakterií umístěna do nádoby s ledem a spolu s ní do skříňky sonikátoru. Celkový čas působení

ultrazvuku na takto připravený roztok bakterií byl přibližně 20 min při výkonu 57 W. Bakterie obsahující exprimované proteiny Nth1 byly vystaveny ultrazvuku s pulzy trvajících 3 s a 17 s pauzami. Bakterie obsahující stabilnější proteiny Bmh1 byly sonikovány po dobu 10 s a prodlevy trvaly 20 s. Sonikační proces trval do doby, než roztok získal našedlou barvu a stal se méně viskózní.

Zbytky rozbitých buněk byly z roztoku obsahujícího homogenizovaný protein odstraněny pomocí centrifugace při 13 500 ot./min a teplotě 4 °C po dobu 40 min. Výsledný supernatant obsahující rozpustný protein byl dále zpracováván niklovou chelatační chromatografií.

5.2.6 Niklová chelatační chromatografie

Všechny zkoumané proteiny byly exprimovány jako fúzní proteiny obsahující na svém N-konci odštěpitelnou histidinovou kotvu (6× His). Tato kotva umožnila využití niklové chelatační chromatografie. Při této metodě byl čištěný fúzní protein zachycen pomocí koordinační vazby s kationty Ni^{2+} , které byly chelatované na náplni kolony. Zachycený protein byl následně přečištěn a eluován gradientem imidazolu, který má schopnost fúzní protein z kolony vytěsnit.

Nejdříve bylo nutné naplnit kolonu přibližně 4 ml sepharosy uložené ve 20% (v/v) ethanolu (Chelating Sepharose™ Fast Flow, GE Healthcare, USA). Pomocí peristaltické pumpy byl z kolony odstraněn ethanol a za průtoku 5 ml min^{-1} byla kolona promyta následujícími roztoky:

- 15 ml destilovaná voda
- 15 ml roztok Stripp (0,5 M NaCl a 0,1 M EDTA)
- 20 ml destilovaná voda
- 50 ml 0,1 M NiSO_4
- 15 ml destilovaná voda
- 20 ml pufr E (složení viz tabulka 5.14, str. 53)

Po promytí kolony pufr E byla hladina tohoto pufru zastavena těsně nad koncem náplně kolony a kolona uzavřena víčkem. Pomocí Pasteurovy pipety bylo do kolony přendáno asi 10 ml sonikátu obsahujícího purifikovaný protein a promícháno s náplní. Celý obsah kolony byl následně přemístěn do kádinky se sonikátem a za stálého míchání inkubován po dobu 30 min při teplotě 4 °C.

V následujícím kroku byl protein zachycený na náplni kolony promýván 400 ml 10% (v/v) roztoku pufru F v pufru E (složení viz tabulka 5.14, str. 53). Promývání bylo prováděno ve dvou 45ml plastových zkumavkách s víčkem pomocí centrifugace při 1600 ot./min a teplotě 4 °C vždy po dobu 1 min. V prvních dvou centrifugacích byla oddělena náplň kolony

s navázanými proteiny od supernatantu, který obsahoval nečistoty rozpuštěné v lyzačním pufru. Supernatant byl opatrně odlit do odpadu. Peleta byla vždy znovu resuspendována přibližně 30 ml 10% (v/v) pufru F. Při tomto procesu došlo k oddělení slaběji, nespecificky navázaných bílkovin od cílového proteinu. Posledních několik desítek mililitrů 10% (v/v) pufru F bylo použito na přemístění náplně s navázaným fúzním proteinem zpět do kolony. Po odčerpání přebytku 10% (v/v) pufru F byla peristaltická pumpa zastavena, tak aby hladina pufru končila těsně nad začátkem náplně kolony s navázaným proteinem. Vývod kolony byl následně uzavřen víčkem.

Eluce přečištěného proteinu byla provedena gravitačně pomocí pufru F (složení viz tabulka 5.14). Jednotlivé frakce byly sbírány do plastových mikrozkušavek umístěných v nádobě s ledem. Z každé frakce byl následně odebrán 15 µl vzorek pro vertikální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (viz následující kapitola 5.2.7). Regenerace kolony byla provedena promytím 30 ml roztoku Stripp (0,5 M NaCl a 0,1 M EDTA), 20 ml destilované vody a 20 ml 20% (v/v) ethanolu a kolona byla uskladněna při teplotě 4 °C.

Tabulka 5.14: Složení pufru E a pufru F pro niklovou chelatační chromatografii.

Pufř E		Pufř F (pH = 8)	
Chemikálie	Výsledná koncentrace	Chemikálie	Výsledná koncentrace
10× PBS	1× PBS	10× PBS	1× PBS
NaCl	0,5 M	NaCl	0,5 M
imidazol	1 mM	imidazol	600 mM
β-merkapt ethanol	2 mM	β-merkapt ethanol	2 mM

5.2.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Přítomnost a čistota vyráběných proteinů byla ověřována pomocí vertikální elektroforézy v 10% (v/v), 12% (v/v) nebo 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu v přítomnosti denaturačního prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). SDS zaručuje, že proteiny separované na gelu mají stejný záporný náboj a dělí se pouze na základě velikosti svých molekul. Molekuly proteinů se pohybují směrem od katody k anodě. Rychlost větších molekul je při této elektromigrační metodě nižší než rychlost menších molekul. Před samotnou elektroforézou bylo nutné nejdříve zpolymerovat polyakrylamidové gely. Separační gel byl připraven podle tabulky 5.15 (viz str. 54) a nalit mezi předem připravená utěsněná skla. Vyrovnaní hladiny gelu bylo provedeno pomocí isopropanolu, který byl nalit na ještě nezpolymerovaný gel. Po ztuhnutí separačního gelu byl isopropanol odstraněn a místo něj byl nalit zaváděcí gel (složení viz

tabulka 5.16). Do tohoto vrchního gelu byl ihned vložen hřebínek, který v gelu vytvořil deset jamek. Po ztuhnutí zaváděcího gelu byla skla s gelem umístěna do speciálního držáku a s ním do elektroforetické nádoby.

Z jednotlivých frakcí získaných např. niklovou chelatační chromatografií byly odebrány 15 μ l vzorky a k nim přidáno 5 μ l 5 \times koncentrovaného vzorkovacího pufru (složení viz tabulka 5.19, str. 55). Vzorky Bmh1 musely být ředěny destilovanou vodou, protože obsahovaly příliš vysoké koncentrace proteinů. 20 μ l vzorky byly před nadávkováním do gelu vařeny v plastových mikrozkuřkách po dobu cca 3 min. Pro určení velikostí proteinů rozdělovaných na gelu byl použit proteinový standard (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad, USA). Elektroforéza probíhala v prostředí 1 \times koncentrovaným SDS pufru (složení viz tabulka 5.17, str. 55). Před spuštěním metody byl vyjmut hřebínek a do jamek bylo pomocí automatické pipety nadávkováno 10 μ l standardu a po 20 μ l jednotlivých vzorků. Poté byla elektroforetická nádoba uzavřena víkem a připojena ke zdroji napětí, které bylo prvních 10 min 95 V, a poté elektroforéza probíhala cca 1 h při 195 V. Po vypnutí byla skla rozdělena a gel přendán do jedolitrové kádinky. Následně byl gel obarven barvicím roztokem (složení viz tabulka 5.20, str. 55) s modrým barvivem Coomassie Brilliant Blue R 250 po dobu cca 30 min a pro následnou vizualizaci proteinů odbarvován přes noc v odbarvovacím roztoku (složení viz tabulka 5.20, str. 55).

Tabulka 5.15: Složení 10% (v/v), 12% (v/v) a 15% (v/v) polyakrylamidového separačního gelu pro SDS-PGE.

Chemikálie	10%	12%	15%
	separační gel	separační gel	separační gel
	Množství	Množství	Množství
pufr pro separační gel	2 ml	2 ml	2 ml
akrylamid/bisakrylamid	2,5 ml	3 ml	3,75 ml
10% peroxodisíran amonný	75 μ l	75 μ l	75 μ l
TEMED	8 μ l	8 μ l	8 μ l
destilovaná voda	3 ml	2,6 ml	1,75 ml

Tabulka 5.16: Složení 4% (v/v) polyakrylamidového zaváděcího gelu.

Chemikálie	Množství
pufr pro zaváděcí gel	1 ml
akrylamid/bis-akrylamid	0,5 ml
10% (w/v) peroxodisíran amonný	75 μ l
TEMED	8 μ l
destilovaná voda	2,25 ml

Tabulka 5.17: Složení akrylamidu/bisakrylamidu a 10× koncentrovaného pufru pro SDS-PAGE.

Akrylamid/bisakrylamid		10× koncentrovaný pufr pro SDS-PAGE	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
akrylamid	29,2 g	Tris	30 g
bis-akrylamid	0,8 g	glycin	144 g
–	–	SDS	10 g
destilovaná voda	doplnění do 100 ml	destilovaná voda	doplnění do 1 l

Tabulka 5.18: Složení 100 ml pufru pro zaváděcí polyakrylamidový gel a pro separační polyakrylamidový gel.

Pufr pro separační gel		Pufr pro zaváděcí gel	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
2 M Tris-HCl (pH = 8,8)	75 ml	1 M Tris-HCl (pH = 6,8)	50 ml
10% (w/v) SDS	4 ml	10% (w/v) SDS	4 ml
destilovaná voda	21 ml	destilovaná voda	46 ml

Tabulka 5.19: Složení 5× koncentrovaného pufru pro přípravu vzorků pro SDS-PAGE.

Chemikálie	Množství
1 M Tris-HCl (pH = 6,8)	600 µl
50% (w/v) glycerol	5 ml
10% (w/v) SDS	2 ml
β-merkapt ethanol	500 µl
1% (w/v) bromfenolová modř	1 ml
destilovaná voda	900 µl

Tabulka 5.20: Složení 1 l barvicího a odbarvovacího roztoku na gely z SDS-PAGE.

Chemikálie	Barvicí roztok	Odbarvovací roztok
	Množství	Množství
Coomassie Brilliant Blue R250	1 g	–
methanol	450 ml	100 ml
kyselina octová	100 ml	100 ml
destilovaná voda	450 ml	800 ml

5.2.8 Dialýza

Dialýza je proces, při kterém dochází k přechodu chemických látek přes semipermeabilní membránu z prostředí s vyšší koncentrací těchto látek do prostředí s koncentrací nižší. Rozhodující je velikost pórů dialyzační membrány, která nesmí umožnit průchod dialyzovaných bílkovin do dialyzačního roztoku.

Na základě výsledků získaných SDS-PAGE byly frakce obsahující největší podíl požadovaného proteinu sloučeny a byla jimi naplněna polopropustná dialyzační membrána z regenerované celulózy (Spectra/Por 4, MWCO 12 – 14 kDa, Spectrum Laboratories, USA), nepropustná pro částice větší než 14 kDa. Membrána byla vložena do jednoho litru vychlazeného dialyzačního pufru (složení viz tabulka 5.21). Dialýza probíhala za stálého míchání při teplotě 4 °C buď přes noc, nebo pouze 5 h a poté byla dialyzační membrána s proteinem předána do pufru E pro iontově výměnnou chromatografii (složení viz tabulka 5.22), ve které dialýza probíhala do druhého dne.

Tabulka 5.21: Složení pufrů pro dialýzu bezprostředně následující po niklové chelatační chromatografii.

Názvy fúzních proteinů	Složení dialyzačního pufru
Nth1 WT a mutantní formy	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 5 mM EDTA, 2 mM β -merkapt ethanol, 10% (w/v) glycerol
Nth1 100-751 a 153-751	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM β -merkapt ethanol, 10% (w/v) glycerol
Bmh1 WT a Δ C M237Stop	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 5 mM EDTA, 2 mM β -merkapt ethanol, 10% (w/v) glycerol

Tabulka 5.22: Složení pufrů E pro dialýzu Nth1 WT a jeho mutantních forem před kationtově výměnnou chromatografií a pro dialýzu Bmh1 WT a Δ C M237Stop před aniontově výměnnou chromatografií.

Názvy fúzních proteinů	Složení pufru E pro iontově výměnnou chromatografií
Nth1 WT a mutantní formy	50 mM kyselina citronová (pH = 6,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% (w/v) glycerol
Bmh1 WT a Δ C M237Stop	50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% (w/v) glycerol

5.2.9 Thrombinové štěpení

Pro přípravu proteinového komplexu pNth1 WT:Bmh1 Δ C M237Stop a jeho následnou krystalizaci, bylo nutné z obou proteinů nejdříve odstranit jejich N-koncové části obsahující mj. histidinovou kotvu.

Pro odštěpení N-koncové části fúzního proteinu Bmh1 Δ C M237Stop byl použit thrombin získaný z lidského séra (Sigma-Aldrich, USA). Lyofilizovaný thrombin se nejdříve rozpustil v 1 ml sterilní destilované vody. Vznikl tak roztok obsahující 1 U enzymu v 1 μ l. Pro odštěpení N-terminální části proteinu Bmh1 Δ C M237Stop bylo přidáno 5 U thrombinu na 1 mg tohoto proteinu. Štěpení probíhalo v dialýze přes noc při teplotě 4 °C v přítomnosti stejného dialyzačního pufru, jaký je uveden v tabulce 5.21 (viz str. 56), ale který obsahoval nižší 1 mM koncentraci EDTA. Úspěšnost štěpení byla ověřena porovnáním původního vzorku obsahujícím N-koncovou část s naštěpeným vzorkem pomocí 15% SDS-PAGE. Thrombin byl ze vzorků odstraněn promytím přes benzamidinovou kolonku (Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (High Sub), GE Healthcare, Švédsko), která byla nejdříve promyta příslušným dialyzačním pufrem.

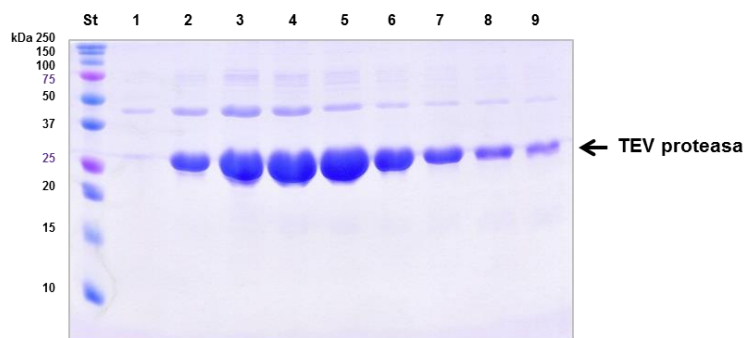
5.2.10 Štěpení TEV proteasou a její příprava

Z důvodu vysoké ceny thrombinu byly konstrukty Nth1 WT, Nth1 100–751 a Nth1 153–751 zaklonovány do plasmidu pRSFDuet-1, který umožňuje odštěpení N-koncové části proteinu pomocí TEV proteasy. Tento enzym jsme schopni v naší laboratoři snadno vyrábět ve vysoké čistotě a velkém množství podle zavedeného protokolu.

K expresi TEV proteasy byl využit zásobní glycerolový roztok buněk BL21(DE3)RIL (Agilent Technologies, USA) obsahujících zaklonovaný gen pro tento enzym. Pro zaočkování 5 ml tekutého LB média bylo použito 5 μ l tohoto roztoku, ampicilin o výsledné koncentraci 100 μ g ml⁻¹ a chloramfenikol o výsledné koncentraci 34 μ g ml⁻¹. Kultivace probíhala přes noc při teplotě 37 °C a 180 ot./min. Druhý den byla narostlá bakteriální kultura přelita do skleněné báně obsahující 1 l LB média s příslušnými antibiotiky. Kultivace, indukce exprese, exprese, centrifugace a resuspendace buněk probíhala stejně, jako bylo popsáno v kapitolách 5.2.3 a 5.2.4 (viz str. 50 a 51).

Resuspendované bakterie byly zmrazeny v lyzačním pufru (1 \times PBS, 1M NaCl, 4 mM β -merkaptoethanol, 2 mM imidazol) při teplotě –80 °C. Následně byly bakterie rozmrazeny a inkubovány s 10 mg lysozymu za stálého míchání při teplotě 4 °C po dobu 30 min. Při navazující sonikaci působil ultrazvuk po dobu 15 s, pak byl vždy na 45 s vypnut a celý proces se několikrát opakoval. Celková doba působení ultrazvuku byla 15 min. Zbytky

rozbitých buněk byly z roztoku obsahujícího TEV proteasu odstraněny pomocí centrifugace při 13 500 ot./min a teplotě 4 °C po dobu 40 min. Poté následovala niklová chelatační chromatografie, která byla provedena stejně jako v kapitole 5.2.6 (viz str. 52). Čistota eluovaných frakcí byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE (viz obrázek 5.3). Frakce 2 až 9 byly sloučeny a umístěny do polopropustné dialyzační membrány z regenerované celulózy (Spectra/Por 4, MWCO 12 – 14 kDa, Spectrum Laboratories, USA) a dialyzovány proti pufru obsahujícímu 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 1 mM EDTA, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol při teplotě 4 °C přes noc.



Obrázek 5.3: 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí obsahujících TEV proteasu (2 až 9) eluovaných při niklové chelatační chromatografii.

Po dialýze byl roztok TEV proteasy vyndán z dialyzační membrány a přefiltrován přes filtr SPARTAN 13/0,45 RC (WhatmanTM, GE Healthcare, Německo). Následně byla změřena proteinová koncentrace proti dialyzačnímu pufru (postup viz kapitola 5.2.14 str. 61). TEV proteasa byla výsledně naředěna tak, aby její zásobní roztok vykazoval absorbanci při 280 nm rovnou přibližně jedna. Takto naředěný roztok obsahoval TEV proteasu o koncentraci cca 0,8 mg ml⁻¹. Podle aktivit komerčně vyráběných TEV proteas 1 U by měla odpovídat 0,1 µg. Z toho plyne, že 1 µl takto připraveného zásobního roztoku TEV proteasy obsahoval přibližně 8 U. Zásobní roztoky TEV proteasy byly skladovány v 1,5 ml mikrozkuvkách při teplotě – 80 °C.

Štěpení proteinů Nth1 (WT z plasmidu pRSF-Duet-1, 153–751 a 100–751) bylo prováděno současně s dialýzou následující bezprostředně po niklové chelatační chromatografii (viz kapitola 5.2.8, str. 56). Na jeden mg proteinu Nth1 bylo do dialyzační membrány přidáno cca 250 U TEV proteasy. Štěpení probíhalo přes noc při teplotě 4 °C.

5.2.11 Iontově výměnná chromatografie

Pro zvýšení čistoty vzorků Nth1 WT a jejích mutantních forem byla do purifikačního procesu zavedena kationtově výměnná chromatografie. Při této metodě bylo využíváno toho, že izoelektrický bod bílkoviny (pI) Nth1 WT má hodnotu 6,8 a po případném odštěpení N-terminálního konce obsahujícího histidinovou kotvu hodnotu $pI = 7,69$. Nth1 předialyzovaná do pufru E s $pH = 6$ (viz tabulka 5.22, str. 56) nesla celkový kladný náboj, protože její pI bylo větší než pH pufru. Díky tomu byla Nth1 zachycena v koloně o objemu 1 ml naplněné Sepharosou MonoS (Amersham, Bioscience, Švédsko). Metoda kationtově výměnné chromatografie byla prováděna na přístroji FPLC-AKTA (Amersham Biosciences, Švédsko). Výstupní data byla zaznamenávána pomocí programu Unicorn 5.01. Po celou dobu metody byl průtok mobilní fáze (pufr E) udržován na 1 ml min^{-1} . Maximální možný objem dávkovací smyčky byly 2 ml, proto bylo nutné udělat několik nástřiků, než se všechn protein dostal na kolonu. Eluce přečištěné Nth1 byla prováděna gradientem od 0 M do 1 M NaCl (0 – 100 %), pomocí pufru F pro kationtovou výměnu. Tento pufr měl stejné složení jako pufr E, ale lišil se přítomností 1 M NaCl. 15 μl vzorky odebrané z jednotlivých 1,5 ml frakcí eluovaných při kationtově výměnné chromatografii byly následně analyzovány pomocí 10% nebo 12% SDS-PAGE (viz kapitola 5.2.7, str. 53).

Analogický proces separace proteinů Bmh1 WT a $\Delta\text{C M237Stop}$ od příměsí dalších bílkovin byl prováděn pomocí aniontově výměnné chromatografie. Při této metodě se používá 1 ml kolona naplněná Sepharosou MonoQ (Amersham, Bioscience Švédsko). Izoelektrický bod proteinů Bmh1 WT má hodnotu 5,25 a Bmh1 $\Delta\text{C M237Stop}$ po odštěpení N-konce s histidinovou kotvou má $pI = 4,98$. Díky tomu proteiny Bmh1 získaly celkový záporný náboj po dialýze v pufru E pro aniontově výměnnou chromatografii o $pH = 8$ (složení viz tabulka 5.22, str. 56). Po nadávkování na kolonu byly proteiny Bmh1 zachyceny na Sepharose MonoQ a následně eluovány gradientem od 0 M do 1 M NaCl (0 – 100 %) pomocí pufru F pro aniontově výměnnou chromatografii. Pufr F měl stejné složení jako pufr E, ale obsahoval navíc 1 M NaCl. 10 μl vzorky odebrané z jednotlivých 1,5 ml frakcí eluovaných při kationtově výměnné chromatografii byly následně analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE (viz kapitola 5.2.7, str. 53).

5.2.12 Koncentrování a filtrování proteinů

Před gelovou permeační chromatografií a často i po ní bylo nutné roztok příslušného proteinu zakoncentrovat z důvodu zmenšení objemu nebo zvýšení proteinové koncentrace. Koncentrování vzorků bylo prováděno v plastových koncentrátorech s různými objemy a

propustností. Pro proteiny Nth1 byly používány koncentrátoři Amicon® Ultra, 30 kDa (Millipore, USA) s propustností částic s hmotností do 30 kDa. Pro proteiny Bmh1 a komplex pNth1:Bmh1 byly použity koncentrátoři Amicon® Ultra, 10 kDa (Millipore, USA), jejichž póry propouští molekuly s relativní molekulovou hmotností menší než 10 kDa. Zakoncentrování roztoku proteinů probíhalo při 3 000 ot./min a teplotě 4 °C. V případě proteinu Nth1 153–751 byly otáčky sniženy na 2 500 ot./min. Při skladování byly koncentrátoři naplněny 0,05% (w/v) azidem sodným.

Před iontově výměnnou a gelovou permeační chromatografií bylo nutné vzorky přefiltrovat přes filtr SPARTAN 13/0,45 RC (Whatman™, GE Healthcare, Německo).

5.2.13 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla posledním stupněm celého purifikačního procesu všech zkoumaných proteinů. Princip této metody spočívá rozdělování proteinů v náplni kolony na základě velikosti jejich molekul. Nejméně zpožděvané byly molekuly největších proteinů, které se nevešly do pórů náplně kolony. Naproti tomu menší molekuly mohly do těchto pórů pronikat a byly tímto procesem zpožděvány a děleny od větších molekul.

Při gelové permeační chromatografii byl za pomoci přístroje FPLC-AKTA (Amersham Biosciences, Švédsko) nadávkován čištěný proteinový vzorek na kolonu Superdex™ 200 10/300 GL (proteiny Nth1; GE Healthcare, Švédsko) nebo na kolonu Superdex™ 75 10/300 GL (proteiny Bmh1; GE Healthcare, Švédsko). V případě finální purifikace větších množství proteinů určených pro krystalografii byla použita kolona Hiload 26/60 Superdex™ 200 pg (GE Healthcare, Švédsko) pro proteiny Nth1 nebo Hiload 26/60 Superdex™ 75 pg (GE Healthcare, Švédsko) pro proteiny Bmh1. Výstupní data byla zaznamenávána pomocí programu Unicorn 5.01. Jako mobilní fáze byly použity přefiltrované pufrы uvedené v tabulce 5.23 (viz str. 61).

Před spuštěním metody byl celý FPLC přístroj odvzdušněn a promyt přefiltrovanou destilovanou vodou. Následně byla připojena kolona a při průtoku 0,5 ml min⁻¹ promyta purifikačním pufrém. Přefiltrovaný vzorek s maximálním objemem 2 ml byl pomocí injekční stříkačky s jehlou nadávkován do dávkovací smyčky FPLC. Poté byl spuštěn příslušný program, který zaručil nástřik vzorku do systému a automatické sbírání jednotlivých frakcí o objemu 0,5 ml. Separace jednotlivých proteinů probíhala za průtoku 0,5 ml min⁻¹. Průtok mobilní fáze v případě kolony Hiload 26/60 Superdex™ 200 byl 2 ml min⁻¹ a byly sbírány frakce o objemu 1,5 ml.

Čistota a velikost proteinů obsažených v jednotlivých frakcích získaných gelovou permeační chromatografií byla ověřena pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 5.2.7, str. 53).

Tabulka 5.23: Složení pufrů pro gelovou permeační chromatografií.

Názvy fúzních proteinů	Složení pufrů pro gelovou permeační chromatografií
Nth1 WT a mutantní formy	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 10% (w/v) glycerol
Nth1 100–751	1 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol
Nth1 153–751	1 mM octan amonný (pH = 7,3), 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol
Bmh1 WT a Δ C M237Stop	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol

5.2.14 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace jednotlivých proteinů byla stanovována pomocí měření absorbance (A) těchto vzorků při vlnové délce 280 nm. Byly používány křemenné kyvety s optickou dráhou dlouhou (l) 1 cm a UV-Vis absorpční spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA). Ke kalibraci přístroje byl používán vždy pufr stejného složení, jaké obsahovaly vzorky měřených proteinů. Molární extinkční koeficient (ϵ) pro jednotlivé proteiny byl vypočten na základě obsahu aromatických aminokyselin pomocí nástroje ProtParam (<http://www.expasy.org>). Seznam molárních extinkčních koeficientů pro jednotlivé proteiny a proteinové komplexy je uveden v tabulce 5.24 (viz str. 62). Výsledná molární koncentrace (c) byla vypočtena podle rovnice (1).

$$A = \epsilon l c \quad (1)$$

5.2.15 Fosforylace proteinu Nth1

Proteiny Nth1, které byly purifikovány pro tvorbu komplexů s proteiny Bmh1, bylo nutné fosforylovat pomocí cAMP-dependentní proteinkinasy (PKA, Promega, USA). Fosforylace probíhala v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM DTT a 10% (w/v) glycerol buď po kationtové výměnné chromatografii, nebo po konečné gelové permeační chromatografii.

Před samotnou fosforylací byla nejdříve určena koncentrace fosforylovaného proteinu (viz předchozí kapitola 5.2.14) a poté vypočítána jeho hmotnost. Pro fosforylací byl použit 50 mM zásobní roztok ATP, přičemž výsledná koncentrace ATP v roztoku proteinu byla 0,75 mM. Dále byl k určenému objemu roztoku proteinu přidán 1 M $MgCl_2$ tak, že jeho výsledná koncentrace byla 20 mM. Jako poslední byla k proteinu přidána komerčně vyráběná PKA

v poměru 80 U na 1 mg fosforylovaného proteinu (výrobce uvádí aktivitu PKA v jednotkách U μl^{-1}). Fosforylace probíhala po dobu 2 h při 30 °C a následně přes noc při teplotě 4 °C.

Tabulka 5.24: Seznam molárních extinkčních koeficientů, relativních molekulových hmotností a počtů aminokyselinových zbytků všech použitých proteinů *Bmh1*, *Nth1* a jejich komplexů.

Název proteinu	Molární extinkční koeficient při 280 nm ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Relativní molekulová hmotnost (Da)	Počet aminokyselinových zbytků
Nth1 WT a mutantní formy s histidinovou a thioredoxinovou kotvou	1,422	100 219	885
Nth1 WT bez histidinové a thioredoxinové kotvy	1,490	86 296	756
Nth1 WT s histidinovou kotvou a proteinem GB_1	1,483	94 438	827
Nth1 WT bez histidinové kotvy a proteinu GB_1	1,492	86 196	755
Nth1 153–751 bez histidinové kotvy a proteinu GB_1	1,711	69 034	603
Nth1 100–751 bez histidinové kotvy a proteinu GB_1	1,655	74 976	656
Bmh1 WT s histidinovou kotvou	0,892	32 386	288
Bmh1 WT bez histidinové kotvy	0,944	30 589	271
Bmh1 ΔC M237Stop s histidinovou kotvou	0,995	29 014	257
Bmh1 ΔC M237Stop bez histidinové kotvy	1,064	27 131	240
komplex pNth1:Bmh1 WT s thioredoxinovou a s histidinovými kotvami	1,214	164 991	1461
komplex pNth1:Bmh1 ΔC M237Stop bez proteinu GB_1 a bez histidinových kotev	1,327	140 458	1235

5.3 Molekulární modelování

Trojrozměrný model katalytické domény Nth1 (sekvence 295–721) byl vytvořen pomocí programu DeepView v4.0.4, na severu SWISS-MODEL (Schwede et al. 2003; Arnold et al. 2006). Jako předloha pro tento model byla použita krystalová struktura katalytické domény neutrální trehalasy Tre37A z *E. coli* (PDB kód 2JF4, sekvence 145–533) (Gibson et al. 2007). Sekvenční identita katalytické domény Nth1 s trehalasou Tre37A je 27 % a sekvenční podobnost 42 %. Konečný model byl ověřen pomocí programu PROCHECK a nežádoucí kontakty byly opraveny manuálně pomocí programu Coot (Emsley et al. 2010).

Trojrozměrný model proteinu Bmh1 (sekvence 4–236) byl vytvořen stejným postupem jako model katalytické domény Nth1. Jako předlohy byly použity známé krystalové struktury různých isoform proteinů 14-3-3. PDB kódy těchto struktur jsou: 1A4O (Liu et al. 1995), 1YZ5 (Benzinger et al. 2005), 2B05, 2BTP, 2C63 a 2BR9 (Yang et al. 2006).

Správnost obou modelů byla následně ověřena pomocí vzdáleností získaných z chemického zesílení využívajícím homobifunkční síťovací činidla DSS a DSG (viz kapitola 6.2.10 str. 111).

5.4 Biofyzikální charakterizace

Pro objasnění molekulárního mechanismu a strukturní podstaty regulace aktivity Nth1 prostřednictvím vazby kationtů Ca^{2+} a/nebo proteinu Bmh1 bylo využito široké spektrum biofyzikálních metod.

5.4.1 Stanovení enzymové aktivity proteinů Nth1

Pro stanovení enzymové aktivity Nth1 a jejích mutantních forem byla použita komerčně vyráběná sada Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit (Invitrogen[™], Life Technologies, USA). Princip metody spočívá v určování koncentrace glukosy produkované hydrolýzou trehalosy katalyzované enzymem Nth1. Vzniklá D-glukosa je pomocí glukosaoxidasy přeměněna na D-glukonolakton za vzniku peroxidu vodíku, který je následně využit křenovou peroxidasou pro reakci s činidlem Amplex[®] Red. Výsledkem těchto spřažených enzymových reakcí je červeně zbarvený resorufin, který je detekován při vlnové délce 571 nm.

Před samotným měřením byly všechny testované proteiny zbaveny redukčních činidel (DTT nebo β -merkptoethanol) pomocí dialýzy proti pufru, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 10% (w/v) glycerol. Objem dialyzačního pufru byl dva litry a dialýza vždy probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Po dialýze byla stanovena přesná proteinová koncentrace (postup viz kapitola 5.2.14, str. 61).

Zásobní roztok činidla Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase byl připraven dle návodu výrobce. Pro měření byla použita časově omezená hydrolýza trehalosy pomocí Nth1, při které vždy stejné množství enzymu katalyzovalo štěpení stejného množství trehalosy. Nejdříve byly do plastových mikrozkušavek připraveny vzorky proteinů o objemu 40 μ l. Každý takovýto vzorek obsahoval pNth1 WT nebo její mutantní formu o výsledné koncentraci 100 nM. Dále vzorky obsahovaly kationty Ca^{2+} nebo kationty Mg^{2+} (výsledné koncentrace 10 mM) a/nebo 15 μ M protein Bmh1. Pro snížení možného vlivu kontaminace kationty Ca^{2+} byla ke vzorkům přidávána EDTA nebo EGTA o výsledné koncentraci 1 mM. Před reakcí byly vzorky inkubovány pět minut ve vodní lázni předehřáté na 30 °C. Enzymová reakce byla zahájena přidáním 10 μ l 150 mM trehalosy a probíhala po dobu 30 s při 30 °C (inkubace ve vodní lázni za stálého míchání). Po uplynutí reakčního času byla hydrolýza trehalosy zastavena povařením vzorku po dobu minimálně tří minut (zastavení reakce denaturací enzymu). Stejný postup se opakoval s kontrolním vzorkem, který neobsahoval trehalosu i s dalšími vzorky. Po povaření byly všechny vzorky umístěny do nádoby s ledem.

Pro stanovení glukosy bylo ke každému vzorku (i k vzorkům kontrolním a kalibračním viz následující odstavec) přidáno 50 μ l činidla Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase a vzorky byly následně 40 min inkubovány v termobloku při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky přendány na led a byla změřena jejich absorbance při 571 nm proti vzorkům obsahujícím nulovou koncentraci trehalosy.

Při každém měření s roztokem činidla Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase byla naměřena nová kalibrační křivka pro stanovení vzniklé glukosy. Každá takováto křivka obsahovala šest bodů s postupně se zvyšující koncentrací glukosy (0 μ M, 24 μ M, 56 μ M, 80 μ M, 120 μ M a 160 μ M). Absorbance byla měřena při 571 nm proti vzorku s nulovou koncentrací glukosy. Specifická aktivita enzymu pNth1 byla stanovena a vyjádřena jako látkové množství glukosy vyprodukované za 1 min jedním miligramem proteinu ($\mu\text{mol Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

5.4.2 Analýza proteinů pNth1 D114L a D125L pomocí MS

Pro ověření přítomnosti jednobodových mutací D114L a D125L v aminokyselinové sekvenci Nth1 a úspěšnosti fosforylace těchto dvou mutantních proteinů byla provedena analýza pomocí LCMS/MS systému, stejného jaký byl použit pro měření H/D výměny spojené s MS (viz kapitola 5.4.7, str. 70). Pro experimenty byly použity proteiny o výsledném látkovém množství 300 pmol. Měření a vyhodnocení výsledků bylo provedeno RNDr. Petrem Manem, PhD. v laboratoři Strukturní biologie a buněčné signalizace na Mikrobiologickém ústavu

AV ČR, v.v.i. Bylo prokázáno, že obě mutantní formy Nth1 obsahují příslušné mutace (D114L nebo D125L) a že přítomnost mutací nebrání fosforylaci ani nesnižuje její úroveň.

5.4.3 Nativní TBE elektroforéza

Schopnost fosforylovaných proteinů pNth1 a jejich mutantních forem vázat se na proteiny Bmh1 byla ověřována pomocí nativní TBE elektroforézy.

Pro tuto metodu byl nejdříve vyroben 12% (v/v) polyakrylamidový gel (viz tabulka 5.25). Složení 10× koncentrovaného TBE pufru a složení vzorkovacího pufru je uvedeno v tabulce 5.26. Nezpolymerovaný gel byl nalit mezi dvě skla umístěná a utěsněná pomocí svorek ve speciálním stojánku. Do vrchní části gelu byl umístěn plastový hřebínek, který v gelu po vyjmutí vytvořil deset jamek.

Tabulka 5.25: Složení 12% (v/v) polyakrylamidového gelu.

Chemikálie	Množství
akrylamid/bisakrylamid	4 ml
10× TBE pufr	1 ml
10% (w/v) persulfát amonný	75 μ l
TEMED	8 μ l
destilovaná voda	4,95 ml

Tabulka 5.26: Složení 10× koncentrovaného TBE pufru a složení vzorkovacího pufru.

10× koncentrovaný TBE pufr		Vzorkovací pufr	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Tris	54 g	10× TBE pufr	1 ml
kyselina boritá	27,5 g	1% bromfenolová modř	1 ml
0,5 M EDTA (pH = 8,0)	20 ml	glycerol	3 ml
destilovaná voda	doplnění do 500 ml	destilovaná voda	5 ml

Vzorky pro nativní elektroforézu byly připravovány o objemu 30 μ l. K těmto vzorkům bylo po přibližně dvacetiminutové inkubaci přidáno 5 μ l vzorkovacího pufru (složení viz tabulka 5.26). Při ověřování vazby proteinů Bmh1 na proteiny Nth1 byl do první jamky umístěn vzorek proteinu Bmh1, do druhé nefosforylovaný vzorek Nth1, do třetí směs proteinů Bmh1 a Nth1, do čtvrté vzorek fosforylované pNth1 a do poslední jamky byl umístěn proteinový komplex pNth1:Bmh1. V případě ověřování schopnosti fosforylovaných mutantních forem pNth1 vázat proteiny Bmh1 bylo pořadí vzorků následující: první vzorek vždy obsahoval samotný protein Bmh1, druhý vzorek samotnou pNth1 WT a do následujících jamek byly umístěny komplexy

proteinů Bmh1 s pNth1 WT nebo jejími mutantními formami. Jednotlivé komplexy byly připravovány tak, aby výsledný molární poměr byl vždy 1:2 (pNth1:Bmh1). Vzorke obsahovaly přibližně 30 pmol pNth1 a 60 pmol Bmh1.

Elektroforéza vzorků probíhala po 3,5 h při napětí 150 V, buď při teplotě 4 °C, nebo byla elektroforetická nádoba umístěna v nádobě s ledem. Po skončení metody byl gel obarven a odbarven stejně jako bylo popsáno v kapitole 5.2.7 (viz str. 53).

5.4.4 Analytická ultracentrifugace

Analytická ultracentrifugace (AUC) je univerzálním nástrojem pro studium proteinů a proteinových komplexů. Sledování sedimentace proteinových makromolekul v centrifugačním poli umožňuje jejich hydrodynamickou a termodynamickou charakterizaci v příslušném roztoku. Sedimentační analýza a stanovení sedimentačních koeficientů slouží k určení hydrodynamického tvaru proteinů a proteinových komplexů, identifikaci případných oligomerních stavů a stanovení stechiometrie heterogenních interakcí (Lebowitz et al. 2002).

Metody AUC byly využity k ověření schopnosti pNth1 WT a jejích mutantních forem vázat proteiny Bmh1. Stejnou technikou byl stanoven také asociační vazebný poměr pNth1:Bmh1 v přítomnosti kationtů Ca^{2+} . Měření byla provedena RNDr. Lenkou Řežábkovou, Ph.D. a Mgr. Daliborem Koškem z týmu prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. na Přírodovědecké Fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

Pro sedimentační analýzu byla použita analytická ultracentrifuga ProteomLabTM XL-I (Beckman Coulter, USA). Měření bylo prováděno při 42 000 nebo 48 000 ot./min⁻¹ (An-50 Ti rotor, Beckman Coulter, USA). Proteiny byly před měřením předialyzovány do pufru obsahujícího: 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 200 mM NaCl a 2 mM β -merkaptoethanol. Sedimentační analýza proteinů pNth1 WT a mutantních forem v přítomnosti proteinů Bmh1 byla prováděna v molárním poměru pNth1 : Bmh1 byl vždy 1:2.

Pro studium vlivu kationtů Ca^{2+} na vazbu proteinu Bmh1 na fosforylovanou formu enzymu pNth1 byla připravena sada vzorků s různým molárním poměrem proteinu Bmh1 a pNth1 (viz tabulka 5.28, str. 67). Koncentrace proteinu Bmh1 byly v rozmezí 0,2 až 20 μM . Koncentrace proteinu pNth1 byla udržována na konstantní úrovni (1 μM). Měření probíhalo dvakrát, jednou v přítomnosti kationtů Ca^{2+} o výsledné koncentraci 10 mM a jednou bez přítomnosti těchto kationtů.

Kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů ($c(S)$) jednotlivých vzorků byly vypočteny pomocí programů SEDFIT a SEDPHAT z hodnot absorbancí naměřených při 280 nm (Schuck 2000; Dam et al. 2005).

Tabulka 5.28: Poměry koncentrací pNth1 a Bmh1 při určování vazebné konstanty komplexu pNth1:Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} .

Číslo kyvety	Koncentrace Bmh1 (μ M)	Koncentrace pNth1 (μ M)
1	0,2	1
2	0,7	1
4	2	1
5	6	1
6	20	1

5.4.5 Cirkulární dichroismus

Metody cirkulární dichroismu (CD) lze využít pro získání informací o sekundární a terciární struktuře zkoumaných proteinů. Všechny bílkoviny jsou opticky aktivní látky, které stáčí rovinu polarizovaného světla. Lineárně polarizované světlo se skládá ze dvou složek – z levotočivé a pravotočivé složky kruhově polarizovaného světla. Při CD je měřen rozdíl v absorpci právě těchto dvou složek. Při průchodu lineárně polarizovaného světla vzorkem dochází k jeho změně na světlo elipticky polarizované. CD využívá zejména skutečnosti, že proteiny obsahují peptidové vazby absorbující světlo v oblasti od 180 do 240 nm (CD spektroskopie ve vzdálené UV oblasti) a že postranní řetězce aromatických aminokyselin absorbují v oblasti od 260 do 320 nm (CD spektroskopie v blízké UV oblasti). Měřením CD ve vzdálené UV oblasti je možné stanovit poměrné zastoupení α -helixů, β -skládaných listů a ohybů v sekundární struktuře zkoumaného proteinu. Informace o terciární struktuře měřených proteinů (tzv. fingerprint) lze získat při měření CD spekter v blízké UV oblasti. Píky pocházející od Trp se nacházejí v oblasti mezi 290 a 305 nm, v případě Tyr v oblasti mezi 275 a 282 nm a u Phe v oblasti mezi 255 a 270 nm (Kelly et al. 2005).

Vliv vazby kationtů Ca^{2+} a vazby proteinů Bmh1 na sekundární strukturu Nth1 byl zkoumán pomocí měření CD ve vzdálené UV oblasti. Ve stejné oblasti byl také ověřován vliv jednobodových mutací na sekundární strukturu proteinu Nth1. Měření v blízké UV oblasti bylo naopak použito pro určení změn terciární struktury mutantních forem pNth1 D114L a D125L v komplexu s proteiny Bmh1. Všechna měření byla prováděna Ing. Pavlínou Ullrichovou v laboratoři prof. RNDr. Marie Urbanové, CSc. na Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze.

CD spektra měřená ve vzdálené UV oblasti byla měřena v křemenné kyvetě, jejíž optická dráha byla 1 mm (Starna, USA), pomocí spektropolarimetru J-810 (Jasco, Japonsko). Podmínky měření byly následující: oblast měření spekter byla od 200 do 270 nm, rychlost skenování byla 10 nm min^{-1} , čas odezvy byl 8 s, rozlišení 1 nm, šířka pásma 1 nm a citlivost

100 mdeg (milidegree). Výsledné spektrum bylo vytvořeno z průměru pěti měření. Jednotlivá spektra byla korigována odečtením spekter samotného pufru. Měření probíhala při teplotě v místnosti (23 °C). Pro všechna měření byl použit pufr obsahující 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM β-merkaptoethanol a 10% (w/v) glycerol. Pro ověřování vlivu kationtů Ca²⁺ na sekundární strukturu Nth1 WT byl použit roztok CaCl₂ o výsledné koncentraci 10 mM a Nth1 WT o koncentraci 0,08 mg ml⁻¹. Koncentrace proteinu Bmh1 byla 0,089 mg ml⁻¹ a koncentrace fosforylované pNth1 a nefosforylované Nth1 byla 0,15 mg ml⁻¹. Koncentrace mutantních forem Nth1 se pohybovaly v rozmezí od 0,04 mg ml⁻¹ do 0,13 mg ml⁻¹. Po upravení základní křivky byla výsledná spektra vyjádřena jako průměrná reziduální elipticita (stupeň odchylky elipsy od kruhu, Q_{MRW}) v jednotkách deg cm² dmol⁻¹. K tomuto výpočtu byla použita rovnice (2),

$$[Q]_{MRW} = \frac{\theta_{obs} M_w}{c l N_R 10} \quad (2)$$

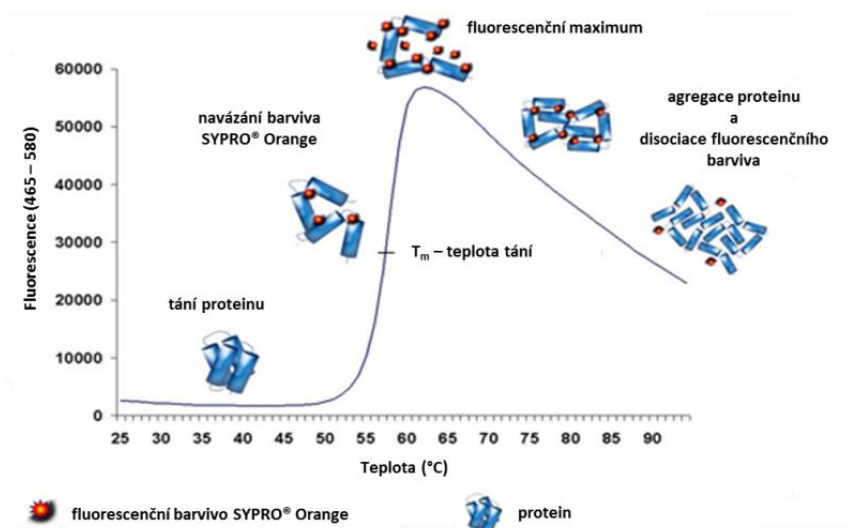
kde (θ_{obs}) značí pozorovanou elipticitu v mdeg, (c) je koncentrace proteinu v mg ml⁻¹, (l) je délka optické dráhy v cm, (M_w) je relativní molekulová hmotnost proteinu a (N_R) je počet aminokyselinových zbytků v proteinu. Obsah jednotlivých sekundárních struktur byl stanoven pomocí internetového programu dostupného z Dichroweb website (Whitmore a Wallace 2004).

CD spektra v blízké UV oblasti byla měřena v rozsahu vlnových délek 250 až 320 nm v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm (Starna, USA). Ostatní podmínky byly stejné jako při měření CD spekter ve vzdálené UV oblasti (viz předchozí odstavec). Koncentrace proteinu Bmh1 byla 0,45 mg ml⁻¹ a koncentrace pNth1 WT a mutantních forem byla 0,69 mg ml⁻¹.

5.4.6 Diferenční skenovací fluorimetrie

Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF, thermofluor) je rychlou a současně poměrně jednoduchou metodou např. pro nalezení stabilizujícího purifikačního pufru, výzkum vlivu ligandů na stabilitu proteinů nebo pro porovnání vlivu mutací na teplotní stabilitu mutantních forem určitého proteinu (Pantoliano et al. 2001; Ericsson et al. 2006; Niesen et al. 2007).

DSF využívá skutečnosti, že fluorescence barviva SYPRO[®] Orange se zvyšuje s postupnou teplotní denaturací proteinu. Při tomto procesu dochází k rozbalování a odkrývání hydrofobních částí proteinu a navazování fluorescenční barvy právě na tyto hydrofobní oblasti (viz obrázek 5.4, str. 69). Fluorescence blízká nule v přítomnosti dokonale sbaleného proteinu je zapříčiněna zhasením fluorescence SYPRO[®] Orange vodným prostředím. Teplota tání (T_m) vyjadřuje stabilitu zkoumaného proteinu v daném prostředí.



Obrázek 5.4: Princip DSF spočívá ve schopnosti hydrofobního fluorescenčního barviva SYPRO® Orange interagovat s odhalujícími se hydrofobními částmi teplotně denaturovaného proteinu. Tento proces vede k postupnému nárůstu intenzity fluorescence barviva SYPRO® Orange. Stabilita testovaného proteinu v daném prostředí se vyjadřuje pomocí teploty tání (T_m). Schéma bylo převzato a upraveno podle (http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology).

Metoda DSF byla nejdříve zavedena pro zjištění stabilizačních vlivů různých pufrů na nativní strukturu Nth1 153–751 a 100–751 za účelem vylepšení kvality vzorků Nth1 určených pro krystalizační experimenty. DSF byla měřena pomocí přístroje real-time PCR LightCycler 480 II (Roche, Švýcarsko). Vzorky byly míchány a měřeny v bílých plastových destičkách obsahujících 96 jamek (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche, Švýcarsko), které byly přelepeny teplotně odolnou fólií (LightCycler 480 Sealing Foil, Roche, Švýcarsko). Díky tomuto vybavení bylo možné najednou určit teplotní stabilitu proteinu např. ve 21 různých 100 mM pufrách (rozsah hodnot pH od 4,5 do 9,0) a to současně v přítomnosti i nepřítomnosti 200 mM NaCl (viz tabulka 5.27, str. 70). Měření probíhala v přítomnosti 8× koncentrovaného fluorescenčního barviva SYPRO® Orange (5000× koncentrovaný zásobní roztok; Sigma-Aldrich, USA).

Výsledný reakční objem v každé jamce byl 25 μ l. Teplotní gradient programu Roche LightCycler 480 SW 1.5 software (Roche, Švýcarsko) byl nastaven od 20 $^{\circ}$ C do 95 $^{\circ}$ C s rychlostí zvyšování teploty 0,01 $^{\circ}$ C s⁻¹. Intenzita fluorescence byla zaznamenávána při vlnové délce 580 nm, excitační vlnová délka byla 465 nm. Teploty tání Nth1 (T_m) odpovídají inflexním bodům křivek tání a byly určeny jako minima první záporné derivace těchto křivek manuálně s pomocí Roche LightCycler 480 SW 1.5 software (Niesen et al. 2007).

Před samotným měřením bylo nutné zjistit vhodnou výslednou koncentraci proteinu. Pro tento účel byly měřeny vzorky Nth1 100–751 o výsledné koncentraci 1 mg ml⁻¹, 0,5 mg ml⁻¹, 0,25 mg ml⁻¹, 0,13 mg ml⁻¹ a 0,06 mg ml⁻¹ v přítomnosti pufru, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Nejlepší křivky poskytly vzorky obsahující 0,25 mg ml⁻¹ a 0,13 mg ml⁻¹ Nth1 100–751. Na základě tohoto výsledku byla pro všechna další měření používána Nth1 o výsledné koncentraci 0,2 mg ml⁻¹.

Metoda DSF byla také využita k ověření vlivu jednobodových mutací na teplotní stabilitu Nth1. Měření probíhala stejným způsobem, jako bylo popsáno v předešlých odstavcích. Vzorky byly měřeny v pufru, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Výsledné koncentrace Nth1 WT a jejich mutantních forem byly 0,2 mg ml⁻¹.

Tabulka 5.27: Seznam testovaných 100 mM pufrů a hodnot jejich pH.

Pufr	pH		
octan sodný	4,5	5,0	
citronan sodný	4,7		
dihydrogenfosforečnan draselný	5,0	6,0	7,0
dihydrogenfosforečnan sodný	5,5	6,5	7,5
MES	5,8	6,2	6,5
HEPES	7,0	8,0	
octan amonný	7,3		
Tris	7,5	8,0	8,5
imidazol	8,0		
Bicin	8,0	9,0	
původní pufr	7,5		

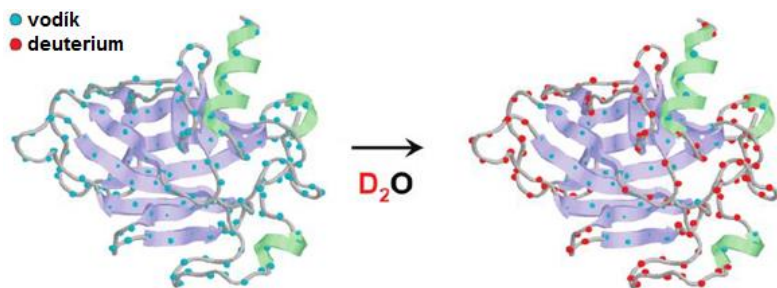
5.4.7 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

K objasnění strukturní podstaty regulace aktivity Nth1 pomocí Bmh1 a/nebo kationtů Ca²⁺ bylo použito měření vodík/deuteriové (H/D) výměny spojené s hmotnostní spektrometrií (MS). Měření byla realizována ve spolupráci s laboratoří Charakterizace molekulární struktury z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., vedené RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. Experimenty byly provedeny RNDr. Petrem Manem, Ph.D.

Detekování H/D výměny pomocí MS slouží k charakterizaci proteinové dynamiky a změn proteinové konformace (Smith et al. 1997; Wales a Engen 2006). Rychlost výměny deuteria za vodík je v proteinu ovlivněna jeho konformačním stavem. Měření deuterace proteinu v čase

může tedy odhalit původní konformační stavy stejně jako změny způsobené vlivem vnějších faktorů, jako jsou např. vliv chemických látek, proteinové interakce, denaturace nebo vliv pH (Engen 2009).

H/D výměna spojená s MS se používá ke sledování spontánní výměny amidických vodíků proteinové páteře za atomy deuteria pocházející z roztoku (viz obrázek 5.5). Ostatní vodíky proteinové páteře, které jsou vázané na uhlík, se většinou nikdy nevyměňují za deuterium. Naproti tomu vodíky z konců postranních řetězců se mění moc rychle a měření pomocí LC/MS je velice obtížné. Možnost měřit výměnu amidických vodíků peptidové vazby má své výhody v tom, že tyto vodíky pomáhají stabilizovat sekundární strukturu proteinu (α -helixy a β -struktury) a také, že každá aminokyselina s výjimkou prolinu nese tento amidický vodík. Správně sbalené proteiny mají H/D výměnu amidických vodíků pomalejší než jejich nesbalené formy. Pomalá změna tedy souvisí se špatnou dostupností vnitřní struktury proteinu pro rozpouštědlo a/nebo s vodíkovými vazbami (Engen 2009).



Obrázek 5.5: Princip H/D výměny. Labilní amidické vodíky (modré tečky) mohou být při styku s deuterovaným rozpouštědlem vyměněny za deuterium. Ostatní vodíky, které se mění za deuterium příliš rychle nebo příliš pomalu, nejsou na tomto obrázku vyznačeny. Rychlost H/D výměny je závislá na přístupnosti pro rozpouštědlo, vodíkových vazbách, pH a teplotě. Na tomto obrázku jsou rychle deuterovány amidické vodíky, které nejsou vázány vodíkovou vazbou a jsou v blízkosti povrchu dokonale sbaleného proteinu. Naproti tomu amidické vodíky vystavené vlivu rozpouštědla, ale zabudované do pravidelných tvarů sekundární struktury (několik α -helixů), jsou chráněné proti výměně vodíkovými vazbami. Obrázek byl převzat z (Engen 2009), kde byla pro jeho tvorbu využita struktura PDB 1tsr (Cho et al. 1994).

H/D výměna byla měřena na vzorcích samotného proteinu Bmh1, fosforylované Nth1 (pNth1) a pNth1 v přítomnosti proteinu Bmh1 (v poměru 1:2). Všechna měření byla zopakována také v přítomnosti 10 mM Ca^{2+} . Experiment byl zahájen desetinásobným zředěním vzorků v deuterovaném pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH/pD = 7,5), 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 200 mM NaCl a 10% (w/v) glycerol. Výsledná koncentrace proteinu byla 3,16 μ M

a pNth1 1,6 μM . V průběhu byly odebírány 80 μl vzorky po pevně daných časech probíhající H/D výměny: 30 s, 1 min, 3 min, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h a 5 h. H/D výměna byla zhášena pomocí přídatku 20 μl 0,1 M HCl a jednotlivé vzorky rychle zmrazeny v kapalném dusíku.

Analýza jednotlivých deuterovaných vzorků (HPLC-MS) byla prováděna na přístroji pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii (HPLC, 1200 Agilent Technologies, Německo), který byl spojen s ESI-FT-ICR hmotnostním spektrometrem (9.4 T APEX-Ultra, Bruker Daltonics, USA). Samotné analýze předcházelo rychlé roztátí vzorků následované jejich rozštěpením pomocí pepsinu na speciální koloně (objem 66 μl , průtoková rychlost 100 $\mu\text{l min}^{-1}$). Vzniklé krátké peptidy byly odsoleny na koloně Peptide MicroTrap (Michrom Bioresources, USA) a rozděleny pomocí kolony C18 s reverzní fází (0.5 \times 50 mm, Jupiter, Phenomenex, USA). Pro rozdělení byl použit lineární gradient 10 – 45% rozpouštědla B trvající 20 min. Rozpouštědlo A obsahovalo 2% acetonitril/0,4% kyselina mravenčí ve vodě a rozpouštědlo B obsahovalo 95% acetonitril/5% voda/0,4% kyselina mravenčí. Pro minimalizaci možnosti zpětné H/D výměny byly nástřikový a přepínací ventil, pepsinová kolona, peptidová past a analytická kolona umístěny v ledu.

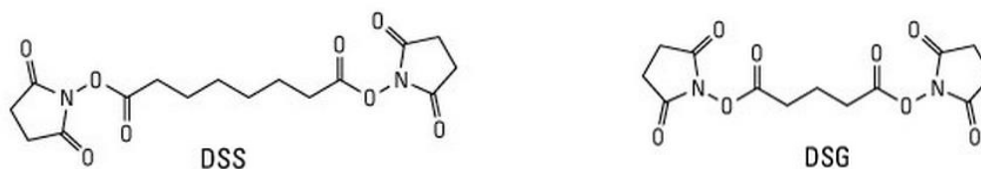
Identifikace jednotlivých peptidů a jejich mapování pomocí HPLC-MS/MS bylo provedeno stejným způsobem jako bylo uvedeno výše. MS/MS spektra byla vložena do programu MASCOT porovnána s databázemi obsahujícími aminokyselinové sekvence Nth1 a Bmh1. Jedinou povolenou modifikací byla fosforylace serinů z Nth1. Spektra částečně deuterovaných peptidů byla exportována jako textové soubory za použití programu DataAnalysis v 4.0 (Bruker Daltonics, USA) a zpracována pomocí programu ExPro, který byl napsán v programovacím jazyce Java v laboratoři RNDr. Petra Nováka, PhD. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. (Kavan a Man 2011).

5.4.8 Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií

Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií umožňuje získání doplňkových informací o prostorovém uspořádání proteinů a jejich komplexů v jejich nativním prostředí. Tyto informace mohou následně sloužit k validaci modelových struktur nebo také pro potvrzení struktur získaných například proteinovou krystalografií. V našem případě byly údaje získané chemickým zesítením využity pro zpřesnění strukturních modelů proteinů Bmh1, Nth1 a jejich komplexu. Měření byla realizována ve spolupráci s laboratoří Charakterizace molekulární struktury z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. vedené RNDr. Petrem Novákem, Ph.D., kde tyto experimenty provedl Mgr. Zdeněk Kukačka.

Proteiny Bmh1, pNth1 a jejich komplex byly chemicky zesíteny v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} . Byla použita homobifunkční síťovací činidla disukcinimidyl

suberát (DSS) a disukcinimidyl glutarát (DSG) (viz obrázek 5.6). Tato činidla reagují s primárními aminy, se kterými při pH 7 – 9 vytváří peptidovou vazbu. DSS tvoří spojení lysin–lysin o vzdálenosti 24 Å a DSG vazbu stejného typu, ale na vzdálenost 20 Å (Young et al. 2000).



Obrázek 5.6: Strukturní vzorce homobifunkčních síťovacích činidel disukcinimidyl suberátu (DSS) a disukcinimidyl glutarátu (DSG), která byla použita při měření chemického zesílení spojeného s MS (<https://www.lifetechnologies.com/>).

Pro měření chemického zesílení byl použit protein Bmh1 o koncentraci 0,25 mg ml⁻¹ a pNth1 0,25 mg ml⁻¹. Síťovací reakce probíhaly v pufru obsahujícím 20 mM HEPES (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 1 mM EGTA. Při testování vlivu kationtů Ca²⁺ (o výsledné koncentraci 10 mM) byly všechny proteiny zesíteny v přítomnosti těchto kationtů pomocí nedeuterovaných síťovacích činidel (DSSD0 a DSGD0) a v nepřítomnosti kationtů Ca²⁺ pomocí čtyřikrát deuterovaných síťovacích činidel (DSSD4 a DSGD4). Čerstvě připravené zásobní směsi síťovacích činidel obsahovaly vždy dané činidlo o výsledné koncentraci 5 mg ml⁻¹ rozpuštěné v DMSO a byly přidávány v patnáctinásobném a třicetinásobném molárním nadbytku vůči koncentraci samotných proteinů Bmh1 a pNth1. Nebo v padesátinásobném a stonásobném nadbytku ke komplexu pNth1:Bmh1. Reakční směsi byly vždy inkubovány po dobu 2 h při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky zesítené v přítomnosti kationtů Ca²⁺ a nedeuterovaných síťovacích činidel smíchány s totožnými vzorky, které byly ale zesíteny pomocí deuterovaných síťovacích činidel v nepřítomnosti kationtů Ca²⁺. Molární poměr takto smíchaných vzorků byl 1:1.

Následně byly zesítené proteiny rozděleny pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy na NuPAGE 4 – 12% Bis-Tris gelech v prostředí 20× koncentrovaného MES SDS pufru. Vzorky odpovídající svou velikostí monomerním zesíteným proteinům byly z těchto gelů vyříznuty. K redukci cysteinů byl použit 100 mM TCEP působící po dobu 5 min za teploty 90 °C. Volné cysteiny byly alkylovány v přítomnosti 50 mM jodacetamidu po dobu 20 min při laboratorní teplotě ve tmě.

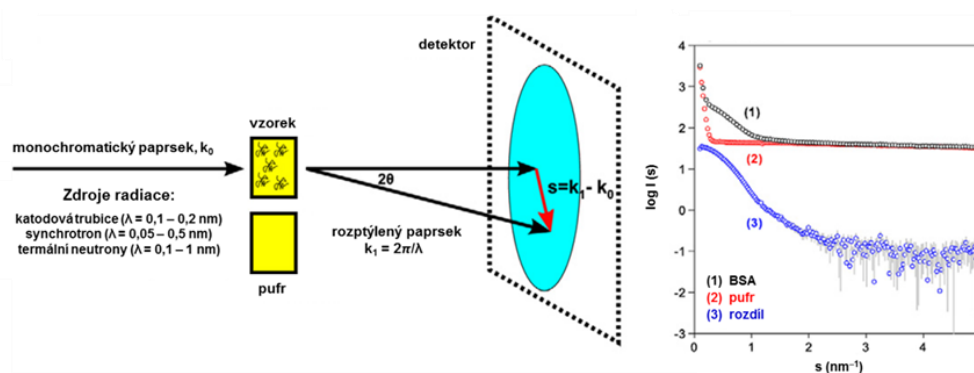
Dále byly vzorky štěpeny trypsinem při 37 °C přes noc. Poměr trypsinu a štěpeného proteinu byl 1:20 (w/w). Vzniklá směs peptidů byla odsolena pomocí kolony Peptide MicroTrap (Michrom Bioresources, USA). Po odsolení byla směs přemístěna na kolonu

s reverzní fází MAGIC C18 ($0,2 \times 150$ mm, Michrom Bioresources, USA) a rozdělena pomocí kapilární HPLC (Agilent Technologies, USA) za průtokové rychlosti $4 \mu\text{l min}^{-1}$ a následujícím průběhu gradientů: po dobu 1 min 1–10% B, 19 min 10–45% B, 5 min 45–95% B. Rozpouštědlo A obsahovalo 0,2% kyselinu mravenčí, 2,5% acetonitril a 2,5% isopropanol rozpuštěné ve vodě. Rozpouštědlo B se skládalo z 0,16% kyseliny mravenčí rozpuštěné v 90% acetonitrilu a 5% isopropanol. Kolona byla připojena přímo na Apex-ULTRA Qe FT-ICR hmotnostní spektrometr (Bruker Daltonics, USA) vybavený 9,4 T supravodivým magnetem a využívajícím elektrosprej jako iontový zdroj. Kalibrace přístroje byla provedena externě za využití argininových skupin a hmotnostní přesnost byla nižší než 2 ppm.

Sběr a zpracování dat bylo provedeno pomocí programů ApexControl 3.0.0 a DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, USA). Jednotlivá spojení byla identifikována za pomoci softwaru Links (Young et al. 2000). Algoritmus tohoto softwaru byl nastaven tak, aby bral v úvahu karbamidomethylaci cysteinů a možnost oxidace methioninů. Odchylka hmotností byla udržována pod hodnotou 2 ppm a všechny přiřazené fragmenty byly ověřeny manuálně.

5.4.9 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Měření maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS) umožňuje studium struktury a dynamiky biomakromolekul a odhad jejich velikosti a tvaru v roztoku. Metoda SAXS často slouží k ověření shody krystalových struktur se strukturami příslušných proteinů v roztoku, zvláště v případě komplexů nebo proteinů s flexibilními oblastmi. Princip této techniky spočívá v měření elastického rozptylu rentgenového záření ($\sim 0,1$ nm) roztokem, který obsahuje nehomogenity v podobě proteinových molekul o velikostech 1 až 100 nm (viz obrázek 5.7).



Obrázek 5.7: Schématické znázornění typického experimentu využívajícího maloúhlový rozptyl záření (levá část obrázku). Graf vpravo obsahuje závislost intenzity rozptylu rentgenového záření (I) na rozptylovém vektoru (s). Data byla naměřena na vzorku BSA (5 mg ml^{-1}) rozpuštěném v pufru obsahujícím 50 mM HEPES o $\text{pH} = 7,5$ (měřeno na X33, DORIS, Hamburk). Obrázek by převzat a upraven podle (Mertens a Svergun 2010).

Rozptyl rentgenového záření je měřen pod velmi malým úhlem v rozmezí 0° až 2° (někdy v rozmezí 0° až 15°). Měřená intenzita rozptýleného záření (I) je sféricky zprůměrována a fázová informace je ztracena. Měřením SAXS lze získat následující strukturální parametry: molekulovou váhu, molekulový objem, gyrační poloměr (R_g) a distribuční funkce vzdáleností ($P(r)$). Z $P(r)$ funkce lze následně odvodit nejdelší vzdálenost v rámci molekuly (D_{max}). Naměřená dvoudimensionální data se musí radiálně integrovat pro získání jednodimensionálních závislostí intenzity rozptylu (I) na úhlu rozptylu (2θ). Rozptylový vektor (s) závisí na úhlu rozptylu podle rovnice (3),

$$s = 4\pi \frac{\sin\theta}{\lambda} \quad (3)$$

kde (λ) je vlnová délka rentgenového záření. Závislost intenzity rozptylu (I) na rozptylovém vektoru (s) je dána rovnicí (4),

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

kde ($P(r)$) je distribuční funkce vzdáleností uvnitř molekuly a (D_{max}) je maximální vzdálenost v rámci rozptylující molekuly. Při odhadu velikosti molekuly pro malé rozptylové vektory (s) platí tzv. Guinierova aproximace uvedená v rovnicích (5 a 6).

$$\ln \frac{I(s)}{I(0)} = \frac{-s^2 R_g^2}{3} \quad \text{kde} \quad I(0) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) dr \quad (5 \text{ a } 6)$$

Pro přesné určení gyračního poloměru je nutné R_g měřit jako funkci koncentrace proteinu a poté extrapolovat na nulovou koncentraci.

K vytvoření tzv. molekulové obálky se nejdříve určí hodnota D_{max} a následně se vytvoří za pomoci tzv. dummy atomů koule o průměru odpovídajícím právě této hodnotě. Dále je tato koule a její atomy upravována tak, aby její výsledná konfigurace při simulovaném měření poskytla stejný výsledek jako experimentálně naměřená SAXS data. Výpočet molekulárního povrchu (obálky příslušného proteinu) se provádí pomocí různých algoritmů (volně dostupných na <http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>) (Putnam et al. 2007; Mertens a Svergun 2010).

SAXS byl využit pro objasnění strukturální podstaty regulace aktivity Nth1 pomocí Bmh1. Měření bylo realizováno v Hamburku v Laboratoři evropské molekulární biologie na synchrotronu DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron, DORIS III, P12 beamline, Německo). Enzym Nth1 a proteinový komplex pNth1:Bmh1 byly měřeny v rozmezí koncentrací 1,8 až 15 mg ml⁻¹. Protein Bmh1 byl měřen v rozmezí koncentrací 2,2 až 16,3 mg ml⁻¹. Minimální objem měřených vzorků byl 40 µl. Pro měření byl použit pufr

obsahující 20 mM Tris (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 2 mM DTT. Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu ATSAS Software Suite (Konarev et al. 2006). Po normalizaci intenzity rozptýleného záření byla data zprůměrována a byl odečten příspěvek pufru za použití programu PRIMUS (Konarev et al. 2003). Hodnota intenzity rozptylu v přímém směru (při nulovém úhlu, $I(0)$) a gyrační poloměr (R_g) byly vypočteny pomocí Guinierovy aproximace. Distribuční funkce vzdáleností uvnitř molekuly ($P(r)$) a maximální vzdálenost částic (D_{max}) byly určeny pomocí nepřímé Fourierovy transformace hodnot intenzity rozptylu ($I(s)$) za použití programu GNOM (Svergun 1992). Molekulové hmotnosti rozpuštěných látek (MM_{exp}) byly získány po srovnání intenzit rozptylu v přímém směru ($I(0)$) s rozptyly získanými z roztoku standardu hovězího sérového albuminu (BSA, o molekulové hmotnosti 66 kDa). *Ab initio* molekulové obálky byly vypočítány pomocí programu DAMMIN (Svergun 1999). Tyto obálky reprezentují protein vzniklý z tzv. dummy atomů. Objem obálky je omezen maximální diametrální vzdáleností pomocí experimentálně zjištěné hodnoty D_{max} . Pro každý protein bylo nezávisle vytvořeno 10 molekulových obálek a výsledná obálka byla vytvořena z jejich průměrných parametrů pomocí programu DAMAVER (Volkov a Svergun 2003).

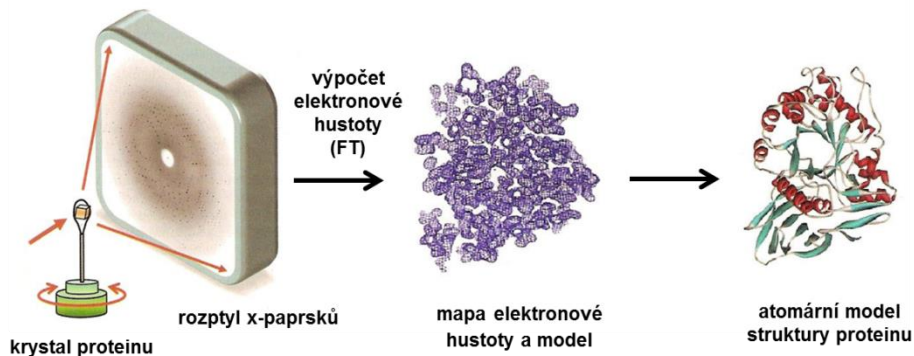
5.4.10 Proteinová krystalografie

Krystalografie proteinů je biofyzikální metoda využívaná pro určení prostorové struktury bílkovin. Úspěšnost této metody je závislá na kvalitě proteinových vzorků, které je nutné připravit v miligramových množstvích. Proces krystalizace probíhá ve vodném prostředí a je závislý na řadě faktorů jako jsou teplota, hodnota pH, koncentrace proteinu a srážedla, čistota proteinového vzorku, typ krystalografické metody aj. Nejen z těchto důvodů, ale také díky tomu, že není možné krystalografický proces simulovat, je celý proces končící vhodným difrakujícím krystalem často velice časově náročný (řádově týdny, měsíce až roky). Kvalitu proteinových krystalů a jejich použitelnost pro strukturní studie není možné vyhodnotit vizuálně, ale je potřeba provést testy rentgenové difrakce. Pro vyřešení struktury je často nutné otestovat větší množství krystalů a případně optimalizovat podmínky kryoprotekce.

Proteinové krystaly se nacházejí v rovnováze s prostředím vodných roztoků, ve kterých vznikly. Přibližně polovina objemu proteinového krystalu je tvořena kanály, které obsahují neuspořádané molekuly rozpouštědla. Velikosti základních buněk proteinových krystalů jsou v jednom směru většinou v rozmezí desítek až stovek Ångström (Å) a hladina jejich uspořádanosti nebývá vysoká (v porovnání s anorganickými krystaly), proto jsou i hodnoty rozptylu rentgenového záření nižší. Z této skutečnosti vyplývá potřeba zdrojů rentgenového záření s vyšší intenzitou, které je dosaženo například při využití rotační anody nebo zdrojů

synchrotronového záření. Difrakční měření se zpravidla provádí za využití oscilační metody při nízkých teplotách v proudu par kapalného dusíku.

Paprsky rentgenového záření, které se rozptylují na elektronech proteinových monokrystalů, jsou zachytávány detektorem. Získaná data jsou následně transformována do mapy elektronových hustot. Výsledná trojrozměrná struktura proteinové molekuly nemůže být vyrobena bez určení nebo odhadu počátečních hodnot fází strukturních faktorů (viz obrázek 5.8). Při tomto procesu může být využito podobnosti s již známou proteinovou strukturou (metoda molekulárního nahrazení) nebo se např. fáze určí experimentálně pomocí metody anomálního rozptylu či izomorfního nahrazení. Zpřesnění struktury proteinu je prováděno výpočetně a manuálně pomocí speciálních programů (Rupp 2009).



Obrázek 5.8: Princip proteinové krystalografie. Krystal složený z uspořádaných molekul proteinu je vystaven rentgenovému záření. X-paprsky jsou rozptylovány elektronovými obaly atomů a vzniklý difrakční obraz je zaznamenán detektorem. Ze získaných difrakčních dat lze vypočítat elektronovou hustotu molekul či atomů, které tvoří testovaný krystal. Pro výpočet map elektronové hustoty se musí nejprve vyřešit fázový problém (určit fázové posuvy difraktovaných vln). Na základě získané mapy elektronové hustoty lze následně vytvořit model struktury proteinové molekuly. Převzato a upraveno podle (Rupp 2009).

Proteinová krystalografie je prováděna na dvou verzích proteinu Nth1 (Nth1 153–751 a Nth1 100–751) a na proteinovém komplexu pNth1 WT:Bmh1 Δ C M237Stop. Byly používány dva typy krystalizačních technik, metoda sedících kapek nebo metoda kapek visících. Díky rozdílné koncentraci krystalizačních činidel v kapce (obsahující roztok daného proteinu smíchaný s roztokem z rezervoáru) a v rezervoáru docházelo k pomalé difúzi par z kapky do roztoku a tím i k zahušťování roztoku proteinu v kapce. Během tohoto procesu byly vytvořeny podmínky vhodné pro nukleaci a růst proteinových krystalů.

Pro hledání vhodných krystalizačních podmínek byl využit robot Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments, USA) a krystalizační destičky umožňující testování 96 krystalizačních

podmínek a to současně ve třech různých poměrech rezervoár : protein (1:2, 1:1 a 2:1) (Intelliplates® 96, Art Robbins Instruments, USA). Objem sedících kapek byl 0,3 μl a rezervoár obsahoval 70 μl krystalizačního roztoku. Byly testovány proteiny Nth1 153–751 o koncentraci 7,2 mg ml^{-1} rozpuštěné v pufru obsahujícím 1 mM octan amonný (pH = 7,3), 150 mM NaCl a 5 mM DTT. Dále proteiny Nth1 100–751 o koncentraci 10,8 mg ml^{-1} umístěné v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. A také komplex proteinů pNth1 WT:Bmh1 $\Delta\text{C M237Stop}$ o koncentraci 9,6 mg ml^{-1} v pufru obsahujícím 1 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 5 mM DTT. Pro hledání vhodných krystalizačních podmínek byly použity komerčně vyráběné sady: Crystal Screen 1 + 2 a Index HT (Hampton Research, USA), JCSG Suite I až IV (Qiagen, Nizozemsko), Morpheus a Midas (Molecular Dimensions, UK). Robotem nakapané destičky byly utěsněny samolepicí fólií (ThermalSeal RTS™ Sealing Films, Excel Scientific, USA). Krystalografické testy probíhaly při teplotě 18 °C. Hledání vhodných krystalizačních podmínek pomocí robotu Crystal Gryphon bylo realizováno ve spolupráci s Laboratoří strukturní biologie vedené RNDr. Cyrilem Bařinkou, Ph.D. na Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i.

Podmínky obsahující nejlepší krystaly byly optimalizovány pod dohledem prof. RNDr. Tomáše Obřila, Ph.D. na Přírodovědecké Fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Během optimalizace počátečních krystalizačních podmínek byly měněny koncentrace krystalizačních podmínek a také koncentrace samotných proteinových vzorků. Byly testovány vlivy různých hodnot pH, snížení teploty na 4 °C a také vliv různých aditiv např. glycerolu, ethanolu nebo aditiv z aditivního screenu (Additive Screen, Hampton Research, USA). Většina krystalizačních experimentů byla prováděna ve visících kapkách o objemu 4 až 6 μl . Byly požívány krystalografické destičky se 24 jamkami (Crystalgen, USA), přičemž do rezervoáru byl vždy umístěn 1 ml krystalizačního roztoku. Jednotlivé kapky byly nanášeny na kulatá silikonizovaná krycí sklíčka (VDX, 0,22 mm, Hampton Research, USA), která byla poté přilepena nad příslušný rezervoár. Od každého konstruktů a od proteinového komplexu bylo několik nejlepších krystalů vyloveno z kapek a jejich složení otestováno pomocí 12% SDS-PAGE. Krystaly byly přeneseny pomocí smyčky do kapky obsahující 5 μl roztoku z rezervoáru a následně vyloveny a přeneseny do 5 μl destilované vody. Z této poslední kapky byly připraveny vzorky na 12% SDS-PAGE (postup viz kapitola 5.2.7, str. 53).

Po ověření složení proteinových krystalů, byly otevřeny další jamky a nejlepší krystaly byly pomocí speciálních smyček vyloveny z kapek. Krystaly byly okamžitě omyty v pufrch odpovídající složením původní kapce, ale obsahujících nejdříve 15% a následně 30% glycerol. Takto ošetřené krystaly byly zmrazeny v kapalném dusíku, ve kterém jsou skladovány před očekávanými testy difrakce.

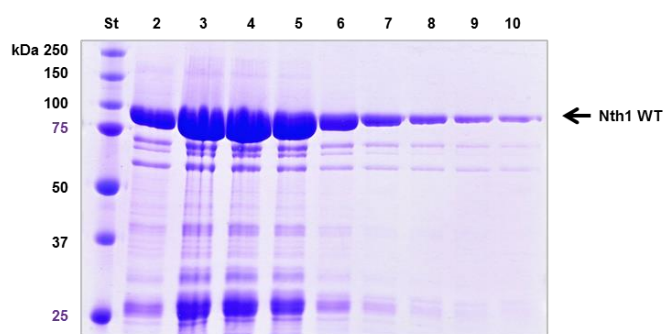
6 Výsledky

6.1 Expres a purifikace proteinů

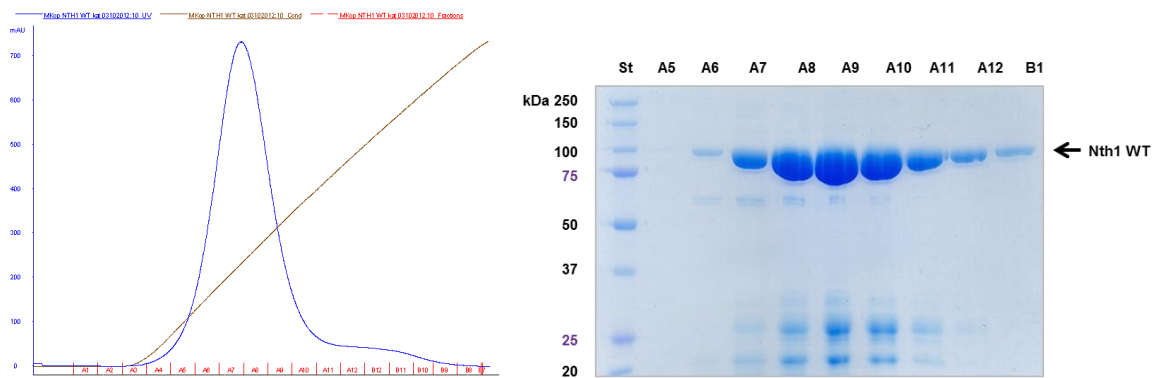
Expres a purifikace všech používaných proteinů probíhaly podle zavedených postupů, které byly popsány v kapitole 5.2 (viz str. 49). V následujících kapitolách jsou uvedeny výsledky expresí a purifikací jednotlivých proteinových konstruktů, přičemž z používaných dvanácti mutantních forem proteinů Nth1 jsou uvedeny výsledky purifikací a expresí pouze dvou z nich. Jsou to mutantní formy Nth1 D114L a D125L, na kterých byla naměřena data zásadní pro celkový výzkum molekulárního mechanismu regulace funkce Nth1. Postupy expres a purifikace všech mutantních forem byly totožné s postupy přípravy Nth1 WT (viz následující kapitola). Lišily se pouze nižšími výtěžky vyráběných proteinů.

6.1.1 Expres a purifikace Nth1 WT

Protein Nth1 WT byl exprimován v bakteriích *E. coli* kmene Rosetta(DE3) a purifikován ve třech krocích. Díky N-koncové histidinové kotvě, bylo možné získaný fúzní protein Nth1 WT přečistit nejprve pomocí niklové chelatační chromatografie. Purifikovaný protein byl z kolony obsahující kationty Ni^{2+} eluován pomocí pufru obsahujícího 600 mM imidazol. Čistota a složení získaných proteinových frakcí byla ověřována pomocí 10% SDS-PAGE (viz obrázek 6.1). Druhým purifikačním krokem byla kationtově výměnná chromatografie, která probíhala na koloně naplněné Sepharosou MonoS připojené k přístroji FPLC-AKTA. Protein Nth1 WT byl z kolony eluován lineárním gradientem chloridu sodného (viz levá část obrázku 6.2, str. 80). Čistota eluovaných frakcí a obsah Nth1 WT byl následně zkontrolován pomocí 10% SDS-PAGE (viz pravá část obrázku 6.2, str. 80).

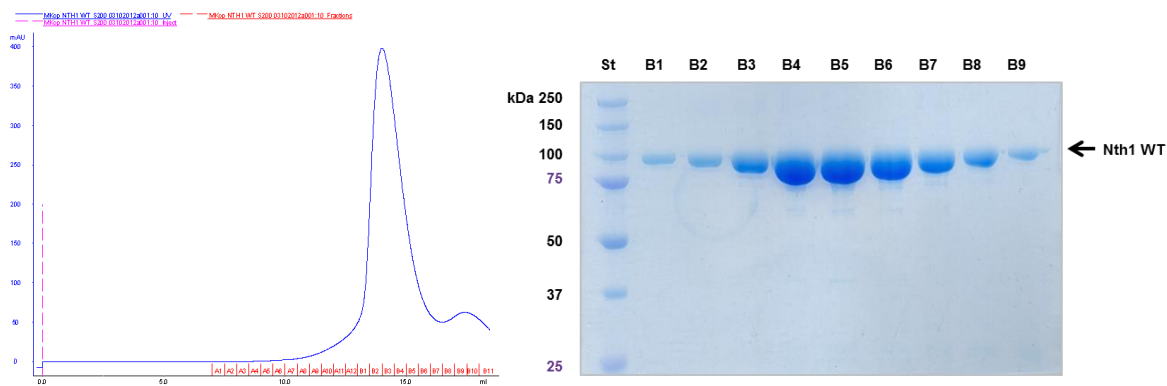


Obrázek 6.1: 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí Nth1 WT číslo 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí.



Obrázek 6.2: Eluční profil vzorku *Nth1 WT* při kationtové výměnné chromatografii (vlevo). Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm a hnědá křivka je tvořena hodnotami vzrůstající konduktivity. V pravé části obrázku je 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí A5 až B1.

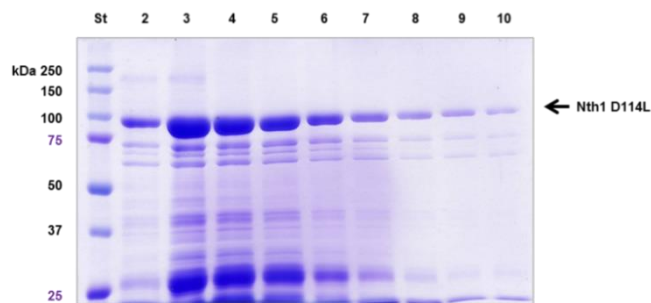
Konečnou purifikační metodou byla gelová permeační chromatografie prováděná na koloně Superdex™ 200 10/300 GL a přístroji FPLC-AKTA. Výsledný eluční profil proteinu *Nth1 WT* a následná analýza čistoty proteinových frakcí jsou uvedeny na obrázku 6.3. Při purifikacích *Nth1 WT* byly získány přibližně 3 mg proteinu ze tří litrů bakteriální kultury. Protein byl získán ve vysoké čistotě a v neagregovaném stavu.



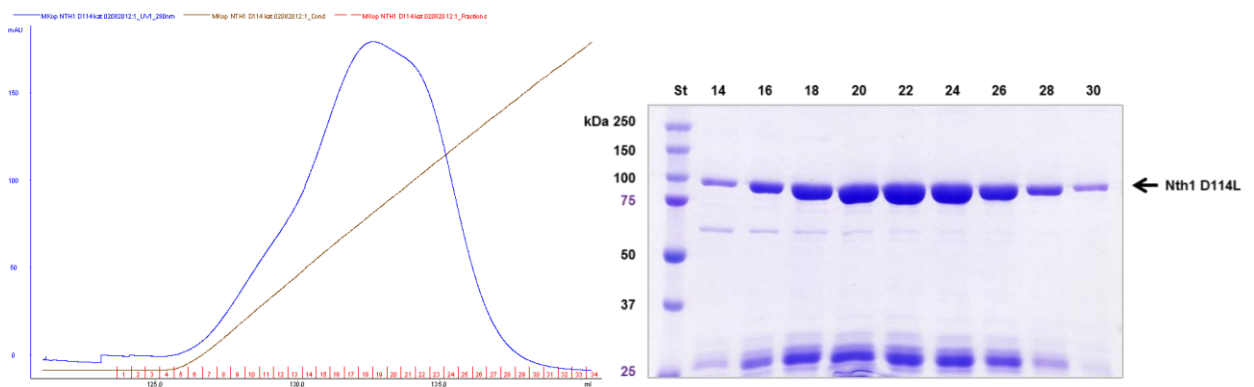
Obrázek 6.3: Eluční profil vzorku *Nth1 WT* z gelové permeační chromatografie na koloně Superdex™ 200 je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí B1 až B9.

6.1.2 Exprese a purifikace mutantní formy Nth1 D114L

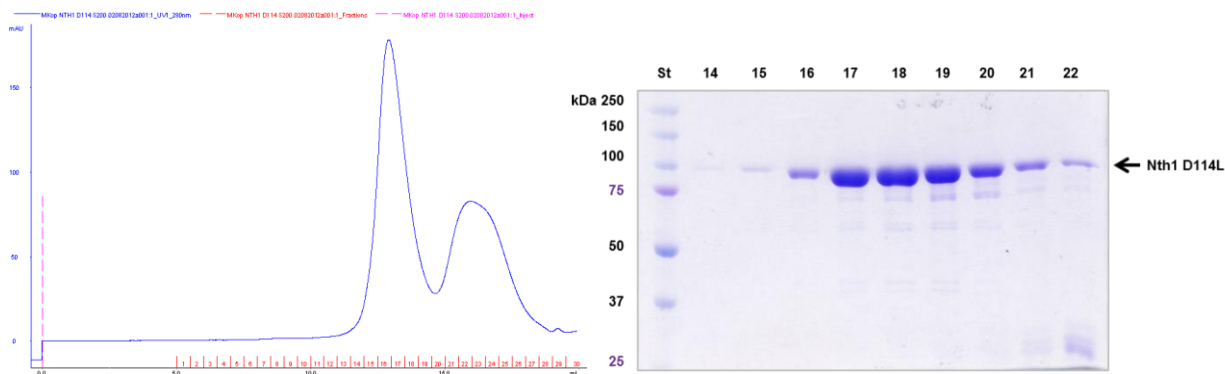
Konstrukt Nth1 D114L, byl připraven pomocí cílené jednobodové mutagenese konstruktů obsahujícího gen pro expresi proteinu Nth1 WT sekvence 1–751. Kodon pro kyselinu asparagovou na pozici 114 byl cíleně změněn na kodon pro leucin. Exprese mutantní formy proteinu Nth1 D114L probíhala v bakteriích *E. coli* kmen Rosetta(DE3) a následoval třístupňový purifikační proces zahrnující niklovou chelatační chromatografii (viz obrázek 6.4), kationtově výměnnou chromatografii (viz obrázek 6.5) a gelovou permeační chromatografií (viz obrázek 6.6, str. 82). Celý purifikační proces byl proveden stejným způsobem, jaký byl popsán v případě Nth1 WT (viz kapitola 6.1.1, str. 79). Při purifikacích proteinu Nth1 D114L bylo získáno přibližně 0,5 - 1 mg proteinu ze 3 litrů bakteriální kultury. Protein byl připraven ve vysoké čistotě a v neagregovaném stavu (viz obrázek 6.6, str. 82).



Obrázek 6.4: 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí Nth1 D114L číslo 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí.



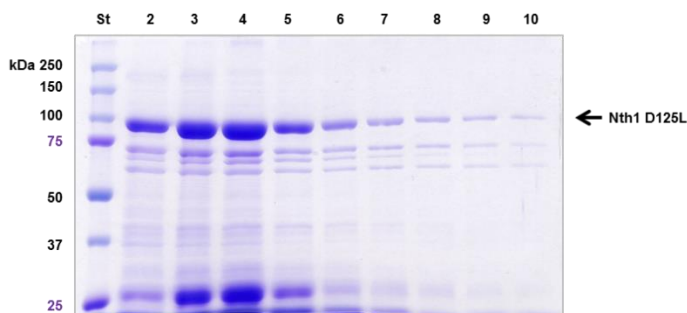
Obrázek 6.5: Eluční profil proteinu Nth1 D114L při kationtově výměnné chromatografii (vlevo). Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm a hnědá křivka je tvořena hodnotami vzrůstající konduktivity. V pravé části obrázku je 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí 14 až 30 eluovaných odpovídajícím pořadí.



Obrázek 6.6: Eluční profil mutantní formy proteinu *Nth1 D114L* z gelové permeační chromatografie na koloně SuperdexTM 200 je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorpance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (*St*) a vzorky proteinových frakcí 14 až 22.

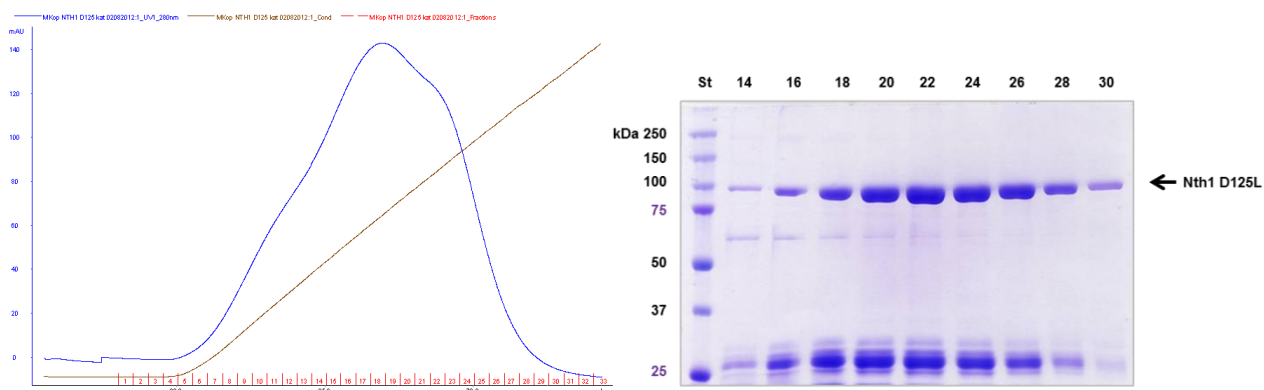
6.1.3 Exprese a purifikace mutantní formy *Nth1 D125L*

Konstrukt používaný pro výrobu mutantního proteinu *Nth1 D125L*, byl připraven pomocí cílené jednobodové mutagenese konstruktů obsahujícího gen pro expresi proteinu *Nth1 WT* sekvence 1–751. Kodon pro kyselinu asparagovou na pozici 125 byl cíleně změněn na kodon pro leucin. Exprese i purifikace mutantní formy proteinu *Nth1 D125L* probíhala stejně, jako bylo popsáno u konstruktu *Nth1 D114L* (viz kapitola 6.1.1, str. 79).

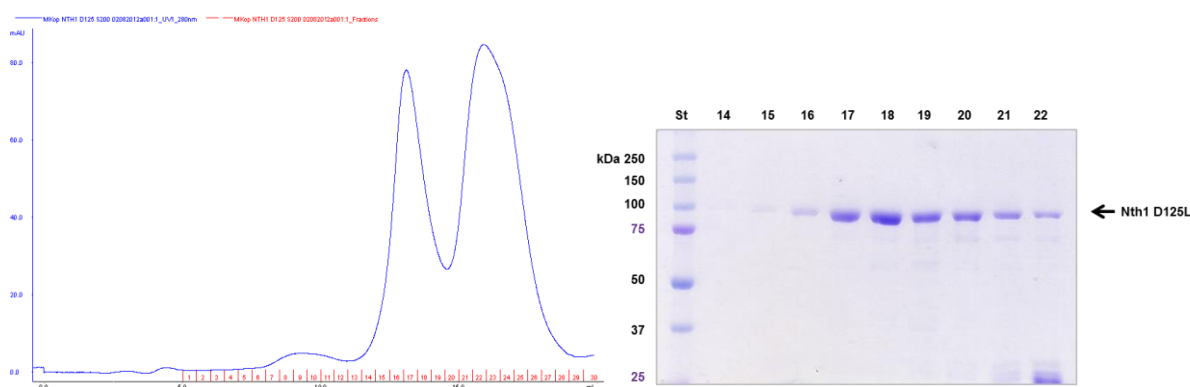


Obrázek 6.7: 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (*St*) a vzorky proteinových frakcí *Nth1 D125L* číslo 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí.

Třístupňový purifikační proces se skládal z niklové chelatační chromatografie (viz obrázek 6.7, str. 82), kationtově výměnné chromatografie (viz obrázek 6.8) a gelové permeační chromatografie (viz obrázek 6.9). Při purifikacích mutantní formy proteinu Nth1 D125L bylo získáno přibližně 0,5 až 1 mg proteinu ze tří litrů bakteriální kultury. Protein byl připraven ve vysoké čistotě a v neagregovaném stavu.



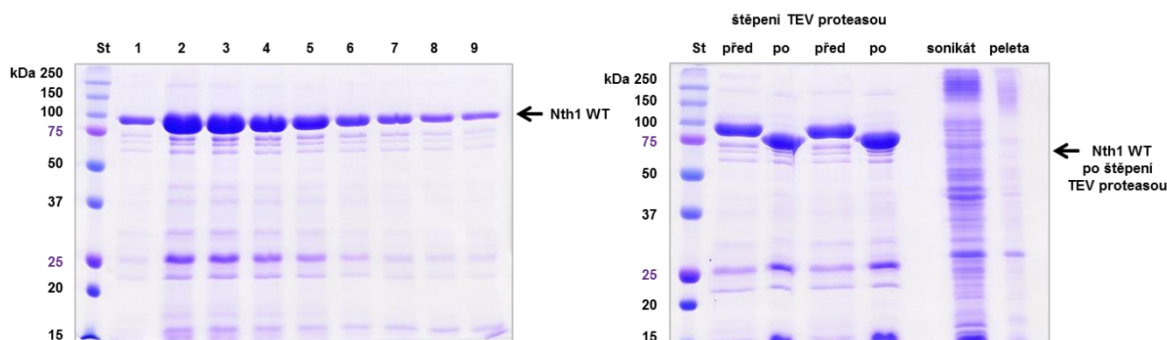
Obrázek 6.8: Eluční profil Nth1 D125L při kationtově výměnné chromatografii (vlevo). Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm a hnědá křivka je tvořena hodnotami vzrůstající konduktivity. V pravé části obrázku je 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí 14 až 30.



Obrázek 6.9: Eluční profil proteinu Nth1 D125L z gelové permeační chromatografie na koloně SuperdexTM 200 je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 10% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí 14 až 22.

6.1.4 Exprese a purifikace Nth1 WT v pRSFDuet-1

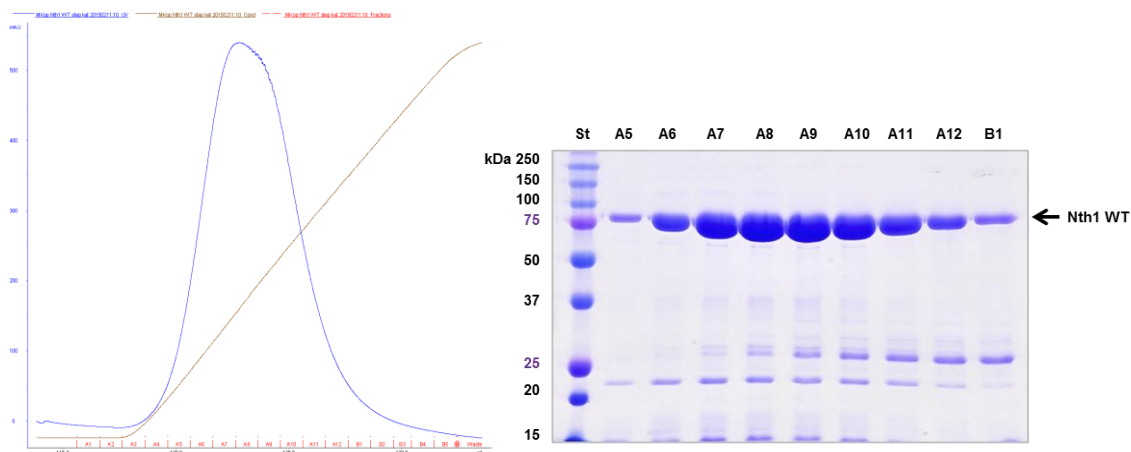
Konstrukt obsahující gen *NTH1* WT 1–751 určený pro přípravu proteinového komplexu pNth1:Bmh1 a jeho následnou krystalizaci byl zaklonován do upraveného plasmidu pRSFDuet-1. Exprese proteinu Nth1 WT v bakteriích *E. coli* kmen BL21(DE3) a následná purifikace pomocí niklové chelatační chromatografie probíhaly identicky jako bylo popsáno v případě Nth1 WT v kapitole 6.1.1 (viz str. 79). Čistota a složení získaných proteinových frakcí byla ověřována pomocí 12% SDS-PAGE (viz pravá část obrázku 6.10).



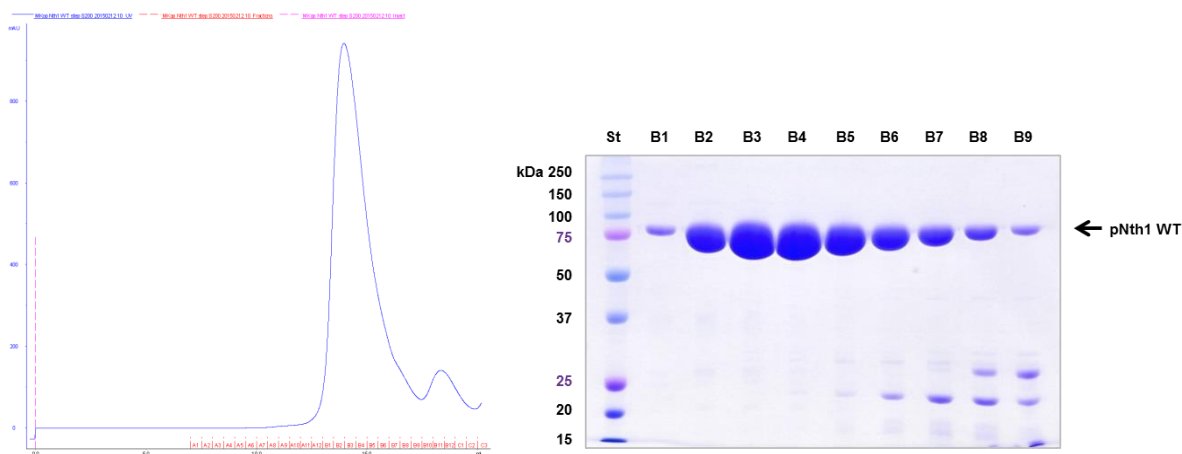
Obrázek 6.10: 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí Nth1 WT číslo 1 až 9 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí (levá část obrázku). Kontrola úspěšnosti odštěpování N-koncové části proteinu Nth1 WT účinkem TEV proteasy provedená pomocí 12% SDS-PAGE (pravá část obrázku). V pravé části pravého kontrolního gelu jsou navíc vzorky sonikátu obsahujícího Nth1 WT a pelety obsahující zbytky rozbitých buněk.

Frakce obsahující protein Nth1 WT byly následně v dialýze štípány pomocí TEV proteasy (na 1 mg proteinu Nth1 WT bylo do dialyzační membrány přidáno přibližně 250 U TEV proteasy). Štěpení probíhalo při teplotě 4 °C do druhého dne, kdy byla úspěšnost reakce zkontrolována pomocí 12% SDS-PAGE (viz levá část obrázku 6.10). Dalším krokem purifikace byla kationtově výměnná chromatografie (viz obrázek 6.11, str. 85), která probíhala stejným způsobem jako v kapitole 6.1.1 (viz str. 79).

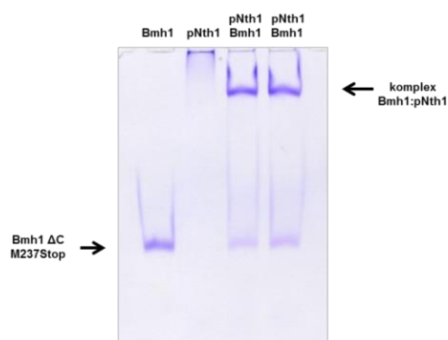
Po kationtově výměnné chromatografii následovala fosforylace a gelová permeační chromatografie prováděná za stejných podmínek, jako při purifikaci uvedené v kapitole 6.1.1 (viz str. 79). Výsledky této metody jsou na obrázku 6.12 (viz str. 85). Při purifikacích tohoto konstruktu Nth1 WT bylo získáno přibližně 5 mg proteinu ze 12 litrů bakteriální kultury. Protein byl získán ve vysoké čistotě a v neagregovaném stavu. Schopnost tvorby komplexu byla ověřena pomocí nativní 12% TBE-PAGE (viz obrázek 6.13, str. 86).



Obrázek 6.11: Eluční profil vzorku proteinu *Nth1 WT* při kationtové výměnné chromatografii (vlevo). Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm a hnědá křivka je tvořena hodnotami vzrůstající konduktivity. V pravé části obrázku je 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (*St*) a vzorky proteinových frakcí A5 až B1.



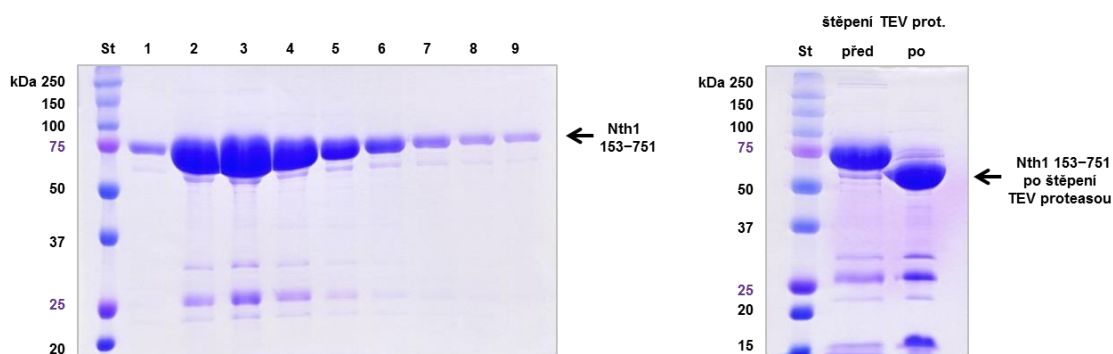
Obrázek 6.12: Eluční profil proteinu *Nth1 WT* (pocházejícího z plasmidu *pRSFDuet-1*) z gelové permeační chromatografie na koloně *SuperdexTM 200* je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (*St*) a vzorky proteinových frakcí B1 až B9.



Obrázek 6.13: Kontrolní 12% gel z nativní TBE-PAGE tvorbu komplexu mezi proteiny pNth1 WT a Bmh1 Δ C M237Stop. V první dráze je protein Bmh1 Δ C M237Stop (60 pmol), ve druhé dráze je fosforylovaná pNth1 WT (30 pmol), ve třetí a čtvrté dráze jsou komplexy těchto dvou proteinů smíchaných v molárním poměru 1:2 (30:60 pmol, pNth1:Bmh1).

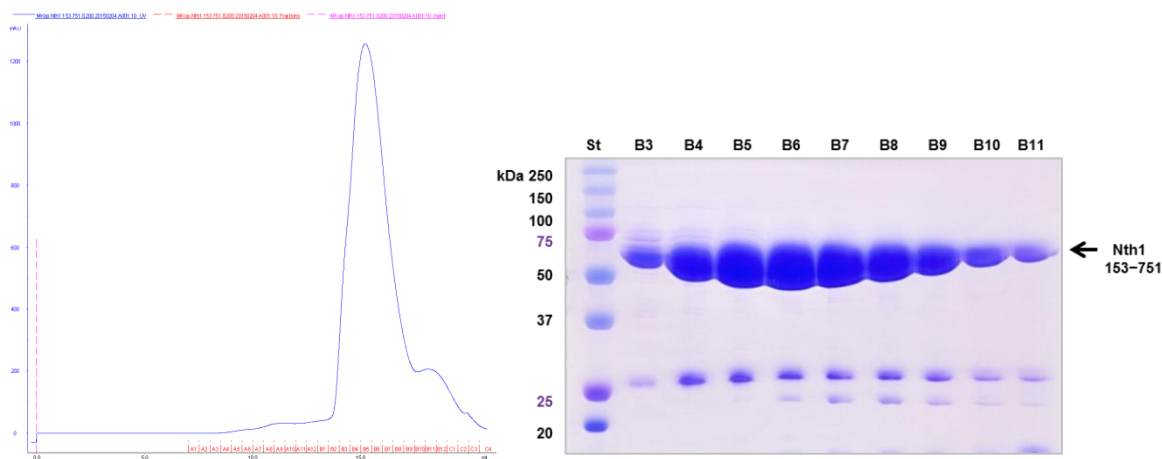
6.1.5 Expresa a purifikace Nth1 153–751

Konstrukt obsahující gen *NTH1* 153–751 určený pro přípravu proteinu Nth1 153–751 a jeho následnou krystalizaci byl vložen do upraveného plasmidu pRSFDuet-1. Expresa proteinu Nth1 153–751 v bakteriích *E. coli* kmen BL21(DE3) a následná purifikace pomocí niklově chelatační chromatografie probíhaly identicky jako bylo popsáno v případě Nth1 WT v kapitole 6.1.1 (viz str. 79). Čistota a složení získaných proteinových frakcí byla ověřována pomocí 12% SDS-PAGE (viz levá část obrázku 6.14). Frakce obsahující protein Nth1 153–751 byly následně v dialýze štěpeny pomocí TEV proteasy stejným způsobem jako v předchozí kapitole 6.1.4 (viz str. 84). (viz pravá část obrázku 6.14).



Obrázek 6.14: 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí Nth1 153–751 číslo 1 až 9 eluovaných při niklově chelatační chromatografii (levá část obrázku). Kontrola úspěšnosti odštěpování N-koncové části proteinu Nth1 153–751 účinkem TEV proteasy provedená pomocí 12% SDS-PAGE (pravá část obrázku).

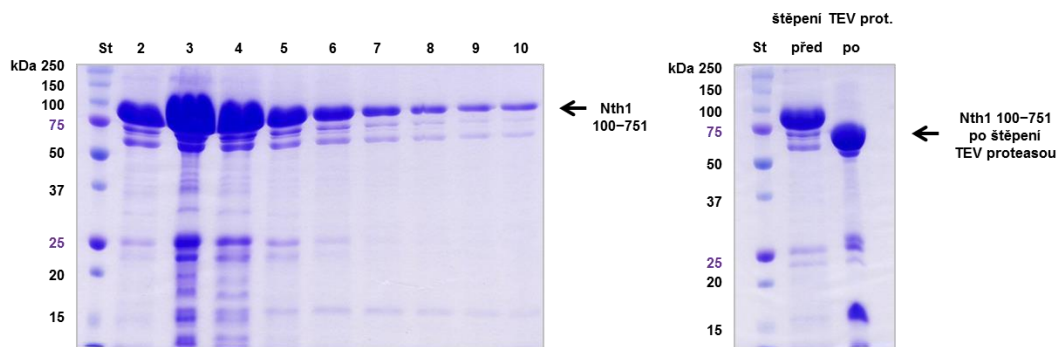
Druhou a konečnou purifikační metodou procesu přípravy proteinu Nth1 153–751 byla gelová permeační chromatografie prováděná stejným postupem jako v kapitole 6.1.1 (viz str. 79). Výsledky této metody jsou na obrázku 6.15. Při purifikacích Nth1 153–751 bylo získáno přibližně 16 mg proteinu z 6 litrů bakteriální kultury. Protein byl připraven v dostatečné čistotě a neagregovaném stavu.



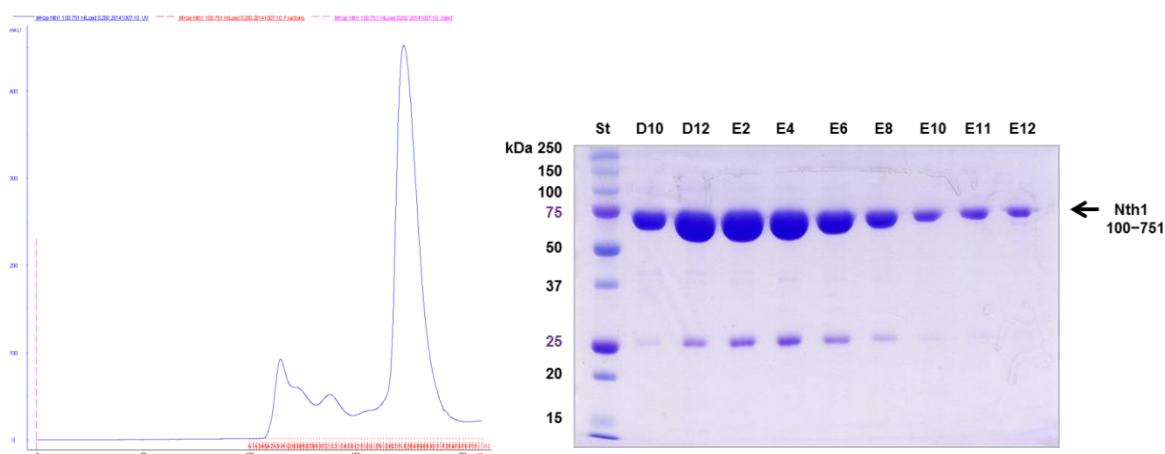
Obrázek 6.15: Eluční profil vzorku Nth1 153–751 z gelové permeační chromatografie na koloně SuperdexTM 200 10/300 GL je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí B3 až B11.

6.1.6 Expres a purifikace Nth1 100–751

Konstrukt obsahující gen *NTH1* 100–751 určený pro přípravu proteinu Nth1 100–751 a jeho následnou krystalizaci byl vložen do upraveného plasmidu pRSFDuet-1. Expres proteinu Nth1 100–751 v bakteriích *E. coli* kmen BL21(DE3), následná purifikace pomocí niklově chelatační chromatografie a štěpení TEV proteasou probíhaly stejným způsobem jako v případě konstruktu Nth1 153–751 (viz kapitola 6.1.5, str. 86). Čistota a složení získaných proteinových frakcí a úspěšnost jejich štěpení byla ověřována pomocí 12% SDS-PAGE (viz obrázek 6.16, str. 88). Konečnou purifikační metodou procesu přípravy proteinu Nth1 100–751 byla gelová permeační chromatografie prováděná na koloně Hiload 26/60 SuperdexTM 200 pg pomocí přístroje FPLC-AKTA. Výsledný eluční profil proteinu Nth1 100–751 a následná analýza čistoty proteinových frakcí pomocí 12% SDS-PAGE jsou uvedeny na obrázku 6.17 (viz str. 88). Při purifikacích Nth1 100–751 bylo získáno přibližně 15 mg proteinu z 6 litrů bakteriální kultury. Protein byl získán v dostatečné čistotě a v neagregovaném stavu.



Obrázek 6.16: 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí *Nth1* 100–751 číslo 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí (levá část obrázku). Kontrola úspěšnosti odštěpování N-koncové části proteinu *Nth1* 100–751 účinkem TEV proteasy provedená pomocí 12% SDS-PAGE (pravá část obrázku).

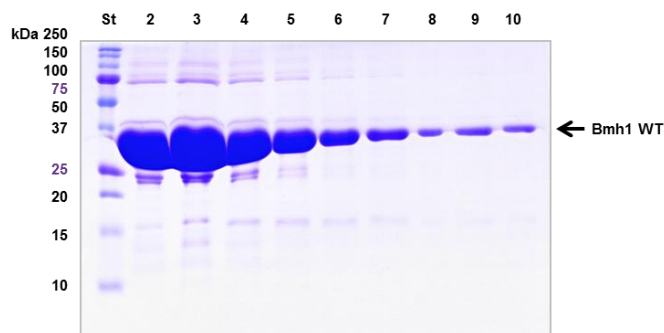


Obrázek 6.17: Eluční profil vzorku *Nth1* 100–751 z gelové permeační chromatografie na koloně Hiload 26/60 SuperdexTM 200 je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorpance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí D10 až E12.

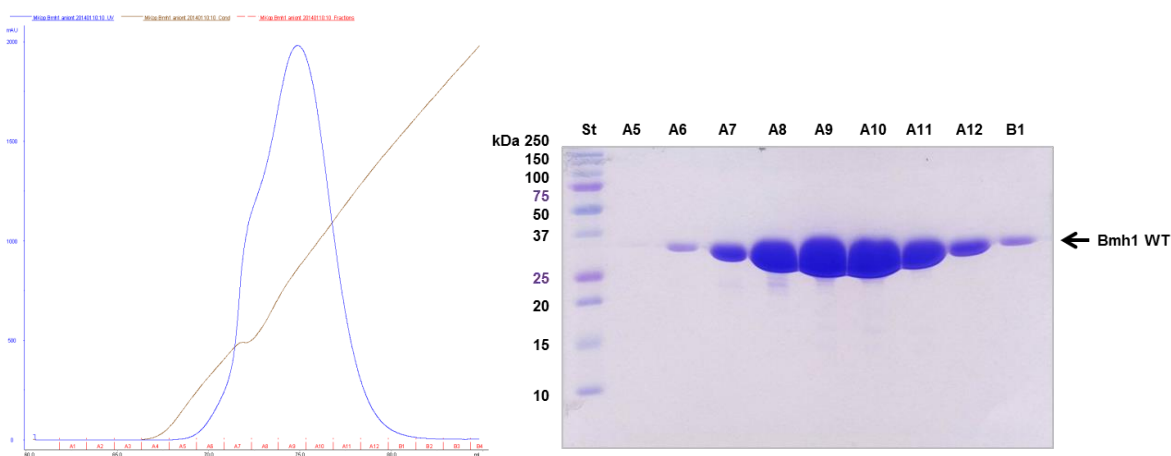
6.1.7 Exprese a purifikace proteinů Bmh1 WT

Konstrukt *BMH1* WT byl zaklonován do plasmidu pET-15b (Invitrogen, USA). Proteiny Bmh1 WT byly exprimovány v bakteriích *E. coli* kmen BL21(DE3) jako fúzní proteiny obsahující afinitní histidinovou kotvu na svém N-konci. Protein Bmh1 WT byl následně přečištěn pomocí niklové chelatační chromatografie (stejný postup jako v kapitole 6.1.1, viz str. 79). Čistota a složení získaných proteinových frakcí byla ověřována pomocí 15% SDS-PAGE

(viz obrázek 6.18). Druhým purifikačním krokem při výrobě proteinu Bmh1 WT byla aniontově výměnná chromatografie prováděna na koloně naplněné Sepharosou MonoQ připojené k přístroji FPLC-AKTA. Protein Bmh1 WT byl z kolony eluován lineárním gradientem chloridu sodného a obsah proteinu Bmh1 WT v eluovaných frakcích byl následně zkontrolován pomocí 15% SDS-PAGE (viz obrázek 6.19).



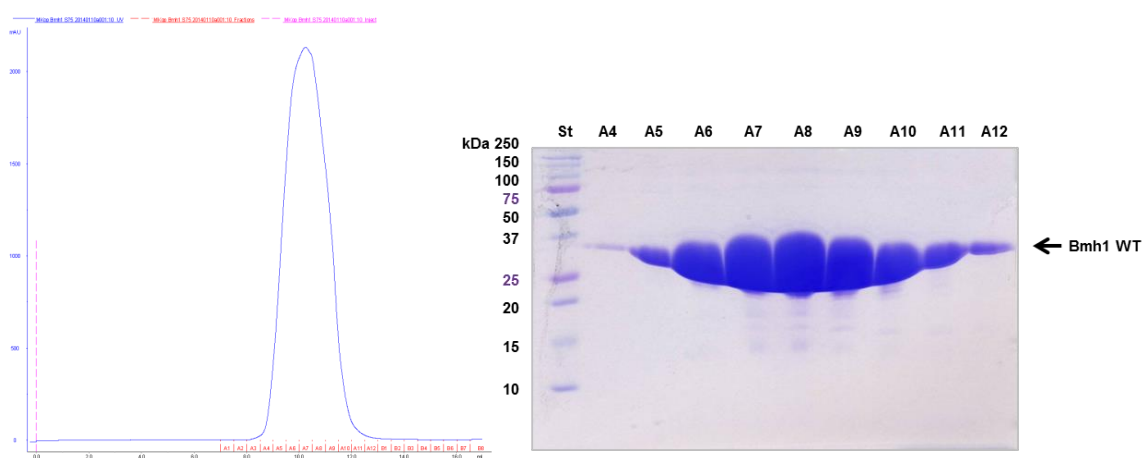
Obrázek 6.18: 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí proteinu Bmh1 WT číslo 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii.



Obrázek 6.19: Eluční profil vzorku proteinu Bmh1 WT při aniontově výměnné chromatografii (vlevo). Modrá křivka obsahuje hodnoty absorpance naměřené při 280 nm a hnědá křivka je tvořena hodnotami vzrůstající konduktivity. V pravé části obrázku je 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí A5 až B1.

Konečnou purifikační metodou procesu přípravy proteinu Bmh1 WT byla gelová permeační chromatografie prováděná na koloně SuperdexTM 75 10/300 GL pomocí přístroje FPLC-AKTA. Výsledný eluční profil proteinu Bmh1 WT a následná analýza čistoty

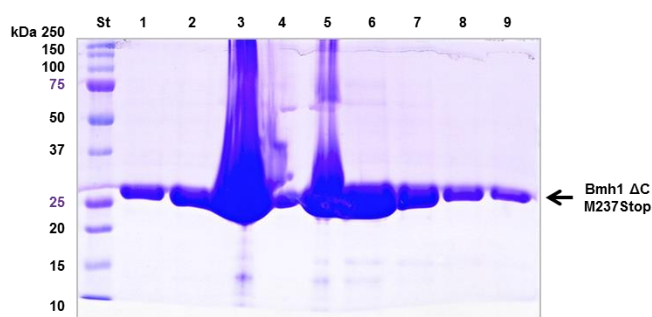
proteinových frakcí pomocí 15% SDS-PAGE jsou uvedeny na obrázku 6.20. Při přípravě Bmh1 WT bylo získáno přibližně 50 mg proteinu ze tří litrů bakteriální kultury. Protein dosahoval vysoké čistoty a byl v neagregovaném stavu.



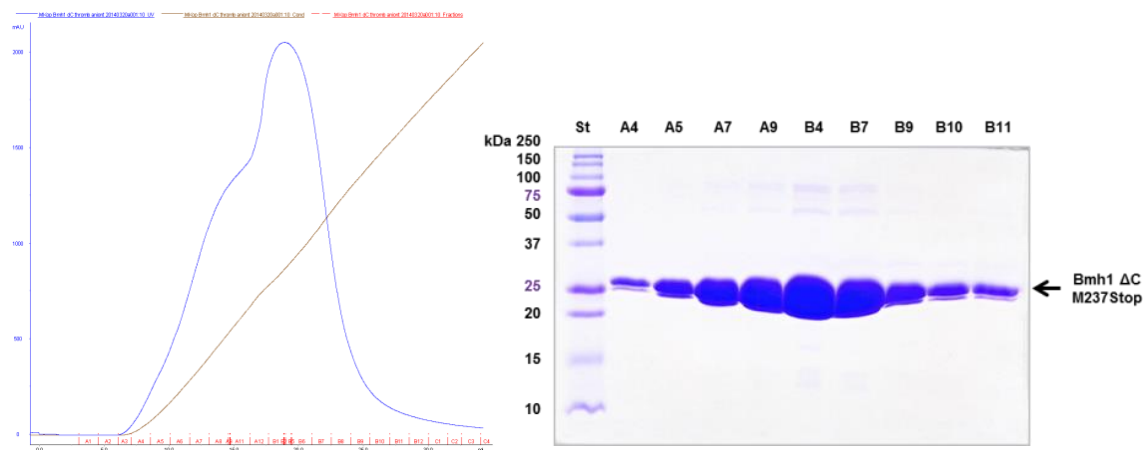
Obrázek 6.20: Eluční profil vzorku Bmh1 WT z gelové permeační chromatografie na koloně SuperdexTM 75 je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorpance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí A4 až A12.

6.1.8 Exprese a purifikace proteinů Bmh1 Δ C M237Stop

Konstrukt pro kratší protein Bmh1 Δ C M237Stop byl vytvořen pomocí cílené jednobodové mutagenese, při které byl zaveden Stop kodon na místo M237 (Veisova et al. 2010). Proteiny Bmh1 Δ C M237Stop byly exprimovány a purifikovány stejným způsobem jako proteiny Bmh1 WT (viz kapitola 6.1.7, str. 88). Výsledky niklové chelatační chromatografie a aniontově výměnné chromatografie jsou uvedeny na obrázcích 6.21 a 6.22 (viz str. 91).

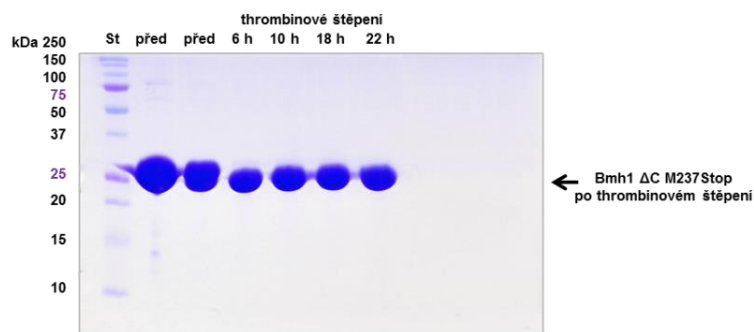


Obrázek 6.21: 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí proteinu Bmh1 Δ C M237Stop číslo 1 až 9 eluovaných při niklové chelatační chromatografii.



Obrázek 6.22: Eluční profil vzorku proteinu *Bmh1* Δ C M237Stop při aniontové výměnné chromatografii (vlevo). Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm a hnědá křivka je tvořena hodnotami vzrůstající konduktivity. V pravé části obrázku je 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí A4 až B11.

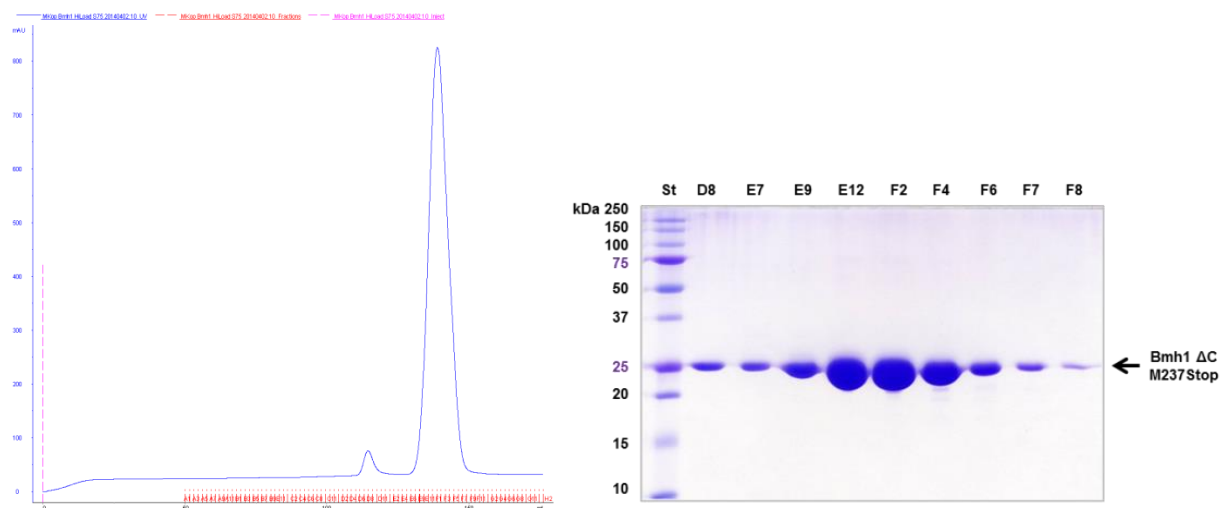
Frakce obsahující protein *Bmh1* Δ C M237Stop byly následně sloučeny a v dialýze štípány pomocí thrombinu z lidského séra. Pro dokonalé odštěpení N-koncové části byl použit thrombin (5 U na 1 mg). Štěpení probíhalo v dialýze přes noc při teplotě 4 °C. Úspěšnost štěpení byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE (viz obrázek 6.23).



Obrázek 6.23: Kontrola úspěšnosti odštěpení N-koncové části proteinu *Bmh1* Δ C M237Stop účinkem thrombinu provedená pomocí 15% SDS-PAGE. První dráha tohoto gelu obsahuje standard molekulových vah (St), druhá a třetí dráha obsahuje nenaštěpený vzorek proteinu *Bmh1* Δ C M237Stop a následující dráhy obsahují vzorky štěpeného proteinu odebírané v průběhu štěpicí reakce s thrombinem.

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie prováděná na koloně Hiload 20/60 SuperdexTM 75 pg pomocí přístroje FPLC-AKTA. Výsledný eluční

profil proteinu Bmh1 Δ C M237Stop a následná analýza čistoty proteinových frakcí pomocí 15% SDS-PAGE jsou uvedeny na obrázku 6.24. Při přípravě Bmh1 Δ C M237Stop bylo získáno přibližně 50 mg proteinu ze tří litrů bakteriální kultury. Protein byl získán ve vysoké čistotě a v neagregovaném stavu.



Obrázek 6.24: Eluční profil vzorku Bmh1 Δ C M237Stop z gelové permeační chromatografie na koloně Hiload 20/60 SuperdexTM 75 je zobrazen vlevo. Modrá křivka obsahuje hodnoty absorbance naměřené při 280 nm. V pravé části obrázku se nachází 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí D8 až F8.

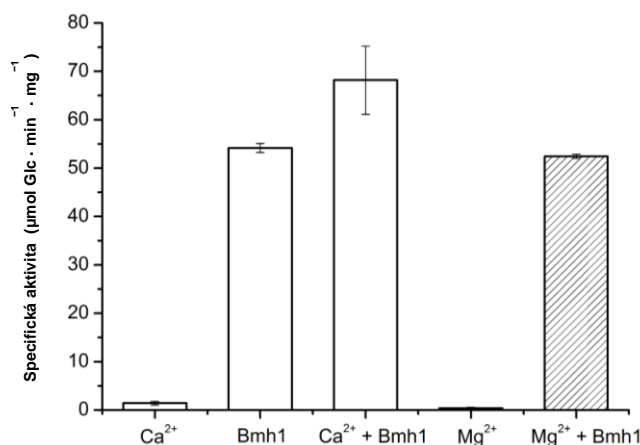
6.2 Biofyzikální charakterizace

Hlavní náplní této disertační práce byla strukturní charakterizace neutrální trehalasy Nth1, objasnění mechanismu její aktivace a strukturních změn, které nastávají při tvorbě komplexu pNth1:Bmh1. Pomocí cílené bodové mutagenese bylo připraveno několik mutantních forem Nth1 a následně probíhala jejich biofyzikální charakterizace. Pro sledování vazebné afinity byly použity metoda nativní TBE-PAGE a analytická ultracentrifugace (AUC). Zatímco nativní TBE-PAGE nám poskytla pouze orientační srovnání vazebných afinit, pomocí AUC bylo možné získat navíc disociační konstanty měřených proteinových komplexů. Pro ověření vlivu jednobodových mutací na aktivitu pNth1 byla stanovena enzymová aktivita těchto proteinů. Vliv mutací na strukturu a teplotní stabilitu Nth1 byl studován pomocí metod cirkulárního dichroismu (CD) a diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). Pro studium struktury proteinů Nth1, Bmh1 a jejich komplexu byly použity metody H/D výměny a chemického zesílení spojených s MS, CD spektroskopie a malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS).

6.2.1 Stanovení enzymové aktivity pNth1 WT

Doposud bylo prokázáno, že enzymová aktivita neutrální trehalasy Nth1 pocházející z *S. cerevisiae* je regulována vazbou proteinu Bmh1 závislou na předchozí fosforylaci pomocí PKA. Dále se předpokládá, že svoji roli v procesu regulace aktivity tohoto enzymu mají i kationty Ca^{2+} . Mechanismus a výsledky jejich účinku nebyly doposud plně objasněny (Panni et al. 2008; Veisova et al. 2012; Schepers et al. 2012). Z tohoto důvodu byla stanovena enzymová aktivita fosforylované pNth1 v přítomnosti proteinu Bmh1 a/nebo kationtů Ca^{2+} nebo Mg^{2+} (viz Obrázek 6.25). Všechny experimenty byly prováděny v přítomnosti 30 mM trehalosy. Vzorek pNth1 v přítomnosti samotného proteinu Bmh1, z důvodu omezení možného vlivu dvojmocných kationtů, obsahoval navíc 1 mM EDTA nebo 1 mM EGTA.

Z výsledků je patrné, že aktivita pNth1 závislá pouze na přítomnosti kationtů Ca^{2+} , je velice nízká. Aktivita naměřená v přítomnosti proteinů Bmh1 je mnohem vyšší. Nejvyšších hodnot pak dosahuje aktivita naměřená v přítomnosti Ca^{2+} a Bmh1. Výsledky aktivace pNth1 pomocí proteinu Bmh1 měřené v přítomnosti 1 mM EDTA nebo EGTA se shodovaly, proto jsou v grafu uvedeny pouze hodnoty naměřené v přítomnosti 1 mM EDTA. Tyto aktivity ($54 \mu\text{mol Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) jsou nicméně nižší než aktivity měřené v nepřítomnosti EDTA nebo EGTA, které dosahovaly hodnot 64 až $66 \mu\text{mol Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Veisova et al. 2012). Vliv kationtů Mg^{2+} nebyl prokázán. Hodnoty aktivit pNth1 naměřené v přítomnosti Mg^{2+} a Bmh1 odpovídaly hodnotám naměřeným v přítomnosti proteinů Bmh1 samotných.



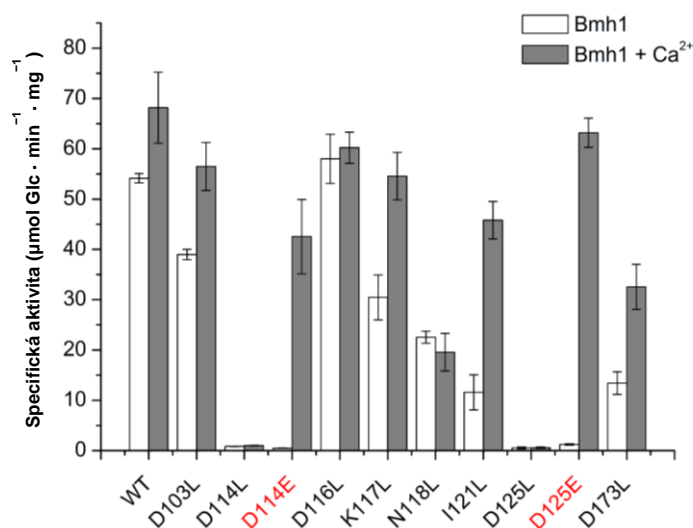
Obrázek 6.25: Porovnání specifických enzymových aktivit pNth1 WT měřených za různých podmínek v přítomnosti 30 mM trehalosy. Specifická aktivita neutrální trehalasy pNth1 je vyjádřena pomocí látkového množství glukosy (μmol) vyprodukovaného za jednu minutu jedním miligramem proteinu. Sloupcové grafy a směrodatné odchylky jsou výsledkem průměru tří nezávislých měření (Kopecka et al. 2014).

6.2.2 Stanovení enzymové aktivity mutantních forem pNth1

Při výzkumu úlohy kationtů Ca^{2+} v regulaci aktivity Nth1 jsme se inspirovali výzkumy prováděnými na neutrální trehalase pocházející ze *S. pombe*. Tyto studie prokázaly, že aktivace neutrální trehalasy závislá na přítomnosti kationtů Ca^{2+} je zprostředkovávána Ca-vazebnou doménou tohoto enzymu (Franco et al. 2003). Právě tato doména obsahuje tzv. EF-hand motiv, který je konzervovaný mezi velkým počtem Ca-vazebných proteinů. Na základě skutečnosti, že Nth1 pocházející z *S. cerevisiae* obsahuje právě takovýto motiv (sekvence $\text{D}^{114}\text{TDKNYQITIED}^{125}$), bylo pro výzkum důležitosti a funkce tohoto motivu navrženo a vyrobeno deset jednobodových mutantních forem Nth1 v rámci konzervovaných i nekonzervovaných pozic tohoto motivu (Rashidi et al. 1999; Lewit-Bentley a Réty 2000). Dále byly vyrobeny také dvě mutantní formy Nth1 obsahující mutace z oblastí sousedících s EF-hand motivem (D103L a D173L). Poslední dvě mutantní formy byly vyrobeny dodatečně, na základě výsledků pozorovaných při měření vodík/deuteriové výměny spojené s MS. V rámci EF-hand motivu byly mutovány aminokyselinové zbytky umístěné na konzervovaných pozicích 1, 3, 5 a 12 (D114L, D116L, D118L a D125L) a patrně se účastníci koordinační vazby s ionty vázaných kovů. V rámci motivu byly také provedeny mutace na nekonzervovaných pozicích 4 a 8 (K117L a I121L). Tyto dva aminokyselinové zbytky se neúčastní vazby kovů, ale u isoleucinu 121 se předpokládá, že má význam pro správnou konformaci motivu. Mutace K117L byla navržena pouze jako negativní kontrola (Rashidi et al. 1999; Lewit-Bentley a Réty 2000). Byla stanovena enzymová aktivita všech vyrobených mutantních forem pNth1 v přítomnosti proteinů Bmh1 samotných nebo současně s kationty Ca^{2+} (viz obrázek 6.26, str. 95). Měření byla prováděna v přítomnosti 30 mM trehalosy.

V nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} vykazovaly všechny mutantní formy nižší enzymové aktivity závislé na přítomnosti proteinu Bmh1. Jedinou výjimkou z tohoto pravidla byla mutantní forma pNth1 D116L. Přítomnost kationtů Ca^{2+} současně s proteiny Bmh1 zvýšila aktivity většiny měřených mutantních forem pNth1. Tento efekt nebyl pozorován pouze u forem pNth1 D114L, N118L, a D125L. Navíc pNth1 D114L a D125L zůstávaly neaktivní v případě všech měřených podmínek. Poslední dva zmíněné mutantní proteiny obsahovaly jednobodové mutace aminokyselinových zbytků klíčových pro koordinační vazbu iontů kovů. Jejich nahrazení za leucin mělo negativní efekt jak na aktivity měřené v přítomnosti vápníku, tak na aktivitu měřenou v přítomnosti samotného proteinu Bmh1. Pro výzkum významu D114 a D125 ohraničujících EF-hand motiv Nth1 byla za stejných podmínek měřena enzymová aktivita mutantních forem pNth1 D114E a D125E. Tyto mutace měřeným mutantním enzymům pNth1 pravděpodobně vrátily jejich schopnost vázat kationty Ca^{2+} a schopnost aktivace v přítomnosti

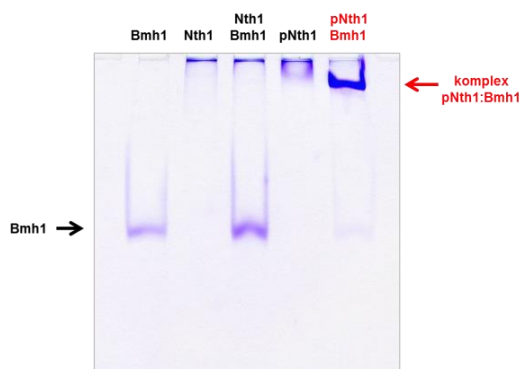
Bmh1 a kationtů Ca^{2+} . Avšak jejich enzymová aktivita v přítomnosti samotných proteinů Bmh1 obnovena nebyla. Na druhou stranu mutantní formy pNth1 D114E a D125E, díky kterým byla mutantní pNth1 pravděpodobně schopna znovu vázat kationty Ca^{2+} , vykazovaly vysoké aktivity závislé na přítomnosti proteinů Bmh1, ale pouze za současné přítomnosti kationtů Ca^{2+} . Z těchto výsledků vyplývá, že strukturní integrita EF-hand motivu je klíčová pro aktivaci pNth1 zprostředkovanou proteiny Bmh1 a že vazba kationtů Ca^{2+} napomáhá a usnadňuje proces aktivace, pravděpodobně díky stabilizačnímu vlivu na strukturu EF-hand motivu.



Obrázek 6.26: Porovnání specifických enzymových aktivit pNth1 WT a jejích mutantních forem měřených v přítomnosti 30 mM trehalosy. Specifické aktivity naměřené v přítomnosti proteinů Bmh1 samotných jsou znázorněny bílými sloupci a specifické aktivity naměřené v přítomnosti proteinů Bmh1 a kationtů Ca^{2+} jsou znázorněny sloupci šedými. Specifická aktivita neutrální trehalosy pNth1 je vyjádřena pomocí látkového množství glukosy (μmol) vyprodukovaného za jednu minutu jedním miligramem proteinu. Sloupcové grafy a směrodatné odchylky jsou výsledkem průměru tří nezávislých měření (Kopecka et al. 2014).

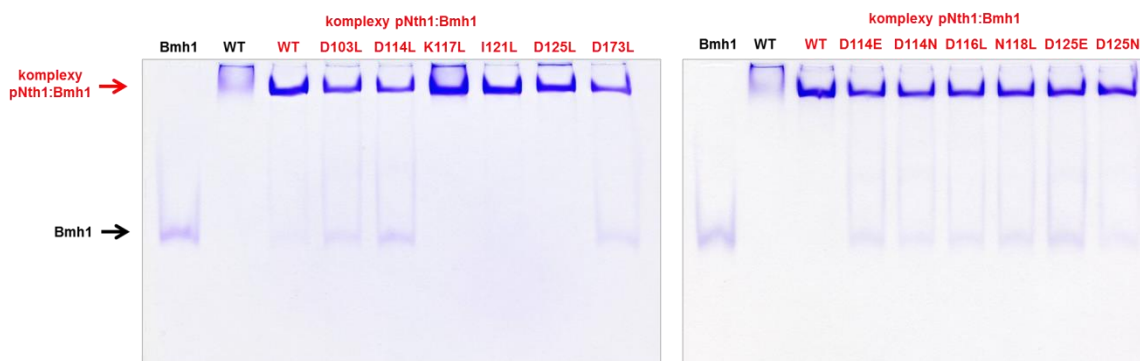
6.2.3 Ověřování vazby proteinů Bmh1 na pNth1 pomocí nativní TBE elektroforézy

Schopnost fosforylované Nth1 WT a jejích mutantních forem vázat protein Bmh1 WT byla ověřena pomocí nativní 12% TBE-polyakrylamidové gelové elektroforézy (TBE-PAGE). V prvním experimentu bylo potvrzeno, že vazba proteinu Bmh1 na Nth1 WT je závislá na fosforylaci Nth1 pomocí PKA (viz obrázek 6.27, str. 96). Proteiny byly míchány v molárním poměru 1:2 (Nth1:Bmh1). V případě směsi proteinu Bmh1 s nefosforylovanou Nth1 nedochází ke vzniku proteinového komplexu (ve třetí dráze je vidět pouze samotný protein Bmh1).



Obrázek 6.27: Výsledný 12% gel z nativní TBE-PAGE dokazující závislost vazby proteinu *Bmh1* na fosforylaci proteinu *Nth1*. V první dráze je protein *Bmh1* (72 pmol), ve druhé dráze je nefosforylovaná *Nth1* (36 pmol), ve třetí dráze je směs nefosforylované *Nth1* a proteinu *Bmh1* v molárním poměru 1:2 (36:72 pmol), ve čtvrté dráze je fosforylovaná *pNth1* (36 pmol) a v poslední dráze je komplex fosforylované *pNth1* s proteinem *Bmh1* smíchaných v molárním poměru 1:2 (36:72 pmol) (Macakova et al. 2013).

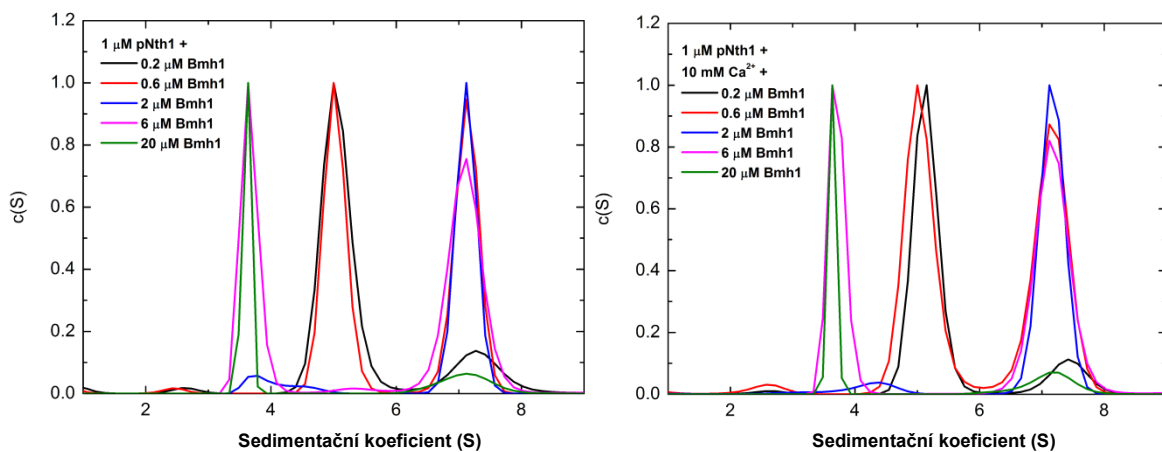
Při ověřování schopnosti všech dvanácti fosforylovaných mutantních forem *pNth1* vázat proteiny *Bmh1* WT, nebyly pomocí 12% nativní TBE-PAGE prokázány žádné podstatné odchylky od *pNth1* WT. Všechny fosforylované mutantní formy *pNth1* D103L, D114L, D114E, D114N, D116L, K117L, N118L, I121L, D125L, D125E, D125N i D173L společně vytvářely komplexy s proteinem *Bmh1* (viz obrázek 6.28). Molární poměr proteinu *pNth1*:*Bmh1* byl 1:2.



Obrázek 6.28: Výsledné 12% gely z nativní TBE-PAGE prokazující tvorbu komplexu všech fosforylovaných mutantních forem *pNth1* s proteinem *Bmh1*. Molární poměr obou proteinů byl 1:2 (*pNth1*:*Bmh1*). Jednotlivé vzorky obsahovaly 60 pmol proteinu *Bmh1* a 30 pmol *pNth1* WT nebo jeho mutantních verzí. V první dráze každého z gelů je samotný protein *Bmh1* a ve druhé samotný *pNth1* WT. Třetí dráhy obsahují komplexy *pNth1* WT:*Bmh1*. Dráhy 4 až 9 na obou gelech obsahují proteinové komplexy *pNth1*: *Bmh1* jednotlivých mutantních forem *Nth1*.

6.2.4 Studium vlivu kationtů Ca^{2+} na stabilitu komplexu pNth1:Bmh1

Studium vlivu kationtů Ca^{2+} na disociační konstantu komplexu pNth1:Bmh1 pomocí sedimentační analýzy bylo prováděno na základě výsledků zjištěných při měření enzymové aktivity pNth1. Tato měření odhalila, že protein pNth1 a některé jeho mutantní formy vykazují vyšší aktivity v přítomnosti proteinů Bmh1 současně s kationty Ca^{2+} , ve srovnání s aktivitami pNth1 naměřenými pouze v přítomnosti proteinů Bmh1 (viz kapitola 6.2.2, str. 94). Z tohoto důvodu bylo nutné pomocí analytické ultracentrifugace ověřit možnost, zda přítomnost kationtů Ca^{2+} nezvyšuje stabilitu proteinového komplexu pNth1:Bmh1. Při sedimentační analýze byla sledována kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů ($c(S)$) směsí proteinu pNth1 s proteinem Bmh1 v pěti různých molárních poměrech (od 5:1 do 1:20). Koncentrace pNth1 byla u všech experimentů totožná (1 μM). Stejná měření probíhala vždy v přítomnosti a nepřítomnosti 10 mM kationtů Ca^{2+} (viz obrázek 6.29).



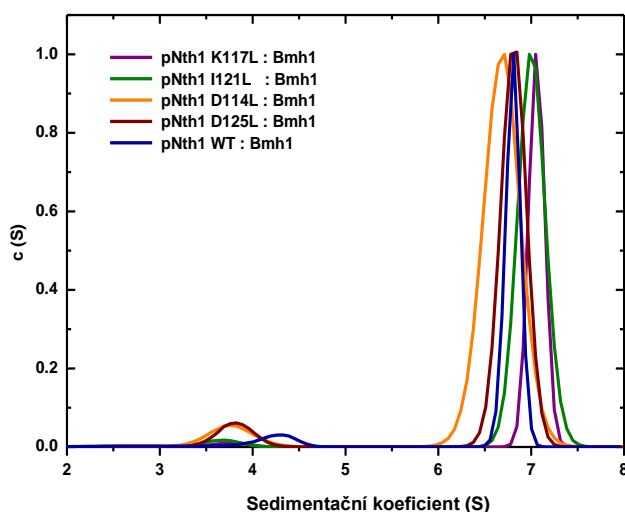
Obrázek 6.29: Graf zobrazující výsledky sedimentační analýzy komplexů proteinů Bmh1 s fosforylovanou Nth1 WT v přítomnosti kationtů Ca^{2+} (vpravo) a v jejich nepřítomnosti (vlevo). Na obou obrázcích jsou zobrazeny distribuce sedimentačních koeficientů ($c(S)$) směsí obsahujících různé koncentrace proteinů Bmh1 a konstantní koncentraci pNth1. Sedimentační analýza neodhalila žádné výrazné rozdíly ve vazebné afinitě pNth1 k proteinům Bmh1 způsobené přítomností kationtů Ca^{2+} (Kopecka et al. 2014).

Distribuce normalizované na výšku píku ukazují, že Bmh1 a pNth1 tvoří komplex, který má sedimentační koeficient normalizovaný na výšku píku ($s_{w,20}$) roven 7,2 S. Samotný protein Bmh1 má samostatný pík rovný hodnotě 3,6 S a pík samotné pNth1 je u hodnoty 5,1 S. Nízké zastoupení proteinů ve formě komplexu v případech, kdy směs obsahovala příliš nízké nebo příliš vysoké koncentrace proteinu Bmh1 (0,2 μM nebo 20 μM), byla způsobena velkým přebytkem pNth1 nebo proteinu Bmh1 ve směsi.

Analýza dat získaných sedimentační analýzou byla provedena pomocí programu SEDPHAT (Dam et al. 2005). Pro výsledky získané v přítomnosti a v nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} byl použit model $A + B \rightleftharpoons AB$. Protein Bmh1 byl modelován jako pevný dimer, který interaguje s pNth1 v poměru 1:1. Nebyl prokázán žádný vliv kationtů Ca^{2+} na rovnovážnou disociační konstantu (K_d) komplexu pNth1:Bmh1. Rovnovážná disociační konstanta komplexu v přítomnosti i nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} byla stanovena 10 nM. Z tohoto výsledku vyplývá, že účinnější aktivace pNth1 v přítomnosti proteinů Bmh1 a kationtů Ca^{2+} nemůže být vysvětlena nárůstem vazebné afinity pNth1 pro proteiny Bmh1.

6.2.5 Sedimentační analýza mutantních forem pNth1

Schopnost některých vybraných mutantních forem pNth1 vázat proteiny Bmh1 byla ověřena pomocí analytické ultracentrifugace (viz obrázek 6.30). Bylo potvrzeno, že testované mutantní formy pNth1 D114L, K117L, I121L a D125L nevykazují žádné odlišné chování v případě tvorby komplexů s proteinem Bmh1 v porovnání s pNth1 WT. Molární poměr proteinů byl vždy 1:2 (pNth1:Bmh1).

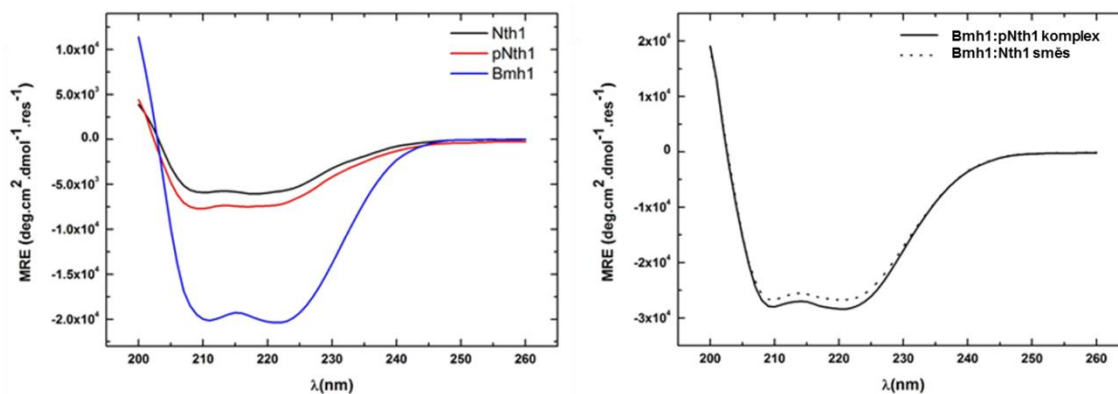


Obrázek 6.30: Graf zobrazující výsledky sedimentační analýzy komplexů proteinů Bmh1 s fosforylovanou pNth1 WT a jejími mutantními formami. Molární poměr pNth1 k proteinům Bmh1 byl 1:2. Sedimentační analýza neodhalila žádné významné rozdíly ve vazebných afinitách mutantních pNth1 k proteinům Bmh1 v porovnání s pNth1 WT. Výsledek získaný z komplexu s pNth1 WT je zobrazen modře, z komplexu s pNth1 K117L fialově, z komplexu s pNth1 I121L zeleně, z komplexu s pNth1 D114L oranžově a z komplexu s pNth1 D125L hnědě.

6.2.6 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD) je standardní technikou pro studium struktury proteinů v roztoku. CD spektra měřená ve vzdálené i v blízké UV oblasti byla použita k ověření vlivu jednobodových mutací Nth1 na sekundární i terciární strukturu těchto proteinů. Pomocí CD spektroskopie byl také zkoumán vliv kationtů Ca^{2+} a proteinů Bmh1 na strukturu Nth1. U všech měření směsí proteinů Bmh1 s proteiny Nth1 nebo komplexů Bmh1:pNth1 byl molární poměr proteinů 2:1 (Bmh1:Nth1). Uváděné výsledné grafy obsahují průměrné reziduální elipticity (MRE) vynesené jako funkce vlnové délky (λ).

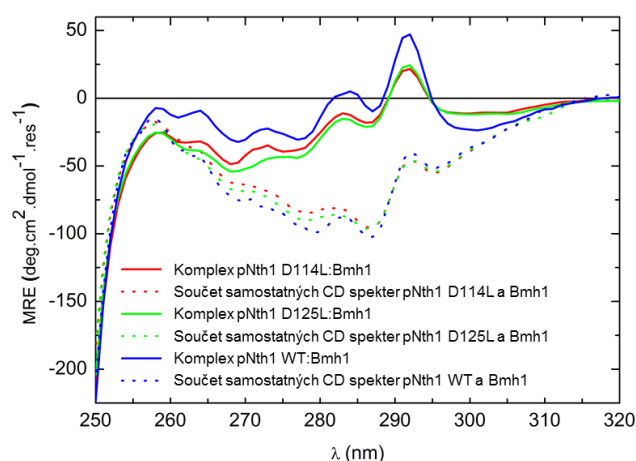
Při porovnání CD spektra měřeného ve vzdálené UV oblasti na proteinovém komplexu pNth1:Bmh1 a CD spektra měřeného za stejných podmínek na směsi proteinu Bmh1 s nefosforylovaným proteinem Nth1 nebyly pozorovány žádné významné změny zastoupení jednotlivých sekundárních struktur (viz obrázek 6.31, vpravo). Tuto skutečnost je možné ověřit sečtením spekter samotné pNth1 a samotného proteinu Bmh1, které poskytuje prakticky stejný výsledek, jaký byl naměřen na komplexu těchto dvou proteinů. V levé části obrázku 6.31 jsou pro porovnání zobrazena samostatná CD spektra proteinů Bmh1, nefosforylované Nth1 a fosforylované pNth1.



Obrázek 6.31: Grafy CD spekter proteinů Bmh1, Nth1, pNth1, jejich směsi a komplexu měřených ve vzdálené UV oblasti. Levý graf obsahuje spektrum nefosforylované Nth1 znázorněné černě a spektrum její fosforylované formy pNth1, které je znázorněno červeně. Spektrum proteinu Bmh1 má modrou barvu. Graf vpravo obsahuje porovnání CD spektra směsi nefosforylované Nth1 s proteinem Bmh1 (znázorněno tečkovanou čarou) se spektrem proteinového komplexu pNth1:Bmh1 (znázorněno plnou čarou). Molární poměr proteinů Nth1:Bmh1 ve směsi i v komplexu byl 1:2. Střední zbytkové elipticity (MRE) jsou vyneseny jako funkce vlnové délky (λ) a vyjádřeny v $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \text{ res}^{-1}$ (Macakova et al. 2013).

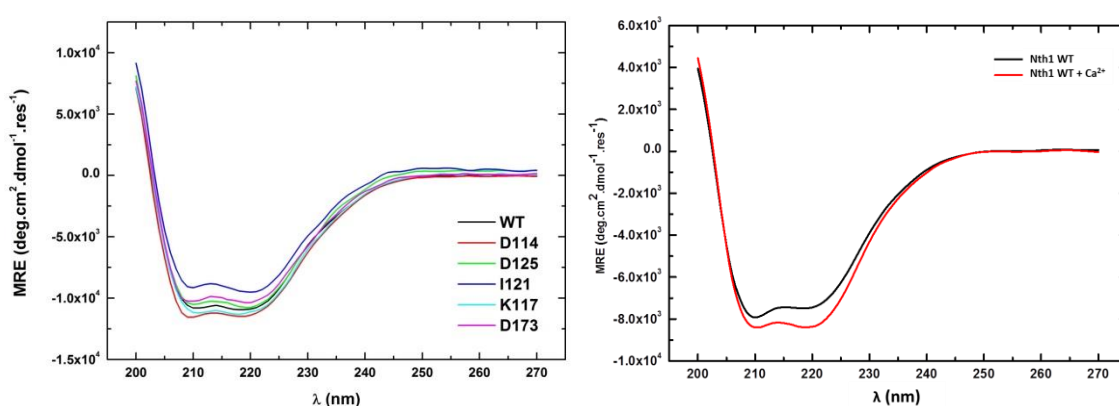
Vyhodnocení orientačního zastoupení sekundárních struktur bylo provedeno pomocí programu dostupného z internetové stránky Dichroweb (Whitmore a Wallace 2004) a odhalilo, že nefosforylovaná Nth1 obsahuje: ~ 26 % α -helikálních struktur, ~ 24 % β -struktury a ~ 50 % neuspořádaných oblastí. U fosforylované formy pNth1 byl výsledek následující: ~ 31 % α -helikálních struktur, ~ 17 % β -struktury a ~ 52 % neuspořádaných oblastí. Protein Bmh1 obsahoval: ~ 84 % α -helikálních struktur a ~ 16 % neuspořádaných oblastí. Všechny tyto hodnoty se dobře shodují s teoreticky odvozenými strukturami jednotlivých testovaných proteinů.

Po nemožnosti odhalit změny struktury pNth1 vyvolané tvorbou komplexu s proteinem Bmh1 pomocí měření CD ve vzdálené UV oblasti, byla provedena měření CD v blízké UV oblasti. Tato spektra odhalila zásadní změny v terciární struktuře vyvolané tvorbou komplexu proteinů pNth1:Bmh1. Největší změny byly pozorovány v oblasti od 260 nm do 310 nm při porovnání součtu spekter samotných proteinů Bmh1 a pNth1 se spektrem jejich proteinového komplexu (viz obrázek 6.32).



Obrázek 6.32: Graf CD spekter proteinových komplexů a součtů spekter samotných proteinů pNth1 WT, pNth1 D114L a Nth1 D125L s proteiny Bmh1 s měřeních v blízké UV oblasti. Spektra komplexů jsou vyznačena plnými čarami – komplex pNth1 WT:Bmh1 (modře), pNth1 D114L:Bmh1 (červeně) a pNth1 D125L:Bmh1 (zeleně). Spektra tvořená součtem samostatných spekter jednotlivých proteinů jsou zobrazena pomocí tečkovaných čar barevně odpovídajícím příslušným komplexům totožných proteinů. Střední zbytkové elipticity (MRE) jsou vyneseny jako funkce vlnové délky (λ) a vyjádřeny v $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{res}^{-1}$ (Kopecka et al. 2014).

Protože měření enzymové aktivity odhalilo, že mutantní formy pNth1 D114L a D125L nemohou být aktivovány v přítomnosti proteinů Bmh1 (viz kapitola 6.2.2, str. 94) a také protože nebyla odhalena jejich nižší afinita pro proteiny Bmh1 (viz kapitola 6.2.5, str. 95), byl měřením CD v blízké UV oblasti ověřen vliv těchto jednobodových mutací na terciární strukturu proteinů Nth1 v závislosti na tvorbě proteinového komplexu pNth1:Bmh1 (viz obrázek 6.32, str. 100). Ukázalo se, že obě mutantní formy vykazují podobný tvar spekter, jaká byla naměřena v případě komplexu pNth1 WT s proteinem Bmh1. Z těchto poznatků vyplývá, že neschopnost aktivace mutantních forem pNth1 D114L a D125L je patrně zapříčiněna drobnými rozdíly ve struktuře Ca-vazebné domény obsahující tzv. EF-hand motiv spíše, než konformační změnou vyvolanou vazbou proteinu Bmh1. Je velice pravděpodobné, že tyto malé změny v rámci Ca-vazebné domény není možné pozorovat pomocí metod CD spektroskopie.



Obrázek 6.33: Grafy CD spekter proteinů Nth1 WT a jejich mutantních forem měřených ve vzdálené UV oblasti. Levý graf obsahuje porovnání CD spekter mutantních forem Nth1 se spektrem Nth1 WT. Spektrum mutantní formy Nth1 D114L je znázorněno červeně, spektrum Nth1 K117L světle modře, spektrum Nth1 I121L tmavě modře, spektrum Nth1 D125L zeleně a spektrum Nth1 D173L fialově. Spektrum Nth1 WT má barvu černou. Pravý graf obsahuje porovnání spekter Nth1 WT v přítomnosti kationtů Ca^{2+} (červeně) a v jejich nepřítomnosti (černě). Všechny porovnávané proteiny z obou grafů mají přibližně stejné zastoupení jednotlivých sekundárních struktur. Střední zbytkové elipticity (MRE) jsou vyneseny jako funkce vlnové délky (λ) a vyjádřeny v $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{res}^{-1}$.

Pro ověření vlivu jednobodových mutací na sekundární strukturu Nth1 bylo použito měření CD spekter ve vzdálené UV oblasti (viz obrázek 6.33, vlevo). Tato měření neprokázala žádné významné změny sekundární struktury mutantních forem Nth1 D114L, K117L, I121L, D125L a D173L v porovnání s výsledky měření původní formy Nth1 WT. Stejný typ měření byl použit pro ověření vlivu kationtů Ca^{2+} na sekundární strukturu Nth1 WT (viz obrázek 6.33, vpravo).

Při orientačním vyhodnocení poměrného zastoupení jednotlivých sekundárních struktur bylo zjištěno, že Nth1 WT (i v přítomnosti kationtů Ca^{2+}) a všechny jeho mutantní formy obsahují ~ 30 % α -helikálních struktur, ~ 20 % β -struktur a ~ 50 % neuspořádaných oblastí. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu dostupného z internetové stránky Dichroweb (Whitmore a Wallace 2004).

6.2.7 Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF)

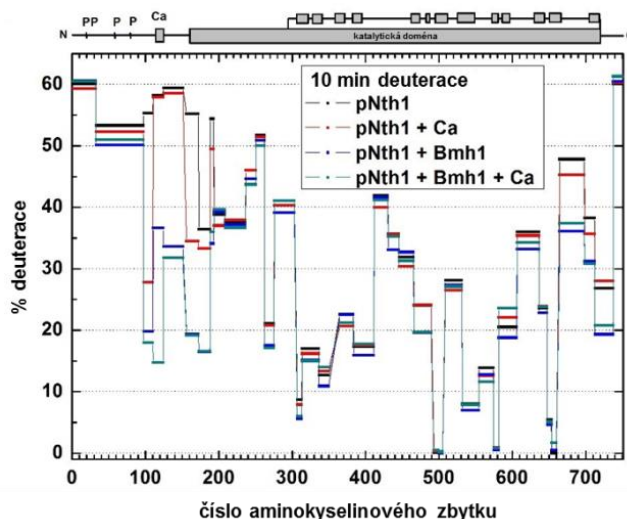
Pro ověření vlivu jednobodových mutací na stabilitu struktury Nth1 byla měřena teplotně indukovaná denaturace těchto proteinů pomocí diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). Výsledné teploty tání (T_m) odpovídající inflexním bodům denaturačních křivek jednotlivých mutantních forem Nth1 a jeho původní formy Nth1 WT byly vytvořeny jako průměrné hodnoty tří měření a jsou uvedeny v tabulce 6.1. Teplota tání proteinu Nth1 WT byla $53,6 \pm 0,3$ °C. S výjimkou mutantní formy Nth1 I121L, jejíž teplota tání byla přibližně $50,4 \pm 0,3$ °C, DSF neodhalila žádné výrazné změny v teplotní stabilitě mutantních forem Nth1 ve srovnání s Nth1 WT. Tato nižší teplota tání mutantní formy Nth1 I121L byla patrně způsobena jiným konformačním stavem EF-hand domény Nth1 způsobeným změnou isoleucinu na leucin. I121 je pravděpodobně aminokyselinovým zbytkem významným pro správnou konformaci EF-hand motivu (Rashidi et al. 1999).

Tabulka 6.1: Porovnání teplot tání (T_m) proteinu Nth1 WT a jeho mutantních forem získaných při sledování teplotně závislé denaturace měřené pomocí diferenční skenovací fluorimetrie (DSF) (Kopecka et al. 2014).

Forma Nth1	T_m (°C)
WT	$53,6 \pm 0,3$
D103L	$52,3 \pm 0,2$
D114L	$52,7 \pm 0,2$
D114E	$53,4 \pm 0,2$
D116L	$53,1 \pm 0,1$
K117L	$53,6 \pm 0,1$
N118L	$52,8 \pm 0,5$
I121L	$50,4 \pm 0,3$
D125L	$52,6 \pm 0,2$
D125E	$53,3 \pm 0,1$
D173L	$52,5 \pm 0,1$

6.2.8 Pozorování změn struktury pNth1 pomocí H/D výměny spojené s MS

Experimenty H/D výměny spojené s MS jsou založeny na pozorování kinetiky deuterace amidických vodíků peptidové vazby. Tato metoda umožňuje zmapování proteinové dynamiky a konformačních změn v závislosti na přístupnosti dané oblasti pro deuterované rozpouštědlo a na přítomnosti vodíkových vazeb v této oblasti (Engen 2009; Iacob a Engen 2012). Pro identifikaci oblastí proteinů pNth1 a Bmh1 (viz následující kapitola 6.2.9, str. 108) účastnících se protein-proteinové interakce a/nebo podléhající konformačním změnám způsobených vznikem komplexu pNth1:Bmh1 a/nebo vlivem kationtů Ca^{2+} bylo využito měření H/D výměny spojené s MS. Kinetika H/D výměny byla sledovaná na 255 peptidech z pNth1, které pokryly celkem 92 % sekvence pNth1 (viz příloha 1) (Kavan a Man 2011). Průběh kinetiky H/D výměny podél celé sekvence pNth1 je zobrazen na obrázku 6.34.

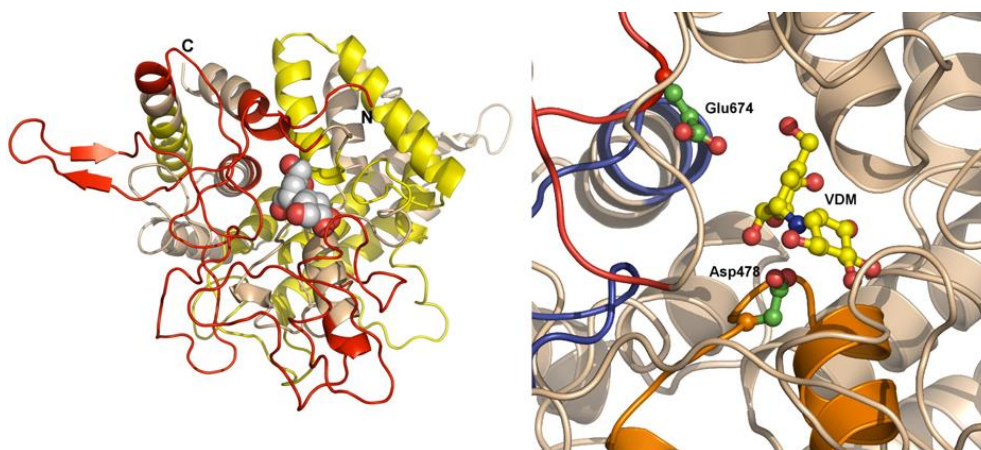


Obrázek 6.34: Míra deuterace naměřená na peptidech Nth1 dosažené po deseti minutách deuterace. Protein pNth1 byl nejdříve měřen samotný, poté v přítomnosti kationtů Ca^{2+} a/nebo v přítomnosti proteinů Bmh1. Molární poměr proteinů pNth1:Bmh1 byl 1:2. V horní části grafu jsou znázorněna PKA fosforylační místa, Ca-vazebná doména a katalytická doména Nth1.

Profil H/D výměny ukazuje procenta deuterace v čase 10 min od začátku výměny a to pro vybrané nepřekrývající se peptidy pokrývající celou sekvenci proteinu pNth1. Oblasti ze samotné pNth1 vykazující relativně rychlou kinetiku deuterace (rozsah deuterace je větší než 30 %, černé křivky) zahrnují N-koncovou část pNth1 obsahující PKA fosforylační místa (oblast 2–110), úsek obsahující Ca-vazebnou doménu (oblast 111–151) a několik oblastí z katalytické domény (oblasti 156–262, 276–303, 412–465, 607–636, 665–712 a 738–751). Vysoká rychlost izotopové výměny v těchto oblastech patrně vyplývá z jejich flexibility a/nebo dobré

přístupnosti pro rozpouštědlo. Profil kinetiky H/D výměny naměřený na pNth1 v přítomnosti kationtů Ca^{2+} je zobrazen červenou křivkou, v přítomnosti proteinu Bmh1 křivkou modrou a za přítomnosti proteinu Bmh1 i kationtů Ca^{2+} je znázorněn zeleně.

Pro vizualizaci strukturálních změn získaných z výsledků H/D výměny spojené s MS naměřené na proteinu pNth1 byl vytvořen homologní model katalytické domény tohoto proteinu (sekvence 295–721, viz obrázek 6.35), k čemuž posloužila jako předloha krystalová struktura trehalasy Tre37A pocházející z *E. coli* (Gibson et al. 2007). Sekvenční podobnost těchto dvou domén byla 42 % a jejich sekvenční shoda dosahovala 27 %. Zmíněný strukturální model se skládá z $(\alpha/\alpha)_6$ barelu shodného se strukturami, jaké byly nalezeny u jiných glykosidas a jehož aktivní centrum je skryté uvnitř struktury katalytické domény Nth1. Správnost našeho homologního modelu byla experimentálně ověřena pomocí chemického zesílení spojeného s MS (viz kapitola 6.2.10, str. 111).



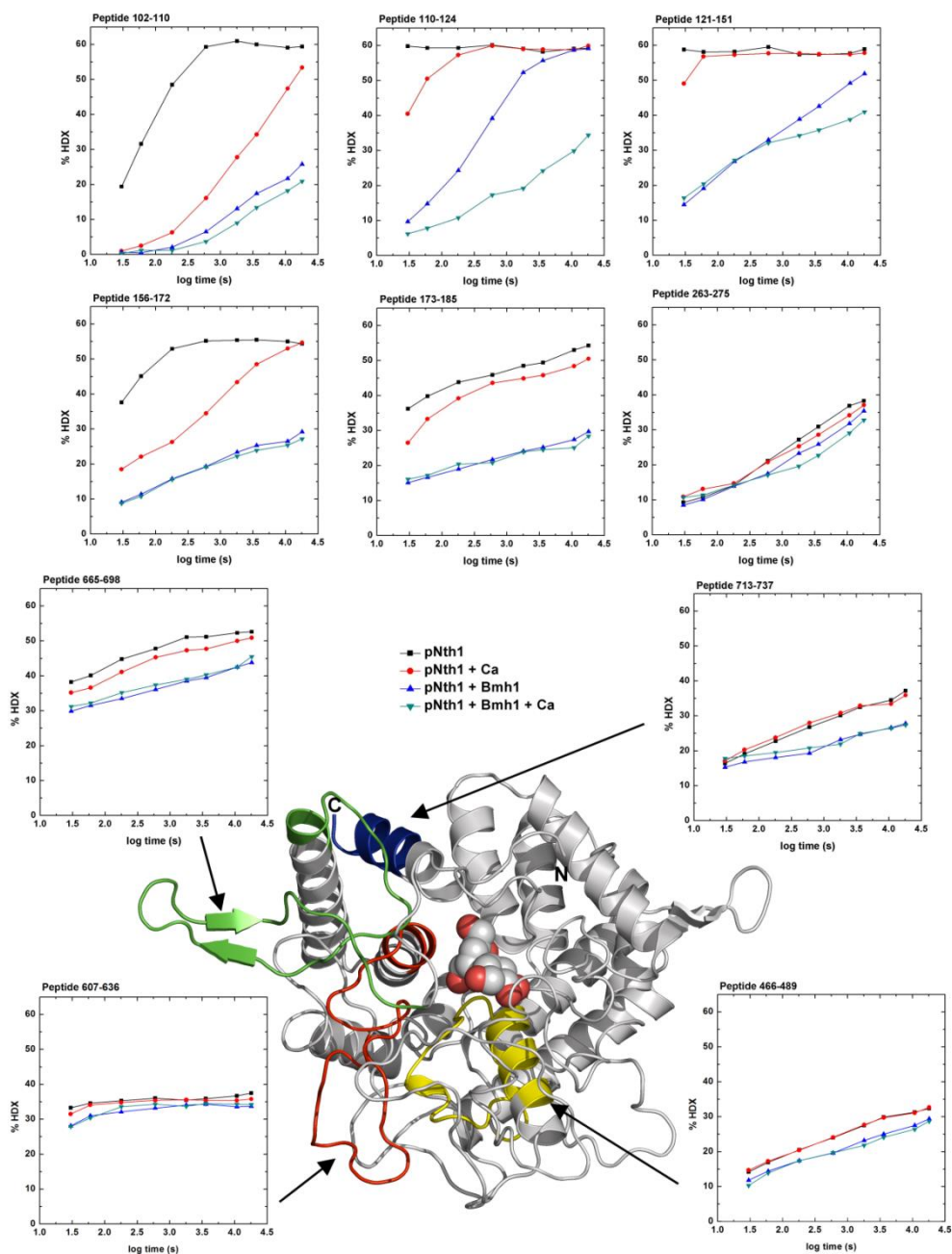
Obrázek 6.35: Homologní model katalytické domény Nth1 (sekvence 295–721, levá část obrázku). Oblasti, které vykazovaly rychlejší kinetiku H/D výměny obklopují aktivní centrum enzymu a jsou znázorněny červeně. Oblasti vykazující pomalejší kinetiku H/D výměny jsou zobrazeny žlutě. Aktivní centrum enzymu obsahuje inhibitor validoxylamin (VDM) zobrazený pomocí kulčkového modelu. Pravá část obrázku obsahuje detailní pohled do aktivního centra Nth1 obsahujícího VDM. Aminokyselinové zbytky Asp478 a Glu674 jsou ekvivalentní k Asp312 a Glu496 z trehalasy Tre37A pocházející z *E. coli*. Tyto dva aminokyselinové zbytky jsou v mechanismu hydrolyzy označovány jako katalytická kyselina (Asp312) a báze (Glu496) (Gibson et al. 2007; Macakova et al. 2013).

Oblasti pNth1 vykazující vyšší rychlost deuterace obklopují aktivní centrum enzymu, jsou více přístupné rozpouštědlu a jsou na modelu pNth1 znázorněny červeně (viz obrázek 6.36, str. 106). Na druhou stranu úseky, které vykazují pomalejší kinetiku H/D výměny (rozsah deuterace je nižší než 20 %) a zahrnují oblasti 307–350, 384–411, 493–505, 532–581 a 648–

660, jsou zvýrazněné žlutou barvou (viz obrázek 6.35, str. 104). Tyto žluté oblasti dobře odpovídají tvarům sekundární struktury (viz horní část obrázku 6.34, str. 103) a/nebo jsou skryty uvnitř struktury katalytické domény Nth1 a jsou méně dostupné pro deuterované rozpouštědlo. Díky těmto výsledkům můžeme náš model založený na homologní podobnosti s Tre37A považovat za smysluplný model katalytické domény Nth1.

Výsledky měření H/D výměny spojené s MS na pNth1 samotné nebo v přítomnosti kationtů Ca^{2+} a/nebo proteinů Bmh1 jsou spolu s homologním modelem katalytické domény Nth1 (sekvence 295–721) znázorněny na obrázku 6.36 (viz str. 106). Bylo prokázáno, že vazba proteinu Bmh1 způsobuje podstatné snížení kinetiky deuterace v několika oblastech Nth1 (porovnání černých a modrých křivek). Největší pokles v kinetice H/D výměny byl pozorován na peptidech z oblasti 98–193, kde se hladina deuterace (v čase 10 min) skokem snížila z počátečních 55–60 % v nepřítomnosti proteinu Bmh1 na konečných 20–35 % naměřených v přítomnosti proteinu Bmh1 (viz obrázky 6.34 a 6.36, str. 103 a 106). Oblasti, ve kterých je deuterace mírně ale prokazatelně snížena v závislosti na vazbě proteinu Bmh1, zahrnují peptidy z N-koncové části Nth1, kde se nachází vazebný motiv pro protein Bmh1 (33–97) a katalytická doména Nth1 (263–275, 307–313, 431–445, 466–489, 607–636 a 665–737). Pokles ve výměně vodíků za deuteria může být způsoben nižší dostupností pro rozpouštědlo a/nebo změnou polohy vodíkových vazeb v závislosti na vzniku komplexu pNth1:Bmh1. Tyto výsledky patrně odrážejí skutečnost, že zmíněné oblasti (nebo jejich části) tvoří vazebné rozhraní mezi pNth1 a proteinem Bmh1 nebo podléhají strukturní změně vyvolané vazbou proteinu Bmh1.

Náš strukturní model katalytické domény Nth1 bohužel neobsahuje nestrukturní N-koncovou část ani Ca-vazebnou doménu Nth1, protože Tre37A, která byla využita jako předloha pro tento model neobsahuje žádné homologní struktury k těmto oblastem (Gibson et al. 2007). Proto mohly být k našemu modelu přiřazeny jen peptidy pocházející z katalytické domény Nth1 (466–489, 607–636, 665–698 a 713–737). Jak je vidět na obrázku 6.36 (viz str. 106), strukturní model Nth1 ukazuje, že aktivní centrum Nth1 je skryté uvnitř struktury katalytické domény Nth1. Proto byla důvodná domněnka, že aktivace enzymu Nth1 vyžaduje konformační změnu, která způsobí odhalení struktury katalytické domény a umožnění přístupu substrátu do aktivního centra enzymu a naopak výstupu vzniklého produktu. Je pravděpodobné, že pozorovaný pokles v kinetice deuterace u oblastí obklopujících aktivní centrum enzymu Nth1 odráží právě takovouto strukturní změnu indukovanou vazbou proteinu Bmh1. Navíc se ukázalo, že vazba proteinu Bmh1 také ovlivňuje kinetiku deuterace úseků, které nejen že pocházejí z oblasti obklopující aktivní centrum, ale také obsahují aminokyselinové zbytky klíčové pro katalýzu (viz obrázek 6.35, str. 104).



Obrázek 6.36: Výsledky H/D výměny spojené s MS měření na pNth1. Grafy zobrazují oblasti pNth1, ve kterých docházelo k největším změnám v kinetice H/D výměny v závislosti na přítomnosti proteinu Bmh1 a/nebo kationtů Ca^{2+} . Peptidy pocházející z katalytické domény pNth1 jsou zvýrazněny na homologním strukturním modelu této domény (sekvence 295–721; zobrazeno žlutě, červeně, zeleně a modře). H/D výměna je vyjádřena v procentech vůči maximální teoretické hladině deuterace a je v případě pNth1 samotné znázorněna černě, za přítomnosti kationtů Ca^{2+} červeně, Bmh1 modře a v přítomnosti proteinů Bmh1 a kationtů Ca^{2+} zeleně (Kopecka et al. 2014).

Porovnání sekvencí využitých při výrobě homologního modelu katalytické domény Nth1 (viz obrázek 4.36, str. 106) odhalilo, že peptid 466–489 (zvýrazněný žlutě) a peptid 665–698 (zvýrazněný zeleně) obsahují aminokyselinové zbytky D478 a E674, které jsou ekvivalentní k D312 a E496 z trehalasy Tre37A pocházející z *E. coli* (viz obrázek 6.35, str. 104). Právě tyto dva aminokyselinové zbytky jsou označovány jako katalytická kyselina (D312) a báze (E496) (Gibson et al. 2007). Zdá se tedy, že vazba proteinu Bmh1 ovlivňuje také strukturní vlastnosti aminokyselinových zbytků, které tvoří aktivní centrum enzymu Nth1. Minoritní pokles v hladině deuterace (přibližně 4 % v době 1 min) způsobený vazbou proteinu Bmh1 byl také pozorován v N-koncové části pNth1 (33–97), která obsahuje obě fosforylační místa S60 a S83, která jsou zásadní pro vazbu proteinu Bmh1 na pNth1. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny vazbou pNth1 do ligand-vazebného žlábků proteinu Bmh1 (Veisova et al. 2012). Skutečnost, že v nepřítomnosti proteinu Bmh1 je hladina deuterace této části pNth1 vysoká (~50–60 %) je v dobré shodě s predikcí sekundární struktury, ve které se tato část Nth1 jeví jako flexibilní a vysoce nestrukturní oblast (viz obrázek 6.34, str. 103). To je také důvodem, proč nejsou změny v hladině deuterace vyvolané vazbou proteinu Bmh1 tak viditelné. Flexibilní N-koncová část parně podléhá tak rychlé H/D výměně, že informace o ní jsou během analýzy téměř nebo úplně ztraceny.

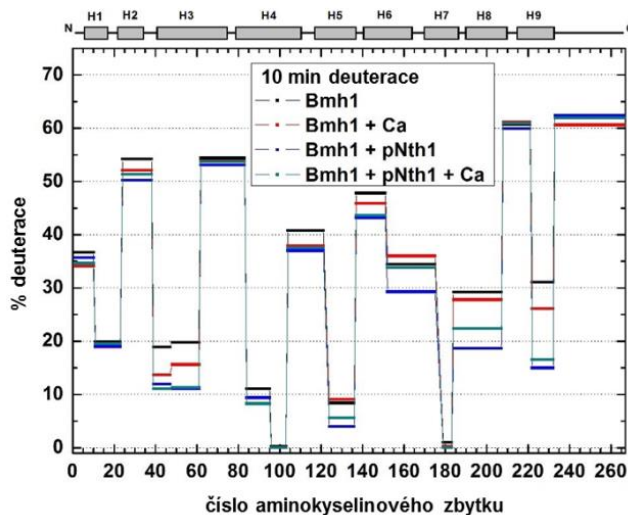
Na základě studií prokazujících skutečnost, že mnoho Ca-vazebných proteinů obsahujících EF-hand motiv mění svoji konformaci po navázání kationtů Ca^{2+} (Lewit-Bentley a Réty 2000), byly navrženy experimenty měření kinetiky H/D na pNth1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} . Při porovnání výsledků měření za zmíněných podmínek jsou vidět největší rozdíly v kinetice deuterace na pěti peptidech pocházejících z oblasti EF-hand motivu pNth1. Peptidy 102–110, 110–124 a 156–172 vykazovaly prokazatelně pomalejší deuteraci v přítomnosti kationtů Ca^{2+} (viz porovnání černých a červených křivek na obrázku 6.36, (viz str. 106). Peptid 110–124 obsahující EF-hand motiv vykazoval pomalejší izotopovou výměnu pouze při krátkých inkubačních časech. Větší pokles v rychlosti deuterace byl pozorován pro všechny peptidy pocházející z oblasti mezi aminokyselinovými zbytky 102 a 185, v případě jejich měření v přítomnosti proteinů Bmh1 a kationtů Ca^{2+} současně (porovnání modrých a zelených křivek).

Pozorované změny v kinetice H/D výměny mohou být obrazem konformačních změn pNth1 a/nebo snížení přístupnosti dané oblasti pro rozpouštědlo. Pouze peptid 110–124 vykazoval významné změny v kinetice izotopové výměny při porovnání dat naměřených na komplexu pNth1:Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} . Tyto výsledky ukazují, že oblast 102–185 a především peptid 110–124, který obsahuje EF-hand motiv, zaujímá tři různé strukturní stavy v závislosti na přítomnosti kationtů Ca^{2+} , proteinu Bmh1 a obou dohromady.

Kinetika H/D výměny naměřená na čtyřech peptidech z blízkosti aktivního centra pNth1, jejichž deuterace byla prokazatelně snížena závislosti na vazbě proteinu Bmh1, ukázala, že pouze peptid 665–698 vykazuje pokles v kinetice deuterace v přítomnosti kationtů Ca^{2+} (patrné při porovnání černých a červených křivek, viz obrázek 6.36, str. 106). Přítomnost kationtů Ca^{2+} však nemá žádný významný vliv na kinetiku isotopové výměny těchto čtyř peptidů za přítomnosti proteinu Bmh1 (porovnání modrých a zelených křivek). Tyto výsledky naznačují, že vazba kationtů Ca^{2+} ovlivňuje hlavně strukturu oblasti pNth1 obsahující EF-hand motiv, zatímco vliv kationtů Ca^{2+} na strukturu katalytické domény je méně významný.

6.2.9 Pozorování změn struktury proteinů Bmh1 pomocí H/D výměny spojené s MS

Měření H/D výměny spojené s MS bylo využito také pro studium vazebného povrchu proteinu Bmh1. Kinetika H/D výměny byla sledována na 61 peptidech pokrývajících 99 % sekvence tohoto proteinu (viz příloha 1) (Kavan a Man 2011). Hladiny deuterace naměřené po deseti minutách deuterace se nachází na obrázku 6.37. Profil izotopové výměny samotného proteinu Bmh1 znázorňují černé křivky. Profil proteinu Bmh1 v přítomnosti pNth1 je znázorněn modře, v přítomnosti kationtů Ca^{2+} má červenou barvu a profil v přítomnosti pNth1 a kationtů Ca^{2+} má barvu zelenou. Profil samotného proteinu Bmh1 obsahuje periodicky se střídající oblasti rychlé a pomalé deuterální kinetiky, které se dobře shodují se známými strukturami proteinů 14-3-3.

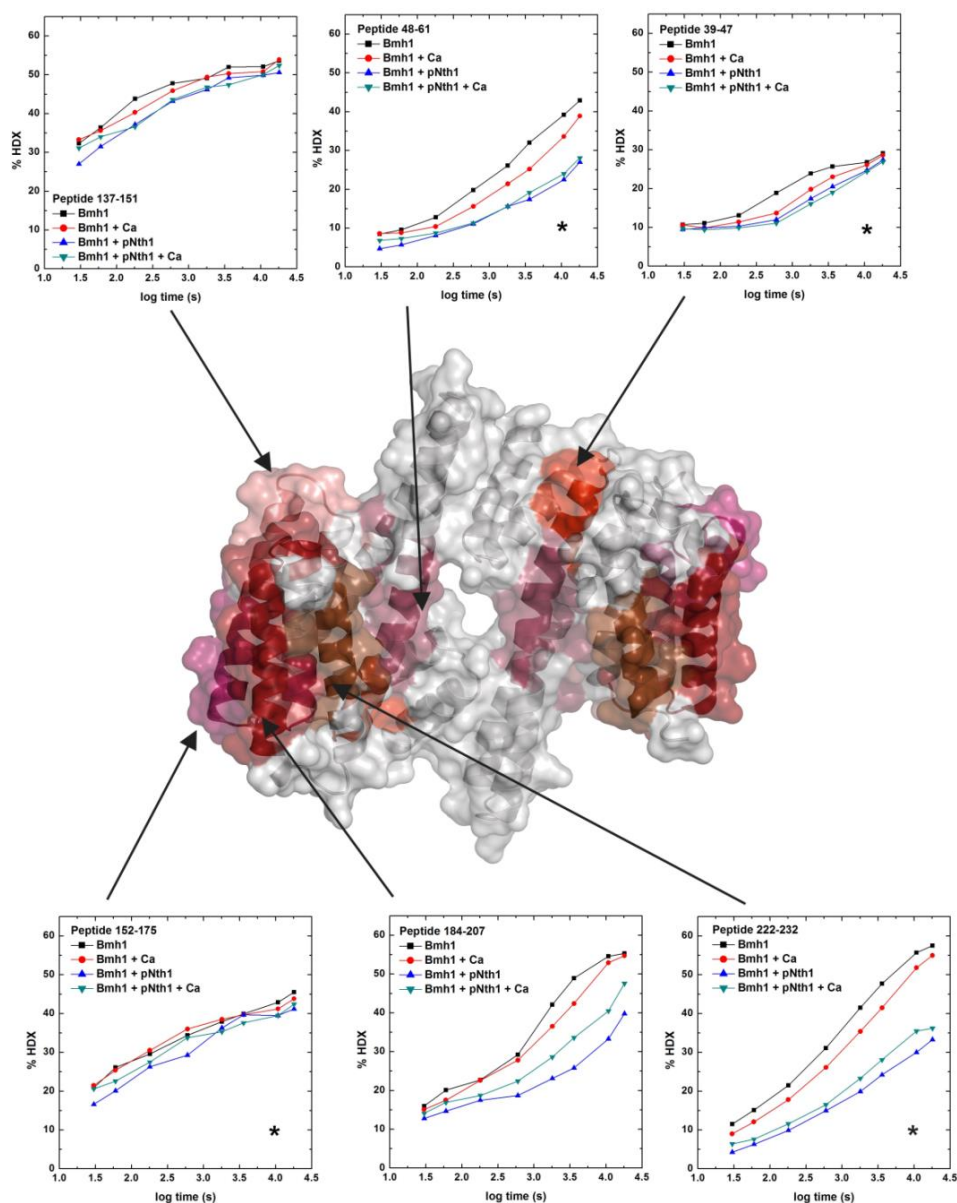


Obrázek 6.37: Hladiny deuterace naměřené na peptidech proteinu Bmh1 dosažené po deseti minutách deuterace. Protein Bmh1 byl měřen jak samotný, tak v přítomnosti kationtů Ca^{2+} a/nebo v přítomnosti pNth1. Molární poměr proteinů pNth1:Bmh1 byl 1:2. V horní části grafu obsahující hladiny deuterace proteinu Bmh1 jsou označeny pozice a čísla jednotlivých α -helixů.

Pro získání strukturního výkladu výsledků H/D výměny spojené s MS naměřené na proteinu Bmh1 byl vytvořen homologní model dimeru proteinu Bmh1 (viz obrázek 6.38, str. 110). Správnost tohoto modelu byla navíc experimentálně ověřena pomocí vzdáleností získaných měření chemického zesílení spojeného s MS. Srovnání Ca-Ca vzdáleností dobře odpovídalo vzdálenostem v modelu proteinu Bmh1 (viz tabulka 6.2, str. 111 a obrázek 6.39, str. 112) a potvrdilo jeho dimerní charakter. Největší hladiny deuterace byly naměřeny na α -helixu H6, smyčkách mezi α -helixy H2 a H3, H3 a H4, H4 a H5, H8 a H9 a na C-konci. Nejnížší hladiny deuterace byly pozorovány na peptidech pocházejících z α -helixů H1, H3, H4, H5, H7 a H9.

Oblasti, ve kterých byl pozorován výrazný pokles v kinetice H/D výměny v závislosti na vazbě pNth1, zahrnovaly peptidy 39–47 a 48–61 z α -helixu H3, peptid 137–151 z α -helixu H6, peptid 152–175 z α -helixů H6 a H7, peptid 184–207 z α -helixů H7 a H8 a peptid 222–232 z C-konce α -helixu H9. Pomalejší H/D výměna může být vysvětlena sníženou přístupností dané oblasti k rozpouštědлу způsobenou tvorbou komplexu pNth1:Bmh1, což může být důsledkem toho, že tyto oblasti nebo jejich části jsou součástí vazebného rozhraní proteinu Bmh1 s pNth1. Je zajímavé, že tyto peptidy nepocházejí jen z oblasti ligand-vazebného žlábků tvořeného α -helixy H3, H5, H7 a H9 (oblast vazby fosforylovaného N-konce pNth1), ale pocházejí také z povrchu α -helixů H6 a H8, které se nacházejí vně centrálního kanálu dimeru proteinu Bmh1.

Při pozorování vlivu kationtů Ca^{2+} na kinetiku H/D výměny měřenou na peptidech pocházejících z proteinu Bmh1, byl objeven významný pokles v hladině deuterace v několika peptidech najednou. Největší změny byly pozorovány na peptidech pocházejících z α -helixů H3 (peptidy 39–47 a 48–61), H8 (peptid 184–207) a H9 (peptid 227–232), jak vyplývá z porovnání černých a červených křivek (viz obrázek 6.38, str. 110). Pouze dva peptidy (184–207 a 222–232) pocházející z α -helixů H8 a H9 vykazovaly významný pokles v kinetice H/D výměny v porovnání s peptidy z komplexu pNth1:Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} (porovnání zelených a modrých křivek). Z této skutečnosti můžeme předpokládat, že tyto α -helixy patrně interagují s EF-hand motivem navázané pNth1 a jsou pravděpodobně ovlivněny jeho konformačními změnami.



Obrázek 6.38: Výsledky H/D výměny spojené s MS měřené na proteinu *Bmh1*. Grafy zobrazují oblasti proteinu *Bmh1*, ve kterých docházelo k největším změnám v kinetice H/D výměny v závislosti na přítomnosti *pNth1* a/nebo kationtů Ca^{2+} . Výsledky jsou spojeny s oblastmi strukturního modelu dimeru proteinu *Bmh1*, ze kterých příslušné peptidy pocházejí (červeně stínované oblasti). H/D výměna je vyjádřena v procentech vůči maximální teoretické hladině deuterace a je v případě proteinu *Bmh1* samotného znázorněna černě, v přítomnosti kationtů Ca^{2+} červeně, v přítomnosti *pNth1* modře a v přítomnosti *pNth1* a kationtů Ca^{2+} zeleně. Peptidy tvořící ligand-vazebný žlábek jsou označeny hvězdičkou (Kopecka et al. 2014).

6.2.10 Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií

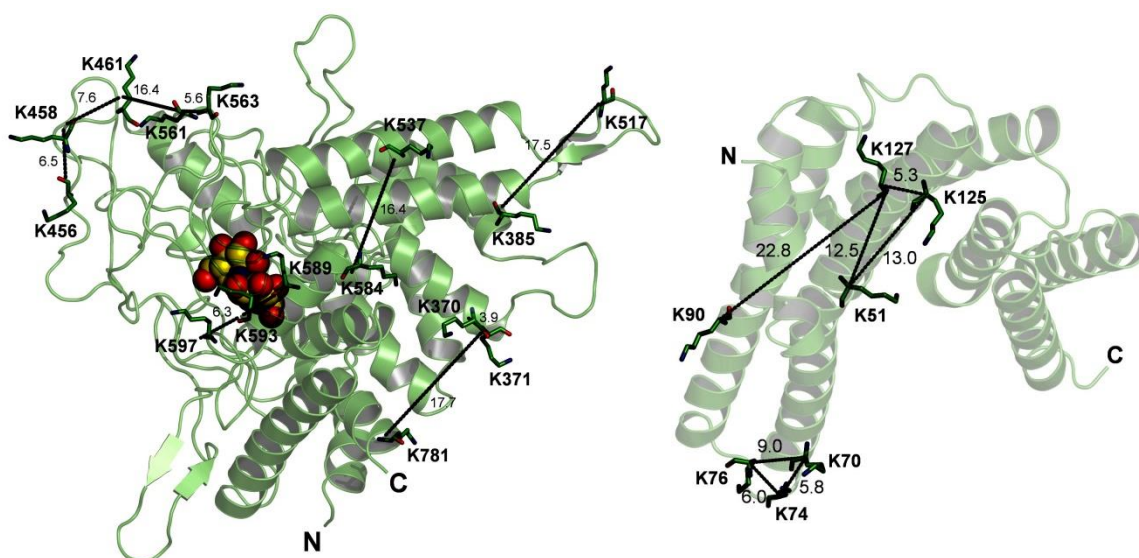
Metoda chemického zesítení spojeného s MS byla realizována jak na samotných proteinech Bmh1 a pNth1, tak na komplexu pNth1:Bmh1. Pro zjištění vzdáleností v rámci těchto dvou proteinů a jejich komplexu byla použita dvě homobifunkční síťovací činidla DSS a DSG. Ca–Ca vzdálenosti mezi spojenými lysinovými zbytky by měly na základě velikosti molekul síťovacích činidel odpovídat 7,7 Å v případě DSG a 11,4 Å v případě DSS. Je však nutné zohlednit flexibilitu postranních řetězců lysinových zbytků a maximální vzdálenosti podle toho upravit. Obecně se používají následující maximální vzdálenosti: 20 Å pro α -uhlíky lysinových zbytků spojených pomocí DSG a 24 Å pro α -uhlíky lysinových zbytků spojených pomocí DSS (Young et al. 2000; Rozbesky et al. 2012).

Vzdálenosti získané chemickým zesítením proteinu Bmh1 pomocí síťovacích činidel DSS a DSG a jejich srovnání se vzdálenostmi odvozenými z homologního modelu proteinu Bmh1 jsou uvedeny v tabulce 6.2. Výsledky chemického zesítení proteinu Bmh1 byly v dobré shodě se vzdálenostmi odvozenými z homologního modelu a potvrdily tak jeho správnost (viz obrázek 6.39, str. 112).

Tabulka 6.2: Vzdálenosti získané chemickým zesítením proteinu Bmh1 pomocí homobifunkčních síťovacích činidel DSS a DSG a jejich srovnání se vzdálenostmi odvozenými z homologního modelu proteinu Bmh1 (Macakova et al. 2013).

Síťovací činidlo	Spojené aminokyselinové zbytky *	Ca–Ca vzdálenost v homologním modelu	Ca–Ca vzdálenosti zjištěné chemickým zesítením
		Å	Å
DSG/DSGD4	K13–K76, inter	17,7/18,3	≤ 20
DSS/DSSD4	K13–K76, inter	17,7/18,3	≤ 24
DSG/DSGD4	K13–K70, inter	14,0/14,5	≤ 20
DSS/DSSD4	K13–K70, inter	14,0/14,5	≤ 24
DSG/DSGD4	K70–K74, intra	5,8	≤ 20
DSS/DSSD4	K70–K74, intra	5,8	≤ 24
DSG/DSGD4	K70–/–K74/–K76, intra	5,8/6,0/9,0	≤ 20
DSS/DSSD4	K70–/–K74/–K76, intra	5,8/6,0/9,0	≤ 24
DSG/DSGD4	K13–K74, inter	15,5/16,0	≤ 20
DSS/DSSD4	K13–K74, inter	15,5/16,0	≤ 24
DSG/DSGD4	K74–K76, intra	6,0	≤ 20

* Intra značí chemické zesítení mezi lysinovými zbytky z totožného peptidu, inter znamená spojení mezi lysinovými zbytky ze dvou různých peptidů.



Obrázek 6.39: Stužková reprezentace strukturního modelu katalytické domény *Nth1* (sekvence 295–721, vlevo). Černé spojnice označují vzdálenosti ověřené pomocí homobifunkčních síťovacích činidel vytvářející spojení dvou lysinových zbytků. Aktivní centrum enzymu *Nth1* nacházející se ve středu katalytické domény obsahuje inhibitor trehalasy validoxylamin (znázorněný sférovým modelem). Model byl vytvořen na základě homologie s krystalovou strukturou trehalasy *Tre37A* z *E. coli* (PDB kód 2JF4, sekvence 145–533) (Gibson et al. 2007). Na pravém obrázku jsou zobrazeny spojené lysinové zbytky v rámci stužkové reprezentace homologního modelu monomeru proteinu *Bmh1* (sekvence 4–236).

Pro snadnější odlišení změn způsobených vazbou kationtů Ca^{2+} byla jak *Nth1* samotná, tak komplex *pNth1:Bmh1* zesíťeny pomocí nedeuterovaných síťovacích činidel (DSS a DSG) v přítomnosti kationtů Ca^{2+} a čtyřikrát deuterovanými síťovacími činidly (DSSD4 a DSGD4) v nepřítomnosti těchto kationtů. Experimenty provedené se samotnou *Nth1* odhalily třicet tři intramolekulárních spojení (viz tabulka 6.3, str. 113). Sedmnáct z těchto spojení je možné porovnat s $\text{Ca}-\text{Ca}$ vzdálenostmi odvozenými z homologního modelu katalytické domény *Nth1*. Skutečnost, že nebylo nalezeno žádné spojení mezi N-koncovou oblastí *pNth1* (sekvence 1–250) a katalytickou doménou *pNth1* (sekvence 300–720) naznačuje, že v nepřítomnosti proteinů *Bmh1* nejsou tyto dvě domény ve vzájemném kontaktu. Kvantifikace získaných spojení ukazuje (viz dva poslední sloupce tabulky 6.3, str. 113), že poměr mezi nedeuterovanými a deuterovanými síťovacími činidly je blízký poměru 1:1 a to pro všechny případy s výjimkou dvou. Tyto dvě výjimky se vyskytly u peptidů z oblasti obsahující EF-hand motiv, jejichž K132 a K142 byly propojeny pouze v přítomnosti kationtů Ca^{2+} . V případě DSG bylo zastoupení těchto spojení 78 % a v případě DSS 90 %. Z tohoto zjištění vyplývá, že

v přítomnosti kationtů Ca^{2+} tyto dva lysinové zbytky jsou dostatečně blízko na to, aby vzniklo jejich spojení pomocí činidel DSG nebo DSS. V nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} tato oblast patrně zaujímá jiný typ konformace, při kterém není spojení pomocí síťovacích činidel možné.

Tabulka 6.3: Výsledky chemického zesílení pNth1 pomocí DSS a DSG v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} (Kopecka et al. 2014).

Síťovací činidlo	Spojené amino-kyselinové zbytky	Ca–Ca vzdálenost v homolog. modelu Å	Ca–Ca vzdálenosti zjištěné chemickým zesílením Å	pNth1 DSS(G)/DSG(G)D4	
				+ Ca^{2+} %	– Ca^{2+} %
DSG/DSGD4	K49–K584	–	≤ 20	49,8	50,2
DSG/DSGD4	K49–K69	–	≤ 20	55,7	44,3
DSS/DSSD4	K52–K104	–	≤ 24	42,2	57,8
DSS/DSSD4	K52–K584	–	≤ 24	48,4	51,6
DSG/DSGD4	K70–K75	–	≤ 20	45,1	54,9
DSS/DSSD4	K70–K75	–	≤ 24	53,4	46,6
DSG/DSGD4	K132–K142	–	≤ 20	77,6	22,4
DSS/DSSD4	K132–K142	–	≤ 24	89,8	10,2
DSG/DSGD4	K211–K214	–	≤ 20	51,0	49,0
DSS/DSSD4	K211–K214	–	≤ 24	45,4	54,6
DSG/DSGD4	K257–K258	–	≤ 20	47,0	53,0
DSS/DSSD4	K257–K258	–	≤ 24	50,3	49,7
DSG/DSGD4	K258–K343	–	≤ 20	47,8	52,2
DSS/DSSD4	K258–K343	–	≤ 24	55,6	44,4
DSG/DSGD4	K258–K393	–	≤ 20	51,0	49,0
DSS/DSSD4	K258–K393	–	≤ 24	51,3	48,7
DSG/DSGD4	K370–K371	3,9	≤ 20	49,7	50,3
DSS/DSSD4	K370–K371	3,9	≤ 24	45,4	54,6
DSG/DSGD4	K371–K718	17,7	≤ 20	50,1	49,9
DSS/DSSD4	K371–K718	17,7	≤ 24	48,9	51,1
DSG/DSGD4	K385–K517	17,5	≤ 20	48,8	51,2
DSS/DSSD4	K385–K517	17,5	≤ 24	45,5	54,5
DSG/DSGD4	K456–K458	6,5	≤ 20	46,4	53,6
DSS/DSSD4	K456–K458	6,5	≤ 24	51,4	48,6
DSS/DSSD4	K458–K461	7,6	≤ 24	41,3	58,7
DSG/DSGD4	K461–K561	16,4	≤ 20	48,1	51,9
DSS/DSSD4	K461–K561	16,4	≤ 24	48,8	51,2
DSS/DSSD4	K537–K584	16,4	≤ 24	44,9	55,1
DSG/DSGD4	K561–K563	5,6	≤ 20	52,4	47,6
DSG/DSGD4	K589–K593	6,1	≤ 20	46,2	53,8
DSS/DSSD4	K589–K593	6,1	≤ 24	46,9	53,1
DSG/DSGD4	K593–K597	6,3	≤ 20	46,9	53,1
DSS/DSSD4	K593–K597	6,3	≤ 24	47,7	52,3

Seznam jednotlivých spojení v rámci pNth1 tvořící komplex pNth1:Bmh1 je uveden v tabulce 6.4. V případě přítomnosti kationtů Ca^{2+} bylo odhaleno mnohem více spojení v rámci pNth1 v porovnání se situací měřenou v nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} . Tento výsledek potvrzuje předpoklad, že pNth1 tvořící komplex s proteinem Bmh1 zaujímá různé konformační stavy a je více citlivá na vazbu kationtů Ca^{2+} ve srovnání s volnou pNth1.

Tabulka 6.4: Výsledky chemického zesílení pNth1 vázaného na dimer proteinu Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} pomocí homobifunkčních síťovacích činidel DSS a DSG (Kopecka et al. 2014).

Síťovací činidlo	Spojené amino-kyselinové zbytky	Ca–Ca vzdálenost v homolog. modelu Å	Ca–Ca vzdálenosti zjištěné chemickým zesílením Å	pNth1 DSS(G)/DSG(G)D4	
				+ Ca^{2+} %	– Ca^{2+} %
DSG/DSGD4	K70–K75	–	≤ 20	55,5	44,5
DSS/DSSD4	K70–K75	–	≤ 24	49,0	51,0
DSG/DSGD4	K132–K142	–	≤ 20	56,8	43,2
DSS/DSSD4	K132–K142	–	≤ 24	52,9	47,1
DSG/DSGD4	K211–K214	–	≤ 20	65,3	34,7
DSS/DSSD4	K211–K214	–	≤ 24	58,8	41,2
DSG/DSGD4	K214–K563	–	≤ 20	80,0	20,0
DSS/DSSD4	K214–K563	–	≤ 24	60,1	39,9
DSG/DSGD4	K257–K258	–	≤ 20	66,7	33,3
DSS/DSSD4	K257–K258	–	≤ 24	59,3	40,7
DSG/DSGD4	K258–K393	–	≤ 20	68,3	31,7
DSS/DSSD4	K258–K393	–	≤ 24	71,2	28,8
DSG/DSGD4	K370–K371	3,9	≤ 20	54,9	45,1
DSS/DSSD4	K370–K371	3,9	≤ 24	47,9	52,1
DSG/DSGD4	K385–K517	17,5	≤ 20	70,2	29,8
DSS/DSSD4	K385–K517	17,5	≤ 24	50,8	49,2
DSG/DSGD4	K393–K396	5,1	≤ 20	51,1	48,9
DSS/DSSD4	K393–K396	5,1	≤ 24	49,5	50,5
DSG/DSGD4	K456–K458	6,5	≤ 20	68,8	31,2
DSS/DSSD4	K456–K458	6,5	≤ 24	63,7	36,3
DSS/DSSD4	K458–K461	7,6	≤ 24	50,2	49,8
DSS/DSSD4	K537–K584	16,4	≤ 24	51,1	48,9
DSG/DSGD4	K589–K593	6,1	≤ 20	71,1	28,9
DSS/DSSD4	K589–K593	6,1	≤ 24	55,1	44,9

Největšími rozdíly nalezenými při porovnání spojení nalezených na pNth1 ovlivněné vazbou proteinu Bmh1 (v porovnání výsledky Nth1 samotné) byly spojení lysinových zbytků: K211–K14, K214–K63, K257–K258, K258–K393, K385–K517, K456–K458 a K589–K593.

Přítomnost spojení mezi K214 a K563, které nebylo pozorováno v případě pNth1 samotné, naznačuje, že oblast obsahující K214 a katalytická doména pNth1 (obsahující K563) jsou mnohem více u sebe v případě pNth1 vázané v komplexu s proteinem Bmh1. Všechny zjištěné Ca–Ca inter-lysinové vzdálenosti získané chemickým zesítním, dobře odpovídají vzdálenostem v rámci strukturních modelů obou studovaných proteinů (viz obrázek 6.39, str. 112).

Rozdíly mezi konformacemi pNth1 navázané na protein Bmh1 v přítomnosti kationtů Ca²⁺ jsou podporovány přítomností zesítní mezi molekulami pNth1 a proteinem Bmh1 (viz tabulka 6.5). Přestože v přítomnosti kationtů Ca²⁺ je přítomno především spojení K214–K563 v rámci molekuly pNth1 (viz tabulka 6.3, str. 113), v nepřítomnosti kationtů Ca²⁺ jsou tyto dva aminokyselinové zbytky pNth1 (K214 a K563) součástí převážně mezimolekulových spojení s lysinovými zbytky proteinu Bmh1 (K127 a K76). Podobný efekt byl také pozorován v případě K393 pocházejícího z pNth1. Tento lysinový zbytek v přítomnosti kationtů Ca²⁺ je součástí intramolekulárního spojení s K258, zatímco v nepřítomnosti kationtů Ca²⁺ tvoří převážně intermolekulární spojení s K145 z proteinu Bmh1.

Tabulka 6.5: Výsledky chemického zesítní proteinového komplexu pNth1:Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca²⁺ pomocí homobifunkčních síťovacích činidel DSS a DSG (Kopecka et al. 2014).

Síťovací činidlo	Spojené aminokyselinové zbytky	Vzdálenost Ca–Ca určená chemickým zesítním Å	Bmh1:pNth1 DSS(G)/DSS(G)D4	
			+ Ca ²⁺ %	– Ca ²⁺ %
DSG/DSGD4	K127 ^a –K214 ^b	≤ 20	28,8	71,2
DSS/DSSD4	K127 ^a –K214 ^b	≤ 24	40,2	59,8
DSG/DSGD4	K76 ^a –K563 ^b	≤ 20	34,7	65,3
DSS/DSSD4	K76 ^a –K563 ^b	≤ 24	42,2	57,8
DSG/DSGD4	K145 ^a –K393 ^b	≤ 20	31,3	68,7
DSS/DSSD4	K145 ^a –K393 ^b	≤ 24	30,7	69,3

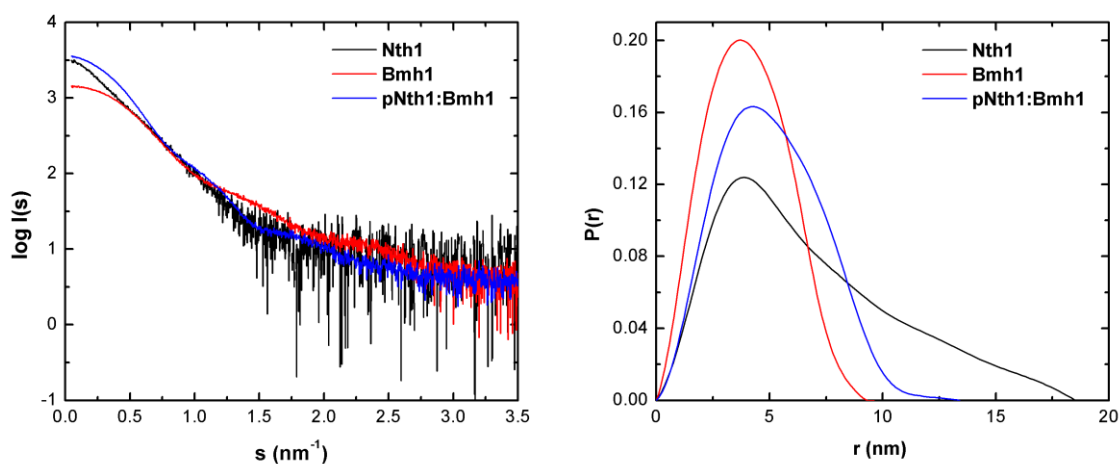
^a Aminokyseliny z peptidu pocházejícího z Bmh1

^b Aminokyseliny z peptidu pocházejícího z pNth1

6.2.11 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

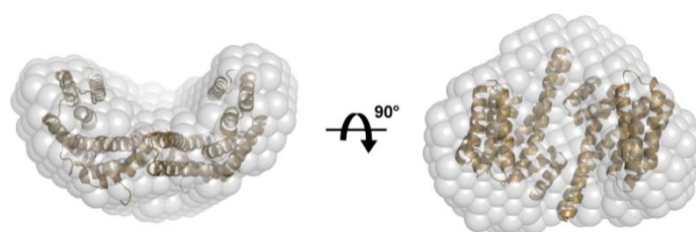
Měření maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS) poskytuje informaci o velikosti a tvaru molekuly proteinu v roztoku. Právě tato technika byla využita pro vytvoření struktury s nízkým rozlišením jak proteinů Bmh1 a Nth1 samotných, tak i jejich komplexu. Experimentální křivky získané ze SAXS měřením všech zmíněných vzorků jsou na obrázku 6.40 (viz str. 116). Molekulová hmotnost proteinového komplexu pNth1:Bmh1 byla stanovena

pomocí porovnání intenzity rozptylu v přímém směru ($I(0)$) s intenzitou získanou z měření referenčního roztoku obsahujícího BSA. Výsledná hodnota 147 kDa byla v dobré shodě s molárním poměrem, který byl 1:2 (pNth1:Bmh1) a také souhlasí s již dříve publikovanými výsledky (Veisova et al. 2012). Pomocí Guinierovy aproximace bylo odhaleno, že samotná Nth1 má výrazně větší gyrační poloměr ($R_g = 52,0 \pm 0,4 \text{ \AA}$) než protein Bmh1 ($R_g = 32,6 \pm 0,1 \text{ \AA}$) a než proteinový komplex pNth1:Bmh1 ($R_g = 40,5 \pm 0,1 \text{ \AA}$). Tato skutečnost napovídá, že komplex pNth1:Bmh1 je patrně více kompaktní částicí než Nth1 samotná. Tento předpoklad byl dále potvrzen pomocí distribuční funkce vzdáleností ($P(r)$), která odhalila maximální vzdálenosti uvnitř molekuly (D_{max}). Maximální vzdálenost v rámci molekuly proteinu Bmh1 byla 92 \AA , v rámci molekuly Nth1 byla 183 \AA a maximální vzdálenost uvnitř proteinového komplexu pNth1:Bmh1 dosáhla vzdálenosti 127 \AA viz pravá část obrázku 6.40. Hodnoty D_{max} též potvrdily předpoklad, že volné molekuly Nth1 zaujímají více podlouhlý asymetrický tvar ve srovnání s jejich tvarem v komplexu pNth1:Bmh1.



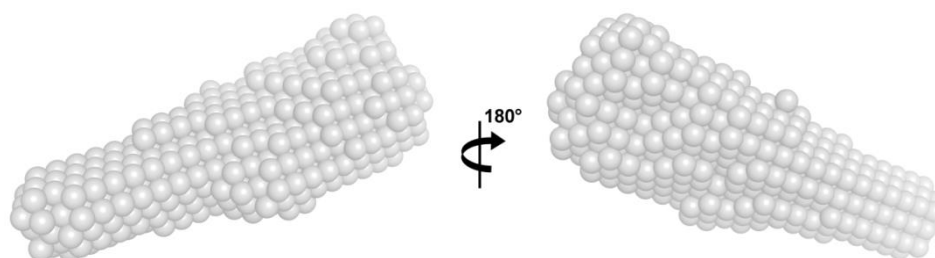
Obrázek 6.40: Výsledky získané SAXS měřením proteinů Bmh1, Nth1 a komplexu pNth1:Bmh1. Vlevo je výnos rozptylové intenzity ($I(s)$) vůči rozptylovému vektoru (s) ($s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je rozptylový úhel a λ je vlnová délka). V pravé části se nachází graf distribučních funkcí vzdáleností ($P(r)$) určující maximální vzdálenost v rámci molekuly (D_{max}). Pro Nth1 je tato vzdálenost rovna 183 \AA , pro protein Bmh1 je to 92 \AA a pro komplex pNth1:Bmh1 je maximální vzdálenost rovna 127 \AA (Kopecka et al. 2014).

Obálka proteinu Bmh1 byla vytvořena modelováním pomocí programu DAMMIN na základě získaných SAXS experimentálních dat. Obálka vykazuje charakteristický pohárkovitý tvar dimeru proteinů 14-3-3 a je v dobré shodě s teoretickým modelem dimeru proteinu Bmh1 (sekvence 4–236, viz obrázek 6.41, str. 117).



Obrázek 6.41: Superpozice SAXS obálky proteinu *Bmh1* s homologním modelem *Bmh1* (sekvence 4–236) (Kopecka et al. 2014).

Naopak obálka proteinu *Nth1* (viz obrázek 6.42) ukázala, že protein *Nth1* zaujímá nataženou tyčkovitou konformaci. Tato skutečnost byla též potvrzena pomocí chemického zesílení spojeného s MS (viz kapitola 6.2.10, str. 111), kdy nebyla nalezena žádná spojení mezi N-koncovou oblastí a katalytickou doménou *Nth1* (viz tabulka 6.3, str. 113). Protáhlá užší polovina molekuly *Nth1* patrně obsahuje nestrukturní N-koncovou část tohoto proteinu obsahující fosforylační místa vazebného motivu pro proteiny 14-3-3. Druhý širší konec *Nth1* pravděpodobně odpovídá zbytku molekuly tohoto proteinu (Ca-vazebné doméně obsahující EF-hand motiv a katalytické doméně).

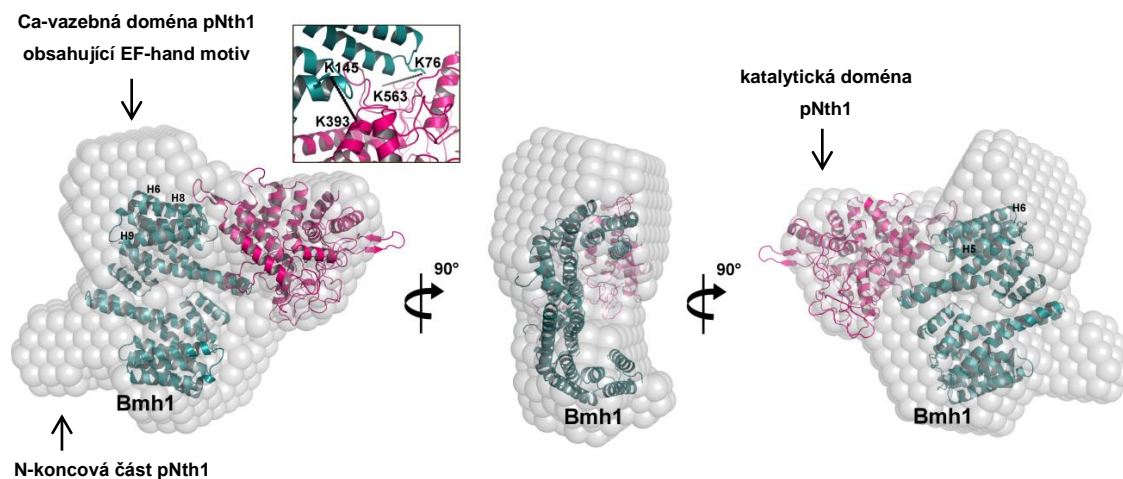


Obrázek 6.42: SAXS obálka proteinu *Nth1*. (Kopecka et al. 2014).

Obálka komplexu p*Nth1*:*Bmh1* má podle očekávání více sférický tvar a ukazuje, že p*Nth1* v komplexu s proteinem *Bmh1* zaujímá výrazně odlišnou konformaci (viz obrázek 6.43, str. 118). Podle tvaru obálky je možné usuzovat, že dimer proteinu *Bmh1* je díky svému tvaru umístěn v širší prostřední části obálky komplexu.

Pro modelování tuhých těles (rigid-body modeling) komplexu p*Nth1*:*Bmh1* bylo využito homologního modelu *Bmh1* a katalytické domény *Nth1* (sekvence 295–721). Výsledný model proteinového komplexu p*Nth1*:*Bmh1* vykazuje dobrou shodu jak s výsledky molekulové obálky s nízkým rozlišením, tak s výsledky získanými pomocí síťovacích experimentů spojených s MS (viz kapitola 6.2.10, tabulka 6.5, str. 115).

Ve vloženém rámečku v rámci obrázku 6.43 je vidět detail vazebného rozhraní mezi Nth1 (sekvence 295–721) a proteinem Bmh1, kde jsou vyznačena dvě z pozorovaných intermolekulárních spojení pomocí síťovacích činidel ($K76^{Bmh1}-K563^{Nth1}$ a $K145^{Bmh1}-K393^{Nth1}$). Třetí pozorované spojení ($K127^{Bmh1}-K214^{Nth1}$) se nachází mimo model katalytické domény Nth1 (sekvence 295–721).

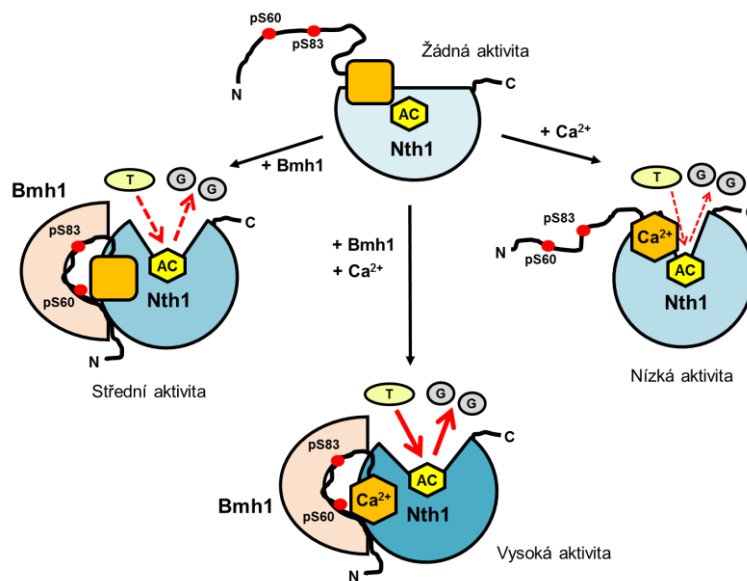


Obrázek 6.43: Superpozice SAXS obálky komplexu pNth1:Bmh1 s modelem komplexu Nth1²⁹⁵⁻⁷²¹:Bmh1. Molekulová obálka komplexu je znázorněna šedě, katalytická doména Nth1 (sekvence 295–721) je znázorněna růžově a dimer proteinu Bmh1 (sekvence 4–236) je znázorněn tmavě zelenou barvou. Vložený rámeček znázorňuje vazebné rozhraní mezi Nth1²⁹⁵⁻⁷²¹ a Bmh1, kde se nacházejí dvě ze tří spojení pomocí síťovacích činidel ($K76^{Bmh1}-K563^{Nth1}$ a $K145^{Bmh1}-K393^{Nth1}$) (Kopecka et al. 2014).

Při pohledu na molekulovou obálku komplexu pNth1:Bmh1 (viz obrázek 6.43) je jasné patrné, že střední část této obálky je výrazně širší než maximální šířka molekulové obálky dimeru proteinu Bmh1. Navíc je na jedné straně více vypouklá a to právě v oblasti, která sousedí s α -helixy H5, H6 a H8 z molekuly proteinu Bmh1 a která je blízká katalytické doméně pNth1. Předpokládáme, že tato vypouklá oblast obsahuje právě Ca-vazebnou doménu pNth1, ve které se nachází EF-hand motiv. Peptidy z α -helixů H6, H8 a H9 vykazovaly při měření H/D výměny spojené s MS výrazný pokles v kinetice izotopové výměny a také vyšší citlivost pro kationty Ca^{2+} v přítomnosti pNth1 (viz kapitola 6.2.9, obrázek 6.37, str. 108). Pomocí chemického zesílení spojeného s MS byla ověřena vzdálenost mezi $K127^{Bmh1}$ z α -helixu H5 z proteinu Bmh1 a $K214^{Nth1}$ z oblasti Nth1 obsahující EF-hand motiv (viz kapitola 6.2.10, tabulka 6.5, str. 115).

Z dosažených výsledků je možné předpokládat, že oblast obsahující EF-hand motiv tvoří zvláštní doménu, která interaguje jak s vnějším povrchem dimeru proteinu Bmh1 (zahrnující α -helixy H5, H6, H8 a H9, vně centrálního kanálu), tak s katalytickou doménou pNth1. Úzký výstupek, který se nachází přímo před jedním ligand-vazebným žlábkem proteinu Bmh1, je pravděpodobně větší N-koncová část pNth1. Zbytek N-koncové oblasti pNth1, který obsahuje oba fosforylované vazebné motivy pro protein Bmh1 (pS60 a pS83), je pravděpodobně uvnitř ligand-vazebného žlábků dimeru proteinu Bmh1. Právě takovéto umístění bylo již dříve identifikováno ve strukturách komplexů proteinů 14-3-3 s jinými proteiny (Rittinger et al. 1999; Yaffe et al. 1997; Obsil et al. 2001; Ottmann et al. 2007; Yang et al. 2006).

6.2.12 Předpokládaný mechanismus aktivace Nth1



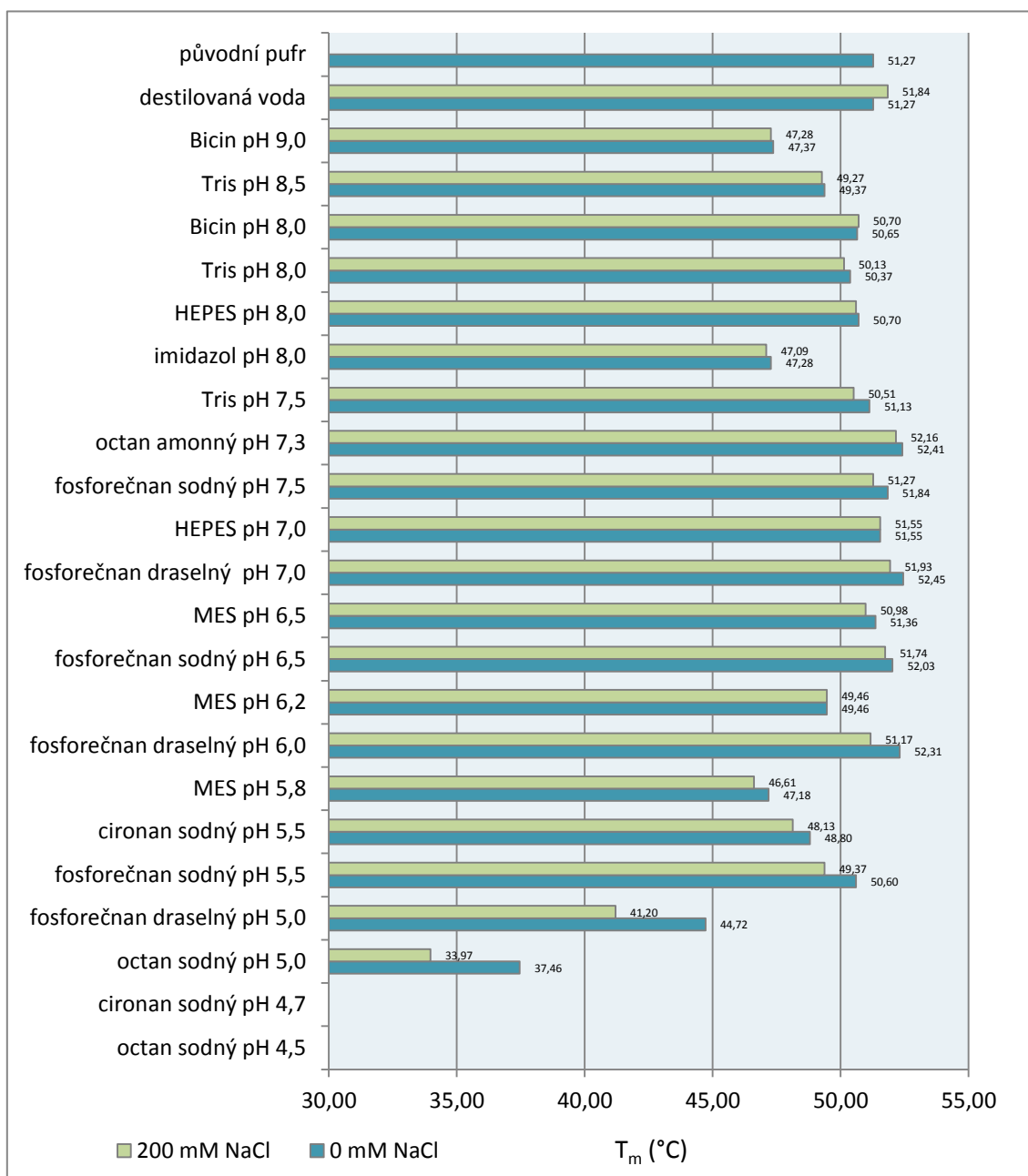
Obrázek 6.44: Předpokládaný mechanismus aktivace enzymu Nth1. V horní části obrázku se nachází schéma neaktivního enzymu Nth1. Aktivní centrum (AC) Nth1 je ukryté uvnitř struktury katalytické domény. Vazba kationtů Ca^{2+} na Ca-vazebnou doménu obsahující EF-hand motiv způsobí konformační změnu, která následně ovlivňuje strukturu katalytické domény a tak i přístupnost aktivního centra enzymu pro substrát, kterým je disacharid trehalosa (T). Tímto způsobem dochází k velice slabé aktivaci Nth1 (pravá část obrázku). Naproti tomu fosforylace Nth1 na S60 a S83 pomocí PKA, která je následována vazbou proteinu Bmh1 indukuje mnohem větší konformační změny jak N-terminální oblasti Nth1, tak její katalytické domény a aktivuje Nth1 s mnohem větší účinností (levá část obrázku). K nejúčinnější aktivaci a produkci glukosy (G) dochází za současné přítomnosti proteinů Bmh1 a kationtů Ca^{2+} (spodní část obrázku). Ca-vazebná doména Nth1 má oranžovou barvu, katalytická doména Nth1 barvu modrou a protein Bmh1 je vybarven růžově.

Z výsledků získaných pomocí jednobodové mutagenese (viz kapitola 6.2.2, str. 94) a H/D výměny spojené s MS (viz kapitola 6.2.8, str. 103) vyplývá, že strukturní integrita EF-hand motivu má rozhodující vliv na aktivaci pNth1 a že strukturní změny tohoto motivu jsou součástí aktivačního procesu. Tato oblast přiléhá ke katalytické doméně a je pravděpodobné, že konformační změna Ca-vazebné domény může ovlivnit strukturu (nebo přístupnost) aktivního centra enzymu pNth1 a umožnit tím aktivaci enzymu. Na základě těchto zjištění bylo navrženo schéma předpokládaného mechanismu aktivace kvasničné neutrální trehalasy Nth1 (viz obrázek 6.44, str. 119)

6.2.13 Diferenční skenovací fluorimetrie proteinů Nth1 153–751 a Nth1 100–751

K hledání optimálního výchozího pufru pro krystalizaci proteinů Nth1 153–751 a Nth1 100–751 byla použita metoda diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). Teplotně indukovaná denaturace proteinů Nth1 byla měřena ve 21 pufrech s rozsahem hodnot pH od 4,5 do 9,0 a to současně v přítomnosti a nepřítomnosti 200 mM NaCl. Pufry, ve kterých měřené proteiny vykazovaly nejvyšší hodnoty teplot tání (T_m), by měly zaručit nejlepší stabilitu a homogenitu těchto proteinových vzorků, která je pro úspěšnost krystalizace klíčová. Výsledné teploty tání odpovídající inflexním bodům denaturačních křivek proteinů Nth1 100–751 jsou vyneseny ve sloupcových grafech na obrázku 6.45 (viz str. 121). Z výsledků měření vyplývá, že ve většině pufrů bylo dosaženo vyšší teploty tání v nepřítomnosti 200 mM NaCl. Na základě tohoto zjištění, jsme se rozhodli pro nové purifikace proteinu Nth1 100–751 použít pufr obsahující 20 mM HEPES (pH = 7,5), 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Při následující výrobě proteinu Nth1 100–751 v prostředí tohoto pufru, bylo sice dosaženo dobrého výtěžku, ale protein byl téměř kompletně zagregovaný a tudíž nepoužitelný. Pro následující purifikace byl znovu použit pufr původní akorát se sníženou koncentrací Tris-HCl (1 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% glycerol).

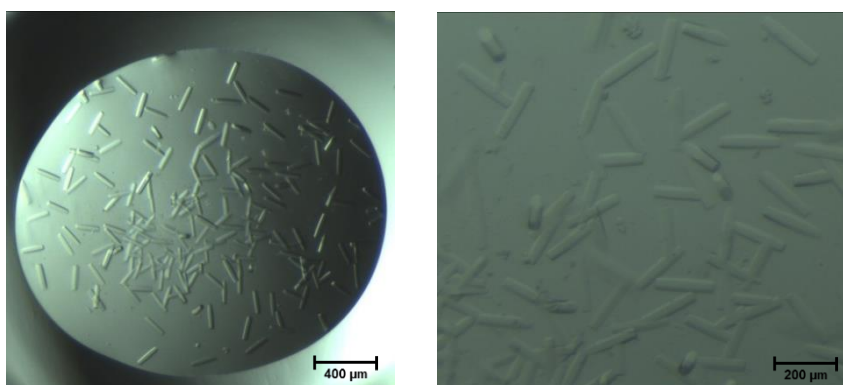
V případě optimalizace výchozího pufru pro krystalizaci proteinu Nth1 153–751, bylo využito DSF přínosem. Stabilitu proteinu ve stejných pufrech, jaké byla použité pro testování Nth1 100–751, otestovala Bc. Aneta Šmídová v rámci své bakalářské práce (Šmídová 2014). Na základě jejích měření byl protein Nth1 153–751 nově purifikován v pufru obsahujícím 1 mM octan amonný (pH = 7,3), 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol. Po nalezení vhodných krystalizačních podmínek pomocí robotu Crystal Gryphon a následné optimalizaci byly získány krystaly Nth1 153–751.



Obrázek 6.45: Porovnání teplot tání (T_m) proteinu *Nth1* 100-751 (o výsledné koncentraci $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$) získaných při sledování teplotně závislé denaturace v pufrách různého složení měřené pomocí diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). Zelené sloupce znázorňují hodnoty výsledných T_m ve 100 mM pufrách obsahujících 200 mM NaCl a modré sloupce jsou výsledky získané ze stejných pufrů neobsahujících 200 mM NaCl. Modrým sloupcem je znázorněn i původní purifikační pufr pro *Nth1* 100–751, který obsahoval 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol.

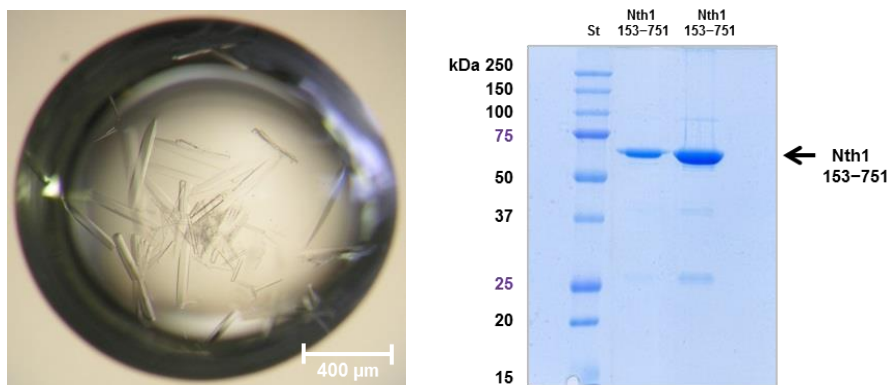
6.2.14 Krystalizace konstruktů Nth1 153–751

Pro hledání vhodných krystalizačních podmínek proteinu Nth1 153–751 pomocí robotu Crystal Gryphon byl použit tento protein o výsledné koncentraci $7,2 \text{ mg ml}^{-1}$. Výchozí pufr obsahoval: 1 mM octan amonný ($\text{pH} = 7,3$), 150 mM NaCl, 5 mM DTT. Byly použity komerčně vyráběné sady srážecích roztoků JCSG Suite I až IV, Morpheus a Midas a testovány tři různé poměry rezervoár : protein (1:2, 1:1 a 2:1). Krystalizace probíhala v sedících kapkách o objemu $0,3 \mu\text{l}$ při teplotě $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Fotky nejlepších krystalů s morfologií jehlic se nacházejí na obrázku 6.46.



Obrázek 6.46: Krystaly proteinu Nth1 153–751 ($7,2 \text{ mg ml}^{-1}$) narostlé v sedících kapkách (objem $0,3 \mu\text{l}$, poměr rezervoár : protein 1:2, $18 \text{ }^\circ\text{C}$) při hledání vhodných krystalizačních podmínek pomocí robotu Crystal Gryphon. Složení srážecího roztoku: 0,1 M citronan sodný ($\text{pH} = 5,6$), 1 M síran lithný a 0,5 M síran amonný.

Optimalizace velikosti krystalů byla prováděna ve visících kapkách o objemu $6 \mu\text{l}$ při teplotě $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek Nth1 153–751 dosahoval koncentrace $7,3 \text{ mg ml}^{-1}$ a výchozí pufr obsahoval navíc 10% (w/v) glycerol. Na základě výsledku krystalografických testů provedených pomocí robotu Crystal Gryphon byl použit srážecí roztok obsahující: 0,1 M citronan sodný ($\text{pH} = 5,6$), 1 M síran lithný a 0,6 M síran amonný (testované rozmezí koncentrace síranu amonného bylo 0,3 M až 0,6 M). Kapka s výslednými krystaly proteinu Nth1 153–751 a ověření složení krystalů pomocí 12% SDS-PAGE se nachází na obrázku 6.47 (viz str. 123).

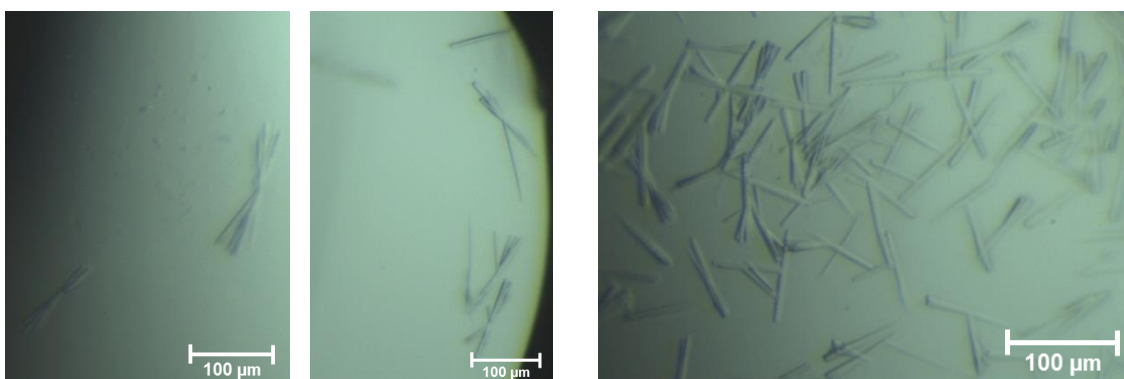


Obrázek 6.47: Krystaly proteinu *Nth1* 153–751 ($7,3 \text{ mg ml}^{-1}$) narostlé ve visících kapkách (objem $6 \mu\text{l}$, poměr rezervoár : protein 1:2, $18 \text{ }^\circ\text{C}$). Složení srážecího roztoku: $0,1 \text{ M}$ citronan sodný ($\text{pH} = 5,6$), 1 M síran lithný a $0,6 \text{ M}$ síran amonný. Vpravo je 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE, která byla použita pro ověření přítomnosti proteinu *Nth1* 153–751 v krystalech zobrazených v levé části obrázku. (St) značí standard molekulových vah, dráhy 2 a 3 obsahují vzorky z testovaných krystalů.

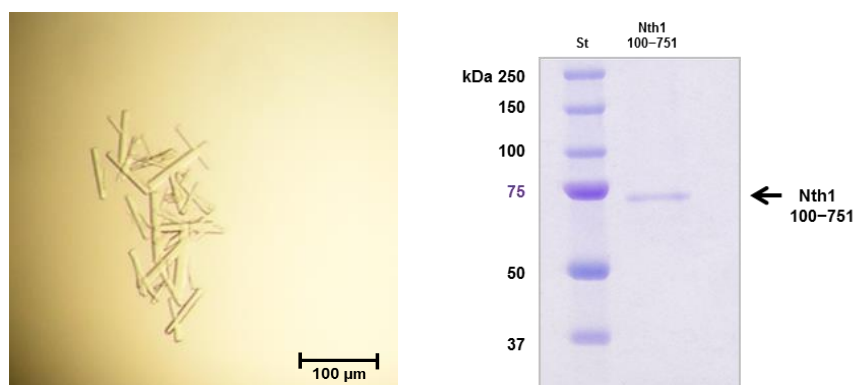
6.2.15 Krystalizace konstruktu *Nth1* 100–751

Pro hledání vhodných krystalizačních podmínek proteinu *Nth1* 100–751 pomocí robotu Crystal Gryphon byl použit tento protein o výsledné koncentraci $10,8 \text{ mg ml}^{-1}$. Výchozí pufr obsahoval: 20 mM Tris-HCl ($\text{pH} = 7,5$), 150 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Byly použity komerční sady srážecích roztoků Crystal Screen 1 + 2, Index HT a JCSG Suite I až IV. Poměr rezervoár : protein byl 1:1. Krystalizace probíhala v sedících kapkách o objemu $0,3 \mu\text{l}$ při teplotě $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Fotky nejlepších krystalů se nacházejí na obrázku 6.48 (viz str. 124).

Optimalizace kvality krystalů byla prováděna ve visících kapkách o objemu $6 \mu\text{l}$ při teplotě $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek *Nth1* 100–751 dosahoval koncentrace $7,1 \text{ mg ml}^{-1}$ a výchozí pufr obsahoval: 1 mM Tris-HCl ($\text{pH} = 7,5$), 150 mM NaCl, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Na základě výsledků krystalografických testů provedených pomocí robotu Crystal Gryphon byly pro optimalizaci mj. použity srážecí roztoky obsahující buď $0,1 \text{ M}$ HEPES ($\text{pH} = 7,5$) nebo $0,1 \text{ M}$ Bis-Tris ($\text{pH} = 6,5$, současně s $0,1 \text{ M}$ NaCl) s různými koncentracemi síranu amonného v rozmezí $0,4$ až $1,6 \text{ M}$. Dosavadní optimalizace zatím neposkytla žádné výrazné zlepšení. Fotografie uvedená na obrázku 6.49 (viz str. 124) obsahuje krystaly proteinu *Nth1* 100–751 získané metodou visící kapky za použití srážecího roztoku obsahujícího $0,1 \text{ M}$ citronan sodný ($\text{pH} = 5,6$), 1 M síran lithný a $0,4 \text{ M}$ síran amonný. Ověření přítomnosti *Nth1* 100–751 v krystalech pomocí 12% SDS-PAGE se nachází na obrázku 6.49 (viz str. 124).



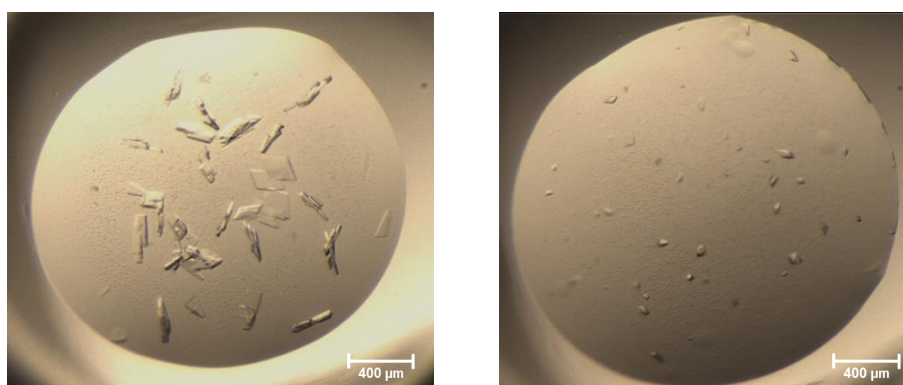
Obrázek 6.48: Krystaly proteinu *Nth1* 100–751 ($10,8 \text{ mg ml}^{-1}$) narostlé v sedících kapkách (objem $0,3 \text{ }\mu\text{l}$, poměr rezervoár : protein 1:1, $18 \text{ }^\circ\text{C}$) při hledání vhodných krystalizačních podmínek pomocí robotu *Crystal Gryphon*. První dvě fotografie zleva zobrazují krystaly z kapky obsahující srážecí roztok složený z $0,1 \text{ M}$ HEPES ($\text{pH} = 7,5$) a $1,26 \text{ M}$ síranu amonného. Na třetí fotografii jsou krystaly z kapky obsahující srážecí roztok složený z $0,1 \text{ M}$ Bis-Tris ($\text{pH} = 6,5$), $0,1 \text{ M}$ NaCl a $1,5 \text{ M}$ síranu amonného.



Obrázek 6.49: Krystaly proteinu *Nth1* 100–751 ($7,1 \text{ mg ml}^{-1}$) narostlé ve visících kapkách (objem $6 \text{ }\mu\text{l}$, poměr rezervoár : protein 1:2, $18 \text{ }^\circ\text{C}$). Složení srážecího roztoku: 1 M citronan sodný ($\text{pH} = 5,6$), 1 M síran lithný a $0,4 \text{ M}$ síran amonný. Pravá část obrázku obsahuje 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE použitý pro ověření přítomnosti proteinu *Nth1* 100–751 v krystalech. (St) značí standard molekulových vah a ve druhé dráze je vzorek testovaných krystalů.

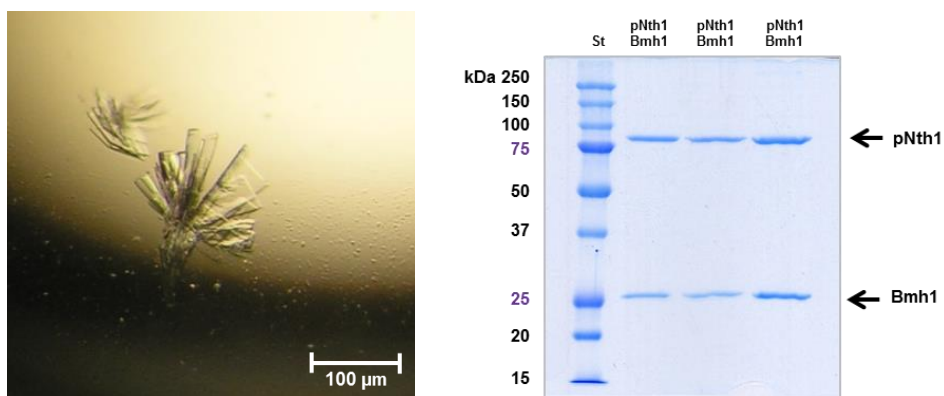
6.2.16 Krystalizace komplexu pNth1 WT:Bmh1 Δ C M237Stop

Pro hledání vhodných krystalizačních podmínek komplexu pNth1 WT:Bmh1 Δ C M237Stop pomocí robotu Crystal Gryphon byl použit tento komplex o výsledné koncentraci $9,6 \text{ mg ml}^{-1}$. Výchozí pufr obsahoval: 1 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl a 5 mM DTT. Byly použity komerčně vyráběné sady srážecích roztoků JCSG Suite I až IV, Morpheus a Midas a testovány tři různé poměry rezervoár : protein (1:2, 1:1 a 2:1). Krystalizace probíhala v sedících kapkách o objemu $0,3 \mu\text{l}$ při teplotě $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Fotky nejlepších krystalů se nacházejí na obrázku 6.50.



Obrázek 6.50: Krystaly proteinového komplexu pNth1 WT:Bmh1 Δ C M237Stop ($9,6 \text{ mg ml}^{-1}$) narostlé v sedících kapkách (objem $0,3 \mu\text{l}$, poměr rezervoár : protein 1:2, $18 \text{ }^\circ\text{C}$) při krystalografických testech prováděných pomocí robotu Crystal Gryphon. Levá fotografie zobrazuje krystaly z kapky obsahující srážecí roztok složený z $0,08 \text{ M}$ kakodylátu sodného (pH = 6,5) a $0,16 \text{ M}$ octanu vápenatého, $14,4\%$ (w/v) PEG 8000 a 20% (v/v) glycerolu. Na pravé fotografii je kapka s krystaly vzniklými působením srážecího roztoku obsahujícího $0,1 \text{ M}$ kakodylát sodný (pH = 6,5), $0,2 \text{ M}$ octan vápenatý, 18% (w/v) PEG 8000.

Optimalizace velikosti krystalů byla prováděna ve visících kapkách o objemu $6 \mu\text{l}$ při teplotě $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek komplexu pNth1 WT:Bmh1 Δ C M237Stop měl koncentraci $7,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a výchozí pufr obsahoval navíc 10% (w/v) glycerol. Na základě výsledku krystalografických testů provedených pomocí robotu Crystal Gryphon byl použit srážecí roztok obsahující: $0,1 \text{ M}$ kakodylát sodný (pH = 6,5), $0,1 \text{ M}$ octan vápenatý, 20% (v/v) glycerol, 16% (w/v) PEG 8000 (testované rozmezí koncentrace PEG 8000 bylo 4% až 24%). Kapka s výslednými krystaly komplexu a ověření složení krystalů pomocí 12% SDS-PAGE se nachází na obrázku 6.51 (viz str. 126).



Obrázek 6.51: Krystaly proteinového komplexu *pNth1 WT:Bmh1 ΔC M237Stop* ($7,5 \text{ mg ml}^{-1}$) narostlé ve visících kapkách (objem $6 \mu\text{l}$, poměr rezervoár : protein 1:2, $18 \text{ }^\circ\text{C}$). Složení srážecího roztoku: $0,1 \text{ M}$ kakodylát sodný ($\text{pH} = 6,5$), $0,1 \text{ M}$ octan vápenatý, 16% (w/v) PEG 8000 a 20% (v/v) glycerol. Pravá část obrázku obsahuje 12% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE použitý pro ověření přítomnosti obou proteinů (*pNth1 WT* a *Bmh1 ΔC M237Stop*) v krystalech komplexu zobrazených v levé části obrázku. (St) značí standard molekulových vah a ve druhé až třetí dráze jsou vzorky získané z testovaných krystalů.

7 Diskuse

Předkládaná disertační práce plynule navazuje na téma neutrální trehalasy Nth1 pocházející z kvasinek rodu *S. cerevisiae* studované v laboratoři RNDr. Veroniky Obšilové, PhD. již po dobu několika let. Nth1 katalyzuje hydrolýzu disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy a pomáhá tak kvasinkám přežít různé nepříznivé životní situace. V rámci studia Nth1 jsme se věnovali především molekulárnímu mechanismu regulace její aktivity a také její struktuře. Pozornost byla upřena i na roli kationtů Ca^{2+} a na kvasničný protein 14-3-3 (Bmh1), který je vazebným partnerem Nth1 a má spolu s kationty Ca^{2+} zásadní vliv na aktivitu tohoto enzymu.

Doposud je známá krystalová struktura pouze trehalasy Tre37A pocházející z *E. coli* a katalytická doména Nth1 z *S. cerevisiae* (sekvence 295–721) vykazuje homologii s touto trehalasou (Gibson et al. 2007). Právě této skutečnosti bylo využito při tvorbě strukturního modelu katalytické domény Nth1, který však nezahrnuje oblast obsahující EF-hand motiv ani N-koncovou část obsahující fosforylační místa pro PKA (vazebný motiv pro protein 14-3-3). Z tohoto důvodu jsme pro získání informací o struktuře oblasti obsahující EF-hand motiv, katalytické domény Nth1 a strukturních změnách způsobených vazbou Ca^{2+} a proteinu Bmh1 použili H/D výměnu a chemické zesílení spojené s MS a také SAXS.

Námi získané výsledky byly v dobré shodě s předpokladem, že aktivní centrum enzymu Nth1 je skryté uvnitř struktury katalytické trehalasové domény, stejně jako tomu je v případě periplasmatické trehalasy Tre37A (Gibson et al. 2007). Z této skutečnosti bylo možné předpokládat nutnost výrazné změny konformace umožňující přístup trehalosy do aktivního centra. Naše hypotéza byla následně také pomocí zmíněných technik potvrzena a navíc do ní dobře zapadala experimentálně prokázaná skutečnost, že enzym Nth1 je sám o sobě inaktivní.

Na základě známé skutečnosti, že Nth1 musí být nejprve fosforylována pomocí PKA a následně aktivována vazbou proteinu Bmh1 (Veisova et al. 2012), byly nejdříve studovány strukturní změny pNth1 vyvolané vazbou tohoto proteinu. Proteiny 14-3-3 jsou známé regulační molekuly, ovlivňující strukturu a vlastnosti svých vazebných partnerů. K regulaci katalytické aktivity mnoha nejrůznějších enzymů prostřednictvím proteinů 14-3-3, dochází pomocí několika uniformních mechanismů (Obsil a Obsilova 2011). Proto bylo důvodné domnívat se, že jeden z těchto mechanismů bude patrně fungovat i v případě regulace aktivity Nth1. Výsledky z H/D výměny spojené s MS prokázaly, že vazba proteinu Bmh1 na pNth1 snižuje kinetiku izotopové výměny v několika různých oblastech pNth1. Jednou z těchto oblastí byla N-koncová část pNth1 obsahující fosforylační místa klíčová pro vazbu proteinu Bmh1 (S60 a S83). Další oblastí vykazující rozhodující změny byla oblast Ca-vazebné domény

(aminokyselinové zbytky 102–185). Změny byly také odhaleny na několika peptidech obklopujících aktivní centrum enzymu skryté ve struktuře katalytické domény. Nabízela se dvě vysvětlení těchto výsledků: tyto oblasti pNth1 jsou v přímém kontaktu s proteinem Bmh1 anebo zde dochází ke konformační změně způsobené vznikem komplexu pNth1:Bmh1. Nicméně měření CD ve vzdálené UV oblasti neodhalila žádné podstatné změny sekundárních struktur způsobené tvorbou komplexu pNth1:Bmh1. Naproti tomu pomocí měření CD v blízké UV oblasti byly odhaleny změny v terciární struktuře. Když toto zjištění spojíme se skutečností, že struktura dimeru proteinu 14-3-3 je obecně považována za vysoce rigidní (Obsil a Obsilova 2011; Obsilova et al. 2008), můžeme vyslovit předpoklad, že zde dochází ke změně terciární struktury pNth1 v důsledku vazby dimeru proteinu Bmh1.

Při výzkumu vazebného rozhraní mezi proteinem Bmh1 a pNth1, bylo zjištěno, že vazba proteinu pNth1 ovlivňuje nejenom tzv. ligand-vazebný žlábek dimerního proteinu Bmh1, ale také oblasti v jeho okolí. Vazebné rozhraní proteinu Bmh1 zahrnuje méně konzervované oblasti helixů H6 a H8 vně centrálního kanálu dimeru tohoto proteinu. Podobný vazebný mechanismus byl již popsán v případě lidského proteinu 14-3-3ζ v jeho komplexu s regulátorem G-proteinové signalizace 3 (Rezabkova et al. 2011). Navíc stejná oblast byla označena jako klíčová část vazebného rozhraní ve vyřešené krystalové struktuře komplexu florigenu Hd3a a proteinu 14-3-3 (Taoka et al. 2011). Zdá se tedy, že tato oblast vně centrálního kanálu je běžným interakčním rozhraním v mnoha komplexech s proteiny 14-3-3 a že sekvenční variabilita tohoto úseku patrně přispívá k vazebné specifitě jednotlivých isoform proteinů 14-3-3 (Obsil a Obsilova 2011; Obsilova et al. 2008; Gardino et al. 2006).

V další fázi výzkumu neutrální trehalasy Nth1 byla pozornost věnována tzv. EF-hand motivu, který je široce rozšířenou strukturou mezi velkým množstvím Ca-vazebných proteinů (Rashidi et al. 1999; Lewit-Bentley a Réty 2000). Jak již bylo zmíněno N-koncová část enzymu Nth1 pocházejícího z *S. cerevisiae* obsahuje právě tuto sekvenci. Nabízí se tedy otázka jakou roli při regulaci aktivity Nth1 hraje tento motiv a vazba kationtů Ca^{2+} (Franco et al. 2003).

Pomocí cílené jednobodové mutageneze aminokyselinových zbytků na klíčových pozicích EF-hand motivu jsme zjistili, že integrita tohoto motivu má rozhodující vliv na aktivaci pNth1 závislou na proteinech 14-3-3. Díky tomu můžeme předpokládat, že tento motiv má esenciální význam pro celý mechanismus aktivace Nth1. Tento předpoklad je také v dobré shodě s výsledky experimentů z H/D výměny spojené s MS, které odhalily výrazné změny struktury pNth1 vyvolané vazbou proteinů Bmh1 nejen v oblasti katalytické domény Nth1, ale také v oblasti EF-hand motivu.

Při porovnání aktivit mutantních forem pNth1 v přítomnosti a nepřítomnosti kationtů Ca^{2+} , bylo prokázáno, že aktivita těchto enzymů závislá na Bmh1 dosahuje nejvyšších hladin pouze

za současné přítomnosti kationtů Ca^{2+} . Jedinými výjimkami z tohoto pravidla byly mutantní formy pNth1 D114L, N118L a D125L, které obsahovaly mutace na konzervovaných pozicích EF-hand motivu (pozice 1, 5 a 12). Již dříve bylo prokázáno, že tyto aminokyselinové zbytky se přímo účastní koordinační vazby s kationty Ca^{2+} (Rashidi et al. 1999; Lewit-Bentley a Réty 2000). Měření CD spekter v blízké UV oblasti odhalilo, že mutantní formy pNth1 D114L a D125L vykazují stejné změny terciární struktury způsobené vazbou proteinů Bmh1 jako proteiny Nth1 WT. Z tohoto zjištění vyplývá, že nemožnost aktivace těchto mutantních forem Nth1 není způsobena nepřítomností strukturních změn způsobených vazbou proteinů Bmh1, ale patrně změnami konformace EF-hand motivu. Pro ověření této hypotézy byly připraveny mutantní formy pNth1 D114E a D125E, které měly obnovit vazbu kationtů Ca^{2+} na EF-hand motiv. Obě tyto mutantní formy pNth1 vykazovaly vysokou aktivitu v přítomnosti proteinů Bmh1, ale pouze za současné přítomnosti kationtů Ca^{2+} . Je tedy pravděpodobné, že vazba kationtů Ca^{2+} na EF-hand motiv usnadňuje aktivaci pNth1 prostřednictvím proteinů Bmh1, protože právě kationty Ca^{2+} umožnily aktivaci jinak neaktivních mutantních forem pNth1 D114E a D125E.

Zásadní úloha oblasti obsahující EF-hand motiv při aktivaci pNth1 byla také potvrzena výsledky získanými z H/D výměny a chemického zesílení spojených s MS. Tyto experimenty ukázaly, že zmíněná oblast zaujímá různé konformační stavy v závislosti na vazbě kationtů Ca^{2+} a/nebo proteinů Bmh1. Předpokládáme, že právě tyto různé strukturní stavy se odrážejí v rozdílných enzymových aktivitách pNth1 v přítomnosti kationtů Ca^{2+} a/nebo proteinů Bmh1.

Naše domněnky byly následně potvrzeny pomocí struktur s nízkým rozlišením získaných měřením SAXS. Porovnáním struktury Nth1 samotné s komplexem pNth1:Bmh1 bylo jasné patrné, že po vazbě proteinů Bmh1 dochází k dramatickým strukturním změnám v rámci celé molekuly pNth1. Struktura s nízkým rozlišením komplexu pNth1:Bmh1 také ukazuje, že oblast pNth1 obsahující EF-hand motiv tvoří samostatnou doménu, která interaguje jak s vnějším povrchem dimeru proteinů Bmh1, tak s katalytickou trehalosovou doménou pNth1. Toto zjištění je také ve shodě s naší hypotézou, že konformační stav této oblasti ovlivněný vazbou proteinu Bmh1, zprostředkovaně vyvolává strukturní změnu katalytické domény pNth1 a tím umožňuje aktivaci enzymu pNth1.

Na základě všech dosažených výsledků byl navržen nový detailnější model mechanismu aktivace Nth1. Tento model předpokládá, že v nepřítomnosti proteinů Bmh1 zaujímá Nth1 nataženou tyčkovitou konformaci a trehalosová aktivita enzymu v tomto stavu je velice nízká. Příčinou je patrně špatná přístupnost aktivního centra pro substrát (trehalosu). Vazba proteinu Bmh1 na fosforylovanou N-koncovou část pNth1 indukuje prokazatelné strukturní změny celé molekuly pNth1. Tyto změny pravděpodobně usnadňují přístup substrátu do aktivního centra

enzymu a tím enzym aktivují. Ačkoliv vazba kationtů Ca^{2+} není pro aktivaci Nth1 bezpodmínečně nutná, kationty Ca^{2+} usnadňují celý proces aktivace tím, že ovlivňují strukturu Nth1 zejména v oblasti EF-hand motivu. Námi získaná data naznačují, že doména Nth1 obsahující EF-hand motiv funguje jako prostředník, skrze kterého proteiny 14-3-3 ovlivňují strukturu katalytické domény pNth1.

8 Závěr

Výsledky výzkumu enzymu neutrální trehalasy Nth1 pocházející z kvasinek rodu *S. cerevisiae* obsažené v této disertační práci byly zveřejněny ve třech impaktovaných publikacích. Ve dvou experimentálních publikacích je autorka uvedena na prvním a prvním sdíleném místě, třetí práce je pak přehledový článek. Ke studiu molekulárního a strukturního mechanismu regulace aktivity Nth1 prostřednictvím kvasničného proteinu 14-3-3 (Bmh1) a/nebo kationtů Ca^{2+} byly využity nejrůznější techniky molekulární biologie a biofyzikální chemie například: cílená bodová mutagenese, enzymová kinetika, diferenční skenovací fluorimetrie, analytická ultracentrifugace, CD spektroskopie, vodík/deuteriová výměna a chemické zesílení spojené s MS a malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).

V rámci této práce bylo dokázáno, že:

- 1) Vazba proteinu Bmh1 na pNth1 ovlivňuje strukturu celé molekuly pNth1.
- 2) EF-hand motiv je součástí samostatné Ca-vazebné domény Nth1.
- 3) Ca-vazebná doména interaguje jak s proteinem Bmh1, tak s katalytickou trehalasovou doménou pNth1 a patrně funguje jako prostředník, skrze kterého protein Bmh1 ovlivňuje strukturu katalytické domény pNth1.
- 4) Strukturní změny, které byly odhaleny v oblastech obklopujících aktivní centrum pNth1, pravděpodobně zvyšují jeho přístupnost pro substrát, což vede k aktivaci enzymu.
- 5) Vazba kationtů Ca^{2+} také ovlivňuje strukturu pNth1 a usnadňuje tím její aktivaci.

Všechny zmíněné výsledky přispěly k lepšímu porozumění mechanismu regulace aktivity neutrální trehalasy Nth1 a navíc obsahují novou strukturní studii komplexu proteinu 14-3-3 s plně aktivním enzymem.

9 Souhrn

Enzym neutrální trehalasa (Nth1, EC 3.2.1.28), pocházející z kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*, pomáhá těmto organismům přežít v nepříznivých životních podmínkách. Nth1 hydrolyticky štěpí zásobní a ochranný disacharid trehalosu za vzniku dvou molekul glukosy. Aktivita enzymu Nth1 je regulována prostřednictvím fosforylace cAMP-dependentní proteinkinasou A (PKA), následnou vazbou kvasničného proteinu 14-3-3 (Bmh1) a pomocí kationtů Ca^{2+} , které se váží na Ca-vazebnou doménu. Tato doména se nachází na N-konci Nth1 a obsahuje tzv. EF-hand motiv ($\text{D}^{114}\text{TDKNYQITIED}^{125}$), který je konzervovaný mezi velkým množstvím Ca-vazebných proteinů.

Hlavním cílem tohoto projektu bylo objasnění molekulární a strukturní podstaty mechanismu regulace aktivity Nth1 prostřednictvím vazby kationtů Ca^{2+} a proteinu Bmh1. Dalšími cíli bylo vyřešení struktury samotné Nth1 a jejího komplexu s Bmh1.

Pro výzkum úlohy kationtů Ca^{2+} v regulaci aktivity Nth1, bylo připraveno dvanáct mutantních forem Nth1 s cílenými bodovými mutacemi v oblasti tzv. EF-hand motivu a jeho blízkém okolí a následně byla stanovena jejich aktivita v závislosti na přítomnosti Bmh1 a/nebo kationtů Ca^{2+} . Tvorba stabilních komplexů fosforylované pNth1 (včetně mutantních forem) s proteinem Bmh1 byla potvrzena pomocí nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy a analytické ultracentrifugace. Vliv mutací na strukturu a vlastnosti Nth1 byl ověřen CD spektroskopii a diferenční skenovací fluorimetrií. Pro objasnění struktury proteinů Bmh1, Nth1 a jejich společného komplexu byla použita vodík/deuteriová (H/D) výměna a chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií a malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS). Souběžně s těmito metodami byly prováděny první krystalografické experimenty jak samotné Nth1, tak jejího komplexu s proteinem Bmh1.

Výsledky těchto studií ukázaly, že vazba proteinu Bmh1 indukuje podstatné změny struktury v několika oblastech pNth1 zahrnující N-koncovou část, kde se váže protein Bmh1, ale také oblast Ca-vazebné a katalytické trehalasové domény pNth1. Změny konformace katalytické domény pNth1 patrně umožňují její lepší přístupnost pro substrát a tak aktivaci tohoto enzymu. Vazebné rozhraní proteinu Bmh1 nezahrnuje jen ligand-vazebný žlábek, do kterého se váže fosforylovaná N-koncová část pNth1, ale také oblasti vně centrálního kanálu dimeru tohoto proteinu. Struktura s nízkým rozlišením odhalila, že oblast Nth1 obsahující EF-hand motiv tvoří samostatnou Ca-vazebnou doménu, která interaguje jak s proteinem 14-3-3, tak s katalytickou trehalasovou doménou Nth1. Integrita EF-hand motivu je klíčová pro aktivaci Nth1 prostřednictvím proteinu Bmh1 i pro vazbu kationtů Ca^{2+} . Aktivace pNth1 prostřednictvím proteinů Bmh1 společně s kationty Ca^{2+} je více účinná než aktivace

v nepřítomnosti těchto kationtů. Předpokládáme, že kationty Ca^{2+} celý proces aktivace pNth1 usnadňují, i když pro tento proces nejsou bezpodmínečně nutné. Ze získaných dat navíc vyplývá, že Ca-vazebná doména obsahující EF-hand motiv funguje jako jakýsi prostředník, skrze kterého Bmh1 moduluje funkci katalytické domény Nth1.

Naše studie komplexu kvasničného proteinu 14-3-3 s plně aktivním enzymem pNth1 poskytuje jedinečný strukturní pohled na klíčový regulační mechanismus tohoto enzymu. Navíc je také první detailnější strukturní studií neutrální trehalasy pocházející z eukaryotického organismu. Získané výsledky mohou přispět nejen k lepšímu porozumění metabolismu trehalosy v kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae*, ale také úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci funkce jiných proteinů.

10 Summary

The yeast enzyme neutral trehalase (Nth1, EC 3.2.1.28) from the *Saccharomyces cerevisiae* helps these organisms to survive adverse living conditions. Nth1 hydrolyses a storage and protective disaccharide trehalose into two molecules of glucose. The activity of this enzyme is regulated by PKA phosphorylation, Ca^{2+} and the yeast 14-3-3 protein (Bmh1) binding. Ca^{2+} binds to the Ca-binding domain located within N-terminus of Nth1 and contains so called EF-hand motif (D¹¹⁴TDKNYQITIED¹²⁵) which is highly conserved among many Ca-binding proteins.

The main aim of this project was to reveal the structural basis of the Bmh1- and calcium-dependent activation of Nth1. Other goals were to solve the structure of Nth1 itself and the structure of its complex with Bmh1.

To reveal how the calcium regulates the Nth1 activity we prepared twelve mutant forms of Nth1 using site directed mutagenesis. These mutations were located within the region of EF-hand motif and its close vicinity. We estimated the enzymatic activity of all these mutants in the presence of Bmh1 and/or Ca^{2+} . The ability of Nth1 to form stable complexes with Bmh1 was verified using the native polyacrylamide gel electrophoresis and analytical ultracentrifugation. The impact of mutations on the structure and properties of Nth1 was tested using CD spectroscopy and differential scanning fluorimetry. To investigate the structure of Bmh1, Nth1 and their complex we used hydrogen/deuterium (H/D) exchange and chemical crosslinking coupled with mass spectrometry and small angle X-ray scattering (SAXS). In parallel with these methods were carried out first crystallographic experiments with Nth1 itself and also with the pNth1:Bmh1 complex.

Results of these studies revealed that the Bmh1 binding induces significant structural changes of several pNth1 regions including the N-terminal segment where Bmh1 protein binds and also the Ca-binding domain and the catalytic trehalase domain of pNth1. We suggest that changes of the catalytic domain of pNth1 allow a better access for its substrate and thus activate this enzyme. The binding surface between pNth1 and Bmh1 includes not only the ligand binding groove of Bmh1 where the phosphorylated N-terminal part of pNth1 binds but also regions located outside the central channel of the Bmh1 dimer. The low resolution structure revealed that the EF-hand motif forms separate Ca-binding domain which interacts not only with the 14-3-3 protein but also with the catalytic trehalase domain of pNth1. The integrity of EF-hand motif is essential for Bmh1 dependent activation of Nth1 and for Ca^{2+} binding. The Bmh1-dependent activation of pNth1 in the presence of Ca^{2+} is more effective compared to the absence of Ca^{2+} . We assume that calcium binding, although not being crucial for its

activation, enhances the whole activation process of pNth1 by affecting its structure. Our data also suggest that the Ca-binding domain containing the EF-hand motif functions as the intermediary through which Bmh1 modulates the function of the catalytic domain of Nth1.

Our study of the yeast 14-3-3 protein complex with fully active enzyme pNth1 provides a unique structural view of a key regulatory mechanism of this enzyme. Moreover, it is also the first detailed structural study of the neutral trehalase from a eukaryotic organism. These results may not only contribute to a better understanding of the trehalose metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but also the role of 14-3-3 proteins in the regulation of other proteins functions.

11 Seznam citované literatury

- AITKEN, A., H. BAXTER, T. DUBOIS, S. CLOKIE, S. MACKIE, K. MITCHELL, A. PEDEN a E. ZEMLICKOVA, 2002. Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*. roč. 30, č. 4, s. 351–360.
- AITKEN, A., 1996. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends in Cell Biology*. roč. 6, č. 9, s. 341–347.
- ALESHIN, A. E., L. M. FIRSOV a R. B. HONZATKO, 1994. Refined structure for the complex of acarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 269, č. 22, s. 15631–15639.
- AMARAL, F. C., P. VAN DIJCK, J. R. NICOLI a J. M. THEVELEIN, 1997. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Archives of Microbiology*. roč. 167, č. 4, s. 202–208.
- APP, H. a H. HOLZER, 1989. Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 264, č. 29, s. 17583–17588.
- ARNOLD, K., L. BORDOLI, J. KOPP a T. SCHWEDE, 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*. roč. 22, č. 2, s. 195–201.
- AROLA, H., T. KOIVULA, A. L. KARVONEN, H. JOKELA, T. AHOLA a M. ISOKOSKI, 1999. Low trehalase activity is associated with abdominal symptoms caused by edible mushrooms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. roč. 34, č. 9, s. 898–903.
- ATTFIELD, P. V., 1987. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS letters*. roč. 225, č. 1-2, s. 259–263.
- AVIGAD, G., O. ZIV a E. NEUFELD, 1965. Intracellular trehalase of a hybrid yeast. *The Biochemical Journal*. roč. 97, č. 3, s. 715–722.
- BABU, Y. S., C. E. BUGG a W. J. COOK, 1988. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. roč. 204, č. 1, s. 191–204.
- BEATTIE, G. M., J. H. CROWE, A. D. LOPEZ, V. CIRULLI, C. RICORDI a A. HAYEK, 1997. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. *Diabetes*. roč. 46, č. 3, s. 519–523.
- BECKER, A., P. SCHLÖDER, J. E. STEELE a G. WEGENER, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*. roč. 52, č. 5, s. 433–439.
- BELL, W., P. KLAASSEN, M. OHNACKER, T. BOLLER, M. HERWEIJER, P. SCHOPPINK, P. VAN DER ZEE a A. WIEMKEN, 1992. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *European journal of biochemistry / FEBS*. roč. 209, č. 3, s. 951–959.
- BENAROUJ, N., D. H. LEE a A. L. GOLDBERG, 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 276, č. 26, s. 24261–24267.
- BENÍTEZ, T., J. María GASENT-RAMÍREZ, F. CASTREJÓN a A. C. CODÓN, 1996. Development of New Strains for the Food Industry. *Biotechnology Progress*. roč. 12, č. 2, s. 149–163.

- BENZINGER, A., G. M. POPOWICZ, J. K. JOY, S. MAJUMDAR, T.A. HOLAK a H. HERMEKING, 2005. The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Research*. roč. 15, č. 4, s. 219–227.
- BERGER, S. J. a B. SACKTOR, 1970. Isolation and biochemical characterization of brush borders from rabbit kidney. *The Journal of Cell Biology*. roč. 47, č. 3, s. 637–645.
- BERG, J. M., J. L. TYMOCZKO a L. STRYER, 2002. *Biochemistry*. 5. vyd. B.m.: W H Freeman.
- BERGOZ, R., 1971. Trehalose malabsorption causing intolerance to mushrooms. Report of a probable case. *Gastroenterology*. roč. 60, č. 5, s. 909–912.
- BLAKELEY, D., B. TOLLIDAY, C. COLACO a B. ROSER, 1990. Dry instant blood typing plate for bedside use. *Lancet*. roč. 336, č. 8719, s. 854–855.
- BRENNAN, P. J. a H. NIKAIIDO, 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. roč. 64, s. 29–63.
- BRIDGES, D. a G. B. G. MOORHEAD, 2005. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. roč. 2005, č. 296, s. re10.
- BRUNET, A., A. BONNI, M. J. ZIGMOND, M. Z. LIN, P. JUO, L. S. HU, M. J. ANDERSON, K. C. ARDEN, J. BLENIS a M. E. GREENBERG, 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. roč. 96, č. 6, s. 857–868.
- BUSTOS, Diego M. a A. A. IGLESIAS, 2006. Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins. *Proteins*. roč. 63, č. 1, s. 35–42.
- CARPENTER, J. F. a J. H. CROWE, 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*. roč. 28, č. 9, s. 3916–3922.
- CROWE, J. H., L. M. CROWE a D. CHAPMAN, 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science (New York, N.Y.)*. roč. 223, č. 4637, s. 701–703.
- CROWE, J. H., F. A. HOEKSTRA a L. M. CROWE, 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*. roč. 54, s. 579–599.
- DAHLQVIST, A., 1968. Assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry*. roč. 22, č. 1, s. 99–107.
- DAM, J., C. A. VELIKOVSKY, R. A. MARIUZZA, C. URBANKE a P. SCHUCK, 2005. Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions $c(s)$. *Biophysical Journal*, roč. 89, č. 1, s. 619–634.
- DAVIS, T. N., M. S. URDEA, F. R. MASIARZ a J. THORNER, 1986. Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell*. roč. 47, č. 3, s. 423–431.
- DEFAYE, J., H. DRIGUEZ, B. HENRISSAT a E. BAR-GUILLOUX, 1983. Stereochemistry of the hydrolysis of α,α -trehalose by trehalase, determined by using a labelled substrate. *Carbohydrate Research*. roč. 124, č. 2, s. 265–273
- DELLAMORA-ORTIZ, G. M., C. H. ORTIZ, J. C. MAIA a A. D. PANEK, 1986. Partial purification and characterization of the interconvertible forms of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. roč. 251, č. 1, s. 205–214.

- DE MESQUITA, J. F., A. D. PANEK a P. S. DE ARAUJO, 2003. In silico and in vivo analysis reveal a novel gene in *Saccharomyces cerevisiae* trehalose metabolism. *BMC genomics*, roč. 4, č. 1, s. 45.
- D' ENFERT, C., B. M. BONINI, P. D. ZAPPELLA, T. FONTAINE, A. M. DA SILVA a H. F. TERENCEZI, 1999. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, roč. 32, č. 3, s. 471–483.
- DE VIRGILIO, C., T. HOTTIGER, J. DOMINGUEZ, T. BOLLER a A. WIEMKEN, 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European journal of biochemistry / FEBS*, roč. 219, č. 1-2, s. 179–186.
- DYSON, H. J. a P. E. WRIGHT, 2002. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, roč. 12, č. 1, s. 54–60.
- ECK, R., C. BERGMANN, K. ZIEGELBAUER, W. SCHÖNFELD a W. KÜNKEL, 1997. A neutral trehalase gene from *Candida albicans*: molecular cloning, characterization and disruption. *Microbiology (Reading, England)*, roč. 143 (Pt 12), s. 3747–3756.
- EGLOFF, M. P., J. UPPENBERG, L. HAALCK a H. VAN TILBEURGH, 2001. Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. *Structure (London, England: 1993)*, roč. 9, č. 8, s. 689–697.
- ELBEIN, A. D., 1974. The metabolism of alpha,alpha-trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, roč. 30, s.
- ELBEIN, A. D., Y. T. PAN, I. PASTUSZAK a D. CARROLL, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, roč. 13, č. 4, s. 1460–2423.
- EMSLEY, P., B. LOHKAMP, W. G. SCOTT a K. COWTAN, 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, roč. 66, č. Pt 4, s. 486–501.
- ENGEN, J. R., 2009. Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Analytical Chemistry*, roč. 81, č. 19, s. 7870–7875.
- ERICSSON, U. B., B. M. HALLBERG, G. T. DETITTA, Niek DEKKER a Pär NORDLUND, 2006. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*, roč. 357, č. 2, s. 289–298.
- ESWAR, N., B. WEBB, M. A. MARTI-RENOM, M. S. MADHUSUDHAN, D. ERAMIAN, M. SHEN, U. PIEPER a A. SALI, 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science*, roč. 50, 2.9.1–2.9.31.
- FICARRO, S. B., M. L. MCCLELAND, P. T. STUKENBERG, D. J. BURKE, M. M. ROSS, J. SHABANOWITZ, D. F. HUNT a F. M. WHITE, 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, roč. 20, č. 3, s. 301–305.
- FISCHER, E., 1895. Ueber den Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme III. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, roč. 28, č. 2, s. 1429–1438.
- FRANCO, A., T. SOTO, J. VICENTE-SOLER, V. PAREDES, M. MADRID, M. GACTO a J. CANSADO, 2003. A role for calcium in the regulation of neutral trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Biochemical Journal*, roč. 376, č. Pt 1, s. 209–217.
- FU, H., R. R. SUBRAMANIAN a S. C. MASTERS, 2000. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, roč. 40, č. 1, s. 617–647

- GADD, G. M., K. CHALMERS a R. H. REED, 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. roč. 48, č. 1-2, s. 249–254
- GALAND, G., 1984. Purification and characterization of kidney and intestinal brush-border membrane trehalases from the rabbit. *Biochimica Et Biophysica Acta*. roč. 789, č. 1, s. 10–19.
- GANGULY, S., J. A. GASTEL, J. L. WELLER, C. SCHWARTZ, H. JAFFE, M. A. NAMBOODIRI, S. L. COON, A. B. HICKMAN, M. ROLLAG, T. OBSIL, P. BEAUVERGER, G. FERRY, J. A. BOUTIN a D. C. KLEIN, 2001. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 98, č. 14, s. 8083–8088.
- GANGULY, S., J. L. WELLER, A. HO, P. CHEMINEAU, B. MALPAUX a D. C. KLEIN, 2005. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 102, č. 4, s. 1222–1227.
- GARDINO, A. K., S. J. SMERDON a M. B. YAFFE, 2006. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Seminars in Cancer Biology*. roč. 16, č. 3, s. 173–182.
- GEISER, J. R., D. VAN TUINEN, S. E. BROCKERHOFF, M. M. NEFF a T. N. DAVIS, 1991. Can calmodulin function without binding calcium? *Cell*. roč. 65, č. 6, s. 949–959.
- GÉLINAS, P., G. FISET, A. LEDUY a J. GOULET, 1989. Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of bakers' yeast in frozen doughs. *Applied and Environmental Microbiology*. roč. 55, č. 10, s. 2453–2459.
- GIBSON, R. P., T. M. GLOSTER, S. ROBERTS, R. A. J. WARREN, I. STORCH DE GRACIA, A. GARCÍA, J. L. CHIARA a G. J. DAVIES, 2007. Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. roč. 46, č. 22, s. 4115–4119.
- GUTIERREZ, C., M. ARDOUREL, E. BREMER, A. MIDDENDORF, W. BOOS a U. EHMANN, 1989. Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. *Molecular & general genetics: MGG*. 6., roč. 217, č. 2-3, s. 347–354.
- HICKMAN, A. B., D. C. KLEIN a F. DYDA, 1999a. Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. *Molecular Cell*. roč. 3, č. 1, s. 23–32.
- HICKMAN, A. B., M. A. NAMBOODIRI, D. C. KLEIN a F. DYDA, 1999b. The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog. *Cell*. roč. 97, č. 3, s. 361–369.
- HIDAKA, M., Y. HONDA, M. KITAOKA, S. NIRASAWA, K. HAYASHI, T. WAKAGI, H. SHOUN a S. FUSHINOBU, 2004. Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like (α/α)(6) barrel fold. *Structure (London, England: 1993)*. roč. 12, č. 6, s. 937–947.
- HOTTIGER, T., C. DE VIRGILIO, M. N. HALL, T. BOLLER a A. WIEMKEN, 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *European journal of biochemistry / FEBS*. roč. 219, č. 1-2, s. 187–193.

- HOTTIGER, T., P. SCHMUTZ a A. WIEMKEN, 1987. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. roč. 169, č. 12, s. 5518–5522.
- CHANDRA, M., W. D. MCCUBBIN, K. OIKAWA, C. M. KAY a L. B. SMILLIE, 1994. Ca²⁺, Mg²⁺, and troponin I inhibitory peptide binding to a Phe-154 to Trp mutant of chicken skeletal muscle troponin C. *Biochemistry*. roč. 33, č. 10, s. 2961–2969.
- CHO, Y., S. GORINA, P. D. JEFFREY a N. P. PAVLETICH, 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science (New York, N.Y.)*. roč. 265, č. 5170, s. 346–355.
- IACOB, R. E. a J. R. ENGEN, 2012. Hydrogen exchange mass spectrometry: are we out of the quicksand? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. roč. 23, č. 6, s. 1003–1010.
- JOHNSON, C., S. CROWTHER, M. J. STAFFORD, D. G. CAMPBELL, R. TOTH a C. MACKINTOSH, 2010. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *The Biochemical Journal*. roč. 427, č. 1, s. 69–78.
- JULES, M., G. BELTRAN, J. FRANÇOIS a J. L. PARROU, 2008. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Applied and Environmental Microbiology*. roč. 74, č. 3, s. 605–614.
- KANDROR, O., A. DELEON a A. L. GOLDBERG, 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 99, č. 15, s. 9727–9732.
- KARA, N. Z., L. TOKER, G. AGAM, G. W. ANDERSON, R. H. BELMAKER a H. EINAT, 2013. Trehalose induced antidepressant-like effects and autophagy enhancement in mice. *Psychopharmacology*. roč. 229, č. 2, s. 367–375.
- KAURA, D., D. K. BHASIN, S. V. RANA, R. KATYAL, K. VAIPHEI a K. SINGH, 2001. Alterations in duodenal disaccharidases in chronic smokers. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*. roč. 20, č. 2, s. 62–63.
- KAVAN, D. a P. MAN, 2011. MSTools—Web based application for visualization and presentation of HXMS data. *International Journal of Mass Spectrometry*. roč. 302, č. 1–3, Hydrogen Exchange Mass Spectrometry, s. 53–58.
- KELLER, F., M. SCHELLENBERG a A. WIEMKEN, 1982. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Archives of Microbiology*. roč. 131, č. 4, s. 298–301.
- KELLY, S. M., T. J. JESS a N. C. PRICE, 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. roč. 1751, č. 2, s. 119–139
- KIM, J., P. ALIZADEH, T. HARDING, A. HEFNER-GRAVINK a D. J. KLIONSKY, 1996. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Applied and Environmental Microbiology*. roč. 62, č. 5, s. 1563–1569.
- KOHLMEIER, M., 2003. *Nutrient Metabolism: Structures, Functions, and Genetics*. B.m.: Academic Press. ISBN 9780080537894.
- KOCH, E. M. a F. C. KOCH, 1925. THE PRESENCE OF TREHALOSE IN YEAST. *Science (New York, N.Y.)*. roč. 61, č. 1587, s. 570–572.

- KONAREV, P. V., M. V. PETOUKHOV, V. V. VOLKOV a D. I. SVERGUN, 2006. ATASAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*. roč. 39, č. 2, s. 277–286.
- KONAREV, P.V., V. V. VOLKOV, A. V. SOKOLOVA, M. H. J. KOCH a D. I. SVERGUN, 2003. PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*. roč. 36, č. 5, s. 1277–1282.
- KOPECKA, M., D. KOSEK, Z. KUKACKA, L. REZABKOVA, P. MAN, P. NOVAK, T. OBSIL a V. OBSILOVA, 2014. Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 289, č. 20, s. 13948–13961.
- KOPP, M., H. MÜLLER a H. HOLZER, 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 268, č. 7, s. 4766–4774.
- KOPP, M., S. NAWAKA a H. HOLZER, 1994. Corrected sequence of the yeast neutral trehalase-encoding gene (NTH1): biological implications. *Gene*. roč. 150, č. 2, s. 403–404.
- KOSTELECKY, B., A. T. SAURIN, A. PURKISS, P. J. PARKER a N. Q. MCDONALD, 2009. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO reports*. roč. 10, č. 9, s. 983–989.
- LEBOWITZ, J., M. S. LEWIS a P. SCHUCK, 2002. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. roč. 11, č. 9, s. 2067–2079.
- LEDERER, E., 1976. Cord factor and related trehalose esters. *Chemistry and Physics of Lipids*. roč. 16, č. 2, s. 91–106.
- LEOPOLD, A. C. (ed), 1986. Membranes, Metabolism, and Dry Organisms. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1–377.
- LEWIT-BENTLEY, A. a S. RÉTY, 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. roč. 10, č. 6, s. 637–643.
- LILLIE, S. H. a J. R. PRINGLE, 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*. roč. 143, č. 3, s. 1384–1394.
- LIU, D., J. BIENKOWSKA, C. PETOSA, R. J. COLLIER, H. FU a R. LIDDINGTON, 1995. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*. roč. 376, č. 6536, s. 191–194.
- LIU, H., N. D. RODGERS, X. JIAO a M. KILEDJIAN, 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *The EMBO journal*. roč. 21, č. 17, s. 4699–4708.
- LONDESBOROUGH, J. a K. VARIMO, 1984. Characterization of two trehalases in baker's yeast. *The Biochemical Journal*. roč. 219, č. 2, s. 511–518..
- LONDESBOROUGH, J. a O. VUORIO, 1991. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from bakers' yeast: purification of a proteolytically activated form. *Journal of General Microbiology*. roč. 137, č. 2, s. 323–330.
- MACAKOVA, E., M. KOPECKA, Z. KUKACKA, D. VEISOVA, P. NOVAK, P. MAN, T. OBSIL a V. OBSILOVA, 2013. Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica Et Biophysica Acta*. roč. 1830, č. 10, s. 4491–4499.

- MADZAROVÁ-NOHEJLOVÁ, J., 1973. Trehalase deficiency in a family. *Gastroenterology*. roč. 65, č. 1, s. 130–133.
- MASTERS, S. C., K. J. PEDERSON, L. ZHANG, J. T. BARBIERI a H. FU, 1999. Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. roč. 38, č. 16, s. 5216–5221.
- MERTENS, H. D. T. a D. I. SVERGUN, 2010. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of Structural Biology*. roč. 172, č. 1, s. 128–141.
- MITTENBÜHLER, K. a H. HOLZER, 1988. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 263, č. 17, s. 8537–8543.
- MOORE, B. W. a V. J. PEREZ, 1967. Specific acidic proteins of the nervous system. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integratin*. s. 343–359.
- MORENO, S., A. KLAR a P. NURSE, 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*. roč. 194, s. 795–823.
- MÜLLER, J., R. A. AESCHBACHER, A. WINGLER, T. BOLLER a A. WIEMKEN, 2001. Trehalose and Trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. roč. 125, č. 2, s. 1086–1093.
- MÜLLER, J., A. WIEMKEN a R. AESCHBACHER, 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Science*. roč. 147, č. 1, s. 37–47.
- MURRAY, I. A., K. COUPLAND, J. A. SMITH, I. D. ANSELL a R. G. LONG, 2000. Intestinal trehalase activity in a UK population: establishing a normal range and the effect of disease. *The British Journal of Nutrition*. roč. 83, č. 3, s. 241–245.
- MUSLIN, A. J., J. W. TANNER, P. M. ALLEN a A. S. SHAW, 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. roč. 84, č. 6, s. 889–897.
- NEVES, M. J. a J. FRANÇOIS, 1992. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*. roč. 288 (Pt 3), s. 859–864.
- NIESEN, F. H., H. BERGLUND a M. VEDADI, 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*. roč. 2, č. 9, s. 2212–2221.
- NIWA, T., T. KATSUZAKI, T. YAZAWA, N. TATEMACHI, Y. EMOTO, T. MIYAZAKI a K. MAEDA, 1993. Urinary trehalase activity in chronic glomerulonephritis. *Nephron*. roč. 63, č. 4, s. 423–428.
- NWAKA, S. a H. HOLZER, 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. roč. 58, s. 197–237.
- NWAKA, S., M. KOPP a H. HOLZER, 1995. Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 270, č. 17, s. 10193–10198.
- NWAKA, S., B. MECHLER a H. HOLZER, 1996a. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS letters*. roč. 386, č. 2-3, s. 235–238.
- NWAKA, S., B. MECHLER, O. VON AHSEN a H. HOLZER, 1996b. The heat shock factor and mitochondrial Hsp70 are necessary for survival of heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. roč. 399, č. 3, s. 259–263.

- OBSILOVA, V., P. HERMAN, J. VECER, M. SULC, J. TEISINGER a T. OBSIL, 2004. 14-3-3zeta C-terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr232. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 279, č. 6, s. 4531–4540.
- OBSILOVA, V., E. NEDBALKOVA, J. SILHAN, E. BOURA, P.HERMAN, J. VECER, M. SULC, J. TEISINGER, F. DYDA a T. OBSIL, 2008. The 14-3-3 protein affects the conformation of the regulatory domain of human tyrosine hydroxylase. *Biochemistry*. roč. 47, č. 6, s. 1768–1777.
- OBSILOVA, V., J. VECER, P. HERMAN, A. PABIANOVA, M. SULC, J. TEISINGER, E. BOURA a T. OBSIL, 2005. 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry*. roč. 44, č. 34, s. 11608–11617.
- OBSILOVÁ, V., J. SILHAN, E. BOURA, J. TEISINGER a T. OBSIL, 2008. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. roč. 57 Suppl 3, s. S11–21.
- OBSIL, T., R. GHIRLANDO, D. C. KLEIN, S. GANGULY a F. DYDA, 2001. Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell*. roč. 105, č. 2, s. 257–267.
- OBSIL, T., R. GHIRLANDO, D. E. ANDERSON, A. B. HICKMAN a F. DYDA, 2003. Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry*. roč. 42, č. 51, s. 15264–15272.
- OBSIL, T. a V. OBSILOVA, 2011. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. roč. 22, č. 7, s. 663–672.
- ODA, Y., K. UNO a S. OHTA, 1986. Selection of yeasts for breadmaking by the frozen-dough method. *Applied and Environmental Microbiology*. roč. 52, č. 4, s. 941–943.
- OLDFIELD, C. J., J. MENG, J. Y. YANG, M. Q. YANG, V. N. UVERSKY a A. K. DUNKER, 2008. Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics*. roč. 9, Suppl 1, S1.
- ORTIZ, C. H., J. C. MAIA, M. N. TENAN, G. R. BRAZ-PADRÃO, J. R. MATTOON a A. D. PANEK, 1983. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. *Journal of Bacteriology*. roč. 153, č. 2, s. 644–651.
- OTTMANN, C., S. MARCO, N. JASPERT, C. MARCON, N. SCHAUER, M. WEYAND, C. VANDERMEEREN, G. DUBY, M. BOUTRY, A. WITTINGHOFER, J. RIGAUD a C. OECKING, 2007. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Molecular Cell*. roč. 25, č. 3, s. 427–440.
- PANEK, A. C., P. S. DE ARAUJO, V. MOURA NETO a A. D. PANEK, 1987. Regulation of the trehalose-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces*. I. Interconversion of forms by phosphorylation. *Current Genetics*. roč. 11, č. 6-7, s. 459–465.
- PANNI, S., C. LANDGRAF, R. VOLKMER-ENGERT, G. CESARENI a L. CASTAGNOLI, 2008. Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*. roč. 8, č. 1, s. 53–63.
- PANTOLIANO, M. W., E. C. PETRELLA, J. D. KWASNOSKI, V. S. LOBANOV, J. MYSLIK, E. GRAF, T. CARVER, E. ASEL, B. A. SPRINGER, P. LANE a F. R. SALEMME, 2001. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening*. roč. 6, č. 6, s. 429–440.

- PERNAMBUKO, M. B., J. WINDERICKX, M. CRAUWELS, G. GRIFFIOEN, W. H. MAGER a J. M. THEVELEIN, 1996. Glucose-triggered signalling in *Saccharomyces cerevisiae*: different requirements for sugar phosphorylation between cells grown on glucose and those grown on non-fermentable carbon sources. *Microbiology (Reading, England)*. roč. 142 (Pt 7), s. 1775–1782.
- POZUELO R., M., K. M. GERAGHTY, B. H. C. WONG, N. T. WOOD, D. G. CAMPBELL, N. MORRICE a C. MACKINTOSH, 2004. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *The Biochemical Journal*. roč. 379, č. Pt 2, s. 395–408.
- PUTNAM, C. D., M. HAMMEL, G. L. HURA a J. A. TAINER, 2007. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*. roč. 40, č. 3, s. 191–285.
- RAJAGOPALAN, S., A. M. JAULENT, M. WELLS, D. B. VEPRINTSEV a A. R. FERSHT, 2008. 14-3-3 activation of DNA binding of p53 by enhancing its association into tetramers. *Nucleic Acids Research*. roč. 36, č. 18, s. 5983–5991.
- RASHIDI, H. H., M. BAUER, J. PATTERSON a D. W. SMITH, 1999. Sequence motifs determine structure and Ca⁺⁺-binding by EF-hand proteins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. roč. 1, č. 1, s. 175–182.
- REZABKOVA, L., E. BOURA, P. HERMAN, J. VECER, L. BOUROVA, M. SULC, P. SVOBODA, V. OBSILOVA a T. OBSIL, 2010. 14-3-3 protein interacts with and affects the structure of RGS domain of regulator of G protein signaling 3 (RGS3). *Journal of Structural Biology*. roč. 170, č. 3, s. 451–461.
- REZABKOVA, L., M. KACIROVA, M. SULC, P. HERMAN, J. VECER, M. STEPANEK, V. OBSILOVA a T. OBSIL, 2012. Structural modulation of phospho-ducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *Biophysical Journal*. roč. 103, č. 9, s. 1960–1969.
- REZABKOVA, L., P. MAN, P. NOVAK, P. HERMAN, J. VECER, V. OBSILOVA a T. OBSIL, 2011. Structural basis for the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the regulator of G protein signaling 3 (RGS3) function. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 286, č. 50, s. 43527–43536.
- RIBEIRO, M. J., A. REINDERS, T. BOLLER, A. WIEMKEN a C. DE VIRGILIO, 1997. Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology*. roč. 25, č. 3, s. 571–581.
- RITTINGER, K., J. BUDMAN, J. XU, S. VOLINIA, L. C. CANTLEY, S. J. SMERDON, S. J. GAMBLIN a M. B. YAFFE, 1999. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Molecular Cell*. roč. 4, č. 2, s. 153–166.
- ROSENQUIST, M., M. ALSTERFJORD, C. LARSSON a M. SOMMARIN, 2001. Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiology*. roč. 127, č. 1, s. 142–149.
- ROUSSEAU, P., H. O. HALVORSON, L. A. BULLA a G. ST JULIAN, 1972. Germination and outgrowth of single spores of *Saccharomyces cerevisiae* viewed by scanning electron and phase-contrast microscopy. *Journal of Bacteriology*. roč. 109, č. 3, s. 1232–1238.
- ROZBESKY, D., P. MAN, D. KAVAN, J. CHMELIK, J. CERNY, K. BEZOUSKA a P. NOVAK, 2012. Chemical cross-linking and H/D exchange for fast refinement of protein crystal structure. *Analytical Chemistry*. roč. 84, č. 2, s. 867–870.

- RUDOLPH, B. R., I. CHANDRASEKHAR, B. P. GABER a M. NAGUMO, 1990. Molecular modelling of saccharide-lipid interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*. roč. 53, č. 2–3, s. 243–261.
- RUF, J., H. WACKER, P. JAMES, M. MAFFIA, P. SEILER, G. GALAND, A. VON KIECKEBUSCH, G. SEMENZA a N. MATEI, 1990. Rabbit small intestinal trehalase. Purification, cDNA cloning, expression, and verification of glycosylphosphatidylinositol anchoring. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 265, č. 25, s. 15034–15039.
- RUPP, B., 2009. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. B.m.: Garland Science. ISBN 9781134064199.
- SACKTOR, B., 1968. Trehalase and the transport of glucose in the mammalian kidney and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 60, č. 3, s. 1007–1014.
- SAHA, S., R. RAJAMAHENDRAN, A. BOEDIONO, C. SUMANTRI a T. SUZUKI, 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*. roč. 46, č. 2, s. 331–343.
- SARKAR, S., J. E. DAVIES, Z. HUANG, A. TUNNACLIFFE a D. C. RUBINSZTEIN, 2007. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 282, č. 8, s. 5641–5652.
- SHOEMAKER, B. A., J. J. PORTMAN a P. G. WOLYNES, 2000. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 97, č. 16, s. 8868–8873.
- SCHEPERS, W., G. VAN ZEEBROECK, M. PINKSE, P. VERHAERT a J. M. THEVELEIN, 2012. In vivo phosphorylation of Ser21 and Ser83 during nutrient-induced activation of the yeast protein kinase A (PKA) target trehalase. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 287, č. 53, s. 44130–44142.
- SCHUCK, P., 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical Journal*. roč. 78, č. 3, s. 1606–1619.
- SCHUMACHER, B., J. MONDRY, P. THIEL, M. WEYAND a C. OTTMANN, 2010. Structure of the p53 C-terminus bound to 14-3-3: implications for stabilization of the p53 tetramer. *FEBS letters*. roč. 584, č. 8, s. 1443–1448.
- SCHWEDE, T., J. KOPP, N. GUEX a M. C. PEITSCH, 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. roč. 31, č. 13, s. 3381–3385.
- SILHAN, J., V. OBSILOVA, J. VECER, P. HERMAN, M. SULC, J. TEISINGER a T. OBSIL, 2004. 14-3-3 protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 279, č. 47, s. 49113–49119.
- SILHAN, J., P. VACHA, P. STRNADOVA, J. VECER, P. HERMAN, M. SULC, J. TEISINGER, V. OBSILOVA a T. OBSIL, 2009. 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 284, č. 29, s. 19349–19360.
- SINGER, M. A. a S. LINDQUIST, 1998a. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell*. roč. 1, č. 5, s. 639–648.
- SINGER, M. A. a S. LINDQUIST, 1998b. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology*. roč. 16, č. 11, s. 460–468.

- SMITH, D. L., Y. DENG a Z. ZHANG, 1997. Probing the Non-covalent Structure of Proteins by Amide Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. roč. 32, č. 2, s. 135–146.
- SOTO, FERNANDEZ, VICENTE-SOLER, CANSADO a GACTO, 1999. Accumulation of trehalose by overexpression of tps1, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied and Environmental Microbiology*. roč. 65, č. 5, s. 2020–2024.
- SOTO, T., A. FRANCO, S. PADMANABHAN, J. VICENTE-SOLER, J. CANSADO a M. GACTO, 2002. Molecular interaction of neutral trehalase with other enzymes of trehalose metabolism in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European journal of biochemistry / FEBS*. roč. 269, č. 15, s. 3847–3855.
- SOTO, T., J. FERNÁNDEZ, A. DOMINGUEZ, J. VICENTE-SOLER, J. CANSADO a M. GACTO, 1998. Analysis of the ntp1+ gene, encoding neutral trehalase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica Et Biophysica Acta*. roč. 1443, č. 1-2, s. 225–229.
- SOUZA, A. C., J. F. DE MESQUITA, A. D. PANEK, J. T. SILVA a V. M. F. PASCHOALIN, 2002. Evidence for a modulation of neutral trehalase activity by Ca²⁺ and cAMP signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. roč. 35, č. 1, s. 11–16.
- SOUZA, N. O. a A. D. PANEK, 1968. Location of trehalase and trehalose in yeast cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. roč. 125, č. 1, s. 22–28.
- STAROVASNIK, M. A., D. R. SU, K. BECKINGHAM a R. E. KLEVIT, 1992. A series of point mutations reveal interactions between the calcium-binding sites of calmodulin. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. roč. 1, č. 2, s. 245–253.
- SU, Z. H., Y. SATO a O. YAMASHITA, 1993. Purification, cDNA cloning and northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochimica Et Biophysica Acta*. roč. 1173, č. 2, s. 217–224.
- SVERGUN, D. I., 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*. roč. 25, č. 4, s. 495–503.
- SVERGUN, D. I., 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal*. roč. 76, č. 6, s. 2879–2886.
- ŠMÍDOVÁ, A., 2014. *Studium stability katalytické domény neutrální trehalasy pomocí diferenční skenovací fluorimetrie*. Přírodovědecká fakulta. Bakalářská práce. Karlova Univerzita v Praze.
- TAKIGUCHI, M., T. NIIMI, Z. H. SU a T. YAGINUMA, 1992. Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. *The Biochemical Journal*. roč. 288 (Pt 1), s. 19–22.
- TAOKA, K., I. OHKI, H. TSUJI, K. FURUITA, K. HAYASHI, T. YANASE, M. YAMAGUCHI, C. NAKASHIMA, Y. A. PURWESTRI, S. TAMAKI, Y. OGAKI, C. SHIMADA, A. NAKAGAWA, C. KOJIMA a K. SHIMAMOTO, 2011. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*. roč. 476, č. 7360, s. 332–335.
- TAOKA, K., I. OHKI, H. TSUJI, C. KOJIMA a K. SHIMAMOTO, 2013. Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends in Plant Science*. roč. 18, č. 5, s. 287–294.
- TEO, L. H. a J. P. WOODRING, 1993. The trehalase of the house cricket *Acheta domesticus* L. (orthoptera: gryllidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. roč. 104, č. 3, s. 493–497.

- THEVELEIN, J. M., 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*. roč. 48, č. 1, s. 42–59.
- THEVELEIN, J. M., J. A. DEN HOLLANDER a R. G. SHULMAN, 1982. Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores: correlation with trehalose breakdown as studied by in vivo ¹³C NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 79, č. 11, s. 3503–3507.
- THEVELEIN, J. M. a K. A. JONES, 1983. Reversibility characteristics of glucose-induced trehalase activation associated with the breaking of dormancy in yeast ascospores. *European journal of biochemistry / FEBS*. 15.11., roč. 136, č. 3, s. 583–587.
- TOURINHO-DOS-SANTOS, C. F., N. BACHINSKI, V. M. PASCHOALIN, C. L. PAIVA, J. T. SILVA a A. D. PANEK, 1994. Periplasmic trehalase from *Escherichia coli*—characterization and immobilization on spherisorb. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. roč. 27, č. 3, s. 627–636.
- TRUONG, A. B., S. C. MASTERS, H. YANG a H. FU, 2002. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins*. roč. 49, č. 3, s. 321–325.
- TZIVION, G., Z. LUO a J. AVRUCH, 1998. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*. roč. 394, č. 6688, s. 88–92.
- TZIVION, G. a J. AVRUCH, 2002. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 277, č. 5, s. 3061–3064.
- UNO, I., K. MATSUMOTO, K. ADACHI a T. ISHIKAWA, 1983. Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 258, č. 18, s. 10867–10872.
- VAN ASSCHE, J. A., A. R. CARLIER a H. I. DEKEERSMAEKER, 1972. Trehalase activity in dormant and activated spores of *Phycomyces blakesleeianus*. *Planta*. roč. 103, č. 4, s. 327–333.
- VANDERCAMMEN, A., J. FRANÇOIS a H. G. HERS, 1989. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry / FEBS*. roč. 182, č. 3, s. 613–620.
- VAN DER PLAAT, J. B., 1974. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. roč. 56, č. 3, s. 580–587.
- VAN DIJCK, P., D. COLAVIZZA, P. SMET a J. M. THEVELEIN, 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. roč. 61, č. 1, s. 109–115.
- VAN HEUSDEN, G. P. H., 2009. 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics*. roč. 94, č. 5, s. 287–293.
- VAN HEUSDEN, G. P. H. a H. Y. STEENSMA, 2006. Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast (Chichester, England)*. roč. 23, č. 3, s. 159–171.
- VAN HEUSDEN, G. P., D. J. GRIFFITHS, J. C. FORD, T. F. CHIN-A-WOENG, P. A. SCHRADER, A. M. CARR a H. Y. STEENSMA, 1995. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *European journal of biochemistry / FEBS*. roč. 229, č. 1, s. 45–53.

- VAN SOLINGEN, P. a J. B. VAN DER PLAAT, 1975. Partial purification of the protein system controlling the breakdown of trehalose in baker's yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. roč. 62, č. 3, s. 553–560.
- VEISOVA, D., E. MACAKOVA, L. REZABKOVA, M. SULC, P. VACHA, H. SYCHROVA, T. OBSIL a V. OBSILOVA, 2012. Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *The Biochemical Journal*. roč. 443, č. 3, s. 663–670.
- VEISOVA, D., L. REZABKOVA, M. STEPANEK, P. NOVOTNA, P. HERMAN, J. VECER, T. OBSIL a V. OBSILOVA, 2010. The C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms. *Biochemistry*. roč. 49, č. 18, s. 3853–3861.
- VOGEL, G., R. A. AESCHBACHER, J. MÜLLER, T. BOLLER a A. WIEMKEN, 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. roč. 13, č. 5, s. 673–683.
- VOLKOV, V. V. a D. I. SVERGUN, 2003. Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*. roč. 36, č. 3, s. 860–864.
- WALES, T. E. a J. R. ENGEN, 2006. Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrometry Reviews*. roč. 25, č. 1, s. 158–170.
- WANG, B., H. YANG, Y. C. LIU, T. JELINEK, L. ZHANG, E. RUOSLAHTI a H. FU, 1999. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry*. roč. 38, č. 38, s. 12499–12504.
- WANG, W. a D. C. SHAKES, 1996. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *Journal of Molecular Evolution*. roč. 43, č. 4, s. 384–398.
- WERA, S., E. DE SCHRIJVER, I. GEYSKENS, S. NWAKA a J. M. THEVELEIN, 1999. Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*. roč. 343 Pt 3, s. 621–626.
- WHITMORE, L. a B. A. WALLACE, 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*. roč. 32, č. Web Server issue, s. W668–673.
- WIEMKEN, A., 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek*. roč. 58, č. 3, s. 209–217.
- WIEMKEN, A. a M. SCHELLENBERG, 1982. Does a cyclic AMP-dependent phosphorylation initiate the transfer of trehalase from the cytosol into the vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*? *FEBS letters*. roč. 150, č. 2, s. 329–331.
- WIGGERS, H. a L., 1832. Untersuchung über das Mutterkorn, *Secale cornutum*. *Annalen der Pharmacie*. roč. 1, č. 2, s. 129–182.
- WILKER, E. W., R. A. GRANT, S. C. ARTIM a M. B. YAFFE, 2005. A structural basis for 14-3-3 sigma functional specificity. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 280, č. 19, s. 18891–18898.
- WILSON, M. A. a A. T. BRUNGER, 2000. The 1.0 Å crystal structure of Ca(2+)-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *Journal of Molecular Biology*. roč. 301, č. 5, s. 1237–1256.
- WOLFE, K. H. a A. J. LOHAN, 1994. Sequence around the centromere of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II: similarity of CEN2 to CEN4. *Yeast (Chichester, England)*. roč. 10 Suppl A, s. S41–46.

- WRIGHT, P. E. a H. J. DYSON, 2009. Linking folding and binding. *Current Opinion in Structural Biology*. roč. 19, č. 1, s. 31–38.
- WYATT, G. R. a G. F. KALF, 1956. Trehalose in insects. *Federation proceedings*. roč. 15, s. 388.
- XIAO, B., S. J. SMERDON, D. H. JONES, G. G. DODSON, Y. SONEJI, A. AITKEN a S. J. GAMBLIN, 1995. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature*. roč. 376, č. 6536, s. 188–191.
- YAFFE, M. B., K. RITTINGER, S. VOLINIA, P. R. CARON, A. AITKEN, H. LEFFERS, S. J. GAMBLIN, S. J. SMERDON a L. C. CANTLEY, 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. roč. 91, č. 7, s. 961–971.
- YAFFE, M. B., 2002. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS letters*. roč. 513, č. 1, s. 53–57.
- YANG, X., W. H. LEE, F. SOBOTT, E. PAPAGRIGORIOU, C. V. ROBINSON, J. G. GROSSMANN, M. SUNDSTRÖM, D. A. DOYLE a J. M. ELKINS, 2006. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 103, č. 46, s. 17237–17242.
- YOKOMISE, H., K. INUI, H. WADA, S. HASEGAWA, N. OHNO a S. HITOMI, 1995. Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. roč. 110, č. 2, s. 382–385.
- YOKOMISE, H., K. INUI, H. WADA, M. UEDA a S. HITOMI, 1996. Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. roč. 111, č. 5, s. 930–934.
- YONEYAMA, Y. a J. E. LEVER, 1987. Apical trehalase expression associated with cell patterning after inducer treatment of LLC-PK1 monolayers. *Journal of Cellular Physiology*. roč. 131, č. 3, s. 330–341.
- YOUNG, M. M., N. TANG, J. C. HEMPEL, C. M. OSHIRO, E. W. TAYLOR, I. D. KUNTZ, B. W. GIBSON a G. DOLLINGER, 2000. High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. roč. 97, č. 11, s. 5802–5806.
- ZÄHRINGER, H., M. BURGERT, H. HOLZER a S. NWAKA, 1997. Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS letters*. roč. 412, č. 3, s. 615–620.

Internetové zdroje:

Mapa plasmidu pRSFDuet-1. Dostupná z URL: <<http://www.merckmillipore.cz>> [29. 3. 2015]

Program pro porovnávání aminokyselinových sekvencí – ClustalW2 Multiple Sequence Alignment. Dostupný z URL: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>> [29. 3. 2015]

Program pro predikci sekundární struktury proteinů – PSIPRED v3.3. Dostupný z URL: <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>> [29. 3. 2015]

Program pro tvorbu obrázků proteinových struktur – PyMOL 1.7.4. Dostupný z URL: <<http://www.pymol.org/>> [24. 4. 2015]

Program pro výpočet molárních extinkčních koeficientů – ProtParam tool. Dostupný z URL: <<http://web.expasy.org/protparam/>> [1. 4. 2015]

Programy pro vyhodnocování dat získaných pomocí SAXS. Dostupné z URL: <<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>> [14. 4. 2015]

Schéma principu diferenční skenovací fluorimetrie. Dostupné z URL: <http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html> [1. 4. 2015]

Strukturní vzorec homobifunkčního síťovacího činidla DSG. Dostupný z URL: <<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/20593>> [15. 4. 2015]

Strukturní vzorec homobifunkčního síťovacího činidla DSS. Dostupný z URL: <<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/21555>> [15. 4. 2015]

12 Přílohy

Příloha 1: *Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1.*

Příloha 2: *Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1.*

Příloha 3: *Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation.*