

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie



Mgr. Miroslava Kacířová

Mechanismus regulace funkce fosducinu.
The mechanism of the regulation of phosducin function.

Disertační práce

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

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Miroslava Kacířová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za cenné rady a trpělivost během vypracovávání mé disertační práce. Můj velký dík patří také RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za umožnění využívat k práci prostory ve FGÚ AV ČR, v.v.i, a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Další velký dík patří všem mým kolegům z laboratoře, kteří vytvářeli pozitivní a motivační pracovní prostředí.

Dále bych chtěla velmi poděkovat všem kolegům, kteří se podíleli na vědeckých publikacích, kterých jsem autorem, nebo spoluautorem, jmenovitě RNDr. Lence Řežábkové, Ph.D. (nyní v PSI, Švýcarsko) a RNDr. Daliboru Koškovi, Ph.D. (nyní v NIH, USA) za pomoc s analytickou ultracentrifugací a analýzou získaných dat. Dále Mgr. Jiřímu Nováčkovi, Ph.D. z CEITEC MU v Brně za naměření spekter nukleární magnetické rezonance (NMR) a analýzu dat, Mgr. Pavlu Srbovi, Ph.D. z ÚOCHB AV ČR, v.v.i. za odborné rady v oblasti NMR. RNDr. Petru Manovi, Ph.D., Mgr. Alanu Kádkovi a doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi z BioCeV MBÚ AV ČR, v.v.i. a PřF UK za hmotnostně-spektrometrická měření a pomoc s analýzou dat. Dále děkuji doc. RNDr. Miroslavu Štěpánkovi za pomoc s realizací měření dynamického rozptylu světla, analýzu dat a za poskytnutí odborných rad nejen při analýze dat, doc. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc. z MFF UK za časově-rozlišená fluorescenční měření, analýzu dat a poskytnutí odborných rad, RNDr. Pavlíně Ullrichové, Ph.D. za naměření spekter cirkulárního dichroismu a Středoevropskému technologickému institutu CEITEC MU za umožnění využití analytické ultracentrifugy.

V neposlední řadě bych pak ráda poděkovala své rodině a svým blízkým za podporu a všestrannou pomoc během mých studií, a svému příteli za trpělivost a noční, nebo brzece ranní doprovody z laboratoře.

Tato disertační práce byla realizována díky finanční podpoře:

Grantové agentury České republiky, projekt číslo P305/11/0708

Grantové agentury MŠMT, projekt číslo MSM0021620857

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 28510

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 793913

Výzkumného projektu FGÚ AV ČR, RVO 67985823

Seznam použitých zkratek

14-3-3 ζ	isoforma proteinu 14-3-3
14-3-3 ζ noW	isoforma proteinu 14-3-3 neobsahující tryptofany
6 \times His kotva	motiv šesti histidinů v řadě za sebou, tzv. His-Tag
Å	Angström (jednotka délky, $1 \cdot 10^{-10}$ m)
A	Ampér (jednotka elektrického proudu)
ANS	8-anilinaftalen-1-sulfonová kyselina
ATP	adenosin-5'-trifosfát
AUC	analytická ultracentrifugace
BamHI	restrikční enzym (EC 3.1.21.4)
BL21(DE3)	kmen bakterií <i>E. coli</i>
BMH1	isoforma proteinu 14-3-3
BMH2	isoforma proteinu 14-3-3
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependentní proteinkinasa II (EC 2.7.1.123)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	u metod značí cirkulární dichroismus
CEITEC MU	Středoevropský technologický institut Brno Masarykovy univerzity
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
C-konec	konec proteinu obsahující karboxylovou skupinu –COOH
CRX	<i>Cone-rod homeobox</i>
Cryo-EM	kryoelektronová mikroskopie
DEAE	diethylaminoethyl
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. <i>dynamic light scattering</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleotic acid</i>)
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EOM	z angl. <i>Ensemble Optimisation Method</i>
ESI	z angl. <i>Electrospray Ionisation</i>
FT-ICR MS	z angl. <i>Fourier Transform – Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>
GDP	guanosin-5'-difosfát
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> (receptor spojený s G-proteiny)
GRK2	G protein-spřažená receptorkinasa 2 (EC 2.7.11.15)
GRK3	G protein-spřažená receptorkinasa 3 (EC 2.7.11.15)

GTP	guanosin-5'-trifosfát
$G_{\alpha}, G_{\beta}, G_{\gamma}$	α, β, γ podjednotka G-proteinu zvaného transducin
h	Planckova konstanta, $6,626070040(81) \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
HDX-MS	výměna vodíku za deuterium spojená s hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysocúčinná kapalinová chromatografie
IDP	vnitřně neuspořádaný protein (z angl. <i>intrinsically <u>d</u>isordered protein</i>)
IPL	vnitřní plexiformní vrstva fotoreceptoru (z angl. <i>inner <u>p</u>lexiform <u>l</u>ayer</i>)
IPSL	3-(2-jodoacetamido)-proxyl
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
ITC	isotermální titrační kalorimetrie (z angl. <i>isothermal <u>t</u>itration <u>c</u>alorimetry</i>)
k_B	Boltzmannova konstanta, $(1,38064852 \pm 0,00000079) \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$
K_d	disociační konstanta
k_q	bimolekulární zhášecí konstanta
K_{SV}	Stern-Volmerova konstanta
kDa	kiloDalton
LB	médium dle Luria-Bertaniho
LC-MS	z angl. <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>Mass Spectrometry</i>)
M_w	molekulová hmotnost
N-konec	konec proteinu obsahující volnou aminoskupinu $-\text{NH}_2$
N_A	Avogadrova konstanta, $(6,022140857 \pm 0,000000074) \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
NdeI	restrikční enzym (EC 3.1.21.4)
NMR	nukleární magnetická rezonance
noW	neobsahující tryptofanové aminokyselinové zbytky
ONL	zevní jaderná vrstva fotoreceptoru (z angl. <i>outer <u>n</u>uclear <u>l</u>ayer</i>)
OPL	zevní plexiformní vrstva fotoreceptoru (z angl. <i>outer <u>p</u>lexiform <u>l</u>ayer</i>)
$\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$	otáčky za minutu
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
Pdc	fosducin
Pdc-CD	C-terminální doména fosducinu (aminokyselinová sekvence 110 – 246)

Pdc-ND	N-terminální doména fosducinu (aminokyselinová sekvence 1 – 107)
PdcQ52K	mutantní forma fosducinu (mutace Q52K)
PdcQ52K S73A	mutantní forma fosducinu (mutace Q52K a S73A)
Pdc WT	přírodně se vyskytující forma fosducinu (z angl. <i>wild-type</i>)
pET-15b	komerčně dostupný plasmid
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa A (EC 2.7.11.11)
R	molární (univerzální) plynová konstanta ($J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)
R_g	gyrační poloměr
RGS	regulátor G-proteinové signalizace
R_H	hydrodynamický poloměr
RIS	vnitřní segment tyčinky (z angl. <i>rod inner segment</i>)
ROS	vnější segment tyčinky (z angl. <i>rod outer segment</i>)
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření (z angl. <i>small-angle X-ray scattering</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný, redukční činidlo
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>)
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
SVD-MEM	z angl. <i>Singular Value Decomposition – Maximum Entropy Method</i>
TFA	kyselina trifluoroctová (z angl. <i>trifluoroacetic acid</i>)
TRIS	Tris-(hydroxymetyl)-aminometan
U	unit, jednotka katalytické aktivity
η	dynamická viskozita ($N \cdot s \cdot m^{-2}$)
ν	frekvence (s^{-1})

Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Seznam použitých zkratk 4	4
Obsah	7
Abstrakt.....	9
Abstract.....	10
1 Úvod.....	11
2 Literární přehled.....	13
2.1 Vnitřně neuspořádané proteiny (IDPs)	13
2.2 Fuzzy komplexy	14
2.3 Fosducin (Pdc)	16
2.3.1 Výskyt Pdc	16
2.3.2 Struktura Pdc.....	19
2.3.3 Funkce Pdc.....	25
2.3.4 Regulace funkce Pdc v sítnici oka	31
2.4 Proteiny 14-3-3	35
3 Cíl práce	37
4 Materiál a metody	38
4.1 Použitý materiál	38
4.1.1 Chemikálie	38
4.1.2 Přístroje	38
4.1.3 Ostatní materiál	39
4.2 Expres a purifikace.....	39
4.2.1 Expres, purifikace a fosforylace fosducinu (Pdc) a jeho mutantních forem ...	40
4.2.2 Expres, purifikace N a C-terminální domény Pdc (Pdc-ND, Pdc-CD) a fosforylace Pdc-ND.....	40
4.2.3 Expres, purifikace a fosforylace izotopově značeného Pdc a jeho mutantních forem pro NMR studie	40
4.2.4 Expres a purifikace proteinu 14-3-3 ζ ΔC a jeho isoform	41
4.3 Fluorescenční techniky	41
4.3.1 Zhášení tryptofanové fluorescence	41
4.3.2 Časově-rozlišené dohasínání intenzity fluorescence	42
4.3.3 Časově-rozlišený pokles anizotropie fluorescence	43
4.4 Dynamický rozptyl světla (DLS)	43
4.5 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)	43
4.6 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	44
4.6.1 Značení 14-3-3 ζ ΔC C189 pomocí paramagnetické značky IPSL.....	45
4.7 Analytická ultracentrifugace (AUC).....	46
4.8 Církulární dichroismus (CD)	48
4.9 Hmotnostní spektrometrie (MS)	48
4.9.1 Výměna H za D spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)	48
4.9.2 Limitovaná proteolýza spojená s hmotnostní spektrometrií	49
4.9.3 Limitovaná defosforylace spojená s hmotnostní spektrometrií	50
4.10 Limitovaná proteolýza s použitím SDS-PAGE	52
4.11 Limitovaná defosforylace s použitím SDS-Phos-tag-PAGE	52
5 Výsledky	54
5.1 Expres a purifikace proteinů	54

5.1.1	Purifikace proteinu ¹⁵ N-PdcQ52K	54
5.1.2	Purifikace proteinu 14-3-3ζΔC C189.....	55
5.1.3	Purifikace proteinu Pdc-ND.....	56
5.1.4	Purifikace proteinu ¹³ C, ¹⁵ N-Pdc-CD.....	57
5.2	Biofyzikální a strukturní charakterizace fosducinu (Pdc).....	58
5.2.1	Charakterizace Pdc pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)	58
5.2.2	Charakterizace Pdc pomocí cirkulárního dichroismu (CD).....	59
5.2.3	Charakterizace Pdc pomocí analytické ultracentrifugace (AUC).....	61
5.2.4	Měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ANS.....	62
5.2.5	Charakterizace Pdc pomocí maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS).....	63
5.2.6	Studium struktury Pdc pomocí nukleární magnetická rezonance (NMR)	68
5.3	Biofyzikální a strukturní charakterizace Pdc-PP a 14-3-3/Pdc-PP	69
5.3.1	Charakterizace pomocí analytické ultracentrifugace (AUC).....	69
5.3.2	Charakterizace pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)	73
5.3.3	Studium konformačního chování Pdc a 14-3-3ζΔC/Pdc-PP pomocí metod fluorescenční spektroskopie.....	74
5.3.4	Studium flexibility Pdc a 14-3-3ζΔC/Pdc-PP pomocí poklesu anizotropie fluorescence	78
5.3.5	Statické zhášení tryptofanové fluorescence	86
5.3.6	Mapování interakčního rozhraní komplexu 14-3-3/Pdc-PP metodou výměny H/D spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)	87
5.3.7	Nukleární magnetická rezonance (NMR) měřená na komplexu.....	91
5.3.8	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) měřený na komplexu	95
5.3.9	„All-atom“ modelování komplexu 14-3-3ζΔC/Pdc-PP	99
5.3.10	Limitovaná proteolýza	101
5.3.11	Limitovaná defosforylace	105
6	Diskuze.....	108
7	Závěr	111
	Seznam citované literatury.....	112
	Přílohy.....	123
8	Publikace	124
9	Teoretické základy k použitým metodám	217
9.1	Fluorescenční techniky	217
9.1.1	Základní fyzikální princip fluorescence.....	217
9.1.2	Zhášení tryptofanové fluorescence	218
9.1.3	Časově-rozlišené dohasínání intenzity fluorescence	221
9.1.4	Časově-rozlišený pokles anizotropie fluorescence	222
9.2	Dynamický rozptyl světla (DLS)	225
9.3	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)	227
9.4	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	236
9.5	Analytická ultracentrifugace (AUC).....	245
9.6	Cirkulární dichroismus (CD)	250
9.7	Hmotnostní spektrometrie (MS)	254
9.7.1	Výměna H za D spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS).....	255

Abstrakt

Předkládaná disertační práce volně navazuje na mou práci diplomovou. Zabývá se studiem 30kDa proteinu fosducinu (Pdc) a mechanismem regulace jeho funkce prostřednictvím vazby s 28kDa adaptorovým proteinem 14-3-3. Oba tyto proteiny se účastní signální dráhy spojené s G-proteiny, především v procesu vidění. Pdc váže komplex $\beta\gamma$ podjednotek heterotrimerního G-proteinu transducinu ($G_t\beta\gamma$) a tím brání zpětné reasociaci $G_t\beta\gamma$ s podjednotkou $G_t\alpha$, čímž blokuje přenos světelného signálu. Tento proces se pravděpodobně uplatňuje při dlouhodobé adaptaci na změnu intenzity světla. Regulační funkce Pdc je dále regulována jeho fosforylací a následnou vazbou na protein 14-3-3. Na základě dostupných dat bylo spekulováno, že vazba 14-3-3 je klíčová pro inhibici interakce mezi fosforylovaným Pdc (Pdc-PP) a $G_t\beta\gamma$. Vznik komplexu 14-3-3/Pdc-PP pak vede k reasociaci trimerního transducinu a zesílení přenosu světelného signálu. Mechanismus, jakým protein 14-3-3 inhibuje interakci Pdc s $G_t\beta\gamma$, je však stále neznámý.

Cílem této disertační práce bylo objasnit strukturu volného Pdc a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 a s pomocí získaných dat navrhnout mechanismus regulace funkce Pdc. Struktura Pdc a komplexu 14-3-3/Pdc-PP byla studována celou řadou biofyzikálních metod včetně malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS), NMR, H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) či metod fluorescenční spektroskopie. Získané výsledky ukázaly, že N-terminální doména Pdc (Pdc-ND) je vnitřně nestrukturovaný protein. Fosforylace Pdc ovlivňuje konformaci nejen v rámci Pdc-ND, kde se nacházejí obě fosforylační místa, ale i v rámci strukturované C-terminální domény (Pdc-CD). Protein 14-3-3 váže Pdc-PP s mikromolární vazebnou afinitou a tvorba komplexu ovlivňuje konformaci a snižuje flexibilitu zejména fosforylované Pdc-ND. Obě fosforylační místa Pdc jsou klíčová pro vazbu proteinu 14-3-3. Velká část Pdc-ND, která tvoří většinu vazebného povrchu Pdc pro $G_t\beta$, se v komplexu se 14-3-3 nachází buď v centrálním kanálu molekuly dimeru 14-3-3, nebo v blízkosti jeho povrchu. Vazba 14-3-3 tedy blokuje vazebný povrch Pdc pro $G_t\beta$ a tím inhibuje tuto interakci. NMR a HDX-MS měření dále ukázala, že Pdc-PP zůstává i po navázání na protein 14-3-3 flexibilní, což naznačuje, že by se mohlo jednat o tzv. „fuzzy“ komplex. Získané výsledky také naznačují, že vazba proteinu 14-3-3 zpomaluje defosforylací Pdc-PP.

Abstract

This dissertation is focused on 30 kDa protein phosphodiesterase (Pdc) and on the regulation of its function through the interaction with 28 kDa adaptor protein 14-3-3. These two proteins participate in G-protein signal transduction pathways, especially in the process of light signal transduction. It is assumed that Pdc binds to the $G_i\beta\gamma$ complex of G-protein called transducin and through this interaction it inhibits the reassociation of $G_i\beta\gamma$ with $G_i\alpha$ thus reducing the visual signal transfer. This process is thought to participate in a long-term light adaptation. The regulation of Pdc function is further regulated by its phosphorylation and subsequent binding to the 14-3-3 protein. It has been speculated that the 14-3-3 binding plays a key role in the inhibition of the interaction between phosphorylated Pdc (Pdc-PP) and $G_i\beta\gamma$. The formation of the 14-3-3/Pdc-PP complex leads to the reassociation of $G_i\beta\gamma$ with $G_i\alpha$ and consequently to the amplification of visual signal transfer. Nevertheless, the mechanism by which the 14-3-3 protein binding inhibits the interaction between Pdc and $G_i\beta\gamma$ remains elusive.

The main aims of this dissertation were: (i) to investigate the structure of Pdc in its apo-state (in the absence of the binding partner) and in the complex with 14-3-3, and (ii) to suggest the mechanism of the 14-3-3-mediated regulation of Pdc function. The structure of Pdc and the 14-3-3/Pdc-PP complex was studied using various biophysical methods including small-angle X-ray scattering (SAXS), NMR, H/D exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS) and fluorescence techniques. Our data suggested that the N-terminal domain of Pdc (Pdc-ND) is intrinsically disordered protein. The phosphorylation of Pdc affects conformation of both its domains - unstructured Pdc-ND as well as structured C-terminal domain (Pdc-CD). The 14-3-3 protein binds Pdc-PP with the binding affinity in micromolar range and the complex formation affects the conformation of Pdc especially within Pdc-ND. Both phosphorylation sites are essential for the complex formation. The majority of Pdc-ND, which accounts for the most of the $G_i\beta$ binding surface, is located either in the central channel of the 14-3-3 dimer or in the close vicinity of the 14-3-3 outer surface. Therefore, our data suggest that the 14-3-3 binding masks the majority of the $G_i\beta$ binding surface of Pdc and thus inhibits its interaction with $G_i\beta$. In addition, NMR and HDX-MS measurements revealed that Pdc-PP remains highly flexible after the 14-3-3 binding, which indicates the formation of a “fuzzy” complex. Our data also showed that the 14-3-3 binding slows down dephosphorylation of Pdc-PP *in vitro*.

1 Úvod

Předkládaná disertační práce je strukturální studií proteinu fosducinu (Pdc) a komplexu s jeho vazebným partnerem, proteinem 14-3-3. Struktura tohoto komplexu nebyla doposud objasněna. Motivací projektu je přispět k pochopení úlohy proteinu 14-3-3 v regulaci funkce Pdc. Znalost struktury je důležitým nástrojem pro pochopení funkce proteinů a jejich komplexů. Tato disertační práce je součástí dlouhodobého projektu vedeného pod dohledem prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. z PřF UK a navazuje na mou práci diplomovou [1].

Ke studiu struktury proteinů a jejich komplexů lze využít celou řadu metod, které však poskytují kvalitativně rozdílné informace. Výběr metody závisí především na charakteru daného proteinu nebo komplexu. V případě strukturovaných proteinů a jejich komplexů s jasně definovaným prostorovým uspořádáním jsou nejvhodnějšími volbami proteinová krystalografie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a kryoelektronová mikroskopie (Cryo-EM). Výhodou metody NMR je získání struktury proteinu ve vodném roztoku, tedy za téměř nativních podmínek, nicméně metoda NMR je omezena pouze na molekuly s molekulovou hmotností do cca 70 kDa. Metoda Cryo-EM je naopak vhodná pro molekuly s molekulovou hmotností větší než cca 200 kDa. Problém s určováním struktury ovšem nastává v případě takových proteinů, jejichž prostorová struktura není nativně určena. Takovýmito proteinům se říká proteiny neuspořádané, nebo nesbalené, v anglicky psané literatuře se značí IDPs (z angl. *Intrinsically Disordered Proteins*). Tyto proteiny nejsou schopné tvořit krystaly a jejich NMR spektra jsou velmi obtížně interpretovatelná díky malému rozptylu signálů.

Protein fosducin, kterým se zabývá tato disertační práce, je typickým příkladem proteinu, jehož značná část vykazuje vlastnosti IDP. Ve volném (tzv. apo) stavu je tato část velmi flexibilní a neuspořádaná, nicméně po vazbě na vazebného partnera $G_t\beta\gamma$ transducinu se flexibilní část molekuly Pdc strukturuje a to dokonce tak, že komplex Pdc/ $G_t\beta\gamma$ byl úspěšně vykrytalizován [2]. Nicméně při vazbě Pdc na jiného vazebného partnera, protein 14-3-3, ke strukturování flexibilní části nedochází. Komplexům, kde jeden z vazebných partnerů je IDP a po vazbě jím zůstává, se v anglické literatuře začalo říkat „fuzzy“ complexes (*fuzzy*, česky *nejasný*) [3].

Při studiu vlastností IDPs a „fuzzy“ komplexů lze využít několika biofyzikálních metod, díky kterým se dá alespoň přibližně určit jejich struktura. V současné době

neexistuje metoda, která by dokázala přesně popsat konformační chování takovýchto proteinů. Výsledkem těchto měření vždy bývá průměrná struktura, často zachycující nejčastěji se vyskytující konformaci proteinu. Mezi metody, které se používají ke studiu IDPs a „fuzzy“ komplexů, patří např. malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS, z angl. *Small-Angle X-Ray Scattering*), pomocí kterého lze získat strukturu s nízkým rozlišením. Ve spojení s NMR a metodami fluorescenční spektroskopie lze pak získat další upřesňující strukturní údaje. Pro charakterizaci sekundární struktury se využívá např. cirkulárního dichroismu (CD). Pro objasnění termodynamických vlastností komplexu lze využít isotermální titrační kalorimetrii (ITC) nebo analytickou ultracentrifugaci (AUC). Hydrodynamické vlastnosti objasňuje také AUC a dále dynamický rozptyl světla (DLS). K získání informací o vazebném povrchu lze využít např. metody výměny vodíku za deuterium spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS). Informaci o změnách ve vnitřní neuspořádanosti proteinu lze získat i jeho kontrolovanou proteolýzou v přítomnosti a nepřítomnosti vazebného partnera. Existuje řada dalších technik, které jsou pro studium takovýchto proteinů využívány, ovšem výše zmíněné jsou pravděpodobně nejčastější. Většina z výše zmíněných technik byla využita ke studiu jak Pdc, tak jeho komplexu se 14-3-3. Na základě získaných dat byl vytvořen detailní strukturní model komplexu Pdc s proteinem 14-3-3 a navržen mechanismus, jakým protein 14-3-3 reguluje funkci Pdc v buňce.

2 Literární přehled

2.1 Vnitřně neuspořádané proteiny (IDPs)

Je známo, že hydrofóbní jádro uspořádaných proteinů je často tvořeno aminokyselinami, jako je Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp a Tyr [4]. Některé proteiny ovšem obsahují částečně polární a nabitě oblasti, které jsou tvořeny aminokyselinami, jako jsou Gln, Ser, Pro, Glu, Lys, občas také Gly a Ala [5, 6, 7]. Tyto oblasti se v roztoku vyznačují značnou neuspořádaností bez výrazných známek sekundární nebo terciární struktury. Proteinům, které jsou takto charakterizovány, se říká vnitřně neuspořádané (IDPs, z angl. *Intrinsically Disordered Proteins*) [8, 9]. IDPs se účastní velkého množství biochemických procesů a podílí se především na procesech spojených s přenosem signálu skrz protein-proteinové interakce, interakce protein-DNA a protein-ligand a na regulačních procesech [10 - 13]. Jejich neuspořádanost a flexibilita umožňuje přístup řady vazebných partnerů a enzymů, kteří usměřují funkci IDPs ve smyslu posttranslačních modifikací, jako jsou fosforylace, acetylace, hydroxylace, ubiquitinace a metylace [12]. Pojem IDP nemusí vždy zahrnovat celý protein, někdy lze pod tímto pojmem chápat pouze část proteinu, např. doménu, která je vnitřně neuspořádaná. IDPs se vyskytují u všech organismů a podle frekvence výskytu je lze seřadit následovně: eukaryota » archea ~ eubakterie. Mnohobuněčná eukaryota pak obsahují větší množství IDPs, než jednobuněčná [14, 15]. Jejich podíl obecně roste se složitostí organismu. Toto rozdělení vychází z *ab initio* predikce struktury proteinů. Pro predikci struktury a tedy i neuspořádanosti proteinů lze v dnešní době využít množství různých algoritmů, jejichž přesnost se stále zvyšuje [16 - 18]. Mezi takovéto predikční algoritmy patří např. PONDR [6], FoldIndex [19, 20], DisEMBL [21], GLOBPLOT 2 [22], DISOPRED 2 [23] a další. Experimentálně určené částečně, nebo úplně neuspořádané proteiny jsou zaznamenávány do databáze DisProt [24, 25, <http://www.disprot.org/>, červenec 2016].

Podle Dunkera a kol. [8] lze proteiny rozdělit do tří, případně čtyř [26] kategorií: 1) uspořádané, 2) molten globule (česky *roztavené klubko*), (3) pre-molten globule), 4) náhodné klubko. Kategorie pre-molten globule představuje protein s obsahem fluktuujících prvků sekundární struktury. Pojem „náhodné klubko“ je mírně zavádějící, jelikož bylo prokázáno, že neuspořádané proteiny zařaditelné do této kategorie vykazují určité opakující se rysy ve své struktuře, jak bylo dokázáno pomocí NMR [27, 28], tak

pomocí *ab initio* výpočtů [29]. Nelze tedy říci, že takto neuspořádané proteiny tvoří v roztoku zcela náhodné struktury bez jakéhokoli schématu, jako je tomu v případě denaturovaných proteinů. Schéma konformeru je primárně určeno jeho aminokyselinovou sekvencí [30]. Uspořádání aminokyselin jdoucích za sebou v proteinu tedy určuje dihedrální úhly a sbalenost daného segmentu [19, 31]. Nedávné studie ovšem ukázaly, že některé proteiny vykazují prostorovou a funkční podobnost, ovšem jejich primární aminokyselinová sekvence se liší [32]. Důležitou roli u těchto proteinů hrála spíše jejich délka a prostorové uspořádání. Na těchto dvou faktorech pak záležela doba života daného proteinu spíše, než na výskytu ubiquitinačních míst a dalších signálů vedoucích k degradaci proteinu [3]. Studie Tsvetkova a kol. naznačuje, že samotná neuspořádanost možná hraje roli v rozkladu IDPs pomocí 20S proteasomu, který během pokusu dokázal rozložit vnitřně neuspořádané sekvence v podmínkách, při kterých jsou přirozené a molten globule stavy proteinů rezistentní vůči degradaci [33]. V této studii také ukázali, že protein-proteinová interakce může degradaci IDP zabránit.

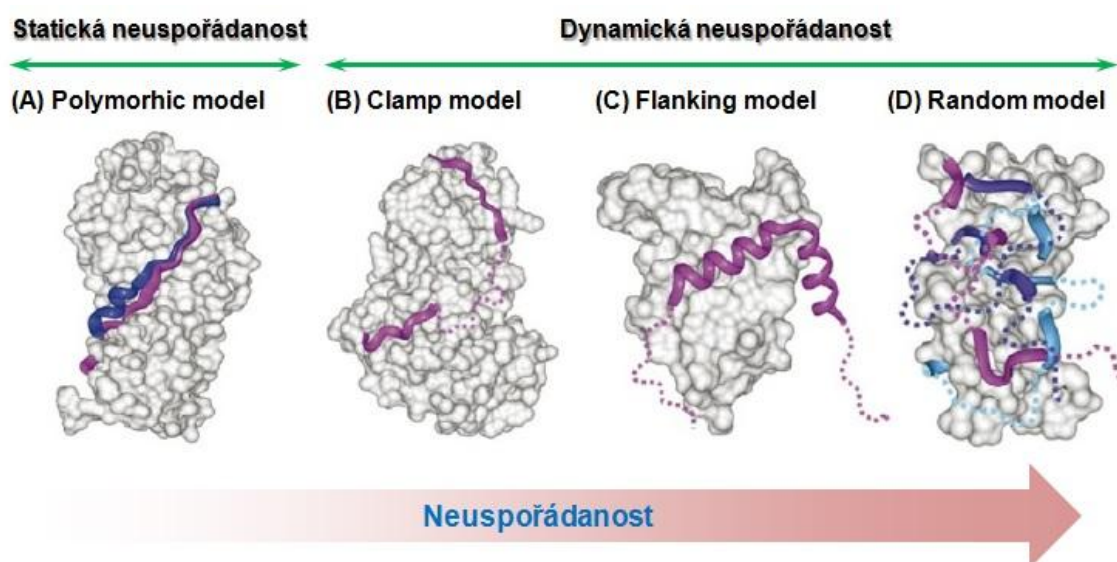
Jednou z vlastností některých IDPs je jejich schopnost přizpůsobit svou strukturu vazebnému partnerovi. Pokud ovšem dojde k nesprávnému sbalení částečně uspořádaných proteinů, může to vést k nemocem, s nimiž si organismus pravděpodobně neví rady, jelikož je protein díky nesprávnému sbalení špatně degradovatelný. Jedním z příkladů takového neuspořádaného proteinu je i protein α -synuclein, jehož nesprávné sbalení může vést až ke tvorbě Lewyho tělísek [34] a k rozvoji např. Parkinsonovy choroby. α -synuclein se pravděpodobně také podílí na regulaci apoptosy vazbou na protein 14-3-3 [35, 36].

Studium struktury a funkce IDPs je tedy velmi zajímavou a motivační oblastí strukturní biologie, jelikož by mohlo vést k novým metodám schopným detailněji popsat jejich chování, strukturu a zapojení do mnohých biochemických procesů, a dále by mohlo vést k porozumění vzniku chorob, se kterými si současná věda a medicína neví rady, a postupně se tak dostat i k jejich efektivní léčbě.

2.2 Fuzzy komplexy

Až do roku 2002 se předpokládalo, že vazba vnitřně neuspořádaného proteinu (IDP) na jeho vazebného partnera způsobí jeho částečnou, nebo úplnou strukturalizaci, a v komplexu tak lze získat strukturní informace o daném IDP mnohem snáz, než ve volném stavu, jelikož je možné komplex např. krystalizovat [37]. Později se ovšem ukázalo, že existuje množství IDPs, které při vazbě na svého vazebného partnera

nepodstupují strukturalizaci, naopak, zachovávají si svou vnitřní neuspořádanost i v komplexu. Takovýmito komplexům se začalo říkat „fuzzy“ komplexy (*fuzzy*, česky *nejasný*) [38]. Podle Tompy a kol. lze fuzzy komplexy v základu rozdělit do čtyř modelů: 1) polymorphic model (*polymorphic*, česky *rozmanitý*), 2) clamp model (*clamp*, česky *svírající*), 3) flanking model (*flanking*, česky *lemující*), 4) random model (*random*, česky *nahodilý*). Polymorphic model byl zařazen do kategorie statické neuspořádanosti, která je charakterizována tvorbou několika stabilních konformací, které nejsou zaznamenatelné pomocí krystalografických měření. Ostatní modely byly zařazeny do kategorie dynamické neuspořádanosti, která je charakterizována tvorbou mnoha rozličných stavů IDP, které lze definovat jako konformační soubor. *Obrázek 2.1* zobrazuje ukázky komplexů odpovídajících jednotlivým modelům [38].



Obr. 2.1 Možná kategorizace „fuzzy“ komplexů. (A) Polymorphic model zobrazuje dva možné dobře definovatelné stavy (modrá, fialová) jednoho IDP vázaného na vazebného partnera (šedá). (B) Clamp model je charakterizován flexibilní peptidovou spojkou mezi dvěma uspořádanými segmenty (fialová) při vazbě na vazebného partnera (šedá). (C) Flanking segment vázaného IDP (fialová) obklopující vazebného partnera (šedá). (D) V random modelu zůstává IDP (modrá, nebo fialová) značně neuspořádaný po vazbě na vazebného partnera (šedá). Plné linie (modrá, nebo fialová) zde představují přechodně se tvořící a měnící se prvky sekundární struktury. Převzato a upraveno z [38].

Další možností jak „fuzzy“ komplexy rozdělit, je podle rychlosti pohybů peptidových segmentů. Časová škála segmentálních pohybů v rámci komplexů složených především z dobře sbalených proteinů se pohybuje v rozmezí μs až ms . Časová škála pohybů flexibilních oblastí se může pohybovat v rozmezí ns až ps [39].

Neuspořádanost a flexibilita IDPs vázaných v komplexu s vazebným partnerem jim může zajišťovat schopnost interakce s dalšími vazebnými partnery a rychlou funkční změnu. Vazby takovýchto komplexů mohou být slabé ($K_d \sim \mu\text{M}$ až mM oblast), ale přesto důležité [38, 39].

2.3 Fosducin (Pdc)

2.3.1 Výskyt Pdc

Fosducin (Pdc) je 28kDa kyselý ($pI = 4,9$, krysí forma - *Rattus Norvegicus*) protein. Dále lze fosducin nalézt pod názvem MEKA, který vychází z aminokyselinové sekvence hovězího (*Bos Taurus*) fosducinu [40]. Byl nalezen u eukaryotních živočichů, konkrétně u hovězího dobytka, krysa, myši, koní, psů, koček, u plazů, kostnatých, nálevníků, hub a u kvasinek [41 - 51]. Savčí Pdc obsahuje 244 až 246 aminokyselin. Je exprimován především v sítnici oka, dále v šišince a jí vývojově příbuzným orgánům, mozku [41 - 45], méně pak v játrech [52], plicích, ledvinách, kosterním svalstvu, ve slezině [53], čichovém ústrojí [54, 55] a sympatickém nervovém systému [56]. V hovězím mozku bylo identifikováno 10 pmol Pdc na 1 mg všech cytosolických proteinů [43, 57]. Gen pro Pdc hledaný v lidském genomu byl nalezen v chromosomu *1q31.1*, který sestává ze čtyř exonů se start-kodonem na exonu 2 [58, 59]. První zmínka o Pdc je datována do roku 1977 [41] a literatura zabývající se jeho podrobnějším výzkumem se naskytla již v roce 1981 [60, 61].

Ve své disertační práci se zabývám především Pdc nacházejícím se v sítnici oka, proto se nyní zaměřím na v sítnici exprimovaný Pdc. Sítnice oka se nachází v jeho zadní části a sestává z fotoreceptorových buněk – tyčinek a čípků. Tyčinky jsou známy svou citlivostí na intenzitu světla a čípky umožňují barevné vidění [62]. Na sítnici oka se vyskytuje 120 miliónů tyčinek a 6 až 7 miliónů čípků [63]. Jelikož je lépe prozkoumaná funkce Pdc v tyčinkách, budu zde dále hovořit především o tyčinkách.

Tyčinku lze pomyslně jednoduše rozdělit na vnější segment (ROS, z angl. *Rod Outer Segment*) a vnitřní segment (RIS, z angl. *Rod Inner Segment*). Vnitřní segment tyčinky pokračuje v jádro a dále synaptické zakončení směřující k interneuronu. Jádra tyčinek jsou zasazena do vnější jádrové vrstvy (ONL, z angl. *Outer Nuclear Layer*). Ve své diplomové práci [1] detailněji popisují strukturu fotoreceptorů a procesy spojené s přenosem světelného signálu do mozku a biochemií vidění. Signál je přes tyčinku převeden skrz

interneuron zevní plexiformní vrstvou (OPL, z angl. *Outer Plexiform Layer*), která obsahuje bipolární a horizontální buňky. Následuje vnitřní jádrová vrstva obsahující jádra bipolárních a horizontálních buněk, a vnitřní plexiformní vrstva (IPL, z angl. *Inner Plexiform Layer*) [64]. Bipolární a horizontální buňky jsou v kontaktu s vrstvou gangliových buněk, ze kterých vybíhá vrstva nervových vláken.

Lokalizovat Pdc v rámci tyčinky a v jednotlivých vrstvách je spíše obtížné, jelikož se výsledky různých výzkumných skupin liší. Jeho rozmístění také závisí na vnějším osvětlení sítnice a přístupnosti vazebných partnerů. V roce 1987 Leeová a kol. zjistili, že ve tmou adaptované sítnici hovězího dobytka se Pdc nachází jak v RIS, tak méně i v ROS. Zjistili také, že Pdc váže dvě podjednotky heterotrimerního G-proteinu transducinu, $G_t\beta\gamma$. $G_t\beta\gamma$ nebyly nalezeny samostatně, pouze jako heterodimer, či jako heterotrimer spolu s podjednotkou α , $G_t\alpha\beta\gamma$. Jejich výsledky ukazují, že $G_t\alpha\beta\gamma$ se nachází jak v ROS, tak v RIS, ale většina zůstává, na rozdíl od Pdc, v ROS [65]. Skupina Pagh-Roehlové našla v roce 1995 Pdc kostnatých primárně v RIS. Zjistila také, že Pdc je fosforylován především za světla a méně za tmy pomocí proteinkinasy A (PKA) a Ca^{2+} /kalmmodulin-aktivovanou kinasou, a defosforylován více za světla pomocí proteinfosfatasy 1 (PP1) a méně za tmy proteinfosfatou 2A (PP2A). Vystavení sítnici světlu po dobu deseti minut vedlo ke snížení fosforylace Pdc o 20 % [66]. První zmínka o fosforylaci Pdc vyvstala již v roce 1984, kde Leeová a kol. ukázali, že úroveň fosforylace Pdc je větší za tmy [42]. Skupina Ruiz-Gómezové také v roce 2000 zjistila, že hovězí Pdc může být fosforylován pomocí G protein-coupled receptor kinasy 2 (GRK2), konkrétně mezi aminokyselinovými zbytky 204 a 245. Tato fosforylace vedla k zeslabení vazby mezi Pdc a $G_t\beta\gamma$ [67]. V roce 2000 přišly Zhuová a Craftová s objevem, že Pdc se nachází nejen v RIS a ROS, ale také ONL, synapsích a lehce také v OPL. Dále zjistily, že v cytoplasmě i jádře se po vystavení oka světlu nachází degradační produkt Pdc a dvě hodiny ve tmavém prostředí po předchozím osvětlení zůstává množství Pdc v sítnici konstantní. Jejich velkým objevem bylo také zjištění, že aminokyselinové zbytky Pdc 187 až 246 silně interagují s novým vazebným partnerem fosducinu a to proteinem CRX (viz dále). Jejich výsledky také ukazují, že vazba CRX na Pdc fyzicky nebrání vazbě $G_t\beta\gamma$, takže je možné, že oba proteiny se mohou na Pdc vázat současně. Zhuová a Craftová dále ukázaly, že u COS-7 buněk se CRX nachází především v jádře a Pdc je v cytoplasmě. Po jejich interakci jsou ovšem oba proteiny nalezeny jak v jádře, tak v cytoplasmě. U fotoreceptorových buněk získaných z hovězí sítnice byl Pdc lokalizován v ROS i RIS a v menším množství také v OPL. CRX se

nacházel především v ONL a v menším množství také v ROS a RIS [68, 69]. Stejná dvojice už v roce 1998 ukázala, že Pdc interaguje také s dalším proteinovým vazebným partnerem, proteinem SUG1 (viz dále). Ten také interaguje s C-terminálními aminokyselinovými zbytky Pdc a to s vyšší afinitou, než mezi Pdc a CRX. Navíc naznačují, že SUG1 potřebuje pro interakci s Pdc i některé aminokyselinové zbytky nacházející se blíže N-konci Pdc [70]. V roce 2001 skupina Nakana přišla s konkrétnějšími čísly ohledně množství Pdc v sítnici. Po osvětlení krysí sítnice byl Pdc nalezen spíše v RIS (83 %) a OPL (v ROS bylo pouhých 17 % Pdc). Velkou roli zde hrál objev, že Pdc je za tmy fosforylován a váže vazebného partnera, protein 14-3-3. K jejich vzájemné interakci dochází i za světla, ovšem bylo nalezeno 5× méně tohoto komplexu za světla, než za podmínek bez světla. Dále zjistili, že ve tmavých podmínkách obsahuje sítnice menší množství $G_i\beta\gamma$, než osvětlená sítnice. Ve tmě se Pdc nacházel více v OPL a RIS společně se 14-3-3. Když došlo k defosforylaci Pdc a rozpadu komplexu 14-3-3/fosforylovaný Pdc, 14-3-3 zůstal v RIS [71]. Ve stejném roce zkoumali přesuny Pdc i ve skupině Thulina. Ti potvrdili, že protein 14-3-3 se nachází v RIS a kinasa, která fosforyluje Pdc – Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasa II (CaMKII) – jej fosforyluje v ROS. Dále ukázali, že ve tmou adaptované sítnici se Pdc nachází jak v RIS, tak v ROS, ale za světla našli Pdc pouze v RIS spolu se 14-3-3 [72]. S novým objevem přišel Sokolov se svou skupinou v roce 2007. Objevili, že množství Pdc v ROS i v RIS je za světla i za tmy srovnatelné, ale mění se množství $G_i\beta\gamma$. Ve tmou adaptované sítnici se $G_i\beta\gamma$ nacházel především v ROS (téměř 100 %) a méně v RIS a jádře, ale za světla v ROS, RIS, jádře a synapsích. V ROS se ovšem nacházelo pouhých 10 % $G_i\beta\gamma$, protože 90 % přešlo za světla do RIS. Dále ukazují, že ve tmou adaptované sítnici ROS je 7× méně Pdc, než $G_i\beta\gamma$, takže jej není dostatek pro vazbu [73]. Podobný výsledek pozorovala i skupina Nakana v roce 2001, která odhadla molární poměr Pdc: $G_i\alpha\beta\gamma$ v ROS krysí sítnice na 1:60 a v RIS na 1:4 – 1:17 [71].

Pro přehlednost zde uvádím *Tabulku 2.1* na str. 19, která stručně zobrazuje vybrané výsledky lokalizace Pdc různých vědeckých skupin jdoucích chronologicky seshora dolů. Každý sloupec představuje část tyčinky, či vrstvy sítnice, ve kterých byl Pdc nalezen ve významném množství (✓), nebo nenalezen (✗). Pomlčka (-) představuje případ, kdy pro danou lokalitu přítomnost Pdc nebyla zkoumána. Pro zjednodušení zde nerozlišuji, zda se jedná o fosforylovaný či nefosforylovaný Pdc, a také nerozlišuji kvantitu Pdc v daném místě. Pokud byl Pdc pozorován jen minimálně, uvádím, že byl nenalezen. Výsledky byly

získány za použití různých technik, kde převažovaly pokusy s protilátkami vázanými na Pdc.

Tabulka 2.1 Rozdělení lokalizace Pdc dle výsledků různých vědeckých skupin

	RIS _S	ROS _S	RIS _T	ROS _T	jádro	ONL	synapse	OPL
Pagh-Roehl [66]	✓	✗	✓	✗	-	-	-	-
Zhu [68, 69]	✓	✓	✓	✓	✓ _S	✓	✓	✓
Nakano* [71]	✓	✗	✓	✓	-	✓	✓	✓
Thulin [72]	✓	✗	✓	✓	-	-	✓ _S	-
Schulz [57]	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	-
Sokolov# [74]	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓
Chen* [75]	✓	✗	✓	✗	✗	-	✓	-
Song# [73]	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

_SZkoumáno po osvětlení sítnice.

_TZkoumáno ve tmou-adaptované sítnici.

#Stejný znak přísluší lidem ze stejné vědecké skupiny.

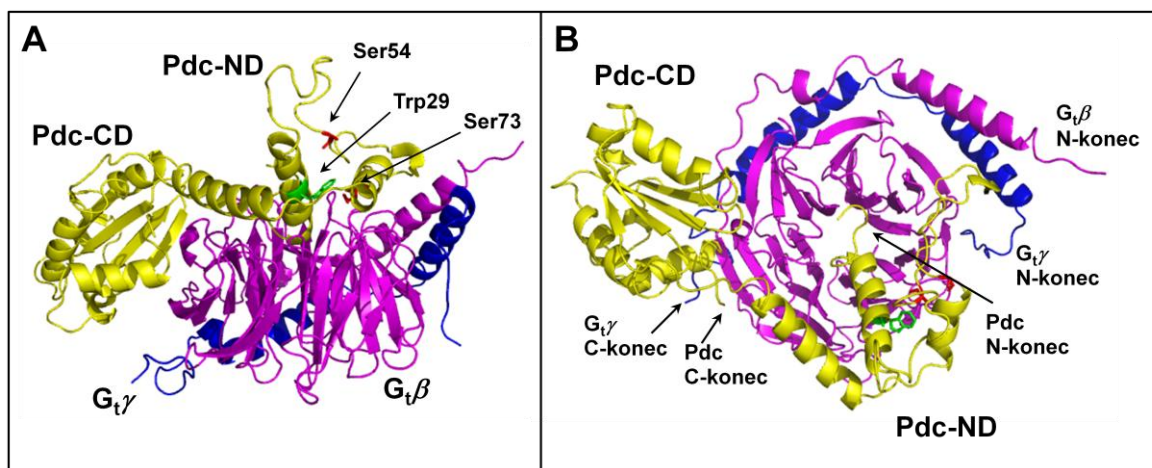
RIS – rod inner segment, ROS – rod outer segment, ONL – outer nuclear layer, OPL - outer plexiform layer

Z Tabulky 2.1 je patrné, že všechny vědecké skupiny se shodly na tom, že Pdc se nachází především v RIS a to jak za světla, tak za tmy. Dále můžeme konstatovat, že se Pdc nachází i v synapsích fotoreceptorových buněk. Výsledek Chena a kol. z roku 2005 naznačil, že spíše, než k přesunu Pdc v rámci tyčinky, dochází k přesunu transducinu v závislosti na osvětlení. Molární poměr Pdc:G_tαβγ se podle jejich studií v tyčinkách pohybuje v rozmezí 1:2 až 1:9 [75]. Jejich výsledek tedy potvrzuje výsledky skupin Nakana z roku 2001 a Sokolova z roku 2004 [71, 74]. K obdobným výsledkům, tedy že množství Pdc v ROS se za světla a za tmy příliš neliší, došla i skupina Songa v roce 2007 [73]. K zajímavému výsledku došla skupina Calverta z roku 2006, která zkoumala translokaci třech proteinů (transducin, arrestin a recoverin), nacházejících se v sítnici oka. V případě transducinu ukázali, že po osvětlení sítnice dojde k přesunu 10 – 20 % transducinu z ROS do RIS v tyčinkách, ovšem v čípcích k přesunu nedochází [76]. Pokud se tedy Pdc podílí na přesunu transducinu v rámci fotoreceptorové buňky, tento výsledek by mohl naznačit, že v čípcích není dostatečné množství Pdc k přesunu transducinu.

2.3.2 Struktura Pdc

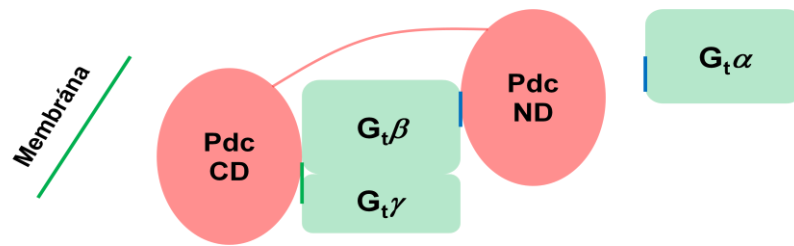
Na prvním významném objevu ukazujícím strukturu hovězího Pdc v krystalovém komplexu společně s heterodimerní podjednotkou G_tβγ se podílela skupina Gaudetové v roce 1996. Získali strukturu s rozlišením 2,4 Å (PDB ID: 2TRC, [2]). Strukturu dále upřesnili v roce 1999 s rozlišením 3 Å doplněním o informace týkající se fosforylace Pdc

(PDB ID: 1B9X, 1B9Y, [77]). Další struktura hovězího Pdc s $G_i\beta\gamma$ byla získána Loewem a kol. v roce 1998 (PDB ID: 1A0R, [78]). Komplex Pdc s $G_i\beta\gamma$ je zobrazen na *Obr. 2.2* [2]. Naše skupina přišla s upřesňujícími informacemi o struktuře krysí formy Pdc v komplexu s vazebným partnerem, lidským proteinem 14-3-3 ζ , v roce 2012 [79], následujícími článkem z roku 2015 [80], kde se zabýváme i strukturou samotného Pdc v roztoku, tedy bez vazebného partnera. V posledním článku, který byl podán letos, se nám podařilo ukázat přesnější model komplexu proteinu 14-3-3 s Pdc (zatím nepublikovaná data).

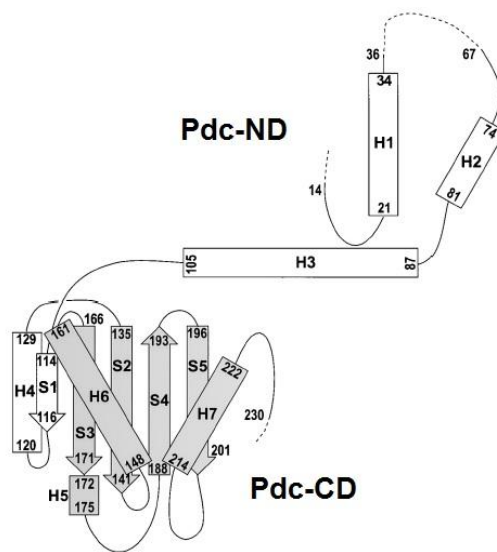


Obr. 2.2 Krystalová struktura fosducinu (Pdc) (žlutá) s $G_i\beta\gamma$ (fialová, respektive modrá). (A) Pohled z boku. Na obrázku je vyznačena N-terminální (Pdc-ND) a C-terminální (Pdc-CD) doména Pdc. Pdc není v kontaktu s $G_i\gamma$. (B) Pohled seshora. Červeně jsou označeny fosforylační místa Ser54 a Ser73, zeleně Trp29. Převzato z [2], PDB ID: 2TRC. Obrázek byl vytvořen v programu PyMol.

Krystalová struktura hovězího (*Bos Taurus*) Pdc s hovězí $G_i\beta\gamma$ získaná skupinou Gaudetové ukázala, že Pdc sestává ze dvou domén – N-terminální domény (Pdc-ND, aminokyselinové zbytky M1 – R110) a C-terminální domény (Pdc-CD, aminokyselinové zbytky G112 – E246) spojené flexibilním peptidovým spojem. Obě domény spolu při vazbě s $G_i\beta\gamma$ navzájem neinteragují, ale pro zvětšení vazebného povrchu ovinou $G_i\beta\gamma$ [2]. Symbolicky je tato vazba ukázána na *Obr. 2.3* na str. 21. Pdc-ND sestává v komplexu s $G_i\beta\gamma$ ze tří α -helixů (H1, H2, H3), Pdc-CD je strukturně podobná thioredoxinu, ovšem díky absenci jednoho ze dvou cysteinových zbytků, nemá tato doména thioredoxinovou redukční funkci. Schematické znázornění sekundární struktury Pdc je zobrazeno na *Obr. 2.4* na str. 21 [2].



Obr. 2.3 Symbolické zobrazení komplexu proteinu fosducinu (*Pdc*) (růžová) s heterodimerem transducinu $G_{\beta\gamma}$ (světle zelená). C-terminální (*Pdc-CD*) a N-terminální (*Pdc-ND*) doména *Pdc* obklopuje $G_{\beta\gamma}$, přičemž *Pdc-CD* je vázána především do míst G_{β} , přičemž se ale zároveň nachází v blízkosti G_{γ} (zelený pruh), která je pravděpodobně zodpovědná za vazbu transducinu do membrány disku tyčinky (zelený pruh). *Pdc-ND* se váže především s oblastmi G_{β} , které také interagují s G_{α} (světle zelená). Vazba *Pdc* tedy blokuje vazbu s G_{α} . Obě domény jsou spojeny flexibilním peptidovým spojením.



Obr. 2.4 Schematické znázornění sekundární struktury *Pdc* vázaného v komplexu s $G_{\beta\gamma}$. Horní část obrázku zobrazuje tři α -helixy N-terminální domény *Pdc* (*Pdc-ND*), spodní část obrázku zobrazuje C-terminální doménu *Pdc* (*Pdc-CD*), která je strukturně podobná proteinu thioredoxinu. Převzato a upraveno z [2].

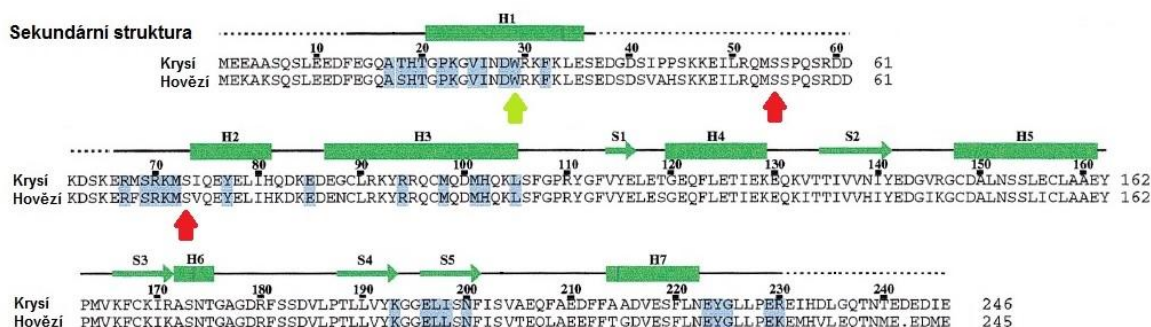
Pdc-CD se váže k β -listům 1 a 7 β -soudku podjednotky G_{β} . V tomto místě dochází v nepřítomnosti *Pdc* k interakci G_{β} s membránou disku tyčinky a receptorovým proteinem rhodopsinem, který patří mezi receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs, z angl. *G-protein coupled receptors*) [2]. Je možné, že právě pozitivně nabitě regiony β -listů 1 a 2 podjednotky G_{β} jsou zodpovědné za interakci s membránou [81]. *Pdc-CD* je velmi negativně nabitá, takže může např. napodobovat záporný potenciál membrány, takže může s membránou soutěžit o vazbu na $G_{\beta\gamma}$, nebo může být záporný náboj zodpovědný za odtažení $G_{\beta\gamma}$ od membrány do cytosolu díky elektrostatickým repulzím s membránou disku. *Pdc-CD* má 19 záporných nábojů na rozdíl od *Pdc-ND*, která má pouhé 3 záporné náboje. Vazba *Pdc-CD* k G_{β} neovlivňuje vazbu G_{α} . K interakcím G_{β} s *Pdc-CD* dochází

konkrétně u aminokyselinových zbytků Pdc-CD K193, E196 – I199, N200, E223 – G226 a E229 – R230. Pdc-CD pokrývá na $G_t\beta\gamma$ celkem 800 \AA^2 . Spolu s Pdc-ND pokrývají 2300 \AA^2 povrchu $G_t\beta\gamma$, což je větší povrch, než na $G_t\beta\gamma$ pokrývá $G_t\alpha$ (1600 \AA^2). V komplexu Pdc/ $G_t\beta\gamma$ je i více iontových a hydrofobních interakcí, než v trimerním transducinu $G_t\alpha\beta\gamma$, čemuž odpovídá i nižší disociační konstanta 17 – 110 nM, oproti 150 nM v transducinu. Samotná Pdc-ND je schopná interagovat s $G_t\beta\gamma$, ale není jej schopná odloučit od membrány. Za to je zodpovědná právě Pdc-CD [2]. Ta ovšem sama o sobě také není schopná odloučit $G_t\beta\gamma$ od membrány a potřebuje k tomu Pdc-ND [82]. S $G_t\beta$ interaguje Pdc-ND v místech (11 aminokyselinových zbytků v Pdc), kde se do $G_t\beta$ váže $G_t\alpha$. Dochází tedy ke krytí vazebných míst pro $G_t\alpha$, což vede k zabránění reasociace $G_t\alpha$ s $G_t\beta\gamma$. Dále bylo dokázáno, že Pdc-ND se váže s $G_t\beta$ s $2\times$ větší afinitou, než Pdc-CD. Tento výsledek by mohl naznačovat, že funkce Pdc-ND a Pdc-CD jsou na sobě nezávislé [36, 83, 84]. $G_t\beta$ konkrétně interaguje s aminokyselinovými zbytky obsaženými v Pdc-ND A23 - F32, R67 – M72, Y77, E85, R94, M98, M101 – H102, L105. A23 – F32 se nachází v helixu H1, Y77 je součástí helixu H2, M98, M101 – H102 jsou součástí helixu H3. Místa na $G_t\beta$ interagující s H3 interagují i s $G_t\alpha$. Je tedy patrné, že helix H2 (aminokyseliny V74 – H81), který je v blízkosti fosforylačního místa S73, se vazby příliš neúčastní. Stejně tak peptidový úsek mezi aminokyselinami K33 a E66, který obsahuje druhé fosforylační místo S54 (viz Obr. 2.5, str. 24) [2]. Bylo dokázáno, že S54 i S73 mohou být fosforylovány pomocí cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA), ovšem fosforylace pomocí Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinasy II (CaMKII) je $100\times$ účinnější a mnohem rychlejší, než pomocí PKA. Navíc dochází ke $100\times$ vyšší inhibici vazby mezi Pdc a $G_t\beta\gamma$, než v případě fosforylace pomocí PKA [72, 85]. Skupina Gaudetové v roce 1999 ukázala, že $G_t\beta\gamma$ tvoří komplex i s fosforylovaným Pdc na S73, který byl fosforylován pomocí PKA. Zjistili také, že po fosforylaci tohoto serinu dochází ke strukturální změně dvaceti residuí, včetně S73, z uspořádaného do neuspořádaného stavu. Podařilo se jim získat krystal komplexu s rozlišením 3 \AA . Disociační konstanta tohoto komplexu je ovšem vyšší ($K_d \sim 150 \text{ \mu M}$) ve srovnání s nefosforylovaným Pdc. V krystalu se jim nepodařilo zobrazit region obsahující aminokyselinové zbytky 67 – 86, což je způsobeno pravděpodobně vyšší neuspořádaností tohoto regionu, jak bylo naznačeno výše. Fosforylací zaniknou vodíkové vazby a polární a hydrofobní interakce výše zmíněných dvaceti aminokyselinových residuí, což má za následek změnu jejich struktury. Důležitými aminokyselinami hrajícími roli ve vazbě jsou Q75 a E76 obsažené v helixu H2. Fosforylace S73 dále vede ke ztrátě

350 Å² z celkových 2300 Å² vazebného povrchu. Sníží se tím také schopnost kompetice Pdc s G_tα o vazbu na G_tβγ. Struktura komplexu se jinak ve srovnání s nefosforylovanou formou Pdc nezměnila, z čehož vyplývá i fakt, že fosforylace S73 neovlivňuje strukturu Pdc-CD, tedy vazba G_tβγ k membráně není přímo ovlivněná fosforylací, ale pouze snížením stability komplexu Pdc/G_tβγ v Pdc-ND [77]. Fakt, že G_tβγ váže fosforylovaný Pdc na S73 byl pozorován již dříve [86, 87]. Skupina Loewa získala v roce 1998 strukturu krystalového komplexu Pdc/G_tβγ (oba hovězí) s rozlišením 2,8 Å. Jejich důležitým zjištěním bylo, že vazba Pdc způsobuje strukturní změny v β-soudku G_tβ, konkrétně dojde k otevření malé kavity mezi listy 6 a 7. Při vazbě hraje důležitou roli Trp29 obsažený v Pdc-ND. Pro G_tβγ určili dva stavy: 1) R-stav (volný, z angl. *relaxed*). Tento stav odpovídá struktuře G_tβγ, která je volná, nebo vázaná jako heterotrimer s podjednotkou G_tα. V R-stavu je okolnímu prostředí vystavena farnesylová hydrofobní kotva G_tγ podjednotky, kterou se G_tβγ váže do membrány disku tyčinky. 2) T-stav (napnutý, z angl. *tense*). Tento stav odpovídá struktuře G_tβγ, která je vázána s Pdc. Farnesylová hydrofobní kotva G_tγ podjednotky je zanořena do kavity vytvořené β-listy 6 a 7 β-soudku G_tβ podjednotky. Takto ukrytá farnesylová kotva se nemůže vázat do membrány disku. Sekvence Pdc-ND nevytváří hydrofobní jádro a hydrofobní oblasti amfipatických α-helixů H2 (I74 – I80) a H3 (E87 – L105) obsažených v Pdc-ND jsou zapojeny do vazby s G_tβγ, což si mírně odporuje se strukturou získanou skupinou Gaudetové. Mírné rozdíly v pozicích aminokyselinových zbytků Pdc interagujících s G_tβγ jsou vidět, porovnáme-li Obr. 2.5 na str. 24, který zobrazuje výsledky skupiny Gaudetové, a Obr. 2.6 na str. 24, který zobrazuje výsledky skupiny Loewa [78]. Později bylo výpočty ověřeno, že farnesylová kotva hraje stabilizační roli komplexu Pdc/G_tβγ [88].

Jak již bylo řečeno výše, při vazbě Pdc s G_tβγ hraje roli Trp29 nacházející se v Helixu H1, který se dále podílí na stabilitě Pdc-ND. Trp29 možná vytváří malé hydrofobní jádro, které umožňuje vazbu s G_tβ skrz síť vodíkových vazeb a van der Waalových kontaktů [2, 78]. Trp29 je funkčně důležitý, protože pravděpodobně plní inhibiční funkci fosfolipasy C isoformy β₂. Stejná skupina i ukázala, že samotná Pdc-ND je na rozdíl od Pdc-CD schopná vázat G_tβγ [89].

Jelikož je Ser54 i Ser73 odvrácen od G_tβ, jsou tyto dvě fosforylační místa přístupná kinasám i fosfatasám. Je tedy možné, že i v komplexu Pdc/G_tβγ může být Pdc fosforylován. Pokud je Pdc fosforylován v místě Ser73, má G_tα snadnější přístup ke G_tβ [90].



Obr. 2.5 Aminokyselinová sekvence krysího (*Rattus Norvegicus*) a hovězího (*Bos Taurus*) Pdc s vyznačenými místy, kde je Pdc v kontaktu s G_{β} (modrá). Horní panel zobrazuje sekundární strukturu Pdc tak, jak se nachází v komplexu s G_{β} (tmavě zelená). Tečky v sekundární struktuře odpovídají částem proteinu se spornou elektronovou hustotou. Červené šipky ukazují pozice fosforylačních míst Ser54 a Ser73. Světle zelená šipka ukazuje pozici Trp29. SWISSPROT číselná označení proteinů jsou seshora P20942 a P19632. Převzato a upraveno z [2].



Obr. 2.6 Aminokyselinová sekvence hovězího (*Bos Taurus*) Pdc s vyznačenými místy, kde je Pdc v kontaktu s G_{β} (modrá). Sekundární struktura Pdc tak, jak se nachází v komplexu s G_{β} je naznačena zelenými liniemi. Aminokyselinové zbytky, které nejsou vyznačeny tučně, jsou pozorovány s nízkou elektronovou hustotou. Červeně je označeno fosforylační místo Ser73. Převzato a upraveno z [78].

Skupina Gaudetové v roce 1999 studovala i samotný Pdc v roztoku pomocí jednodimenzionálních (1D) protonových NMR spekter a pomocí cirkulárního dichroismu (CD). V této studii ukázali, že Pdc je částečně nesbalený protein, což potvrdily i naše studie, kterými se zabývám v kapitole 5. Pdc-ND obsahuje 105 residuí, která jsou vysoce hydrofilní, takže nedochází k jejich samovolnému sbalení v roztoku [2, 77].

Phosducin je 28kDa protein, ovšem na gelu elektroforézy v redukčním prostředí (SDS-PAGE) se projevuje jako 33kDa protein. Je to pravděpodobně způsobeno velkou kyselostí proteinu, tedy vysokým obsahem kyseliny glutamové a asparagové. Dalším důvodem může být vysoký obsah aminokyselinových zbytků obsahujících síru (5× cystein, 7× metionin) [40, 42, 65, 91]. Dalším zajímavým jevem pozorovaným u fosforylovaného Pdc (fosforylovaná obě místa – Ser54, Ser73) je tvorba dubletových pruhů na gelu po SDS-PAGE. Tento jev pozorovala skupina Thulina [72] a byl pozorován i námi. Pokud jsme na gel aplikovali pouze fosforylovanou Pdc-ND, ukázal se multiplet pruhů nad sebou.

Tento jev byl námi pozorován pokaždé a multiplet směřoval směrem k vyšším hodnotám molekulové hmotnosti, což vyvrací možnou domněnku, že protein byl degradován a proteolyticky štěpen (nepublikovaná data). Roli zde pravděpodobně hrají fosfátové skupiny navázané v molekule Pdc.

2.3.3 Funkce Pdc

Z kapitoly 2.3.2 je patrné, že Pdc váže $G_i\beta\gamma$ heterodimerní podjednotku transducinu. Bylo zjištěno, že Pdc může interagovat s různými druhy $\beta\gamma$ podjednotek G-proteinů [71, 92] a obecně s různými subtypy G-proteinů (G_s , G_i , G_0 apod.) [53, 92, 93]. Z tohoto pohledu lze Pdc považovat za regulátor G-proteinové signalizace. U myši bylo prokázáno, že Pdc se vyvíjí v těle společně s $G_i\beta$ o týden dřív, než se vyvine $G_i\alpha$, přičemž $G_i\beta$ se v šišince vyvíjí ještě dříve, než Pdc [94, 95]. Exprese Pdc u myši začíná 6 dní po porodu a na běžnou úroveň vzroste 18. den po porodu [96]. Nejvíce prozkoumanou oblastí, kde Pdc váže $G_i\beta\gamma$ jsou tyčinky oční sítnice, ovšem i zde není doposud zcela jasné, jakou přesně roli zde Pdc hraje. Jednou z navrhovaných rolí Pdc ukázala skupina Willardsona [85, 97]. Podle jejich posledního návrhu Pdc po vnějším světelném impulzu váže $G_i\beta\gamma$, která vznikne rozpadem heterotrimerního transducinu. Tento proces tvorby komplexu Pdc/ $G_i\beta\gamma$ nastává ve vnějším segmentu tyčinek (ROS) a je důsledkem snížení cytosolické koncentrace Ca^{2+} a cAMP. Pdc dále napomáhá translokaci $G_i\beta\gamma$ do vnitřního segmentu tyčinek (RIS) a také do synapsí. Do RIS také nezávisle na Pdc/ $G_i\beta\gamma$ putuje podjednotka $G_i\alpha$. Ve tmou adaptované sítnici dochází ke zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} a cAMP, čímž se aktivují kinasy PKA a CaMKII, které fosforylují Pdc v místech Ser54 a Ser73. Fosforylace oslabí vazbu Pdc s $G_i\beta\gamma$, fosforylovaný Pdc (Pdc-PP) je vázán proteinem 14-3-3, který se nachází v RIS, a $G_i\beta\gamma$ se v RIS váže s $G_i\alpha$ a společně jako heterotrimer $G_i\alpha\beta\gamma$ se vrací do ROS k membráně disku tyčinky. V ROS, RIS i synapsích se zároveň nachází i volný Pdc fosforylovaný na Ser73 (Pdc-P₇₃). $G_i\alpha\beta\gamma$ je vázán do membrány disku v blízkosti fotoreceptoru rhodopsinu a je připraven k přenosu dalšího světelného impulzu. Pokud ten nastane, Pdc je defosforylován pomocí dvou fosfatů – PP1 a PP2A a cyklus se opakuje [97, 98]. Ve skutečnosti není zcela jasné, zda dochází k translokaci Pdc v rámci tyčinky, nebo zda je Pdc obsažen po celé její délce a pouze napomáhá přesunu $G_i\beta\gamma$, ale z posledních studií vyplývá, že spíše dochází především k přesunu $G_i\beta\gamma$ [73, 75, 99]. Bylo dokázáno, že k masivní defosforylaci obou míst dochází již za podmínek tlumeného světla, ovšem dlouhodobé vystavení myší sítnice mírnému světlu vedlo k fosforylaci Ser71 (myší

forma, analogická Ser73 hovězí a krysí formy) na Pdc v ROS. Ve tmou adaptované sítnici se Pdc fosforylovaný v místě Ser54 (Pdc-P₅₄) nacházel hlavně v horní části RIS (tzv. elipsoid) a v ROS, zatímco Pdc-P₇₁ se nacházel po celé délce tyčinky. Tyto výsledky naznačují, že obě fosforylační místa mohou hrát rozdílnou roli [73]. Stejná skupina také ukázala, že úroveň fosforylace Pdc je závislá na intenzitě světla. Při záření 0,08 lux stála vzrůstala fosforylace Ser54 i 71. Toto osvětlení nestačilo ke spuštění defosforylace. Při ozáření o hodnotě 0,8 lux došlo k defosforylaci obou míst o více, než 80 %. Při osvětleních 8, 10³ a 10⁴ lux došlo k defosforylaci Ser54, ovšem při osvětlení 10⁴ lux vzrostla úroveň fosforylace na Ser71 a zároveň byla fosforylována další místa na Pdc. Dále zjistili, že fosforylace Pdc je dvoufázový proces, kdy ve tmou adaptované sítnici je rychlost fosforylace Ser54 $0,44 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$, což odpovídá poločasu přeměny $t_{1/2} \sim 57 \text{ s}$, a rychlost fosforylace Ser71 je $0,72 \pm 0,13 \text{ s}^{-1}$, což odpovídá poločasu přeměny $t_{1/2} \sim 94 \text{ s}$. Kompletní fosforylaci Pdc pozorovali po 20 minutách vystavení oka tmě. Zjistili také, že k fosforylaci Ser71 dochází při současné translokaci G_tα z RIS do ROS. Defosforylace také závisela na délce vystavení oka světlu. Pokus vypadal následovně: Ve tmě adaptované myši byly vystaveny záření o hodnotě 8 lux po dobu 10 až 0 min. a byly usmrceny. Po 1 minutě vystavení oka světlu pozorovali defosforylaci Ser54 i 71 o 50 %. Pokud ovšem zkoumali sítnice myší, které byly zabity po 10 minutách ve světle, pozorovali 97% defosforylaci Ser54 a 90% defosforylaci Ser71. Po dlouhodobé noční adaptaci sítnice pozorovali 4 – 10 % Pdc-P₅₄ a ~ 40 % Pdc-P₇₁. Jejich konečný model lze tedy popsat takto: Ve tmě je molární poměr Pdc:Pdc-PP = 1:1, díky stejné rychlosti aktivity kinasy a fosfatasy. Fotoreceptor rhodopsin není fosforylován. Za běžného denního světla dojde k uzavření iontových kanálů vázajících cAMP a cGMP. Toto uzavření iontových kanálů vede ke snížení koncentrace Ca²⁺ v buňce, čímž se sníží funkce CaMKII. Rovnováha se tedy posune k nefosforylované formě Pdc za současné aktivity fosfatasy. Rhodopsin stále není fosforylován, ale je aktivován. V prostředí velmi silného světla dochází k fosforylaci rhodopsinu, což vede k inhibici defosforylace Pdc-PP, jelikož fosfatasy soutěží o místo defosforylace (buď fosforylovaný rhodopsin, nebo Pdc-PP), a tato inhibice defosforylace Pdc-P₇₁ vede k nové rovnováze, kde převažuje forma Pdc-P₇₁ nad Pdc. Mezi cytoplasmou a membránou dochází k putování fosfatasy [73]. Kinetiku fosforylace a defosforylace Pdc zkoumaly i jiné skupiny. Jedna z nich zjistila, že za tmy byl Ser54 fosforylován na 70 % s poločasem $t_{1/2} \sim 90 \text{ min}$. a Ser73 na 50 % s poločasem $t_{1/2} \sim 3 \text{ min}$., což jsou velmi rozdílné hodnoty oproti předešlé skupině Songa. Za světla došlo k defosforylaci Ser54 na

20 % pomocí PP2A s poločasem $t_{1/2} \sim 2$ min. a Ser73 na méně, než 20 % pomocí PP1 s poločasem $t_{1/2} \sim 9$ min. Kinetika fosforylace a defosforylace Pdc může souviset s kinetikou vazby proteinu 14-3-3. Stejná skupina ukázala, že CaMKII není zapojena do fosforylace Ser73 *in vivo*, což vyvrací všechny předchozí studie, kde byla zkoumána fosforylace *in vitro* [85] i studii skupiny Thulina, kde byla fosforylace zkoumána v sítnicovém extraktu [72]. Jiná skupina tvrdí, že hovězí Pdc inhibuje světelně-závislou fosforylaci rhodopsinu pomocí kinasy GRK2. Aktivita PKA (fosforyluje v Pdc-ND) a GRK2 (fosforyluje v Pdc-CD) se *in vitro* neovlivňují a mohou tak být nezávislými modulátory [67]. Z výše uvedených výsledků lze vidět, že různé skupiny dosahují různých výsledků, ovšem tyto výsledky by se daly shrnout tak, že Pdc je protein, který se podílí na dlouhodobé adaptaci tyčinek na světlo a tmu a jeho aktivita souvisí s buněčnou koncentrací Ca^{2+} , cAMP a cGMP.

Dále hraje Pdc roli v prodlužování a zkracování fotoreceptorových buněk ryb v závislosti na vnějším osvětlení. Prodloužení RIS-ROS vyžaduje defosforylaci Pdc pomocí PP1 za světla a pomocí PP2A za tmy. Výsledky tohoto výzkumu lze shrnout následovně: Za tmy dochází k fosforylaci Pdc (Pdc-PP) pomocí PKA a tím dojde ke zkrácení RIS-ROS. Zároveň dochází k defosforylaci pomocí PP2A, ovšem velké množství Pdc zůstává fosforylováno. Toto vede k prodloužení RIS-ROS. Za světla je Pdc-PP masivně defosforylován pomocí PP1, což vede k prodloužení RIS-ROS. Zároveň dochází k fosforylaci Pdc pomocí PKA a následnému zkrácení RIS-ROS [66].

Další role Pdc by mohla být aktivace transkripce některých genů u kvasinek i savců, nebo jeho podíl na aktivaci či deaktivaci. Zhuová a Craftová zjistily, že část Pdc (sekvence 187 – 246 nacházející se v Pdc-CD) interaguje *in vitro* i *in vivo* přímo s N-koncem (sekvence 1 - 178) proteinu CRX (viz kapitola 2.3.4). Ten slouží jako aktivátor transkripce některých genů potřebných pro expresi několika proteinů obsažených v sítnici oka [100, 101]. Vazba části Pdc-CD na CRX pravděpodobně inhibuje transkripční aktivitu CRX. Inhibice aktivity CRX pak záleží na molárním poměru Pdc:CRX v buňce. Tvrdí ale, že Pdc přímo neovlivňuje vazbu CRX s DNA. Zhuová a Craftová také tvrdí, že sekvence 207 – 246 Pdc může sama aktivovat transkripci, když je vázána s DNA vazebnou doménou. Tato sekvence obsahuje kyselé aminokyselinové zbytky podobně, jako jsou obsaženy u jiných aktivátorů transkripce. Při vazbě Pdc s CRX nevadilo, že byl Pdc vázán v komplexu Pdc/ $G_i\beta\gamma$ [68,69]. Z tohoto pohledu by se tedy dalo shrnout, že Pdc by mohl fungovat jako regulátor transkripce, což naznačují i výsledky skupiny Chena [75].

Některé studie tvrdí, že Pdc se podílí na regulaci množství transducinu v buňce. U myši, které měly vypnutý gen pro Pdc (Pdc^{-/-}) pozorovali nižší množství transducinu v tyčinkách a zároveň docházelo k jeho nesprávné lokalizaci za podmínek světla a tmy. Pdc by se tedy mohl podílet nejen na expresi transducinu, ale také na jeho lokalizaci, jak už bylo naznačeno dříve [99, 102]. Belcastro a kol. také tvrdí, že fosforylovaný Pdc by mohl urychlovat návrat transducinu G_t z RIS do ROS [99]. Tato myšlenka podporuje výsledky skupiny Sokolova, které naznačují, že Pdc napomáhá pohyblivosti G_t v rámci tyčinky [74]. Zhuová a Craftová prováděly také pokusy s proteiny, které jsou fosducinu podobné – tzv. *phosducin-like orphan* proteiny (PhLOP). Konkrétně u proteinu PhLOP1 chybí ve srovnání s Pdc 53 N-terminálních aminokyselinových zbytků. PhLOP1 protein byl nalezen spíše v jádře, zatímco Pdc v cytoplasmě. Z tohoto by se dalo usuzovat, že N-konec Pdc hraje roli v lokalizaci Pdc do cytoplasmy a je možné, že to souvisí s vazbou na G_tβγ [68, 69]. Některé studie naznačují, že Pdc by mohl chránit G_tβγ před ubiquitinací a degradací, jak ukazují pokusy provedené *in vitro* [85, 103]. To vyvrátila skupina Chena, která prováděla pokusy *in situ* a tvrdí, že fosducinu je ve srovnání s transducinem v buňce velmi malé množství, takže není možné, aby v tak malém množství mohl ochránit G_tβγ před ubiquitinací, degradací, či sumoylací [75].

K aktivaci a vnoření některých GPCRs do membrány disku je potřebná jejich fosforylace pomocí G-protein receptorové kinasy 2 a 3 (GRK2, GRK3). Tato aktivace může proběhnout pouze v přítomnosti G_tβγ, který ale může být blokován fosducinem [54, 55, 104]. Zde tedy může Pdc také sehrávat svou roli.

Pdc je spojován i s vyšší aktivitou adenylcyklyasy v čichových řasinkách savců. Bylo zjištěno, že v přítomnosti fosforylovaného Pdc se zvýšila koncentrace cAMP v řasince [54, 55]. Tento proces je také spojený s G-proteiny a může být následkem další funkce Pdc, a to snížení GTPasové aktivity podjednotky G_tα, pravděpodobně inhibicí uvolnění GDP z G-proteinu. Při nízkých koncentracích Pdc se Pdc vázal s G_tβγ, při vyšších koncentracích pak docházelo k inhibici GTPasové aktivity na G_tα [53, 104, 105]. Také bylo zjištěno, že Pdc účinně zpomaluje proces internalizace opioidních receptorů spojených s G-proteiny [106, 107].

Fosducin se také může podílet na rozvoji zánětu sítnice, jako důsledek autoimunitní odpovědi, jak bylo ukázáno u krysu [108] a psů [109].

Jako jeden z dalších kandidátů skupiny G-proteinů, které interagují s Pdc, byly G-proteiny podskupiny G_i, do které patří G-proteiny spojené s metabotropním

glutamátovým receptorem skupiny III [110]. Tento receptor hraje roli zpětnovazebného modulátoru uvolňování glutamátu v neuronech a váže glutamát. Po vazbě glutamátu spouští G-proteinovou kaskádu přenosu signálu. Podskupina G_i funguje jako negativní regulátor adenylcyklyasy. Zde je na místě zmínit, že Pdc interaguje s proteinem 14-3-3, jak bylo zjištěno skupinou Nakana v roce 2001, a oba proteiny byly nalezeny v synapsích tyčinek [71]. Světelný impulz zapříčiní rozpad komplexu 14-3-3/Pdc-PP, volný 14-3-3 zapříčiní vyšší uvolňování neurotransmiteru glutamátu. Ten by se vázal do glutamátového receptoru a spustil by tak díky G_i proteinu signální kaskádu, ovšem Pdc díky vazbě s $G_i\beta\gamma$ sníží možnost přenosu signálu. Dá se tedy obecně říci, že je možné, že Pdc společně se 14-3-3 ovlivňují přenos nervového signálu v synapsích, spojeného s neurotransmiterem glutamátem [71, 72].

Dalším nedávným zjištěním byl fakt, že Pdc hraje roli v regulaci krevního tlaku. Skupina Beetzové v roce 2009 vyšetřovala myši s vypnutým genem pro Pdc ($Pdc^{-/-}$). Ty vykazovaly vyšší krevní tlak v odpovědi na pooperační stres. Dále pozorovali zvýšenou fluktuaci katecholaminů v periferním sympatiku. Bylo dokázáno, že Pdc se nachází i v gangliích sympatiku. V ostatních ohledech myši vypadaly normálně, jen s tím rozdílem, že v jejich sítnici nebyl logicky nalezen Pdc. U dvou populací lidí (Francouzsko-Kanadská - FK, Afro-Americká - AA) odhalili několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP, z angl. *Single-Nucleotide Polymorphism*) v genu pro Pdc. Konkrétně, pokud byla v jednom místě vyměněna alela G místo alely A, docházelo u těchto lidí ke zvýšení krevního tlaku o 12 – 15 mm rtuťového sloupce ve srovnání s lidmi, kteří měli alelu A. Přesná příčina se ovšem neví. Spekuluje se o tom, že kardiovaskulární funkce jsou spojeny s G-proteiny a jejich regulátory a Pdc, jakožto regulátor G-proteinové signalizace, mohl by i zde hrát svou roli. Vyšší tlak by také mohl souviset s vyšší aktivitou sympatiku, která je způsobena rychlejší repolarizací nervů, díky větší koncentraci K^+ iontů, která byla pozorována u myší $Pdc^{-/-}$. Při zkoumání heterozygotních myší ($Pdc^{+/-}$), kterým chyběla pouze jedna kopie genu pro Pdc, bylo zjištěno, že množství fosducinové mRNA se snížilo o ~ 51 % a exprese Pdc v sítnici se snížila pouze o ~ 12 %, ve srovnání s Pdc WT (divoký typ, z angl. *wild type*), tedy $Pdc^{+/+}$. U myší $Pdc^{-/-}$ byl zvýšen jak systolický, tak diastolický krevní tlak, byla ovlivněna stažitelnost levé srdeční komory, ovšem nedošlo ke změně srdečního tepu, ani ke změně morfologie srdce u myší starých 1,5 – 2 měsíce. Nezměnila se ani struktura cév u stejně starých myší, ve srovnání s myšmi Pdc WT, což nasvědčuje faktu, že zvýšení tlaku krve není způsobeno zúžením cév ani změnou jejich elasticity. Výsledné zvýšení tlaku

u těchto myší ovšem v pozdějším věku (starší než 4 měsíce) vedlo k funkčním a strukturním změnám v cévách a hypertofii srdečních komor. Dále myši vystavili stresu operací, anebo přenesením do nového prostředí. V obou případech došlo ke zvýšení především systolického krevního tlaku a to jak v případě homozygotů ($Pdc^{-/-}$), tak v případě heterozygotů ($Pdc^{+/-}$). Při zkoumání aktivity sympatiku zjistili, že u $Pdc^{-/-}$ myší byla v krvi nalezena 3,4× vyšší koncentrace katecholaminu noradrenalinu, než u $Pdc^{+/+}$ myší. Koncentrace adrenalinu byla srovnatelná. Vyšší vylučování noradrenalinu pozorovali pouze v noci, ne za dne. Přítomnost Pdc tedy u myší snižuje koncentraci noradrenalinu během spánku. Zjistili také, že průměr zornice oka myší byl za různých světelných podmínek vždy větší v případě $Pdc^{-/-}$ myší, než v případě $Pdc^{+/+}$ myší. Spekuluji ovšem nad možností, že pouze Pdc exprimovaný v synaptických gangliích periferního nervového systému, se podílí na regulaci krevního tlaku, ne Pdc exprimovaný v šišince, či sítnici oka. U zkoumaných lidí, jejichž gen pro Pdc obsahoval SNPs (rs12402521), vystavených stresu (test z matematiky, postavení se z pozice ležmo) také vzrostl krevní tlak a to především systolický krevní tlak, ve srovnání se zdravými jedinci. Jejich výsledky tedy naznačují, že Pdc neovlivňuje základní klidový tlak krve, ovšem Pdc omezuje vliv aktivace sympatiku na tlak krve [56]. Stresem indukovaná hypertenze je pravděpodobně řízená symaptickým nervovým systémem (konkrétně jeho zvýšenou aktivitou) a opakované vystavení stresu tak může u lidí a zvířat, kteří jsou heterozygoti nebo homozygoti se špatnou alelou pro Pdc , vést ke zvýšení tlaku krve, především tlaku systolického, tedy toho, který je měřen při stažení srdečního svalu. Pdc se tak může stát dobrým cílem pro farmaceutický vývoj léčiv. Výsledky Beetzové a kol. dále potvrdila i studie Ritze a Rumpa [111] a dále skupiny Saxenové a Butona, která studovala geny u Skandinávců s výskytem diabetu typu 2 [112] a britských Kavkazanů [113]. S podobným výsledkem přišla i skupina Palatiniho, která studovala vliv dvou SNPs (rs12402521 a rs6672836) v genu pro Pdc na zvýšení tlaku krve u obézních a neobézních lidí. Na rozdíl od Beetzové ukázali, že obézní nositelé A alely mají 1,28× vyšší riziko vývoje hypertenze, než u nosičů G alel. Zkoumali homozygoty G/G, A/A a heterozygoty A/G a G/A, přičemž nositeli A alely byly především ženy. Jejich výsledky naznačují, že na vývoj hypertenze má vliv nejen genetická výbava člověka, ale také BMI (z angl. *Body Mass Index*). U těchto jedinců hrál v hypertensi roli SNP rs12402521. Zvýšení krevního tlaku opět spojovali se zvýšenou aktivitou sympatiku [114].

Skupina Herrmanna studovala v roce 2010 odpovědi ON-bipolárních buněk na světelný signál u $Pdc^{-/-}$ myší adaptovaných ve tmě. Zjistili, že tyto odpovědi jsou ve

srovnání s Pdc WT myšmi nižší. Skupina došla k závěru, že hlavní regulační složka, která je zodpovědná za nastavení citlivosti přenosu signálu mezi fotoreceptory a ON-bipolárními buňkami je obsažena ve fotoreceptorech a Pdc se zásadně podílí na molekulárním mechanismu [115]. Podle Krispelové ze stejné skupiny Pdc pravděpodobně nepřispívá k mechanismům adaptace ROS kontrolou dostupnosti heterotrimeru transducinu, ale je spíše nezbytný k udržení normálního množství transducinu, potřebného k běžné citlivosti tyčinek [102]. Skupina Longa měřila světelně evokované elektrické signály u synapsí tyčinka-tyčinka bipolárních buněk (angl. *rod-to-rod bipolar cell*, RBC) u Pdc WT a Pdc^{-/-} myši za světelných i tmavých podmínek. Reakce v podmínkách tlumeného záření u Pdc^{-/-} myši byly velmi zpožděné ve srovnání s Pdc WT myšmi [116]. Z výše zmíněných výsledků lze tedy konstatovat, že Pdc se podílí na citlivosti buněk obsažených v sítnici a na rychlosti přenosu signálu skrz sítnici.

2.3.4 Regulace funkce Pdc v sítnici oka

Z předchozí kapitoly vyplývá, že Pdc se pravděpodobně podílí na mnoha procesech spojených s G-proteiny a možná nejen na nich. Jelikož je Pdc regulační protein, i jeho funkce musí být regulována. Regulace Pdc se děje pravděpodobně dvěma hlavními způsoby. Prvním z nich je jeho úprava v podobě posttranslačních modifikací (např. fosforylace a SUMOylace), druhým je vazba s vazebnými partnery.

Thulin a kol. studovali detailně fosforylaci Pdc *in vitro* i v ROS extraktu. Jejich hlavním výsledkem je, že Pdc může být fosforylován celkem na pěti serinech (Ser6, 36, 54, 73 a 106). Pro zeslabení komplexu Pdc/G_tβγ je důležitá fosforylace Ser73, fosforylace Ser54 zabránila vazbě G_tβγ s membránou disku a fosforylace obou těchto serinů byla klíčová v rozpadu komplexu Pdc/G_tβγ, pravděpodobně díky vazbě fosforylovaného Pdc s proteinem 14-3-3 [72]. Tato vazba byla pozorována v RIS, kde se protein 14-3-3 nachází, a ve tmou adaptované sítnici bylo nalezeno 5× více tohoto komplexu, ve srovnání se sítnicí adaptovanou za světelných podmínek. Obecné vazebné motivy fosforylovaných partnerů proteinu 14-3-3 jsou: RSXS^{*}XP, RX(Y/F)XS^{*}XP, kde X značí libovolnou aminokyselinu a S^{*} značí fosforylovaný serin [117]. Aminokyselinové sekvence zahrnující oba důležité seriny (Ser54 a Ser73) obsažené v hovězím a krysím Pdc jsou: RQSMS₅₄SP, RKMS₇₃IQ. Mnohé vědecké skupiny ověřily, že Pdc je fosforylován pomocí PKA, a některé skupiny ověřily, že je fosforylován i pomocí CaMKII [66, 71, 72, 73, 77, 85]. PKA by se měla podílet především na fosforylaci Ser73 a CaMKII na fosforylaci Ser54. Není zcela jasné,

zda je Pdc fosforylován za podmínek světla, nebo tmy, ale bylo ověřeno, že defosforylace Pdc se děje za podmínek vystavení oka světlu [42, 66, 71, 72]. Ovšem při silném dlouhodobějším osvětlení může docházet k fosforylaci Ser71 u myší isoformy Pdc, jak bylo zmíněno dříve [73]. Skupina Ruiz-Gomézové navíc ukázala, že Pdc může být *in vitro* fosforylován i v Pdc-CD působením GRK2 [67]. Bylo ukázáno, že Pdc je defosforylován působením dvou fosfatů: PP1 a PP2A [86, 118]. Navíc bylo ukázáno, že pro defosforylaci fosforylovaného Pdc (Pdc-PP) je důležitá B56ε regulační podjednotka heterotrimerní PP2A. Fosforylovaný Pdc je defosforylován heterotrimerem PP2A, zatímco heterodimer PP2A defosforyluje spíše opsin receptoru rhodopsinu [118].

Bylo zjištěno, že v sítnici oka se nachází především ε a ζ isoforma proteinu 14-3-3 [119]. Bylo prokázáno, že protein 14-3-3 váže fosforylovaný Pdc, přičemž pro vazbu jsou klíčové fosforylace serinů 54 a 73 obsažených v Pdc [71, 72, 120]. Vazba proteinu 14-3-3 brání vazbě Pdc s $G\beta\gamma$ podjednotkami G-proteinů. Tento proces může vést k oslabení světelného signálu vedoucího k synapsím tyčinek a čípků [71, 72, 97], dále může vazba 14-3-3 ovlivňovat uvolňování neurotransmiteru glutamátu v synapsích tyčinek [71], dále se spekuluje o možnostech, že protein 14-3-3 chrání Pdc, nebo zpomaluje procesy na Pdc spojené s jeho degradací, defosforylací [72] či SUMOylací. Protein 14-3-3 interaguje s Pdc v místech, kde se Pdc-ND váže s $G\beta$. Detailnější informace o této vazbě se lze dozvědět ve výsledcích této disertační práce (kapitola 5).

Za dalšího vazebného partnera Pdc je považován protein SUG1. SUG1 je proteinová podjednotka 26S proteasomu o hmotnosti 45,6 kDa [121]. Dále byl SUG1 identifikován jako vnitřní složka komplexu RNA polymerasy II, vázající TATA-vazebný protein a také jaderné receptory hormonů [122, 123]. 26S proteasom je multi-proteinový komplex, nalezený v očních čočkách [124, 125], sítnicových pigmentových epiteliálních buňkách [126] a ve fotoreceptorech sítnice [127]. SUG1 je členem velké rodiny ATPas schopných hydrolyzy ATP [128] pojmenované AAA rodina (z angl. *ATPases Associated with a variety of cellular Activities*) [121]. Tyto ATPasy obsahují vysoce konzervovanou sekvenci 200 aminokyselin a plní mnohé funkce [129, 130, 131]. Napříč živočišnými druhy existuje několik druhových homologů SUG1, které se jen velmi málo liší. Např. lidský SUG1 nazývaný p45 je identický s hovězím, myším a krysím SUG1 [129, 132, 133]. Dále existuje i lidský homolog nazývaný protein Trip1 s 99,6% podobností ke kvasinkovému SUG1 [134]. Předpokládaná funkce SUG1 spočívá v regulaci intracelulárních signálních drah skrz regulační proteiny, nebo může hrát roli v regulaci

specifické transkripce kontrolou rychlosti degradace transkripčních faktorů [70, 135]. Dále se také předpokládá jeho možná funkce v cíleném přesunu proteinů Pdc rodiny k jejich degradaci [68]. SUG1 se prozatím jeví jako multifunkční protein spojený s různými buněčnými proteinovými komplexy [129]. Je možné, že se jedná o DNA helikasu [128, 136]. Skupina Makina [129] ukázala, že SUG1 dokáže specificky interagovat s mRNA a hrát roli v jejím metabolismu. Zhuová a Craftová [70] ukázaly, že fosducin a proteiny fosducinové rodiny interagují se SUG1. Interakce se účastní C-konec fosducinové rodiny. Pokud je z C-konce Pdc a jeho homologů odstraněno 60 aminokyselin, k interakci se SUG1 nedojde. Pravděpodobný proces, kterého se účastní SUG1, Pdc a CRX, byl navržen Zhuovou a Craftovou, jak je popsáno níže [68].

Jak již bylo naznačeno výše, Pdc pravděpodobně interaguje i s proteinem CRX. CRX (z angl. *Cone-rod homeobox*) je 32,4kDa proteinový jaderný transkripční faktor specifický pro oční sítnici a šišinku. Gen kódující protein CRX je členem Otd/Otx homeobox genové rodiny. U dospělých savců je CRX exprimován ve fotoreceptorech sítnice oka – tyčinkách i čípcích – a také v buňkách šišinky - pinealocytech [87, 101, 137]. V sítnici se CRX váže na specifický DNA vazebný motiv TAATCC/A, který je charakteristický pro několik genů kódujících fotoreceptory a také geny pro opsin, IRBP, arrestin a další [87, 101]. CRX dále reguluje fotoreceptorovou diferenciaci [87, 101, 137]. Během cyklu světlo-tma se množství CRX-mRNA v sítnici příliš nemění. Regulace CRX v sítnici pravděpodobně probíhá na úrovni posttranslačních mechanismů. V šišince je situace poněkud odlišná. CRX zde váže a aktivuje regulační element DNA TAATC/T, který se nachází v genu pro šišinkovou „noční-specifickou ATPasu“ a dalších genech kódujících rychlost-limitující enzymy pro syntézu melatoninu [138]. Množství šišinkové CRX-mRNA ovšem oproti sítnici výrazně osciluje během cyklu světlo-tma [139]. CRX hraje roli v rozvoji rakoviny oční sítnice a šišinky [140] a mutace genu pro CRX vedou k mnohým nemocem sítnice, jako je např. autosomální dystrofie tyčinek [141], Leberova vrozená slepota [142] a další. Studie ukázaly, že sítnicový CRX je v buňce situován v závislosti na osvětlení sítnice. Ve světle adaptované sítnici se CRX nachází spíše v cytoplasmě fotoreceptorových buněk, kdežto za tmy byl CRX detekován v jejich jádře. Celkové množství CRX zůstává v buňce za tmy konstantní po dobu dvou hodin [68, 139]. Zhuová a Craftová dokázaly, že CRX interaguje přímo *in vitro* i *in vivo* s Pdc a jeho homology, tzv. Pdc-like a Pdc-like orphan proteiny [68]. Dále dokázaly, že s N-koncem (aminokyselinové zbytky 1 až 178) CRX interaguje C-koncová thioredoxinová doména Pdc (aminokyselinové zbytky 187 až 246). Vazba Pdc

s $G_t\beta\gamma$ pravděpodobně nebrání interakci fosducinu s CRX. Na základě svých výsledků navrhly model procesů probíhajících v sítnici oka a zahrnujících Pdc, CRX a SUG1. Tento model naznačuje, že by mohlo docházet k cytosolické interakci nefosforylovaného Pdc se SUG1, který přenesení Pdc do 26S proteasomu (v cytosolu, nebo v jádře). 26S proteasom degraduje Pdc, přičemž jeho C-koncová doména zůstane zachována (nebo alespoň její větší peptidové fragmenty) a dále interaguje s jaderným CRX, který je takto aktivován a váže se na promotor jednoho z DNA vazebných motivů charakteristických pro CRX [68]. Skupina Margulise ovšem ukázala, že celá molekula Pdc se může nacházet v buněčném jádře, kde může být dokonce fosforylována, nejen Pdc-CD [120].

Skupina Klenka ukázala, že další možností regulace funkce Pdc je jeho posttranslační modifikace proteinem SUMO (z angl. *Small Ubiquitin-related Modifier*) a to jak *in vitro*, tak *in vivo* v hovězích fotoreceptorových buňkách a buňkách srdce. Uvnitř Pdc byla identifikována sekvence pro protein SUMO, která obsahuje lysin 33, který se nachází v blízkosti tryptofanu 29 v Pdc-ND. Jejich pokusy ukázaly, že pokud byl lysin 33 zmutován na arginin 33 (K33R), Pdc K33R byl ve srovnání s Pdc WT méně stabilní, což by mohlo souviset s jeho vyšší ubiquitinací, tedy další modifikací proteinu Pdc. Z tohoto pohledu by tedy SUMOylace mohla chránit Pdc před proteasomální degradací. Dále ukázali, že SUMOylace snižuje u Pdc schopnost vázat $G_t\beta\gamma$, což by mohlo vést, podobně jako v případě proteinu 14-3-3, ke snížení funkce Pdc blokovat světelný signál. Ubiquitinace tedy vede k degradaci proteinu, ovšem SUMOylace proteinu může vést k regulaci jeho funkce, např. změnou protein-proteinových interakcí a ovlivněním subcelulární lokalizace. SUMOylace může vést i ke stabilizaci proteinu, právě díky antagonistické funkci k ubiquitinu. Protein SUMO je na Pdc vázán kovalentní vazbou [143]. V naší laboratoři jsme se pokoušeli tuto posttranslační modifikaci studovat, ovšem nepodařilo se nám za žádných z použitých podmínek Pdc SUMOylovat (nepublikovaná data).

Jednou z dalších možností, jak by mohla být nepřímo ovlivněna funkce Pdc, je vazba proteinu $G_t\alpha$ jinými proteiny. Tato podjednotka interaguje např. s proteinem RGS3, což je regulátor G-proteinové signalizace, který urychluje na $G_t\alpha$ podjednotce přeměnu GTP na GDP [144, 145]. Nedávno bylo zjištěno, že $G_t\alpha$ by mohla interagovat s proteinem UNC119 a oddisociovat tak $G_t\alpha$ podjednotku od podjednotky $G_t\beta\gamma$. Navíc vazba UNC119 brání transducinu vázat se k membráně disku. Proteiny Pdc a UNC119 by tímto způsobem mohly spolupracovat a regulovat tak množství přenášeného světelného signálu [146, 147].

2.4 Proteiny 14-3-3

Strukturou, funkcí a regulací funkce proteinové rodiny 14-3-3 se podrobně zabývám ve své bakalářské i diplomové práci [1, 148], proto zde uvedu pouze základní poznatky s těmito proteiny spojené.

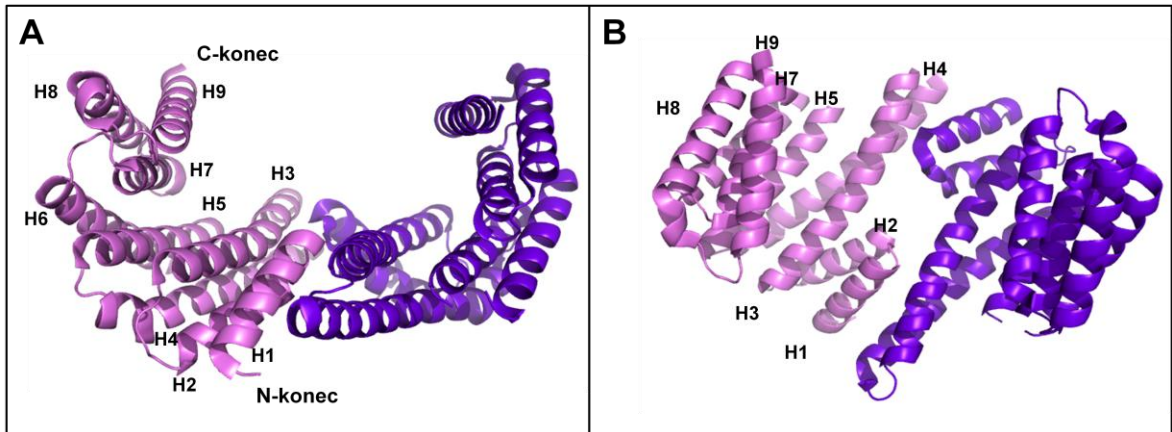
Proteiny 14-3-3 jsou rodinou kyselých (pI ~ 4,7), vysoce konzervovaných proteinů o hmotnosti okolo 30 kDa. Proteiny 14-3-3 tvoří stabilní homo- nebo heterodimery [149, 150]. Nachází se ve všech eukaryotických buňkách a to nejen v živočišných, ale i rostlinných a kvasinkových [151, 152]. Savčí isoformy byly označeny $\beta - \eta$ [153], kvasničné isoformy se nazývají BMH1 a BMH2 [154]. V rostlinné říši bylo nalezeno patnáct isoform [155]. Bylo objeveno více než 300 vazebných partnerů, které s proteiny 14-3-3 interagují. Toto množství partnerů souvisí i s podílem 14-3-3 na mnohých procesech v buňkách, např. apoptose, transkripci, regulaci buněčného cyklu, růstu a diferenciaci buněk, intracelulárním transportu, buněčné adhezi, strukturaci cytoskeletu a dalších [156 - 159]. Jejich podíl byl také prokázán u vývoje neurodegenerativních chorob, včetně Creutzfeldt-Jakobovy choroby [160 - 162], Alzheimerovy choroby [163], Parkinsonovy choroby [164] a dalších. Vazební partneři proteinů 14-3-3 jsou nejčastěji fosforylované proteiny, obsahující jeden nebo oba vazebné motivy: $R(S/\Phi)+S^*XP$ a $RX(S/\Phi)+S^*XP$, kde S^* značí fosforylovaný serin (nebo threonin), Φ znamená aromatický aminokyselinový zbytek, $+$ označuje bazický aminokyselinový zbytek a X jakýkoli aminokyselinový zbytek. Byl objeven i třetí vazebný motiv $S^*-X_{1-2}-COOH$, kde X není prolin [165, 166]. Vazebné motivy jsou upřesňovány a je jich více, jak bylo naznačeno v kapitole 2.3.4, kde Yaffe a kol. ukázali mírně odlišné motivy [117]. Byl vyroben i syntetický peptid R18 obsahující sekvenci WLDLE, která se 14-3-3 reagovala s vyšší afinitou, než fosforylované proteiny [167, 168]. Častými vazebnými partnery proteinů 14-3-3 jsou IDPs.

Monomer 14-3-3 sestává z devíti α -helixů (H1-H9), jak je ukázáno na *Obr. 2.7* na str. 36. Dimer pak tvoří útvar ve tvaru misky. Uvnitř „misky“ se nachází amfifilní žlábek s konzervovanou sekvencí obou monomerů. Žlábek je často místem, kam se váže většina vazebných partnerů. Ve vnějších oblastech dimeru jsou již sekvence v rámci isoform více proměnlivé [149, 150, 163]. Byly nalezeny proteiny, které interagují i s vnějšími oblastmi dimeru 14-3-3 [144, 145], včetně fosducinu [80].

Funkce proteinů 14-3-3 může být rozčleněna do tří základních mechanismů: 1) přímá změna konformace vazebného partnera [166, 169 - 171], 2) fyzické obklopení sekvence,

nebo strukturního motivu vazebného partnera, nebo jeho zpřístupnění [128, 172],
 3) zprostředkování vazby mezi dvěma jinak neinteragujícími partnery [173].

Proteiny 14-3-3 jsou regulovány na úrovni posttranslačních modifikací, konkrétně např. jejich fosforylací v místech Ser58, Ser63, Ser184 a Ser/Thr232 [174 - 176]. Další regulace probíhá na úrovni exprese genů 14-3-3 a vazbou ligandů, jakožto vazebných partnerů.



Obr. 2.7 Krystalová struktura dimeru proteinu 14-3-3 ζ . Každý monomer je označen jinou barvou (růžová, respektive modrá). (A) Pohled zepředu. Na obrázku jsou vyznačeny α -helixy (H1 – H9) a N- a C-konec monomeru. Analogické značení by bylo i v případě modrého monomeru. (B) Pohled seshora. Převzato z [165], PDB ID: 1QJA. Obrázek byl vytvořen v programu PyMol.

Porovnání sekvencí savčích isoform proteinu 14-3-3 je zobrazeno na Obr. 2.8.

beta	MTMDKSELVQKAKLAEQAERYDDMAAAMKAVTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTE--RNEKKQQMGKEYREKIE
zeta	--MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE--GAEEKQQMAREYREKIE
theta	--MEKTELIQKAKLAEQAERYDDMATCMKAVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSAWRVISSIEQKTD--TSDKKLQLIKDYREKVE
sigma	--MERASLIQKAKLAEQAERYEDMAAFMKGAVEKGEELSCERNLLSVAYKNVVGQRAAWRVLSSIEQKSNEEGSEKGPVREYREKVE
eta	--MGDREQLLQARLAEQAERYDDMASAMKAVTELNEPLSNEDRNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTMADGNEKKLEKVKAYREKIE
gamma	--MVDREQLVQKARLAEQAERYDDMAAAMKAVTELNEPLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTSADGNEKKIEMVRAYREKIE
epsilon	--MDDREDLVYQAKLAEQAERYDEMVE SMKKVAGMDVELTVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRISSIEQKEENKGGEDKLMIREYRQMV
beta	AELQDICNDVLELLDKYLIP--NATQFESKVFYLMKMGDYFRYLAEVAGDNKQTTVSNQQAYQEAPEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSV
zeta	TELRLICNDVLSLEKFLIP--NASQAESKVFYLMKMGDYFRYLAEVAGDDKGIQDQSQAYQEAPEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSV
theta	SELRSICTTVLELLDKYLIA--NATNPESKVFYLMKMGDYFRYLAEVACGDDRRQTIIDNSQAYQEAPEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSV
sigma	TELQGVCDTVLGLLDSHLIK--EAGDAESRVFYLKMGDYFRYLAEVATGDDKKRIIDSARSAYQEAPEISKKEMPTNPIRLGLALNFSV
eta	KELETVCNDVLSLLDKFLIKNCNDFQYESKVFYLMKMGDYFRYLAEVAGSEKKNVVEASEAAYKEAPEISKEQMPTHPIRLGLALNFSV
gamma	KELEAVCQDVLSDNYLIKNCSETQYESKVFYLMKMGDYFRYLAEVATGKRATVVESEKAYSEAEIISKEHMPTHPIRLGLALNFSV
epsilon	TELKLCICCDILDVLDKHLIP--AANTGESKVFYLMKMGDYFRYLAEVATGDRKRAAENSLVAYKAASDIAMTELPPTHPIRLGLALNFSV
beta	FYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSENQGDGEGDAGEGEN-----
zeta	FYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSDTQGDGAEAGEGEN-----
theta	FYYEILNNSPELACTLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSDSAGECDAAEAGEEN-----
sigma	FHYEIANSPPEAISLAKTTFDEAMADLHTLSEDSYKDSLIMQLLRDNLTLWTADNAGEEGGEAPQEPQS-----
eta	FYYEIQNAPEQACLAKQAFDDAIAELDTLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSDQDDEAGEGN-----
gamma	FYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSDQDDEAGEGN-----
epsilon	FYYEILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDTLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSDMQDDEGEQNKALQDVEDENQ

Obr. 2.8 Porovnání sekvencí lidských isoform proteinů 14-3-3. Stínování vypovídá o sekvenci shodě jednotlivých isoform [177].

3 Cíl práce

Hlavním cílem této disertační práce je strukturně charakterizovat protein fosducin (Pdc) a jeho komplex s proteinem 14-3-3 a na základě získaných dat objasnit úlohu proteinu 14-3-3 v regulaci funkce Pdc.

Dílčí cíle této práce jsou:

- Biofyzikálně charakterizovat N-terminální a C-terminální domény (Pdc-ND a Pdc-CD) Pdc. Stanovit jejich vazebné afinity k proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- Zmapovat konformační změny molekuly Pdc vyvolané fosforylací na Ser54 a Ser73.
- Zmapovat vazebné rozhraní komplexu fosforylovaného fosducinu (Pdc-PP) s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- Strukturně charakterizovat volný Pdc a jeho komplex s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- Objasnit, zda vazba proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C ovlivňuje kinetiku defosforylace fosducinu *in vitro*.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

- agar - Carl Roth GmbH, Německo
- agarosa - Carl Roth GmbH, Německo
- akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo
- ampicilin - Sigma-Aldrich, USA
- ATP - Sigma-Aldrich, USA
- běžné chemikálie - Lachema a.s., Neratovice, Sigma-Aldrich, USA, Carl Roth GmbH, Německo
- bis-akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo
- bromfenolová modř - Sigma-Aldrich, USA
- $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Anglie
- Coomassie Brilliant Blue R-250 - Lachema a.s, ČR
- DTT (dithiotreitol) - Carl Roth GmbH, Německo
- EDTA - Sigma-Aldrich, USA
- glycin - Carl Roth GmbH, Německo
- imidazol - Carl Roth GmbH, Německo
- IPSL - Sigma-Aldrich, USA
- IPTG - Sigm-Aldrich a, USA
- $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ - Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Anglie
- NP40 - Sigma-Aldrich, USA
- persulfát amonný - Sigma-Aldrich, USA
- SDS - Sigma-Aldrich, USA
- síran nikelnatý - Penta, ČR
- TRIS (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) - Carl Roth GmbH, Německo
- 2-merkapt ethanol - Carl Roth GmbH, Německo

Všechny chemikálie byly nejméně čistoty p.a.

4.1.2 Přístroje

- ALV, Photometer (ALV, Langen, Německo), ALV CGS/8F goniometr, ALV High QE ADP detektor, ALV, 5000/EPP multibit, multitaun autokorelátor
- centrifuga - pro koncentrování proteinů – Eppendorf 5804R, rotor A-4-44
- centrifuga - pro mikrozkušky – MPW 52, rotor no. 11 3271, Austrálie
- centrifuga - rotor GSA a SS34 – Sorval RC-5B, DuPont Instruments, USA
- fotonásobič - Hamamatsu, R3809U-50, Japonsko

- hmotnostní spektrometr 15T FT-ICR (SolariX XR, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)
- chromatografie - HPLC-AKTA, Amersham Biosciences, Švédsko
- chromatografie – Watrex, P102 pump, Sykam S_3240 UV/VIS Multichannel detector
- NMR - 600, 850 a 950MHz magnety Bruker Avance III, Bruker, USA
- sonikátor - Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA
- Spektrofluorimetr - Photon Counting PC1 ISS, USA
- Spektrofluorimetru obsahující Ti:safírový laser (Coherent, Chameleon Ultra II) a časově-korelovaný detektor (Becker&Hickl, SPC150) s chlazeným čítačem fotonů MCP-PMT (Hamatsu, R3809U-50)
- Spektropolarimetr - J-810 - Jasco, Japonsko
- Synchrotron Petra III (Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY)), Hamburk, Německo
- třepačka miniprepů – Shaking Incubator HandyLab[®] System, N-Biotek, Korea
- třepačka litrových LB médií – InforsHT Multitron, Inforsag, Německo
- ultracentrifuga ProteomeLab-XL I, Beckman Coulter, USA, rotor AN50Ti
- UV-LED excitace - PicoQuant, PLS 295-10, Německo
- UV-VIS absorpční spektrofotometr - Agilent 8453, USA

4.1.3 Ostatní materiál

- dialyzační membrána - MCO (Molecular weight cut off) 14 kDa - Roth, Německo
- dialyzační membrána – MCO 6-8 kDa – Spectrum Laboratories, Inc., USA
- *E.coli* BL21(DE3) - Stratagene, USA
- chymotrypsin A – Sigma-Aldrich, USA
- lysozym - New England BioLabs, USA
- náplně do kolon a kolony - Amersham Biosciences, Švédsko
- vektor - pET-15b - Invitrogen, USA
- PKA - Promega, USA
- PP1 – Sigma-Aldrich, USA
- PP2A – Cayman, USA
- standard molekulových hmotností - Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, USA
- standard molekulových hmotností – Blue Protein Ladder, Central European Biosystem, Česká republika
- trypsin - Sigma-Aldrich, USA

4.2 Exprese a purifikace

Tato disertační práce volně navazuje na mou diplomovou práci [1], kde se lze detailně dozvědět o expresi a purifikaci studovaných proteinů a jejich mutantních forem. Z tohoto důvodu zde uvádím pouze stručný souhrn expresních a purifikačních kroků, které jsem během své disertační i diplomové práce prováděla.

4.2.1 Exprese, purifikace a fosforylace fosducinu (Pdc) a jeho mutantních forem

Kryší fosducin (*Rattus Norvegicus*) (Pdc WT, z angl. *wild type*) a jeho mutantní formy (PdcQ52K, PdcQ52K S73A, PdcQ52K W29F Y93W, PdcQ52K W29F F107W, PdcQ52K W29F F123W, PdcQ52K W29F F208W, PdcQ52K C168) byly purifikovány a fosforylovány stejným způsobem a s obdobnými výtěžky, jako jsou uvedeny v mé diplomové práci [1] pro PdcQ52K mutantní formu.

4.2.2 Exprese, purifikace N a C-terminální domény Pdc (Pdc-ND, Pdc-CD) a fosforylace Pdc-ND

Exprese a purifikace Pdc-CD (konstrukt R110 – E246) s 6×His kotvou na N-konci probíhala stejně, jako v případě celého konstruktu fosducinu. Exprese a purifikace Pdc-ND (konstrukt M1 – F107) s 6×His kotvou na N-konci probíhala podobně, jako v případě celého konstruktu, jen s tím rozdílem, že při aniontové iontově-výměnné a gelové permeační chromatografii byl použit TRIS-HCl o pH 8,2, jelikož je $pI(\text{Pdc-ND}) = 6,55$ a při použití roztoku o pH 8 docházelo ke ztrátám proteinu. Konstrukt Pdc-ND také obsahuje mutaci Q52K, takže je možné jej fosforylovat v obou fosforylačních místech (Ser54 a Ser73) pomocí PKA.

4.2.3 Exprese, purifikace a fosforylace izotopově značeného Pdc a jeho mutantních forem pro NMR studie

DNA kódující kryší mutantní formu fosducinu (*Rattus Norvegicus*, PdcQ52K) a Pdc-ND a Pdc-CD, všechny obsahující 6×His N-terminální kotvu, byla vnesena do vektoru pET-15b a transformována do bakteriálních buněk *Escherichia coli* kmene BL21 (DE3), kultivována na agarové misce s obsahem ampicilinu při 37 °C po dobu 18 hodin a poté amplifikována v 5 ml sterilního LB média s obsahem ampicilinu ve 37 °C, při 190 ot. · min.⁻¹ po dobu 18 hodin. Poté byly buňky centrifugovány ve 4 °C a promyty 1,5 ml destilované vody. Tento krok byl opakován celkem 4×, aby se odstranily zbytky LB média. Promyté buňky byly přeneseny do 0,9 l sterilního minimálního média (0,042M Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,015M KH₂PO₄; 8,6μM NaCl; 18,7μM ¹⁵NH₄Cl; 2mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 22,2mM ¹³C₆H₁₂O₆ nebo C₆H₁₂O₆; 1mM thiamin-HCl) obsahujícího ampicilin o konečné koncentraci 100 μg · ml⁻¹ a poté inkubovány ve 37 °C při 190 ot. · min.⁻¹ do hodnoty OD₆₀₀ = 0,8. Protein byl dále získán a pročišťován stejně, jako

v případě neznačených proteinů. Fosforylace PdcQ52K probíhala stejně, jako v případě neznačeného proteinu. Výtěžek z 0,9 l minimálního média byl značně kolísavý. U celého konstruktu fosducinu bylo dosaženo výtěžku až 4,9 mg, u zkrácených verzí pak do 1 mg, ovšem v jednom případě bylo u $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Pdc-CD dosaženo výtěžku 6,7 mg. Tyto výkyvy pravděpodobně souvisí s kvalitou a stářím použitých buněk.

4.2.4 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 ζ Δ C a jeho isoform

Mutantní forma proteinu 14-3-3 ζ Δ C, 14-3-3 ζ Δ C C189, obsahující pouze jeden cystein (Cys189), byla připravena za použití DNA obsahující lidský gen pro 14-3-3 ζ C189 (dar od RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D.) s produkcí 245 aminokyselinové formy 14-3-3 s přídatným obsahem 20 residuí (6 \times His kotva) na N-konci. Tyto geny byly zkráceny vnesením stop kodonu pro formu proteinu 14-3-3 ζ bez posledních 15 aminokyselin (označení stop231, nebo Δ C) kvůli zvýšení afinity proteinu k jeho vazebným partnerům [178]. Vzniklé geny byly vneseny do vektoru pET-15b s obsahem štěpných míst pro NdeI a BamHI. Exprese probíhala stejně, jako v případě PdcQ52K. Purifikace byla podobná, jako v případě PdcQ52K, jen s tím rozdílem, že pufrý neobsahovaly NP-40. Pufr pro gelovou permeační chromatografii byl stejného složení, jako je složení pufru pro zastavení fosforylace fosducinu. Stejný proces exprese i purifikace byl proveden pro mutantní formu 14-3-3 ζ noW, tedy formu, kde byly vloženy mutace W59F a W228F. Z 0,9 l LB média lze získat přibližně 6 mg čistého proteinu vhodného pro experimenty.

4.3 Fluorescenční techniky

4.3.1 Zhášení tryptofanové fluorescence

Pro měření statického zhášení tryptofanové fluorescence byly připraveny vzorky mutantních forem fosforylovaného (-PP) fosducinu, obsahujících vždy pouze jeden tryptofanový zbytek, konkrétně PdcQ52K-PP, PdcQ52K W29F Y93W-PP, PdcQ52K W29F F107W-PP, PdcQ52K W29F F123W-PP, PdcQ52K W29F F208W-PP o objemu 400 μ l v koncentracích 35 μ M. Takto připravený roztok byl nejdříve proměřen bez obsahu proteinu 14-3-3 ζ noW (mutantní forma 14-3-3 ζ neobsahující tryptofanové zbytky – mutace W59F a W228F). K roztoku fosducinu byl dále přidáván roztok akrylamidu v μ l objemech v rozmezí konečných koncentrací akrylamidu 0,000 – 0,546M. Stejně byl proměřen i roztok proteinu 14-3-3 ζ noW o koncentraci 70 μ M, roztok komplexu

14-3-3 ζ noW/Pdc-PP (všechny mutantní formy Pdc) a také roztok samotného pufru. Každé měření bylo zopakováno minimálně třikrát. Měření probíhalo vždy při 22 °C v pufru o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM 2-merkptoethanol, na spektrofluorimetru ISS PC1 photon counting spectrofluorometer na FGÚ AV ČR, v.v.i. Štěrbiny monochromátorů excitačního i emisního záření byly nastaveny na 8 nm. Excitační vlnová délka byla nastavena na 297 nm, emise byla sledována při 340 nm. Naměřené intenzity byly korigovány na intenzitu pufru, na objem a na vnitřní filtr. Získané korigované intenzity byly vyneseny jako Stern-Volmerův výnos, z něhož byla získána hodnota K_{SV} a následně dopočítána hodnota k_q . Teoretické informace o použité metodě lze získat v kapitole 9.1.2.

4.3.2 Časově-rozlišené dohasínání intenzity fluorescence

Vzorky pro měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence tryptofanových zbytků a AEDANS byly připravovány RNDr. Lenkou Řežábkovou, Ph.D. a měřeny a vyhodnocovány ve spolupráci s doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. a doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. z MFF UK. Detailnější popis přípravy vzorků je popsán v příložených člancích [79, 80] (viz Kapitola 8 - Publikace).

Vzorky pro měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ANS byly připraveny následovně. Pro měření byly připraveny vzorky PdcQ52K, Pdc-CD a Pdc-ND o konečné koncentraci 5 μ M v pufru o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 200mM NaCl a 2mM DTT. K těmto vzorkům byl přidán ANS o konečné koncentraci 20 μ M v celkovém objemu vzorku 350 μ l v pufru o stejném složení, jako v případě proteinových vzorků. Vzorky byly měřeny na spektrofluorimetru obsahujícího Ti:safírový laser (Coherent, Chameleon Ultra II) a časově-korelovaný detektor (Becker&Hickl, SPC150) s chlazeným čítačem fotonů MCP-PMT (Hamatsu, R3809U-50). ANS byl excitován při 355 nm a emise byla sledována při 480 nm za použití monochromátoru s 405nm filtrem v emisním kanálu. Dohasínání fluorescence bylo zaznamenáváno pod magickým úhlem, typicky 1024 kanálů a časovým rozlišením 50 ps/kanál, dokud nebylo dosaženo množství 10^7 v jednom dohasínání. Data byla vyhodnocována doc. Večeřem a doc. Heřmanem. Teoretické informace o použité metodě lze získat v kapitole 9.1.3.

ANS (8-anilinaftalen-1-sulfonová kyselina) je hydrofobní fluorescenční značka, která je schopná se vázat do hydrofobních oblastí sbalených a částečně sbalených proteinů.

4.3.3 Časově-rozlišený pokles anizotropie fluorescence

Vzorky pro měření časově-rozlišeného poklesu anizotropie fluorescence tryptofanových zbytků a AEDANS byly připravovány RNDr. Lenkou Řežábkovou, Ph.D. a měřeny a vyhodnocovány ve spolupráci s doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. a doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. z MFF UK. Detailnější popis přípravy vzorků je popsán v příložených článcích [79, 80]. Teoretické informace o použité metodě lze získat v kapitole 9.1.4.

4.4 Dynamický rozptyl světla (DLS)

V rámci této disertační práce byly zjišťovány hydrodynamické poloměry R_H fosducinu PdcQ52K, fosforylovaného fosducinu PdcQ52K-PP, proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta C$, komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta C$ /PdcQ52K-PP a jednotlivých domén fosducinu (Pdc-ND, Pdc-CD). Měření bylo provedeno na přístroji ALV Photometer (ALV, Langen, Německo) vybaveném 22 mW He-Ne laserem, měřicího při vlnové délce $\lambda = 632,8$ nm, dále ALV CGS/8F goniometrem, ALV High QE ADP detektorem, ALV 5000/EPP multibit, multitau autokorelátorem, při 25 °C a úhlu 90°. Data byla vyhodnocena algoritmem CONTIN, který poskytl distribuční funkci korelačních časů τ , z nichž byla získána distribuční funkce hydrodynamických poloměrů R_H (viz rovnice 9.30 na str. 227). Veškerá měření byla prováděna v pufru o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 150mM* (nebo 200mM) NaCl, 1mM EDTA, 2mM DTT. Koncentrace vzorků byla 120 μ M (14-3-3 $\zeta\Delta C^*$) a 60 μ M (PdcQ52K, PdcQ52K-PP*, Pdc-ND, Pdc-CD). Část měření bylo provedeno, vyhodnoceno a konzultováno ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Štěpánkem, Ph.D. z PřF UK. Teoretické informace o metodě DLS lze získat v kapitole 9.2.

4.5 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Měření SAXS experimentů probíhalo v Německém Hamburku v laboratořích European Molecular Biology Laboratory (EMBL) P12 beamline, za použití synchrotronu PETRA III (Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY)). Vzorky byly měřeny za laboratorní teploty v roztoku o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 200mM NaCl, 1mM EDTA a 2mM 2-merkaproethanol (2mM DTT*). Nejdříve byl měřen samotný PdcQ52K. Byla připravena koncentrační řada PdcQ52K v koncentracích 2,3; 3,4 a 4,2 mg \cdot ml⁻¹. Vzorky byly přefiltrovány a centrifugovány, aby nebyly přítomny jakékoli

agregáty a větší nečistoty. Získaná data byla zprůměrována a rozptylová data pufru byla odečtena za použití programu PRIMUS [179]. Guinierovou aproximací byla vypočtena intenzita rozptylu v přímém směru $I(0)$ a gyrační poloměr částice R_g . Párová distribuční funkce vzdáleností r dvou pozic v rámci molekuly $p(r)$ a hodnota D_{max} byla spočítána z rozptylových dat za použití programu GNOM [180]. Zdánlivá molekulová hmotnost $M_{w,exp}$ byla odhadnuta s použitím rozptylových dat roztoku hovězího sérového albuminu o molekulové hmotnosti 66 kDa. *Ab initio* molekulové obálky byly vypočteny pomocí programu DAMMIN [181]. Výsledky programu DAMMIN byly zprůměrovány pomocí programu DAMAVER [182]. Analýza založená na EOM metodě byla provedena za použití programu EOM [183]. Dále byly změřeny roztoky proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta^*$ o koncentracích 4,3; 8,4 a 11,1 mg · ml⁻¹, a také roztoky obsahující komplex $^* 14-3-3\zeta\Delta:Cp$ v molárním poměru 2:1 o koncentracích komplexu 5,6; 6,3; 10,9 a 16,8 mg · ml⁻¹. Při vyhodnocování těchto dat byla opět využita Guinierova aproximace a GNOM. K výpočtu vyloučeného objemu hydratované částice (Porodův objem V_p) bylo využito Porodova přístupu [184]. K *ab initio* modelování obálek proteinů bylo využito programu DAMMIF [185]. Výsledky programu DAMMIF byly dále opět zprůměrovány pomocí programu DAMAVER. Pomocí programu SUPCOMB [186] byly vyrobeny obrázky obsahující obálku proteinu 14-3-3 získanou ze SAXS měření, s vnořenou krystalovou strukturou tohoto proteinu [187]. Teoretické rozptylové křivky byly spočítány ze strukturních modelů a proloženy experimentálními daty za použití programů CRY SOL [188] a FoXS [189]. Data byla vyhodnocována prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. Teoretické informace o použitých metodách lze získat v kapitole 9.3.

4.6 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Pro NMR měření bylo připraveno celkem šest izotopově značených proteinů: ¹⁵N-PdcQ52K, ¹⁵N-PdcQ52K-PP, ¹³C,¹⁵N-PdcQ52K, ¹³C,¹⁵N-PdcQ52K-PP, ¹⁵N-Pdc-CD, ¹³C,¹⁵N-Pdc-CD. Pro studium komplexu byly připraveny i neznačené mutantní formy proteinu 14-3-3: 14-3-3 $\zeta\Delta$, 14-3-3 $\zeta\Delta$ C189. Všechny experimenty byly měřeny ve filtrovaném pufru o složení 50mM MES (pH 6,5), 100mM NaCl, 1mM TCEP. Vzorky byly měřeny za použití 600, 850 a 950 MHz magnetů Bruker Avance III (Bruker, USA) vybavených trojrezonančními chlazenými sondami, při teplotě vzorku 293,15 K. Koncentrace fosducinu byla ve většině případů 200 μ M, což je maximální koncentrace Pdc, při které nedochází k jeho oligomerizaci *in vitro*, jak bylo zjištěno v jednom z NMR

^1H - ^{15}N HSQC experimentů. Koncentrace Pdc-CD byla minimálně 300 μM . Fosducin byl fosforylován (-PP) podle ověřeného protokolu [1], jako v případě neznačených vzorků. Protein 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ byl měřen v takové koncentraci, aby vzniklý komplex byl v minimálním molárním poměru 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$:PdcQ52K-PP = 2:1.

Pro přiřazení sekvence Pdc bylo nejdříve změřeno 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum celého PdcQ52K a následně jeho strukturované Pdc-CD, u které byly změřeny i 3D experimenty HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HNCACB, HN(CO)CA. Pomocí programu SPARKY [190] byly přiřazeny signály jednotlivým aminokyselinám obsaženým především v Pdc-CD. Pro přiřazení signálů nestrukturované Pdc-ND byly změřeny dva 5D NMR experimenty HN(CA)CONH, HabCabCONH, dále 3D HNCO. Pro získání informace o Pdc v přítomnosti a nepřítomnosti 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$, kde molekulová hmotnost komplexu je 87,2 kDa, byla naměřena 2D ^1H - ^{15}N TROSY spektra pro samotný PdcQ52K a PdcQ52K-PP v komplexu. 3D HNCA experiment byl použit pro získání sekundární struktury z chemických posunů $C\alpha$, které jsou indikativní na přítomnost motivů sekundární struktury.

Pro upřesnění modelu komplexu získaného z dat SAXS byl měřen PRE NMR experiment. Při tomto experimentu byla použita mutantní forma 14-3-3, 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ C189, obsahující pouze jeden cystein. Na tento cystein byla kovalentně navázána paramagnetická značka IPSL [3-(2-jodoacetoamido)-proxyl] (Sigma-Aldrich, USA). Takto připravený protein 14-3-3 byl smísen s ^{15}N -PdcQ52K-PP v minimálním molárním poměru 2:1. Následovalo měření ^1H - ^{15}N TROSY experimentů. Po 3,5 dnech měření byla ke vzorku přidána kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA) ve trojnásobném molárním přebytku oproti 14-3-3, vzorek byl jemně promíchán a odstředěn kvůli případným sraženinám. Vznikl tak diamagnetický vzorek, který byl měřen za stejných podmínek, jako v případě paramagnetického vzorku. Teoretické informace o použitých metodách lze získat v kapitole 9.4.

Měření a vyhodnocování dat bylo prováděno ve spolupráci s Mgr. Jiřím Nováčkem, Ph.D. z CEITEC MU v Brně.

4.6.1 Značení 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ C189 pomocí paramagnetické značky IPSL

IPSL [3-(2-jodoacetoamido)-proxyl] (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna v DMSO do finální koncentrace 277 mM. Roztok IPSL byl po kapkách za stálého míchání přidán k roztoku proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ C189 (190 μM) o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5),

100mM NaCl a 1mM EDTA, s dvaceti-molárním přebytkem IPSL oproti proteinu, a jemně promíchán. Výsledný roztok byl ponořen do vodní lázně o teplotě 30 °C na dobu 3 hodin a jemně míchán každých 10 minut. Uzavřená zkumavka s roztokem byla obalena hliníkovou fólií, aby nedocházelo k jakémukoli osvětlení vzorku, a roztok byl míchán při 120 ot. · min.⁻¹ přes noc za laboratorní teploty. Následovalo přemístění roztoku do 4 °C, bez míchání. Úplnost značení byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie (ESI-FT-ICR MS) ve spolupráci s RNDr. Petrem Manem, Ph.D. z BioCeV MBÚ AV ČR, v.v.i. a PřF UK.

4.7 Analytická ultracentrifugace (AUC)

Vzorky připravované pro zjištění stechiometrie komplexu a dále ke zjištění signifikance fosforylace obou fosforylačních míst Pdc (Ser54, Ser73) (měření sedimentační rychlosti) a ke zjištění disociační konstanty K_d komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C/PdcQ52K-PP (měření sedimentační rovnováhy) byly měřeny ve spolupráci s RNDr. Lenkou Řežábkovou Ph.D. na PřF UK, která i vyhodnocovala naměřená data. Měření bylo provedeno na ultracentrifuze ProteomeLabTM XL-I, Beckman Coulter (USA) vybavené rotorem AN50Ti. Naměřená data byla vyhodnocována v programech SEDPHIT a SEDPHAT [191, 192]. Hustota, viskozita a specifický objem proteinů byly určeny za použití programu SEDNTERP 1.09 (<http://www.jphilo.mailway.com>, květen 2016). Vzorky pro metodu sedimentační rovnováhy sestávaly ze směsi proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C s PdcQ52K-PP v molárním poměru 2:1 v koncentracích komplexu 3 – 15 μ M. Vzorky byly měřeny při teplotě 4 °C, v pufru obsahujícím 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 200mM NaCl a 2mM 2-merkptoethanol, s úhlovými rychlostmi rotoru 8000, 15000 a 26000 ot. · min.⁻¹. Absorbční data byla sbírána při 280 nm s průměrováním 20 scanů s prostorovým rozlišením 10 μ m až do dosažení rovnováhy ve všech případech. Data sbírána při různých úhlových rychlostech a různých koncentracích vzorků, byla globálně prokládána pomocí programu SEDPHAT [191, 192] s modelem reverzibilní reakce dimer 14-3-3 + PdcQ52K-PP \rightleftharpoons 14-3-3 $\zeta\Delta$ C:PdcQ52K-PP. Vzorky pro metodu sedimentační rychlosti sestávaly z 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, PdcQ52K-PP, jejich směsi v molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 a jedna molekula Pdc-PP) a dále 2:2 (dimer 14-3-3 a dvě molekuly Pdc-PP), dále ze směsi proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C s mutantní formou fosducinu PdcQ52K S73A-P, kde byl pomocí PKA fosforylován pouze Ser54, a s Pdc WT, kde byl pomocí PKA fosforylován pouze Ser73. Vzorky byly připraveny v koncentracích 3 – 60 μ M. Měření probíhalo při

20 °C s úhlovými rychlostmi rotoru 42000, nebo 48000 ot. · min⁻¹. Absorbční data byla sbírána při 280 a 250 nm. Scany byly nahrávány každých 5 minut s prostorovým rozlišením 30 μm. Data byla analyzována pomocí modelu distribucí sedimentačních koeficientů $c(s)$. Spojitá $c(s)$ distribuce zahrnovala hodnoty sedimentačních koeficientů v rozmezí 0 – 10 S s rozlišením 150 a úrovní jistoty 0,68 (F-poměr). Plochy pod jednotlivými křivkami byly integrovány pro získání vážených hodnot sedimentačních koeficientů s_w .

Vzorky připravované pro porovnání hydrodynamických vlastností PdcQ52K, Pdc-CD a Pdc-ND metodou sedimentační rychlosti, a vzorky připravované pro určení disociačních konstant případných komplexů proteinu 14-3-3ζΔC s PdcQ52K-PP, Pdc-ND-PP a Pdc-CD metodou sedimentační rychlosti, byly měřeny ve spolupráci s RNDr. Daliborem Koškem Ph.D. na PřF UK a CEITEC MU v Brně, který i vyhodnocoval naměřená data. Pro porovnání hydrodynamických vlastností PdcQ52K, Pdc-ND a Pdc-CD metodou sedimentační rychlosti a pro ověření monodisperzity vzorku při dané koncentraci, byly připraveny roztoky těchto proteinů o koncentracích ~ 50 μM, v pufru o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 200mM NaCl a 2mM 2-merkptoethanol. Vzorky byly měřeny při 20 °C a otáčkách rotoru 48000 ot. · min⁻¹. Data byla snímána absorpční technikou při 280 nm. Distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ byla získána a vypočítána z absorpčních dat za použití programu SEDFIT. Pro určení disociační konstanty případných proteinových komplexů (viz výše) byly připraveny vzorky obsahující vždy 14μM 14-3-3ζΔC a formy fosducinu (PdcQ52K-PP, Pdc-ND-PP a Pdc-CD) vždy o koncentracích v rozmezí 0,7 až 70μM tak, aby stechiometrické molární poměry odpovídaly hodnotám 14-3-3:fosducin = 20:1, 6:1, 2:1, 2:3 a 1:5. Data byla opět snímána absorpční technikou při 280 nm. Takto byly získány sedimentační koeficienty s_w komplexů, přesněji integrované hodnoty pod jednotlivými signály a byly váhově zprůměrovány. Dále byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci fosducinu $c_{fosducin}$ a získané isotermy byly prokládány modelem $A + B \rightleftharpoons AB$ pomocí programu SEDPHAT, kde byla vždy známa hodnota s_w jednotlivých samostatných komponent. Data byla prokládána na základě Langmuierova vazebného modelu, kde byl uvažován molární poměr 14-3-3:fosducin = 2:1. Výsledné parametry byly ověřovány a koncentrace byla korigována za použití modelování pomocí Lammovy rovnice obsažené v programu SEDPHAT. Teoretické informace o použitých metodách lze získat v kapitole 9.5.

4.8 Církulární dichroismus (CD)

Veškerá měření a vyhodnocování dat z CD byla prováděna ve spolupráci s RNDr. Pavlínou Ullrichovou, Ph.D. z VŠCHT v Praze, a RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. z FGÚ AV ČR, v.v.i. Pro měření CD v daleké oblasti UV byly připraveny vzorky PdcQ52K, Pdc-CD a Pdc-ND o koncentracích $\sim 10 \mu\text{M}$ v konečném objemu 300 μl . Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě s optickou délkou 1 mm (Starna, USA), při teplotě 22 °C v pufru o složení 20mM TRIS-HCl (pH 7,5), 200mM NaCl, 1mM EDTA a 2mM 2-merkapt ethanol, na spektropolarimetru J-810 (Jasco, Japonsko). Data byla sbírána v rozmezí vlnových délek 200 až 320 nm, při rychlosti scanování $10 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, s časovou odezvou 8 s a rozlišením 1 nm. Vlnový rozsah byl 1 nm a citlivost 100 milistupňů. Konečné spektrum bylo získáno zprůměrováním pěti akumulací. Spektra byla korigována odečtením dat naměřených v čistém pufru bez obsahu proteinů. Data byla finálně vynesena do grafu závislosti molární elipticity střední hodnoty residua $[\theta]$ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{res}^{-1}$) na vlnové délce λ .

Pro měření CD v blízké oblasti UV byly připraveny vzorky PdcQ52K, Pdc-CD a Pdc-ND o koncentracích 80 - 160 μM v konečném objemu 2 ml. Vzorky byly měřeny v kyvetě s optickou délkou 1 cm (Starna, USA) na stejném přístroji, ve stejném pufru a za stejných podmínek, jako v případě daleké oblasti UV, s tím rozdílem, že data byla sbírána v rozmezí vlnových délek 240 – 330 nm a výsledné spektrum je průměrem patnácti akumulací. Teoretické informace o použité metodě lze získat v kapitole 9.6.

4.9 Hmotnostní spektrometrie (MS)

4.9.1 Výměna H za D spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)

Veškerá měření HDX-MS a vyhodnocování dat bylo prováděno ve spolupráci s RNDr. Petrem Manem, Ph.D. a Mgr. Alanem Kádkem z BioCeV MBÚ AV ČR a PřF UK. Byly měřeny vzorky PdcQ52K, PdcQ52K-PP, 14-3-3 ζ ΔC a komplex 14-3-3 ζ ΔC:PdcQ52K-PP v molárním poměru 2:1. Finální koncentrace vzorků byla vždy 60 μM pro fosducin a 120 μM pro 14-3-3 ζ ΔC. Výměna vodíku za deuterium (HDX) byla zahájena ředěním ($5\times$) vzorku v deuterovaném pufru o složení 20mM TRIS-HCl (pD 7,5), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT a 10% glycerol. Po 40 s, 4 a 15 min., a 1, 3, a 8 hod. byly odebírány z deuterovaného roztoku proteinu vzorky o objemu 10 μl . HDX byla zastavena snížením pH roztoku na hodnotu 2,5 přidáním 57 μl 6mM HCl a následným

okamžitým zamrazením roztoku v kapalném dusíku. Vzorby byly poté postupně rozmrazeny a okamžitě injektovány na nemobilní kolonu obsahující proteasu pepsin. Na kolonu bylo injektováno vždy 180 pmol fosducinu a 360 pmol 14-3-3 ζ Δ C v celkovém objemu 20 μ l. Na koloně s obsahem pepsinu došlo k naštěpení proteinů na kratší peptidy. Kolona s obsahem pepsinu byla promývána 0,4% roztokem kyseliny mravenčí ve vodě při rychlosti promývání 100 μ l \cdot min⁻¹. Peptidy byly dále zachytávány a odsoleny v microtrap koloně (Optimize Technologies, Oregon City, OR) a eluovány do analytické chromatografické kolony (Jupiter C18, 0,5 \times 50 mm, 5 μ m, 300 Å, Phenomenex, Torrance, CA) a odděleny lineárním gradientem 10 – 25% roztoku B (95% acetonitril, 5% voda, 0,4% kyselina mravenčí) (Agilent 1200, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) po dobu 5 minut. Následoval rychlý výplach do 40% B. Veškeré kroky probíhaly při 0 °C. Vyeluované peptidy byly okamžitě převedeny do hmotnostního spektrometru pomocí ESI následující FT za použití 15T FT-ICR hmotnostního spektrometru (SolariX XR, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operujícího v MS/MS módu. Peptidy byly dále identifikovány pomocí programu MASCOT v databázi obsahující krysí formu fosducinu. Jedinou povolenou modifikací byla fosforylace Ser/Thr. Data byla dále analyzována pomocí programu DataAnalysis verze 4.1. Teoretické informace o použité metodě lze získat v kapitole 9.7.1.

4.9.2 Limitovaná proteolýza spojená s hmotnostní spektrometrií

Limitovaná proteolýza je metoda vhodná k ověřování přístupnosti jednotlivých oblastí proteinu vůči proteasám. Jedním z možných použití je nalezení stabilního konstruktu proteinu pro krystalografické studie [1], další možností je zkoumání kinetiky proteolýzy v přítomnosti a nepřítomnosti vazebného partnera, jako to bylo provedeno v tomto případě. V našem případě byla hlavní myšlenka směřována na možný fakt, že protein 14-3-3 by mohl zpomalovat proteolýzu fosforylovaného fosducinu Pdc-PP. Navrhli jsme proto experiment pro *in vitro* sledování kinetiky proteolýzy fosducinu s použitím hmotnostní spektrometrie. Tato technika neposkytuje kvantitativní informace ohledně proteolytických štěpů, ale může nastínit kinetiku *in vitro* optimalizovaného procesu v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3 ζ Δ C.

K proteolýze PdcQ52K-PP a komplexu 14-3-3 ζ Δ C/PdcQ52K-PP byly vybrány dvě proteasy: a) trypsin (prasečí Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega)

a *b*) chymotrypsin A (Sigma-Aldrich). Trypsin štěpí podle obecného schématu K/R- \-P, chymotrypsin Y/W/K/F- \-P.

Komplex byl připraven jako směs 30 μ M PdcQ52K-PP s 60 μ M 14-3-3 ζ Δ C a ekvilibrován po dobu 15 minut *a*) na ledu, *b*) při 25 °C. Aktivita trypsinu byla příliš vysoká, proto bylo nutno ji zpomalit nízkou teplotou. Limitovaná proteolýza byla provedena v molárních poměrech 1/18750 pro trypsin/14-3-3 ζ Δ C a 1/9375 pro trypsin/PdcQ52K-PP, oba na ledu, a 1/2335 pro chymotrypsin/14-3-3 ζ Δ C a 1/1167 pro chymotrypsin/PdcQ52K-PP, oba při 25 °C. Proteolýza byla zastavena povařením při 100 °C ve vodní lázni po dobu 3 minut, ochlazená v ledu po dobu 1,5 minuty a k takto připravené směsi byla přidána TFA ve finální koncentraci 0,03 % (w/w). Zastavení proteolýzy proběhlo po první, třetí a páté minutě proteolýzy. První vzorek, kde neprobíhala proteolýza (čas 0 min.) byl také povařen, ochlazen a smíchán s TFA. 50 pmol takto připravených vzorků bylo automatickým sběračem injektováno do chromatografické kolony Agilent LC 1200 (AgilentTechnologies, Waldbronn, Německo) spojené s 15T FT-ICR hmotnostním spektrometrem (Solarix XR, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Každý vzorek byl odsolen za použití kolony Peptide CapTrap (Optimize Technologies) a oddělen na koloně s obrácenou fází (0,2 \times 150 mm, PLRP-S, Michrom Bioresources) za použití lineárního gradientu 10 – 70% roztoku B v roztoku A po dobu 3 minut, kde roztok A byl 2% acetonitril, 0,2% kyselina mravenčí ve vodě, a roztok B byl 95% acetonitril, 5 % voda, 0,2% kyselina mravenčí. Vzorky byly měřeny za použití techniky ESI-LC-MS/MS. Peptidy byly identifikovány v databázi obsahující krysí fosducin za použití programů MASCOT (jedinou povolenou modifikací byla fosforylace Ser/Thr) a GPMaw 8.0 (Lighthouse data, Odense, Dánsko) a hmotnosti byly přiřazovány pomocí programu mMass [193]. Data byla analyzována pomocí programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonik, GmbH) a GPMaw 8.0 (Lighthouse data, Odense, Dánsko). Měření a analýza dat byla prováděna ve spolupráci s RNDr. Petrem Manem, Ph.D. z BioCeV MBÚ AV ČR a PřF UK.

4.9.3 Limitovaná defosforylace spojená s hmotnostní spektrometrií

Limitovaná defosforylace je metoda, při které je defosforylován fosforylovaný protein po určitou dobu pomocí enzymů fosfatasy a následně je defosforylace zastavena. Dá se tak např. zkoumat kinetika defosforylace v přítomnosti a nepřítomnosti vazebného partnera, jako to bylo v našem případě. Pro tento účel jsme se rozhodli limitovanou

defosforylaci spojit s hmotnostní spektrometrií (MS), kde lze kinetiku dobře sledovat na defosforylujících se peptidech štěpeného proteinu PdcQ52K-PP. Podobně jako v případě limitované proteolýzy nám šlo o důkaz zpomalení defosforylace PdcQ52K-PP v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ Δ C.

Pro limitovanou defosforylaci PdcQ52K-PP a komplexu 14-3-3 ζ Δ C/PdcQ52K-PP byly vybrány dvě fosfatasy: *a*) proteinfosfatasa 1 (PP1) (králičí katalytická podjednotka α -Isoforma, Sigma-Aldrich, USA, specifická aktivita 10326,98 U/mgP) a *b*) proteinfosfatasa 2A (PP2A) (Protein Phosphatase 2A C podjednotka – lidská rekombinantní forma L309 delece, Cayman, specifická aktivita 9,5 U/mg). Obě fosfatasy by se měly podílet na defosforylaci fosducinu v buňce [66, 72].

V případě defosforylace pomocí PP1 byly proteiny dialyzovány přes noc v pufru obsahujícím 50mM HEPES (pH 7,5), 2mM DTT, 1mM MnCl₂ a 0,01 % NP-40 (v/v) při 7 °C. V případě defosforylace pomocí PP2A byly proteiny dialyzovány přes noc v pufru obsahujícím 40mM TRIS-HCl (pH 8,4), 100mM NaCl, 2mM DTT a 34mM MgCl₂, při 7 °C. Komplex 14-3-3 ζ Δ C/PdcQ52K-PP byl připraven jako směs 30 μ M PdcQ52K-PP s 60 μ M 14-3-3 ζ Δ C a ekvilibrován po dobu 15 minut ve 25 °C. Limitovaná defosforylace byla provedena v molárních poměrech 1/1193 pro PP1/PdcQ52K-PP ve 30 °C a 1/36 pro PP2A/PdcQ52K-PP ve 37 °C. Defosforylace byla zastavena přidáním inhibitoru fosfatasy β -glycerolfosfátu (Sigma-Aldrich, USA) do finální koncentrace 100mM, dále přidáním glycinu (pH 2,3) do finální koncentrace 217,5 mM a zamražením v kapalném dusíku po 0,5; 1,5; 3 a 7 minutách defosforylace. Vzorek, který nebyl defosforylován (0 min.) byl také smíchán s inhibitorem, glycinem a zmražen v kapalném dusíku. 100 pmol defosforylovaného roztaveného kyselého vzorku bylo injektováno na chromatografickou kolonu obsahující buď proteasu pepsin, nebo rhizopuspepsin [194, 195]. Proteasy naštěpily protein na menší fragmenty – peptidy – které byly dále převedeny přes kolonu Peptide MicroTrap (Optimize Technologies, Oregon City, OR), odsoleny online a odděleny na koloně s obrácenou fází C18 reversed phase column (0,5 × 50 mm, Jupiter C18, Phenomenex, Torrance, CA) za použití lineárního gradientu 10 – 25% roztoku B v roztoku A po dobu 7 minut, kde roztok A byl 2% acetonitril, 0,4% kyselina mravenčí ve vodě, a roztok B byl 95% acetonitril, 5 % voda, 0,4% kyselina mravenčí (Agilent 1200, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Kolona byla spojena s ESI iontovým zdrojem 15T FT-ICR hmotnostního spektrometru (Solarix XR, Bruker Daltonics, Bremen, Německo) operujícího v MS/MS módu stejně jako v případě H/D výměny. Peptidy byly

identifikovány pomocí programu MASCOT obsahujícího sekvenci krysího fosducinu (jedinou povolenou modifikací byla fosforylace Ser/Thr) a GPMW 8.0 (Lighthouse data, Odense, Dánsko). Data byla analyzována pomocí programu Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonik, GmbH). Měření a analýza dat byla prováděna ve spolupráci s RNDr. Petrem Manem, Ph.D. z BioCeV MBÚ AV ČR a PřF UK.

4.10 Limitovaná proteolýza s použitím SDS-PAGE

Pro ověření kinetiky proteolýzy PdcQ52K-PP v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3 ζ Δ C byla kromě hmotnostní spektrometrie použita i vizuální technika na polyakrylamidovém gelu (PAGE) obarveném pomocí Coomassie Brilliant Blue R250, v redukčních podmínkách v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Jedná se o klasický postup přípravy a barvení gelů, který je běžně používán pro vizualizaci čistoty proteinů po purifikaci (viz [1]).

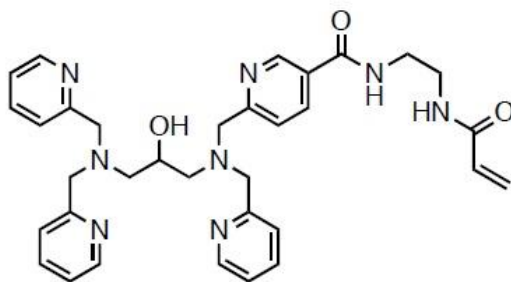
Vzorky byly připraveny stejně a za stejných podmínek, jako při limitované proteolýze spojené s MS (viz kapitola 4.9.2). Výjimkou byl přídavek 5 \times SDS barvicího pufru před varem vzorku [1]. Vzorky byly aplikovány na 15 % SDS gel. Elektroforéza byla ponechána po dobu 2 hodin při 120 V. Gely byly barveny pomocí roztoku obsahujícího Coomassie Brilliant Blue R250 [1] po dobu 2 hodin a odbarvovány přes noc.

4.11 Limitovaná defosforylace s použitím SDS-Phos-tag-PAGE

Pro ověření kinetiky defosforylace PdcQ52K-PP v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3 ζ Δ C byla kromě hmotnostní spektrometrie použita i vizualizační technika na polyakrylamidovém gelu (PAGE) obsahujícím molekulu Phos-tagTM (Phos-tagTM PAGE Guide Book, http://www.phos-tag.com/shouh/pt_page_e_ver8.pdf, 8. 6. 2016, Japonsko). Phos-tagTM je aromatická organická molekula (viz *Obr. 4.1*, str. 53) schopná vázat Mn²⁺ kationty, které zajistí imobilizaci fosforylovaných proteinů v určité výšce PAGE gelu. Podle množství fosfátů obsažených v proteinu jsou pak proteiny zachytávány s větší (více fosfátů), nebo menší (méně fosfátů) afinitou. Poloha proteinového pruhu se dále liší podle hydrodynamických vlastností konkrétního proteinu, nebo jeho mutantní formy.

V případě použití SDS-Phos-tagTM elektroforézy byly proteiny a komplexy smíchány ve stejném molárním poměru, jako v případě použití hmotnostní spektrometrie (viz kapitola 4.9.3), za stejných podmínek, kromě způsobu zastavení defosforylace, která zde

probíhala přidavkem inhibitoru β -glycerolfosfátu (Sigma-Aldrich, USA) do finální koncentrace 100mM, dále přidáním 5 \times SDS barvicího pufru [1] a následným varem po dobu 3 minut ve vodní lázni o 100 °C. Pro detekci stupně defosforylace PdcQ52K byly připraveny 10 % SDS-Phos-tag gely s obsahem 50 μ M Phos-TaguTM za využití standardního protokolu (viz výše). Elektroforéza byla ponechána 2 hodiny při 120 V. Gely byly barveny pomocí roztoku obsahujícího Coomassie Brilliant Blue R250 [1] po dobu 2 hodin a odbarvovány přes noc.



Obr. 4.1 Zobrazení molekuly Phos-tagTM umožňující vazbu Mn²⁺ iontů a následnou imobilizaci fosforylovaného proteinu, nebo peptidu. Pro více informací lze využít Phos-tagTM PAGE Guide Book, http://www.phos-tag.com/shouh/pt_page_e_ver8.pdf, 8. 6. 2016.

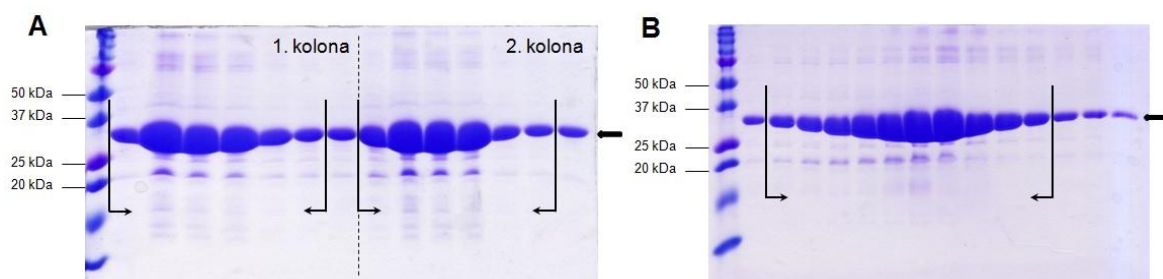
5 Výsledky

5.1 Exprese a purifikace proteinů

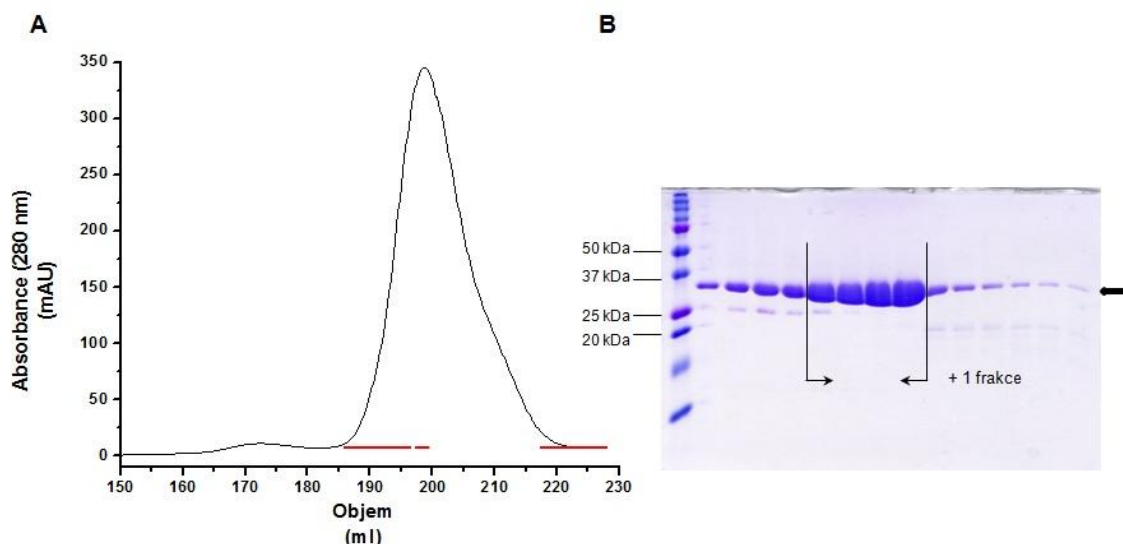
Veškeré studované proteiny byly exprimovány a purifikovány podle protokolů, které jsou detailně popsány v mé diplomové práci [1] a bylo dosaženo obdobných výtěžků a konečné čistoty. V tomto oddíle jsou pro ilustraci ukázány pouze výsledky dílčích kroků purifikace vybraných proteinů ^{15}N -PdcQ52K, 14-3-3 ζ Δ C C189, Pdc-ND a $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Pdc-CD. Ostatní formy byly získány vždy s velmi podobnou čistotou.

5.1.1 Purifikace proteinu ^{15}N -PdcQ52K

Při této konkrétní purifikaci bylo z $8 \times 0,9$ l minimálního média získáno celkem 37,6 mg ^{15}N izotopově značeného PdcQ52K ($M_w = 30,3$ kDa). Čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii je zobrazena na *Obr. 5.1A*, čistota proteinu po aniontové iontově-výměnné chromatografii je zobrazena na *Obr. 5.1B*. Na SDS-PAGE gelu (*Obr. 5.2B*, str. 55) jsou pouze vybrané frakce pro ověření finální čistoty. Černé svislé čáry s šípkami na gelu naznačují, které frakce byly smíseny pro další experimenty.



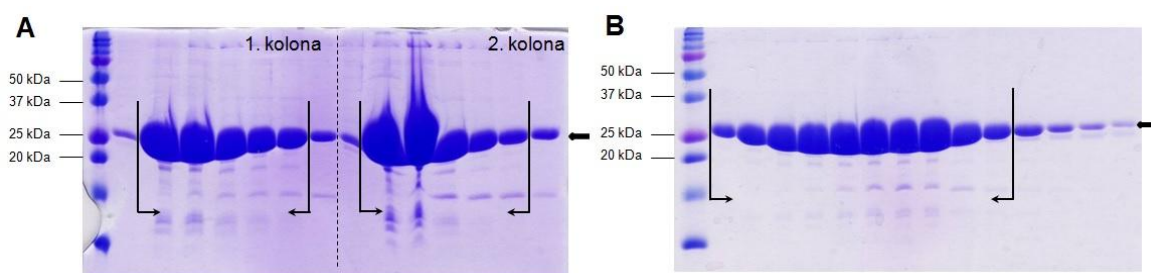
Obr. 5.1 (A) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi ^{15}N -PdcQ52K eluovanými při niklové chelatační chromatografii (dvě opakování). (B) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi ^{15}N -PdcQ52K eluovanými při aniontové iontově-výměnné chromatografii. Vybrané frakce označené černými svislými čarami a šípkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.



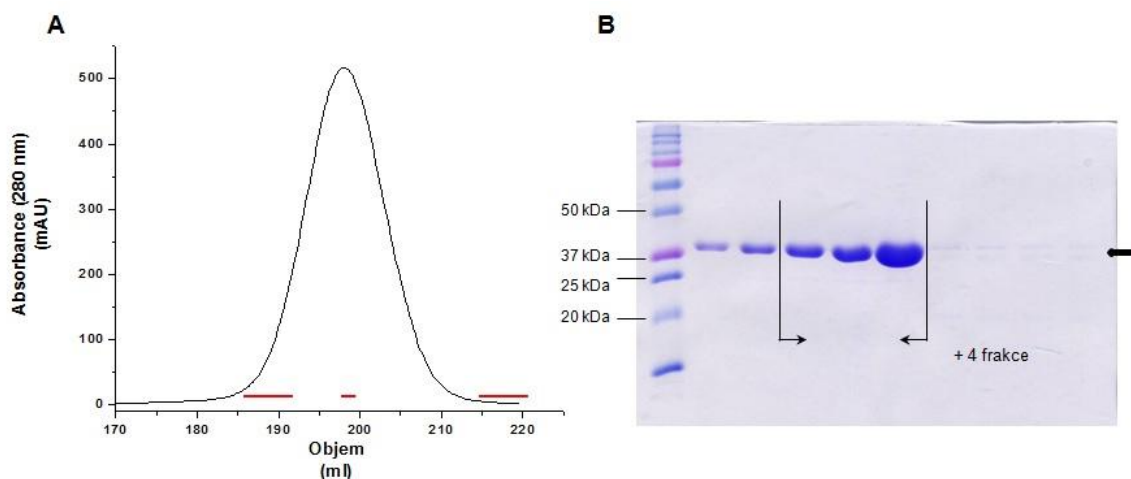
Obr. 5.2 (A) Chromatogram získaný po posledním purifikačním kroku (gelová permeační chromatografie) proteinu ^{15}N -PdcQ52K. Vybrané frakce (červené čáry) byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE (B). Frakce označené černými svislými čarami a šípkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.

5.1.2 Purifikace proteinu 14-3-3 Δ C C189

Při této konkrétní purifikaci bylo z $6 \times 0,9$ l LB média získáno celkem 30,7 mg mutantní formy proteinu 14-3-3 Δ C obsahující pouze jeden cystein C189 ($M_w = 28,5$ kDa). Čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii je zobrazena na Obr. 5.3A, čistota proteinu po aniontové iontově-výměnné chromatografii je zobrazena na Obr. 5.3B. Na gelu (Obr. 5.4B, str. 56) jsou pouze vybrané frakce pro ověření čistoty. Černé svislé čáry se šípkami na gelu naznačují, které frakce byly smíseny pro další experimenty.



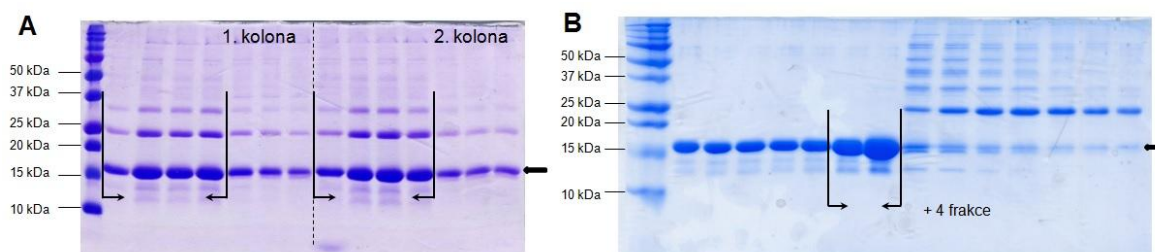
Obr. 5.3 (A) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi 14-3-3 Δ C eluovanými při niklové chelatační chromatografii (dvě opakování). (B) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi 14-3-3 Δ C eluovanými při aniontové iontově-výměnné chromatografii. Vybrané frakce naznačené černými svislými čarami a šípkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.



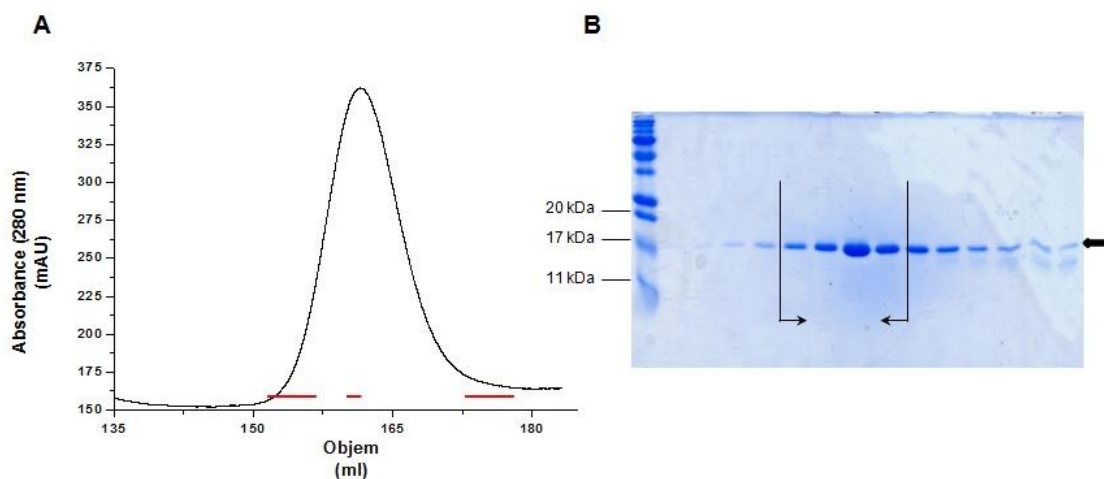
Obr. 5.4 (A) Chromatogram získaný po posledním purifikačním kroku (gelová permeační chromatografie) proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Vybrané frakce (červené čáry) byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE (B). Frakce označené černými svislými čarami a šípkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.

5.1.3 Purifikace proteinu Pdc-ND

Pdc-ND zahrnuje pouze N-terminální doménu Pdc (sekvence M1 – F107). Při této konkrétní purifikaci bylo z $6 \times 0,9$ l LB média získáno celkem 3,1 mg Pdc-ND ($M_w = 14,8$ kDa). Čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii je zobrazena na *Obr. 5.5A*, čistota proteinu po aniontové iontově-výměnné chromatografii je zobrazena na *Obr. 5.5B*. Na gelu (*Obr. 5.6B*, str. 57) jsou pouze vybrané frakce pro ověření čistoty. Černé svislé čáry se šípkami na gelu naznačují, které frakce byly smísены pro další experimenty.



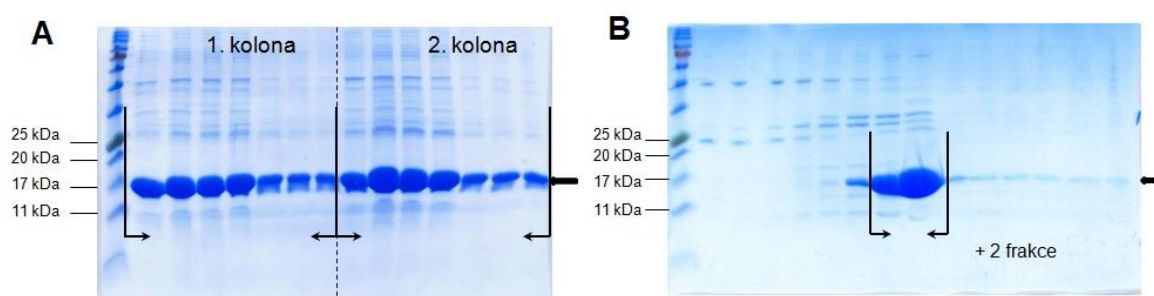
Obr. 5.5 (A) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi Pdc-ND eluovanými při niklové chelatační chromatografii (dvě opakování). (B) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi Pdc-ND eluovanými při aniontové iontově-výměnné chromatografii. Vybrané frakce naznačené černými svislými čarami a šípkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.



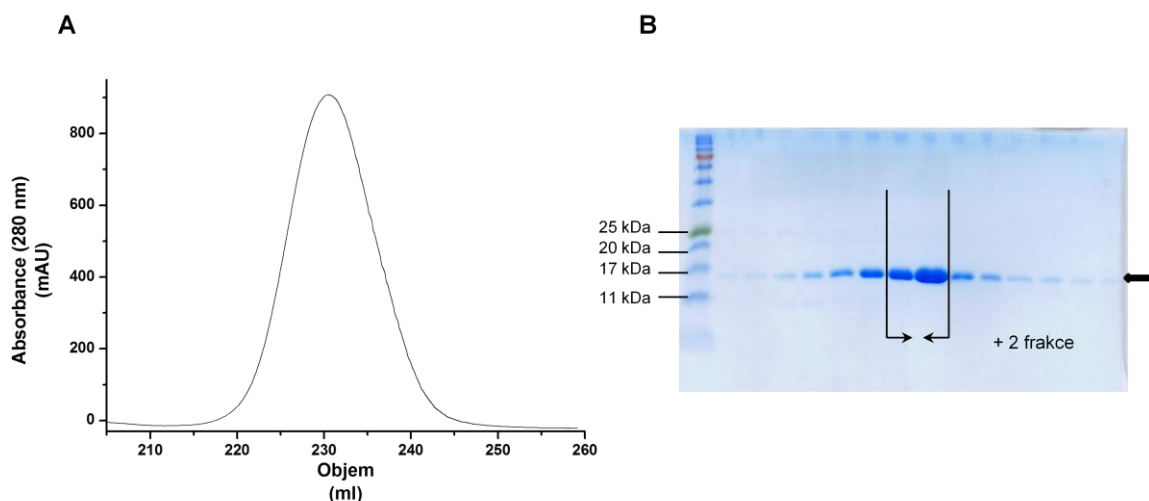
Obr. 5.6 (A) Chromatogram získaný po posledním purifikačním kroku (gelová permeační chromatografie) proteinu Pdc-ND. Vybrané frakce (červené čáry) byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE (B). Frakce označené černými svislými čarami a šipkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností. Při této purifikaci byla použita kolona HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade a chromatografický systém Watrex.

5.1.4 Purifikace proteinu ^{13}C , ^{15}N -Pdc-CD

Pdc-CD obsahuje pouze C-terminální doménu Pdc (sekvence R110 – E246). Při této konkrétní purifikaci bylo ze $3 \times 0,9$ l minimálního média získáno celkem 20,2 mg izotopově značeného ^{13}C , ^{15}N -Pdc-CD ($M_w = 17,6$ kDa). Čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii je zobrazena na Obr. 5.7A, čistota proteinu po aniontové iontově-výměnné chromatografii je zobrazena na Obr. 5.7B. Na gelu (Obr. 5.8B, str. 58) jsou pouze vybrané frakce pro ověření čistoty. Černé svislé čáry se šipkami na gelu naznačují, které frakce byly smíseny pro další experimenty.



Obr. 5.7 (A) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi ^{13}C , ^{15}N -Pdc-CD eluovanými při niklové chelatační chromatografii (dvě opakování). (B) 15% SDS-PAGE gel s frakcemi ^{13}C , ^{15}N -Pdc-CD eluovanými při aniontové iontově-výměnné chromatografii. Vybrané frakce naznačené černými svislými čarami a šipkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.



Obr. 5.8 (A) Chromatogram získaný po posledním purifikačním kroku (gelová permeační chromatografie) proteinu $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Pdc-CD. Vybrané frakce (červené čáry) byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE (B). Frakce označené černými svislými čarami a šipkami byly sloučeny. Černá tlustá šipka ukazuje pozici, na které se protein nachází. První sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.

Ve své diplomové práci také popisují detailní postup fosforylace fosducinu pomocí katalytické podjednotky PKA. Stejným způsobem jsem postupovala i v případě fosforylace Pdc-ND.

5.2 Biofyzikální a strukturní charakterizace fosducinu (Pdc)

Krystalová struktura komplexu Pdc s $\text{G}\beta\gamma$ ukázala, že molekula Pdc obsahuje dvě domény: N-terminální (Pdc-ND, sekvence 1-107) a C-terminální (Pdc-CD, sekvence 114-246) domény [2, 77]. Tyto strukturní studie naznačily, že Pdc-ND je velmi flexibilní a ve volném stavu by mohla být neuspořádaná, tedy chovat se jako IDP. Pro ověření této hypotézy jsme provedli biofyzikální a strukturní charakterizaci obou domén pomocí řady biofyzikálních metod.

5.2.1 Charakterizace Pdc pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)

Pomocí DLS, měřeného při rozptylovém úhlu 90° , se podařilo zjistit hydrodynamický poloměr R_H jak PdcQ52K, tak jeho obou domén. V *Tabulce 5.1* na str. 59 jsou ukázány výsledky měření.

Tabulka 5.1 Výsledky z měření fosducinu metodou DLS

	PdcQ52K	Pdc-ND	Pdc-CD
Počet residuí ^a	265	126	156
M_w^b (g · mol ⁻¹)	30161,4	14643,2	17414,2
R_H (Å)	38,4 ± 0,5	35,4 ± 0,4	26,0 ± 0,1

^aPočet residuí odpovídá proteinu spolu s 6×His kotvou bez prvního methioninu.

^bMolekulová hmotnost M_w vypočtená na základě aminokyselinové sekvence s obsahem 6×His kotvy.

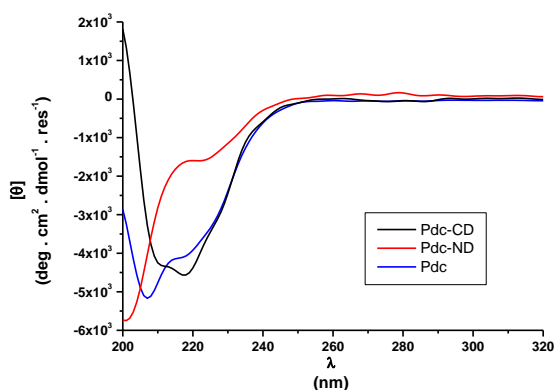
Jak lze vidět z *Tabulky 5.1*, ačkoli má Pdc-ND méně než polovinu aminokyselin (126 včetně 6×His kotvy) ve srovnání s celou molekulou fosducinu (265 včetně 6×His kotvy), vykazuje tato doména téměř stejně velký hydrodynamický poloměr R_H , jako celá molekula PdcQ52K. Naproti tomu hodnota R_H Pdc-CD je 26 Å při podobném množství aminokyselinových zbytků (156 včetně 6×His kotvy), jako v případě Pdc-ND, což vypovídá o mnohem kompaktnější struktuře Pdc-CD, ve srovnání s Pdc-ND. Tento výsledek naznačuje, že hodnota R_H celého Pdc je z hlavní části ovlivněna rozvolněností Pdc-ND, která vykazuje velký R_H . Bioinformatická analýza sekvence Pdc dále ukázala, že posledních 21 aminokyselin v Pdc-CD by také mohlo vytvářet neuspořádanou strukturu [80]. Výsledky DLS měření tedy naznačují, že Pdc-ND je tzv. vnitřně neuspořádaný protein (IDP, z angl. *Intrinsically Disordered Protein*) nevykazující známky sekundární struktury a uspořádanosti. V těchto měřeních byly použity mutantní formy Pdc, tedy PdcQ52K a stejná mutace v případě Pdc-ND.

5.2.2 Charakterizace Pdc pomocí cirkulárního dichroismu (CD)

Výsledky z DLS naznačily, že Pdc-ND jeví v roztoku známky značné rozvolněnosti, což by mohlo být spojeno s absencí prvků sekundární a terciární struktury [2, 79]. Tuto domněnku jsme se rozhodli ověřit pomocí metody cirkulárního dichroismu (CD) a to jak v daleké ultrafialové (UV) oblasti, díky které lze získat informace o sekundární struktuře proteinu, tak v blízké oblasti UV, která vypovídá o terciární struktuře (viz kapitola 9.6).

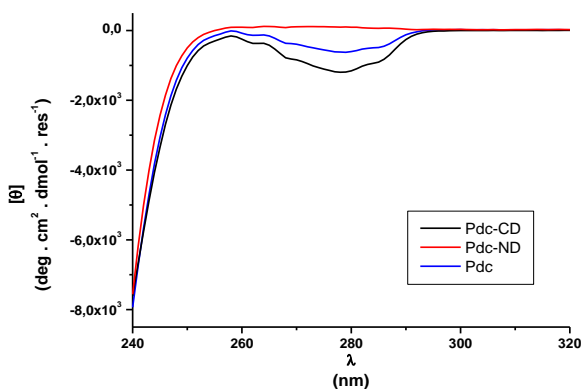
Na *Obr. 5.9*, str. 60 jsou zobrazeny výsledky z měření vzorků v daleké oblasti UV. Jednalo se opět o vzorky obsahující celou molekulu PdcQ52K (modrá křivka), Pdc-CD (černá křivka) a Pdc-ND (červená křivka). Z grafu závislosti molární elipticity střední hodnoty residua $[\theta]$ na vlnové délce λ je patrné, že Pdc-CD vykazuje známky proteinu s dobře definovanou sekundární strukturou. Naopak záporná molární elipticita u 200 nm a celkový tvar červené křivky u Pdc-ND vypovídá o proteinu bez výrazného obsahu prvků

sekundární struktury. U celé molekuly fosducinu pak byla naměřena křivka, která vykazuje známky částečně uspořádaného proteinu.



Obr. 5.9 Spektra cirkulárního dichroismu v daleké oblasti UV. Jedná se o závislost molární elipticity střední hodnoty residua $[\theta]$ na vlnové délce λ . Z křivek je patrné, že N-terminální doména fosducinu (Pdc-ND, aminokyseliny 1 - 107 s N-terminální 6×His kotvou, červená křivka) nevykazuje prvky sekundární struktury, naopak C-terminální doména fosducinu (Pdc-CD, aminokyseliny 110 - 246 s N-terminální 6×His kotvou, černá křivka) takovéto prvky vykazuje. Celá molekula PdcQ52K s N-terminální 6×His kotvou (modrá křivka) vykazuje prvky částečně uspořádaného proteinu.

Na Obr. 5.10 jsou zobrazeny výsledky z měření stejných vzorků v blízké oblasti UV. Pdc-ND vykazuje nevýrazné spektrum, což nasvědčuje faktu, že aromatické postranní řetězce Pdc-ND nemají dobře definovanou konformaci. Opačný efekt je pozorován u Pdc-CD. Celá molekula Pdc opět vykazuje spektrum s oběma prvky.



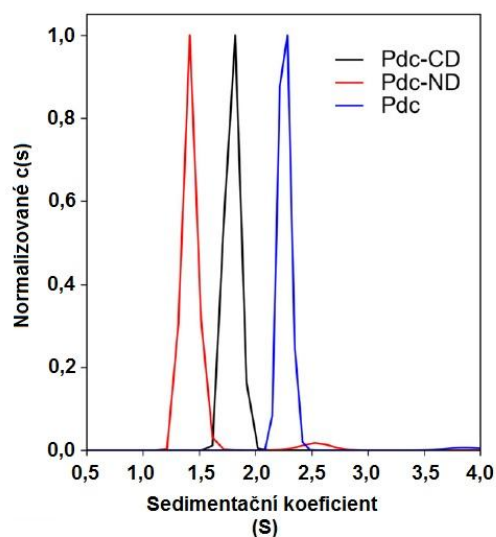
Obr. 5.10 Spektra cirkulárního dichroismu v blízké oblasti UV. Jedná se o závislost molární elipticity střední hodnoty residua $[\theta]$ na vlnové délce λ . Z křivek je patrné, že N-terminální doména fosducinu (Pdc-ND, aminokyseliny 1 - 107 s N-terminální 6×His kotvou, červená křivka) nevykazuje prvky terciární struktury, naopak C-terminální doména fosducinu (Pdc-CD, aminokyseliny 110 - 246 s N-terminální 6×His kotvou, černá křivka) takovéto prvky vykazuje. Výsledky změřené na celé molekule Pdc s N-terminální 6×His kotvou (modrá křivka) se nachází mezi výsledky z obou domén.

Získaná CD spektra tedy potvrdila, že Pdc-ND vykazuje vlastnosti IDP, zatímco Pdc-CD je strukturovaná doména. V těchto měřeních byly použity mutantní formy Pdc, tedy PdcQ52K a stejná mutace v případě Pdc-ND.

5.2.3 Charakterizace Pdc pomocí analytické ultracentrifugace (AUC)

Z výsledků DLS je patrné, že ve srovnání s celou molekulou Pdc vykazuje Pdc-ND velký hydrodynamický poloměr R_H . Bylo tedy na místě ověřit, zda při přibližně stejné koncentraci tvoří Pdc-ND dimerní, či oligomerní struktury, které by také vysvětlovaly takto vysoké hodnoty R_H . Za tímto účelem jsme zvolili metodu analytické ultracentrifugace (AUC), konkrétně metodu sedimentační rychlosti, která ověřila, že PdcQ52K, Pdc-ND i Pdc-CD tvoří při daných koncentracích v pufru o stejném složení pouze monomerní formy. Výsledky z měření jsou zobrazeny na *Obr. 5.11* a jsou korigovány na 20 °C a hustotu vody.

Obr. 5.11 Normalizované spojité distribuce sedimentačního koeficientu získané metodou sedimentační rychlosti proteinů Pdc, Pdc-ND a Pdc-CD o koncentracích $\sim 40\mu\text{M}$. Pdc-ND vykazuje nejnižší sedimentační koeficient, díky rozvolněné struktuře v roztoku. Pdc-CD vykazuje vyšší sedimentační koeficient, než Pdc-ND, díky kompaktnější struktuře, vykazující nižší tření. Nejvyšší sedimentační koeficient vykazuje Pdc, který, ač má také polovinu molekuly rozvolněnou, má nejvyšší molekulovou hmotnost.



Z *Obr. 5.11* je také patrné, že sedimentační koeficient Pdc-ND je nižší ($\sim 1,5$ S), než Pdc-CD (1,8 S). Jelikož pohyb částic při ultracentrifugaci závisí na jejich hydrodynamických vlastnostech, tento výsledek může vypovídat o rozvolněnější struktuře Pdc-ND, ve srovnání s Pdc-CD. Celá molekula Pdc pak vykazuje nejvyšší hodnotu sedimentačního koeficientu (2,4 S), což je dáno jeho téměř dvojnásobnou molekulovou hmotností. Těmito hodnotám sedimentačních koeficientů odpovídají hodnoty molekulových hmotností, které jsou zobrazeny v *Tabulce 5.2* na str. 62. Z tabulky je patrné, že všechny vzorky jsou v roztoku monomerní.

Tabulka 5.2 Výsledky získané metodou AUC, sedimentační rychlosti

	Pdc	Pdc-ND	Pdc-CD
Počet residuí ^a	265	126	156
M_w^b (g · mol ⁻¹)	30161,4	14643,2	17414,2
M_w^{AUC} (kDa)	31,8	14,4	18,7
Sedimentační koeficient (S)	2,4	1,5	1,8

^aPočet aminokyselinových zbytků odpovídá proteinu spolu s 6×His kotvou bez prvního methioninu.

^bMolekulová hmotnost M_w vypočtená na základě aminokyselinové sekvence.

M_w^{AUC} je molekulová hmotnost sférické částice odpovídající danému sedimentačnímu koeficientu.

V těchto měřeních byly použity mutantní formy Pdc, tedy PdcQ52K a stejná mutace v případě Pdc-ND.

5.2.4 Měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ANS

ANS (8-anilinaftalen-1-sulfonová kyselina) je hydrofobní fluorescenční značka, která je schopná se vázat do hydrofobních oblastí sbalených a částečně sbalených proteinů. V našem případě sloužila k ověření, že Pdc-ND je vnitřně neuspořádaný protein (IDP) a naopak Pdc-CD je sbalený protein s prvky sekundární a terciární struktury. Bylo provedeno měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ANS. Touto technikou je možné získat hodnotu střední doby života excitovaného stavu fluoroforu τ_{mean} , která může sloužit jako ukazatel polarizace nejbližšího okolí fluoroforu, v našem případě ANS. Výsledky měření jsou zobrazeny v Tabulce 5.3.

Tabulka 5.3 Výsledky z měření vzorků metodou časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence ANS.

	Pdc	Pdc-ND	Pdc-CD
$\tau_{mean}(ANS)^{a,b}$ (ns)	7,4	3,7	5,7

^aSměrodatná odchylka = 0,05 ns

^b τ_{mean} byl vypočítán dle rovnice 9.10 na str. 222.

Z Tabulky 5.3 je patrné, že střední doba života excitovaného stavu Pdc-ND je mnohem nižší, než střední doba života Pdc-CD (3,7 ns vs 5,7 ns), z čehož vyplývá, že Pdc-ND tvoří více rozvolněnou strukturu, než Pdc-CD a také Pdc, a obsahuje také méně hydrofobních oblastí, do kterých se může ANS navázat. Více polární okolí totiž zapříčinilo zkrácení doby života excitovaného stavu ANS u Pdc-ND. Z tabulky je také patrné, že střední doba života celého Pdc je delší, než obou samotných domén. To může nasvědčovat tomu, že obě domény mezi sebou interagují a tím vytvářejí oblasti, které nejsou natolik

přístupné okolnímu roztoku. V těchto měřeních byly použity mutantní formy Pdc, tedy PdcQ52K a stejná mutace v případě Pdc-ND.

5.2.5 Charakterizace Pdc pomocí malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS)

Dalším logickým krokem k objasnění struktury volného Pdc bylo určení jeho prostorové struktury. Jelikož se ukázalo, že Pdc-ND má vlastnosti IDP, nemělo smysl takovýto protein krystalovat. Rozhodli jsme se pro určení struktury proteinu s nízkým rozlišením za použití metody SAXS (viz kapitola 9.3), který umožňuje strukturní charakterizaci i velmi flexibilních proteinů.

Guinierův výnos (viz *Obr. 5.12A* – vložený obrázek, str. 65) poukazuje svou linearitou na monodisperzitu všech měřených vzorků. Guinierův výnos je lineární v oblasti, pro kterou platí $s \cdot R_g < 1,3$, kde s je rozptylový vektor a R_g je gyrační poloměr částice. Gyrační poloměr částice byl vypočten ze směrnice Guinierova výnosu a vychází 36,5 – 37,0 Å pro tři vzorky o různých koncentracích (viz *Tabulka 5.4*, str. 64), což nasvědčuje tomu, že částice Pdc má protáhlý tvar.

Z rozptylových dat byla pomocí programu GNOM [180] vypočtena párová distribuční funkce vzdáleností r dvou pozic v rámci molekuly $p(r)$, která je zobrazena na *Obr. 5.12B*, str. 65. Tato křivka vykazuje maximum u 27 Å a maximální vzdálenost v rámci molekuly $D_{max} = 120 - 129$ Å (viz *Tabulka 5.4*, str. 64). Vysoká hodnota D_{max} naznačuje, že molekula Pdc v roztoku vykazuje velmi rozvolněnou strukturu, která je s největší pravděpodobností dána rozvolněnou strukturou Pdc-ND a C-konce Pdc-CD.

Z intenzity rozptylu, měřené při nulovém úhlu $I(0)$, byla vypočtena teoretická molekulová hmotnost Pdc v jednotlivých vzorcích $M_{w,exp}$ (viz *Tabulka 5.4*, str. 64), kde index „exp“ odkazuje na hodnotu získanou experimentem. Tato hodnota velmi dobře koreluje s teoretickou molekulovou hmotností PdcQ52K vypočtenou z aminokyselinové sekvence PdcQ52K (30,16 kDa).

Tabulka 5.4 Strukturální parametry fosducinu získané z měření metodou SAXS

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
c (mg · ml⁻¹)	4,2	3,4	2,3
R_g^a (Å)	36,6 ± 0,3	37,0 ± 0,3	36,5 ± 0,4
R_g^b (Å)	37,2 ± 0,3	37,9 ± 0,2	36,2 ± 0,3
D_{max} (Å)	127	129	120
M_{w,exp}^c (kDa)	33 ± 1	34 ± 1	33 ± 1

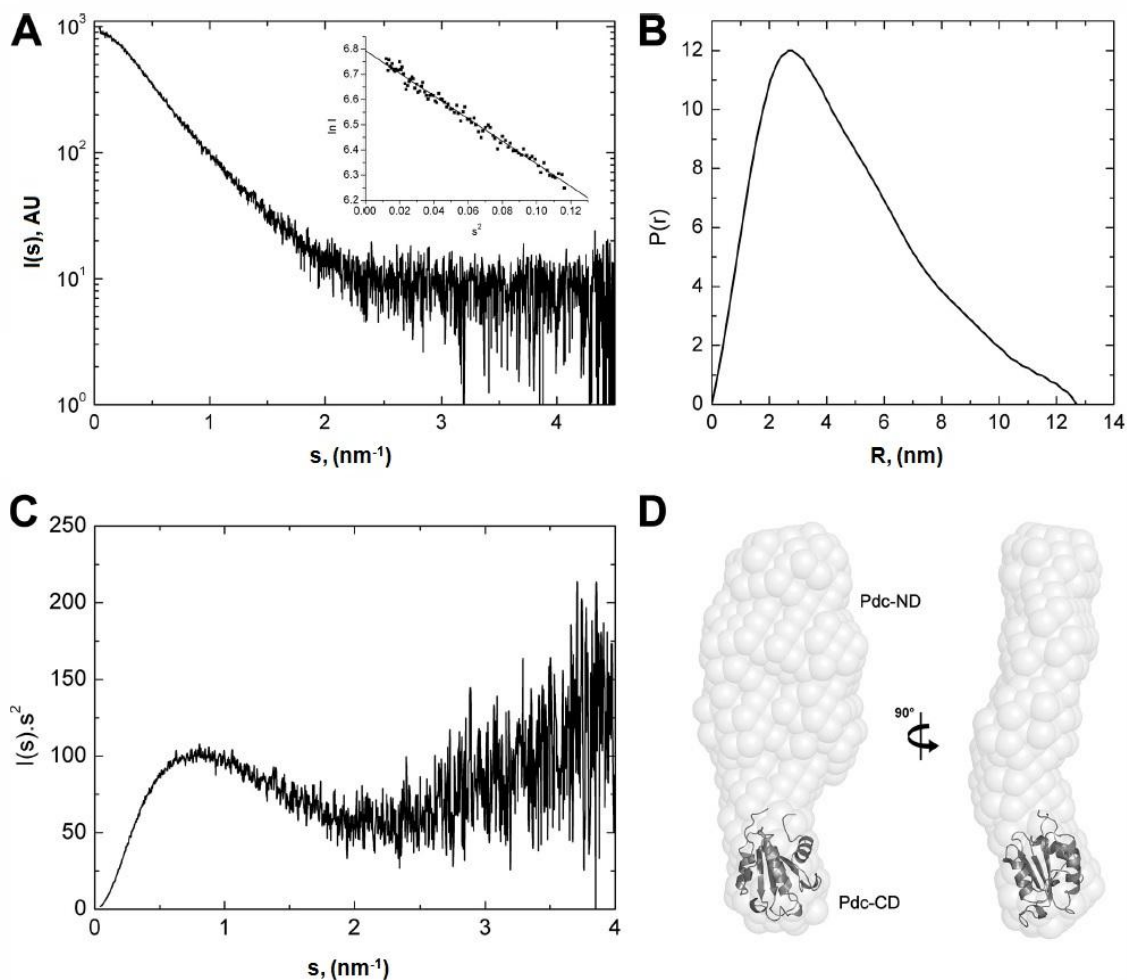
^aGyrační poloměr získaný výpočtem za použití Guinierovy aproximace [196].

^bGyrační poloměr získaný výpočtem za použití programu GNOM [180].

^cMolekulová hmotnost byla stanovena porovnáním intenzity rozptylu při nulovém úhlu $I(0)$ vzorku s referenčním roztokem obsahujícím hovězí sérový albumin.

Pomocí Kratkyho výnosu ($s^2I(s)$ vs s), který odráží stupeň kompaktnosti částice, byla odhadnuta celková flexibilita molekuly Pdc. Kratkyho výnos (viz *Obr. 5.12C*, str. 65) vykazuje známky částečně uspořádaného proteinu, což se projevuje nízkým vrcholem u malých hodnot s a následným pozvolným nárůstem $s^2I(s)$ u vyšších hodnot s .

K modelování struktury Pdc na základě získaných SAXS dat bylo využito dvou přístupů. Prvním z nich bylo tzv. *ab initio* modelování, které umožňuje získat tvar povrchu molekuly s nízkým rozlišením (tzv. molekulovou obálku). Finální tvar povrchu molekuly byl získán zprůměrováním deseti samostatných rekonstrukcí a nasvědčuje tomu, že molekula Pdc tvoří protáhlý, tyčinkovitý útvar, kde jeden z jeho konců je širší a pravděpodobně se jedná o Pdc-ND, a druhý konec je užší a pravděpodobně přísluší Pdc-CD, čemuž odpovídá i jeho velikost. Výsledný obrázek tvaru povrchu molekuly Pdc je zobrazen na *Obr. 5.12D*, str. 65.

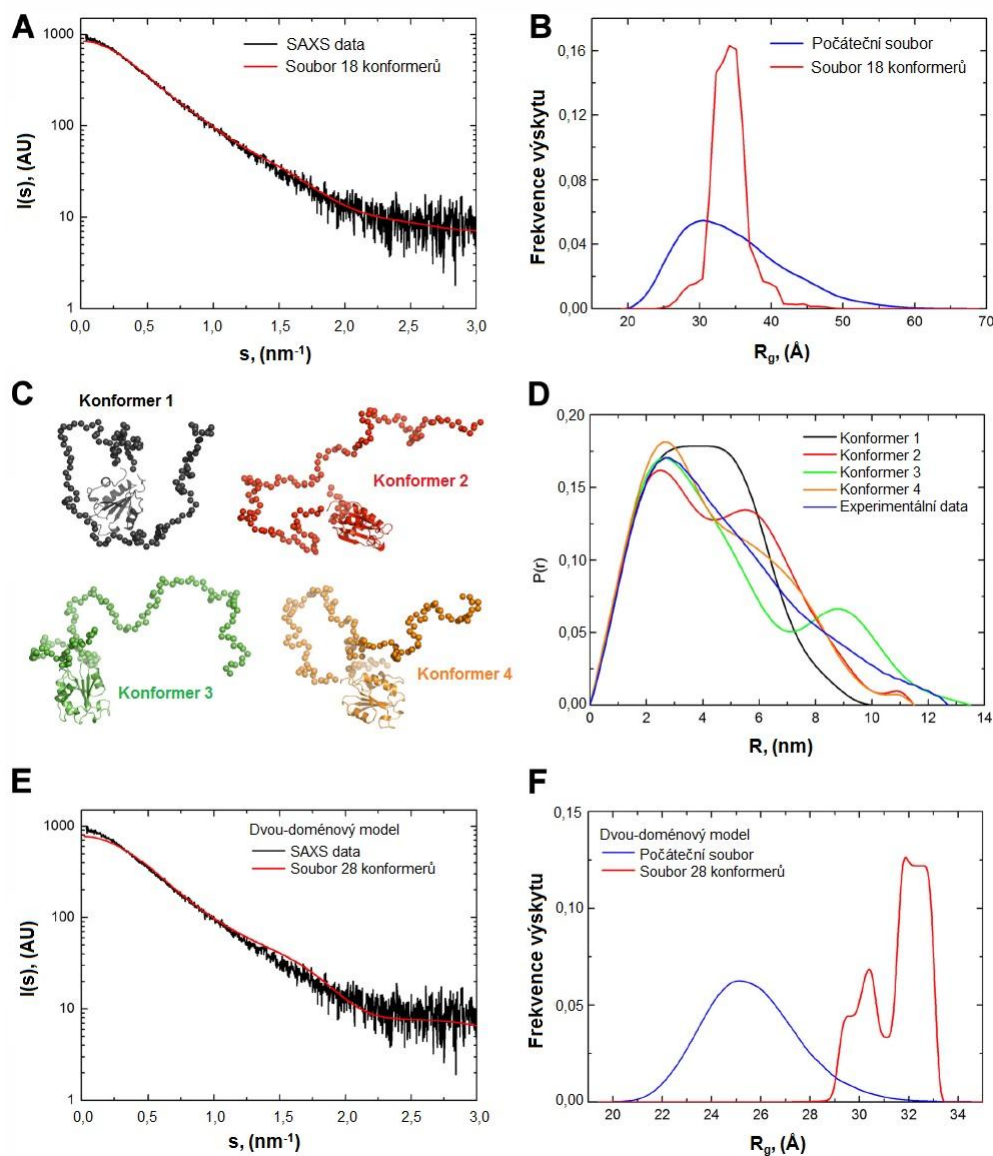


Obr. 5.12 Strukturní charakterizace Pdc pomocí metody SAXS. (A) Obrázek zobrazuje rozptylovou křivku získanou měřením vzorku o koncentraci $4,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Rozptylová křivka je zobrazena jako závislost rozptylové intenzity $I(s)$ na rozptylovém vektoru s . Vložený obrázek zobrazuje linearitu Guinierova výnosu, jako závislosti $\ln I = f(s^2)$. Linearita vypovídá o monodisperzitě vzorku. (B) Na grafu je vynesena párová distribuční funkce vzdáleností r dvou pozic $P(r)$ v rámci molekuly u vzorku o koncentraci $4,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Jedná se o závislost $P(r)$ na vzdálenosti pozic R . Jak je patrné z grafu, nejvíce zastoupeny jsou v rámci molekuly vzdálenosti o hodnotě 2,7 nm, maximální prostorová vzdálenost v rámci molekuly D_{max} odpovídá vysoké hodnotě 12,9 nm. (C) Graf zobrazuje Kratkyho výnos závislosti $I(s) \cdot s^2 = f(s)$. Maximum okolo 0,75 nm^{-1} a následný nárůst u vyšších hodnot s nasvědčuje duálnímu charakteru molekuly, která je částečně uspořádaná. (D) Zprůměrovaná a filtrovaná obálka molekuly Pdc získaná programem DAMMIN [181]. Užší spodní část svou velikostí odpovídá Pdc-CD, širší část tedy představuje obálku rozvolněné struktury Pdc-ND.

Druhý přístup modelování struktury Pdc využíval metodu EOM (viz kapitola 9.3). U tohoto přístupu byla Pdc-CD (residua 106 – 230) zafixována jako nehybná doména, a Pdc-ND (residua 1 – 105) byla ponechána jako flexibilní oblast, spolu s posledními šestnácti aminokyselinami v Pdc-CD (residua 231 – 246). Residua flexibilních oblastí byla modelována jako koule o velikosti průměrné aminokyseliny těsně uspořádané v řetězci za sebou. Nejdřív byl vytvořen soubor možných konformací molekuly Pdc (celkově 10 000

konformerů). Jednalo se o modely Pdc s náhodnými konformacemi, ovšem s omezeními danými primární aminokyselinovou sekvencí. Genetickým algoritmem pak byl tento soubor omezen na osmnáct konformerů, které svými teoretickými rozptylovými křivkami nejlépe prokládají experimentální SAXS křivku (vzorek o koncentraci $4,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Hodnota χ^2 , která vypovídá o kvalitě proložení (fitu), měla v tomto případě velmi dobrou hodnotu 0,98. Na *Obr. 5.13A*, str. 67, je zobrazeno proložení (červená čára) experimentálních dat (černá křivka) daty ze souboru osmnácti vybraných konformerů. Metodou EOM byla také získána hodnota gyračních poloměrů R_g jednotlivých konformerů a navíc bylo provedeno porovnání R_g konformerů počátečního souboru (10 000 konformerů) s vybraným souborem osmnácti konformerů, jak je zobrazeno na *Obr. 5.13B* na str. 67. Z *Obr. 5.13B* je patrné, že vybraný soubor má mnohem užší rozsah R_g , s mnohem vyšší frekvencí výskytu, než počáteční soubor 10 000 konformerů, což nasvědčuje větší kompaktnosti celé molekuly ve srovnání s počátečním souborem. Maximální hodnoty R_g bylo dosaženo u $34,2 \text{ \AA}$, což přibližně odpovídá i hodnotě získané z rozptylových křivek (viz *Tabulka 5.4*, str. 64). *Obr. 5.13C* na str. 67 pak ukazuje čtyři vybrané zástupce konformerů molekuly Pdc. Z *Obr. 5.13C* je patrné, že Pdc-ND tvoří různě orientované, rozvolněné struktury, jejichž průměrem jsou námi získaná data. To je ukázáno i na *Obr. 5.13D* na str. 67, kde jsou zobrazeny modelové rozptylové křivky jednotlivých reprezentativních čtyř konformerů, kde žádný z nich přesně neopisuje získanou experimentální křivku (modrá). Vybrané konformery vykazují značnou variabilitu, což nasvědčuje už dříve naznačenému závěru, že Pdc-ND je v roztoku značně flexibilní. Podobné výsledky byly získány pro všechny tři vzorky, tedy i pro koncentrace $3,4$ a $2,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Alternativně byl použit ještě jeden přístup modelování metodou EOM, kde byly zafixovány obě domény Pdc (tak jak byly pozorovány v krystalové struktuře komplexu Pdc s $G_t\beta\gamma$ [2]) spojené flexibilní spojkou. Získané hodnoty χ^2 pro takto zvolený model však vykazovaly mnohem vyšší hodnotu (1,51) ve srovnání s předchozím modelem, tedy horší shodu s experimentálními daty. Proložení experimentálních dat křivkou získanou z tohoto modelu je zobrazeno na *Obr. 5.13E* na str. 67. Navíc, R_g takto zvoleného modelu Pdc vykazuje daleko větší hodnoty, než by se dalo očekávat z původního souboru konformerů, jak je ukázáno na *Obr. 5.13F* na str. 67.



Obr. 5.13 EOM analýza SAXS dat měřených na Pdc o koncentraci $4,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. **(A)** Graf závislosti rozptylové intenzity $I(s)$ na rozptylovém úhlu s zobrazuje srovnání získaných rozptylových dat (černá křivka) s teoretickou rozptylovou křivkou 18 konformerů Pdc, získanou metodou EOM (červená křivka). Obě křivky se dobře překrývají, čemuž odpovídá i hodnota $\chi^2 = 0,98$. **(B)** Graf závislosti frekvence výskytu gyračních poloměrů R_g možných konformerů Pdc na hodnotě R_g . Modrá křivka odpovídá počátečnímu souboru (10 000) konformerů daných primární aminokyselinovou sekvencí, červená křivka odpovídá souboru (18) konformerů vybraných metodou EOM tak, aby průměr teoretických rozptylových křivek těchto konformerů nejlépe odpovídal naměřeným datům. **(C)** Ukázka čtyř reprezentativních trojrozměrných struktur Pdc vybraných ze souboru 18 konformerů. Část s dobře definovanými prvky sekundární struktury představuje Pdc-CD, rozvolněný řetězec pak Pdc-ND. **(D)** Zobrazení párové distribuční funkce $P(r)$ pro čtyři jednotlivé konformery z části (C). Z grafu je patrné, že žádný z konformerů samostatně nedokáže ideálně reprezentovat naměřená data, pouze jejich průměr se naměřeným datům blíží. **(E)** Srovnání experimentální rozptylové křivky (černá) s teoretickou rozptylovou křivkou 28 konformerů (červená), získanou metodou EOM, kde jako model byl použit případ dvou nehybných domén. Jak je patrné z obrázku i z porovnání s částí (A), teoretická data dobře neprokládají data naměřená, čemuž odpovídá i vyšší hodnota $\chi^2 = 1,51$. **(F)** Obdobný obrázek, jako v části (B) poukazuje na špatně zvolený model dvou nehybných domén, což se projevuje i většími hodnotami R_g vybraných 28 konformerů, oproti počátečnímu souboru (10 000 konformerů).

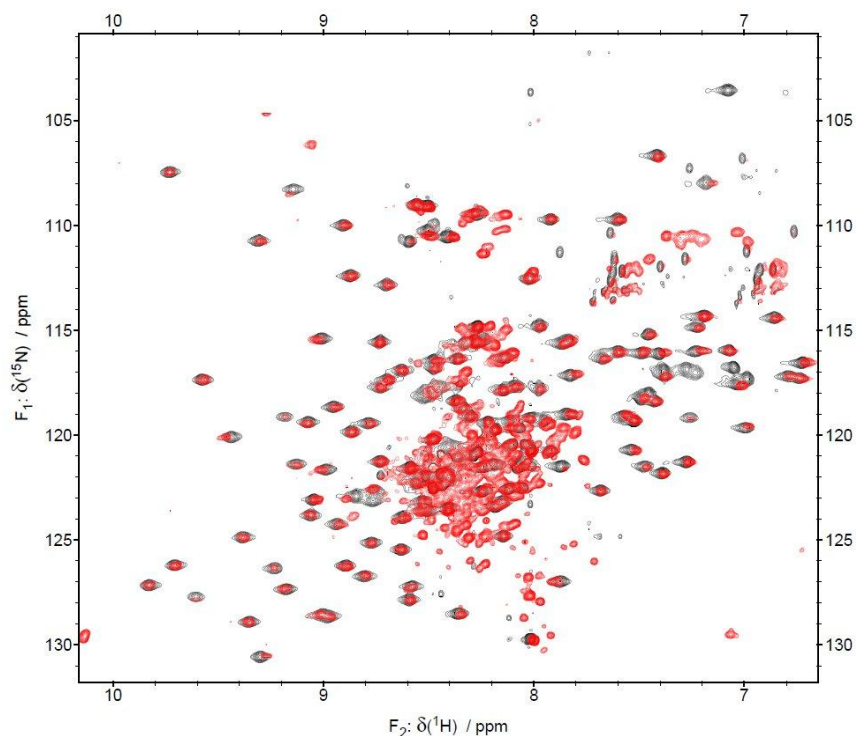
Metodou SAXS tedy bylo prokázáno, že Pdc je při použitých podmínkách monomerní a vykazuje rozvolněnou strukturu, především díky rozvolněné Pdc-ND, což potvrzuje výsledky ostatních biofyzikálních měření. V těchto měřeních byla použita mutantní forma Pdc, tedy PdcQ52K.

5.2.6 Studium struktury Pdc pomocí nukleární magnetická rezonance (NMR)

Další metodou, která umožňuje studium struktury flexibilních proteinů je NMR (viz kapitola 9.4). Techniky NMR jsme použili pro potvrzení výsledků získaných v předchozích experimentech a pro získání detailnější strukturní informace. Na *Obr. 5.14* na str. 69 jsou zobrazena dvě překrývající se 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektra, kde spektrum s červenými signály odpovídá celé molekule Pdc (přiřazeno bylo 74 % celé sekvence PdcQ52K) a spektrum s černými signály odpovídá pouze Pdc-CD. Pro protein s nesbalenou strukturou je typické, že signály v HSQC spektru jsou seskupeny uprostřed spektra a vykazují špatné rozlišení. To lze pozorovat i u červeného spektra Pdc. Shluk signálů uprostřed odpovídá Pdc-ND, která je značně nestrukturovaná. Okolní, dobře rozpoznatelné a separované signály odpovídají sbalené Pdc-CD. Ze spekter je také patrné, že signály Pdc-CD se příliš nezměnily (nezměnily pozici a nevymizely) pokud byla odstraněna Pdc-ND. To může nasvědčovat faktu, že Pdc-ND nijak výrazně neovlivňuje strukturu Pdc-CD.

Dalším zajímavým výsledkem z měření NMR bylo zjištění, že molekula PdcQ52K tvoří při koncentracích větších než 200 μM oligomerní částice. Tento fakt nám znemožnil měřit NMR data PdcQ52K ve vyšších koncentracích.

Na molekule Pdc byla také zkoumána jeho náchylnost ke tvorbě prvků sekundární struktury. Jelikož byla tato studie provedena jak na samotném PdcQ52K, tak na jeho fosforylované formě (-PP) a také na PdcQ52K-PP v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ ΔC , jsou tyto výsledky pro porovnání ukázány až v kapitole 5.3.7.



Obr. 5.14 Zobrazení překrývajících se ^1H - ^{15}N HSQC spekter *PdcQ52K* (červené signály) a *Pdc-CD* (černé signály). Shluk signálů uprostřed spektra odpovídá nestrukturované *Pdc-ND*.

5.3 Biofyzikální a strukturní charakterizace *Pdc-PP* a 14-3-3/*Pdc-PP*

5.3.1 Charakterizace pomocí analytické ultracentrifugace (AUC)

Metoda AUC byla použita k získání hodnoty zdánlivé disociační konstanty komplexu K_d (metodou sedimentační rovnováhy) a k objasnění stechiometrie komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ /*PdcQ52K-PP* (metodou sedimentační rychlosti). Na *Obr. 5.15* na str. 71 jsou zobrazeny výsledky z těchto měření. *Obr. 5.15A* zobrazuje příklady profilů absorpčních dat získaných metodou sedimentační rovnováhy měřených při 280 nm pro směs proteinů *PdcQ52K-PP* a 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$. Tyto tři vybrané profily představují data pro vzorek s molárním poměrem 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$:*PdcQ52K-PP* = 2:1, kde dimer 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ váže jednu molekulu *PdcQ52K-PP*. Takto naměřená data byla globálně prokládána za použití správně zvoleného modelu vratné reakce $\text{PdcQ52K-PP} + \text{dimer } 14\text{-3-3}\zeta\Delta\text{C} \rightleftharpoons 14\text{-3-3}\zeta\Delta\text{C}:\text{PdcQ52K-PP}$, jak ukazují dobře proložená naměřená data (černá, červená, modrá křivka). Pro danou směs byla naměřena data při třech různých otáčkách rotoru (8000, 15000 a 26 000 ot. \cdot min. $^{-1}$). Z výsledků těchto měření byla stanovena hodnota zdánlivé disociační konstanty $K_d = 3 \pm 0,5 \mu\text{M}$, což nasvědčuje středně silné vazbě mezi oběma vazebnými partnery. Pod *Obr. 5.15A* je graf závislosti odchylky naměřených dat od

hodnot získaných globálním proložením (hodnota 0). Z obrázku je patrné, že odchylky jsou rovnoměrně rozprostřeny okolo hodnoty 0, což vypovídá o dobré shodě použitého modelu s experimentálními daty.

Na *Obr. 5.15B* a *C* jsou zobrazeny výsledky z měření metodou sedimentační rychlosti. *Obr. 5.15B* zachycuje souvislé distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ čtyř různých vzorků. V tomto případě byl měřen vzorek 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (modrá křivka), jehož váhově zprůměrovaný sedimentační koeficient s_w dosahuje hodnoty 3,7 S. Dále byl měřen komplex 14-3-3 $\zeta\Delta$ C/PdcQ52K-PP pro dva různé molární poměry vazebných partnerů, konkrétně 2:1 a 2:2. Z *Obr. 5.15B* je patrné, že v případě poměru 2:2 (zelená křivka) vzniká jak komplex s poměrem 2:1, pro nějž samotný byla naměřena hodnota $s_w = 4,0$ S, tak je pozorován i zbytek nenavázaného PdcQ52K-PP s hodnotou s_w okolo 2,0 S, což je hodnota odpovídající hodnotě naměřené pro samotný PdcQ52K (2,4 S). Tento výsledek nasvědčuje tomu, že získaná stechiometrie komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C:PdcQ52K-PP je 2:1, tedy dimer proteinu 14-3-3 váže jednu molekulu Pdc-PP. Navíc výsledek poukazuje na podobné hydrodynamické vlastnosti komplexu a samotného 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, což může nasvědčovat faktu, že neuspořádaná Pdc-ND je zanořena do vnitřního kanálu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.

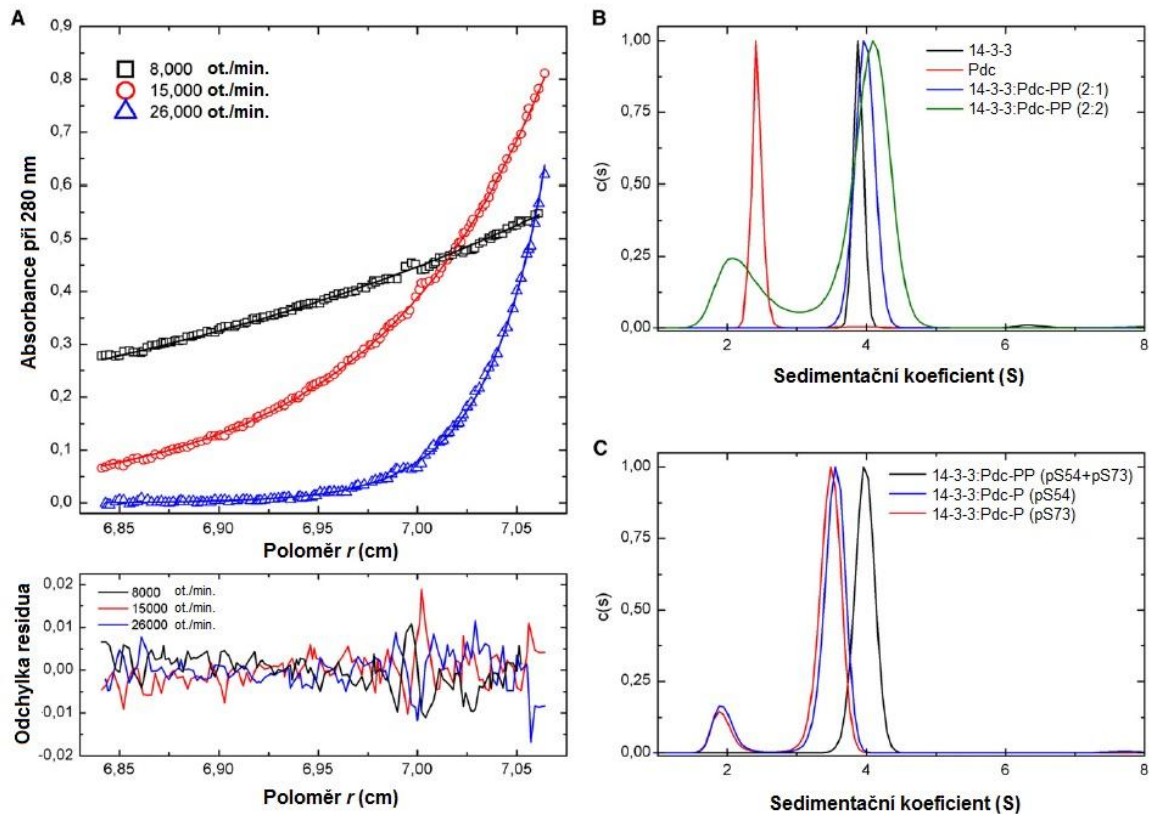
Dále byl pomocí stejné metody zkoumán význam fosforylace obou fosforylačních míst (Ser54 a Ser73) pro vznik komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C/PdcQ52K-PP v molárním poměru 2:1. Byly připraveny dvě mutantní formy fosducinu (PdcQ52K, PdcQ52K S73A) a přirozený fosducin Pdc WT. Všechny tři formy byly fosforylovány pomocí katalytické podjednotky PKA (viz [1]), takže došlo k fosforylacím všech tří forem, které jsou zobrazeny v *Tabulce 5.5*.

Tabulka 5.5 Fosforylace tří forem fosducinu pomocí PKA.

Fosforylace	Ser54	Ser73
Pdc WT	✘	✓
PdcQ52K S73A	✓	✘
PdcQ52K	✓	✓

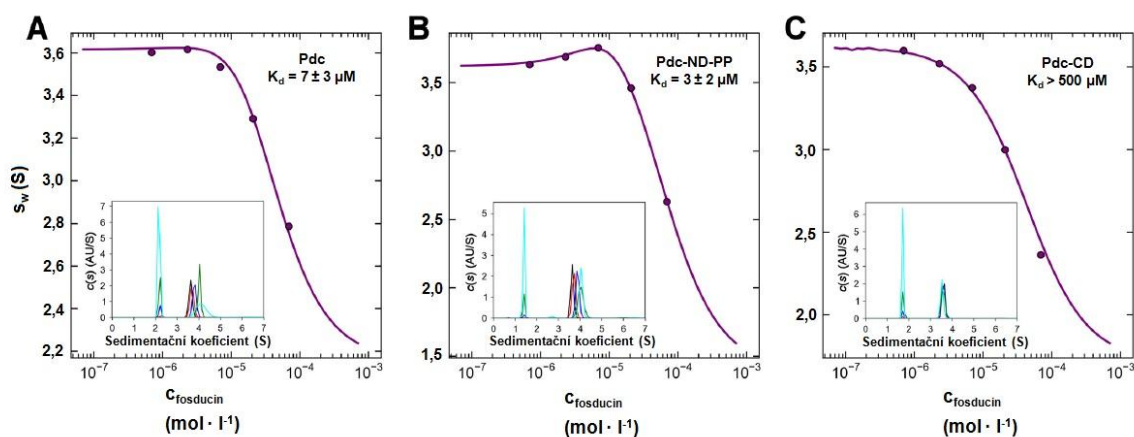
Z *Obr. 5.15C* na str. 71 je patrné, že vznik komplexu se stejnou hodnotou s_w , jako v případě *Obr. 5.15B*, byl pozorován pouze pro vzorek obsahující oba současně fosforylované seriny (Ser54 a Ser73), což vypovídá o důležitosti fosforylace v obou těchto místech při *in vitro* tvorbě komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C/PdcQ52K-PP. Signál odpovídající s_w okolo 2,0 S odpovídá volným formám fosducinu. Z obrázku je také patrné, že k určité

tvorbě komplexu v případě jednofosforylovaných forem dochází, ovšem síla jejich vazby je nižší, než v případě obou fosforylovaných míst. Je na místě se tedy domnívat, že obě fosforylační místa je nutno fosforylovat i pro tvorbu komplexu *in vivo*.



Obr. 5.15 Analýza vzorků za použití metody AUC. **(A)** Metodou sedimentační rovnováhy byla získána data a vynesena do grafu závislosti absorbance měřené při 280 nm na poloměru otáčení r , tedy vzdálenosti od středu rotace. Byl měřen vzorek komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C/PdcQ52K-PP o koncentracích 60/30 μ M, při třech různých otáčkách rotoru. Data (barevné sférické útvary) byla globálně proložena (tři barevné linie). Graf níže zobrazuje kvalitu proložení dat, tedy odchylku naměřených dat od dat proložených při dané hodnotě r . Získaná hodnota K_d vyšla $3 \pm 0,5 \mu$ M. **(B)** Metodou sedimentační rychlosti byl zkoumán molární poměr jednotlivých komponent v proteinovém komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C/PdcQ52K-PP. Byly připraveny vzorky směsí fosducinu s proteinem 14-3-3 o koncentracích 30, respektive 60 μ M, a 60, respektive 60 μ M, a změřeny při 48 000 ot. \cdot min.⁻¹ Data byla vynesena do grafu závislosti souvislé distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ na hodnotě sedimentačních koeficientů. Obrázek ukazuje, že stechiometrie komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C:PdcQ52K-PP je 2:1 (modrá linie), nikoli 2:2 (zelená linie), což se projevuje přídavným signálem volného PdcQ52K-PP okolo hodnoty $s_w \sim 2$ S. **(C)** Metodou sedimentační rychlosti byl zkoumán význam fosforylace obou fosforylačních míst (Ser54a Ser71) vzhledem k vazbě se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Byly připraveny vzorky 14-3-3/Pdc-P(P) o koncentracích 60/30 μ M a změřeny při 42 000 ot. \cdot min.⁻¹ Dvě formy Pdc byly fosforylovány pouze na jednom ze dvou serinů, třetí forma obsahovala obě fosforylovaná místa. Černá linie (obě fosforylovaná místa) ukazuje, že komplex je *in vitro* tvořen v případě obou fosforylovaných míst, zatímco červená a modrá linie (jedno fosforylované místo) ukazuje, že se tvoří komplex s mnohem nižší afinitou obou vazebných partnerů a signál o hodnotě $s_w \sim 1,9$ S odpovídá nevázaným formám fosducinu.

Dále byl zkoumán podíl jednotlivých domén Pdc (Pdc-CD a Pdc-ND) na vazbě s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Metodou sedimentační rychlosti byly získány isotermy pro jednotlivé směsi, z nichž bylo možné získat hodnoty zdánlivých disociačních konstant K_d ovlivněných hydrodynamickými vlastnostmi jednotlivých komplexů/komponent. I přes fakt, že výsledky jsou ovlivněny, postačily tyto k dobrému odhadu a porovnání jednotlivých směsí. Vzorky sestávaly vždy ze 14 μ M 14-3-3 ζ Δ C a formy fosducinu (PdcQ52K-PP, Pdc-ND-PP a Pdc-CD) vždy o koncentracích v rozmezí 0,7 až 70 μ M tak, aby stechiometrické molární poměry odpovídaly hodnotám 14-3-3:fosducin = 20:1, 6:1, 2:1, 2:3 a 1:5. Z distribucí $c(s)$ (viz vložené grafy na Obr. 5.16, str. 73) byly následně získány hodnoty vážených sedimentačních koeficientů s_w směsí. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci fosducinu $c_{fosducin}$, jak je zobrazeno na Obr. 5.16. Data byla prokládána na základě Langmuierova vazebného modelu, kde byl uvažován molární poměr 14-3-3:Pdc (Pdc-ND, Pdc-CD) = 2:1. Model s touto stechiometrií nejlépe souhlasil s experimentálními daty. Z vloženého grafu na Obr. 5.16A je zřejmé, že u vzorku se stechiometrickým poměrem 14-3-3:Pdc = 2:1 (modrá linie) není veškerý Pdc-PP navázán v komplexu. To je způsobeno nízkou koncentrací obou vazebných partnerů v daném vzorku, která vede k přítomnosti jak volné, tak vázané formy Pdc-PP. Z Obr. 5.16 je patrné, že vazba samotné fosforylované Pdc-ND-PP s proteinem 14-3-3 ζ Δ C je silnější ($K_d = 3 \pm 2\mu$ M), než vazba celého PdcQ52K-PP ($K_d = 7 \pm 2\mu$ M). To může nasvědčovat faktu, že Pdc-CD interaguje s Pdc-ND-PP a přítomnost Pdc-CD snižuje přístupnost fosforylovaných residuí Pdc-ND-PP k vnitřnímu kanálu 14-3-3 ζ Δ C. Samotná Pdc-CD nevykazovala vazbu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C, z čehož vyplývá, že se pravděpodobně *in vitro* na stabilitě komplexu nijak významně nepodílí. Dále lze usuzovat, že na tvorbě komplexu má majoritní význam Pdc-ND-PP.



Obr. 5.16 Zobrazení výsledků z AUC, metody sedimentační rychlosti (při $48\,000 \text{ ot.} \cdot \text{min.}^{-1}$), při studiu vlivu jednotlivých domén Pdc na tvorbu komplexu. Grafy zobrazují závislost váženého sedimentačního koeficientu s_w na koncentraci formy fosducinu c_{fosducin} obsažené ve směsi s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Koncentrace 14-3-3 ζ Δ C byla vždy $14 \mu\text{M}$ a koncentrace jednotlivých forem fosducinu od $0,7$ do $70 \mu\text{M}$ tak, aby molární poměr 14-3-3:fosducin odpovídal hodnotám 20:1 (černá), 6:1 (červená), 2:1 (tmavě modrá), 2:3 (zelená) a 1:5 (světle modrá). Vložené grafy představují distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro jednotlivé molární poměry směsi. Zobrazené grafy jsou ukázány pro komplexy s PdcQ52K-PP (A), Pdc-ND-PP (B) a Pdc-CD (C).

5.3.2 Charakterizace pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)

Výsledky AUC naznačují, že hydrodynamické vlastnosti komplexu 14-3-3 ζ Δ C/PdcQ52K-PP ($s_w = 4,0 \text{ S}$) jsou podobné, jako v případě samotného 14-3-3 ζ Δ C ($s_w = 3,7 \text{ S}$). Tento fakt může poukazovat na proces vnoření nestrukturované flexibilní Pdc-ND do centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3 ζ Δ C (viz Obr. 2.7 na str. 36). Pro ověření hydrodynamických vlastností proteinů byla zvolena metoda DLS. Výsledky metody jsou zobrazeny v Tabulce 5.6.

Tabulka 5.6 Hydrodynamické poloměry R_H proteinů měřených metodou DLS

	14-3-3 ζ Δ C	PdcQ52K	PdcQ52K-PP	14-3-3 ζ Δ C + PdcQ52K	14-3-3 ζ Δ C + PdcQ52K-PP
$R_{H,DLS}^a$ (Å)	$36,6 \pm 0,5$	$37,4 \pm 0,3$	$38,2 \pm 0,5$	$36,9 \pm 0,1$	$44,2 \pm 0,6$
$R_{H,teor.}^b$ (Å)	25,4	20,6	20,6	-	29,3
M_w^c ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$56896,0^d$	$30161,4^e$	$30161,4^e$	-	$87021,5^f$

^aHydrodynamické poloměry získané měřením DLS. Hodnoty odpovídají střední hodnotě \pm směrodatná odchylka z pěti měření.

^bHydrodynamické poloměry získané teoretickým výpočtem rigidního sférického dehydratovaného proteinu získaného z rovnice $R_H[\text{protein}] = 66 \cdot 10^{-12} \cdot M_w^{1/3}$, kde M_w je molekulová hmotnost ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) [197].

^cMolekulová hmotnost M_w vypočtená na základě aminokyselinové sekvence s obsahem $6 \times$ His kotvy.

^dMolekulová hmotnost dimeru 14-3-3 ζ Δ C obsahujícího dvě N-terminální $6 \times$ His kotvy.

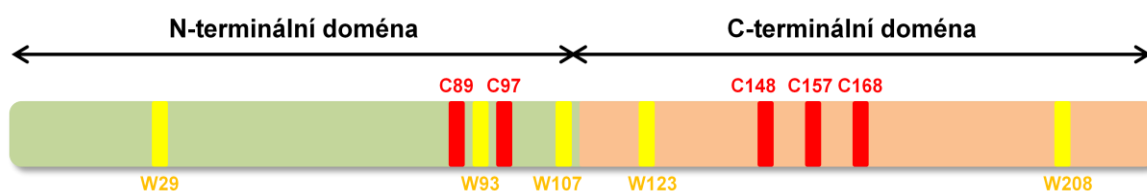
^eMolekulová hmotnost bez prvního methioninu obsaženého v $6 \times$ His kotvě.

^fMolekulová hmotnost bez prvního methioninu obsaženého v $6 \times$ His kotvě PdcQ52K, a dimeru 14-3-3 ζ Δ C obsahujícího dvě N-terminální $6 \times$ His kotvy.

Z *Tabulky 5.6* na str. 73 je patrné, že ačkoli má dimer 14-3-3 ζ Δ C téměř dvojnásobnou molekulovou hmotnost oproti PdcQ52K, hodnoty jejich R_H jsou velmi podobné (36,6 Å, respektive 37,4 Å), což potvrzuje rozvolněnost molekuly PdcQ52K a kompaktnost dimeru 14-3-3 ζ Δ C. *Tabulka 5.6* také dokazuje, že nefosforylovaný Pdc netvoří komplex se 14-3-3 proteinem, což lze vidět v posledních dvou sloupcích, kde naopak vznik komplexu je zaznamenán nárůstem R_H (44,2 Å). Z *Tabulky 5.1* na str. 59 také víme, že největší podíl na R_H fosducinu má Pdc-ND (35,4 Å). Při tvorbě komplexu 14-3-3 ζ Δ C/PdcQ52K-PP se hodnota R_H PdcQ52K-PP změní z hodnoty 38,2 Å na hodnotu komplexu 44,2 Å. Tato změna potvrzuje výsledky získané metodou AUC, tedy že Pdc-ND je při tvorbě komplexu pravděpodobně vnořena do centrálního kanálu 14-3-3 ζ Δ C. Rozdíl experimentálních a teoretických hodnot R_H poukazuje na fakt, že fosducin je značně nesymetrická molekula.

5.3.3 Studium konformačního chování Pdc a 14-3-3 ζ Δ C/Pdc-PP pomocí metod fluorescenční spektroskopie

Pro detailnější popis strukturních změn týkajících se vzniku komplexu a samotné fosforylace fosducinu, byla zvolena měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence. Na *Obr. 5.17* jsou schematicky zobrazena místa, na kterých se nachází fluorofor Trp zbytku (W), nebo místa (postranní řetězce Cys zbytků), která byla označena sondou 1,5-IAEDANS (C). Jedná se fluorofory, které byly použity v následujících experimentech.



Obr. 5.17 Schematické znázornění pozic použitých fluoroforů v molekule fosducinu. Molekula fosducinu je barevně rozdělena na Pdc-ND a Pdc-CD. Tryptofanové zbytky jsou znázorněny jako žluté pruhy, místa (postranní řetězce Cys zbytků) označená pomocí 1,5-IAEDANS jsou znázorněna červeně.

5.3.3.1 Dohasínání fluorescence AEDANS

Molekula fosducinu (PdcQ52K) obsahuje celkem pět cysteinů (v Pdc-ND Cys89, Cys97, v Pdc-CD Cys148, Cys157 a Cys168, viz též *Obr. 5.17*), které byly kovalentně modifikovány fluorescenční značkou (IAEDANS) za odštěpení jodovodíku HI

(→ proteinový Cys-AEDANS + HI). Pomocí měření časově-rolíšeného dohasínání intenzity fluorescence lze zjistit dobu života excitovaného stavu fluoroforu (viz kapitola 9.1.3) a její změnu, jakožto silnou indikaci změny polaroty mikrokolí fluoroforu. V rámci experimentu byly připraveny vzorky mutantních forem PdcQ52K obsahující pouze jeden cystein (ostatní cysteiny byly mutovány na Ala). Následovalo měření jednotlivých forem fosducinů, dále jejich fosforylovaných forem a následně komplexů fosducinu se 14-3-3 ζ AC. Všechny AEDANS skupiny vykazovaly emisní dohasínání s multimodálními distribucemi, proto byla pro monitorování změn v mikrokolí fluoroforu po fosforylaci a vazbě 14-3-3 ζ AC zvolena střední doba života excitovaného stavu τ_{mean} (viz kapitola 9.1.3). Získaná data byla vyhodnocena metodou maximální entropie [198]. Výsledky z měření jsou zobrazeny v *Tabulce 5.7* a na *Obr. 5.20* na str. 82.

Tabulka 5.7 Hodnoty středních dob života τ_{mean} AEDANS skupin vázaných na cysteinech

Mutantní forma PdcQ52K	Vzorek	$\tau_{mean}^{a,b}$ (ns)
Cys89	ne-PP	15,00
	ne-PP + 14-3-3	15,01
	PP	14,67
	PP + 14-3-3	15,52
Cys97	ne-PP	15,28
	ne-PP + 14-3-3	15,28
	PP	14,73
	PP + 14-3-3	15,33
Cys148	ne-PP	15,70
	ne-PP + 14-3-3	15,51
	PP	14,99
	PP + 14-3-3	15,14
Cys157	ne-PP	14,70
	ne-PP + 14-3-3	14,69
	PP	14,13
	PP + 14-3-3	14,32
Cys168	ne-PP	15,43
	ne-PP + 14-3-3	15,42
	PP	14,92
	PP + 14-3-3	15,44

^aSměrodatná odchylka < 0,05 ns.

^bHodnota střední doby života τ_{mean} byla vypočtena podle rovnice 9.10 na str. 222.

Z *Tabulky 5.7* je patrné, že samotná fosforylace mutantních forem PdcQ52K obsahujících pouze jeden cysteinový zbytek vždy způsobila zkrácení τ_{mean} daného fluoroforu, což vypovídá, v případě AEDANS, o zvýšení polaroty v mikrokolí těchto

fluoroforů a tudíž jejich rychlejšímu dohasínání. Největší rozdíl byl překvapivě pozorován u mutantní formy obsahující Cys148, který se nachází v Pdc-CD, což může nasvědčovat faktu, že Pdc-CD interaguje s Pdc-ND-PP, kde -PP značí fosforylaci na Ser54 i Ser73. Naopak zvýšení τ_{mean} bylo pozorováno při tvorbě komplexu, porovnáme-li je s fosforylovanými formami fosducinu ve všech případech, což vypovídá o snížení polaritu v mikrookolí fluoroforu AEDANS, tedy s největší pravděpodobností snížení přístupnosti fluoroforů okolnímu roztoku jejich zakrytím částí/částmi vazebného partnera, či sebe samého, jako důsledek strukturní změny při vazbě. Z tohoto lze usuzovat na přímý fyzický kontakt proteinu 14-3-3 s označenými místy fosducinu, nejvíce pak u Cys89, Cys97, ale také Cys168, který se nachází v Pdc-CD. Je vhodné připomenout, že Cys89 a Cys97, jsou obsaženy v α -helixu 3 Pdc, který je zapojen do vazby s $G_i\beta$. Vazba 14-3-3 tedy může mít na tyto oblasti vliv a ovlivňovat tak vazbu s $G_i\beta$.

5.3.3.2 Dohasínání intenzity tryptofanové fluorescence

Přirozeně se vyskytující krysí forma fosducinu (Pdc WT) obsahuje pouze jeden tryptofanový zbytek 29 (Trp29). Stejně tak i mutantní forma PdcQ52K, která byla použita pro tato měření, obsahuje pouze tento tryptofanový zbytek. Z Obr. 5.17 na str. 74 je patrné, že cysteinové zbytky obsažené v molekule fosducinu pokrývají pouze malou část sekvence. Bylo tedy logické prozkoumat podobným způsobem i oblasti, které jsou z biochemického pohledu zajímavé, konkrétně Trp29, který pravděpodobně hraje roli v inhibici fosfolipasy C isoformy β_2 [89] a zároveň se prostorově nachází v blízkosti obou fosforylačních míst potřebných pro tvorbu komplexu s proteinem 14-3-3 (Ser54, Ser73) [2, 77] a sumoylačního místa Lys33 [143]. Trp29 je obsažen v α -helixu 1, který tvoří rozsáhlý vazebný povrch s $G_i\beta$ [2]. Také nás zajímala Pdc-CD, jelikož z měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence AEDANS se ukázalo, že při vazbě 14-3-3 dochází ke zvýšení hodnoty střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} AEDANS navázaného na Cys168. Vzhledem k tomu, že Pdc-CD může hrát určitou roli v transkripci důležitých genů interakcí s proteinem CRX [68, 69], může docházet k její fosforylaci pomocí GRK2 kinasy [67] a dále by mohla interagovat s proteinem SUG1 [70], byl také studován vliv vazby 14-3-3 na její strukturu.

Pro potřeby tryptofanových fluorescenčních měření byly připraveny čtyři tryptofanové mutantní formy fosducinu PdcQ52K (mutace W29F Y93W, W29F F107W, W29F F123W, W29F F208W) obsahujících vždy po jednom tryptofanovém zbytku. S nimi

byly provedeny měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence, jako v předchozím případě (viz kapitola 5.3.3.1) pouze s tím rozdílem, že byla použita mutantní forma 14-3-3 ζ noW neobsahující tryptofany. U všech studovaných mutantních forem Pdc docházelo ke komplikovanému multiexponenciálnímu dohasínání tryptofanové fluorescence, proto byla k interpretaci dat opět použita střední doba života excitovaného stavu fluoroforu τ_{mean} . Získaná data byla vyhodnocena metodou maximální entropie [198]. Výsledky z měření jsou shrnuty v *Tabulce 5.8* a zobrazeny na *Obr. 5.22* na str. 85.

Tabulka 5.8 Hodnoty τ_{mean} pro vzorky obsahující jeden tryptofanový zbytek

Mutantní forma PdcQ52K	Vzorek	$\tau_{mean}^{a,b}$ (ns)
W29	ne-PP	3,9
	PP	3,8
	PP + 14-3-3 ^c	4,2
W93	ne-PP	4,3
	PP	4,1
	PP + 14-3-3 ^c	4,4
W107	ne-PP	4,9
	PP	4,9
	PP + 14-3-3 ^c	5,0
W123	ne-PP	4,5
	PP	4,3
	PP + 14-3-3 ^c	4,3
W208	ne-PP	4,6
	PP	4,2
	PP + 14-3-3 ^c	4,4

^aSměrodatná odchylka < 0,05 ns.

^bHodnota střední doby života τ_{mean} byla vypočtena podle rovnice 9.10 na str. 222.

^cPro měření byla použita mutantní forma proteinu 14-3-3 ζ , 14-3-3 ζ noW (mutace W59F a W228F).

Výsledky z *Tabulky 5.8* jsou analogické výsledkům z *Tabulky 5.7* ze str. 75 s navázanými fluorescenčními značkami AEDANS. Samotná fosforylace fosducinu vedla ke snížení τ_{mean} ve všech případech, kromě formy W107, což poukazuje na změnu polaritu v mikrookolí tryptofanových zbytků, tedy jejich lepší přístupnosti rozpouštědлу a rychlejšímu dohasínání. Největšího snížení bylo dosaženo u W93, W123 a také W208, který se nachází v Pdc-CD. Naopak vazba 14-3-3 vedla ke zvýšení τ_{mean} tryptofanových zbytků Pdc-PP, kromě mutantní formy s W123. Zvýšení τ_{mean} by mohlo být důsledkem snížení polaritu v mikrookolí těchto tryptofanových zbytků díky jejich většímu zastínění před polárním rozpouštědlem způsobenému překryvem proteinem 14-3-3, nebo sebou samým jako důsledek strukturálních změn způsobených vazbou 14-3-3. Z těchto výsledků, společně s výsledky získanými měřeními s AEDANS, lze říci, že samotná fosforylace má

vliv na strukturu různých oblastí molekuly Pdc a to jak v rámci Pdc-ND, tak i Pdc-CD. Naopak vazba proteinu 14-3-3 způsobuje strukturní změny vedoucí k nižší přístupnosti fluoroforů, což naznačuje na fyzický kontakt Pdc-PP s proteinem 14-3-3. Vazby se účastní jak Pdc-ND-PP, kde jsou obsažena obě fosforylační místa nutná pro vazbu, tak Pdc-CD. Pdc-ND-PP i Pdc-CD mezi sebou *in vitro* interagují, což signalizuje pokles τ_{mean} W208, C148, C157 i C168 po fosforylaci.

5.3.4 Studium flexibility Pdc a 14-3-3 Δ C/Pdc-PP pomocí poklesu anizotropie fluorescence

5.3.4.1 Pokles anizotropie fluorescence AEDANS

Měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence naznačilo, že při fosforylaci Pdc i jeho vazbě s proteinem 14-3-3 dochází ke strukturním změnám v molekule Pdc. Je logické se domnívat, že kontakty proteinu 14-3-3 s Pdc-PP ovlivní pohyblivost segmentů, které se účastní těchto interakcí. Proto byly v dalším kroku zkoumány segmentální pohyby těchto segmentů. K tomuto účelu posloužila měření časově-rozlišeného poklesu anizotropie fluorescence. Anizotropie fluorescence vyjadřuje míru depolarizace polarizovaného fluorescenčního záření a její změny lze použít ke sledování změn pohyblivosti fluoroforu. Pro tato měření byly využity stejné vzorky, jako v případě měření dohasínání intenzity fluorescence (viz kapitola 5.3.3.1). Všechny měřené mutantní formy Pdc označené AEDANS vykazovaly komplexní pokles anizotropie (tedy takový, který nelze popsat monoexponenciálně). Pro každou z AEDANS skupin byly nalezeny čtyři třídy rotačních korelačních časů, které příslušely různým typům pohybů AEDANS navázaných kovalentně k cysteinovým zbytkům v různých pozicích Pdc. Krátké korelační časy (okolo 500 ps a 3 ns) odpovídají spíše rychlým lokálním pohybům AEDANS skupin. Časy v rozmezí 8 – 25 ns odpovídají rotačním difúzním pohybům velkých rigidních domén Pdc (pravděpodobně Pdc-CD apod.) a časy > 50 ns přísluší celkové rotaci molekuly Pdc. V *Tabulce 5.9* na str. 79 jsou zobrazeny výsledky z těchto měření.

Tabulka 5.9 Výsledky z měření poklesu anizotropie fluorescence AEDANS

Mutant PdcQ52K	Vzorek	β_1^a	ϕ_1^b (ns)	β_2^a	ϕ_2^b (ns)	β_3^a	ϕ_3^b (ns)	β_4^a	ϕ_4 (ns)
Cys89	ne-PP	0,027	0,4	0,093	2,5	0,078	13	0,032	> 50
	ne-PP + 14-3-3	0,044	0,5	0,093	3,0	0,068	16	0,025	> 50
	PP ^c	0,029	0,4	0,092	2,1	0,066	8	0,043	> 50
	PP ^c + 14-3-3	0,013	0,3	0,076	2,1	0,066	9	0,075	> 50
Cys97	ne-PP	0,054	0,5	0,083	3,3	0,056	12	0,037	> 50
	ne-PP + 14-3-3	0,035	0,4	0,090	2,5	0,059	11	0,046	> 50
	PP ^c	0,052	0,5	0,096	2,5	0,066	15	0,016	> 50
	PP ^c + 14-3-3	0,052	0,5	0,076	3,3	0,055	15	0,047	> 50
Cys148	ne-PP	0,006	0,3	0,088	2,7	0,071	12	0,065	> 50
	ne-PP + 14-3-3	0,022	0,5	0,077	3,0	0,074	12	0,057	> 50
	PP ^c	0,023	0,4	0,078	2,5	0,084	11	0,045	> 50
	PP ^c + 14-3-3	0,011	0,3	0,075	2,1	0,083	10	0,061	> 50
Cys157	ne-PP	0,023	0,5	0,094	3,0	0,096	18	0,017	> 50
	ne-PP + 14-3-3	0,034	0,7	0,080	2,7	0,100	19	0,016	> 50
	PP ^c	0,045	0,6	0,100	3,3	0,071	18	0,014	> 50
	PP ^c + 14-3-3	0,038	0,4	0,124	3,0	0,034	23	0,034	> 50
Cys168	ne-PP	0,032	0,6	0,109	2,7	0,079	25	0,010	> 50
	ne-PP + 14-3-3	0,029	0,5	0,099	2,7	0,087	18	0,015	> 50
	PP	0,047	0,5	0,098	2,7	0,075	15	0,010	> 50
	PP ^c + 14-3-3	0,022	0,3	0,096	2,7	0,071	18	0,041	> 50

^aSměrodatná odchylka < 0,01.

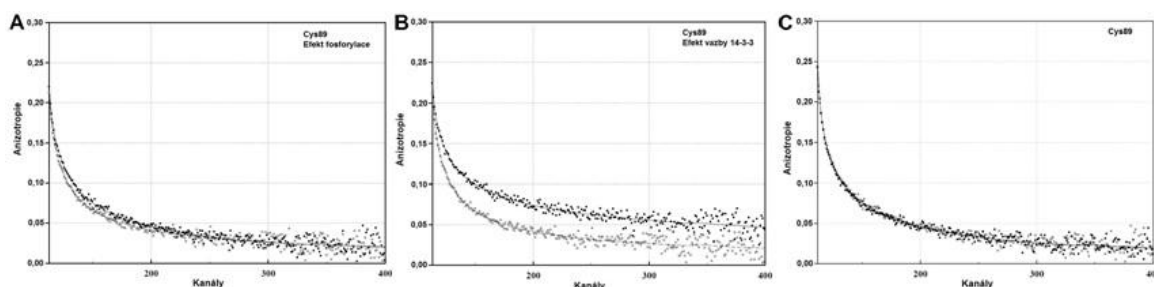
^bSměrodatná odchylka < 20 %.

^cOznačení PP značí fosforylaci na obou fosforylačních místech Pdc (Ser54, Ser73).

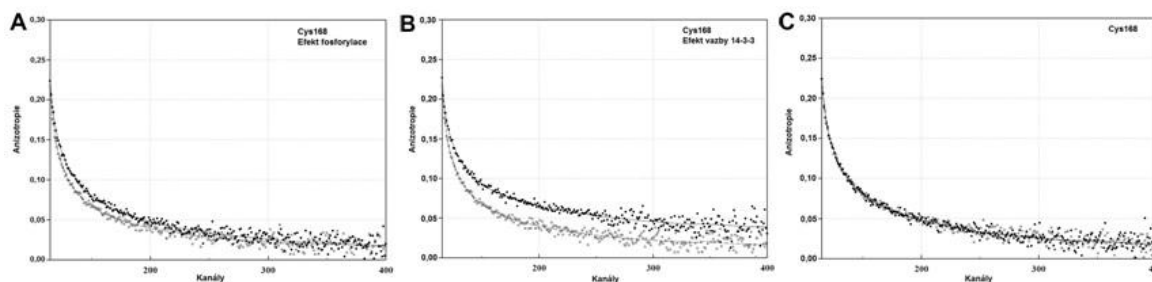
Rychlým pohybům byly přiřazeny amplitudy β_1 a β_2 , které představují příspěvek daného rotačního korelačního času ϕ_1 , respektive ϕ_2 k celkové anizotropii fluorescence. Amplitudy byly získány metodou maximální entropie (MEM) [198]. Pro oba typy rychlých pohybů byla zvolena amplituda β_{short} (*short*, z angl. *krátký*) jako součet amplitud β_1 a β_2 , a představovala míru změn v segmentální pohyblivosti jednotlivých AEDANS vázaných fluoroforů. Fosforylace zvýšila flexibilitu AEDANS vázaných na Cys157 a trochu také na Cys97, jak lze vidět v *Tabulce 5.9* a *Obr. 5.20* na str. 82 z nárůstu hodnot β_{short} mezi fosforylovanou a nefosforylovanou formou fosducinu. Vazba 14-3-3 naopak flexibilitu snížila u všech segmentů označených AEDANS (nejvíce u Cys89 a Cys168), kromě Cys157, což lze opět vidět v poklesech, respektive nárůstu hodnoty β_{short} oproti fosforylované formě Pdc-PP. Pro pomalé pohyby zahrnující celkovou rotaci molekuly (ϕ_4) byly přiřazeny pouze malé hodnoty amplitud β_4 (0,010 – 0,065) kvůli vysoké lokální pohyblivosti AEDANS skupin, což vedlo k téměř okamžité kompletní depolarizaci emitovaného záření. V roztoku se kromě vzorku vyskytovaly i agregáty, kterým

odpovídaly hodnoty amplitud $\beta_4 \sim 0,01 - 0,02$, proto nebylo možné přesně určit hodnoty ϕ_4 a nebylo s nimi při vyhodnocování počítáno.

Na *Obr. 5.18* a *5.19* na str. 80 a 81 je zobrazen pokles anizotropie fluorescence pro mutantní formy fosducinu obsahující pouze Cys89, respektive Cys168, pro vzorky obsahující nefosforylovaný fosducin, jeho fosforylovanou verzi (*Obr. 5.18A*, *5.19A* na str. 80 a 81) a následně změnu dohasínání anizotropie po vazbě proteinu 14-3-3 ζ noW (*Obr. 5.18B*, *5.19B* na str. 80 a 81). Z obou obrázků lze vidět, že samotná fosforylace způsobila malé zvýšení rychlosti poklesu anizotropie jednotlivých AEDANS skupin, což vypovídá o jejich větší pohyblivosti, jak bylo řečeno výše. Naopak vazba proteinu 14-3-3 způsobila snížení rychlosti poklesu anizotropie fluorescence, což vypovídá o snížení flexibility obou fluoroforů. Při smíchání nefosforylované formy fosducinu se 14-3-3 ζ Δ C (*Obr. 5.18C* a *5.19C* na str. 80 a 81) nedošlo ani v jednom případě ke změně v rychlosti poklesu anizotropie fluorescence, takže přítomnost 14-3-3 ζ Δ C nemá vliv na anizotropii mutantních forem nefosforylovaného PdcQ52K.



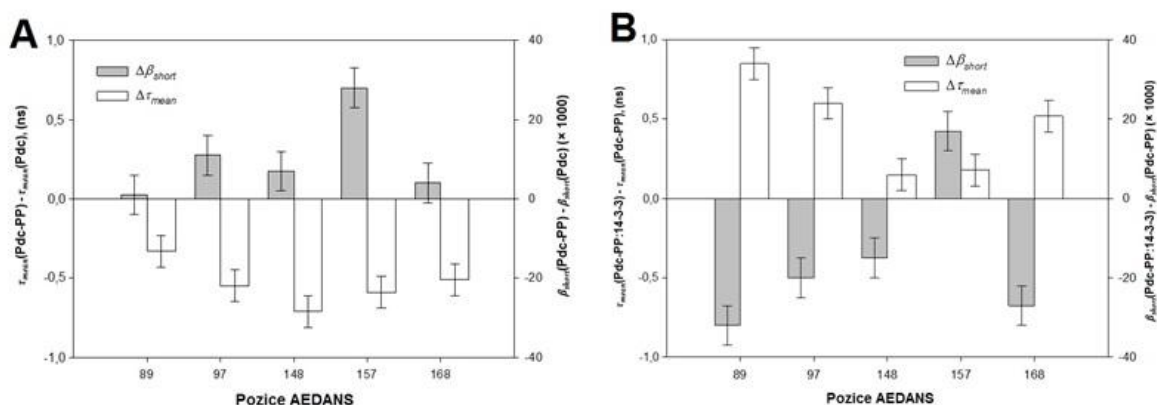
Obr. 5.18 Změna v rychlosti poklesu anizotropie fluorescence AEDANS u mutantní formy PdcQ52K obsahující jeden cysteinový zbytek Cys89. (A) Efekt fosforylace na pokles anizotropie fluorescence AEDANS. Plná kolečka (●) představují anizotropii nefosforylovaného fosducinu, prázdná kolečka (○) fosforylovaného fosducinu. (B) Efekt vazby proteinu 14-3-3 ζ Δ C na pokles anizotropie fluorescence AEDANS. Prázdná kolečka (○) představují anizotropii fosforylovaného fosducinu, plná kolečka (●) fosforylovaného fosducinu po vazbě se 14-3-3 ζ Δ C. (C) Vliv vazby 14-3-3 ζ Δ C na nefosforylovaný fosducin je nulový. Prázdná kolečka (○) představují anizotropii nefosforylovaného fosducinu, plná kolečka (●) nefosforylovaného fosducinu po smíchání se 14-3-3 ζ Δ C.



Obr. 5.19 Změna v rychlosti poklesu anizotropie fluorescence AEDANS u mutantní formy PdcQ52K obsahující jeden cysteinový zbytek Cys168. (A) Efekt fosforylace na pokles anizotropie fluorescence AEDANS. Plná kolečka (●) představují anizotropii nefosforylovaného fosducinu, prázdná kolečka (○) fosforylovaného fosducinu. (B) Efekt vazby proteinu 14-3-3ζΔC na pokles anizotropie fluorescence AEDANS. Prázdná kolečka (○) představují anizotropii fosforylovaného fosducinu, plná kolečka (●) fosforylovaného fosducinu po vazbě se 14-3-3ζΔC. (C) Vliv vazby 14-3-3ζΔC na nefosforylovaný fosducin je nulový. Prázdná kolečka (○) představují anizotropii nefosforylovaného fosducinu, plná kolečka (●) nefosforylovaného fosducinu po smíchání se 14-3-3ζΔC.

Obrázek 5.20 na str. 82 představuje shrnutí výsledků z měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence a poklesu anizotropie fluorescence AEDANS a důkaz, že vazba 14-3-3ζΔC ovlivňuje strukturu fosducinu v jeho Pdc-ND-PP i Pdc-CD a to přímo, skrz fyzický kontakt. Na tomto obrázku jsou zobrazeny změny střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} jednotlivých AEDANS skupin navázaných na cysteinových zbytcích mutantních forem PdcQ52K obsahujících jediný cysteinový zbytek a to jak po fosforylaci (Obr. 5.20A), tak po vazbě proteinu 14-3-3ζΔC (Obr. 5.20B). Na obrázku jsou také zobrazeny celkové změny v amplitudách rychlých pohybů (β_{short}) pro výše zmíněné vzorky. Z Obr. 5.20A lze vidět, že pokles v τ_{mean} , způsobený fosforylací fosducinu, byl pozorován u všech AEDANS pozic, nejvíc pak u Cys148, který se nachází v Pdc-CD. Nejvyšší nárůst v β_{short} byl pozorován u Cys157, který se také nachází v Pdc-CD. Vazba 14-3-3ζΔC naopak způsobila nárůst τ_{mean} ve všech případech, jak lze vidět na Obr. 5.20B, nejvíce v pozicích Cys89, Cys97 v Pdc-ND a Cys168, který se nachází v Pdc-CD. Poklesy β_{short} byly pozorovány ve všech případech, kromě Cys157, jak již bylo zmíněno výše. Největší poklesy byly opět pozorovány jak v Pdc-ND-PP (Cys89), tak v Pdc-CD (Cys168). Opačný trend v τ_{mean} a β_{short} vypovídá o pozitivní korelaci mezi segmentální flexibilitou a přístupností AEDANS skupin okolnímu (polárnímu) roztoku. Zvýšení τ_{mean} AEDANS totiž odpovídá nižšímu vystavení fluoroforu okolnímu roztoku, což je pravděpodobně způsobeno přímým fyzickým kontaktem fluoroforu s proteinem 14-3-3ζΔC, nebo s jinou

částí molekuly Pdc, a tento proces vede zároveň ke snížení flexibility příslušného segmentu, což se projeví snížením hodnoty β_{short} .



Obr. 5.20 Zobrazení změn ve středních dobách života excitovaného stavu τ_{mean} AEDANS navázaných na cysteinových zbytcích fosducinu (Pdc, konkrétně PdcQ52K) v různých pozicích (Cys89, Cys97, Cys148, Cys157 a Cys168) a celkových změn v amplitudách rychle se pohybujících komponent AEDANS ($\beta_{short} = \beta_1 + \beta_2$) získaných pomocí metody maximální entropie [198] z dat poklesu anizotropií fluorescence. (A) Změny vyvolané fosforylací fosducinu (Pdc-PP) na Ser54 a Ser73. (B) Změny indukované vazbou 14-3-3 ζ ΔC na fosforylovaný fosducin.

5.3.4.2 Pokles anizotropie tryptofanové fluorescence

Stejně jako v případě fluoroforů AEDANS vázaných na jednotlivé cysteinové zbytky fosducinu byl proměřen i časově-rozlišený pokles anizotropie fluorescence tryptofanových zbytků obsažených v molekule fosducinu, jako logické vyústění faktu, že fosforylace fosducinu a jeho vazba s proteinem 14-3-3 ζ noW vedla ke změnám hodnot střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} jednotlivých tryptofanových zbytků, jakožto ukazatele polarity okolí daného tryptofanového zbytku (viz kapitola 5.3.3.2). Změna polarity okolí může souviset se změnami pohybů a přístupnosti daných tryptofanových zbytků, proto bylo vhodné tuto domněnku ověřit. Jednalo se o stejné pozice tryptofanových zbytků, jako v případě měření dohasínání intensity fluorescence (viz kapitola 5.3.3.2). Všechny měřené tryptofanové zbytky vykazovaly složené dohasínání anizotropie (ne s pouze jednoduchým monoexponenciálním poklesem). Pro každý z tryptofanových zbytků byly nalezeny tři třídy rotačních korelačních časů, které příslušely různým typům pohybů tryptofanových zbytků v různých pozicích Pdc. Krátké korelační časy ϕ_1 (0,3 – 0,9 ns) a ϕ_2 (1,4 – 3,0 ns) odpovídají rychlým lokálním pohybům tryptofanových zbytků. Časy v rozmezí 15 - 71 ns (ϕ_3) odpovídají celkové rotační difuzi molekuly Pdc. V *Tabulce 5.10* na str. 83 jsou zobrazeny výsledky z těchto měření.

Tabulka 5.10 Výsledky z měření poklesu anizotropie tryptofanové fluorescence

Mutant PdcQ52K	Vzorek	β_1^a	ϕ_1^b (ns)	β_2^a	ϕ_2^b (ns)	β_3^a	ϕ_3^b (ns)
Trp29	ne-PP	0,045	0,5	0,094	2,4	0,061	36
	PP	0,057	0,4	0,102	2,7	0,043	36
	PP + 14-3-3 ^c	0,028	0,4	0,067	1,8	0,108	71
Trp93	ne-PP	0,065	0,6	0,048	3,2	0,086	22
	PP	0,055	0,9	0,050	3,0	0,091	23
	PP + 14-3-3 ^c	0,022	0,3	0,044	1,8	0,137	51
Trp107	ne-PP	0,034	0,3	0,045	1,6	0,122	33
	PP	0,035	0,4	0,043	1,9	0,120	34
	PP + 14-3-3 ^c	0,029	0,8	0,036	1,5	0,137	54
Trp123	ne-PP	0,036	0,6	-	-	0,160	20
	PP	0,031	0,4	-	-	0,170	20
	PP + 14-3-3 ^c	0,017	0,4	0,019	1,4	0,166	32
Trp208	ne-PP	0,081	0,6	-	-	0,116	15
	PP	0,074	0,5	-	-	0,124	16
	PP + 14-3-3 ^c	0,047	0,8	0,013	2,2	0,142	36

^aSměrodatná odchylka < 0,01.

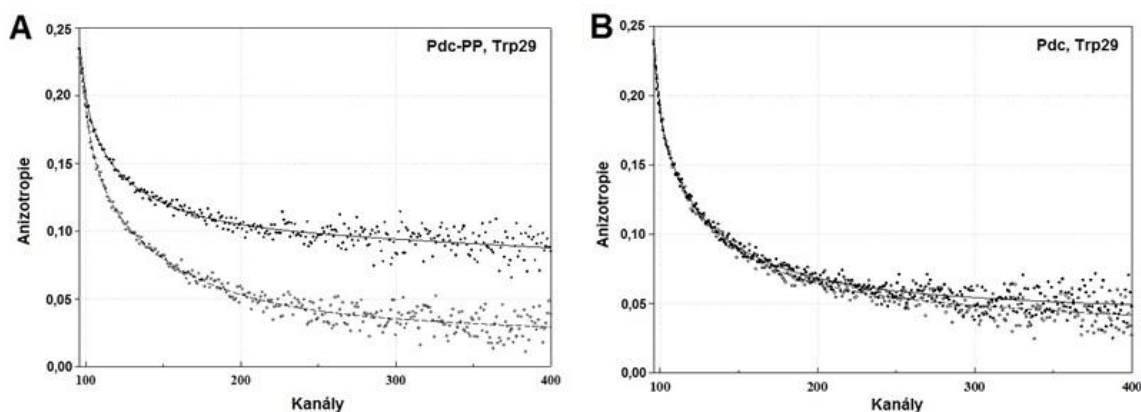
^bSměrodatná odchylka < 20 %.

^cPro měření byla použita mutantní forma proteinu 14-3-3 ζ , 14-3-3 ζ noW (mutace W59F a W228F), označení PP značí fosforylaci na obou fosforylačních místech Pdc (Ser54, Ser73).

Hlavní ukazatele ve změnách segmentálních pohybů představují příslušné amplitudy β . Rychlým pohybům byly přiřazeny amplitudy β_1 a β_2 , které představují příspěvek daného rotačního korelačního času ϕ_1 , respektive ϕ_2 k celkové anizotropii fluorescence. Amplitudy byly získány metodou maximální entropie (MEM) [198]. Pro oba typy rychlých pohybů byla zvolena amplituda β_{short} (*short*, z angl. *krátký*) jako součet amplitud β_1 a β_2 , a představovala míru změn v segmentální pohyblivosti jednotlivých tryptofanových zbytků. β_3 pak byla vyjádřena jako $r_0 - \beta_{short}$ a vnitřní pohyby bylo vhodné vyhodnocovat právě na základě β_3 kvůli její větší přesnosti. Fosforylace zvýšila flexibilitu Trp29, jak lze vidět v *Tabulce 5.10* z poklesu hodnoty β_3 mezi fosforylovanou a nefosforylovanou formou fosducinu. U ostatních tryptofanových zbytků se flexibilita po fosforylaci téměř nezměnila. Vazba 14-3-3 naopak flexibilitu snížila u všech tryptofanových zbytků, kromě Trp123, nejvíce u Trp29, což lze opět vidět ze zvýšení hodnot β_3 oproti fosforylované formě Pdc-PP.

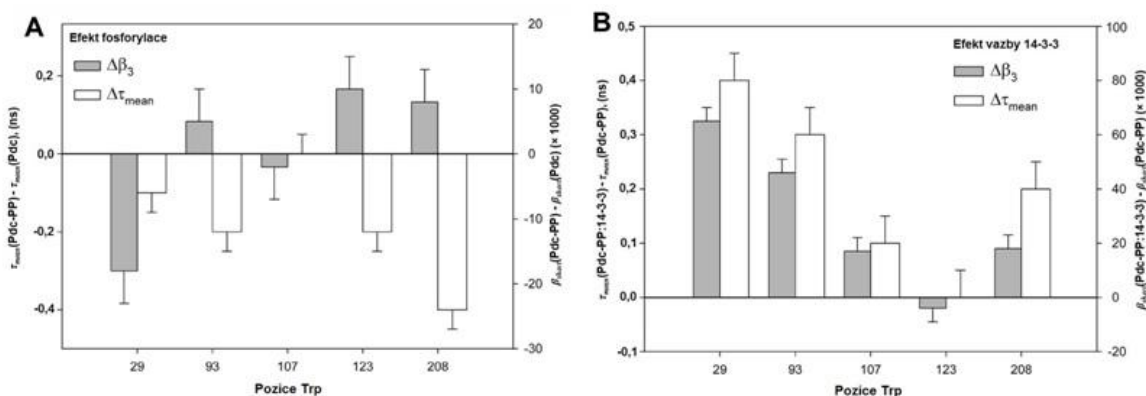
Na *Obr. 5.21* na str. 84 je zobrazen pokles anizotropie fluorescence pro PdcQ52K obsahující Trp29, pro vzorky obsahující nefosforylovaný fosducin ve směsi se 14-3-3 ζ noW a jeho fosforylovanou verzí se 14-3-3 ζ noW (*Obr. 5.21B* a *5.21A*). Z obrázků lze vidět, že anizotropie Trp29 nefosforylovaného fosducinu téměř není ovlivněna přítomností

14-3-3 ζ noW, naopak díky vzniku vazby mezi fosforylovaným fosducinem (Pdc-PP) a 14-3-3 ζ noW se rychlost poklesu anizotropie fosducinového Trp29 snížila.



Obr. 5.21 Změna v rychlosti poklesu anizotropie fluorescence Trp29 u mutantní formy PdcQ52K obsahující jeden tryptofanový zbytek. (A) Prázdná kolečka (○) představují data pro samotný fosforylovaný fosducin (Pdc-PP), plná kolečka (●) představují data pro Pdc-PP v přítomnosti 14-3-3 ζ noW. (B) Prázdná kolečka (○) představují data pro samotný nefosforylovaný fosducin (Pdc), plná kolečka (●) představují data pro Pdc v přítomnosti 14-3-3 ζ noW.

Obrázek 5.22 na str. 85 představuje shrnutí výsledků z měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence a poklesu anizotropie fluorescence tryptofanových zbytků a důkaz, že vazba 14-3-3 ζ noW ovlivňuje strukturu fosducinu v jeho Pdc-ND-PP i Pdc-CD a to přímo, skrz fyzický kontakt. Na tomto obrázku jsou zobrazeny změny ve střední době života excitovaného stavu τ_{mean} jednotlivých tryptofanových zbytků PdcQ52K a to jak po fosforylaci (Obr. 5.22A), tak po vazbě proteinu 14-3-3 ζ noW (Obr. 5.22B). Na obrázku jsou také zobrazeny celkové změny v amplitudách pomalých interních pohybů (β_3) pro výše zmíněné vzorky. Z Obr. 5.22A lze vidět, že pokles v τ_{mean} , způsobený fosforylací fosducinu, byl pozorován u všech pozic tryptofanových zbytků, kromě Trp107, nejvíce pak u Trp208, který se nachází v Pdc-CD. Pokles β_3 související s vyšší mobilitou byl pozorován u Trp29. Vazba 14-3-3 ζ noW naopak způsobila nárůst τ_{mean} ve všech případech, kromě Trp123, jak lze vidět na Obr. 5.22B, nejvíce v pozicích Trp29 a Trp93, ale také Trp208, který se nachází v Pdc-CD. Vzrůst hodnot β_3 , související s omezením pomalých pohybů celé molekuly fosducinu, byl pozorován ve všech případech, kromě Trp123, jak již bylo zmíněno výše. Největší vzrůst byl opět pozorován jak v Pdc-ND-PP (Trp29, Trp93), tak v Pdc-CD (Trp208).



Obr. 5.22 Zobrazení změn ve středních dobách života excitovaného stavu τ_{mean} tryptofanových zbytků obsažených v molekule fosducinu (Pdc, konkrétně PdcQ52K) v různých pozicích (Trp29, Trp93, Trp107, Trp123 a Trp208), a celkových změn v amplitudách pomalu se pohybujících komponent tryptofanů (β_3) vyplývajících z poklesů anizotropií fluorescence. (A) Změny vyvolané fosforylací fosducinu (Pdc-PP) na Ser54 a Ser73. (B) Změny indukované vazbou 14-3-3čnoW na fosforylovaný fosducin.

Z rotačního korelačního času ϕ_3 pro Trp29 byla vypočítána hodnota hydrodynamického poloměru R_H Pdc, Pdc + 14-3-3, Pdc-PP a komplexu podle rovnice

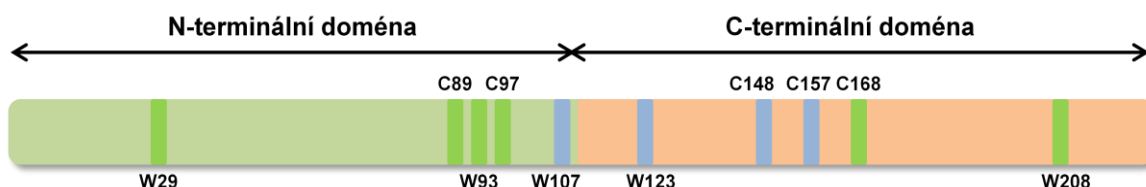
$$\phi_3 = \frac{\eta V}{kT}, \quad (\text{rovnice 5.1})$$

kde η je viskozita vody, T je termodynamická teplota, k je Boltzmannova konstanta a V je objem sférického rigidního rotoru daný rovnicí 5.2

$$V = \frac{4}{3} \pi R_H^3 \quad (\text{rovnice 5.2})$$

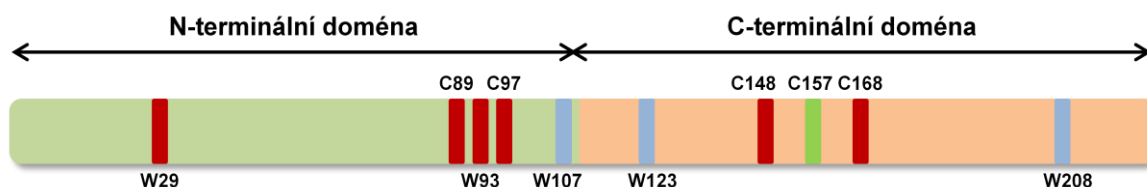
Byly získány následující hodnoty R_H : 34 Å (Pdc), 41 Å (Pdc + 14-3-3), 34 Å (Pdc-PP), 43 Å (komplex), které dobře odpovídají hodnotám z DLS (viz kapitola 5.3.2).

Obr. 5.23 zobrazuje, u kterých fluoroforů obsažených v molekule PdcQ52K a mutantních forem, došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení (zelené pruhy) τ_{mean} . Zvýšená hodnota τ_{mean} naznačuje přímý fyzický kontakt se 14-3-3.



Obr. 5.23 Schematické znázornění molekuly fosducinu s vyznačenými pozicemi fluoroforů, u kterých došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} (zelené pruhy). Modré pruhy odpovídají pozicím fluoroforů, u kterých došlo k minimální, nebo žádné změně τ_{mean} po vazbě 14-3-3.

Obr. 5.24 zobrazuje, u kterých fluoroforů obsažených v molekule PdcQ52K a jeho mutantních forem došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení (zelené pruhy), nebo snížení (červené pruhy) pohyblivosti dané buď změnou hodnoty β_{short} , nebo změnou hodnoty β_3 . Zvýšená pohyblivost rychlých lokálních pohybů odpovídá zvýšení hodnoty β_{short} . Zvýšená rotační difuze celé molekuly odpovídá snížení hodnoty β_3 .



Obr. 5.24 Schematické znázornění molekuly fosducinu s vyznačenými pozicemi fluoroforů, u kterých došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení (zelené pruhy) nebo snížení (rudé pruhy) flexibility. Modré pruhy odpovídají pozicím fluoroforů, u kterých došlo k minimální, nebo žádné změně flexibility po vazbě 14-3-3.

5.3.5 Statické zhášení tryptofanové fluorescence

Jelikož z dynamických fluorescenčních měření vyplývá, že u některých fosducinových tryptofanových zbytků (mutantní formy PdcQ52K – W29, W29F Y93W, W29F F107W, W29F F123W, W29F F208W obsahující vždy jeden tryptofanový zbytek) pravděpodobně dochází k prostorové interakci s navázaným proteinem 14-3-3 ζ noW, rozhodli jsme se ověřit jejich přístupnost okolnímu roztoku po vazbě 14-3-3 ζ noW pomocí statického zhášení tryptofanové fluorescence, kde jako zhášedlo sloužil roztok akrylamidu. Pro jednotlivé mutantní formy byl vždy připraven vzorek fosforylovaného (-PP) fosducinu, který byl zhášen roztokem akrylamidu v pufru o stejném složení, a následně byl zhášen vzorek fosducinu s proteinem 14-3-3 ζ noW v molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 váže jednu molekulu Pdc). Naměřené intenzity byly korigovány na fluorescenci pufru, změnu objemu a efekt vnitřního filtru a využity k získání Stern-Volmerova výnosu (viz kapitola 9.1.2), ze kterého byly získány hodnoty Stern-Volmerových konstant K_{SV} . Hodnoty K_{SV} spolu s hodnotami τ_{mean} získanými z časově-rozlišených měření byly použity pro výpočet hodnot bimolekulárních zhášecích konstant k_q (viz kapitola 9.1.2). Výsledky jsou zobrazeny v *Tabulce 5.11* na str. 87.

Tabulka 5.11 Výsledky ze statického zhášení Trp fluorescence akrylamidem

Mutantní forma PdcQ52K-PP	$k_q \times (10^{-9} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})^{a,b}$
Trp29	2,08 ± 0,06
Trp29 + 14-3-3ζnoW^c	1,07 ± 0,03
Trp93	1,12 ± 0,03
Trp93 + 14-3-3ζnoW^c	0,73 ± 0,05
Trp107	1,35 ± 0,04
Trp107 + 14-3-3ζnoW^c	0,98 ± 0,08
Trp123	0,63 ± 0,02
Trp123 + 14-3-3ζnoW^c	0,67 ± 0,02
Trp208	0,43 ± 0,07
Trp208 + 14-3-3ζnoW^c	0,29 ± 0,01

^aPro srovnání, bimolekulární zhášecí konstanta Trp ve vodném prostředí je $k_q = 5,9 \times 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [199].

^bBimolekulární zhášecí konstanta k_q byla vypočtena za použití rovnice 9.4 na str. 219.

^cPro měření byla použita mutantní forma proteinu 14-3-3ζ, 14-3-3ζnoW (mutace W59F a W228F).

Zvýšení hodnoty k_q lze interpretovat jako lepší přístup zhášedla k fluoroforu a tedy účinnější zhášení. Největší pokles k_q po vazbě 14-3-3ζnoW byl pozorován u Trp29, který je prostorově blízký oběma fosforylačním místům (Ser54 a Ser73) a hraje roli i v jiných biochemických procesech. Toto snížení hodnoty k_q je pravděpodobně důsledkem interakce Trp29 s dimerem 14-3-3ζnoW, nebo jinou částí fosducinu v důsledku strukturní změny po vazbě 14-3-3ζnoW. Pokles hodnoty k_q byl pozorován i u Trp93, Trp107 a nepatrně také Trp208, který se nachází v Pdc-CD, což může potvrzovat naši domněnku, že Pdc-CD interaguje se 14-3-3. Z těchto výsledků je tedy patrné, že Trp29, Trp93, Trp107 a Trp208 se buď účastní přímých kontaktů s proteinem 14-3-3, nebo se nacházejí v blízkosti jeho povrchu.

5.3.6 Mapování interakčního rozhraní komplexu 14-3-3/Pdc-PP metodou výměny H/D spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)

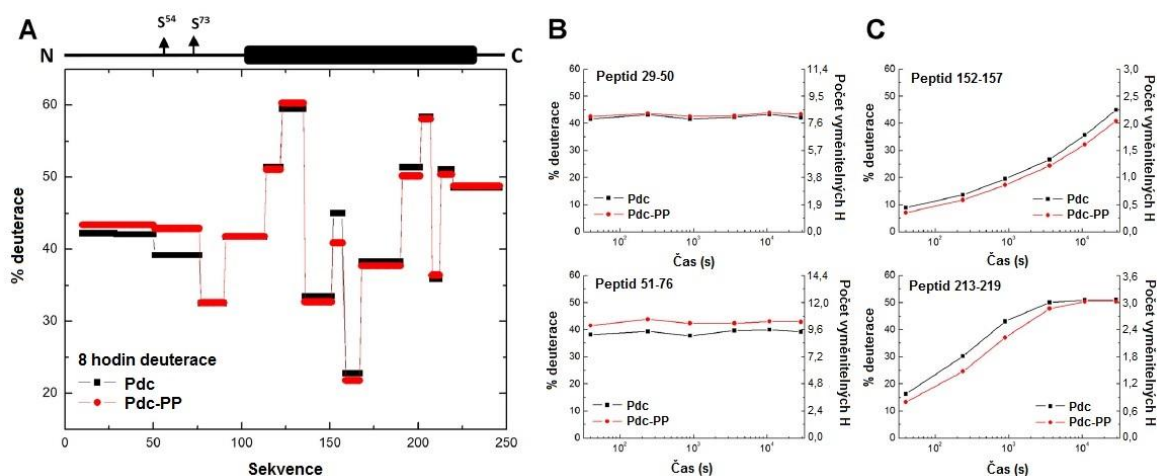
HDX-MS byla zvolena pro zmapování interakčního povrchu v komplexu 14-3-3ζΔC/PdcQ52K-PP a zmapování změn ve struktuře fosducinu po jeho fosforylaci. Metoda sleduje kinetiku deuterace určitých částí fosducinu a 14-3-3ζΔC, které jsou přístupné okolnímu rozpouštědлу obsahujícího D₂O, nebo naopak jemu nepřístupné. V místech molekuly proteinu, kde dochází ke stínění vazebným partnerem, nebo sebou samým v důsledku strukturní změny po vazbě partnera nebo fosforylaci, je nárůst deuterace v daném časovém intervalu pomalejší nebo žádný, než v nepřítomnosti vazebného partnera (viz kapitola 9.7.1). Pro tento účel byly připraveny vzorky

nefosforylovaného fosducinu PdcQ52K (dále jen Pdc), fosforylovaného fosducinu v místech Ser54 a Ser73 (Pdc-PP) a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 ζ ΔC v molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 s jednou molekulou Pdc) (14-3-3/Pdc-PP). Tyto vzorky byly podrobeny deuteraci po určitou stanovenou dobu (viz kapitola 4.9.1) a následně přeneseny na hmotnostní spektrometr, před kterým byl vzorek proteolyticky štěpen na kratší peptidy, jejichž hodnota m/z byla pozorována a porovnávána. Kinetika deuterace byla u proteinu 14-3-3 ζ ΔC pozorována celkem na 121 peptidech pokrývajících 100 % jeho aminokyselinové sekvence. U PdcQ52K bylo získáno celkem 87 peptidů, které taktéž pokrývají 100 % sekvence fosducinu.

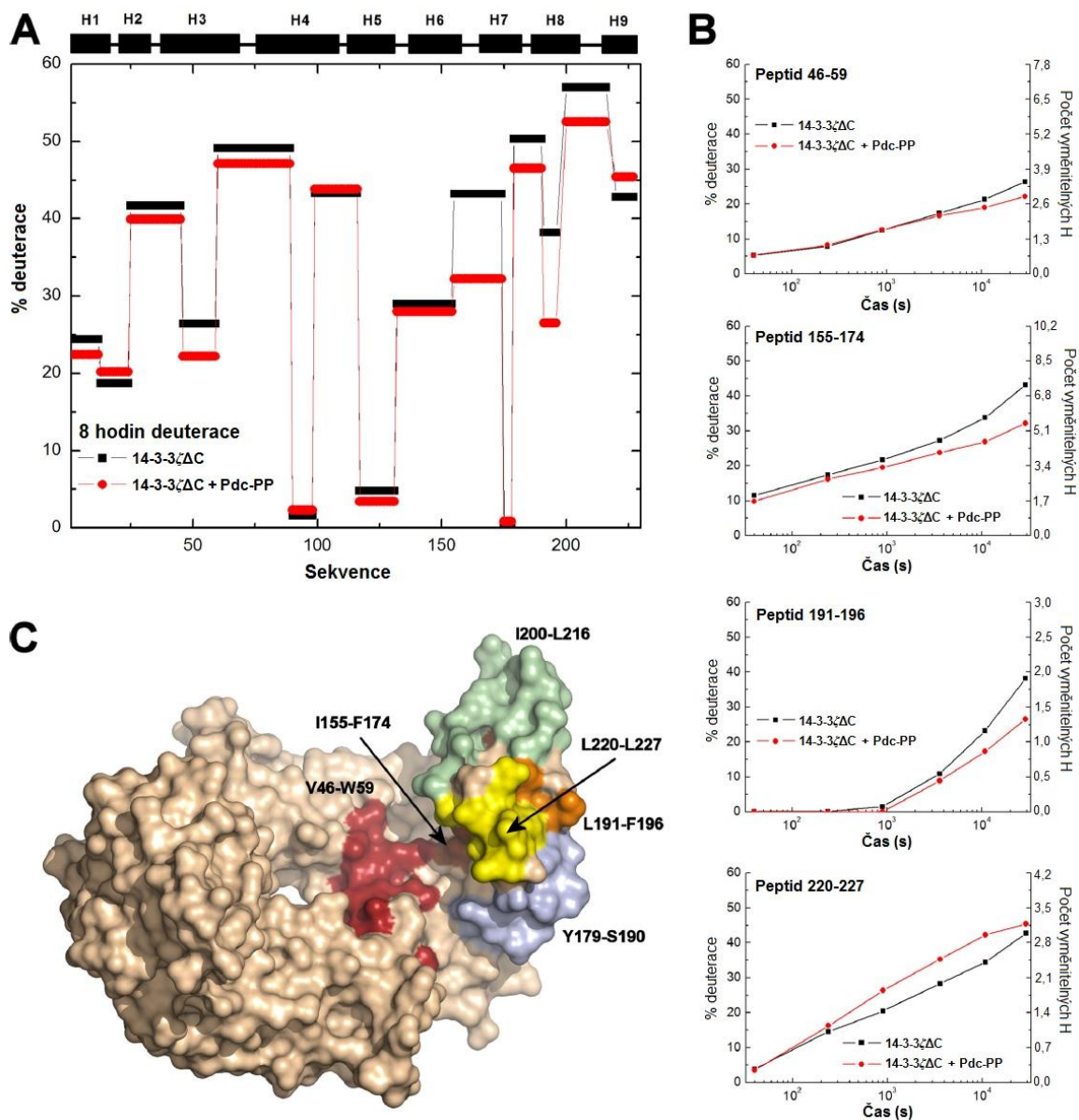
Získané výsledky ukazují, že samotná fosforylace má vliv na změnu kinetiky deuterace především v Pdc-ND (peptid 51-76) okolo fosforylačního motivu, což je zobrazeno na *Obr. 5.25A* na str. 89. Po fosforylaci byla pozorována vyšší hodnota deuterace po osmi hodinách, což nasvědčuje lepší přístupnosti tohoto peptidu okolnímu roztoku. Fosforylace má ale vliv i na Pdc-CD (peptidy 152-157 a 213-223), u kterých došlo k mírnému poklesu deuterace po fosforylaci, což nasvědčuje protekci těchto peptidů po fosforylaci. Tento výsledek potvrzuje naši domněnku, že u volného fosducinu Pdc-CD interaguje s Pdc-ND-PP, což naznačily i výsledky časově-rozlišených fluorescenčních měření a SAXS (viz kapitoly 5.3.3, 5.3.4, respektive 5.3.8). *Obr. 5.25B* na str. 89 zobrazuje typické chování neuspořádaného flexibilního proteinu, kde dochází k rychlé deuteraci. V tomto případě se jedná o peptidy obsažené v Pdc-ND (29-50, 51-76). Naopak *Obr. 5.25C* ukazuje postupný nárůst deuterace typický pro uspořádaný strukturovaný protein. V tomto případě se jedná o peptidy obsažené v Pdc-CD (152-157, 213-219). Pravá svislá osa u grafů *5.25B* a *C* zobrazuje počet vyměnitelných vodíků pro daný peptid. Pokud peptid obsahuje prolin (29-50), k výměně vodíku na něm nedochází.

Po vazbě 14-3-3 ζ ΔC nebyly na fosforylovaném fosducinu pozorovány příliš velké změny v kinetice deuterace. Tento jev je pravděpodobně důsledkem nepříliš signifikantních strukturních změn v rámci Pdc-PP po vazbě 14-3-3, dále možnosti, že si fosducin po vazbě ponechává svou flexibilitu, především v Pdc-ND, a tedy, že v rámci molekuly Pdc-PP nedochází k žádnému významnému vzniku oblastí, u kterých by docházelo ke strukturalizaci a vzniku prvků sekundární struktury. Flexibilní oblasti Pdc-ND podstupují velmi rychlou deuteraci, která je méně citlivá k protein-proteinové interakci. Dalším důvodem, proč nelze pozorovat změnu v deuteraci po vazbě na Pdc-PP může být skutečnost, že interakce mezi oběma proteiny jsou zprostředkovány převážně

elektrostatickými silami bočních řetězců, u kterých deuteraci nepozorujeme. Deuterace je totiž sledována pouze na amidických vodících hlavního řetězce. Naopak, určité změny byly pozorovány na molekule 14-3-3 ζ Δ C (peptidy 46-59, 155-174 a 191-196) a tyto oblasti, u kterých docházelo ke změně kinetiky deuterace, jsou zobrazeny na *Obr. 5.26* na str. 90. Výše zmíněné oblasti vykazují nižší hodnotu deuterace po vazbě Pdc-PP, tedy pomalejší výměnu vodíků za deuterium, způsobenou menším vystavením těchto peptidů roztoku, nebo zapojením amidických vodíků do vazby s Pdc-PP. Peptidy, u kterých došlo ke změně deuterace po osmi hodinách, jsou obsaženy jak ve vazebném žlábků dimeru proteinu 14-3-3 (helixy H3, H5 a H7, viz kapitola 2.4), tak ve vnějších povrchových částech (helixy H6 a H8, viz kapitola 2.4), což poukazuje na už dříve zmiňovanou domněnku, že fosducin (pravděpodobně Pdc-CD) interaguje i s vnějšími oblastmi 14-3-3. U peptidu 220-227 (obsažen v helixu H9, viz kapitola 2.4) byl pozorován opačný trend v deuteraci po vazbě s Pdc-PP, tedy vyšší deuteraci. Tento jev ale po krátkém čase vymizel.



Obr. 5.25 Zobrazení výsledků z HDX-MS po fosforylaci fosducinu. **(A)** Graf závislosti úrovně deuterace peptidů získaných proteolytickým štěpením PdcQ52K (Pdc, černá) a fosforylovaného PdcQ52K (Pdc-PP, červená) po osmi hodinách deuterace vzorků. Vrchní panel schematicky znázorňuje sekvenci Pdc s vyznačenými fosforylačními místy (Ser54 a Ser73) a rozlišenými domén (Pdc-ND a Pdc-CD). **(B)** Grafy znázorňující kinetiku deuterace dvou vybraných peptidů obsažených v Pdc-ND (černá) a fosforylované Pdc-ND (červená). **(C)** Grafy znázorňující kinetiku deuterace dvou vybraných peptidů obsažených v Pdc-CD (černá) a ve fosforylovaném fosducinu Pdc-CD (červená). Úroveň deuterace je vyjádřena jako procento vztažené k maximální možné teoretické deuteraci daného peptidu (levá vertikální osa) a také počtem vyměněných vodíků pro daný peptid (pravá vertikální osa).

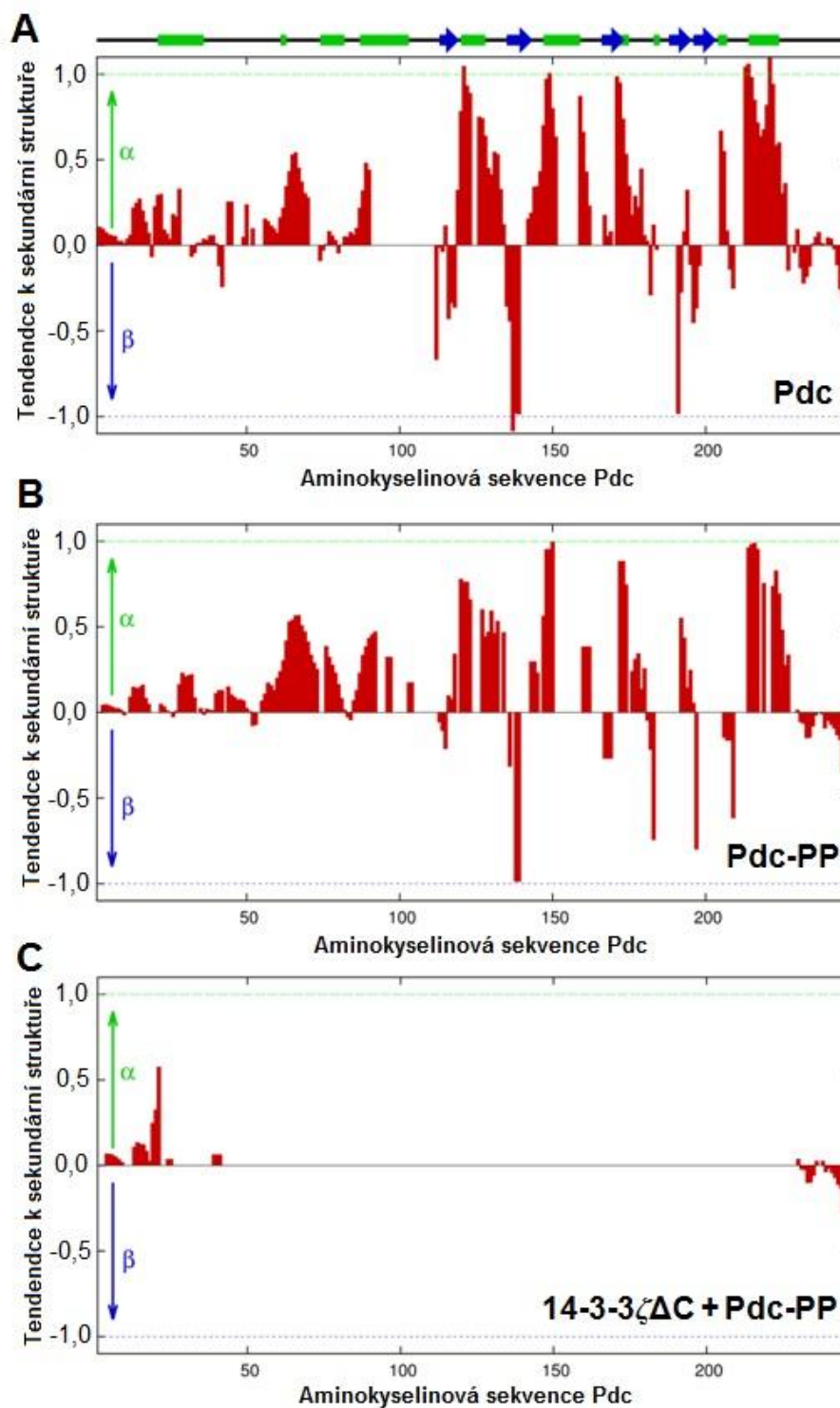


Obr. 5.26 Zobrazení výsledků z HDX-MS na 14-3-3 ζ ΔC po vazbě fosforylovaného fosducinu PdcQ52K (Pdc-PP) v molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 váže jednu molekulu Pdc-PP). (A) Graf závislosti úrovně deuterace peptidů získaných proteolytickým štěpením samotného 14-3-3 ζ ΔC (černá) a 14-3-3 ζ ΔC vázaného v komplexu s fosforylovaným Pdc-PP (červená) po osmi hodinách deuterace vzorků. Vrchní panel schematicky znázorňuje sekvenci monomeru 14-3-3 ζ ΔC s vyznačenými α -helixy (H1 – H9). (B) Grafy znázorňující kinetiku deuterace čtyř vybraných peptidů obsažených ve 14-3-3 ζ ΔC. Úroveň deuterace je vyjádřena jako procento vztažené k maximální možné teoretické deuteraci daného peptidu (levá vertikální osa) a také počtem vyměněných vodíků pro daný peptid (pravá vertikální osa). (C) Na povrchové reprezentaci jsou barvami zvýrazněny peptidy obsažené v proteinu 14-3-3 ζ ΔC, u kterých dochází po vazbě Pdc-PP ke změně kinetiky deuterace. Obarveny jsou pouze peptidy na jednom ze dvou řetězců dimeru 14-3-3 [117].

5.3.7 Nukleární magnetická rezonance (NMR) měřená na komplexu

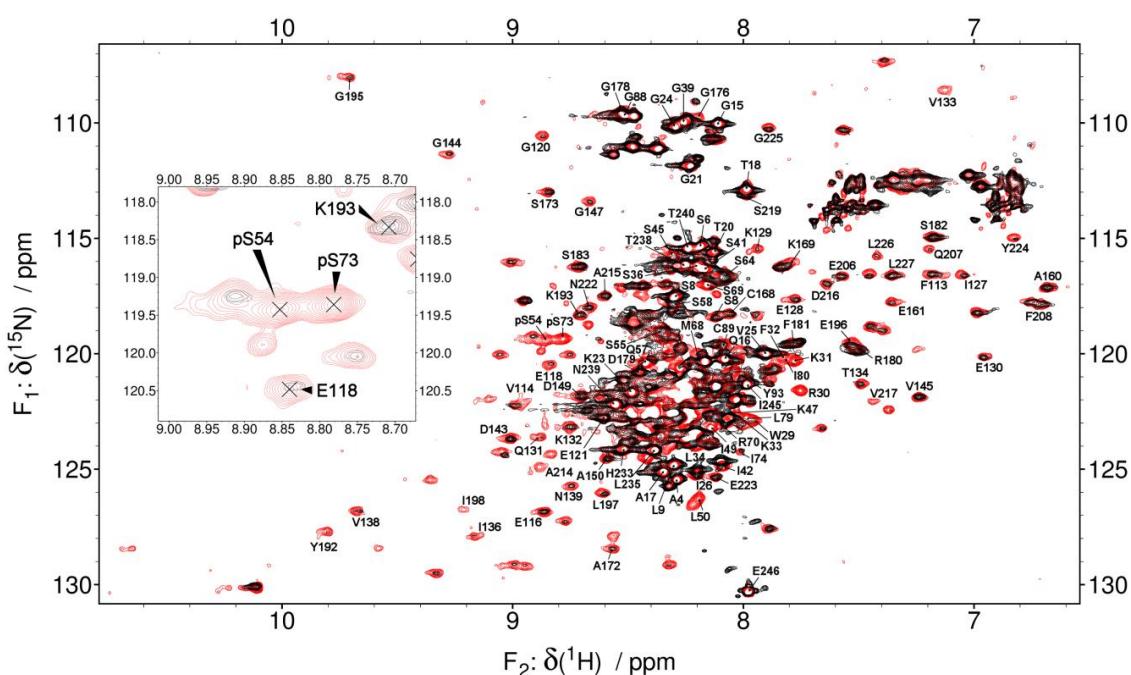
K hlubšímu porozumění podstaty vazby mezi fosducinem PdcQ52K (Pdc) a proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C byla vybrána metoda nukleární magnetické rezonance (NMR). Metoda také posloužila k záznamu případných změn ve struktuře Pdc po jeho fosforylaci (Pdc-PP) a přesnějšímu popisu struktury komplexu.

^1H - ^{15}N HSQC spektra měřená na samotném Pdc a jeho samotné C-terminální doméně (Pdc-CD) (viz kapitola 5.2.6) umožnila přiřazení sekvence Pdc-CD jednotlivým hodnotám signálů a také ukázala přítomnost prvků sekundární struktury, které byly u Pdc pozorovány v komplexu s $G_i\beta\gamma$ (PDB 2TRC). Výsledky jsou zobrazeny na *Obr. 5.27A* na str. 92. Pro přiřazení signálů aminokyselinové sekvence Pdc-ND posloužily dva 5D experimenty (HN(CA)CONH a HabCabCONH). Z *Obr. 5.27A* je patrné, že pouze regiony v oblasti residuí 66 a 89 vykazují tendenci ke vzniku α -helikální struktury, ostatní regiony Pdc-ND zůstávají flexibilní a spíše nestrukturované. Stejně NMR experimenty měřené na Pdc-PP s fosforylovaným Ser54 a Ser73 ukázaly, že Pdc-ND zůstává po fosforylaci neuspořádaná a flexibilní s α -helikální tendencí ve stejných regionech, jako v případě Pdc, ovšem s novou tendencí ke tvorbě α -helixu v oblasti Ser73, jak lze vidět na *Obr. 5.27B* na str. 92. Samotná fosforylace má tedy minimální vliv na strukturu Pdc. Tyto výsledky jsou konzistentní s výsledky získanými z HDX-MS a časově-rozlišených měření dohasínání fluorescence. Dále byl měřen Pdc-PP spolu se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C v minimálním molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 s jednou molekulou Pdc), kde izotopově značen byl pouze Pdc-PP, ale celková molekulová hmotnost komplexu byla téměř 90 kDa. Z tohoto důvodu docházelo k pomalé rotaci komplexu v roztoku a tudíž k rozšíření signálů a snížení jejich intenzity. Ve 3D spektrech tedy byla pozorována pouze residua 1-35, 39-41 a 230-246, jak lze vidět na *Obr. 5.27C*. Tento jev naznačuje, že zmíněná residua zůstávají v komplexu flexibilní a jsou pravděpodobně v minimálním, nebo žádném kontaktu se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.



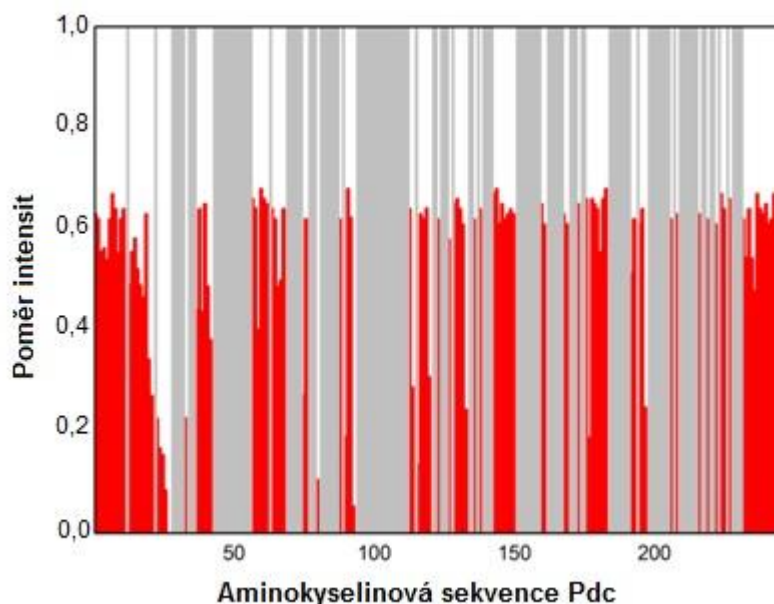
Obr. 5.27 Tendence ke vzniku prvků sekundární struktury (2°) na Pdc. (A) Tendence ke vzniku 2° na samotném Pdc získané z chemických posuvů CA, CB, CO, N a HA. Kladné hodnoty představují tendenci ke tvorbě α -helixu, záporné ke tvorbě β -listu a rozvolněnějších struktur. Válce a šípky v horní části panelu představují α -helixy, respektive β -listy na molekule Pdc obsažené v komplexu s $G_\beta\gamma$ [2]. (B) Tendence ke vzniku 2° na samotném Pdc-PP. (C) Tendence ke vzniku 2° na Pdc-PP získané z CA chemických posuvů ze 3D HNCA spektra komplexu 14-3-3 ζ Δ C:Pdc-PP (molární poměr 2:1).

Dále byla měřena 2D ^1H - ^{15}N TROSY spektra samotného Pdc-PP a Pdc-PP vázaného v komplexu se 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ (viz Obr. 5.28). Z Obr. 5.28 je patrné, že po vazbě 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ nedochází u C-terminální domény Pdc-PP k žádným výrazným strukturním změnám. Některé signály příslušející residuům z Pdc-ND, včetně obou fosforylovaných serinů (Ser54 a Ser73), vymizely po vazbě se 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$, ovšem u ostatních nebyl pozorován žádný výrazný posun ve frekvenci, porovnáme-li spektrum samotného Pdc-PP a vázaného Pdc-PP. Tento fakt nasvědčuje naší domněnce, že residua nacházející se mezi oběma fosforylovanými seriny (Ser54 a Ser73) zůstávají i po vazbě flexibilní. Dále lze ze spektra usuzovat, že Pdc-ND a C-konec Pdc-CD zůstávají i po vazbě se 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ nestrukturovaní, což odpovídá malému rozlišení příslušných signálů seskupených uprostřed spektra před vazbou i po vazbě. Takovéto chování vykazují tzv. „fuzzy“ komplexy, u kterých nedochází k výrazné strukturalizaci nestrukturovaného vazebného partnera, naopak partner zůstává značně flexibilní a případně takto přístupný jiným vazebným partnerům [3]. Pro „fuzzy“ komplexy tedy nelze získat statický strukturní model, ovšem lze získat několik modelů odpovídajících nejpravděpodobnějším a nejčastěji se vyskytujícím konformacím.



Obr. 5.28 ^1H - ^{15}N TROSY spektrum Pdc-PP v nepřítomnosti (černá) a přítomnosti (červená) 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ (molární poměr 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$:Pdc-PP = 2:1). Pro přehlednost nejsou popsány všechny signály ve střední části spektra. Vložený graf ukazuje přibližný pohled na signály obou fosforylovaných serinů (Ser 54 a Ser 73).

Pro přesnější charakterizaci oblastí vzájemně interagujícího Pdc-PP a 14-3-3 ζ Δ C byla zvolena metoda PRE NMR (z angl. *Paramagnetic Relaxation Enhancement NMR*). Byl připraven ^{15}N -značený PdcQ52K-PP, který byl smíchán s nadbytkem mutantní formy 14-3-3 ζ Δ C obsahující pouze jeden cysteinový zbytek Cys189 (mutace 14-3-3 ζ Δ C C25A C94A). Minimální molární poměr 14-3-3 ζ Δ C:Pdc-PP byl 2:1. Na Cys189 byla kovalentně připevněna paramagnetická značka (IPSL, Sigma-Aldrich) a vzorek komplexu byl změřen jak pro oxidovanou (paramagnetickou), tak pro redukovanou (diamagnetickou) formu IPSL jako ^1H - ^{15}N TROSY spektrum. Přítomnost paramagnetické značky ve vzorku způsobuje snížení a rozšíření signálů aminokyselin nacházejících se v blízkém okolí této značky. Na základě porovnání intenzit z obou vzorků lze tedy usuzovat na vzájemnou prostorovou blízkost Cys189 obsaženého ve 14-3-3 ζ Δ C a okolních residuí obsažených v Pdc-PP. Na Obr. 5.29 jsou zobrazeny výsledky z těchto měření.



Obr. 5.29 Výsledky z měření získané metodou PRE NMR na ^{15}N -Pdc-PP vázaném v komplexu se 14-3-3 ζ Δ C Cys189, na kterém je kovalentně navázána paramagnetická značka IPSL v oxidovaném nebo redukovaném stavu. Graf zobrazuje poměr intenzit signálů Pdc-PP ve vzorku obsahujícím redukovanou/oxidovanou formu IPSL (červená). Šedými místy jsou vyznačena residua, jejichž signály nebyly pomocí ^1H - ^{15}N TROSY měření přiřaditelné.

Obr. 5.29 ukazuje, že residua 16 - 26 obsažená v Pdc-ND se nacházejí v prostorové blízkosti Cys189 obsaženého ve 14-3-3 ζ Δ C. Cys189, na který je navázán IPSL, se nachází na N-konci helixu H8, blízko smyčky mezi helixy H7 a H8. Oblast obsažená v Pdc-ND, která se nachází v prostorové blízkosti Cys189 proteinu 14-3-3 ζ Δ C, zahrnuje velký vazebný povrch s $G_{\gamma}\beta_{\gamma}$ [2], což může nasvědčovat tomu, že 14-3-3 ζ plní v této vazbě roli

nejen jako kompetitor s $G\beta\gamma$ o Pdc-PP, ale může také chránit tuto oblast před proteolytickým štěpením.

5.3.8 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) měřený na komplexu

K získání strukturního modelu komplexu 14-3-3 ζ ΔC/PdcQ52K-PP byla vybrána metoda SAXS, jelikož neuspořádanost a vysoká flexibilita Pdc-ND i v komplexu neumožňovala jeho krystalizaci a velká hmotnost komplexu (téměř 90 kDa) znesnadňovala získání jeho struktury metodou NMR. Pro tato měření byla připravena koncentrační série (64 – 193 μ M) vzorků komplexu 14-3-3 ζ ΔC:PdcQ52K-PP v molárním poměru 2:1. Koncentrace vzorků byly vysoko nad hodnotou $K_d = 3 \pm 0,5 \mu$ M [79], takže nehrozila přílišná disociace komplexu. Dále byla připravena koncentrační série (76 – 196 μ M) samotného 14-3-3 ζ ΔC, který byl taktéž analyzován.

Linearita Guinierova výnosu (viz *Obr. 5.30A*, str. 96) napovídá, že ve vzorcích nebyly přítomny žádné agregáty. Hodnoty gyračního poloměru R_g a Porodova objemu V_p se ovšem se vrůstající koncentrací vzorku snižovaly (viz *Tabulka 5.12*, str. 96), což nasvědčuje vzniku nových přitažlivých sil v rámci komplexu i samotného 14-3-3 ζ ΔC. Z tohoto důvodu byla pro další strukturní analýzy použita pouze data naměřená na vzorcích komplexu o koncentracích 64 a 72 μ M a 14-3-3 ζ ΔC o koncentracích 76 a 148 μ M. Zdácnivá molekulová hmotnost M_{MoW} dimeru 14-3-3 ζ ΔC a komplexu byla získána za použití programu SAXSMoW [200], který počítá s nepřesností do 10 %. Pomocí tohoto programu byla stanovena hodnota M_{MoW} dimeru 14-3-3 ζ ΔC na 57 až 60 kDa, což dobře odpovídá teoretické hodnotě vypočtené na základě aminokyselinové sekvence obsahující dvě N-terminální 6 \times His kotvy ($M_w = 56,6$ kDa), a hodnota M_{MoW} komplexu dimeru 14-3-3 ζ ΔC s PdcQ52K na 81 až 82 kDa, přičemž teoretická hodnota z aminokyselinových sekvencí, ve všech třech případech taktéž s N-terminálními 6 \times His kotvami, je rovna $M_w = 86,9$ kDa. Tyto výsledky odpovídají našim dřívějším výsledkům z analytické ultracentrifugace.

Tabulka 5.12 Strukturní parametry komplexu a 14-3-3ζΔC získané z měření metodou SAXS

	c ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	c^a (μM)	R_g^b (\AA)	R_g^c (\AA)	D_{max} (\AA)	V_p^d (nm^3)	$M_{MoW}^{e,f}$ (kDa)
Komplex	16,8	193	$32,1 \pm 0,5$	$32,9 \pm 0,1$	109	108	77,4
	10,9	125	$33,6 \pm 0,1$	$34,1 \pm 0,1$	120	114	81,3
	6,3	72	$34,3 \pm 0,8$	$35,2 \pm 0,1$	125	118	82,4
	5,6	64	$34,4 \pm 0,8$	$35,1 \pm 0,1$	125	117	82,2
14-3-3ζΔC	11,1	196	$28,2 \pm 0,1$	$28,3 \pm 0,1$	84	85	56,6
	8,4	148	$28,5 \pm 0,1$	$28,5 \pm 0,1$	85	87	57,8
	4,3	76	$28,8 \pm 0,1$	$28,8 \pm 0,1$	86	89	59,6

^aMolární koncentrace dimeru 14-3-3ζΔC a komplexu 14-3-3ζΔC:PdcQ52K-PP v molárním poměru 2:1.

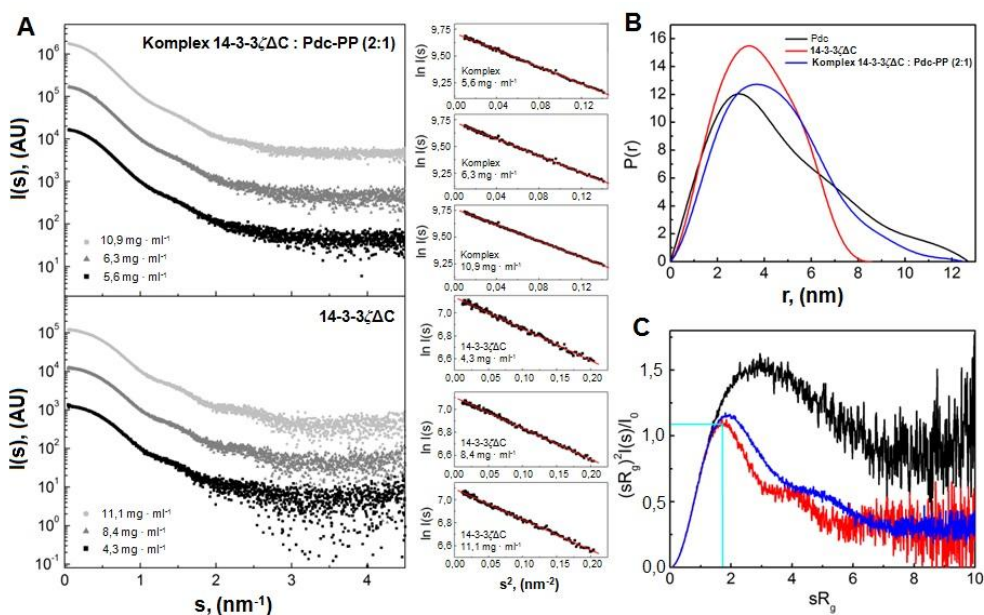
^bGyrační poloměr R_g vypočtený za použití Guinierovy aproximace [196].

^cGyrační poloměr R_g vypočtený za použití programu GNOM [180].

^dVyloučený objem hydratované částice (Porodův objem V_p).

^eMolekulová hmotnost M_{MoW} vypočítaná z experimentálních rozptylových dat za použití programu SAXSMoW [200].

^fTeoretická molekulová hmotnost M_w dimeru 14-3-3ζΔC obsahujícího dvě N-terminální 6×His kotvy je 56,6 kDa, teoretická molekulová hmotnost M_w komplexu 14-3-3ζΔC:PdcQ52K-PP (molární poměr 2:1) obsahujících celkem tři N-terminální 6×His kotvy je 86,9 kDa.



Obr. 5.30 Výsledky získané měřením vzorků metodou SAXS. (A) Grafy zobrazující rozptylovou intenzitu $I(s)$ jako funkci rozptylového vektoru s pro komplex 14-3-3ζΔC:PdcQ52K-PP (označeno Pdc-PP) v molárním poměru 2:1, v koncentracích od 5,6 do 10,9 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, a proteinu 14-3-3ζΔC v koncentracích od 4,3 do 11,1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Rozptylové profily v tmavě a světle šedě barvě jsou násobeny faktorem 10, respektive 100. V pravé části obrázku jsou zobrazeny Guinierovy výnosy pro jednotlivé vzorky. (B) Na grafu je vynesena párová distribuční funkce vzdáleností r dvou pozic, $P(r)$, v rámci molekuly, vypočítaná z rozptylových dat pomocí programu GNOM [180]. Jedná se o závislost $P(r)$ na vzdálenosti pozic r . Pro srovnání je přidána i křivka samotného Pdc, získaná předešlým měřením SAXS (černá). (C) Normalizovaný Kratkyho výnos 14-3-3ζΔC (červená), Pdc (černá) a jejich komplexu (modrá). Světle modrý průsečík zobrazuje maximum o hodnotě 1,104 pro $sR_g = 1,73$, které je charakteristické pro rozptylová data kompaktních globulárních proteinů.

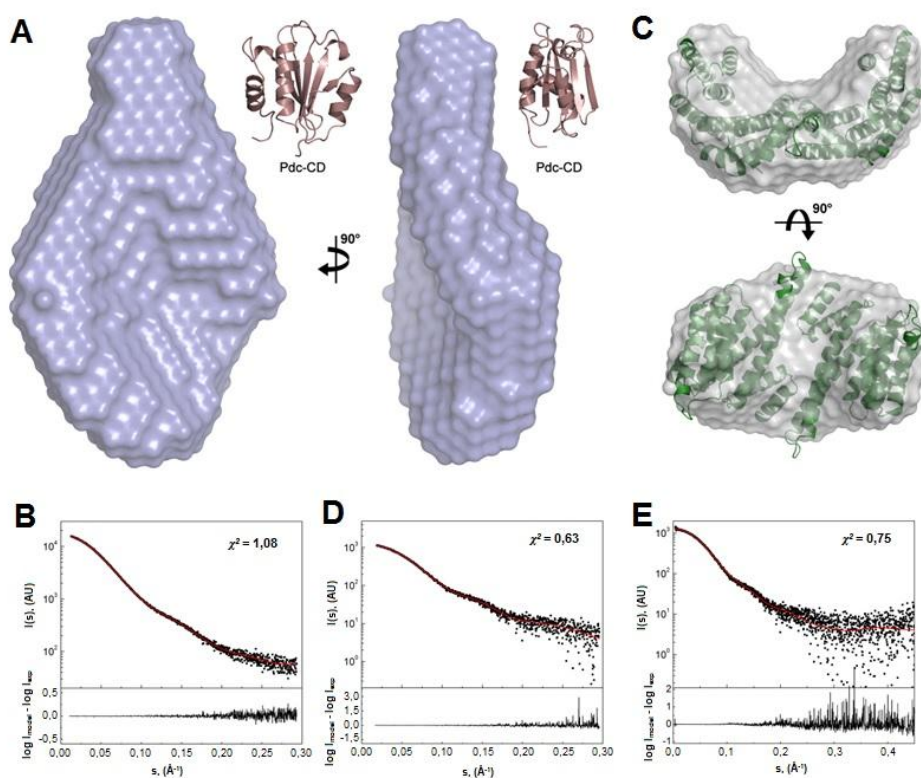
Tabulka 5.13 Statistické údaje související s *ab initio* rekonstrukcí obálky měřených proteinů

	Komplex		14-3-3ζΔC	
c (mg · ml ⁻¹)	6,3	5,6	8,4	4,3
Úhlový rozsah (nm ⁻¹)	0,093-3,063	0,104-2,931	0,12-3,034	0,165-2,955
Skutečný rozsah v prostoru (nm ⁻¹)	0-12,5	0-12,5	0-8,5	0-8,56
Celkový odhad z GNOM	0,714	0,680	0,735	0,78
Symetrie	P1	P1	P2	P2
χ^2 ^a	1,46-1,52	1,07-1,09	0,75	0,63
Počet modelů v průměru/celkový počet	15/15	15/15	15/15	14/15
DAMAVER NSD ^b	0,73	0,63	1,085	1,291

Ab initio rekonstrukce obálek byly provedeny za použití programu DAMMIF [185].

^aOdchylka mezi simulovanou rozptylovou křivkou a experimentálními daty.

^bNSD z angl. *Normalized Spatial Discrepancy*, tedy normalizovaná prostorová odchylka.



Obr. 5.31 *Ab initio* rekonstrukce obálky měřených proteinů. (A) Šedá obálka komplexu 14-3-3ζΔC:PdcQ52K-PP smíchaných v molárním poměru 2:1, získaná výpočtem ze SAXS dat, pro vzorek o koncentraci 5,6 mg · ml⁻¹. (B) Srovnání rozptylových dat pro komplex s koncentrací 5,6 mg · ml⁻¹ (černá) s proloženým *ab initio* modelem získaným programem DAMMIF (červená). (C) Šedá obálka 14-3-3ζΔC získaná výpočtem ze SAXS dat pro vzorek o koncentraci 4,3 mg · ml⁻¹, s vloženou krystalovou strukturou 14-3-3ζ (PDB: 1QJA, [165]). (D) Srovnání rozptylových dat 14-3-3ζΔC o koncentraci 4,3 mg · ml⁻¹ (černá) s proloženým *ab initio* modelem získaným programem DAMMIF (červená). (E) Srovnání spočítané teoretické rozptylové křivky (červená) krystalové struktury 14-3-3ζ [165] s experimentálními rozptylovými daty. Statistické údaje příslušející *ab initio* rekonstrukci obálky jsou shrnuty v Tabulce 5.13. DAMMIF *ab initio* model 14-3-3ζΔC obklopující krystalovou strukturu 14-3-3ζ byl vytvořen pomocí programu SUPCOMB [186]. Teoretická rozptylová křivka proteinu 14-3-3ζΔC byla získána za využití programu CRY SOL [188].

Z Obr. 5.30B a Tabulky 5.12 na str. 96 je patrné, že komplex vykazuje větší hodnotu D_{max} a maximum $P(r)$ funkce leží u vyšších hodnot ($\sim 4,1$ Å), než v případě dimeru 14-3-3 ζ Δ C ($P(r) \sim 3,9$ Å). Z toho vyplývá, že komplex je rozsáhlejší prostorový útvar, než dimer 14-3-3 ζ Δ C. Do grafu 5.30B byla pro srovnání přidána $P(r)$ funkce samotného fosducinu, získaná z předešlých SAXS měření (černá linie) (viz kapitola 5.2.5). Hodnota D_{max} komplexu (120 - 125 Å, pomineme-li nejkonzentrovanejší vzorek) je téměř srovnatelná s hodnotou D_{max} samotného Pdc (120 – 129 Å), což může nasvědčovat tomu, že tvorba komplexu nezpůsobuje výraznou strukturalizaci Pdc, ani nenechá vzniknout procesům, které by vedly ke sbalení Pdc do kompaktnější struktury. Obr. 5.30C zobrazuje normalizovaný Kratkyho výnos (závislost $(sR_g)^2 I(s)/I(0)$ na sR_g) rozptylových dat pro komplex (modrá), dimer 14-3-3 ζ Δ C (červená) a i samotný Pdc (černá), jehož data byla získána z předešlých měření (viz kapitola 5.2.5). Normalizace Kratkyho výnosu umožňuje porovnávat kompaktní molekuly s prostorově rozsáhlými molekulami, nezávisle na jejich velikosti [201]. Rozptylové křivky komplexu a 14-3-3 ζ Δ C vykazují zvonovitý tvar s maximy v hodnotách $sR_g = 1,9$, respektive 1,7. Rozptylová data kompaktní globulární molekuly vykazují pro $sR_g = 1,73$ hodnotu 1,104, což je v Obr. 5.30C vyznačeno světle modrým průsečíkem. Pozvolné snižování hodnot odpovídajících svislé ose u vyšších hodnot sR_g a vyšší hodnoty maxima, oproti kompaktní globulární molekule, vypovídají o vyšší flexibilitě aminokyselinového řetězce molekuly. Z tohoto faktu je patrné, že komplex (modrá) je flexibilnější ve srovnání s dimerem 14-3-3 ζ Δ C (červená), ovšem komplex je méně flexibilní, než samotný Pdc (černá), jehož křivka odpovídá neuspořádané Pdc-ND a uspořádané Pdc-CD (viz kapitola 5.2.5).

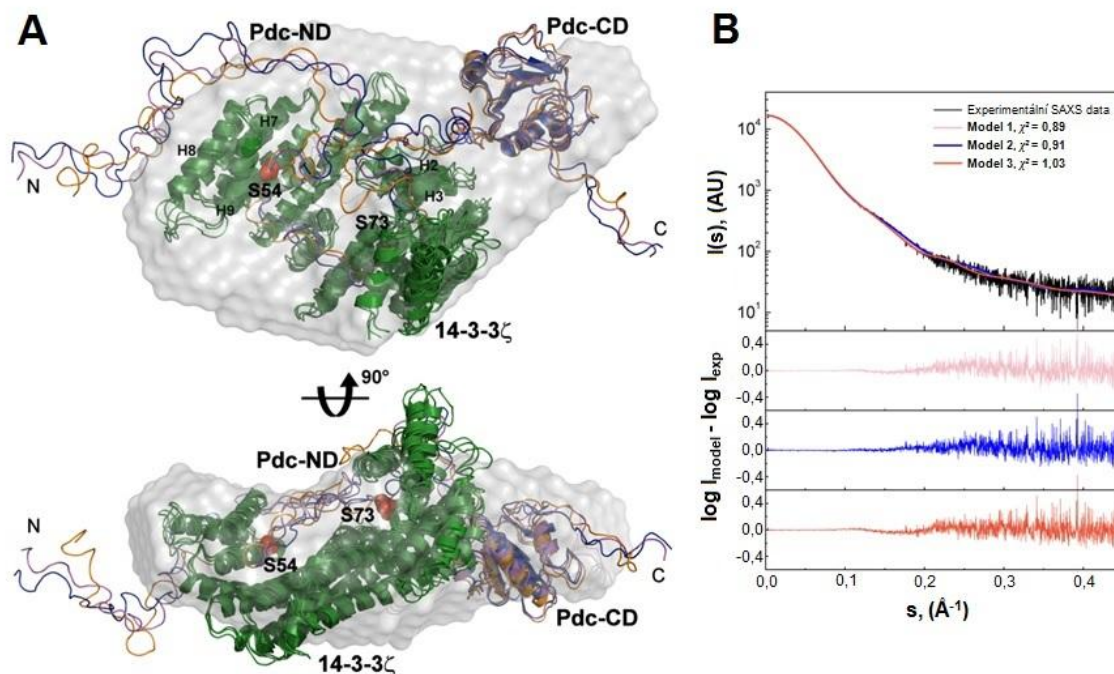
Obr. 5.31A na str. 97 zobrazuje výsledný model komplexu o koncentraci $5,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, jako superpozici filtrované zprůměrované *ab initio* obálky, kde objemnější část odpovídá dimeru proteinu 14-3-3 ζ Δ C s uvnitř zanořenou Pdc-ND a užší část velikostně odpovídá Pdc-CD, která vyčnívá vně 14-3-3 ζ Δ C. Na Obr. 5.31B je zobrazeno srovnání experimentálních rozptylových dat (černá linie) s jejich proloženým *ab initio* modelem (červená linie) získaným za použití programu DAMMIF. Hodnota χ^2 , která vypovídá o kvalitě proložení daty (fity) odpovídala dobré hodnotě 1,08. Obr. 5.31C pak zobrazuje superpozici filtrované zprůměrované *ab initio* obálky dimeru 14-3-3 ζ Δ C s vnořenou krystalovou strukturou 14-3-3 ζ [165], Obr. 5.31D na str. 97 opět porovnání rozptylových dat s proložením získaným programem DAMMIF, Obr. 5.31E zobrazuje teoretickou rozptylovou křivku (červená) spočítanou pro krystalovou strukturu 14-3-3 ζ .

Hodnota R_g vypočtená z krystalové struktury 14-3-3 ζ (29,3 Å) dobře odpovídá hodnotě získané z rozptylových dat ze SAXSu. *Tabulka 5.13* na str. 97 je souhrnem statistických údajů příslušejících jednotlivým vzorkům měřených metodou SAXS.

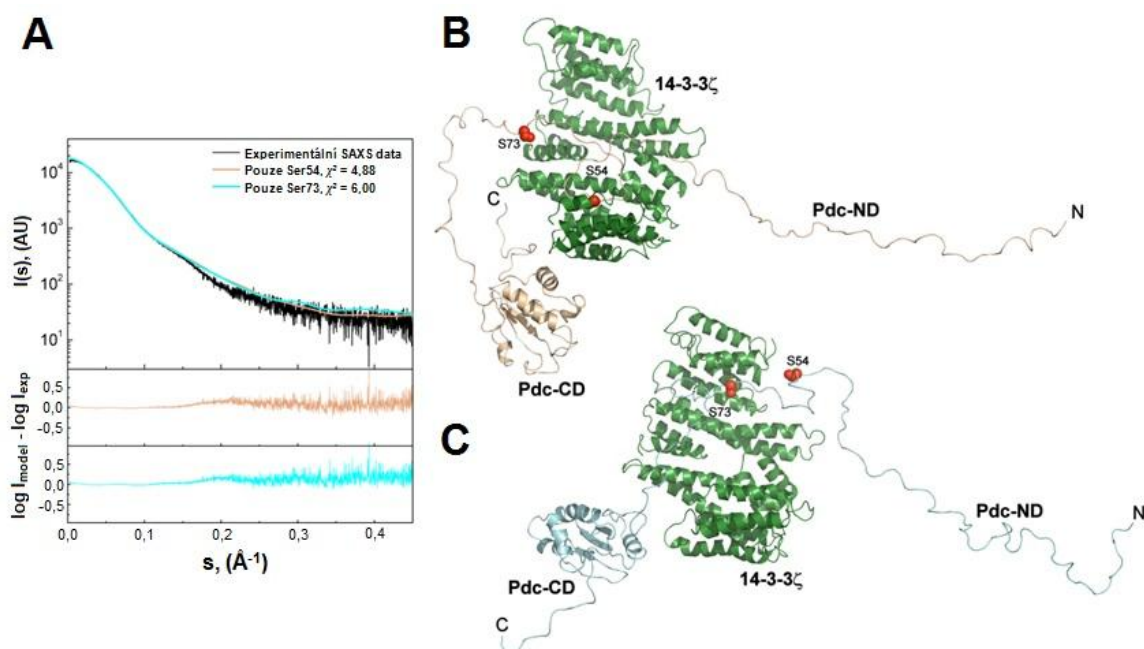
5.3.9 „All-atom“ modelování komplexu 14-3-3 ζ ΔC/Pdc-PP

Pro získání detailního strukturního modelu komplexu 14-3-3 ζ ΔC/Pdc-PP bylo použito tzv. all-atom modelování. Modelování bylo provedeno za použití metody AllosMod-FoXS, která je založena na produkci proteinových konformací, které porovnává s experimentálními profily získanými metodou SAXS [202, 203]. Počáteční model byl generován serverem AllosMod (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/allosmod-foxs/> ze dne 13. 7. 2016) za použití krystalové struktury 14-3-3 ζ s vázaným fosfopeptidem [165] a Pdc-CD (residua 107 - 246) [2]. Pdc-ND (residua 1 - 106 s N-terminální 6×His kotvou) byla modelována buď s oběma 14-3-3 vazebnými motivy (obsahujícími fosforylovaný Ser54 a Ser73, residua 51 – 57 a 69 – 76) vnořenými do vazebných žlábků dimeru 14-3-3 ζ , jak bylo pozorováno v krystalové struktuře komplexu 14-3-3 ζ /fosfopeptid, nebo pouze s jedním vazebným motivem zanořeným za ponechání druhého v nevázaném volném stavu. Tři vybrané modely pro oba vnořené vazebné motivy Pdc-PP kvalitně prokládaly experimentální SAXS data komplexu o koncentraci 5,6 mg · ml⁻¹ s hodnotou $\chi^2 = 0,89 - 1,03$, jak je ukázáno na *Obr. 5.32B* na str. 100. V těchto třech modelech jsou oba vazebné motivy Pdc-PP (residua 45 - 80) drženy uvnitř centrálního vazebného žlábků dimeru 14-3-3 ζ , zatímco N-terminální segment Pdc-ND (residua ~20 - 30) vyčnívá vně centrálního kanálu 14-3-3 ζ a je lokalizován blízko smyčky mezi α -helixy 14-3-3 ζ H7 a H8, a C-konce H9 (*Obr. 5.32A*). Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky z PRE NMR (viz kapitola 5.3.7). Pdc-CD je také lokalizována vně centrálního kanálu dimeru 14-3-3 ζ a nachází se v blízkosti N-konce jednoho z řetězců dimerního 14-3-3 ζ a jeho smyčky mezi α -helixy H2 a H3. Všechny tři modely jsou v dostatečné shodě s *ab initio* molekulárními obálkami komplexu, jejich R_g hodnoty 35,1 – 35,4 Å odpovídají hodnotám vypočteným z experimentálních rozptylových dat (viz *Tabulka 5.12* na str. 96). AllosMod modely s pouze jedním vnořeným vazebným motivem Pdc-PP vykazovaly špatné proložení experimentálními SAXS daty s hodnotami $\chi^2 = 4,88$ (pro vnořená residua 51 – 57) a 6,00 (pro vnořená residua 69 – 76), což je ukázáno na *Obr. 5.33* na str. 101. Vypočtené hodnoty R_g pro tyto modely (41,1 respektive 42,2 Å) byly mnohem větší ve srovnání s experimentálními daty. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že obě fosforylační místa (Ser54

i Ser73) musí být fosforylována, aby mohl vzniknout komplex 14-3-3 ζ /Pdc-PP, což potvrzuje výsledky z AUC (viz kapitola 5.3.1) a vazba 14-3-3 na Pdc-PP snižuje jeho flexibilitu, především v Pdc-ND, což potvrzuje výsledky z NMR a měření časově-rozlišených poklesů anizotropie fluorescence (viz kapitoly 5.3.7 a 5.3.4).



Obr. 5.32 All-atom modelování komplexu 14-3-3 ζ /Pdc-PP. (A) Tři modely komplexu spočítané s použitím serveru AllosMod-FoXS [202, 203], které nejlépe odpovídají naměřeným rozptylovým SAXS datům. 14-3-3 ζ je zobrazen zeleně, Pdc-PP fialově (Model 1), modře (Model 2) a oranžově (Model 3). AllosMod modely jsou vneseny do DAMMIF ab initio obálky (šedá) spočítané ze SAXS dat pro komplex o koncentraci 5,6 mg · ml⁻¹. (B) Srovnání spočítaných rozptylových křivek pro tři nejlepší modely komplexu (fialová, modrá a oranžová) s experimentálními rozptylovými daty komplexu o koncentraci 5,6 mg · ml⁻¹ (černá linie). Teoretické rozptylové křivky byly spočítány a prokládány experimentálními daty za použití programu FoXS [189]. DAMMIF ab initio model komplexu a jeho AllosMod modely byly sloučeny pomocí programu SUPCOMB [186].



Obr. 5.33 All-atom modelování komplexu 14-3-3 ζ /Pdc-PP se špatným předpokladem. (A) Srovnání spočítaných rozptylových křivek nejlepších AllosMod modelů komplexu, kde pouze jeden z vazebných motivů Pdc-PP byl vnořen do vazebného žlábků dimeru 14-3-3 ζ (hnědá a světle modrá linie) s experimentálními rozptylovými daty (černá). (B) Model s vnořeným vazebným motivem, obsahujícím fosforylovaný Ser54. (C) Model s vnořeným vazebným motivem, obsahujícím fosforylovaný Ser73.

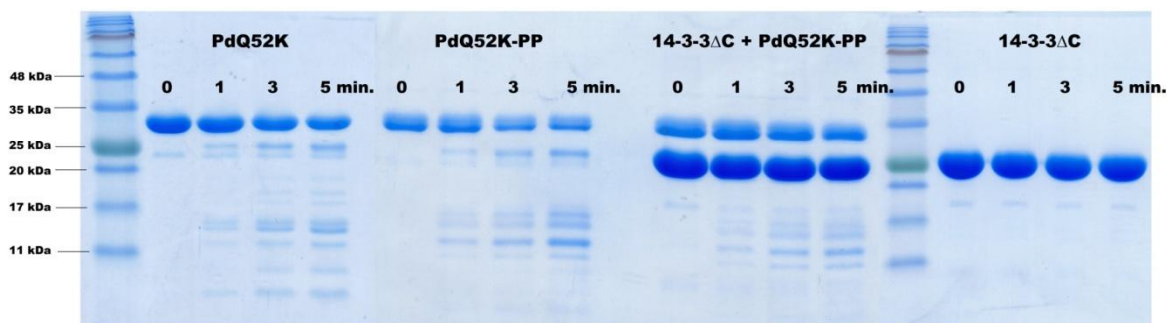
5.3.10 Limitovaná proteolýza

Pro ověření AllosMod modelu komplexu byla zvolena metoda limitované proteolýzy, která posloužila k odhalení míst na molekule PdcQ52K (značeno Pdc), u kterých dochází ke zpomalení proteolýzy v důsledku vazby proteinu 14-3-3 Δ C. Jako vhodný nástroj ke sledování kinetiky proteolýzy byla vybrána vizualizace na polyakrylamidovém gelu v redukčním prostředí (SDS-PAGE) a také vynesení výsledků hmotnostní spektrometrie spojené s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS) do časově závislých grafů.

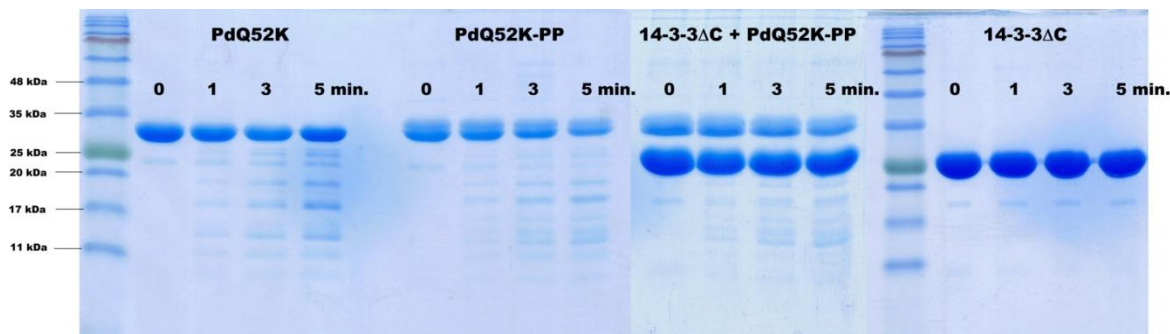
5.3.10.1 Limitovaná proteolýza sledovaná pomocí SDS-PAGE

Na Obr. 5.34 a 5.35 na str. 102 jsou zobrazeny výsledné gely po proteolytickém štěpení chymotrypsinem, respektive trypsinem. Štěpení probíhalo na vzorcích PdcQ52K, jeho fosforylované verzi PdcQ52K-PP, jejího komplexu se 14-3-3 Δ C a na samotném 14-3-3 Δ C, po dobu 0, 1, 3 a 5 minut. Z obou obrázků je patrné, že proteolytické štěpení při daných podmínkách neproběhlo na samotném 14-3-3 Δ C. Fosforylace měla vliv na

kinetiku štěpení fosducinu, jak lze vidět v levé části *Obr. 5.34*, kde jsou vidět rozdíly v tloušťce pruhů naštěpených peptidů a zároveň v jejich mírně rozdílném vzoru. Naopak v případě trypsinového štěpení jsou pruhy peptidů po fosforylaci méně výrazné v daný čas (nejlépe zobrazeno po 5 minutách proteolýzy) (*Obr. 5.35*). Vazba 14-3-3 $\zeta\Delta$ C zpomalila proteolýzu v obou případech proteas, jak lze vidět na obou obrázcích, neboť peptidové pruhy odpovídající štěpným produktům PdcQ52K-PP jsou méně výrazné, pokud byl ve vzorku přítomen 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.



Obr. 5.34 Vizualizace výsledků z proteolytického štěpení chymotrypsinem na polyakrylamidovém gelu. Zleva, srovnání kinetiky štěpení pro PdcQ52K a fosforylovaný PdcQ52K-PP, dále PdcQ52K-PP v komplexu se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. K proteolýze 14-3-3 $\zeta\Delta$ C za daných podmínek vůbec nedošlo. Vzorky byly chymotrypticky štěpeny po dobu 0, 1, 3 a 5 minut. Obrázek byl vytvořen spojením dvou gelů. První a čtrnáctý sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.



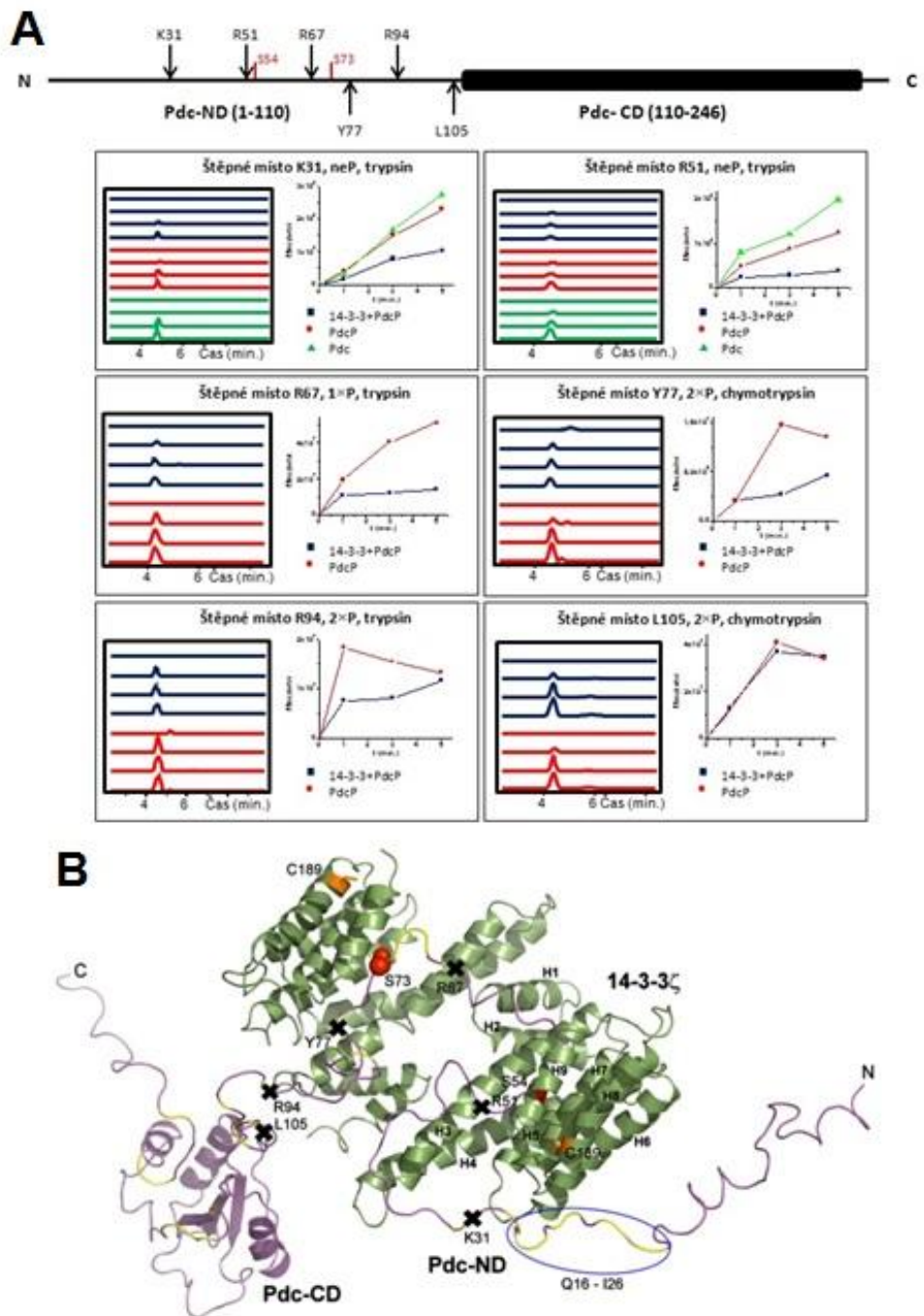
Obr. 5.35 Vizualizace výsledků z proteolytického štěpení trypsinem na polyakrylamidovém gelu. Zleva, srovnání kinetiky štěpení pro PdcQ52K a fosforylovaný PdcQ52K-PP, dále PdcQ52K-PP v komplexu se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. K proteolýze 14-3-3 $\zeta\Delta$ C za daných podmínek vůbec nedošlo. Vzorky byly trypticky štěpeny po dobu 0, 1, 3 a 5 minut. Obrázek byl vytvořen spojením dvou gelů. První a čtrnáctý sloupec odpovídá proteinovému standardu molekulových hmotností.

5.3.10.2 Limitovaná proteolýza sledovaná pomocí LC-MS/MS

Sledování kinetiky proteolýzy pomocí LC-MS/MS umožnilo detailněji nahlédnout k místům, kde vazba 14-3-3 $\zeta\Delta$ C zpomaluje proteolytické štěpení na PdcQ52K-PP svou přítomností. Proteolýza probíhala na vzorcích PdcQ52K, PdcQ52K-PP a na komplexu

14-3-3 ζ Δ C:PdcQ52K-PP v molárním poměru 2:1. Bylo vybráno šest peptidů, jakožto produktů proteolýzy, u kterých byl sledován nárůst jejich množství po určitém čase (0, 1, 3 a 5 min.) působení proteasy (chymotrypsinu, nebo trypsinu). Šest štěpných míst (K31, R51, R67, Y77, R94 a L105) odpovídá N-koncům těchto peptidů (viz *Obr. 5.36*, str. 104). Z důvodu možného ovlivnění účinnosti ionizace v MS vlivem fosfátových skupin vázaných na Ser54 a Ser73, u peptidů začínajících K31 a R51 byla sledována kinetika proteolýzy jak u PdcQ52K, tak u PdcQ52K-PP i PdcQ52K-PP v komplexu. V ostatních případech byla sledována pouze kinetika proteolýzy PdcQ52K-PP a PdcQ52K-PP v komplexu.

Z *Obr. 5.36A* na str. 104 je patrné, že vazba 14-3-3 ζ Δ C zpomalila proteolýzu PdcQ52K-PP ve všech vybraných štěpných místech peptidů, kromě L105, který se nachází v C-terminální části Pdc-ND. Štěpné místo R94 bylo chráněno proti proteolýze v menší míře. Tyto výsledky jsou konzistentní s AllosMod modelem komplexu (*Obr. 5.36B*, str. 104). V něm jsou černými křížky vyznačena štěpná místa. Žlutě jsou v modelu vyznačena místa, která interagují s $G_i\beta\gamma$. Jak je vidět z modelu, velká část těchto míst obsažených především v Pdc-ND (30 až 80 residuí) je zapojena do vazby s dimerem 14-3-3 ζ Δ C. Přítomost 14-3-3 ζ Δ C zpomalila proteolýzu v místě K31, které se pravděpodobně nachází mimo centrální kanál dimeru 14-3-3 ζ Δ C. Tento výsledek nasvědčuje, že místo K31 se nachází v blízkosti povrchu dimeru 14-3-3 ζ Δ C a je konzistentní s našimi předešlými výsledky z měření poklesu anizotropie fluorescence, ve kterém bylo pozorováno omezení flexibility tryptofanu W29 po vazbě a zároveň byla pozorována změna v jeho fluorescenčních vlastnostech (viz kapitola 5.3.3). Pomalejší štěpení u PdcQ52K-PP (červená, *Obr. 5.36A* na str. 104) v místě R51, ve srovnání s PdcQ52K (zelená, *Obr. 5.36A* na str. 104) potvrzuje naše předešlé výsledky, že fosforylace Ser54 a Ser73 ovlivňuje konformační chování N-terminální poloviny Pdc-ND-PP.



Obr. 5.36 Detailní pohled na interakci mezi 14-3-3 ζ Δ C (značeno 14-3-3) a PdcQ52K-PP (značeno PdcP) pomocí limitované proteolýzy spojené s LC-MS/MS. **(A)** Levé části obrázků představují chromatogramy odpovídající konkrétnímu kladně nabitému peptidu vzniklému proteolýzou. Nejvýš umístěný chromatogram dané barvy v černém rámečku odpovídá peptidu po 0 minutovém působení proteasy (trypsin, nebo chymotrypsin). Nejníže umístěný chromatogram dané barvy odpovídá 5 minutovému působení proteasy. Grafy vpravo zobrazují kinetiku proteolýzy. Každý bod odpovídá určitému množství peptidu detekovanému hmotnostním spektrometrem v odpovídajícím čase proteolýzy. Tyto výsledky jsou zobrazeny pro šest vybraných peptidů. Peptidy pokrývají Pdc-ND-PP se štěpnými místy K31, R51, R67, Y77, R94 a L105. **(B)** AllosMod model komplexu s vyznačenými štěpnými místy (černé křížky). Cys189 na 14-3-3 ζ Δ C, na kterém byla vázána IPSL značka při PRE NMR měřeních, je zobrazen oranžově. Místa ovlivněná IPSL jsou označena modrou elipsou. Residua přímo zapojená do vazby s G β jsou zobrazena žlutě [2].

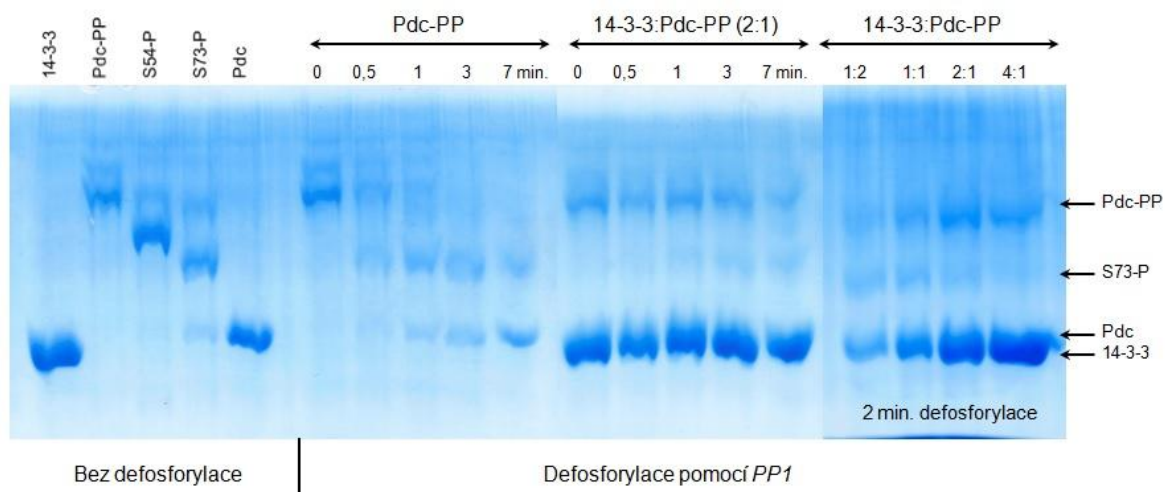
5.3.11 Limitovaná defosforylace

Podle některých studií [66, 72] dochází v buňce k defosforylaci Pdc-PP pomocí dvou fosfatas, proteinfosfatasy 1 (PP1) a proteinfosfatasy 2A (PP2A). Jednou z možných funkcí proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C v buňce je ochrana Pdc-PP před defosforylací, či její zpomalení. Rozhodli jsme se proto tento návrh ověřit *in vitro* pomocí metody limitované defosforylace. Pro vizualizaci kinetiky defosforylace byly vybrány dvě techniky. První z nich je vizualizace na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-TagTM (SDS-PAGE-Phos-Tag), druhá je hmotnostní spektrometrie spojená s LC-MS.

5.3.11.1 Limitovaná defosforylace sledovaná pomocí SDS-PAGE-Phos-Tag

Na *Obr. 5.37* na str. 106 jsou zobrazeny výsledné gely po defosforylaci PdcQ52K-PP pomocí PP1. Defosforylace pomocí PP2A nebyla, z důvodu nedostatku enzymu, provedena touto metodou, ale výsledky jsou dostupné v Diplomové práci Mgr. Jiřího Šimůnka [204]. Defosforylace byla vždy zastavena po 0; 0,5; 1,5; 3 a 7 minutách působení PP1. V levé části obrázku jsou ukázány pozice proteinů na gelu, zleva odpovídají 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, PdcQ52K-PP, PdcQ52K S73A-P (pomocí PKA fosforylován pouze v pozici S54), Pdc WT-P (pomocí PKA fosforylován pouze v pozici S73), PdcQ52K. Následuje gel zobrazující kinetiku defosforylace samotného PdcQ52K-PP, poté PdcQ52K-PP vázaného v komplexu se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C v molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 váže jeden Pdc), a nakonec PdcQ52K-PP ve směsi se 14-3-3 $\zeta\Delta$ C v molárních poměrech 14-3-3 $\zeta\Delta$ C:PdcQ52K-PP = 1:2; 1:1; 2:1 a 4:1, kde defosforylace u všech čtyřech vzorků probíhala po dobu dvou minut.

Z *Obr. 5.37* je zřejmé, že přítomnost 14-3-3 $\zeta\Delta$ C *in vitro* zpomalila defosforylaci PdcQ52K-PP, což se projevuje klesající intenzitou barvy pruhu obsahujícího Pdc-PP v rostoucím čase v nepřítomnosti 14-3-3 $\zeta\Delta$ C oproti komplexu. Obrázek také nasvědčuje tomu, že PP1 nejdříve odstraní fosfát ze Ser54 a poté až Ser73. Opačný trend byl pozorován v případě PP2A [204]. Větší množství 14-3-3 $\zeta\Delta$ C ve směsi zabránilo defosforylaci PdcQ52K-PP s větší účinností, jak lze vidět na intenzitě barvy pruhu odpovídajícího Pdc-PP ve směsi s poměrem 4:1, v porovnání např. se směsí s poměrem 1:2.

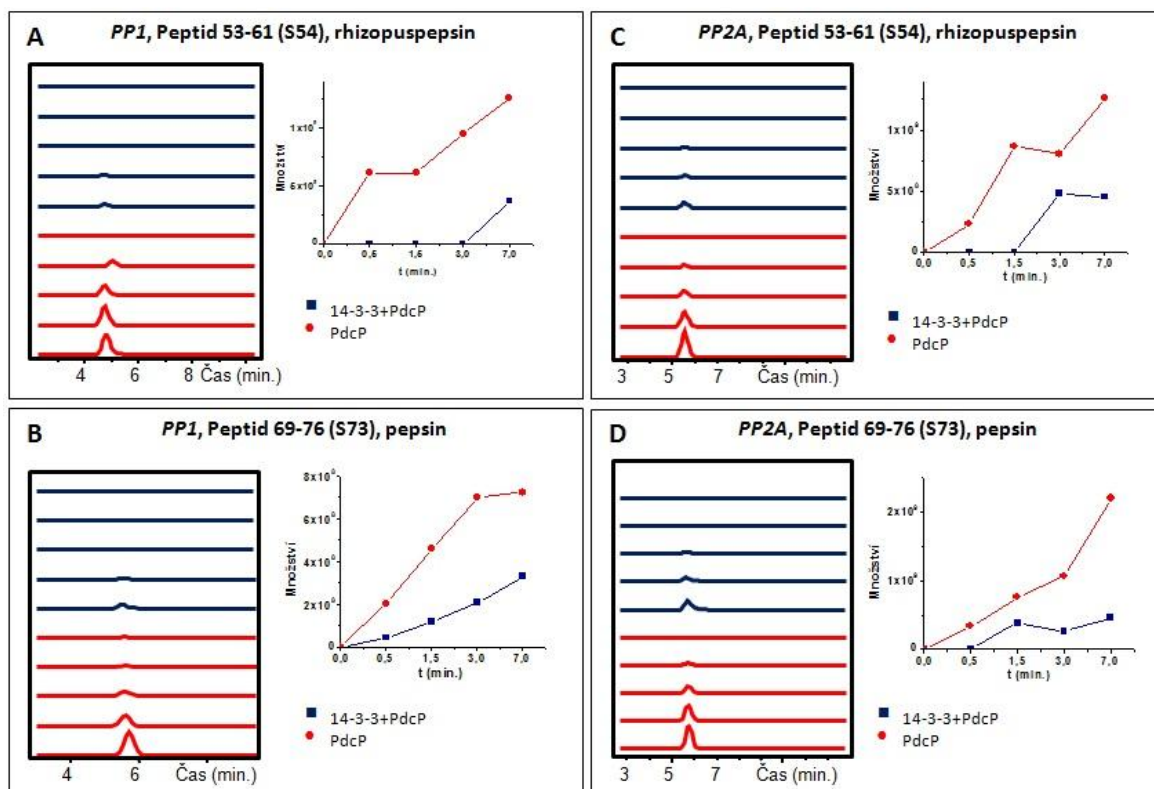


Obr. 5.37 Vizualizace kinetiky defosforylace PdcQ52K-PP pomocí PP1 na 10% Phos-TagTM gelu. Zleva, 14-3-3 ζ Δ C (14-3-3), PdcQ52K-PP (Pdc-PP), PdcQ52K S73A-P (fosforylován pouze S54) (S54-P), Pdc WT-P (fosforylován pouze S73) (S73-P), PdcQ52K (Pdc). Následuje gel s vizualizací defosforylace samotného PdcQ52K-PP, poté PdcQ52K-PP v komplexu se 14-3-3 ζ Δ C v molárním poměru 2:1 (dimer 14-3-3 s jedním Pdc). Defosforylace byla zastavena po 0; 0,5; 1,5; 3 a 7 minutách. Gel vpravo vizualizuje defosforylaci PdcQ52K-PP ve směsi se 14-3-3 ζ Δ C v molárních poměrech 14-3-3 ζ Δ C:PdcQ52K-PP = 1:2; 1:1; 2:1 a 4:1 po 2 minutách působení PP1. Obrázek je složen ze tří gelů.

5.3.11.2 Limitovaná defosforylace sledovaná pomocí LC-MS

V případě kinetiky defosforylace PdcQ52K-PP sledované z výsledků z LC-MS, byla použita jak PP1, tak PP2A. K experimentu bylo použito sestavení přístrojové techniky běžně používané ke sledování HDX-MS (kapitola 4.9.1). Vzorek byl injektován na kolonu s obsahem proteasy (pepsin, nebo rhizopuspepsin), odsolen a vzniklé peptidy byly přeneseny nejdříve na kolonu kapalinové chromatografie a dále do hmotnostního spektrometru, kde byly kladně nabity a následně analyzovány (LC-MS). K vizualizaci defosforylace byly vybrány peptidy obsahující fosforylační místa Ser54 a/nebo Ser73, a sledován byl nárůst nefosforylovaného peptidu v čase. Získaná data ukazují, že přítomnost 14-3-3 ζ Δ C ve vzorku (komplex v poměru 2:1 = 14-3-3:Pdc-PP) zpomaluje defosforylaci obou fosforylačních míst, jak je ukázáno na Obr. 5.38 na str. 107. Tento výsledek může poukazovat na fakt, že další rolí 14-3-3 v buňce může být jeho ochrana fosducinu, případně jiných fosforylovaných vazebných partnerů, před rychlou defosforylací, pravděpodobně fyzickým zabráněním přístupu fosfatasy. Navíc tento výsledek potvrzuje, že obě fosforylační místa jsou zapojena do vazby, což potvrzuje naše předešlé výsledky z AUC a NMR.

Defosforylace byla vždy zastavena po 0; 0,5; 1,5; 3 a 7 minutách. Na *Obr. 5.38* jsou vždy v levé části (černý rámeček) zobrazeny chromatogramy daného peptidu, kde nejvyšší pozice chromatogramu dané barvy (modrá nebo červená) odpovídá 0 minutám defosforylace a nejnižší 7 minutám defosforylace. Každý bod grafu v pravé části odpovídá množství peptidu analyzovaného MS v daném čase zastavené defosforylace.



Obr. 5.38 Vizualizace kinetiky defosforylace PdcQ52K-PP (značeno PdcP) z výsledků získaných metodou LC-MS. Levé části obrázků (A, B, C, D) představují chromatogramy odpovídající konkrétnímu kladně nabitému peptidu vzniklému proteolýzou (pepsin, nebo rhizopuspepsin) defosforylujícího fosducinu. Nejvýše umístěný chromatogram dané barvy (modrá nebo červená) v černém rámečku odpovídá peptidu po 0 minutovém působení fosfatasy (PP1, nebo PP2A). Nejnižší umístěný chromatogram dané barvy odpovídá 7 minutovému působení fosfatasy. Grafy vpravo (A, B, C, D) zobrazují kinetiku defosforylace. Každý bod odpovídá určitému množství peptidu detekovanému hmotnostním spektrometrem v odpovídajícím čase zastavení defosforylace. Tyto výsledky jsou zobrazeny pro čtyři vybrané peptidy obsahující fosforylační místa PdcQ52K, Ser54 a Ser73. Pokusy byly provedeny pro PdcP v přítomnosti (molární poměr 2:1) i nepřítomnosti 14-3-3 ζ C (značeno 14-3-3).

6 Diskuze

Hlavním cílem této disertační práce je biofyzikálně charakterizovat protein fosducin (Pdc) v jeho volném (tzv. apo) stavu, dále biofyzikálně charakterizovat doposud neobjasněnou strukturu komplexu fosforylovaného Pdc s proteinem 14-3-3 (14-3-3/Pdc-PP) a objasnit, jakou roli hraje vazba proteinu 14-3-3 ve funkci Pdc.

Gaudetové a kol. se podařilo získat krystalovou strukturu Pdc s jeho vazebným partnerem, heterodimerní podjednotkou $G_i\beta\gamma$ trimerního G-proteinu transducinu. Tato studie ukázala, že největší vazebný povrch na $G_i\beta\gamma$ zaujímá N-terminální doména Pdc (Pdc-ND) (~65 %). Ve vázaném stavu tato podjednotka sestává ze tří α -helixů (*Obr. 2.4*, str. 21). C-terminální doména (Pdc-CD) je strukturně podobná thioredoxinu [2]. Gaudetová a kol. také ukázali, že pokud je Pdc fosforylován v místě Ser73, je formován komplex $G_i\beta\gamma$ /Pdc s nižší afinitou. Stejná skupina zkoumala i volný Pdc pomocí metod 1D nukleární magnetické rezonance (NMR) a cirkulárního dichroismu (CD). Jejich výsledky naznačují, že ve volném stavu je Pdc částečně neuspořádaný a nesbalený protein [77]. Pro detailní charakterizaci struktury volného Pdc byly v rámci této práce použity různé přístupy strukturní biologie včetně metod dynamického rozptylu světla (DLS), CD v blízké i vzdálené oblasti ultrafialového záření (UV), analytické ultracentrifugace (AUC), časově-rozlišeného dohásínání intenzity fluorescence ANS, malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS) a 2D – 5D nukleární magnetické rezonance (NMR). V našich studiích jsme studovali nejen celou molekulu Pdc, ale také izolované Pdc-ND a Pdc-CD. Za použití výše zmíněných metod jsme potvrdili, že Pdc-ND je ve svém apo stavu vnitřně neuspořádaný protein (IDP) bez signifikantních náznaků sekundární či terciární struktury, zaujímající rozsáhlý objem. Pdc-CD je protein vykazující typické rysy sbaleného kompaktního proteinu s jasně definovanou sekundární i terciární strukturou, kromě aminokyselinové sekvence posledních 22 C-terminálních zbytků, jak potvrdila i bioinformatická analýza [80]. Na základě získaných dat byly navrženy čtyři plausibilní konformery proteinu Pdc (*Obr. 5.13C*, str. 67). Když byl Pdc fosforylován na dvou jeho fosforylačních místech (Ser54, Ser73) [72, 85], pozorovali jsme vzájemnou slabou interakci obou domén, jak lze vidět i z výsledků fluorescenčních měření (kapitola 5.3.3).

Pro vznik komplexu 14-3-3/Pdc-PP je nutná fosforylace obou fosforylačních míst (Ser54 a Ser73) obsažených v Pdc, jak potvrzují naše výsledky z AUC (kapitola 5.3.1).

Tento závěr podporuje výsledky Thulina a kol. a také Nakana a kol. [71, 72]. Dále jsme ukázali, že se jedná o středně silnou vazbu s disociační konstantou v jednotkách μM . Největší podíl na vazbě Pdc-PP s proteinem 14-3-3 má fosforylovaná Pdc-ND, jak lze vidět z výsledků AUC (kapitola 5.3.1). Protein 14-3-3 interaguje s Pdc-ND v místech, kde Pdc-ND interaguje s $G_i\beta\gamma$, což naznačuje, že protein 14-3-3 soutěží s $G_i\beta\gamma$ o vazebné místo na fosforylovaném Pdc. Jednou z možných funkcí proteinů 14-3-3 je fyzické zakrytí (maskování) určité sekvence nebo strukturního motivu vazebného partnera [205]. Tato funkce dobře zapadá do schématu komplexu 14-3-3/Pdc-PP, kde 14-3-3 pravděpodobně zakrývá obě fosforylační místa Pdc-PP a většinu aminokyselinové sekvence Pdc-ND. Ukázali jsme, že velká část Pdc-ND se nachází v centrálním kanálu dimeru 14-3-3, přičemž fosforylační místa Ser54 a Ser73 vytvářejí dva 14-3-3 vazebné motivy, které se podílejí na tvorbě komplexu [117, 165, 166]. Při tvorbě komplexu 14-3-3/Pdc-PP nebyla pozorována výrazná změna sekundární a terciární struktury v rámci fosforylované Pdc-ND, která i v navázaném stavu zůstává flexibilní. Z toho usuzujeme, že vzniká tzv. „fuzzy“ komplex (kapitola 2.2). V komplexu jsme ovšem pozorovali částečné omezení pohyblivosti určitých fosducinových residuí, nacházejících se jak v Pdc-ND (Trp29, Cys89, Trp93, Cys97), tak v Pdc-CD (Cys148, Cys168) (kapitola 5.3, *Obr. 5.24*, str. 86). Vazba 14-3-3 tedy částečně snižuje flexibilitu Pdc-ND i Pdc-CD, což může naznačovat na fakt, že i Pdc-CD interaguje přímo se 14-3-3. NMR studie ukázaly, že oblast 14-3-3 dimeru obsahující cysteinový zbytek 189 se nachází v blízkosti segmentu Pdc-ND s aminokyselinovými zbytky 16 - 26 (kapitola 5.3.7). Cysteinový zbytek 189 se nachází v helixu H8 14-3-3, který je situován na vnějším okraji dimeru (*Obr. 2.7* na str. 36). Z těchto měření vyplývá, že vazebný povrch 14-3-3 zahrnuje nejen centrální kanál dimeru, ale i vnější nekonzervované oblasti. Podobná interakce byla pozorována už dříve s proteinem RGS3 [144, 145]. Pomocí metody limitované proteolýzy byla odhalena místa na Pdc, která podléhají pomalejšímu proteolytickému štěpení, pokud je Pdc vázán v komplexu se 14-3-3. Modelování struktury komplexu na základě dat získaných ze SAXS měření (*Obr. 5.32A* na str. 100) poskytlo model, který je v souladu s výsledky limitované proteolýzy a NMR měření.

Dále jsme zkoumali, zda vazba proteinu 14-3-3 zpomaluje defosforylaci fosforylovaného Pdc, jak bylo spekulováno v práci Thulina a kol. [72]. Tuto domněnku jsme potvrdili *in vitro* pomocí limitované defosforylace spojené s hmotnostní spektrometrií a dále vizualizací kinetiky defosforylace na redukčním gelu obsahujícím Phos-TagTM.

Závěrem lze tedy říci, že se nám podařilo charakterizovat strukturu Pdc jak ve volném stavu, tak i v komplexu s proteinem 14-3-3. Na základě získaných strukturních dat jsme navrhli mechanismus, kterým protein 14-3-3 inhibuje interakci Pdc s $G_i\beta\gamma$. Dále jsme ukázali, že další možnou funkcí vazby proteinu 14-3-3 může být zpomalení defosforylace Pdc-PP fyzickým bráněním přístupu fosfatas PP1 a PP2A.

7 Závěr

V rámci této disertační práce byla zkoumána struktura Pdc a jeho komplexu s proteinem 14-3-3. Ke studiu struktury bylo použito řady biofyzikálních a biochemických metod. Dále byl zkoumán vliv vazby 14-3-3 na kinetiku defosforylace fosforylovaného Pdc.

Tato práce přinesla následující konkrétní výsledky:

- Pdc-ND je vnitřně neuspořádaný protein (IDP) a v roztoku nevykazuje prvky sekundární ani terciární struktury. Pdc-CD je vnitřně uspořádaná a vykazuje prvky jak sekundární, tak terciární struktury.
- Vazebná afinita fosforylované Pdc-ND k proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C je vyšší ($K_d \sim 3 \mu\text{M}$), než afinita celého fosforylovaného Pdc k 14-3-3 $\zeta\Delta$ C ($K_d \sim 7 \mu\text{M}$). Vazebná afinita Pdc-CD k 14-3-3 $\zeta\Delta$ C nebyla pozorována ($K_d > 500 \mu\text{M}$). Z těchto výsledků vyplývá, že pro tvorbu komplexu je klíčová fosforylovaná Pdc-ND.
- Fosforylace Pdc vyvolává strukturní změny a změny ve flexibilitě, a to zejména v Pdc-ND. Výsledky také naznačují, že u volného Pdc-PP fosforylovaná Pdc-ND interaguje s Pdc-CD.
- Obě fosforylační místa Pdc (Ser54 a Ser73) jsou klíčová pro vazbu proteinu 14-3-3. Velká část Pdc-ND, která tvoří většinu vazebného povrchu Pdc pro $G_i\beta$, se v komplexu se 14-3-3 nachází buď v centrálním kanálu molekuly dimeru 14-3-3, nebo v blízkosti jeho povrchu. Vazba 14-3-3 tedy blokuje vazebný povrch Pdc pro $G_i\beta$ a tím inhibuje tuto interakci. NMR a HDX-MS měření ukázala, že Pdc-PP zůstává i po navázání na protein 14-3-3 flexibilní, což naznačuje, že by se mohlo jednat o tzv. „fuzzy“ komplex.
- Vazba proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C zpomaluje defosforylací Pdc-PP pomocí PP1 a PP2A *in vitro*.

Seznam citované literatury

- [1] Kacířová, M.: *Studium struktury komplexu 14-3-3:Pdc.*, Diplomová práce, PšF UK, Praha (2011).
- [2] Gaudet, R., Bohm, A., Sigler, P. B.: *Cell*, 87, 577-588 (1996).
- [3] Tompa, P., Fuxreiter, M.: *Trends in Biochemical Science*, 33, 2 - 8 (2008).
- [4] Dyson, H. J., Wright, P. E.: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 197 – 208 (2005).
- [5] Mitchell, P. J., Tjian, R.: *Science*, 245, 371 – 378 (1989).
- [6] Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C., Villafrance, J. E., Dunker, A.K.: *Proceedings of the International Conference on Neural Networks*, 1, 91 – 95 (1997).
- [7] Vucetic, S., Brown, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z.: *Proteins*, 52, 573 – 584 (2003).
- [8] Dunker A. K., Obradovic Z.: *Nature Biotechnology*, 19, 805 - 806 (2001).
- [9] Uversky V. N.: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43, 1090 – 1103 (2011).
- [10] Xie, H., Vucetic, S., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Uversky, V. N., Obradovic, Z.: *Journal of Proteome Research*, 6, 1882 - 1898 (2007).
- [11] Vucetic, S., Xie, H., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z., Uversky, V. N.: *Journal of Proteome Research*, 6, 1899 - 1916 (2007).
- [12] Xie, H., Vucetic, S., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z., Uversky, V. N.: *Journal of Proteome Research*, 6:1917 - 1932 (2007).
- [13] Tompa, P.: *FEBS Letters*, 579, 3346-3354 (2005).
- [14] Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., Jones, D. T.: *Journal of Molecular Biology*, 337, :635 – 645 (2004).
- [15] Dunker, A. K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E. C., Brown, C. J.: *Genome Informatics. Workshop on Genome Informatics*, 11, 161 - 171 (2000).
- [16] Radivojac, P., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Obradovic, Z., Uversky, V. N., Dunker, A. K.: *Biophysical Journal*, 92, 1439 - 1456 (2007).
- [17] Ishida, T., Kinoshita, K.: *Bioinformatics*, 24, 1344 - 1348 (2008).
- [18] Dosztanyi, Z., Tompa, P.: *Methods in Molecular Biology*, 426, 103-115 (2008).
- [19] Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L.: *Proteins*, 41, 415 – 427 (2000).
- [20] Prilusky, J., Felder, C. E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E., Man, O., Beckmann, J. S., Silman, I., Sussman, J. L.: *Bioinformatics*, 21, 3435 - 3438 (2005).
- [21] Linding, R., Jensen, L. J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T. J., Russell, R. B.: *Structure*, 11, 1453 – 1459 (2003).
- [22] Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V., Gibson, T. J.: *Nucleic Acids Research*, 31, 3701 – 3708 (2003).
- [23] Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., Jones, D. T.: *Journal of Molecular Biology*, 337, 635 – 645 (2004).

- [24] Vucetic, S., Obradovic, Z., Vacic, V., Radivojac, P., Peng, K., Iakoucheva, L. M., Cortese, M. S., Lawson, J. D., Brown, C. J., Sikes, J. G., Newton, C. D., Dunker, A. K.: *Bioinformatics*, 21, 137 – 140 (2005).
- [25] Sickmeier, M., Hamilton, J. A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M. S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V. N., Obradovic, Z., Dunker, A. K.: *Nucleic Acid Research*, 35, D786 – D793 (2007).
- [26] Uversky, V. N.: *Protein Science*, 11, 739 – 756 (2002).
- [27] Dyson, H. J. & Wright, P. E.: *Advances in Protein Chemistry*, 62, 311 – 340 (2002).
- [28] Meier, S., Grzesiek, Blackledge, M.: *Journal of the American Chemical Society*, 129, 9799 – 9807 (2007).
- [29] Zhu, F., Kapitan, J., Tranter, G. E., Pudney, P. D., Isaacs, N. W., Hecht, L., Barron, L. D.: *Proteins*, 70, 823-833 (2008).
- [30] Jernigan, R. L., Kloczkowski, A.: *Methods in Molecular Biology*, 350, 251 - 276 (2007).
- [31] Weathers, E. A., Paulaitis, M. E., Woolf, T. B., Hoh, J. H.: *PROTEINS: Structure, Function and bioinformatics*, 66, 16 – 28 (2007).
- [32] Daughdrill, G. W., Narayanaswami, P., Gilmore, S. H., Belczyk, A., Brown, C. J.: *Journal of Molecular Evolution*, 65, 277 - 288 (2007).
- [33] Tsvetkov, P., Asher, G., Paz, A., Reuven, N., Sussman, J. L., Silman, I., Shaul, Y.: *Proteins*, 70, 1357 - 1366 (2008).
- [34] Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M.: *Nature*, 388, 839–840 (1997).
- [35] Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, M., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B.: *The Journal of Neuroscience*, 19, 5782 – 5791 (1999).
- [36] Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., Honjyo, Y., Shibasaki, H., Budka, H.: *Journal of neuropathology and Experimental Neurology*, 61, 245 – 253 (2002).
- [37] Dyson, H. J., Wright, P. E.: *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 54 – 60 (2002).
- [38] Tompa, P., Fuxreiter, M.: *TRENDS in Biochemical Sciences*, 33, 2 – 8 (2008).
- [39] Mittag, T., Kay, L. E., Forman-Kay, J. D.: *Journal of Molecular Recognition*, 23, 105 – 116 (2010).
- [40] Lee, R. H., Fowler, A., McGinnis, J. F., Lolley, R. N., Craft, C. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 265, 15867 - 15873 (1990).
- [41] Lolley, R. N., Brown, B. M., Faerber, D. B.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 572 - 578 (1977).
- [42] Lee, R. H., Brown, B. M., Lolley, R. N.: *Biochemistry*, 23, 1972 - 1977 (1984).
- [43] Danner, S., Lohse, M. J.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 93, 10145 - 10150 (1996).
- [44] Lee, R. H., Whelan, J. P., Lolley, R. N., McGinnis, J. F.: *Experimental Eye Research*, 46, 829 - 840 (1988).
- [45] Schaad, N. C., Shinohara, T., Abe, T., Klein, D. C.: *Endocrinology*, 129, 3289 - 3298 (1991).
- [46] Kobayashi, Y., Hisatomi, O., Satoh, T., Tokunaga, F.: *FEBS Letters*, 502, 117 - 121 (2001).

- [47] Kobayashi, Y., Hisatomi, S., Yamamoto, T., Tokunaga, F.: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **133**, 77 - 83 (2002).
- [48] Fabczak, H., Sobierajska, K., Fabczak, S.: *Protist*, **155**, 181 - 192 (2004).
- [49] Sobierajska, K., Fabczak, H., Fabczak, S.: *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **79**, 135 - 143 (2005).
- [50] Salamon, J. A., Acuna, R., Dawe, A. L.: *Molecular Microbiology*, **76**, 848 - 860 (2010).
- [51] Flanary, P. L., DiBello, P. R., Estrada, P., Dohlman, H. G.: *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 18462 - 18469 (2000).
- [52] Kuo, C. H., Taira, E., Takaha, N., Sohma, H., Akino, T., Fukada, Y., Sanada, K., Miki, N.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **191**, 1097 - 1104 (1993).
- [53] Bauer, P. H., Muller, S., Puzicha, M., Pippig, S., Obermaier, B., Helmreich, E. J., Lohse, M. J.: *Nature*, **358**, 73-76 (1992).
- [54] Schulz, K., Danner, S., Bauer, P., Schröder, S. and Lohse, M. J.: *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 22546 - 22551 (1996).
- [55] Boekhoff, I., Touhara, K., Danner, S., Inglese, J., Lohse, M. J., Breer, H., Lefkowitz, R. J.: *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 4606 - 4612 (1997).
- [56] Beetz, N., Harrison, M. D., Brede, M., Zong, X., Urbanski, M. J., Sietmann, A., Kaufling, J., Barrot, M., Seeliger, M. W., Vieira-Coelho, M. A., Hamet, P., Gaudet, D., Seda, O., Tremblay, J., Kotchen, T. A., Kaldunski, M., Nusig, R., Szabo, B., Jacob, H. J., Cowley, A. W., Biel, M., Stoll, M., Lohse, M. J., Broeckel, U., Hein, L.: *Journal of Clinical Investigation*, **119**, 3597 - 3612 (2009).
- [57] Schulz, R.: *Pharmacological Research*, **43**, 1 - 10 (2001).
- [58] Ding, C., Li, X., Griffin, C. A., Jabs, E. W., Hawkins, A. L., Levine, M. A.: *Genomics*, **18**, 457 - 459 (1993).
- [59] Sparkes, R. S., Lee, R. H., Shinohara, T., Craft, C. M., Kojis, T., Klisak, I., Heinzmann, C., Bateman, J. B.: *Genomics*, **18**, 426 - 428 (1993).
- [60] Lee, R. H., Brown, B. M., Lolley, R. N.: *Biochemistry*, **20**, 7532 - 7538 (1981a).
- [61] Lee, R. H., Brown, B. M., Lieberman, B. S., Lolley, R. N.: *Abstracts - Society for Neuroscience*, **7**, 917 (1981b).
- [62] Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Kreiger, Scott, Zipursky, Darnell: *Molecular Cell Biology (fifth edition)*, W. H. Freeman and Company, New York, 2003.
- [63] Williamson, S. J., Cummins, H. Z.: *Light and Color in Nature and Art*, Wiley (1983).
- [64] Gray, H.: *Anatomy of the Human Body*, Lea & Febiger, Philadelphia and New York, USA, 1918.
- [65] Lee, R. H., Lieberman, B. S., Lolley, R. N.: *Biochemistry*, **26**, 3983 - 3990 (1987).
- [66] Pagh-Roehl, K., Lin, D., Su, L., Burnside, B.: *Journal of Neuroscience*, **15**, 6475 - 6488 (1995).
- [67] Ruiz-Gómez, A., Humrich, J., Murga, C., Quitterer, U., Lohse, M. J., Mayor Jr., F.: *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 29724 - 29730 (2000).
- [68] Zhu, X., Craft, C. M.: *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 5216 - 5226 (2000).
- [69] Zhu, X., Craft, C. M.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **270**, 504 - 509 (2000).
- [70] Zhu, X., and Craft, C. M.: *Molecular Vision*, **4**, 13 (1998).

- [71] Nakano, K., Chen, J., Tarr, G. E., Yoshida, T., Flynn, J. M., Bitensky, M. W.: *Neurobiology*, 98, 4693 - 4698 (2001).
- [72] Thulin, C. D., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Truscott, S. M., Old, W. M., Ahn, N. G., Resing, K. A., Hamm, H. E., Bitensky, M. W., Willardson, B. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23805 - 23815 (2001).
- [73] Song, H., Belcastro, M., Young, E. J., Sokolov, M.: *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 23613 – 23621 (2007).
- [74] Sokolov, M., Strissel, K. J., Leskov, I. B., Michaud, N. A., Govardovskii, V. I., Arshavsky, V. Y.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19149 - 19156 (2004).
- [75] Chen, J., Yoshida, T., Nakano, K., Bitensky, M. W.: *Visual Neuroscience*, 22, 19 – 25 (2005).
- [76] Calvert, P. D., Strissel, K. J., Schiesser, W. E., Pugh Jr, E. N., Arshavsky, V. Y.: *TRENDS in Cell Biology*, 16, 560 – 568 (2006).
- [77] Gaudet, R., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Willardson, B. M., Sigler, P. B.: *Molecular Cell*, 3, 649-660 (1999).
- [78] Loew, A., Ho, Y.-K., Blundell, T., Bax, B.: *Structure*, 6, 1007 – 1019 (1998).
- [79] Rezabkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T.: *Biophysical Journal*, 103, 1960 – 1969 (2012).
- [80] Kacirova, M., Kosek, D., Kadek, A., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 16246 – 16260 (2015).
- [81] Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N., Hamm, J., Sigler, P.: *Nature*, 379, 311 - 319 (1996).
- [82] Tanaka, H., Kuo, C.-H., Matsuda, T., Fukada, Y., Hayashi, F., Ding, Y., Irie, Y., and Miki, N.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223, 587 – 591 (1996).
- [83] Hawes, B. E., Touhara, K., Kurose, H., Lefkowitz, R. J., Inglese, J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 29825 – 29830 (1994).
- [84] Tanaka, H., Iwami, C., Kuo, C. H., Ding, Y., Do, E., Irie, Y., Miki, N.: *Neurochemistry International*, 31, 625 – 634 (1997).
- [85] Lee, B. Y., Thulin, C. D., Willardson, B. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 54008 - 54017 (2004).
- [86] Yoshida, T., Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Jensen, G. J., Thornton, B. J., Bitensky, M. W.: *Journal of Biological Chemistry*, 269, 24050 - 24057 (1994).
- [87] Chen, F., Lee, R. H.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233, 370 – 374 (1997).
- [88] Lukov, G. L., Myung, C.-S., McIntire, W. E., Shao, J., Zimmerman, S. S., Garrison, J. C., Willardson, B. M.: *Biochemistry*, 43, 5651 – 5660 (2004).
- [89] Xu, J., Wu, D., Slepak, V. Z., Simon, M. I.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 92, 2086-2090 (1995).
- [90] Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Yoshida, T., Bitensky, M. W.: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 1475 – 1479 (1996).
- [91] Wilkins, J. F., Bitensky, M. W., Willardson, B. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 271, 19232 - 19237 (1996).

- [92] Müller, S., Straub, A., Schröder, S., Bauer, P. H., Lohse, M. J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 11781 – 11786 (1996).
- [93] Bauer, P. H., Blüml, K., Schröder, S., Hegler, J., Dees, C., Lohse, M. J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 9465 – 9471 (1998).
- [94] Babila T., Schaad, N. C., Simonds, W. F., Shinohara, T., Klein, D. C.: *Brain Research*, 585, 141 – 148 (1992).
- [95] Lee, R. H., Lieberman, B. S., Lolley, R. N.: *Experimental Eye Research*, 51, 325 – 333 (1990).
- [96] Kuo, C. H., Miki, N.: *Neuroscience Letters*, 103, 8 - 10 (1989).
- [97] Willardson, B. M., Howlett, A. C.: *Cellular Signalling*, 19, 2417 – 2427 (2007).
- [98] Krizaj, D., Copenhagen, D. R.: *Frontiers in Bioscience*, 7, d2023–2044 (2002).
- [99] Belcastro, M., Song, H., Sinha, S., Song, C., Mathers, P. H., Sokolov, M.: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 3084 – 3091 (2012).
- [100] Chen, S., Wang, Q.-L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Zack, D. J.: *Neuron*, 19, 1017 – 1030 (1997).
- [101] Furukawa, T., Morrow, E. M., Cepko, C. L.: *Cell*, 91, 531 – 541 (1997).
- [102] Krispel, C. A., Sokolov, M., Chen, Y.-M., Song, H., Herrmann, R., Arshavsky, V. Y., Burns, M. E.: *The Journal of General Physiology*, 130, 303 – 312 (2007).
- [103] Obin, M., Lee, B. Y., Meinke, G., Bohm, A., Lee, R. H., Gaudet, R., Hopp, J. A., Arshavsky, V. Y., Willardson, B. M., Taylor, A.: *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44566 – 44575 (2002).
- [104] Wehmeyer, A., Schulz, R.: *Life Science*, 62, PL127 – PL134 (1998).
- [105] Lee, R. H., Ting, T. D., Lieberman, B. S., Tobias, D. E., Lolley, R. N., Ho, Y. K.: *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 25104 – 12 (1992).
- [106] Schulz, R., Wehmeyer, A., Schulz, K., Murphy, J.: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289, 599 – 606 (1999).
- [107] Schulz, R., Wehmeyer, A., Murphy, J., Schulz, K.: *European Journal of Pharmacology*, 375, 349 – 57 (1999).
- [108] Abe, T., Satoh, N., Nakajima, A., Koizumi, T., Tamada, M., Sakuragi, S.: *Experimental Eye Research*, 65, 703 – 710 (1997).
- [109] Zhang, Q., Acland, G. M., Parshall, C. J., Haskell, J., Ray, K., Aguirre, G. D.: *Gene*, 215, 231 – 239 (1998).
- [110] Koulen, P., Kuhn, R., Wässle, H., Brandstätter, J. H.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 96, 9909 – 9914 (1999).
- [111] Ritz, E., Rump, L. C.: *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25, 1048 – 1050 (2010).
- [112] Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., et al.: *Science*; 316, 1331–1336 (2007).
- [113] Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N. et al.: *Nature*, 447, 661 – 678 (2007).
- [114] Palatini, P., Ceolotto, G., Ragazzo, F., Mos, L., Santonastaso, M., Zanata, G., Saladini, F., Casiglia, E.: *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 23, 323 – 329 (2013).
- [115] Herrmann, R., Lobanova, E. S., Hammond, T., Kessler, C., Burns, M. E., Frishman, L. J., Arshavsky, V. Y.: *The Journal of Neuroscience*, 30, 3239 – 3253 (2010).
- [116] Long, J. H., Arshavsky, V. Y., Burns, M. E.: *PLOS one*, 8, 1 – 8 (2013).

- [117] Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A. Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., Cantley, L. C.: *Cell*, 91, 961 - 971 (1997).
- [118] Brown, B. M., Carlson, B. R., Zhu, X., Lolley, R. N., Craft, C. M.: *Biochemistry*, 41, 13526 – 13538 (2002).
- [119] Roseboom, P. H., Weller, J. L., Babila, T., Aitken, A., Sellers, L. A., Moffett, J. R., Namboodiri, M. A., Klein, D. C.: *DNA and Cell Biology*, 13, 629 – 640 (1994).
- [120] Margulis, A., Dang, L., Pulukuri, S., Lee, R., Sitamarayya, A.: *Molecular Vision*, 8, 477 – 482 (2002).
- [121] Confalonieri, F.: Duguet, M.: *BioEssays*, 17, 639 – 650 (1995).
- [122] Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M., Young, R. A.: *Cell*, 73, 1361 – 1375 (1993).
- [123] Koleske, A. J., and Young, R. A.: *Nature*, 368, 466 – 469 (1994).
- [124] Shivanandappa, T., Margolis, J. W., Wagner, B. J.: *Current Eye Research*, 10, 871 - 876 (1991).
- [125] Cai, H., Singh, I., Wagner, B. J.: *Experimental Eye Research*, 66, 339 - 346 (1998).
- [126] Obin, M., Nowell, T., Taylor, A.: *Current Eye Research*, 14, 751 - 760 (1995).
- [127] Obin, M. S., Jahngen-Hodge, J., Nowell, T., Taylor, A.: *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 14473 - 14484 (1996).
- [128] Makino, Y., Yamano, K., Masato, K., Morikawa, K., Kishimoto, T., Shimbara, N., Tanaka, K., Tamura, T.: *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 23201 - 23205 (1997).
- [129] Makino, Y., Yogosawa, S., Kanemaki, M., Yoshida, T., Yamano, K., Kishimoto, T., Moncollin, V., Egly, J.-M., Muramatsu, M., Tamura, T.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220, 1049 – 1054 (1996).
- [130] Goyer, C., Lee, H. S., Malo, D., Sonenberg, N.: *DNA Cell Biology*, 11, 579 – 585 (1992).
- [131] Hirtzlin, J., Faerber, P. M., Franklin, R. M.: *Eur. J. Biochem.*, 226, 673 – 680 (1994).
- [132] Akiyama, K., Yokota, K., Kagawa, S., Shimbara, N., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Noda, C., Tanaka, K.: *FEBS Letters*, 363, 151 - 156 (1995).
- [133] vom Baur, E. V., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J., Garnier, J. M., Vivat, V., Le Douarin, B. L., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R.: *EMBO Journal*, 15, 110 - 124 (1996).
- [134] Lee, J. W., Ryan, F., Swaffield, J. C., Johnston, S. A., Moore, D. D.: *Nature*, 374, 91 - 94 (1995).
- [135] Wang, W., Chevray, P. M., Nathans, D.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 93, 8236 - 8240 (1996).
- [136] Fraser, R. A., Rossignol, M., Heard, D. J., Egly, J.-M., Chambon, P. M.: *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 7122 - 7126 (1997).
- [137] Freund, C. L., Gregory-Evans, C. Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Herbrick, D. Ng, J. A., Duncan, A., Scherer, S. W., Tsui, J., L. C., Loutradis-Anagnostou, A., Jacobson, S. G., Cepko, C. L., Bhattacharya, S. S., McInnes, R. R.: *Cell*, 91, 543 – 553 (1997).
- [138] Li, X., Chen, S., Wang, Q., Zack, D. J., Snyder, S. H., Borjigin, J.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 95, 1876 – 1881 (1998).
- [139] Sakamoto, K., Oishi, K., Okada, T., Onuma, Y., Yokoyama, K., Sugimoto, K., Ishida, N.: *Neuroscience Letters*, 261, 101 – 104 (1999).

- [140] Santagata, S., Maire, C. L., Idbaih, A., Geffers, L., Correll, M., Holton, K., Quackenbush, J., Ligon, K. L.: *PloS One*, 4, e7932 (2009).
- [141] Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Huang, Y., Hanna, D. B., Freund, C. L., Affatigato, L. M., Carr, R. E., Zack, D. J., Stone, E. M., McInnes, R. R.: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39, 2417 - 2426 (1998).
- [142] Lakowski J., Baron, M., Bainbridge, J., Barber, A. C., Pearson, R. A., Ali, R. R., Sowden, J. C.: *Human Molecular Genetics*, 23, 4545 - 4559 (2010).
- [143] Klenk, C., Humrich, J., Quitterer, U., Lohse, M. J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 8357 – 8364 (2006).
- [144] Rezaczkova, L., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Journal of Structural Biology*, 170, 451-461 (2010).
- [145] Rezaczkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T.: *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 43527 – 43536 (2011).
- [146] Zhang, H., Constantine, R., Vorobiev, S. et al.: *Nature Neuroscience*, 14, 874 – 880 (2011).
- [147] Gopalakrishna, K. N., Doddapuneni, K., Boyd, K. K., Masuho, I., Martemyanov, K. A., Artemyev, N. O.: *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 28954 – 28962 (2011).
- [148] Kacířová, M.: *Studium stechiometrie komplexu 14-3-3 proteinu s RGS3 proteinem*, Bakalářská práce, PŘF UK, Praha 2009.
- [149] Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R. J., Fu, H., Liddington, R.: *Nature*, 376, 191 - 194 (1995).
- [150] Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S. J.: *Nature*, 376, 188 - 191 (1995).
- [151] Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G., Soll, J.: *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 498 - 501 (1992).
- [152] Ferl, R. J., Manak, M. S., Reyes, M. F.: *Genome Biology*, 3, REVIEWS3010 (2002).
- [153] Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo J., Patel, Y.: *Journal of Biological Chemistry*, 270, 5706 - 5709 (1995).
- [154] Lottersberger, F., Panza, A., Lucchini, G., Piatti, S., Longhesei, M.P.: *Genetics*, 106, 661 - 675 (2006).
- [155] Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C., Sommarin, M.: *Plant Physiology*, 127, 142 - 149 (2001).
- [156] Gardino, A. K., Smerdon, S. J., Yaffe, M. B.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 173 - 182 (2006).
- [157] Tzivion, G., Gupta, V. S., Kaplun, L., Balan, V.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 203 - 213 (2006).
- [158] Porter, G. W., Khuri, F. R., Fu, H.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 193 - 202 (2006).
- [159] Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F., Smidt, M. P.: *Biochemical Journal*, 380, 297 - 309 (2004).
- [160] Wiltfang, J., Otto, M., Baxter, H. C., Bodemer, M., Steinacker, P., Bahn, E., Zerr, I., Kornhuber, J., Kretzschmar, H. A., Poser, S., Rütther, E., Aitken, A.: *Journal of Neurochemistry*, 73, 2485 – 90 (1999).
- [161] Mackie, S., Aitken, A.: *FEBS Journal*, 272, 4202 – 10 (2005).
- [162] Baxter, H. C., Liu, W.G., Aitken, A., Fraser, J. R.: *Journal of Neuroscience*, 109, 6 – 15 (2002).
- [163] Layfield, R., Fergusson, J., Aitken, A., Lowe, J., Landon, M., Mayer, J.: *Neuroscience Letters*, 209, 57 – 60 (1996).

- [164] Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B.: *Journal of Neuroscience*, 19, 5782 – 91 (1999).
- [165] Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., Yaffe, M. B.: *Molecular Cell*, 4, 153 - 166 (1999).
- [166] Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., Klein, D. C.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 102, 1222 - 1227 (2005).
- [167] Wang, H., Zhang, L., Liddington, R., Fu, H.: *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 16297 - 16304 (1998).
- [168] Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., Liddington, R. C.: *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 16305 - 16310 (1998).
- [169] Obsil, T., Girlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S., Dyda, F.: *Cell*, 105, 257 - 267 (2001).
- [170] Bachmann, M., Huber, J. L., Liao, P. C., Gage, D. A., Huber, S.C.: *FEBS Letters*, 387, 127 - 131 (1996).
- [171] Macakova, E., Kopecka, M., Kukacka, Z., Veisova, D., Novak, P., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 4491 – 4499 (2013).
- [172] Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E., Yaffe, M. B.: *Journal of Biological Chemistry*, 156, 817 - 828 (2002).
- [173] van der Hoeven, P. C. J., van der Wal, J. C. M., Ruurs, P., van Dijk, M. C. M., van Blitterswijk, W.J.: *Biochemical Journal*, 345, 297 - 306 (2000).
- [174] Aitken, A.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 162 - 172 (2006).
- [175] Mackintosh, C.: *Biochemical Journal*, 381 (pt2), 329 - 342 (2004).
- [176] Wilker, E., Yaffe, M. B.: *Journal of Molecular and Cellular Kardiology*, 37, 633 - 642 (2004).
- [177] Obsilova, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., Obsil, T.: *Physiological Research*, 57, 11 - 21 (2008).
- [178] Veisova, D., Rezabkova, L., Stepanek, M., Novotna, P., Herman, P., Vecer, J., Obsil, T., Obsilova, V.: *Biochemistry*, 49, 3853 – 3861 (2010).
- [179] Roessle, M. W., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrmann, T., Konarev, P., Round, A., Fiedler, S., Hermes, C., Svergun, D.: *Journal of Applied Crystallography*, 40, S190 – S194 (2007).
- [180] Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 25, 495 – 503 (1992).
- [181] Svergun, D. I.: *Biophysical Journal*, 76, 2879 – 2886 (1999).
- [182] Volkov, V. V., Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 36, 860 – 864 (2003).
- [183] Bernado, P., Svergun, D. I.: *Molecular BioSystems*, 8, 151 – 167 (2012).
- [184] Porod, G.: *Small-angle X-ray Scattering*, kapitola General theory, 17 – 51, Academic Press, London, 1982.
- [185] Franke, D., Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 42, 342 - 346 (2009).
- [186] Kozin, M. B., Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 34, 33 - 41 (2001).
- [187] Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon S. J., Gamblin, S. J., Yaffe, M. B.: *Molecular Cell*, 4, 153 - 166 (1999).
- [188] Svergun, D., Barberato, C., Koch, M. H. J.: *Journal of Applied Crystallography*, 28, 768 - 773 (1995).
- [189] Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A., Sali, A.: *Biophysical Journal*, 105, 962 - 974 (2013).

- [190] Goddard, T. D., Kneller, D. G.: *Sparky NMR analysis software*, University of California, San Francisco, 2001.
- [191] Schuck, P.: *Biophysical Journal*, 78, 1606 – 1619 (2000).
- [192] Schuck, P.: *Analytical Biochemistry*, 320, 104 – 124 (2003).
- [193] Strohalm, M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., Havlicek, V.: *Analytical Chemistry*, 82, 4648 – 4651 (2010).
- [194] Wang, L., Pan, H. Smith, D. L.: *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 132 - 138 (2002).
- [195] Rey, M., Man, P., Brandolin, G., Forest, E., Pelosi, L.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 3431 - 3438 (2009).
- [196] Guinier, A.: *Annales de Physique – Paris*, 12, 161 - 237 (1939).
- [197] Rothe, G. M.: *Electrophoresis*, 9, 307 – 316 (1988).
- [198] Vecer, J., Herman, P.: *Journal of Fluorescence*, 21, 873 – 881 (2011).
- [199] Eftink, M. R., Ghiron, C. A.: *Biochemistry*, 15, 672 – 680 (1976).
- [200] Fischer, H., Neto, M. D., Napolitano, H. B., Polikarpov, I., Craievich, A. F.: *Journal of Applied Crystallography*, 43, 101 - 109 (2010).
- [201] Receveur-Brechot, V., Durand, D.: *Current protein & peptide science*, 13, 55 - 75 (2012).
- [202] Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Sali, A.: *Nucleic Acids Research*, 38, W540 - 544 (2010).
- [203] Weinkam, P., Pons, J., Sali, A.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 109, 4875 - 4880 (2012).
- [204] Šimůnek, J.: *Studium posttranslačních modifikací fosducinu*, Diplomová práce, PřF UK, Praha (2016).
- [205] Obsilova, V., Kopecka, M., Kosek, D., Kacirova, M., Kylarova, S., Rezabkova, L., Obsil T.: *Physiological Research*, 63, S155 – S164 (2014).
- [206] Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy (Third Edition)*, Springer, Singapore, 2006.
- [207] Ghisaidoobe, A. B. T., Chung, S. J.: *International Journal of Molecular Science*, 15, 22518 22538 (2014).
- [208] Vivian J. T., Callis, P. R.: *Biophysical Journal*, 80, 2093 – 2109 (2001).
- [209] Teale, F. V. J, Weber, G.: *Biochemical Journal*, 65, 476 – 482 (1957).
- [210] Kirby, E. P., Steiner, R. F.: *The Journal of Physical Chemistry*, 74, 4480 – 4490 (1970).
- [211] Ho, C., Stubbs, C. D.: *Biophysical Journal*, 34, 63897 – 902 (1992).
- [212] Chattopadhyay, A., Rawat, S. S., Kelkar, D. A., Ray, S., Chakrabarti, A.: *Protein Science*, 12, 2389 – 2403 (2003).
- [213] Pavlovich, V. S.: *Biopolymers*, 82, 435 – 441 (2006).
- [214] Canuto, S.: *Solvation effects on Molecules and Biomolecules*, Springer, Brazil, 2008.
- [215] Möller, M., Denicola, A.: *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30, 175 – 178 (2002).
- [216] Keizer, J.: *Journal of the American Chemical Society*, 105, 1494 – 1498 (1983).
- [217] Rolinski, O. J., Martin, A., Birch, D. J. S.: *Journal of Biomedical Optics*, 12, 034013-1 – 034013-7 (2007).
- [218] Charnes, A., Frome, E. L., Yu, P. L.: *Journal of the American Statistical Association*, 71, 169 – 171 (1976).
- [219] Prosser, V. a kol.: *Experimentální metody biofyziky*, Academia, Praha, 1989.

- [220] Bohren, C. F., Huffman, D. R.: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley-VCH, Germany, 2004.
- [221] Berne, B. J., Pecora, R.: *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Dover Publications, Inc., New York, 2000.
- [222] Arzenšek, D.: *Dynamic Light Scattering and Application to Proteins in Solutions*, Seminar – 4th Year, University of Ljubljana, Faculty of Mathematics and Physics, 2010.
- [223] Arzenšek, D.: *Physics of Colloidal Interactions in Protein Aggregation Processes*, Doctoral thesis, University of Ljubljana, Faculty of Mathematics and Physics, 2015.
- [224] Hiemenz, P. C., Rajagopalan, R.: *Principles of Colloid and Surface Chemistry, Third Edition, Revised and Expanded*, CRC Press, 1997.
- [225] Provencher, S. W.: *Computer Physics Communications*, 27, 213 – 227, 229 - 242 (1982).
- [226] Mertens, H. D. T., Svergun, D. I.: *Journal of Structural Biology*, 172, 128 – 141 (2010).
- [227] Als-Nielsen, J., McMorrow, D.: *Elements of Modern X-ray Physics*, John Wiley, Chichester, West Sussex, 2011.
- [228] Svergun, D. I., Koch, M. H. J.: *Reports on Progress in Physics*, 66, 1735 – 1782 (2003).
- [229] Flory, P. J.: *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, New York (1965).
- [230] Kohn, J. E., Millet, I. S., Jacob, J., Zagrovic, B., Dillon, T. M., Cingel, N., Dothager, R. S., Seifert, S., Thiagarajan, P., Sosnick, T. R., Hasan, M. Z., Pande, V. S., Ruczinski, I., Doniach, S., Plaxco, K. W.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 101, 12491 – 12496 (2004).
- [231] Glatter, O.: *Journal of Applied Crystallography*, 10, 415 – 421 (1977).
- [232] Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Kikhney, A. G., Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 40, s223 – s228 (2007).
- [233] Doniach, S.: *Chemical Reviews*, 101, 1763 – 1778 (2001).
- [234] Stuhmann, H. B.: *Acta Crystallographica*, A26, 297 – 306 (1970b).
- [235] Chacon, P., Moran, F., Diaz, J. F., Pantos, E., Andreu, J. M.: *Biophysical Journal*, 74, 2760 – 2775 (1998).
- [236] Bada, M., Walther, D., Arcangioli, B., Doniach, S., Delarue, M.: *The Journal of Molecular Biology*, 300, 563 – 574 (2000).
- [237] Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D., Vecchi, M. P.: *Science*, 220, 671 – 680 (1983).
- [238] Bernadó, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M., Svergun, D. I.: *Journal of the American Chemical Society*, 129, 5656 – 5664 (2007).
- [239] Marsh, J. A., Neale, C., Jack, F. E., Choy, W. Y., Lee, A. Y., Crowhurst, K. A., Forman-Kay, J. D.: *Journal of Molecular Biology*, 367, 1494 – 1510 (2007).
- [240] Marsh, J. A., Forman-Kay, J. D.: *Journal of Molecular Biology*, 391, 359 – 374 (2009).
- [241] Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A., Sali, A.: *Biophysical Journal*, 105, 962 - 974 (2013).
- [242] Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, III, A. G., Skelton, N. J., Rance, M.: *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Elsevier, USA, 2007.
- [243] Dračínský, M.: *Skripta k výuce NMR kurzu*, dostupné na www.uochb.cz/web/structure/671.html?lang=cz (září 2016).

- [244] Tugarinov, V., Muhandiram, M., Ayed, A., Kay, L. E.: *Journal of the American Chemical Society*, 124, 10025 – 10035 (2002).
- [245] Goddard, D., Kneller, D. G: *SPARKY 3*, University of California, San Francisco, dostupné na <https://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/> (září 2016).
- [246] Cole, J. L., Lary, J. W., Moody, T. P., Laue, T. M.: *Methods in Cell Biology*, 84, 143 – 179 (2008).
- [247] Vaněk, O., Bezouška, K.: *Chemické Listy*, 104, 1155 – 1162 (2010).
- [248] Teller, D. C., Swanson, E., de Haën, C.: *Methods in enzymology*, 61, 104 – 124 (1979).
- [249] van Holde, K. E., Johnson, W. C., Ho, P. S.: *Principles of physical biochemistry*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1998.
- [250] Svedberg, T., Pedersen, K. O.: *The Ultracentrifuge.*, Oxford, Claredon Press, 1940.
- [251] Schuck, P.: *Biophysical Journal*, 75, 1503 – 1512 (1998).
- [252] Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., and Pelletier, S. L.: *Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In ‘Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science’*, 90 – 125, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1992).
- [253] Johnson Jr, W. C.: *Methods of Biochemical Analysis*, 31, 62 - 163 (1985).
- [254] Woody, R. W.: *Methods in Enzymology*, 246, 34 - 71 (1995).
- [255] Woody, R. W.: *Theory of Circular dichroism of Proteins. In Fasman GD (ed) Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press Publisher, New York, 25 - 30, 1996.
- [256] Kelly, S. M., Price, N. C.: *Current Protein and Peptide Science*, 1, 349 – 384 (2000).
- [257] Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751, 119 – 139 (2005).
- [258] Correa, D. H. A., Ramos, C. H. I.: *African Journal of Biochemistry Research*, 3, 164 – 173 (2009).
- [259] Greenfield N. J., Fasman G. D.: *Biochemistry*, 8, 4108 - 4116 (1969).
- [260] Whitmore, L., Wallace, B. A.: *Nucleic Acids Research*, 32, W668 – W673 (2004).
- [261] Whitmore, L., Wallace, B. A.: *Biopolymers*, 89, 392 – 400 (2008).
- [262] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava, 2003.
- [263] Wolf, B.: *Handbook of Ion Sources*, CRC Press, Darmstadt, 1995.
- [264] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M.: *Mass Spectrometry Reviews*, 9, 37 – 70 (1990).
- [265] Moy, F. J., Haraki, K., Mobilio, D., Walker, G., Powers, R.: *Analytical Chemistry*, 73, 571 – 581 (2001).
- [266] Zhang, Z., Smith, D. L.: *Protein Science*, 2, 522 – 531 (1993).
- [267] Borsellino, A., Omodeo, P., Strom, R., Vecchi, A., Wanke, E.: *Developements in Biophysical Research*, str. 274, Plenum Press, New York and London, 1980.

Přílohy

8 Publikace

- 1) Rezabkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P, Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural Modulation of Phosducin by Phosphorylation and 14-3-3 Protein Binding*, *Biophysical Journal*, 103, 1960 – 1989 (2012).

IF₂₀₁₂: 3,668

Podíl autorky na publikaci:

V rámci této publikace jsem exprimovala a purifikovala proteiny pro fluorescenční měření, analytickou ultracentrifugaci (AUC), dynamický rozptyl světla (DLS) a limitovanou proteolýzu. Podílela jsem se na měření proteinů pomocí AUC. Samostatně jsem prováděla pokusy DLS a limitovanou proteolýzu. Dále jsem se podílela na vyhodnocování dat z DLS.

- 2) Kacirova, M., Kosek, D., Kadek, A., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural Characterization of Phosducin and Its Complex with the 14-3-3 Protein*, *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 16246 – 16260 (2015).

IF₂₀₁₅: 4,258

Podíl autorky na publikaci:

V rámci této publikace jsem exprimovala a purifikovala proteiny a připravovala vzorky pro veškerá měření, kromě časově-rozlišených fluorescenčních měření tryptofanových mutantních forem fosducinu. Samostatně jsem měřila statické zhášení tryptofanové fluorescence a dynamický rozptyl světla a vyhodnotila jsem získaná data. Podílela jsem se na měřeních metodami časově-rozlišeného zhášení intenzity fluorescence ANS, hmotnostní spektrometrie, malouhlového rozptylu rentgenového záření, analytické ultracentrifugace a cirkulárního dichroismu. Přispěla jsem k vyhodnocování dat z H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.

3) Rukopis – v recenzním řízení:

Kacirova, M., Novacek, J., Man, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural Basis for Regulation of Phosducin Function by 14-3-3 Protein*

Podíl autorky na publikaci:

V rámci této publikace jsem exprimovala a purifikovala proteiny a připravovala vzorky pro veškerá měření. Samostatně jsem prováděla pokusy metodami limitované proteolýzy a limitované defosforylace. Podílela jsem se na vyhodnocování dat limitované proteolýzy a defosforylace spojené s hmotnostní spektrometrií.

- 4) Obsilova, V., Kopecka, M., Kosek, D., Kacirova, M., Kylarova, S., Rezabkova, L., Obsil T.: *Mechanism of the 14-3-3 Protein Function: Regulation of Protein Function Through Conformational Modulation*, *Physiological Research*, 63, S155 – S164 (2014).

IF₂₀₁₄: 1,293

Přehledový článek, ve kterém jsou také diskutovány výsledky této disertační práce.

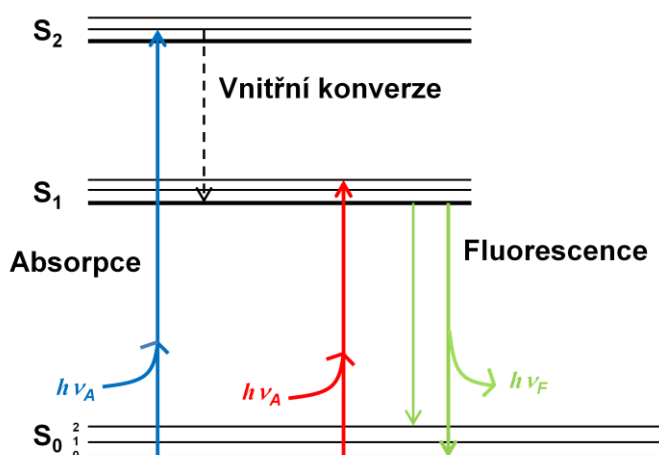
9 Teoretické základy k použitým metodám

9.1 Fluorescenční techniky

9.1.1 Základní fyzikální princip fluorescence

Proces, při kterém dochází k emisi energie ve formě světla po předchozí absorpci kvanta energie, trvající řádově 10^{-8} s, se nazývá fluorescence. Proces absorpce záření trvá řádově 10^{-15} s. Absorbované záření se může pohybovat v širokém rozmezí vlnových délek λ , nejčastěji v ultrafialové oblasti (UV, 400 – 10 nm) a oblasti viditelného záření (VIS, 400 – 750 nm), ale možná je i absorpce v oblasti rentgenového záření (RTG, 10 nm – 100 pm). Emitované záření má větší vlnovou délku λ , než světlo dopadající. Výjimkou jsou případy, kdy dojde k absorpci dvou a více fotonů. Pak může emisní záření dosahovat i menších vlnových délek, než má záření dopadající. V předchozím jednofotonovém případě dochází k energetickým ztrátám v důsledku spotřeby energie pro vibrační a rotační pohyby molekul, což se projeví jako tepelné sálání.

Fluorescenci zobrazuje následující obrázek *Obr. 9.1*, tzv. Jabloňského diagram.



Obr. 9.1 Zjednodušený Jabloňského diagram. Šipky směřující hrotem nahoru představují absorpci záření o energii $h\nu_A$, kde h představuje Planckovu konstantu a ν_A představuje frekvenci absorbovaného záření. Při tomto ději se ozářený atom dostává ze základního elektronového singletového stavu S_0 do některého z excitovaných elektronových stavů $S_1, S_2 \dots$ v závislosti na dodané energii. Celistvé šipky směřující hrotem dolů představují fluorescenci. Jedná se o zářivý přechod s energií $h\nu_F$. Přerušované šipky představují nezářivé vibrační přechody, při nichž se energie vyzáří ve formě tepla. Tenké vodorovné linky představují vibrační stavy molekuly (převzato a upraveno z [206]).

Vnitřní konverze (IC z angl. *I*nternal *C*onversion) zobrazená v Jabloňského diagramu (*Obr. 9.1*) trvá řádově 10^{-12} s nebo i méně [206].

Fluorescence fluoreskující látky, fluoroforu, je charakterizována dobou excitovaného stavu τ_0 fluoroforu. Tato doba je dána rovnicí

$$\tau_0 = \frac{1}{k}, \quad (\text{rovnice 9.1})$$

kde k je monomolekulární rychlostní konstanta dohasínání fluorescence a určuje se experimentálně z kinetiky dohasínání. V tomto případě v sobě zahrnuje pouze zářivé procesy. Doba života excitovaného stavu ovlivněná i nezářivými procesy se značí τ .

Fluorescence dohasíná exponenciálně podle vztahu

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (\text{rovnice 9.2})$$

kde I je intenzita fluoreskujícího záření v čase t , I_0 je intenzita v čase $t = 0$.

Dále fluorescenci charakterizuje veličina zvaná kvantový výtěžek Q , který je zjednodušeně dán poměrem

$$Q = \frac{N_{emit}}{N_{abs}}, \quad (\text{rovnice 9.3})$$

kde N_{emit} je počet emitovaných fotonů a N_{abs} je počet absorbovaných fotonů [206].

9.1.2 Zhášení tryptofanové fluorescence

Celková fluorescence proteinů je dána souhrnem fluorescencí všech fluoroforů obsažených v molekule proteinu. Mezi tyto fluorofory patří aromatické aminokyseliny tryptofan (Trp, W), fenylalanin (Phe, F) a tyrosin (Tyr, Y), ale také disulfidické vazby [207]. Nejintenzivnější fluorescence je pozorována u Trp residuí, proto se fluorescence tryptofanů využívá ke strukturním studiím proteinů a studiím jejich konformačních změn, aniž by byla zasažena jejich primární sekvence. Studují se ale i mutantní formy proteinů obsahujících buď uměle zavedené tryptofany, nebo uměle přeměněné tryptofany, např. mutací Trp \rightarrow Phe. U takovýchto mutantních proteinů je vhodné jinými technikami zjistit, zda mutací nedošlo k funkčním a velkým strukturním změnám v molekule proteinu. Další výhodou je pak relativně malé zastoupení tryptofanových residuí v proteinech. Některé proteiny mohou obsahovat i pouze jeden tryptofan, takže během strukturních studií se tryptofany vzájemně neovlivňují a lze tak získat informaci o konkrétním tryptofanovém zbytku a jeho blízkém okolí. Některá residua, jako např. kyselina asparagová (Asp, D), nebo kyselina glutamová (Glu, E) mohou svými protonovanými postranními skupinami také ovlivňovat nejbližší okolí tryptofanového zbytku [208], takže lze získat informaci

o jejich vzájemné prostorové blízkosti. Tryptofan je navíc oproti tyrosinu citlivější na změnu v blízkém okolí [206].

Maximální absorpce tryptofanu je pozorována u vlnové délky dopadajícího záření $\lambda = 280$ nm. Emise takto excitovaného tryptofanu se pak projeví zářením v oblasti vlnových délek od 300 do 350 nm, v závislosti na okolním prostředí. Na takto velký rozsah maxim v emisních pásech tryptofanu má vliv viskozita rozpouštědla, polarita rozpouštědla a teplota okolního prostředí [206, 208, 209]. Na stabilizaci excitovaného stavu fluoroforu má vliv polarita blízkého okolí fluoroforu, v závislosti na typu elektronového přechodu, který v důsledku absorpce světelného záření nastane. Uvažujeme-li povolený přechod $\pi \rightarrow \pi^*$, který u tryptofanu nastává, excitovaný elektron se dostává ze základního stavu do více polárního excitovaného stavu. Ten je stabilizován interakcí s polárním rozpouštědlem. Při přechodu z nepolárního do polárního rozpouštědla pak dochází k červenému posuvu s větší hodnotou maxima emisní vlnové délky a nižší energií [206]. Střední doba života excitovaného stavu τ se u tryptofanu a AEDANS zkracuje v polárnějším prostředí. Jednou z příčin může být fakt, že větší dipólové momenty μ okolních molekul mohou zvyšovat účinnost přenosu energie v rámci daného elektronového stavu fluoroforu [210 - 212]. U jiných fluoroforů tomu může být naopak [213, 214]. Záleží především na tom, jak nezářivé procesy reagují na přítomnost polárního okolí.

Bavíme-li se konkrétně o zhášení tryptofanové fluorescence pomocí tzv. zhášedla, získáme tak informaci především o přístupnosti tryptofanového zbytku okolnímu rozpouštědлу. Zhášedlo bývá obsaženo v rozpouštědle, ve kterém je rozpuštěn i protein, a v důsledku strukturní změny, která může nastat např. navázáním proteinu k ligandu, nebo změnou pH okolního prostředí apod., může dojít k odhalení tryptofanového zbytku z jeho hydrofobního jádra a jeho rychlejšímu návratu do základního elektronového stavu. Jako zhášedlo se může použít např. akrylamid, jodid, kyslík apod. [215].

Pro zhášení fluorescence jsou navrženy dva základní mechanismy. Jedním z nich je zhášení statické, které nastává díky tvorbě nezářivých komplexů se zhášedlem a není závislé na difuzi fluoroforu, ani zhášedla. Druhým typem zhášení je zhášení dynamické (kolizní), které závisí na difuzi fluoroforu a rozpouštědla a je dáno Stern-Volmerovou rovnicí ve tvaru

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (\text{rovnice 9.4})$$

kde I_0 a I jsou intenzity fluorescence v nepřítomnosti, respektive přítomnosti rozpouštědla, k_q je tzv. bimolekulární rychlostní konstanta zhášení (s^{-1}), τ_0 je doba života excitovaného stavu fluoroforu v nepřítomnosti zhášedla (s) a $[Q]$ je molární koncentrace zhášedla (z angl. *Quencher*) ($mol \cdot l^{-1}$). Součin $k_q \cdot \tau_0$ bývá označován jako Stern-Volmerova konstanta K_{sv} .

Stern-Volmerova rovnice má tvar lineární rovnice a vynáší se do grafu jako $\frac{I_0}{I} = f([Q])$. Stern-Volmerovým výnosem lze přímo získat hodnotu K_{sv} , která je směrnicí vynesené přímky. Nelinearita výnosu pak vypovídá o přítomnosti většího množství fluoroforů, přičemž jeden z nich je méně přístupný zhášedlu. V takovém případě je křivka zakřivena směrem k ose $[Q]$. Pokud je křivka zakřivena směrem nahoru, od osy $[Q]$, příčinou zakřivení bývá často existence jak dynamické, tak statické formy zhášení ve vzorku [216]. Hodnoty I_0 a I lze získat přímým měřením, hodnota $[Q]$ je volitelná, hodnotu τ_0 lze získat měřením časově-rozlišeného zhášení fluorescence (viz dále) a hodnotu k_q pak výpočtem po získání hodnoty K_{sv} . Bimolekulární rychlostní konstanta zhášení k_q odráží účinnost zhášení a přístupnost fluoroforu zhášedlu. Čím je vyšší, tím vyšší je účinnost zhášení a přístupnost fluoroforu zhášedlu [206].

Při vyhodnocování dat ze statického zhášení fluorescence se musí uvažovat tzv. korekce na efekt vnitřního filtru. Tento efekt vzniká v důsledku vzniku pomyslných vrstev v rámci kyvety, ve které je vzorek obsažen. Dopadající záření pak v rámci kyvety excituje obsažené fluorofory nerovnoměrně, tedy ty nejbližší stěnám kyvety nejvíce a s postupnou rostoucí hloubkou méně, neboť je toto záření tlumeno vnějšími vrstvami. Pro odstranění tohoto efektu se tedy změří i fluorescence samotného pufru s postupnými přídávky zhášedla stejně, jako v případě vzorku, při daných excitačních (v mém případě 297 nm) i emisních (v mém případě 340 nm) vlnových délkách, a získaná intenzita I_c se vypočítá podle rovnice

$$I_c = I_{mer} \cdot 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}}, \quad (\text{rovnice 9.5})$$

kde A_{ex} a A_{em} představují absorbanci pufru s obsahem určité koncentrace zhášedla při excitační (297 nm), respektive emisní (340 nm) vlnové délce a I_{mer} představuje změřenou hodnotu intenzity pro daný objem vzorku, teplotu a koncentraci zhášedla. Konečnou reálnou hodnotu intenzity fluoroforu I_{kon} ve vzorku lze pak získat z rovnice zahrnující objemové změny i korekce na vnitřní filtr

$$I_{kon} = I_{mer} - I_{puf} \cdot \frac{V_{vzorek}}{V_0} \cdot 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}}, \quad (\text{rovnice 9.6})$$

kde V_0 je počáteční objem vzorku bez zhášedla a V_{vzorek} je aktuální objem vzorku po přidavku zhášedla. I_{puf} je intenzita fluorescence pufru změřená současně s měřením intenzit fluorescencí vzorků před a po jednotlivých přidavcích zhášedla při emisní vlnové délce.

9.1.3 Časově-rozlišené dohasínání intenzity fluorescence

Měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence fluoroforu obsaženého v molekule proteinu je užitečným nástrojem ke zjišťování informací o mikrookolí fluoroforu. Dohasínání fluorescence fluoroforu je dáno střední dobou života excitovaného stavu τ_{mean} (z angl. *mean* - *střední*) a může být urychleno vystavením fluoroforu více polárním prostředí, jakým může být vodný roztok (viz kapitola 9.1.2). Tato metoda tedy může poskytnout informace o dynamice molekul, jejich vzájemné interakci a o dalších dynamických procesech molekul, které nás zajímají. Střední doba života fluoroforu τ_{mean} je střední doba mezi excitací a emisí světla při návratu fluoroforu do jeho základního elektronového stavu.

Metoda tedy podává informaci o poklesu intenzity fluorescence $I(t)$ v závislosti na čase t . Na rozdíl od ustálené fluorescence se u časově-rozlišené fluorescence používá pulzní excitace, nebo fázově modulované budící záření. Z rovnice 9.2 vyplývá, že dohasínání fluorescence lze popsat exponenciálním poklesem intenzity fluorescence. Tento vztah platí pro sférické částice a lze jej také zapsat ve tvaru

$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_{mean}}} \quad (\text{rovnice 9.7})$$

Za platnosti vztahu 9.7 lze hodnotu τ_{mean} získat z výnosu závislosti $\ln I(t) = f(t)$, kde směrnice přímky je rovna $-1/\tau_{mean}$ [206].

Pokud vzorek obsahuje více fluoroforů, určuje se jejich poměrná část, která přispívá k celkové intenzitě dohasínání fluorescence. Tento stav, kterému se říká multiexponenciální dohasínání, lze zapsat rovnicí

$$I(t) = \alpha_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \alpha_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + \dots + \alpha_N e^{-\frac{t}{\tau_N}} = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (\text{rovnice 9.8})$$

a platí

$$I_0 = \sum_i \alpha_i \quad (\text{rovnice 9.9})$$

α_i představuje poměrné zastoupení fluoroforu, tedy distribuci středních dob života jednotlivých fluoroforů. Celková Intenzita $I(t)$ je dána konvolucí (součtem) příspěvků od každého fluoroforu. V případě multiexponenciálního dohasínání fluorescence nebude závislost $I(t) = f(t)$ lineární, ale zakřivená. Pro získání informace o množství jednotlivých fluoroforů a jejich dob života se musí provést dekonvoluce získaného signálu. I v případě obsahu jednoho tryptofanu ve vzorku je možné pozorovat multiexponenciální dohasínání fluorescence. Je to dáno např. větším množstvím konformací proteinu v roztoku [217].

Pro analýzu naměřených intenzit $I(t)$ lze použít např. metodu nejmenších čtverců [218], nebo metodu maximální entropie (SVD-MEM) [198]. Pomocí SVD-MEM se získá sada amplitud α_i , které představují distribuci dob života excitovaných stavů fluoroforů τ_i . Střední doba života je pak vypočítána podle vzorce

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \cdot \tau_i, \quad (\text{rovnice 9.10})$$

kde f_i představuje frakční intenzitu, která je dána vztahem

$$f_i = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i}. \quad (\text{rovnice 9.11})$$

9.1.4 Časově-rozlišený pokles anizotropie fluorescence

Je-li nehybný fluorofor ozařován lineárně polarizovaným zářením a jeho absorpční přechodný dipólový moment je rovnoběžný s jeho emisním přechodným dipólovým momentem, dojde k vyzařování lineárně polarizovaného fluorescenčního záření se stejnou orientací elektrické složky záření, jako má záření dopadající. Dochází-li ovšem k pohybu fluoroforu ať už samotného, nebo v rámci celé molekuly, je úroveň polarizace emisního záření změněna. Úroveň polarizace emisního záření je popsána veličinou anizotropie r (nestejnorodost). Její pokles závisí na rychlosti pohybu fluoroforu, někdy také přesněji řečeno rychlosti rotace molekuly, která rotuje s určitým rotačním korelačním časem ϕ (s). Čím je rychlost pohybů fluoroforu větší (tj. v případě malých rotačních korelačních časů ϕ), tím rychleji se zmenšuje polarizace daného záření a my pozorujeme menší anizotropii r . Tento fakt vyplývá z Perrinovy rovnice 9.12

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau_0}{\phi}}, \quad (\text{rovnice 9.12})$$

kteřá platí pro globulární proteiny. r_0 představuje tzv. vnitřní anizotropii, charakterizující daný elektronový přechod. τ_0 je doba života excitovaného stavu fluoroforu [206]. U velkých molekul, které mají velké rotační korelační časy, pak můžeme pozorovat rostoucí anizotropii. Tento efekt se dá využít při popisu vzniku velkých proteinových komplexů.

Perrinova rovnice (9.12) se dá upravit na tvar, ze kterého lze zjistit rotační difuzní koeficient sférických rotorů D_r

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} (1 + 6D_r \tau_0) = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{RT\tau_0}{\eta V} \right), \quad (\text{rovnice 9.13})$$

kde R je molární plynová konstanta, T je termodynamická teplota (*Kelvin*), η je dynamická viskozita ($N \cdot s \cdot m^{-2}$), V je objem rotující sféry. Vnitřní (fundamentální) anizotropie r_0 fluoroforu je dána rovnicí

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right), \quad (\text{rovnice 9.14})$$

kde β je úhel mezi dipólovými momenty molekuly v jejím základním a excitovaném stavu. Z rovnice 9.14 je patrné, že maximální hodnoty r_0 je dosaženo při $\beta = 0$, kdy jsou oba momenty rovnoběžné. Pak je $r_0 = 0,4$. Takovéto hodnoty je dosaženo v jednofotonovém případě za nepřítomnosti depolarizace. Minimální hodnoty r_0 je dosaženo při $\beta = \pi/2$, kdy jsou momenty na sebe kolmé. Pak je $r_0 = -0,2$.

Intenzita I fluorescence polarizovaného emisního záření se měří ve dvou orientacích. První orientace je rovnoběžná (\parallel) s orientací elektrické složky absorbovaného záření. Druhá orientace je kolmá (\perp) na první orientaci. Hodnotu anizotropie r lze pak určit podle vztahu

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (\text{rovnice 9.15})$$

Intenzita propuštěného emisního záření v horizontální (\perp) či vertikální (\parallel) orientaci je dána umístěním emisních polarizátorů v těchto směrech. Těmito polarizátory pak projde to záření, které má nenulový průmět elektrické složky záření do směru natočení polarizátoru. Od velikosti průmětu se pak odvíjí velikost intenzity v daném směru. V důsledku vzniku nežádoucích jevů v emisních spektrech při měření intenzity fluorescence v jiném úhlu, než je úhel polarizovaného dopadajícího světla, se ale emisní polarizátory natáčejí v tzv.

„magickém úhlu“ $54,7^\circ$. Při tomto úhlu se dá změřit celková intenzita fluorescence $I(t)$ v případě, že doba dohasínání fluorescence je srovnatelná s rotační relaxační dobou. Celková intenzita fluorescence pak nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu [206, 219].

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t). \quad (\text{rovnice 9.16})$$

Při měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence lze získat množství informací o pohybu molekuly obsahující fluorofor. Při stacionárním měření se získají pouze zprůměrované hodnoty intenzit fluorescence. Při časově-rozlišeném měření jsou jak vertikální, tak horizontální složka měřené intenzity brány jako časově proměnné veličiny a celková intenzita $I(t)$ je dána rovnicí 9.16.

Při časově-rozlišeném měření dohasíná anizotropie sférického proteinu obsahujícího jediný fluorofor monoexponenciálně, podle jiné formy Perrinovy rovnice

$$r(t) = r_0 \cdot e^{-\frac{t}{\phi}} = r_0 \cdot e^{-6D_r t} \quad (\text{rovnice 9.17})$$

Vynese-li se závislost $\ln[r(t)] = f(t)$, pak $-1/\phi$ je směrnici.

Multiexponenciální dohasínání nasvědčuje nesymetrické prostorové geometrii molekuly. Z rovnice 9.12 vyplývá, že pokud je doba života excitovaného stavu τ_0 srovnatelná s rotační korelační dobou, podíl $\frac{r}{r_0}$ bude 0,5. Molekulární pohyb bude ovlivňovat anizotropii a my budeme schopni v časovém měřítku tyto změny detekovat a určit z nich některé dynamické parametry molekul ve vzorku.

Při měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence se vzorek ozáří krátkým pulzem (kratším, než je τ_0) záření a emisní záření je detekováno v čase nejdříve pod magickým úhlem (pro získ celkové intenzity fluorescence) a poté ve vertikálním a horizontálním směru. Získané křivky se složí a získá se časový průběh poklesu anizotropie fluorescence.

Pro molekuly vykonávající naráz více druhů pohybů (rychlé segmentální pohyby, pohyby celé molekuly apod.) se celková anizotropie $r(t)$ vyjadřuje jako součet jednotlivých příspěvků anizotropií, tedy jako součet klesajících exponenciál

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-\frac{t}{\phi_i}}, \quad (\text{rovnice 9.18})$$

kde β_i představují amplitudy popisující distribuci rotačních korelačních časů ϕ_i a jejich součtem je vnitřní anizotropie v čase $t = 0$ s

$$r_0 = \sum_i \beta_i. \quad (\text{rovnice 9.19})$$

Amplitudy lze získat metodou maximální entropie (SVD-MEM) [198].

9.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS, z angl. *Dynamic Light Scattering*) je nedestruktivní a neinvazivní metoda, díky které se dá zjistit difúzní koeficient D částic v roztoku a na jeho základě i jejich velikost (hydrodynamický poloměr R_H). DLS slouží také k ověření kvality, přesněji polydisperzity proteinového vzorku, dá se např. zjistit, zda je proteinový vzorek agregován, nebo zda obsahuje pouze částice o stejné velikosti. Zde je nutno zmínit, že informaci o velikosti částic je možné získat i pomocí statického rozptylu světla (SLS) z úhlové závislosti intenzity rozptýleného záření, která je způsobena interferencí vln rozptýlených na jedné částici. Fázový posun vln dostatečný k měřitelné úhlové závislosti ovšem vyžaduje velikosti částic odpovídající typicky nejméně $\lambda/20$, kde λ je vlnová délka použitého záření, takže k měření velikosti molekul proteinů, které dosahují zpravidla jen několika nm, je metoda SLS obvykle nepoužitelná.

Světelný paprsek dopadající na částici je složen z navzájem kolmé elektrické a magnetické složky. Obě složky se šíří ve směru od zdroje záření jako harmonické vlny. Oscilující elektrická složka paprsku po jeho dopadu na částici v ní - zjednodušeně řečeno - indukuje elektrický dipólový moment μ . Tento dipólový moment osciluje s frekvencí stejnou, jako je frekvence dopadajícího záření, a emituje sekundární záření ve všech směrech [220].

Bylo vyzorováno, že částice v roztoku do cca 5 μm vykonávají pozorovatelný Brownův pohyb. Větší částice bývají často těžší, proto u nich Brownův pohyb není pozorovatelný, záleží ovšem také na hustotě částice. Částice s vyšší hustotou vykazují nižší pohyblivost v roztoku. Ozáříme-li pohybující se částice monochromatickým koherentním laserovým paprskem světelného záření (v DLS v červené oblasti 632 - 675 nm), dojde k rozptylu tohoto záření na koloidních částicích a rozptýlené vlny spolu interferují (v případě nekoherentního zdroje záření by díky náhodným fázím vln k interferenci nedocházelo). Díky Brownovu pohybu, který částice vykonávají, se s časem náhodně mění fázové posuny mezi rozptýlenými vlnami a tím i výsledná intenzita rozptýleného světelného záření okolo průměrné hodnoty. Metoda DLS tedy měří intenzitu rozptýleného záření $I(\theta, t)$ jako funkci času t a rozptylového úhlu θ . Rozptýlené záření dopadá na detektor a signál je analyzován digitálním rychlým čítačem fotonů (korelátor), který

vyhodnotí časovou autokorelační funkci signálu. Autokorelační funkce je tedy funkce statistická a pro monodisperzní vzorek je normalizovaná autokorelační funkce $g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ zapsána ve tvaru

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) = \frac{\langle I(\mathbf{q}, t) I(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle}{\langle I(\mathbf{q}, t) \rangle^2}, \quad (\text{rovnice 9.20})$$

kde lomené závorky označují střední hodnotu přes čas t a q je amplituda vlnového vektoru, jehož hodnota je určena vlnovou délkou λ dopadajícího světelného paprsku, úhlem θ , pod kterým je intenzita rozptýleného záření měřena, a indexem lomu rozpouštědla n , podle vztahu [221]

$$\mathbf{q} = \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \right) \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{rovnice 9.21})$$

Vlnový vektor \mathbf{q} je vektorovým rozdílem vlnového vektoru \mathbf{k}_i dopadajícího paprsku a vlnového vektoru \mathbf{k}_f rozptýleného paprsku

$$\mathbf{q} = \mathbf{k}_i - \mathbf{k}_f \quad (\text{rovnice 9.22})$$

Velikost vlnového vektoru $|\mathbf{k}_i|$ je závislá na indexu lomu n a vlnové délce dopadajícího světelného paprsku λ_i

$$|\mathbf{k}_i| = k_i = \frac{2\pi n}{\lambda_i}, \quad (\text{rovnice 9.23})$$

Spojením rovnice 9.21 a 9.22 získáme tvar rovnice 9.23 [221].

Označení autokorelační funkce $g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ funkcí druhého řádu vychází z toho, že autokorelovanou veličinou je intenzita (výkon) záření, která je úměrná druhé mocnině intenzity elektrického pole záření $\mathbf{E}(\mathbf{q}, t)$. Od veličiny $\mathbf{E}(\mathbf{q}, t)$ lze analogicky odvodit funkci 1. řádu

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = \frac{\langle \mathbf{E}(\mathbf{q}, t) \mathbf{E}^*(\mathbf{q}, t + \tau) \rangle}{\langle |\mathbf{E}(\mathbf{q}, t)|^2 \rangle}, \quad (\text{rovnice 9.24})$$

kde * označuje funkci komplexně sdruženou. Dá se ukázat, že obě funkce spolu souvisejí tzv. Siegertovým vztahem

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) = 1 + \beta |g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)|^2 \quad (\text{rovnice 9.25})$$

kde β je faktor související se zachováním koherence v detekčním objemu. Pro malé hodnoty τ je korelace vysoká, protože pohybující se částice nemají dostatek času k přesunu do jiné pozice, než ve které se nachází. Porovnáme-li dva signály pro malé hodnoty τ , zůstávají pak oba téměř stejné. Se zvětšujícími se hodnotami τ korelace exponenciálně klesá a pro $\tau \rightarrow \infty$ již neexistuje korelace intenzity rozptylu mezi jejím počátečním a konečným stavem.

Autokorelační funkce $g^{(1)}(q, \tau)$ je v systému neinteragujících částic bez vnitřní dynamiky, kdy jediné pozorovatelné fluktuační v systému jsou spojené s jejich translační difúzí, dána vztahem

$$g^{(1)}(q, \tau) = e^{-Dq^2\tau}, \quad (\text{rovnice 9.26})$$

kde D je difúzní koeficient částic [221]. Pro polydisperzní vzorky je autokorelační funkce složitější. V principu představuje součet exponenciál pro každý druh dané částice s konkrétním difúzním koeficientem a příslušnou odezvou v intenzitě. Podrobnější informace o získu informací o částicích v polydisperzním vzorku a o jejich rozdělení v roztoku lze nalézt v literatuře [221 – 224].

Při vyhodnocování dat se z autokorelační funkce $g^{(1)}(q, \tau)$ získá inverzní Laplaceovou transformací distribuční funkce difúzních koeficientů $A(D)$

$$g^{(1)}(q, \tau) = \int_0^\infty A(D)e^{-Dq^2\tau} dD \quad (\text{rovnice 9.27})$$

Inverzní Laplaceova transformace se nejčastěji provádí pomocí algoritmu CONTIN [225].

Závislost mezi difúzním a frikčním koeficientem částice popisuje Einsteinova rovnice

$$D = \frac{k_B T}{f}, \quad (\text{rovnice 9.28})$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota a f je koeficient tření, známý také jako frikční koeficient ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$). Pro frikční koeficient kulové částice o poloměru R obtékané tekutinou o viskozitním koeficientu η platí za předpokladu laminárního proudění Stokesův vztah

$$f = 6\pi\eta R, \quad (\text{rovnice 9.29})$$

Spojením obou rovnic získáváme Stokesovu-Einsteinovu rovnici, pomocí níž lze částici o daném difúzním koeficientu připsat tzv. hydrodynamický poloměr R_H , definovaný jako poloměr kulové částice, která má v daném prostředí za dané teploty stejný difúzní koeficient D jako sledovaná disperzní částice. Platí pro něj rovnice

$$R_H = \left(\frac{k_B T}{6\pi\eta}\right) q^2 \tau = \frac{8\pi n^2 k_B T}{3\lambda^2 \eta} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \tau \quad (\text{rovnice 9.30})$$

9.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Maloúhlový rozptyl rentgenového záření – SAXS (z angl. *Small-Angle X-ray Scattering*) - je metoda hojně využívaná k získání struktury makromolekul (od desítek kDa po stovky MDa) s nízkým rozlišením (minimálně jednotky nm). Díky možnosti ponechat

makromolekulu v roztoku s téměř libovolným složením, využívají SAXS často vědci pracující s biomakromolekulami, jakými jsou proteiny a DNA, které, ponechány v pufru o vhodném složení (iontová síla, pH, obsah detergentů a redukčních činidel apod.), zachovávají si téměř svou nativní strukturu.

Pomocí SAXSu lze získat množství informací popisujících strukturu i dynamiku makromolekuly v roztoku, případně směsí makromolekul vzájemně interagujících. Mezi takovéto informace patří např. tvar molekuly/ komplexu, její velikost, oligomerní stav, molekulová hmotnost M_w . SAXS se také využívá ke kvantitativní analýze flexibilních systémů [183].

Základní princip metody je zobrazen na *Obr. 9.2* na str. 229. Roztok makromolekuly o určité koncentraci je umístěn v křemenné kapiláře a je osvětčován fokusovaným rentgenovým (RTG) elektromagnetickým zářením (vlnová délka $\lambda = 0,001 - 10$ nm), které je následně rozptylováno na elektronových oblacích jednotlivých atomů. Záření je rozptylováno pod malými úhly ($0 - 15^\circ$). Molekuly jsou mnohem větší, než vlnová délka dopadajícího záření, a mají různou trojrozměrnou strukturu. Rozptýlené fotony se proto liší ve fázi. Intenzita rozptýleného záření $I(s)$ je úměrná množství molekul, na kterých dochází k rozptylu, tedy koncentraci roztoku, a rozdílu elektronové hustoty $\Delta\rho(\mathbf{r})$, který je roven rozdílu elektronové hustoty minoritní komponenty v roztoku (makromolekuly) $\rho(\mathbf{r})$ a rozpouštědla ρ_s . Pro vodné roztoky je tento rozdíl velmi malý.

$$\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho_s \quad (\text{rovnice 9.31})$$

Polohový vektor \mathbf{r} udává polohu částice od pomyslného zvoleného počátku. Rozptýlené záření je poté zachycováno dvou-dimensionálním (2D) detektorem. Intenzita rozptýleného záření je ve vodných roztocích izotropní díky náhodným orientacím částic v roztoku. Je tedy brána jako průměrná intenzita přes všechny orientace Ω v prostoru. Pro monodisperzní systém složený z jednoho druhu identických částic a po odečtení příslušného pozadí (rozptyl rozpouštědla, šum apod.), je intenzita rozptýleného záření $I(s)$ vynášena jako funkce rozptylového úhlu (2θ), přesněji jako funkce rozptylového vektoru s

$$s = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}, \quad (\text{rovnice 9.32})$$

a platí pro ni vztah

$$I(s) = \langle I(\mathbf{s}) \rangle_\Omega = \langle \mathbf{A}(\mathbf{s}) \cdot \mathbf{A}^*(\mathbf{s}) \rangle_\Omega \quad (\text{rovnice 9.33})$$

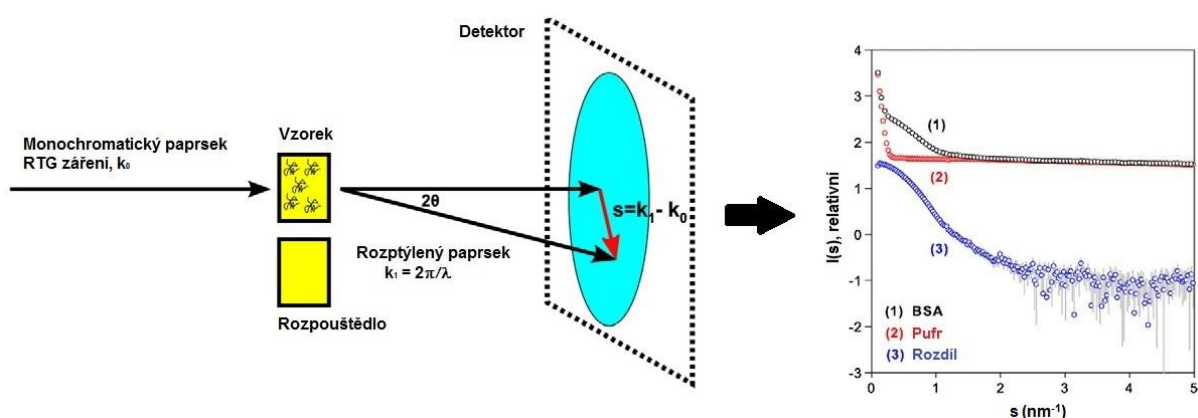
Rozptylová amplituda $\mathbf{A}(s)$ je Fourierovou transformací $\Delta\rho(\mathbf{r})$

$$\mathbf{A}(s) = \mathfrak{F}[\rho(\mathbf{r})] = \int \Delta\rho(\mathbf{r}) \cdot e^{i\mathbf{s}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{r} \quad (\text{rovnice 9.34})$$

V případě flexibilních molekul a polydisperzního vzorku není intenzita úměrná rozptylu jedné částice, ale v úvahu se musí brát lineární kombinace příspěvků K -typů částic ve směsi

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s) \quad (\text{rovnice 9.35})$$

kde v_k představuje objemový podíl k -té částice a $I_k(s)$ je rozptylová intenzita k -té komponenty. Ještě komplikovanější výpočty by bylo nutno zahrnout pro roztoky s nesespecificky agregovanými molekulami, kde $k \gg 1$. V takovýchto případech není jednoduchá dekompozice uskutečnitelná [183].



Obr. 9.2 Základní schéma SAXS experimentu (převzato a upraveno z [226]). V pravé části obrázku jsou vyobrazeny rozptylové křivky dvou roztoků, roztok BSA (černá), roztok pufru (červená) a jejich rozdíl (modrá).

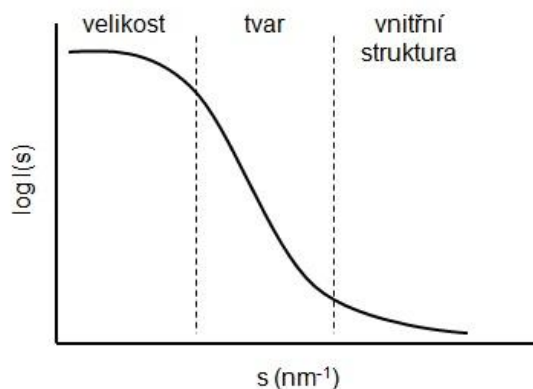
Jako zdroj RTG záření se nejčastěji používá rotující anoda ($\lambda = 0,1 - 0,2$ nm), nebo synchrotron, který využívá jako zdroje RTG záření urychlené nabitě částice – elektrony, které letí takovou rychlostí a po takové zakřivené trajektorii, že uvolňují elektromagnetické záření o vlnové délce odpovídající RTG záření ($\lambda = 0,05 - 0,5$ nm). Použití synchrotronu jako zdroje RTG záření má mnoho výhod ve srovnání s jinými zdroji RTG záření používanými u laboratorních přístrojů s možností měření SAXSu. Těmito výhodami jsou především rychlost, za jakou jsou naměřena potřebná data (na synchrotronu v řádech sekund, na laboratorních zdrojích až v hodinách), a rychlost zpracování dat. Synchrotronové záření vykazuje vysokou zářivost, která je definována podle vztahu [227]

$$\text{zářivost} = \frac{\text{počet fotonů}}{s \cdot \text{mrad}^2 \cdot \text{mm}^2 \cdot 0,1\% \text{ šířky pásma}} \quad (\text{rovnice 9.36})$$

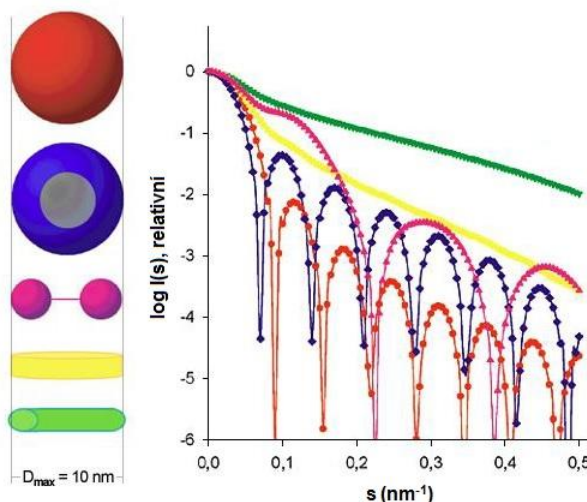
Po ozáření vzorku RTG zářením se vzorek většinou zničí, což je jedna z nevýhod použití SAXSu, podobně jako u ozařování proteinových krystalů v proteinové krystalografii. Aby nedocházelo k měření radiačně zničeného vzorku, vzorek je ozařován v jednom bodě tenké kapiláry, kterou vzorek při každém měření protéká.

Pro měření vzorku proteinu pomocí SAXSu je potřeba 1 - 2 mg proteinu, řádově desítky μl vzorku a koncentrace v jednotkách až desítkách $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. U vzorků s vyššími koncentracemi se pak dají zkoumat vzájemné interakce mezi částicemi. Vzorek musí být čistý a monodisperzní bez agregátů, proto je vhodné ještě před samotným SAXS měřením ověřit jeho monodisperzitu např. pomocí dynamického rozptylu světla (DLS), o kterém hovořím v kapitole 9.2. Pro získání kvalitních dat je nezbytné změřit několik vzorků s různou koncentrací proteinu, tedy koncentrační řadu, ale v identickém pufru, a to především kvůli extrapolaci k nekonečnému zředění a získu přesné hodnoty gyračního poloměru R_g (viz dále).

Již z prvního pohledu na získané rozptylové křivky lze získat několik důležitých informací týkajících se velikosti, oligomerního stavu a celkového tvaru molekuly nebo systému (Obr. 9.3, 9.4). Z křivky proložení rozptylových dat lze např. poznat, zda mezi částicemi ve vzorku dochází k přitažlivým, nebo odpudivým interakcím, a to sklonem křivky u malých hodnot s ($s < 1 \text{ nm}^{-1}$), který může být sestupný, respektive vzestupný, případně i vodorovný s osou s , kdy nedochází k žádným výrazným mezimolekulárním



Obr. 9.3 Schematické znázornění prvotní orientace v rozptylové křivce SAXSu. Z každé části křivky, oddělené svislým čerchováním, lze zjistit prvotní informace o velikosti, tvaru a vnitřní struktuře měřené molekuly.



Obr. 9.4 Z tvaru rozptylových křivek lze usuzovat na tvar molekuly (převzato a upraveno z [228]). V levé části obrázku jsou vyobrazeny možné tvary molekul a v pravé části pak jejich příslušné rozptylové křivky. Každá barva molekuly odpovídá stejné barvě křivky v grafu.

interakcím ovlivňujícím měření. Této skutečnosti se dá např. využít k návrhu koncentrace vzorku pro krystalografické studie, které typicky vyžadují slabé přitažlivé interakce [226].

Rychlou analýzou naměřených dat lze získat několik parametrů popisujících vlastnosti makromolekuly nezávisle na modelu struktury. Jsou jimi molekulová hmotnost M_w , gyrační poloměr R_g , hydratovaný objem částice V_p a maximální vzdálenost v rámci rozptylující molekuly D_{max} . Rychlou analýzou se zde myslí tzv. Guinierova aproximace [196], která platí pouze pro malé hodnoty s . Pro monodisperzní roztok globulárních makromolekul je Guinierova rovnice definována ve tvaru

$$I(s) = I(0) \cdot e^{-\frac{1}{3}R_g^2 s^2} \quad (\text{rovnice 9.37})$$

$I(0)$ je intenzita záření v přímém směru (při nulovém úhlu).

Guinierův výnos pak představuje lineární závislost $\ln[I(s)]$ na s^2 pro malé hodnoty s (u biologických vzorků platí rozsah $s_{max} < 1,3/R_g$, obecně platí, že velmi velké molekuly mají Guinierův region velmi úzký). Nelineární chování v Guinierově výnosu pak vypovídá o špatné kvalitě vzorku ve smyslu obsahu nesespecifických agregátů, dále o mezičásticových repulzích apod. Hodnotu $I(0)$ lze získat odečtením bodu průsečíku přímky z úseku osy $\ln[I(s)]$ a R_g lze získat výpočtem ze směrnice přímky přímo z Guinierova výnosu. Hodnotu $I(0)$ nelze získat přímo experimentálně, jelikož tato pozice na detektoru je zakryta clonou chránící záznamovou techniku před poškozením RTG zářením.

Gyrační poloměr R_g částice je parametr charakterizující velikost částice jakéhokoli tvaru. Lze si jej představit tak, že částici rozdělíme na velký počet hmotných bodů o hmotnostech m_i vzdálených na vzdálenost r_i od těžiště částice. Pro R_g pak bude platit

$$R_g^2 = \frac{\sum_i m_i \cdot r_i^2}{\sum_i m_i} \quad (\text{rovnice 9.38})$$

Pokud je m_i všech hmotných bodů stejné, pak získáme kvadratický průměr vzdáleností všech hmotných bodů od těžiště

$$R_g^2 = \frac{\sum_i r_i^2}{n} \quad (\text{rovnice 9.39})$$

kde n je počet hmotných bodů. Pro neuspořádané stavy proteinů představuje R_g z-průměrovanou hodnotu přes všechny možné konformace v roztoku. Pro nesbalené proteiny se k získání hodnoty R_g využívá Floryho rovnice [229]

$$R_g = R_0 \cdot N^\nu \quad (\text{rovnice 9.40})$$

závisející na počtu residuí v polymerním řetězci N (tedy délce řetězce). Exponenciální škálovací faktor ν byl experimentálně určen pro 26 chemicky denaturovaných proteinů jako $0,598 \pm 0,028$ (pro $R_0 = 1,927 \pm 0,27$) [230]. Škálovací konstanta R_0 je funkcí tuhosti polymerního řetězce. NMR studie indikují, že chemicky denaturované proteiny mají více rozvolněné konformace, než vnitřně neuspořádané proteiny (IDPs – z angl. *Intrinsically Disordered Proteins*). Jejich R_g vykazovalo o 15 % větší hodnotu, než u IDPs [28].

Nezávisle na Guinierově aproximaci lze získat hydratovaný objem částice V_p (Porodův objem) pomocí Porodovy rovnice

$$V_p = \frac{2\pi^2 I(0)}{Q} \quad (\text{rovnice 9.41})$$

kde Q je Porodův invariant a platí pro něj vztah

$$Q = \int_0^\infty s^2 I(s) ds \quad (\text{rovnice 9.42})$$

Pro globulární proteiny je hodnota V_p (nm^3) přibližně rovna $1,5-2 \times M_w$ (kDa). Z Porodovy rovnice lze tedy odhadnout i M_w globulární částice [184].

Dalším parametrem, který lze získat pro lineární oblast (malé hodnoty s) Guinierova výnosu, je párová distribuční funkce vzdáleností r dvou pozic v rámci molekuly $p(r)$. Ta je vypočítána Fourierovou transformací rozptylové křivky podle rovnice

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds \quad (\text{rovnice 9.43})$$

Z párové distribuční funkce vzdáleností $p(r)$ je možné získat hodnotu maximální vzdálenosti v rámci rozptylující molekuly D_{max} a také hodnotu R_g

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{max}} r^2 p(r) dr}{\int_0^{D_{max}} p(r) dr} \quad (\text{rovnice 9.44})$$

Pro získání přesnějších hodnot výše zmíněných parametrů se do výpočtů zahrnují data z celých rozptylových křivek, ne pouze z počáteční lineární části. Pro větší hodnoty s se pak využívá přesnější Debeyovy aproximace

$$\frac{I(s)}{I(0)} = \frac{2}{x^2} (x - 1 + e^{-x}), \quad (\text{rovnice 9.45})$$

kde $x = s^2 R_g^2$ a Fourierova transformace pro získání $p(r)$ funkce je nahrazena nepřímou Fourierovou transformací [231], kde je $p(r)$ funkce reprezentována jako lineární kombinace K -kolmých funkcí φ_k v rozmezí $[0, D_{\max}]$, kde D_{\max} je uživatelsky volitelný parametr.

$$p(r) = \sum_{k=1}^K c_k \varphi_k(s_i) \quad (\text{rovnice 9.46})$$

Optimální koeficienty c_k jsou hledány minimalizací funkce

$$\Phi = \chi^2 + \alpha P(p), \quad (\text{rovnice 9.47})$$

kde χ^2 je parametr vyjadřující kvalitu proložení (fitu) experimentálních dat ve srovnání s vypočtenými daty přímou přeměnou $p(r)$ funkce. Čím je hodnota χ^2 nižší, tím kvalitnější je daný fit. Typicky je snahou dosahovat hodnot χ^2 do 1.

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{poc.}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2 \quad (\text{rovnice 9.48})$$

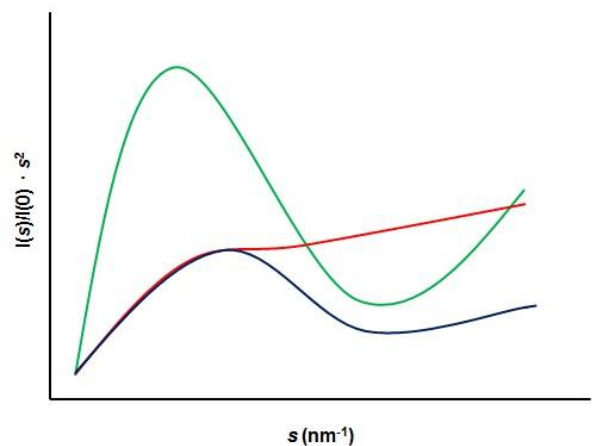
$P(p)$ je funkce zajišťující hladkost $p(r)$ funkce

$$P(p) = \int_0^{D_{\max}} [p']^2 dr \quad (\text{rovnice 9.49})$$

N vyjadřuje počet bodů v datech, σ odpovídá standardním odchylkám, c je škálovací faktor a násobitel α bilancuje mezi fitem dat a hladkostí $p(r)$ funkce.

K získání $p(r)$ funkce z celé rozptylové křivky se dá využít např. program GNOM [180] nebo AUTOGNOM [232], oba využívají nepřímou Fourierovu transformaci rozptylové intenzity k získání $p(r)$. Těmito programy lze získat i hodnotu D_{\max} , $I(0)$ a R_g .

Pro studium proteinového sbalování, ale také obecně pro studium nesbalených proteinů se využívá Kratkyho výnosu, kde $s^2 I(s)$ je funkcí s [233] (viz Obr. 9.5). Pro sbalené globulární proteiny má rozptylová křivka v Kratkyho výnosu zvonovitý tvar s nápadným vrcholem u malých hodnot s . Zvonovitý tvar křivky určuje rozptylová



Obr. 9.5 Schematické znázornění Kratkyho výnosu pro tři konstrukty Src-kinasy (převzato a upraveno z [183]). Globulární SH3 doména (zelená), plně neuspořádaná Unique doména (červená) a duální charakter konstruktu obou domén (modrá).

intenzita $I(s)$ globulárních proteinů, která je přibližně rovna $\frac{1}{s^4}$. Nesbalené proteiny vykazují v Kratkyho výnosu pomalý nárůst $s^2 I(s)$ ve vysokých hodnotách s . Proteiny s více doménami pak vykazují duální charakter rozptylové křivky, tedy typicky malé lokální maximum v malých hodnotách s s postupným mírným nárůstem ve vyšších hodnotách s .

Pro rekonstrukci tvaru částice se využívá různých programů využívajících specializovaných algoritmů umožňujících různou volitelnost vstupních parametrů. Jedná se o *ab initio* metody využívající sférické harmonické reprezentace dílčích rozptylových amplitud [234]

$$I(s) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l |A_{lm}(s)|^2 \quad (\text{rovnice 9.50})$$

Další vývoj *ab initio* technik umožnil využívat tzv. automatického kapkového modelování (angl. *automated bead-modeling*) [181, 235, 236]. Pro tento účel byl naprogramován např. program DAMMIN (z angl. *Dummy Atom Model Minimisation*) [181]. Jeho algoritmus představuje částici jako kolekci M ($\gg 1$) těsně uspořádaných koulí uvnitř omezeného (obvykle sférického) hledaného objemu, který je omezen experimentálně určeným D_{max} . Každá koule je matematicky náhodně přiřazena rozpouštědлу (index = 0) nebo částici (index = 1) a struktura částice je popsána dvojkovou soustavou X o délce M . Rekonstrukce tvaru částice začíná náhodnou počáteční aproximací pomocí tzv. simulovaného žihání [237], které zajistí globální minimalizaci funkce (rovnice 9.47) tak, aby nedocházelo k falešnému spádu funkce (rovnice 9.47) v lokálních minimech. V každém kroku simulovaného žihání je jedné kouli náhodně přiděleno nové přiřazení (1 nebo 0). Každý krok tak vede k novému modelu X' s novou vypočítanou rozptylovou křivkou. Takto se postupuje tak dlouho, dokud rozdíl mezi spočtenou a experimentální rozptylovou křivkou je globálně minimální, čili dokud se nedosáhne významné statistické shody mezi oběma křivkami. Výsledek každého vypočteného modelu je vždy omezen spojitostí koulí a jeho kompaktností [181] a samozřejmě shodou jeho vypočtených rozptylových křivek s křivkami experimentálními.

Vylepšení programu DAMMIN vedlo k jeho až $40 \times$ rychlejší verzi DAMMIF (F se odkazuje na angl. *fast*) [185], která navíc využívá neomezeného objemu pro lepší simulované žihání a zároveň se tak vyhýbá artefaktům způsobeným špatně určeným hodnotám D_{max} a vykazuje i další vylepšení. Nevýhodou programů DAMMIN a DAMMIF je jejich předpoklad, že elektronová hustota v částici je uniformní, což není běžné. To znamená, že rozptylové křivky mohou být proloženy pouze na omezené škále s rozlišením

do $s = 2,5 \text{ nm}^{-1}$. Pokud se experimentálně získaná data spočítají několikrát stejnými programy (DAMMIN, DAMMIF apod.), často jsou získány různé výsledky, které ovšem mají stejné základní rysy. Proto se tyto výsledky průměrují, např. pomocí programu DAMAVER (AVER se dokazuje na angl. *average*) [182], který u nového zprůměrovaného modelu zachovává nejčtetnější základní rysy všech průměrovaných modelů.

Z výše uvedených faktů je jasné, že rozptylové křivky makromolekul lze také získat nejen experimentálním měřením, ale i *in silico* výpočty. K takovýmto výpočtům slouží např. program CRY SOL [188], který ze známých struktur atomických modelů vypočte příslušné rozptylové křivky, které pak lze porovnávat s křivkami experimentálními.

SAXS je vhodný nástroj pro určování strukturní obálky dříve zmiňovaných vnitřně neuspořádaných proteinů IDPs. Rozptylový profil IDP je průměrem všech konformerů, které daný nestrukturovaný protein v roztoku vykazuje. Klíčovými rysy IDPs jsou monotónní růst rozptylové křivky v Kratkyho výnosu (viz *Obr. 9.5*, str. 233), velké hodnoty R_g , široká $p(r)$ funkce s velkou hodnotou D_{max} . *Ab initio* rekonstrukce IDPs vykazuje pokles v rozlišení příslušných obálek modelů. S příchodem tzv. ensemble modelování (modelování souboru) byly vyvinuty algoritmy vhodné pro získání obálky s nízkým rozlišením příslušných IDPs. Jedním takovýmto algoritmem může být např. EOM (z angl. *Ensemble Optimization Method*) [183, 238]. Tento algoritmus, podobně jako jemu podobné (BILBO-MD/MES, EROS, Flexible Meccano a další), používá k získání obálky částice dvou základních kroků:

- 1) Výpočetně vyprodukuje tisíce náhodných konformací, jejichž struktury jsou omezeny vlastnostmi danými např. primární strukturou proteinu, tedy možnými prostorovými uspořádáními, geometrií v prostoru danou jednotlivými aminokyselinovými rezidui.
- 2) Vybere soubor konformací, které nejlépe odpovídají experimentálním SAXS datům.

Strategie EOM metody pro získání R_g je následující. Nejdříve je vyprodukováno M náhodných konformací (až tisíce) daného proteinu. Tyto zahrnují konformace s omezeními zmiňovanými výše. Využitím genetického algoritmu se vyprodukuje N vybraných konformerů (20 až 50 konformerů), jejichž rozptylové křivky dobře odpovídají naměřeným rozptylovým křivkám. Výpočet s použitím genetického algoritmu se R -krát nezávisle opakuje a na konci je pak získána $N \times R$ distribuce R_g pro danou molekulu. $N \times R$ distribuce

se poté porovnává s počátečním M množstvím konformerů a tímto porovnáním lze získat kvantitativní strukturní odhad proteinových konformací koexistujících v roztoku [183].

Rozptylové křivky N konformerů jsou počítány sečtením jednotlivých rozptylových rysů (rovnice 9.34, str. 228), za předpokladu, že všechny konformery rovnoměrně zastupují podskupinu tak, že intenzita podskupiny $I(s)$ obsahující N konformerů je

$$I(s) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N I_n(s), \quad (\text{rovnice 9.51})$$

kde $I_n(s)$ je rozptyl n -tého konformeru. Pro zrychlení optimalizace se rozptylové křivky předpočítávají pomocí programu CRY SOL [188].

Další programy dostupné na internetu využívají faktu, že SAXS data lze kombinovat s výsledky získanými z jiných biofyzikálních technik, jako je např. NMR, kde se dá využít např. program ENSEMBLE [239, 240]. Na internetové stránce <http://modbase.compbio.ucsf.edu/allosmod-foxs/> (květen 2016) lze najít odkaz na server AllosMod-FoXS [202, 241], díky kterému lze produkovat množství konformerů pro daný vzorek. Tento server např. využívá AllosMod simulace v teplotách 300 až 500 K a zvyšuje pak stabilitu sekundární struktury modelovaného proteinu.

9.4 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Jev nukleární magnetické rezonance (NMR) je hojně využíván ke zkoumání chemické struktury látek, ke studiu dynamických procesů (reakční kinetiky, chemické výměny apod.), ke konformačním studiím (studium proteinů, DNA, jejich komplexů, polysacharidů), v medicíně ke snímání např. orgánů v těle (MRI – z angl. *Magnetic Resonance Imaging*), ve farmacii pro návrh léčiv, kde je zjišťován vztah mezi strukturou léčiva a jeho aktivitou (SAR – z angl. *Structure Activity Relationships*).

Atomové jádro je podle obecně uznávaných tvrzení složeno především z protonů a neutronů. Každé jádro tak může mít hmotnost m , náboj Q a jaderný spin I , což je spinové kvantové číslo, tedy spinový moment hybnosti. Ne všechny jádra ovšem spin mají. Spin jádra lze zjistit počtem jeho protonů a neutronů. Pro základní stav atomového jádra (tj. stabilní stav) obecně platí, že pokud je jádro se sudým nukleonovým číslem N a sudým protonovým číslem Z , pak spin je nulový. Pro sudé N a liché Z je spin celočíselný a pro liché N je spin poločíselný. Jádra s nenulovým jaderným spinem jsou NMR aktivní. V NMR jsou ovšem nejčastěji využívána jádra se spinem $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F apod.).

Jader s nulovým spinem se vyskytuje jen velmi málo a patří mezi ně např. izotopy ^{12}C , ^{16}O apod. Spinové kvantové číslo je vyjádřeno podle vztahu

$$|I| = \hbar \cdot \sqrt{I(I+1)}, \quad (\text{rovnice 9.52})$$

kde \hbar představuje tzv. redukovanou hodnotu Planckovy konstanty h , někdy známou jako Diracova konstanta

$$\hbar = \frac{h}{2\pi} \quad (\text{rovnice 9.53})$$

Spinové kvantové číslo může nabývat $2I + 1$ hodnot (orientací) v rozsahu $[-I, -I+1, \dots, I-1, -1]$.

Pokud má jádro nenulový spin, může mít i nenulový spinový magnetický moment μ , který lze vyjádřit vztahem

$$\mu = \gamma \cdot I \quad (\text{rovnice 9.54})$$

Gyromagnetický poměr γ ($\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) je pro každé jádro specifický a může nabývat kladných i záporných hodnot.

Existuje-li soubor izolovaných jader, tj. vzájemně se neovlivňujících, bez vnějšího magnetického pole, pak celková magnetizace M_0 je součtem všech příspěvků magnetických momentů jader a je nulová díky náhodné orientaci μ_i jednotlivých jader v prostoru

$$M_0 = \sum_i \mu_i = 0 \quad (\text{rovnice 9.55})$$

Jelikož má většina jader nenulový magnetický moment μ , chovají se jádra ve vnějším magnetickém poli o magnetické indukci B_0 symbolicky jako stříelky kompasu a natáčejí své magnetické momenty μ v rovnoběžném směru se směrem vektoru vnějšího magnetického pole B_0 . Energii E popisující vzájemnou interakci mezi magnetickým momentem jádra μ a vnějším magnetickým polem B_0 , lze vyjádřit skalárním součinem

$$E = -\mu \cdot B_0 \quad (\text{rovnice 9.56})$$

Nejnižší hodnotu energie tedy můžeme pozorovat v případě, že vektory obou veličin budou směřovat stejným směrem.

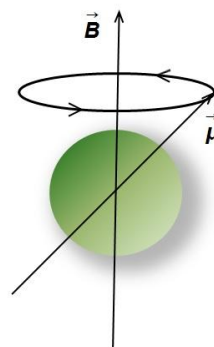
Vlivem působení vnějšího magnetického pole B_0 má tedy jádro tendenci se natočit rovnoběžně se směrem působení B_0 díky vlastnímu magnetickému spinového momentu μ , ale k tomuto nedojde. Z pohledu klasické fyziky je možné pohyb magnetického momentu μ v magnetickém poli B_0 popsat jako precesi, kterou si lze představit vytočením jádra

v kolmém směru od \mathbf{B}_0 a která vzniká díky vzniku krouživého momentu $\mathbf{\Gamma}$, který je dán vektorovým součinem

$$\mathbf{\Gamma} = \gamma \cdot \mathbf{I} \times \mathbf{B}_0 \quad (\text{rovnice 9.57})$$

U precesního pohybu – Larmorova precese – se energie nemění a vzájemná orientace vektorů \mathbf{B}_0 a $\boldsymbol{\mu}$ zůstává stejná. Vektor magnetického momentu $\boldsymbol{\mu}$ opisuje tvar kužele (viz Obr. 9.6).

Obr. 9.6 Symbolické znázornění precesního pohybu vektoru magnetického momentu $\boldsymbol{\mu}$ jednoho jádra (zelená koule) okolo vektoru vnějšího magnetického pole \mathbf{B} . Vektor $\boldsymbol{\mu}$ opisuje precesním pohybem pomyslný tvar kužele s vrcholem v pomyslném středu jádra.



U Larmorovy precese se dá měřit rychlost otáčení ω ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$), kterou lze vyjádřit jako skalární součin

$$\omega = -\gamma \cdot B_z \quad (\text{rovnice 9.58})$$

kde B_z je orientace magnetického pole \mathbf{B}_0 do osy z . Lze získat i frekvenci Larmorovy precese ν_{Larm} . (Hz)

$$\nu_{Larm} = \frac{\omega}{2\pi} \quad (\text{rovnice 9.59})$$

Bavíme-li se o $2I + 1$ orientacích spinu \mathbf{I} (rovnice 9.52), máme tedy na mysli orientace lišící se úhlem θ svírajícím vektory $\boldsymbol{\mu}$ a \mathbf{B}_0 . Jednotlivým orientacím pak odpovídají z -složky magnetického momentu μ_z směřující ve směru vnějšího magnetického pole

$$\mu_z = \boldsymbol{\mu} \cdot \cos \theta = -\gamma m \hbar, \quad (\text{rovnice 9.60})$$

kde m je magnetické kvantové číslo jádra nabývající hodnot $I, I-1, \dots, -I$ (celkem $2I+1$ hodnot). Každé orientaci pak přísluší hodnota energie

$$E = -\mu_z B_0 = -\gamma m \hbar B_0 \quad (\text{rovnice 9.61})$$

Nejčastěji NMR měřená jádra mají spin $I = 1/2$, proto magnetické kvantové číslo m může nabývat dvou hodnot, $m = -1/2$ a $m = 1/2$. Jak dále vyplývá z rovnice 9.60, jaderný magnetický moment v z -orientaci pak může nabývat hodnot $\mu_z = \pm 1/2 \gamma \hbar$. Dvě hodnoty

magnetického momentu pak dají za vznik dvěma energetickým hladinám označovaným α a β ve vnějším magnetickém poli s magnetickou indukcí \mathbf{B}_0

$$E_\alpha = -\frac{1}{2}\gamma\hbar\mathbf{B}_0, \quad E_\beta = \frac{1}{2}\gamma\hbar\mathbf{B}_0 \quad (\text{rovnice 9.62, 9.63})$$

Mezi oběma hladinami je pak energetický rozdíl ΔE dán rovnicí

$$\Delta E = \gamma\hbar\mathbf{B}_0 \quad (\text{rovnice 9.64})$$

Tomuto energetickému rozdílu odpovídá frekvence přechodu podle rovnice 9.59. Tato frekvence dosahuje u dnes vyvinutých magnetických polí magnetů používaných při NMR měření desítek až stovek MHz. Čím větší je magnetická indukce B_0 vnějšího magnetického pole, tím větší je rozdíl mezi stavy α a β , a tím větší je i rozdíl v populacích jednotlivých spinových stavů, který umožňuje vyšší citlivost NMR. Populace spinů obou stavů je dána Boltzmannovým rozdělením

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} \sim e^{\frac{\Delta E}{k_B T}}, \quad (\text{rovnice 9.65})$$

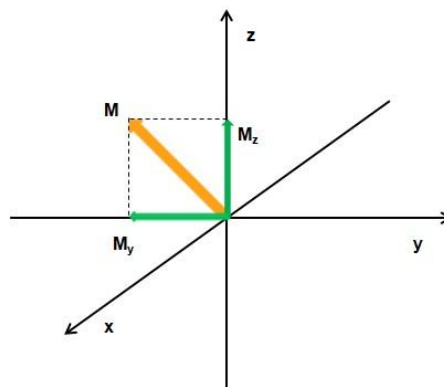
kde k_B je Boltzmannova konstanta a T je termodynamická teplota (*Kelvin*). ΔE pak představuje rozdíl energií populací spinů ve stavu β a α ($\Delta E = E_\beta - E_\alpha$; $E_\alpha < E_\beta$). N_α a N_β představují počet spinů ve stavu α , respektive β ($N_\alpha > N_\beta$). Pro každé jádro si lze představit *obrázek 9.6* na str. 238. Spiny jader \mathbf{I} , přesněji vektory magnetické indukce $\boldsymbol{\mu}$, vykonávají v magnetickém poli \mathbf{B}_0 precesní pohyb a jednotlivé spiny spolu nejsou ve fázi. Proto je soubor všech jader zobrazován jako skupina všech spinů opisujících tvar kužele ve směru magnetické indukce \mathbf{B}_0 pro stavy α (podle konvence nad rovinou xy), respektive proti směru magnetické indukce, pro stavy β (podle konvence pod rovinou xy). Celková magnetizace \mathbf{M}_0 vzorku, daná vektorovým součtem magnetických momentů jednotlivých jader, směřuje ve směru osy z , tedy ve směru \mathbf{B}_0 [242, 243].

Podle frekvence, při které rezonují jádra ^1H je v NMR spektroskopii zvykem udávat indukci \mathbf{B}_0 magnetu. Mluvíme pak např. o 950 MHz magnetu apod., což tedy znamená, že frekvence ν daná rovnicí 9.59 o určité hodnotě B_0 magnetu odpovídá Larmorově frekvenci jader ^1H o hodnotě 950 MHz. Čím vyšší je tedy \mathbf{B}_0 , tím vyšší je i Larmorova frekvence jader ^1H .

Doposud zde bylo hovořeno o systému souřadnic, který se nazývá laboratorní systém souřadnic. Jelikož v tomto systému rotující spiny o rychlosti ω znesnadňují další analýzu, používá se v NMR rotující soustava souřadná, která sama rotuje rychlostí ω , tedy

s Larmorovou frekvencí. Z fyzikálního pohledu se tedy odstraní vliv \mathbf{B}_0 a za rezonanční podmínky se vektor celkové magnetizace \mathbf{M} nepohybuje (viz Obr. 9.7).

Obr. 9.7 Zobrazení rotující soustavy souřadné. Vektor \mathbf{M} v této soustavě nevykonává precesní pohyb, vliv vnějšího magnetického pole \mathbf{B}_0 je z fyzikálního pohledu odstraněn.



Aby mohlo v rotující soustavě souřadné dojít k vychýlení vektoru magnetizace \mathbf{M} do pozice jiné, než je pozice rovnoběžná s \mathbf{B}_0 (tj. vychýlení z rovnovážné pozice), je potřeba systému dodat vnější impulz. Tím impulzem je radiofrekvenční oscilující magnetické záření \mathbf{B}_1 s frekvencí ω_1 generované střídavým napětím na cívce. Pokud je rychlost otáčení (přesněji uhlová frekvence) ω_1 stejná, jako je Larmorova frekvence ω , dojde k absorpci energie. V laboratorní soustavě souřadné pak vektor magnetizace \mathbf{M} začne precesovat kolem směru \mathbf{B}_1 , které může být orientováno např. ve směru osy x , nebo y . Pozici vektoru \mathbf{M} v čase t po impulzu lze pak rozepsat jeho jednotlivými složkami, např.

$$M_y = -M_0 \cdot \sin(\gamma B_1 t) \quad M_z = M_0 \cdot \cos(\gamma B_1 t) \quad (\text{rovnice 9.66, 9.67})$$

V nepřítomnosti magnetického pole \mathbf{B}_1 vektor \mathbf{M} nebude vykonávat precesní pohyb ve stejné pozici donekonečna, ale bude se vracet do pozice rovnoběžné s osou z , tedy bude tzv. relaxovat do rovnovážné pozice. Tento návrat do rovnováhy je detekován stejnou radiofrekvenční cívkou, která původně generovala přídatné magnetické pole nutné pro vychýlení \mathbf{M} z rovnováhy, a my jej pozorujeme jako soustavný pokles amplitud sum harmonických funkcí v čase známý jako FID (z angl. *Free Induction Decay*) [242, 243]. V NMR se rozlišují dva typy relaxačních dějů. Prvním z nich je relaxace podélná (spin-mřížková, longitudální). Ta zobrazuje nárůst M_0 v ose z M_z za čas t a dá se popsat rovnicí

$$M_z = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (\text{rovnice 9.68})$$

T_1 je spin-mřížkový relaxační čas a čím je kratší, tím rychleji je dosaženo rovnovážného stavu. U tohoto typu relaxace dochází ke změně energie systému. Dalším typem relaxace je relaxace příčná (spin-spinová, transversální), u které je naopak pozorován úbytek magnetizace v rovině xy , a lze ji zapsat rovnicí

$$M_{xy} = M_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (\text{rovnice 9.69})$$

T_2 je spin-spinový relaxační čas a čím je kratší, tím rychleji ubývá magnetizace v rovině xy a tím kratší je odpovídající FID. U tohoto typu relaxace nedochází ke změně energie systému. Následkem malých hodnot T_2 bývá rozšíření a snížení signálu ve spektru NMR, což můžeme pozorovat u molekul s velkou molekulovou hmotností M_w , jako jsou např. proteiny. Tyto velké molekuly mají malou rotační rychlost, tedy velký rotační korelační čas, což v důsledku vede ke kratšímu T_2 [242, 243]. Proto je měření NMR proteinů v kapalinách omezeno do přibližně 70 kDa jejich hmotnosti [244].

Pro popis relaxací pomocí vektorového modelu slouží Blochovy rovnice. Z nich také vyplývá, že příslušným relaxačním časům přísluší relaxační rychlosti R_1 a R_2 [242, 243]

$$R_1 = \frac{1}{T_1} \quad R_2 = \frac{1}{T_2} \quad (\text{rovnice 9.70, 9.71})$$

NMR signál (FID), tedy nejčastěji udávaná závislost velikosti M_x nebo M_y na čase t , je Fourierovou transformací (rovnice 9.72) převeden na frekvenční spektrum závislosti $I=f(\nu)$, kde I je intenzita signálu.

$$f(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i2\pi\nu t} dt. \quad (\text{rovnice 9.72})$$

Mluvíme-li o základních parametrech v NMR, které nás zajímají, máme na mysli počet signálů v NMR spektru, jejich pozice ve spektru, intenzitu signálu (přesněji integrovanou plochu pod konkrétním signálem), štěpení signálů vlivem J -interakční konstanty (viz dále) a relaxační vlastnosti (T_1 , T_2 a další).

Z pohledu chemické struktury můžeme v místě jádra hovořit o jeho lokálním magnetickém poli B_{lok} , jelikož se samo symbolicky chová jako malý magnet, jak již bylo řečeno dříve. Toto lokální magnetické pole je ovlivněno okolním elektronovým oblakem, který lokální magnetické pole jádra různými způsoby deformuje. Pohybující se elektrony mají tendenci kompenzovat vnější magnetické pole B_0 a vytváří tak tzv. stínící efekt, tj. dodatečné magnetické pole. Toto tzv. chemické stínění má za následek změnu pozice signálu v NMR spektru. Lokální magnetické pole B_{lok} v ose z lze pak vyjádřit rovnicí

$$B_{lok} = B_0 - B_0\sigma = B_0(1 - \sigma), \quad (\text{rovnice 9.73})$$

kde σ je konstanta chemického stínění. Lokální magnetické pole pak určuje magnetickou frekvenci, tedy pozici signálu ve spektru

$$\omega = \gamma \cdot B_{lok} = \gamma \cdot B_0(1 - \sigma), \quad (\text{rovnice 9.74})$$

Z rovnice 9.74 také vyplývá, že chemický posuv, tedy pozice signálu ve spektru, závisí na velikosti magnetického pole. Aby se předešlo nedorozuměním při porovnávání spekter jedné látky na magnetech s různou frekvencí, byla dohodou zvolena referenční látka tetrametylsilan (TMS), který je dobře rozpustný, inertní, generuje jediný vodíkový signál ve spektru a vodík z něj je silně stíněn elektrony, tudíž je jeho signál velmi posunut, často daleko od signálu vzorku. Frekvence měřených látek ω jsou pak na různých přístrojích vztahovány k frekvenci TMS ω_{ref} a tak získáme relativní hodnotu chemického posuvu δ (v jednotkách ppm, z angl. *parts per million*), pro kterou platí

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \cdot 10^6 \quad (\text{rovnice 9.75})$$

Tato hodnota už není závislá na velikosti magnetického pole. Jako další referenční látky (standards) lze použít např. i dioxan aj.

Další ovlivnění lokálního magnetického pole jádra je způsobeno přímou dipól-dipólovou interakcí s ostatními magneticky aktivními jádry. Ve spektrech kapalin se ovšem díky rychlé reorientaci molekul přímo neprojevuje, její vliv na relaxační časy je ovšem zachován. Třetím faktorem ovlivňujícím lokální magnetické pole je nepřímá spin-spinová interakce, tzv. *J*-interakce (*J*-vazba). Při této interakci dochází k tomu, že magnetický moment jádra polarizuje magnetické momenty elektronů a tato polarizace je dále přenášena na další jádra. Díky *J*-interakci dochází ke štěpení signálů jednotlivých jader [242, 243].

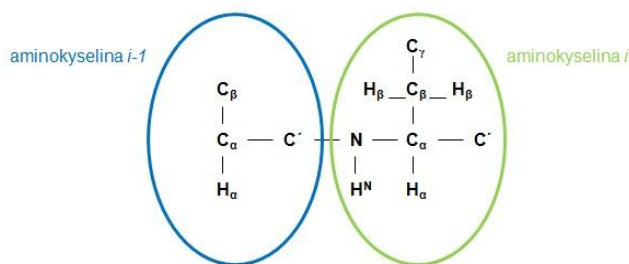
Bavíme-li se především o NMR proteinů, pak spektra těchto vzorků nemusí být pouze jednodimenzionální (1D), ale mluvíme také o dvou až vícedimenzionálních spektrech (2D – nD). U 2D spekter je přidána dimenze navíc dimenzí časovou. U 2D NMR měření se měří série 1D spekter s různě dlouhou časovou odmlkou pro vývoj nepřímé dimenze. Získáme tak sérii 1D spekter. Druhou dimenzi představuje tato série spekter. Následně se provádí dvojnásobná Fourierova transformace [242].

2D spektra se pak dále dělí na rozlišená (rozlišená podle interakčních konstant – *J*(H,H), *J*(C,H) apod.), kde na jedné ose jsou chemické posuny δ a na druhé příslušné interakční konstanty *J*, a korelovaná, kde na obou osách jsou chemické posuny δ . Obě tato spektra se pak ještě dále dělí na spektra homonukleární a heteronukleární, v závislosti na tom, jestli se polarizace přenáší mezi stejnými nebo různými typy jader. V této souvislosti je na místě zmínit pojem korelační spektroskopie, pro niž je v NMR základem korelace NMR parametrů (chemický posuv, interakční konstanta atd.) určitých jader. Korelaci lze

realizovat přenosem polarizace (magnetizace) z jednoho jádra na druhé a to již zmíněnou přímou dipól-dipólovou interakcí, nebo nepřímou spin-spinovou J -interakcí.

Vícedimenzionální NMR využívá různých sekvencí pulzů, kterými ovlivňuje spoustu parametrů měření (např. dobu, za kterou se vektor magnetizace M vrátí do rovnovážné polohy, četnost vychýlení M z jeho rovnovážné polohy, přenos polarizace z různých typů jader na stejné, nebo jiné typy jader apod.). K získání informace o konečném stavu systému po sérii radiofrekvenčních pulzů aplikovaných na vzorek slouží produktové operátory. V NMR měřeních se také využívá různých jevů, např. jevu nukleárního Overhauserova efektu (NOE), který je důsledkem dipolární interakce mezi dvěma jádry, a slouží k určování prostorové blízkosti atomů v molekulách a tedy určování prostorové struktury proteinů.

Mezi 2D NMR měření patří např. HSQC (z angl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*), což je heteronukleární NMR měření, kde dochází ke korelaci mezi dvěma typy jader (např. ^1H a ^{13}C). Touto sekvencí získáme 2D korelované heteronukleární spektrum, kde konkrétnímu uhlíku je přiřazen konkrétní vodík apod. Další sekvence využívají J -interakci k přenosu magnetizace mezi různými jádry. Mluvíme pak o HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, CBCANH, HNCACB, CBCA(CO)NH a HN(CO)CACB experimentech [242], kde H značí vodík, O kyslík, C uhlík a A a B značí, zda se jedná o uhlík v pozici α , respektive β na peptidovém řetězci (viz Obr. 9.8).



Obr. 9.8 Označení uhlíků v dipeptidu u NMR experimentů

Těmito sekvencemi lze získat 3 až 5D spektra a lze jimi určit pozice signálů ve spektru, kde každý signál odpovídá jedné aminokyselině v sekvenci. Pro určení postranních řetězců proteinů se pak využívá např. HBHA(CO)NH, H(CCCO)NH, CC(CO)NH apod. Pro určení hlavního řetězce je také vhodná sekvence TROSY (z angl. *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*), která slouží pro studium velkých molekul a komplexů. U TROSY experimentu jsou vyrušeny relaxační mechanismy určitých

komponent a ve výsledku tak vidíme 2D spektrum s ostrými signály. Pro TROSY experiment je potřeba silných magnetů, tj. od přibližně 700 MHz [242].

Pro měření proteinové NMR je potřeba mít vzorek izotopově značený, tzn. uhlík ^{12}C je nahrazen uhlíkem ^{13}C a dusík ^{14}N je nahrazen dusíkem ^{15}N . Izotopově označených vzorků lze dosáhnout expresí proteinů z bakterií ve speciálně upraveném minimálním médiu, které obsahuje mimo jiné komponenty i $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ a $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. V takto připraveném médiu musí být zajištěny jako jediné zdroje uhlíku a dusíku právě tyto izotopově značené sloučeniny. U ^{15}N izotopově obohaceného proteinu se dá zjistit jeho čistota, správné sbalení a správnost koncentrace pro další měření. Také se dají studovat interakce s ligandem apod. U ^{13}C , ^{15}N vzorku se pak dá zjišťovat i struktura proteinu. Komplikací ve studiu nestrukturovaných proteinů pomocí NMR je vzhled výsledného spektra, zejména signály amidických protonů vykazují velice úzkou distribuci chemických posuvů okolo 8,2 ppm a jsou tudíž obtížně rozlišitelné. Koncentrace vzorku se pohybuje podle síly magnetu, účinnosti chlazení sondy NMR přístroje a vlastností proteinu od 0,1 do 1,0 mM, objem vzorku pak od 250 do 600 μl .

K získání informací o vzdálenostech v rámci molekuly lze využít kromě NOE efektu, i PRE NMR experiment (z angl. *Paramagnetic Relaxation Enhancement NMR*), a to zavedením paramagnetické značky přímo do molekuly proteinu, např. kovalentní vazbou na cysteinové residuum. Přítomnost paramagnetické značky způsobí snížení a rozšíření signálů aminokyselin v NMR spektru, které se nacházejí v její prostorové blízkosti. Následným porovnáním signálů diamagnetické a paramagnetické formy molekuly s navázanou značkou lze pak určit prostorovou blízkost aminokyselinových zbytků.

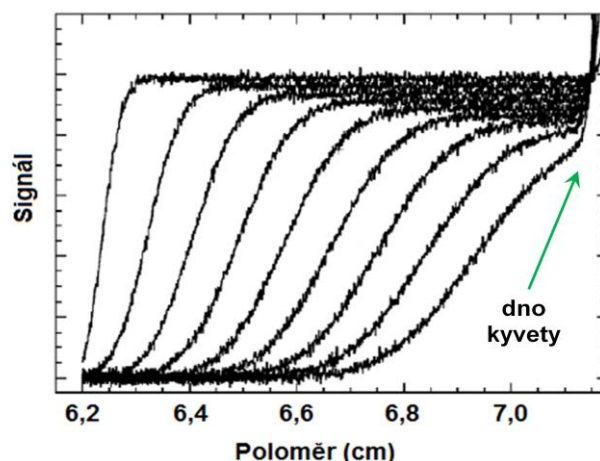
Pomocí programu SPARKY [245] pak lze sekvenčně specificky přiřadit signály patřící jednotlivým aminokyselinám v hlavním řetězci a dále postranním řetězcům. Následně lze vypočítat 3D strukturu proteinu. U větších molekul (od cca 40 kDa) je ovšem pro určení 3D struktury nutno proteiny exprimovat v deuterovaném minimálním médiu, což napomáhá vyhodnocování spektra. Do výpočetního programu jsou vloženy základní údaje o proteinu (primární struktura, délka vazeb, velikost dihedrálních úhlů a další kovalentní vazby, např. S-S můstky, apod.) a informace získané z NMR měření (např. vzdálenosti získané z NOE, PRE NMR). Následuje molekulárně-dynamická simulace využívající minimalizace celkové energie, algoritmu pro simulované žihání (viz kapitola 9.3) apod. Následuje ověřování pravdivosti získané struktury a to shodou vypočtených struktur s experimentálními daty, spočtením rozptylu získaných struktur a příslušné

směrodatné odchylky, porovnáním strukturních parametrů s již známými proteiny (využití Ramachandranova diagramu apod.). Pro ověření slouží např. program PSVS (z angl. *Protein Structure Validation Software suite*, dostupné na http://psvs-1_5-dev.nesg.org/ - září 2016).

9.5 Analytická ultracentrifugace (AUC)

Analytická ultracentrifugace je metoda využívaná ke studiu hydrodynamických a termodynamických vlastností biomolekul. Její výhody spočívají v relativně malé spotřebě proteinového vzorku, který se dá dále využít pro jiné analýzy, a v dnešní době již relativně lehké analýze naměřených dat, dostupné i pro nepříliš odbornou veřejnost v dané oblasti. Další výhodou je možnost přímo získat nativní molekulovou hmotnost a relativně přesnou hodnotu disociační K_d konstanty komplexu. Vzorky jsou měřeny ve vodném prostředí, takže je možné je ponechat v téměř nativní formě [246, 247]. Nevýhodou je cena zařízení, doba trvání experimentu v případě měření sedimentační rovnováhy (viz dále), a požadavky na velkou čistotu vzorku (např. v případě NMR drobné nečistoty, které neovlivňují vzorek, nejdou ve spektru vidět, proto příliš neškodí výslednému vyhodnocení).

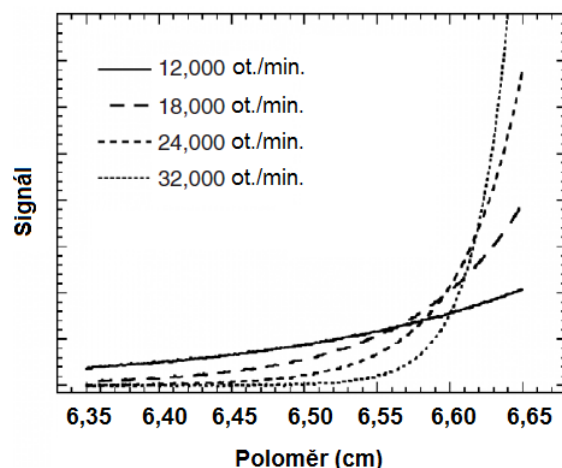
Sedimentační analýzu provedenou pomocí AUC lze rozdělit do dvou typů experimentů. Prvním z nich je metoda sedimentační rychlosti a druhou je metoda sedimentační rovnováhy. Obě metody jsou vzájemně komplementární. Metoda sedimentační rychlosti je technika hydrodynamická. Slouží k určování tvaru molekul, relativní molekulové hmotnosti M_r a ke studiu agregačního chování molekul. Touto metodou lze také určit mono nebo polydisperzitu vzorku, stechiometrii komplexu a také hodnotu zdánlivé disociační konstanty proteinového komplexu, ovlivněné hydrodynamickými vlastnostmi systému K_d . Při metodě sedimentační rychlosti se využívá vysokých otáček rotoru (řádově 10^4 ot. \cdot min⁻¹ a více) k vytvoření rozhraní mezi sedimentujícími makromolekulami a oblastí roztoku bez makromolekul [246, 247]. Toto rozhraní se vlivem rotace pohybuje od středu rotace (tj. horní části kyvety) směrem ke dnu kyvety konstantní rychlostí. Tento pohyb je sledován buď absorpčně, nebo interferenčně (viz dále). Vlivem difuze molekul ovšem dochází k rozmývání ostrého rozhraní, což se projeví na změně jeho tvaru, jak lze vidět např. na *Obr. 9.9*.



Obr. 9.9 Simulované spektrum závislosti signálu (např. absorbance) na poloměru otáčení v průběhu měření sedimentace molekuly o molekulové hmotnosti 50 kDa metodou sedimentační rychlosti. Daná molekula má sedimentační koeficient $s = 4$ S. Simulované otáčky byly nastaveny na $50\,000$ ot. \cdot min $^{-1}$. Obrázek představuje sérii devíti snímků jdoucích za sebou v čase zleva doprava. Sigmoidální měnící se křivka představuje pohybující se rozhraní mezi makromolekulami a roztokem bez makromolekul. Za měnící se tvar křivek je zodpovědná difuze molekul doprovázející sedimentaci. Převzato a upraveno z [246].

Při metodě sedimentační rychlosti je sledována rychlost pohybu rozhraní a jeho tvar. Se znalostí těchto parametrů lze dále určit hydrodynamické veličiny, jakými jsou difuzní koeficient D a sedimentační koeficient s makromolekuly. Zdánlivou disociační konstantu K_d komplexu lze získat z isotherm, které jsou vyneseny, jako závislost sedimentačních koeficientů na koncentraci jedné z přidávaných složek proteinového komplexu. Isothermy lze získat globálním prokládáním dat pomocí programu SEDPHAT se zabudovaným Langmuierovým vazebným modelem pro daný molární poměr vazebných partnerů [191, 192]. Tento postup slouží k přibližnému odhadu disociační konstanty.

Metoda sedimentační rovnováhy je metoda termodynamická. Slouží k získání absolutní hodnoty molekulové hmotnosti M_w , ke studiu protein-proteinových interakcí, tedy např. k získání hodnoty zdánlivé disociační konstanty K_d , touto metodou lze také sledovat agregační chování makromolekul. Na rozdíl od metody sedimentační rychlosti, je metoda sedimentační rovnováhy nezávislá na tvaru makromolekuly. Při této metodě se používají nižší otáčky (často v rozmezí $10\,000 - 35\,000$ ot. \cdot min $^{-1}$), aby mohlo dojít ke vzniku rovnovážného koncentračního gradientu makromolekul v roztoku v rámci kyvety, tj. v každém bodě kyvety [246]. Do rovnováhy se pak dostává sedimentace a difuze makromolekul. Koncentrace makromolekul se směrem ke dnu kyvety zvyšuje vlivem odstředivé síly, jak lze vidět na Obr. 9.10 na str. 247.



Obr. 9.10 Simulované spektrum závislosti signálu (např. absorpance při 280 nm) na poloměru otáčení v průběhu měření sedimentace molekuly o molekulové hmotnosti 50 kDa metodou sedimentační rovnováhy. Simulované otáčky byly nastaveny v rozmezí od 12 000 do 32 000 ot. · min⁻¹. Obrázek představuje zobrazení rovnovážného koncentračního gradientu pro stejný vzorek při čtyřech různých rychlostech otáček rotoru. Z obrázku je patrné, že s rostoucím poloměrem kyvety (více u dna kyvety) rovnovážný koncentrační gradient mezi makromolekulami a roztokem bez makromolekul narůstá vlivem sedimentace makromolekul. Převzato a upraveno z [246].

Signál je, stejně jako v případě sedimentační rychlosti, možno sledovat jak absorpčně, tak interferenčně. Samotný pokus trvá v porovnání s metodou sedimentační rychlosti mnohem déle, i několik dní, než se ustaví rovnováha.

Pro popis částice pohybující se v daném rozpouštědle konstantní rychlostí v kyvetě, která je centrifugována, slouží Svedbergova rovnice

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho_{rozt.})}{f}, \quad (\text{rovnice 9.76})$$

kde s je Svedbergova konstanta – sedimentační koeficient - pro daný systém částice/ rozpouštědlo (s). Jinou jednotkou pro sedimentační koeficient je Svedberg (S), a platí pro něj, že $1\text{S} = 10^{-13}\text{ s}$. v je rychlost pohybující se částice ve směru odstředivé síly ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) a v případě ultracentrifugace odpovídá rychlosti pohybujícího se rozhraní, ω je uhlová rychlost ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$), r je vzdálenost od středu rotace, m je hmotnost částice, \bar{v} je parciální specifický objem částice ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$), $\rho_{rozt.}$ je hustota roztoku, ve kterém je částice rozpuštěna, a f je frikční koeficient a platí pro něj vztah

$$f = \frac{RT}{N_A D}, \quad (\text{rovnice 9.77})$$

kde R je univerzální plynová konstanta, T je termodynamická teplota (*Kelvin*), N_A je Avogadrova konstanta a D je difuzní koeficient. Z rovnice 9.76 a 9.77 je patrné, že jejich kombinací lze přímo získat hodnotu relativní molekulové hmotnosti M_r

$$M_r = \frac{RTs}{D(1-\bar{v}\rho_{rozl.})} \quad (\text{rovnice 9.78})$$

Pro hladkou, kulovitou, kompaktní částici lze vypočítat frikční koeficient f_0 podle Stokesova vztahu

$$f_0 = 6\pi\eta r_0, \quad (\text{rovnice 9.79})$$

kde η je viskozita rozpouštědla a r_0 je poloměr koule. Kombinací rovnice 9.76, 9.78 a 9.79 pak lze získat sedimentační koeficient pro kouli ve tvaru [248, 249]

$$s_{koule} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{N_A 6\pi\eta r_0} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{N_A 6\pi\eta \sqrt{\frac{3M_w \bar{v}}{4\pi N_A}}} \quad (\text{rovnice 9.80})$$

Pomocí rovnice 9.80 lze predikovat sedimentační koeficient pro kulovitou molekulu proteinu. Platí navíc, že sedimentační koeficient koule s_{koule} je nejvyšší možný sedimentační koeficient, jakého lze při sedimentaci dosáhnout, jelikož koule má při daném objemu minimální povrch, tedy minimální styčnou plochu s rozpouštědlem, čemuž odpovídá i minimální frikční koeficient f_0 . Rovnice 9.80 je dále upravována a normována dle podmínek okolního prostředí (např. teplota 20 °C, hustota vody apod.). Podle konvence jsou sedimentační koeficienty udávány ve standardním stavu vody při 20 °C a následná korekce je provedena podle vztahu [247]

$$s_{20,w} = s_{T,B} \frac{\eta_{T,B}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{(1-\bar{v}\rho)_{20,w}}{(1-\bar{v}\rho)_{T,B}}, \quad (\text{rovnice 9.81})$$

kde index „20,w“ značí standardní podmínky a index „T,B“ značí podmínky při dané teplotě T za daných podmínek (složení pufru, hustota apod.).

Poměrem f/f_0 se dá odhadnout velikost a tvar částice. Poměr f/f_0 představuje odchylku od tvaru koule.

Nejjednodušší možností analýzy dat v případě metody sedimentační rychlosti, je sledování inflexního bodu koncentračního rozhraní [250]. V dnešní době se využívá sofistikovanějšího přesnějšího přístupu za využití Lammovy rovnice pro putování částic v silovém poli [246]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) - s \omega^2 \left(r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right) \quad (\text{rovnice 9.82})$$

Rovnice 9.82 představuje časový vývoj t radiální distribuce vážených koncentrací c během sedimentace. r je vzdálenost konkrétní hodnoty koncentrace (makromolekuly) od středu rotace. Optický systém analytické ultracentrifugy podává informaci o radiální distribuci koncentrací v určitých časových úsecích v průběhu experimentu ($c(r,t)$). Úhlová rychlost rotoru ω je volitelná. Sledovanými veličinami zůstávají sedimentační koeficient s a difuzní koeficient D . Výsledkem bývá závislost distribuce sedimentačního koeficientu $g(s)$ na hodnotě sedimentačního koeficientu s . Tato distribuce je dále matematicky upravována a prokládána vhodnými algoritmy, takže ve výsledku získáme distribuci normalizovaných spojitých sedimentačních koeficientů $c(s)$. V případě výskytu jednoho maxima je patrné, že vzorek obsahuje pouze částice o stejné velikosti a hmotnosti, se stejnými hydrodynamickými vlastnostmi, tedy se stejnou hodnotou s i D . V případě výskytu více maxim, vzorek obsahuje větší množství různých druhů částic. Posuny maxim pro danou částici ve stejném roztoku při stejné teplotě pak nasvědčují např. vzájemným interakcím s jinými částicemi v roztoku.

Pro vyhodnocování dat získaných metodou sedimentační rychlosti je využíván program SEDFIT [191, 192], používající numerických výpočtů k řešení velkých souborů Lammových rovnic. Tento program lze využít i pro studium interagujících systému [251]. Další verzi programu SEDFIT, která je schopná globálního modelování většího množství experimentů současně, je program SEDPHAT [191, 192]. Program, který zpracovává a aproximuje parametry pufru (hustota, viskozita apod.), ale také např. parciální specifický objem částice, se nazývá SEDNTERP [252].

Při vyhodnocování dat metodou sedimentační rovnováhy se uvažuje rovnice okamžité hodnoty rovnovážné koncentrace c v závislosti na vzdálenosti od středu rotace r (rovnice 9.83) [246]

$$c(r) = c_0 \cdot e^{\left[\frac{M_w \omega^2 (r^2 - r_0^2)}{RT} \right]} = c_0 \cdot e^{\left[\sigma \left(\frac{r^2 - r_0^2}{2} \right) \right]} \quad (\text{rovnice 9.83})$$

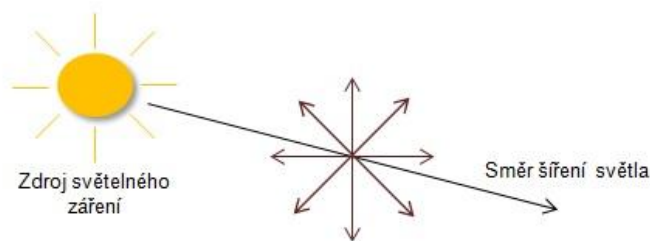
Rovnice 9.83 platí pro ideální neinteragující částici. c_0 je koncentrace v náhodně zvolené referenční vzdálenosti r_0 . σ je někdy nazývána redukovanou molekulární hmotností. Úpravou rovnice 9.83 lze získat přesnou hodnotu molekulové hmotnosti M_w a následně i její oligomerní stav [246].

Jak již bylo zmíněno výše, sedimentaci lze sledovat pomocí dvou optických systémů. První z nich je interferenční optický systém (XL-I), druhý je absorbanční optický systém (XL-A). Interferenční optický systém je založen na Rayleighově rozptylu a měří index lomu n . Je vhodný pro látky neobsahující fluorofor, nebo látky málo či příliš absorbující. Absorbanční optický systém měří absorbanci. Je často využíván při měření proteinů obsahujících přirozené fluorofory, jako např. tryptofanové zbytky. Absorbance se poté měří při vlnové délce 280 nm. Může se měřit i absorbance při 250 nm, pro ověření, že nejvyšší použitá koncentrace vzorku vykazuje absorbanci v lineární oblasti [247].

9.6 Cirkulární dichroismus (CD)

Cirkulární dichroismus (CD) je spektroskopická metoda, jejíž pomocí lze získat informace o sekundární a terciární struktuře proteinů, struktuře peptidů, cukrů, organických sloučenin, i struktuře nukleových kyselin [253 - 258]. Mezi výhody CD patří jednoduchost a rychlost v provedení experimentu a v přípravě vzorku, možnost měřit vzorek v roztoku téměř jakéhokoli složení, takže je možné simulovat nativní podmínky biomolekul, které mohou být všech velikostí, u vzdáleného UV CD (viz dále) měření je potřeba relativně malého množství vzorku. CD je komplementární metoda doplňující informace o struktuře makromolekul, často těch, které nelze jednoduše krystalovat. Pomocí CD lze ale studovat i efekty vazby ligandu na sekundární strukturu makromolekuly, sledovat dynamiku procesů sbalování proteinů, sledovat vliv vnějších podmínek (pH, teplota, iontová síla apod.) na strukturu makromolekuly apod. Nevýhodou CD je jeho nízká rozlišovací schopnost, to znamená, že není možné přesně určit, které části v makromolekule vykazují jaké prvky sekundární a terciární struktury, lze pouze určit jejich relativní zastoupení v rámci molekuly.

Světelnou vlnu šířící se prostorem ve směru propagace vlny lze popsat dvěma složkami navzájem kolmými, složkou elektrickou a složkou magnetickou. Pokud bychom se jako pozorovatelé dívali na slunce, nebo např. rozsvícenou žárovku, do všech směrů, tedy i v našem směru, se budou šířit elektromagnetické vlny světelného záření, jejichž elektrické složky (tedy i magnetické), jsou navzájem pootočený do všech možných směrů kolmých ke směru šíření vlny (viz *Obr. 9.11*, str. 251). Takovému záření se říká záření nepolarizované.



Obr. 9.11 Symbolické zobrazení šíření nepolarizovaného světelného záření. Hnědé šipky naznačují směry amplitud elektrických (a magnetických) vln, které jsou kolmé ke směru šíření světelného záření.

Pokud je do směru šíření vlny vnesen polarizátor, za polarizátor budou propuštěny pouze ty orientace světelných vln, které polarizátor dovolí propustit. Získáme tak lineárně polarizované světlo, které představuje elektromagnetickou vlnu šířící se pouze v jedné orientaci, kde orientace elektrické složky vlny je rovnoběžná s orientací polarizátoru. Budou-li se v jednom směru šířit dvě elektromagnetické, navzájem kolmé vlny se stejně velkou amplitudou, které budou navíc vzájemně mimo fázi o $\frac{1}{4}$ vlnové délky λ , vznikne kruhově polarizované světlo. Vznik kruhového (přesněji helikálního) pohybu elektrického vektoru okolo vektoru propagace světla je dán součtem vektorů jednotlivých elektrických složek obou šířených vln. Podle toho, zda jsou obě elektromagnetické vlny vzájemně mimo fázi o $\frac{1}{4}$, nebo o $-\frac{1}{4}$ vlnové délky, lze získat pravotočivé, respektive levotočivé kruhově polarizované světlo. Kruhově polarizovaného světla se využívá v CD (viz dále). Posunutí vln o $|\frac{1}{4}|$ fáze lze dosáhnout pomocí např. křemenného krystalu, který deformací vykazuje piezoelektrické vlastnosti. Kruhově polarizované světlo se používá např. i u polarizačních brýlí ve 3D kinech.

CD využívá faktu, že některé molekuly, jako např. proteiny, vykazují chirální charakter. Chirální molekula nemůže být ztotožněna se svým zrcadlovým obrazem a je opticky aktivní ve smyslu, že může stáčet rovinu polarizovaného světla. Další vlastností chirálních látek je jejich schopnost absorbovat různou měrou levotočivé a pravotočivé kruhově polarizované světlo. Projde-li kruhově polarizované světlo vzorkem s obsahem pouze chirální látky, pak rozdíl mezi absorpcí levotočivě a pravotočivě polarizovaného světla $\Delta A(\lambda)$ bude velmi malý ($\ll 10^{-4}$ celkové absorpce). Tento velmi malý rozdíl ovšem stačí k přeměně kruhově polarizovaného světla na světlo elipticky polarizované [256] z důvodu rozdílných amplitud jednotlivých složek.

$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_P(\lambda) = [\varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_P(\lambda)] \cdot l \cdot c, \quad (\text{rovnice 9.84})$$

$A_L(\lambda)$ a $A_P(\lambda)$ představují absorpční koeficienty levotočivě (L), respektive pravotočivě (P) kruhově polarizovaného světla, l představuje délku kyvety (cm), c představuje molární koncentraci ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), λ je vlnová délka dopadajícího záření a $\varepsilon_P(\lambda)$ a $\varepsilon_L(\lambda)$ představují molární absorpční koeficient, který je specifický pro každou látku a může se lišit i díky schopnosti látky absorbovat P a L kruhově polarizované světlo. Rozdíl molárních absorpčních koeficientů $\Delta\varepsilon$ je typicky $< 10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, jejich velikost ovšem dosahuje hodnot např. $20\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. CD signál je tedy malý rozdíl dvou velkých hodnot. Vztah pro absorpční koeficient látky (rovnice 9.84) vychází z Lambertova-Beerova zákona. Měřeným signálem CD je elipticita, která se pro proteinové vzorky udává jako molární elipticita střední hodnoty residua $[\theta]$ (stupeň $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$),

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100 \cdot M_w}{c_m \cdot l \cdot N} \quad (\text{rovnice 9.85})$$

θ představuje elipticitu ve stupních, M_w je molekulová hmotnost, c_m je hmotnostní koncentrace v ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), l je délka kyvety (optická dráha) (cm) a N je počet residuí (aminokyselinových zbytků) v proteinovém řetězci.

Elipticita a absorpance jsou spolu vztaženy vztahem [258]

$$\Delta A = \frac{\theta}{32980}, \quad (\text{rovnice 9.86})$$

kde

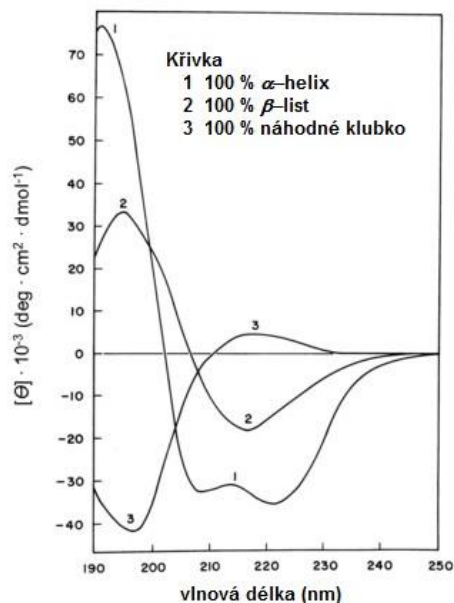
$$\theta = \frac{2,303[A_P(\lambda) - A_L(\lambda)]}{4l} \quad (\text{rovnice 9.87})$$

Fyzikálně si lze vznik CD signálu představit tak, že zkoumaná látka je schopná absorbovat kvantum světelného záření, tedy excitovat určité elektrony v obsažených chromoforech. Vznikají tak přechodné dipóly, které ovšem musí být prostorově orientovány tak, aby byly schopné absorbovat světelné záření. Signál je tedy citlivý na změnu konformace.

Bavíme-li se o měření CD u vzorků obsahujících proteiny, zajímá nás elektromagnetické záření v oblastech spektra dalekého UV (190 - 240 nm) a blízkého UV (240 - 350 nm). Informace o sekundární struktuře proteinů lze získat měřením CD v daleké oblasti UV s vlnovými délkami menšími než 240 nm. Při absorpci světla při 220 nm dochází k přechodu elektronů $n \rightarrow \pi^*$, což lze pozorovat jako slabý, ale široký pás ve spektru, které je zobrazeno jako $[\theta] = f(\lambda)$. Další absorpci lze pozorovat při 190 nm, čemuž odpovídá elektronový přechod $\pi \rightarrow \pi^*$. Oba tyto přechody jsou typické pro peptidovou vazbu. Chromoforem je karboxylová skupina v peptidové vazbě. Prvky sekundární struktury měřeného proteinu lze v CD spektru odečíst díky jejich typickým

absorpčních pásů. Pro α -helix jsou pozorovány dva pásy se zápornou hodnotou střední elipticity $[\theta]$ při 208 a 222 nm, a jeden pás s kladnou hodnotou $[\theta]$ při 192 nm. β -list vykazuje záporný pás při 216 nm a kladný při 195 nm. U β -ohybu lze pozorovat silný široký záporný pás (180 – 190 nm), slabý široký záporný pás (220 – 230 nm) a kladný pás při 205 nm. Náhodné klubko se projevuje záporným pásem při 200 nm. Tvar křivek odpovídajících jednotlivým prvkům sekundární struktury je zobrazen na *Obr. 9.12* a křivkám se říká standardní Fasmanovy křivky [256, 257]. Aromatické aminokyseliny mohou také přispívat ke tvaru CD signálů v oblastech pod 250 nm. Ze spektra v oblasti vlnových délek 260 až 320 nm (blízká oblast UV) lze získat informace o terciární struktuře proteinu. Absorpce zde nastává v důsledku obsahu aromatických aminokyselin v proteinovém řetězci. Tryptofan (Trp, W) vykazuje kladný pás u 290 nm s plytkým poklesem mezi 290 a 305 nm. Tyrosin (Tyr, Y) vykazuje kladný pás mezi 275 a 282 nm a mírně se překrývá s pásem Trp. Fenylyalanin (Phe, F) vykazuje několik kladných ostrých absorpčních pásů v oblasti 255 až 270 nm. Výsledný tvar křivek závisí na množství daných aminokyselinových zbytků, jejich okolí, pohyblivosti a prostorové orientaci [257].

Obr. 9.12 Zobrazení standardních Fasmanových křivek jednotlivých prvků sekundární struktury proteinu po jejich změření pomocí CD spektroskopie (převzato a upraveno z [259]). Křivka 1 odpovídá α -helixu, křivka 2 β -listu a křivka 3 náhodnému klubku.



K získání informací o množství daných prvků sekundární struktury lze využít např. program dostupný na internetové stránce Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>, květen 2016) [260, 261]. K získání informací o sekundární struktuře proteinového vzorku se pak používá proložení experimentální křivky θ_{ex} kombinací standardních křivek, v nejjednodušším případě pomocí Fasmanových standardů

$$\theta_F = x_\alpha \theta_\alpha + x_\beta \theta_\beta + x_k \theta_k, \quad (\text{rovnice 9.88})$$

kde x_α , x_β a x_k představují podílové zastoupení α -helixu, β -listu, respektive náhodného klubka, přičemž

$$x_\alpha + x_\beta + x_k = 1 \quad (\text{rovnice 9.89})$$

Parametry x_α , x_β a x_k se volí tak dlouho, dokud se nedosáhne nejlepší shody mezi θ_{ex} a θ_F . Následuje minimalizace metodou nejmenších čtverců [218].

9.7 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. *Mass Spectrometry*) je technika kvalitativní i kvantitativní a stala se užitečným nástrojem ke zkoumání a ověřování struktury molekul a makromolekul, jejich hmotnosti, k ověřování posttranslačních modifikací proteinů, ke studiu tvorby proteinových komplexů, ale také *in vitro* buněčných procesů, a jistě by se našlo spoustu dalších využití, které může MS díky rychle se vyvíjejícím technologiím a výpočetním procesům poskytnout.

Základní princip MS spočívá ve čtyřech po sobě následujících krocích. Prvním krokem je převod vzorku z kapalně do plynné fáze a vaporizace, tedy odpaření rozpouštědla z molekul. Druhým krokem je nabití molekuly kladným nábojem. Třetím krokem je přenos iontu do silného radiálně zakřiveného magnetického pole, kde dojde k rozdělení iontů na základě jejich velikosti a náboje, přesněji na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji m/z , a posledním krokem je detekce dopadajících iontů v čase, pomocí detektoru často fungujícího na principu zesilování napětí pomocí série uspořádaných anod [262]. V dnešní době je známo mnoho technik umožňujících přesnou analýzu. Každý výše zmíněný krok je v dnešní době možné provést různými přístupy. Pro ionizaci molekul se často využívá tzv. elektrospreje (ESI, z angl. *Electrospray Ionization*), nebo matricí asistovaná laserová desorpce (MALDI, z angl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) [262 - 264]. V dalších krocích se využívá různých technik typu iontových pastí, kvadrupólu jako analyzátorů apod.

Hmotnostní spektrometr lze přímo připojit ke kapalinové chromatografii (LC, z angl. *Liquid Chromatography*), takže je možné kapalně vzorek nejdříve rozdělit a analyzovat pomocí LC a následně pomocí MS (LC-MS). Další možností kombinace MS s jinou technikou je kombinace s nukleární magnetickou rezonancí NMR (MS/NMR) [265]. MS lze spojit i s plynovou chromatografií a dalšími technikami, ale výše zde dvě zmíněné jsou nejpoužívanější v proteinové MS. Všechny součásti hmotnostního spektrometru bývají

vakuovány, ovšem je možný i účelný přídavek inertního plynu do analyzátoru pro brzdění pohybujících se kationtů. Někdy se pro detailnější analýzu přidává další hmotnostní spektrometr, ve kterém je analyzován vybraný kationt, který je dále štěpen na menší frakce. Takovému tandemovému uspořádání se poté říká MS/MS uspořádání.

V analyzátoru dochází k rozdělení částic podle jejich poměru m/z . Tento poměr je úměrný magnetické indukci B vnějšího magnetického pole a nepřímo úměrný urychlujícímu napětí U , které urychluje ionty při jejich pohybu do analyzátoru, podle vztahu

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2U} \quad (\text{rovnice 9.90})$$

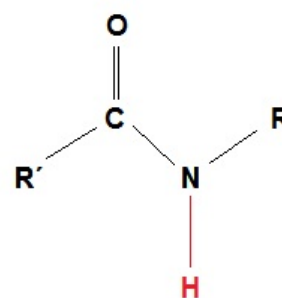
r představuje poloměr kruhové dráhy, po které se iont pohybuje.

Velká výhoda hmotnostní spektrometrie spočívá v malé spotřebě vzorku a relativně rychlé analýze získaných dat. Pomocí MS lze analyzovat organické látky, proteiny, peptidy, DNA i cukry. Nevýhodou je především cena zařízení.

9.7.1 Výměna H za D spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)

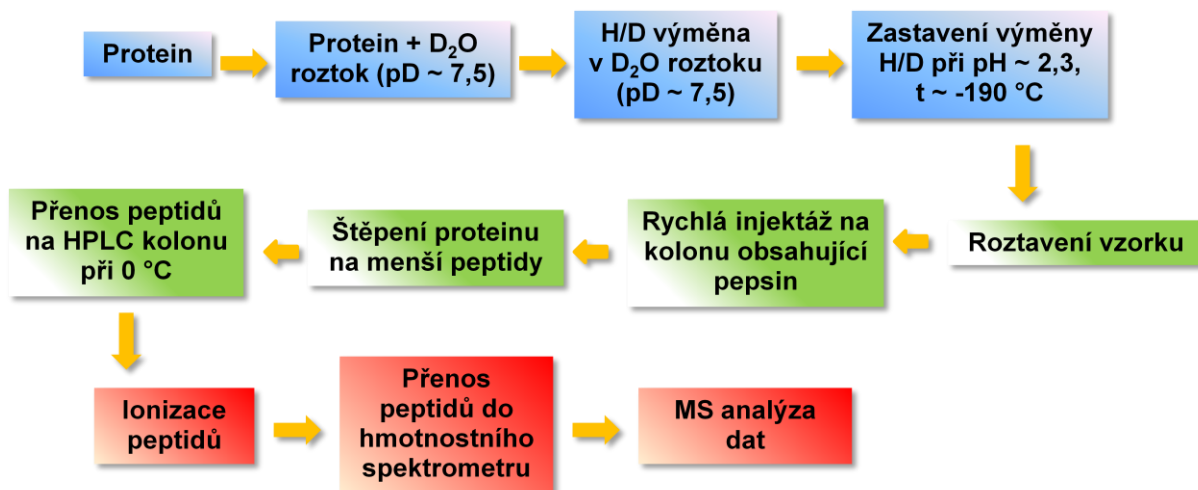
Účelná spontánní výměna amidických vodíků ^1H za deuterium ^2D v proteinech je relativně nová metoda [266] umožňující zkoumání dynamických procesů týkajících se proteinů, především jejich sbalování a vazbu s ligandem, a vliv vnějších faktorů (pH, iontová síla, vznik vodíkových vazeb apod.) na strukturu proteinu. Na *Obr. 9.13* jsou vyznačeny amidické vodíky obsažené v proteinech, které jsou schopné se vyměňovat s vodíky obsaženými v okolním roztoku. Tyto vodíky se mohou vyměňovat i za deuterium, je-li deuterium v roztoku přítomno. Navázáním deuteria do konkrétních aminokyselinových zbytků způsobí zvýšení jejich hmotnosti, což lze analyzovat pomocí MS. Ostatní vodíky v aminokyselinách se také mohou měnit s vodíky v roztoku, ale jejich výměna je příliš rychlá, nebo příliš pomalá.

K výměně amidických vodíků dochází pouze v případě, že jsou okolnímu roztoku přístupné a nejsou blokovány vodíkovými vazbami. Často se jedná o vodíky obsažené v hydrofilních aminokyselinách proteinového řetězce, které



Obr. 9.13 Zobrazení amidických vodíků v části proteinu, schopných výměny za vodíky obsažené v okolním roztoku.

jsou vystaveny vnějšímu roztoku na povrchu proteinu. Naopak u aminokyselin, které se nachází v hydrofobních oblastech proteinů, které nebývají vystaveny polárnímu okolí, k výměně amidických vodíků s vodíky roztoku nedochází. Tohoto principu se využívá při H/D výměně spojené s hmotnostní spektrometrií. Základní schéma experimentu je zobrazeno na *Obr. 9.14*, str. 257 [266]. V prvním kroku experimentu je protein rozpuštěn v roztoku obsahujícím deuterium. V tento okamžik začne docházet k výměně odhalených amidických vodíků proteinů za deuteria z roztoku. Proces výměny vodíků za deuterium probíhá v různě dlouhých zvolených časových intervalech a dále je zastaven přidávkem kyseliny o velmi nízkém pH (pH ~ 2,3) a ponořením roztoku do kapalného dusíku. Dalším krokem je rychlé rozmrazení roztoku a okamžitá injektáž na kolonu obsahující vhodnou proteasu, např. pepsin, který štěpí peptidy v kyselém prostředí. Pepsin naštěpí protein na menší fragmenty, které jsou dále dopraveny přes ledem chlazenou kolonu vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. *High-Performace Liquid Chromatography*). HPLC kolona obsahuje hydrofobní polymer a proto dojde k zachycení proteinu na jeho povrchu. Na koloně poté dojde k odsolení peptidů pomocí okyselené (kyselina mravenčí) destilované vody a následuje vymytí peptidů pomocí gradientu acetonitrilu (10 – 40 %). Takto pročištěné peptidy jsou dále převedeny na kolonu s obrácenou fází a promývány acetonitrem. Následuje přesun peptidů do hmotnostního spektrometru, kde dochází k jejich rozdělení podle hodnoty m/z a analýze (FT-ICR MS, z angl. *Fourier Transform – Ion Cyclotron Resonance*). Jednotlivé hmotnosti peptidů jsou zaznamenány a porovnány s databází. Tato databáze je vytvořena programem MASCOT a GPMAW 8.0 a spočívá ve vnesení primární sekvence proteinu do programu s možností navolení obsahu vodíků nebo deuterií a navolení použité proteasy, a tento program následně vyprodukuje sérii možných vzniklých peptidů s příslušnou hodnotou náboje. Měřením získané kationty peptidů jsou porovnány s databází a místa, kde dochází k vodíkové výměně, jsou zaznamenána.



Obr. 9.14 Základní schéma experimentu HDX-MS. Převzato a upraveno z [266].

K výměně vodíku za deuterium může docházet rychle (velmi přístupné residuum), nebo pomalu (méně přístupné residuum). Kinetika procesu výměny H/D je sledována díky měření vzorků v různých časových intervalech. U některých residuí může být výměna H/D tak rychlá, že dojde ke zpětné výměně D/H i přes velký nadbytek deuteria v roztoku, takže kinetiku pro konkrétní peptid nelze přímo určit. Je pak na každém vědeckém pracovníkovi, aby zvážil tuto možnost pro konkrétní peptid.

Výše zmíněná hodnota pD je definována jako $pD = pH + 0,4$ [267].

Velkou výhodou měření výměny amidických vodíků je jejich výskyt v každé aminokyselině (kromě prolinu) a jejich podíl na stabilizaci sekundární struktury proteinů.