

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Studium posttranslačních modifikací fosducinu

Study of the posttranslational modifications of phosducin

Diplomová práce

Biofyzikální chemie

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

Praha 2016

Jiří Šimůnek

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením svého školitele prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Práce nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Praze dne

.....

Jiří Šimůnek

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali během vypracování této diplomové práce. Mé díky patří Mgr. Miroslavě Kacířové za věnovaný čas, úsilí a cenné rady. Dále děkuji svému školiteli, prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. především za nově nabyté zkušenosti, korekturu mé práce a možnost pracovat v příjemném prostředí.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem úlohy posttranslačních modifikací fosducinu na jeho interakci s proteinem 14-3-3 a dále posouzení vlivu tvorby komplexu na tyto modifikace.

Fosducin je 33kDa protein nacházející se ve fotoreceptorových buňkách sítnice, ale také v jiných tkáních. Přes mnohé experimenty jsou však jeho fyziologické funkce stále řešeným tématem. Spekuluje se o jeho vlivu při regulaci signální dráhy oční sítnice, krevního tlaku a exprese G-proteinů. Funkce fosducinu je regulována proteinem 14-3-3, jenž hraje roli v mnohých biochemických procesech. Tvorba komplexu mezi proteinem 14-3-3 a fosducinem vyžaduje fosforylaci dvou serinových zbytků v N-terminální doméně molekuly fosducinu. Úloha vazby proteinu 14-3-3 v regulaci funkce fosducinu je ovšem stále nejasná.

V rámci této diplomové práce byly exprimovány proteiny 14-3-3 $\zeta\Delta$ C a fosducin (s mutací Q52K) a úspěšně purifikovány. Ke studiu vlivu tvorby komplexu na posttranslační modifikace fosducinu bylo využito limitované proteolýzy a defosforylace. Experimenty ukázaly, že tvorba komplexu způsobuje významné zpomalení defosforylace Ser-54 i Ser-73 a proteolytické degradace, což indikuje protektivní funkci vazby proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Úloha obou 14-3-3 $\zeta\Delta$ C vazebných motivů obsahujících Ser-54 a Ser-73 pro interakci fosducinu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C byla zkoumána měřením stacionární anizotropie fluorescence syntetických fosfopeptidů. Výsledky ukázaly obdobné vazebné afinity obou studovaných motivů, čímž poukazují na stejný význam motivů pro interakci fosducinu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.

Abstract

The aim of this diploma thesis was to study the role of posttranslational modifications of phosducin and their role in the interaction with the 14-3-3 protein as well as the influence of the complex formation on these modifications.

Phosducin is a 33kDa protein commonly present in photoreceptor cells of the retina as well as other tissues. Despite many experiments, its physiological functions are still elusive. It has been speculated that fosducin plays an important regulatory role in visual phototransduction pathway, regulation of blood pressure and expression of G-proteins. The phosducin function is regulated through binding to the 14-3-3 protein, a regulatory protein involved in many biochemical processes. Phosducins binding to 14-3-3 protein requires phosphorylation of two serine residues Ser-54 and Ser-73 within the N-terminal domain of phosducin. However, the role of the 14-3-3 protein binding in the regulation of phosducin function is still unclear.

In this diploma thesis proteins 14-3-3 $\zeta\Delta$ C and phosducin (mutation Q52K) were successfully expressed and purified. The effect of the complex formation on phosducin posttranslational modifications was investigated using limited proteolysis and dephosphorylation. These experiments revealed that the complex formation significantly slowed down both the dephosphorylation of pSer-54 and pSer-73 and the proteolytic degradation of phosducin. This indicates that the complex formation might have a protective function against dephosphorylation and proteolytic cleavage. The importance of the two 14-3-3 $\zeta\Delta$ C protein binding motifs containing pSer-54 and pSer-73 for the interaction between phosducin and 14-3-3 $\zeta\Delta$ C protein was investigated using steady-state fluorescence anisotropy measurements with synthetic phosphopeptides. These measurements revealed similar binding affinities for both studied motifs thus suggesting their similar importance for the interaction between phosducin and 14-3-3 $\zeta\Delta$ C protein.

OBSAH

Seznam zkratk a symbolů	8
1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1. Fosducin.....	10
2.1.1. Úvod	10
2.1.2. Struktura	11
2.1.3. Rozdílná funkce N-terminální a C-terminální domény	13
2.1.4. Posttranslační modifikace fosducinu	13
2.1.5. Fyziologické funkce fosducinu.....	15
2.2. Proteiny 14-3-3	18
2.2.1. Úvod	18
2.2.2. Struktura	19
2.2.3. Vazebný motiv.....	20
2.2.4. Mechanismus funkce proteinu 14-3-3	20
2.3. Interakce proteinu 14-3-3 a fosducinu	21
3. Cíle práce	22
4. Metody a materiál	23
4.1. Použitý materiál	23
4.1.1. Chemikálie.....	23
4.1.2. Přístroje.....	24
4.1.3. Ostatní materiál	24
4.2. Exprese a purifikace proteinů	25
4.2.1. Plasmid	25
4.2.2. Bakteriální expresní systém.....	25
4.2.3. Transformace bakterií.....	26
4.2.4. Kultivace bakterií a indukce exprese proteinů	26
4.2.5. Preparativní centrifugace.....	27
4.2.6. Sonikace	27
4.2.7. Dialýza.....	28
4.2.8. Chromatografie.....	30
4.2.9. Koncentrování roztoků proteinů.....	34

4.3.	SDS-PAGE	34
4.4.	Měření koncentrace proteinů	37
4.5.	Fosforylace fosducinu	37
4.6.	Limitovaná proteolýza	38
4.7.	Defosforylace	38
4.8.	SUMOylace	39
4.9.	Fluorescenční měření	41
5.	Výsledky	44
5.1.	Expres a purifikace proteinů 14-3-3 ζ Δ C a PdQ52K	44
5.1.1.	Expres	44
5.1.2.	Niklová chelatační chromatografie	44
5.1.3.	Aniontově výměnná chromatografie	45
5.1.4.	Gelová permeační chromatografie	47
5.2.	Studium posttranslačních modifikací fosducinu	50
5.2.1.	Limitovaná proteolýza PdQ52K	50
5.2.2.	Limitovaná defosforylace PdQ52K	52
5.2.3.	SUMOylace fosducinu	54
5.2.4.	Porovnání vazebné afinity fosforylovaných peptidů	55
6.	Diskuze	61
7.	Závěr	63
8.	Seznam citované literatury	64

Seznam zkratek a symbolů

ATP	adenosintrifosfát
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní protein kinasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
Da	Dalton, hmotnostní jednotka
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Flc	fluorescein
FPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GDP	guanosindifosfát
GPC	gel permeation chromatography
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
GRK2	s G-proteiny spřažená receptorová kinasa 2
G _t	G-protein transducin
GTP	guanosintrifosfát
G _α	α podjednotka G-proteinů
G _{βγ}	βγ podjednotky G-proteinů
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonová kyselina
His-tag	motiv 6 histidinů za sebou
HRP	křenová peroxidasa
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
K _D	disociační konstanta
LB	Lysogeny broth
M	mol·l ⁻¹
MCO	molecular weight cut-off
NP40	nonyl fenoxypolyethoxyethanol
PdQ52K	fosducin s mutací Q52K
PKA	cAMP-dependentní protein kinasa
PP1	protein fosfatasa typu 1
PP2A	protein fosfatasa typu 2A
rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS
SEC	size exclusion chromatography
SNP	single nucleotide polymorphism
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TBST	tris-buffered saline and Tween 20
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

1. Úvod

Předkládaná diplomová práce je součástí širšího projektu laboratoře prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. Cílem tohoto projektu je objasnění struktury komplexu fosducinu s proteinem 14-3-3, charakterizace vazebných interakcí a regulačních vlastností těchto proteinů. Cílem této diplomové práce je studium úlohy posttranslačních modifikací na interakci fosducinu s proteinem 14-3-3 a dále posouzení vlivu tvorby komplexu na tyto modifikace.

Funkce fosducinu jsou stále řešeným tématem. Nejasná je jeho aktivita v oční sítnici, byť s největší pravděpodobností spočívá především v regulaci signálu přenášeného z oční sítnice k neuronům, který je zprostředkován G-proteinovou signální drahou. Intenzita denního světla je ovšem příliš vysoká a vyžaduje utlumení příslušné signální dráhy. Ve tmě je naopak zesílení tohoto signálu nutné, a proto je inhibiční funkce fosducinu potlačena prostřednictvím jeho fosforylace následované interakcí s proteinem 14-3-3.

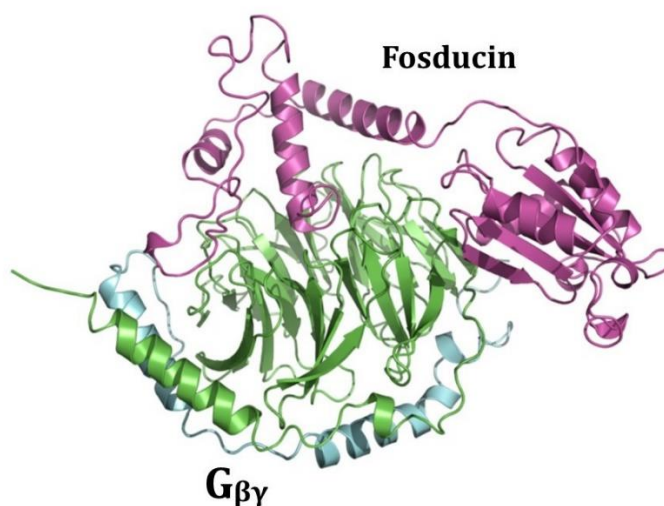
2. Teoretická část

2.1. Fosducin

2.1.1. Úvod

Fosducin je protein, který byl více než před 30 lety objeven a purifikován z hovězích sítnic v komplexu s $\beta\gamma$ podjednotkami ($G_{\beta\gamma}$) G-proteinu transducinu (G_t) [1]. Tento protein je v závislosti na přítomnosti světla fosforylován kinasami [2], především cAMP-dependentní protein kinasou (PKA) [3]. Odtud také pramení jeho název, jelikož zohledňuje možnost fosforylace (fos-) i nejčastějšího vazebného partnera (-ducin) [4].

Jeho význam spočívá především ve schopnosti regulace přenosu signálu, a to interakcí s heterotrimerními G-proteiny, například v buňkách oční sítnice se jedná o již zmíněný G_t [4]. Tyto proteiny jsou součástí signálních drah, kde přenáší signál z receptorů (GPCR) prostřednictvím výměny GDP za GTP a svým následným rozpadem na podjednotky G_α a $G_{\beta\gamma}$ [5]. Aktivovaná G_α dále reguluje mnoho dalších efektorových systémů. Fosducin je schopen vázat $G_{\beta\gamma}$, čímž brání zpětné asociaci heterotrimeru G_t a tím přerušuje cyklus přenosu signálu. Je-li ovšem fosducin fosforylován, jeho schopnost interakce s $G_{\beta\gamma}$ je inhibována.



Obr. 2.1. Stužkové zobrazení komplexu fosducinu (fialově) s $G_{\beta\gamma}$ podjednotkou transducinu (zeleně) [6].

Fosducin je přítomen s velmi podobnou strukturou u savců. S většími strukturními odchylkami se nachází však i u jiných eukaryotických organismů (kostnatých, nálevníků, hub i kvasinek) [4]. Také byly objeveny proteiny, které mají obdobnou strukturu jako fosducin [7]. Část jejich struktury je odlišná, přesto si zachovaly schopnost vázat $G_{\beta\gamma}$. Většina těchto proteinů je však zapojena do skládání proteinů, kde fungují jako chaperony.

Fyziologické role fosducinu jsou stále zkoumaným tématem, především se jedná o jeho zapojení do procesu vidění a s tím spojeného přenosu světelného signálu [8][9], nicméně také se objevují další důkazy o jeho spojitosti s vysokým krevním tlakem [10][11][12] a expresí $G_{\beta\gamma}$ [13].

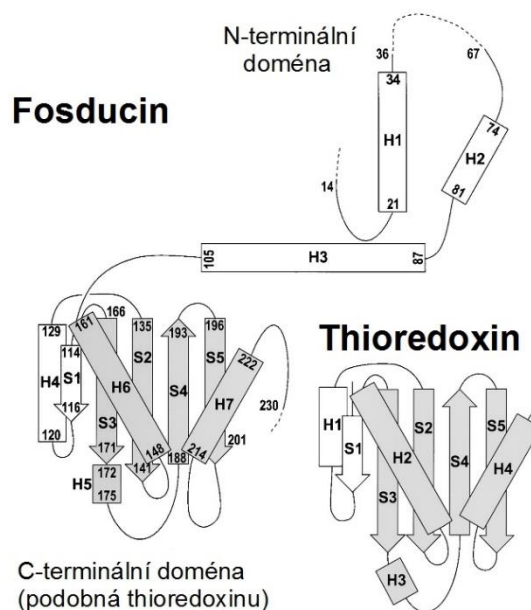
2.1.2. Struktura

Savčí fosducin se v závislosti na druhu skládá z 244-246 aminokyselin, což odpovídá molekulové váze 28 kDa, nicméně na SDS-PAGE gelu se nachází ve frakci odpovídající 33 kDa [9].

Krystalová struktura fosducinu byla vyřešena v komplexu s $G_{\beta\gamma}$, a to s rozlišením 2,4 Å. Identifikovány byly dvě domény, N- a C-terminální. Tyto domény spolu neinteragují, namísto toho obalují $G_{\beta\gamma}$ a vytváří rozsáhlý interakční povrch [6].

N-terminální doména je velmi flexibilní a nepřilíš strukturovaná. V komplexu s $G_{\beta\gamma}$ je tvořena především třemi α -helixy. Tato doména interaguje s $G_{\beta\gamma}$ v oblasti vazebného místa pro G_{α} a navázání N-terminální domény fosducinu tedy brání asociaci G_{α} s $G_{\beta\gamma}$ [14].

C-terminální doména je podobná struktuře thioredoxinu. Váže část $G_{\beta\gamma}$ zodpovědnou za vazbu k membráně tyčinek a interakci s receptorem, čímž uvolňuje $G_{\beta\gamma}$ z membrány [14].



Obr. 2.2. Obrázek znázorňuje uspořádání sekundární struktury fosducinu v komplexu s $G_{\beta\gamma}$. N-terminální doména je složená ze tří α -helixů (H1-3). C-terminální doména se skládá z pěti β -listů (S1-4) a čtyř α -helixů (H4-7). Z obrázku je také patná podobnost C-terminální domény s thioredoxinem [6].

2.1.2.1. Nestrukturované proteiny

Nestrukturované proteiny a proteiny, které obsahují nestrukturované oblasti, postrádají stabilní terciární strukturu, typickou pro ostatní proteiny [15]. Tyto proteiny se zároveň vyskytují ve více, ovšem funkčních konformacích [16]. Jedná se však o běžně se vyskytující proteiny, které plní mnoho biologických funkcí a byla prokázána i jejich souvislost s řadou lidských onemocnění [17]. Funkce nestrukturovaných proteinů jsou spojeny například se signálními drahami, regulací transkripce, kondenzací DNA a dělením buněk [15]. Tyto schopnosti mají především díky své flexibilitě, která umožňuje řadu interakcí se signálními a regulačními proteiny.

Struktura těchto proteinů většinou obsahuje mnoho hydrofilních aminokyselinových zbytků, mimo vazebných míst ostatních proteinů, které jsou často hydrofóbní [16]. V nestrukturovaných oblastech proteinu jsou také lokalizovány některé posttranslační modifikace, například fosforylace serinových a tyrosinových zbytků [15]. Stejně je tomu u fosducinu, jehož nestrukturovanou oblastí je N-terminální doména.

2.1.3. Rozdílná funkce N-terminální a C-terminální domény

2.1.3.1. N-terminální doména

N-terminální doména fosducinu interaguje s $G_{\beta\gamma}$ v části, která ve tmou adaptované sítnici váže G_{α} [14]. Právě vytvořením této vazby N-terminální doména strukturně brání opětovné reasociaci $G_{\beta\gamma}$ s G_{α} .

Tato vazba je narušena fosforylací fosducinu, přičemž fosforylované zbytky aminokyselin se nachází na povrchu jeho N-terminální domény [18]. Dokonce se vyskytují i na povrchu komplexu fosducinu s $G_{\beta\gamma}$ a jsou tedy volně přístupné kinasám [6]. Samotná fosforylace ovšem nezpůsobuje rozrušení tohoto komplexu, namísto toho způsobuje konformační změnu N-terminální domény. Fosforylace na Ser-73 způsobí ve fosducinu konformační změnu helixu 2, jejímž výsledkem je ztráta kontaktu s $G_{\beta\gamma}$ právě v místě, které váže G_{α} . Vlivem této strukturní změny se zvyšuje přístupnost G_{α} k vazebnému místu $G_{\beta\gamma}$. K úplnému rozrušení komplexu je však potřeba fosforylace více zbytků aminokyselin [18].

Navázání samotné N-terminální domény fosducinu dokázalo způsobit inhibici přenosu signálu a její fosforylace následně rozrušení komplexu s $G_{\beta\gamma}$, což indikuje nezávislost na C-terminální doméně [14]. Samotná N-terminální doména ovšem nedokázala způsobit odpuzení od membrány tyčinky. Tato funkce náleží C-terminální doméně fosducinu [6].

2.1.3.2. C-terminální doména

Jelikož má C-terminální doména záporný náboj, který připomíná záporný náboj membrány, navazuje se na G_{γ} podjednotku právě v místě, které kotví $G_{\beta\gamma}$ v membráně [6]. Tím C-terminální doména stéricky blokuje možnost interakce $G_{\beta\gamma}$ s membránou. Zároveň se záporné náboje C-terminální domény a membrány odpuzují, a tudíž je komplex přenášen do cytosolu, kde není možná jeho reasociace s G_{α} .

2.1.4. Posttranslační modifikace fosducinu

Jak již bylo zmíněno, fosducin se účastní regulace signálních drah kompeticí s G_{α} o vazbu s $G_{\beta\gamma}$. Tato vlastnost fosducinu je výrazně ovlivněna jeho fosforylačním

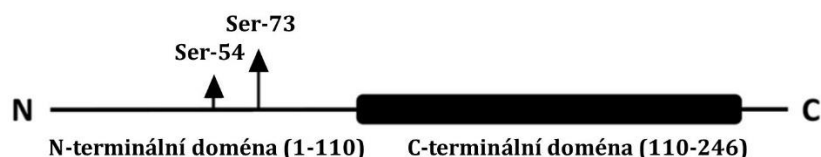
stavem [5]. Ten závisí na intenzitě světla, kterému byly sítnice, ze kterých byl fosducin izolován, vystaveny [2] (viz kap. 2.1.5.2.).

Ser-73 se nachází v N-terminální doméně fosducinu a je jedním z jeho dvou hlavních fosforylačních míst [14]. Toto místo je fosforylováno především cAMP-dependentní protein kinasou A [3]. Fosforylace touto kinasou brání fosducinu v jeho inhibiční funkci G-proteinů, jelikož pouze nefosforylovaný fosducin je schopný bránit reasociaci G_α s $G_{\beta\gamma}$. Interakce fosducinu s G_α však nebyla prokázána, na rozdíl od interakce s $G_{\beta\gamma}$. Fosforylace fosducinu pomocí PKA tedy narušuje jeho schopnost interakce s $G_{\beta\gamma}$ a umožňuje tak zpětnou reasociaci G_t [5].

Jelikož je fosducin fosforylován pomocí PKA, je jeho fosforylační stav také závislý na koncentraci cAMP, která je řízena adenylátcyklasou, jejíž aktivita je regulována Ca^{2+} a proteinem kalmodulinem. Tímto mechanismem může být tedy fosforylace fosducinu regulována koncentrací Ca^{2+} [19].

Vliv koncentrace Ca^{2+} je dále zprostředkován Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní protein kinasou II (CaMKII) [18]. Touto kinasou je fosducin velmi efektivně fosforylován, čímž je, stejně jako v případě PKA, inhibována vazba komplexu s $G_{\beta\gamma}$, a to dokonce se stonásobnou účinností než v případě PKA. CaMKII ovšem nefosforyluje fosducin pouze na Ser-73, ale také na Ser-54, což umožňuje navázání proteinu 14-3-3. Snížení koncentrace Ca^{2+} *in vivo* interakci těchto proteinů znemožnilo a koncentrace Ca^{2+} tedy má přímý dopad na fosforylační stav fosducinu.

Vysoká účinnost inhibice vazby fosducinu fosforylovaného CaMKII a $G_{\beta\gamma}$ je pravděpodobně způsobena fosforylací dalších serinových zbytků [18]. CaMKII je totiž *in vitro* schopna fosforylovat fosducin na Ser-6, Ser-36, Ser-54, Ser-73 a Ser-106. Fosforylace těchto míst má kumulativní efekt při inhibiční vazby komplexu, nejdůležitějšími místy jsou však Ser-54 a Ser-73. Fosforylace Ser-106 ovšem výrazně snižuje schopnost fosducinu uvolnit komplex z membrány.



Obr. 2.3. Schematické znázornění primární struktury fosducinu. Na obrázku jsou vyznačeny dvě nejdůležitější fosforylační místa fosducinu (Ser-54 a Ser-73), které se nachází v jeho N-terminální doméně.

Fosforylace však byla pozorována i v C-terminální doméně fosducinu [20]. Fosducin je zde fosforylován s G-proteiny spřaženou receptorovou kinasou 2 (GRK2). Tato modifikace také inhibuje schopnost fosducinu vázat $G_{\beta\gamma}$ a naznačuje tak možnou modulaci jeho aktivity.

Také bylo poukázáno na pravděpodobnou regulaci fosducinu fosfatasami [21]. Po fosforylaci fosducinu PKA byla totiž prokázána jeho defosforylace fosfatasou typu 1 (PP1) a typu 2A (PP2A).

Dále byla publikována studie, která naznačila možnou regulaci fosducinu prostřednictvím proteinu SUMO (small ubiquitin-related modifier) [22]. Podle této studie se SUMO váže na Lys-33 v N-terminální doméně fosducinu (mutace Lys-33 na Arg znemožnila modifikaci fosducinu proteinem SUMO). Stejně jako v případě fosforylace, navázání SUMO snížilo afinitu fosducinu k $G_{\beta\gamma}$. Dále bylo spekulováno, že tato modifikace také chrání fosducin před proteosomální degradací.

2.1.5. Fyziologické funkce fosducinu

2.1.5.1. Buněčná lokalizace

Fosducin je exprimován v buňkách oční sítnice (v tyčinkách i čípcích), kde se také nachází v nejvyšších koncentracích [23]. Zároveň je však exprimován v šišince, která má obdobný původ [4]. V nižších koncentracích se také vyskytuje v játrech, slezině, příčně pruhované svalovině a centrálním nervovém systému [24].

Zajímavá je také přítomnost fosducinu a $G_{\beta\gamma}$ v tyčinkách, v závislosti na osvětlení, kterému byly tyčinky vystaveny. Fosducin byl totiž nalezen v obou, vnějším i vnitřním segmentu tyčinek adaptovaných na tmu, ovšem pouze ve vnitřním segmentu tyčinek adaptovaných na světlo [25]. U $G_{\beta\gamma}$ tomu bylo obráceně. V tyčinkách adaptovaných na tmu byl přítomen pouze ve vnějším segmentu a po adaptaci na světlo v obou. Osvětlení tedy způsobuje přesun jak fosducinu, tak $G_{\beta\gamma}$ komplexu do cytosolu vnitřního segmentu tyčinek a je pravděpodobné, že za přesun $G_{\beta\gamma}$ komplexu je zodpovědný fosducin.

2.1.5.2. Funkce fosducinu v oční sítnici

V buňkách oční sítnice obratlovců je reakce na světlo zprostředkována G-proteinovou signální drahou [26]. Fotony jsou nejprve zachyceny rhodopsinem, což způsobí jeho izomeraci. Takto excitovaný rhodopsin dále aktivuje G-protein

transducin, a to katalyzou výměny vázaného GDP za GTP, což zapříčiní jeho rozpad na podjednotky G_α a $G_{\beta\gamma}$. Uvolněná G_α dále aktivuje enzym fosfodiesterasu, která hydrolyzuje cGMP. Snížení koncentrace cGMP vede k uzavření Na^+ a Ca^{2+} kanálů a následné hyperpolarizaci membrány, tedy vytvoření nervového signálu.

Přes veškeré informace o interakcích fosducinu s $G_{\beta\gamma}$, role fosducinu a závislosti jeho fosforylace na světle není stále vyřešena [23]. Díky značné koncentraci fosducinu v tyčinkách, jeho vazbě s $G_{\beta\gamma}$ a závislosti fosforylačního stavu na intenzitě světelného záření, začalo být zkoumáno možné zapojení fosducinu do přenosu světelného signálu [27]. Korelace mezi fosforylačním stavem fosducinu a množstvím světla, kterému byly tyčinky vystaveny, byla objevena již v roce 1984 [2]. Fosducin v tyčinkách je ve tmě fosforylován a při expozici světelnému záření dochází k jeho defosforylaci, čímž je umožněna jeho vazba s $G_{\beta\gamma}$ [5]. Tato vazba přetrvává až do opětovné fosforylace fosducinu [27]. Vychytávání $G_{\beta\gamma}$ nefosforylovaným fosducinem a přesun z vnější části tyčinek se zdá být hlavním mechanismem, kterým je fosducin zapojen do signální dráhy vidění.

Také bylo poukázáno na možnou rozdílnou funkci jednotlivých fosforylačních míst [23]. Fosducin fosforylovaný na Ser-54 byl přítomen především ve vnější části tyčinek, zatímco fosducin fosforylovaný na Ser-71 (pokusy byly provedeny na myších, jejichž fosducin byl o dvě aminokyseliny kratší) byl přítomen ve všech částech tyčinky. Slabé světlo spustilo rychlou reversibilní defosforylaci obou míst, zatímco silné světlo zapříčinilo fosforylaci Ser-71 ve vnější části tyčinky. Tyto výsledky podporují roli fosducinu v přenosu světelného signálu.

Objevena byla také spojitost fosducinu s degenerací buněk oční sítnice [28]. Při pokusech prováděných na myších s touto degenerací byla rovnováha mezi fosducinem fosforylovaným ve tmě a přítomností nefosforylovaného fosducinu ve světelné fázi narušena. Fosducin byl fosforylován pomocí CaMKII nezávisle na dávce světla.

Na druhou stranu, experimenty provedené na myších s vyřazeným genem pro fosducin neprokázaly změnu při adaptaci na světlo, ve srovnání s myšmi, u kterých gen vyřazen nebyl. Byla však prokázána signifikantně snížená senzitivita na světlo, která korelovala s nižší expresí $G_{\beta\gamma}$. Tyto výsledky poukazují spíše na účast fosducinu při expresi G-proteinů, než na jeho vliv při adaptaci na světlo [13].

2.1.5.3. Kardiovaskulární funkce

Hypertenze a její kardiovaskulární následky značnou měrou přispívají k celosvětové úmrtnosti, přesto je však u více než 90 % pacientů příčina vysokého tlaku neznámá a pacienti jsou diagnostikováni s tzv. primární hypertenzí [29]. Zvýšené riziko vzniku primární hypertenze je přitom často predikováno genetickými faktory. Objevují se stále nové důkazy o souvislosti mezi zvýšenou aktivitou sympatického nervového systému a vysokým tlakem pacientů, nicméně mechanismus tohoto vlivu je neznámý.

Kardiovaskulární funkce je modulována signálními molekulami, které aktivují GPRC, samotnými G-proteiny a také jejich regulátory [11]. Fosducin, který váže $\beta\gamma$ podjednotky G-proteinů by proto mohl ovlivňovat kardiovaskulární homeostázu.

U lidí byl prokázán vliv SNP (single nucleotide polymorphism) v genu pro fosducin na hladinu krevního tlaku [10]. Pacienti, kteří byli diagnostikováni s mutací v obou alelách, měli hladinu krevního tlaku vyšší v průměru o 12 až 15 mm Hg [11].

Fosducin byl také identifikován jako možná ochrana proti vzniku stresově závislé hypertenze [29]. Časté vystavení jedince stresovým situacím totiž často vede k zvýšené hladině krevního tlaku, které může vyústit až v primární hypertenzi. U myší, které postrádaly gen pro fosducin, byl zjištěn signifikantní nárůst vzniku stresově závislé hypertenze, způsobené zvýšenou činností sympatického systému.

Mechanismus, kterým fosducin ovlivňuje hladinu krevního tlaku, není přesně znám, nabízí se však několik možností [12]. Roli by mohla hrát prokázaná schopnost fosducinu vylučovat $\beta\gamma$ podjednotky G-proteinů, schopnost napomoci při skládání jiných proteinů, nebo také ovlivnění iontových kanálů.

2.2. Proteiny 14-3-3

2.2.1. Úvod

Proteiny 14-3-3 tvoří skupinu vysoce konzervovaných, 30kDa kyselých proteinů, které jsou exprimovány v širokém spektru organismů a tkání [30]. Své jméno získaly podle specifického pohybu na dvoudimensionální DEAE-celulosové chromatografii a elektroforéze provedené na škrobovém gelu.

Jedná se o dimerní proteiny, které modulují interakce mezi ostatními proteiny. Zapojeny jsou například do regulace buněčné signalizace a buněčného cyklu. Proteiny 14-3-3 interagují s mnoha dalšími proteiny, včetně transkripčních faktorů, biosyntetických enzymů, cytoskeletálních proteinů, signálních molekul a tumor supresorů [31].

První popsanou funkcí proteinů 14-3-3 je aktivace tyrosinových a tryptofanových hydroxylas, které nachází uplatnění při biosyntéze serotoninu a katecholaminu [30]. Následně byla prokázána jejich interakce s kinasami a fosfatasami a v dnešní době je již známo přes více než 200 interakčních partnerů proteinů 14-3-3. Některé z těchto interakčních partnerů jsou zapojeny do neurodegenerativních onemocnění, například Parkinsonovy [32] nebo Alzheimerovy choroby [33].

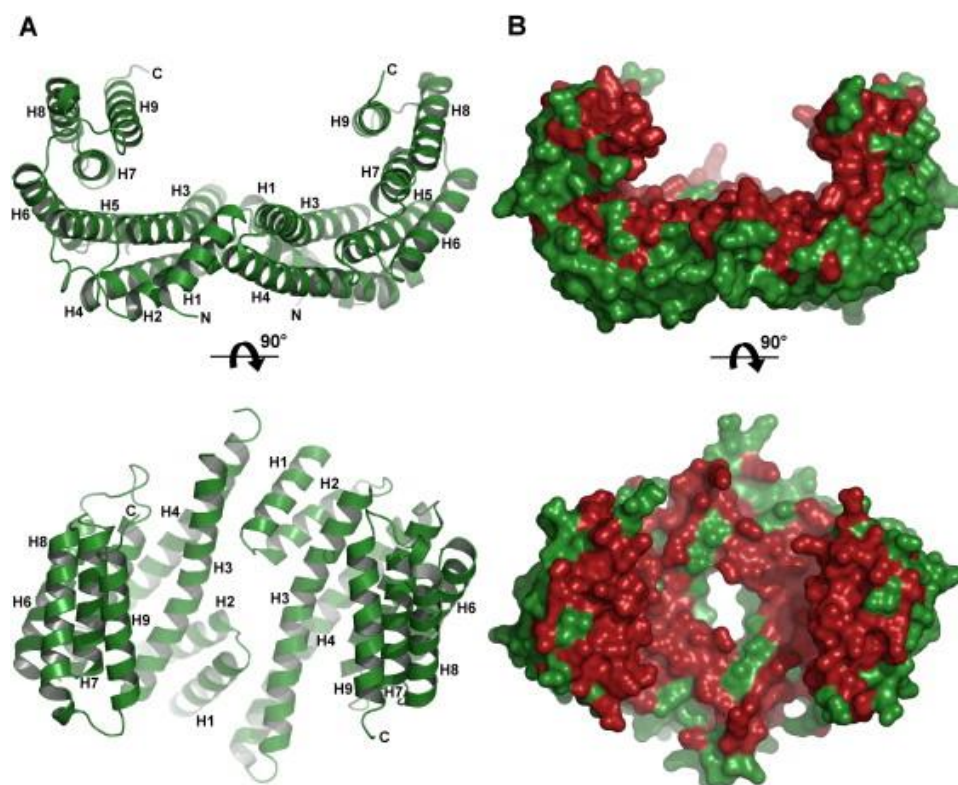
Důležitost proteinů 14-3-3 v přenosu buněčného signálu byla postulována kvůli jejich schopnosti vázat fosforylované seriny a threoniny přítomné ve strukturních motivech svých interakčních partnerů [34]. Proteiny 14-3-3 jsou však také schopny rozpoznávat i motivy nefosforylované.

Tyto proteiny se vyskytují v několika isoformách. U vyšších eukaryot se nachází 15 isoform proteinu 14-3-3, u savců bylo identifikováno isoform sedm (β , ϵ , η , γ , ζ , τ a σ) [34]. Přes svou strukturní podobnost (viz obr. 2.2.) se jednotlivé isoformy značně liší ve své schopnosti tvořit homo- a heterodimery.

2.2.2. Struktura

Jedná se o velmi helikální, dimerní proteiny [30]. Každý monomer je tvořen devíti antiparalelními α -helixy (H1-H9), přičemž všechny isoformy mohou tvořit homo- a heterodimery, s výjimkou σ isoformy, která vytváří pouze homodimery.

Dimerní molekula vytváří velký, záporně nabitý kanál [30]. V tomto kanálu se nachází vždy stejné zbytky aminokyselin u všech isoform. Rozdílné zbytky aminokyselin se totiž nachází především na povrchu těchto dimerů. Dá se tedy předpokládat, že zatímco tento kanál rozpoznává pouze určité znaky vazebných partnerů, povrch dimeru by mohl být zodpovědný za jejich velkou diversitu. Struktura celého dimeru je velmi rigidní, dokonce ani po navázání ligandu se téměř nezmění.



Obr. 2.2. Krytalová struktura proteinu 14-3-3 (isoforma ζ). (A) označuje stužkové a (B) povrchové znázornění proteinu 14-3-3 ζ . Červeně jsou znázorněny oblasti, které jsou shodné ve všech sedmi lidských isoformách proteinu 14-3-3 [34].

2.2.3. Vazebný motiv

Proteiny 14-3-3 byly první molekuly, u kterých bylo prokázáno, že specificky váží fosforylované aminokyseliny serin a threonin, čímž dokáží pozměnit funkce proteinů [30]. Tato vlastnost byla dále prozkoumána a byly nalezeny dva vazebné motivy, které jsou pro tuto vazbu nutné a jsou shodné ve všech isoformách proteinu 14-3-3. Jsou to $R[S/\phi][+]pSXP$ a $RX[\phi/S][+]pSXP$, kde pS označuje fosforylovaný serin, ϕ aromatickou aminokyselinu, $[+]$ bazickou aminokyselinu a X jakoukoli jinou aminokyselinu kromě cysteinu [35].

Pro schopnost proteinu 14-3-3 vázat a regulovat jejich vazebné partnery je nezbytné, aby byla utvořena rigidní struktura dímeru proteinu 14-3-3 a aby vazebný partner obsahoval více vazebných míst [34]. Tyto místa přitom musí být přítomny v nestrukturované části proteinu.

Mnoho vazebných partnerů proteinu 14-3-3 obsahuje dva a více vazebných motivů, které mohou být do vazby zapojené zároveň. U peptidů s dvěma fosforylovanými místy byly prokázány vyšší vazebné afinity, než u stejných peptidů s pouze jedním fosforylovaným místem. Z dalších pozorování bylo odvozeno, že jeden vazebný motiv je naprosto esenciální pro vytvoření vazby. Jedná se tedy o dominantní místo, tzv. „gatekeeper“. Pro správnou biologickou aktivitu je však nutná i vazba druhého místa, které se prokazuje nižší afinitou k proteinu 14-3-3 [34].

2.2.4. Mechanismus funkce proteinu 14-3-3

Mechanismus funkce proteinů 14-3-3 lze klasifikovat do několika kategorií [35]. Proteiny 14-3-3 jsou schopny přímo způsobit konformační změnu cílových proteinů, bránit interakci stíněním jejich specifických funkčních či strukturních oblastí, nebo přiblížit proteiny k sobě a umožnit tak jejich interakci.

2.3. Interakce proteinu 14-3-3 a fosducinu

Fosforylace fosducinu CaMKII vedla k narušení jeho schopnosti vázat $G_{\beta\gamma}$ [18]. Tato modifikace však také umožnila vazbu s proteinem 14-3-3. Vazba proteinu 14-3-3 s fosforylovaným fosducinem navíc snížila jeho schopnost inhibovat reasociaci G_t . Tím by mohl protein 14-3-3 přispívat k regulativní funkci fosducinu (v závislosti na jeho fosforylačním stavu). Tento inhibující efekt byl vysvětlen tím, že protein 14-3-3 interaguje s fosducinem v místě, které je důležité pro vazbu fosducinu s komplexem $G_{\beta\gamma}$ [36].

Pro vazbu fosforylovaného fosducinu s proteinem 14-3-3 je důležitá fosforylace obou serinových zbytků, Ser-54 a Ser-73, jelikož substituce jednoho či druhého z nich znemožnila schopnost vazby proteinu 14-3-3 s fosducinem [18]. Tato vazba je uskutečněna ve stechiometrickém poměru 1:2 s hodnotou disociační konstanty $K_D 3 \pm 5 \mu\text{M}$. [37]. V tomto komplexu se molekula fosducinu pravděpodobně nachází uvnitř centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3. Navázání proteinu 14-3-3 na fosducin znatelně ovlivnilo flexibilitu N-terminální domény fosducinu (kde se nachází obě fosforylační místa), nicméně dramatické uspořádání struktury nenastalo [36]. C-terminální doména fosducinu také pravděpodobně interaguje s dimerem proteinu 14-3-3. Tato interakce nastává na povrchu proteinu 14-3-3 a v oblasti vazebného místa $G_{\beta\gamma}$, což naznačuje mechanismus, kterým by mohl protein 14-3-3 inhibovat funkce fosducinu.

Další role proteinu 14-3-3 by mohla být ochrana fosforylovaného fosducinu od degradace a agregace [18]. Samotná N-terminální doména totiž pravděpodobně není příliš stabilní, přičemž fosforylace dále destabilizuje její strukturu, a proto by se mohla stát potenciálním cílem proteas. Vazba s proteinem 14-3-3 by mohla N-terminální doménu stabilizovat. Třetí role proteinu 14-3-3 může spočívat v lokalizaci fosducinu uvnitř fotoreceptoru.

3. Cíle práce

Hlavní cíle práce jsou:

- Připravit protein 14-3-3 ζ Δ C.
- Připravit fosducinu (mutant Q52K) fosforylovaný na Ser-54 a Ser-73.
- Prostudovat vliv vazby proteinu 14-3-3 ζ Δ C na rychlost defosforylace fosducinu.
- Prostudovat vliv vazby 14-3-3 ζ Δ C na limitovanou proteolýzu fosducinu.
- Potvrdit SUMOylaci fosducinu.
- Porovnat vazebné afinity peptidů obsahujících fosforylované motivy fosducinu k proteinu 14-3-3 ζ Δ C.

4. Metody a materiál

4.1. Použitý materiál

4.1.1. Chemikálie

1,4-dithiotreitol	Carl Roth GmbH (Německo)
2-thioethanol (β -merkapt ethanol)	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
agar	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
ampicilin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
azid sodný	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Lachema (Česká republika)
dyhydrogenfosforečnan draselný	Lachema (Česká republika)
EDTA	Carl Roth GmbH (Německo)
glycerol	Lachema (Česká republika)
glycin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
HEPES - Natrium salz	Carl Roth GmbH (Německo)
hydroxid sodný	Lach-ner (Česká republika)
chlorid hořečnatý	Lach-ner (Česká republika)
chlorid sodný	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
imidazol	Carl Roth GmbH (Německo)
IPTG	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
kyselina chlorovodíková	PENTA (Česká republika)
kyselina octová	Lach-ner (Česká republika)
LB Agar High Salt	Ducheta Biochemie (Nizozemsko)
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH (Německo)
methanol	Lach-ner (Česká republika)
NP40	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH (Německo)

SDS	Carl Roth GmbH (Německo)
SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
síran nikelnatý	PENTA (Česká republika)
TEMED	Carl Roth GmbH (Německo)
TRIS	Carl Roth GmbH (Německo)
Tween 20	Carl Roth GmbH (Německo)

4.1.2. Přístroje

3505 pH Meter	Nova Capital (Velká Británie)
Centrifuge 5804	Eppendorf AG (Německo)
Centrifuge 5415D	Eppendorf AG (Německo)
FPLC	Watres (Česká republika)
inkubátor	MELAG Medizintechnik (Německo)
NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (USA)
Photon Counting Spectrophotometer PC1	ISS (USA)
Shaking incubator NB-205	N-BIOTEK (Korejská republika)
Sigma 8K Floorstanding Refrigerated Centrifuge	SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Německo)
Sonicator 3000	Misonix (USA)
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies (USA)
třepačka litrových LB médií Multitron	Infors AG (Švýcarsko)
vortex ZX3	VELP Scientifica (Itálie)

4.1.3. Ostatní materiál

Blue protein Ladder	CE Biosystems (Česká republika)
Anti-PDC (HPA 028432)	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling (USA)
dialyzační membrána - MCO 14000	Carl Roth GmbH (Německo)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Stratagene (USA)

filtry Spartan 13/0,45 RC	GE Healthcare (USA)
koncentrátory Amicon Ultra (MCO 10000)	EMD Millipore (USA)
křemenná kyveta	Agilent Technologies (USA)
lysozym	New England BioLabs (USA)
náplně do kolon	Amersham Biosciences (USA)
PKA	Promega (USA)
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories (USA)
SUMOylation Kit	Eno Life Sciences (USA)
vektor pET-15b	Invitrogen (USA)

4.2. Exprese a purifikace proteinů

4.2.1. Plasmid

Pro expresi proteinů byly použity vektory pET-15b, do kterých byly vneseny geny pro protein 14-3-3 ζ Δ C a PdQ52K. V molekule fosducinu byl zmutován Gln-52 za lysin pro umožnění fosforylace Ser-54 i Ser-73 *in vitro* pomocí PKA.

Vektor pET-15b nese geny rezistence vůči antibiotiku ampicilinu. Zároveň umožňuje expresi žádaného proteinu jako fúzního proteinu s tzv. His-tag což je motiv šesti histidinových zbytků na N-konci proteinu, který umožňuje purifikaci tohoto proteinu niklovou chelatační chromatografií.

Příprava expresních konstruktů proteinu 14-3-3 ζ Δ C a fosducinu (Q52K) včetně jejich mutantů již byla dříve provedena ostatními členy laboratoře.

4.2.2. Bakteriální expresní systém

Pro expresi proteinů byly využity kompetentní buňky bakterií *Escherichia coli* (*E. Coli*) kmene BL21(DE3). Tyto kmeny bakterií mohou být uchovávány dlouhou dobu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a jsou vhodné pro efektivní expresi proteinů [38]. Jejich genom obsahuje gen pro T7 RNA polymerasu, který je pod kontrolou *lacUV5* promotoru. Po přidavku isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosidu (IPTG) dochází k jeho vazbě na *lacUV5* promotor, čímž je umožněna exprese T7 RNA polymerasy. Tato polymerasa

rozeznává pouze T7 promotor, který je přítomen v genu expresního vektoru, v mém případě pET-15b, umístěný před rekombinantním proteinem. T7 polymerasa je velmi účinná a žádaný protein může tvořit až 50 % všech bakteriálních proteinů.

4.2.3. Transformace bakterií

Transformace bakterií byla provedena metodou teplotního šoku. 50 μl roztoku kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) bylo nejprve inkubováno v ledové lázni s 0,7 μl plasmidové DNA (cDNA PdQ52K/14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$, vektor pET-15b) po dobu 20 min. Roztok byl následně ponořen na 45 s do vodní lázně o teplotě 42 °C a poté na 2 min vložen do ledové lázně. K roztoku bylo dále pipetováno 400 μl LB média a směs byla inkubována 1 h při 37 °C. 200 μl tohoto roztoku bylo sterilně nanášeno na Petriho misku s LB médiem o koncentraci ampicilinu 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Miska byla umístěna do inkubátoru a inkubace bakterií probíhala přes noc při 37 °C.

4.2.4. Kultivace bakterií a indukce exprese proteinů

Po transformaci byla jedna kolonie bakterií sterilně přenesena kličkou do 5 ml tekutého LB média s koncentrací ampicilinu 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a kultivována přes noc při 210 rpm a 37 °C. V případě přípravy těchto roztoků z glycerolových stoků bylo vždy do 5 ml LB média pipetováno 10 μl roztoku bakterií. Kultivované roztoky byly druhý den přelity do Erlenmeyerových bání s obsahem 0,9 l LB média, ve kterých bakterie rostly až do optické hustoty 0,7 (měřené při vlnové délce 600 nm).

Následovalo snížení teploty na 25°C a indukce exprese proteinů přidáním 0,9 ml 0,5M roztoku IPTG. Baňky byly ponechány při 25 °C a 210 rpm po dobu 20 h a poté byly buňky bakterií odstředěny (kap. 4.2.5.).

Příprava LB média

K přípravě bylo využito komerční LB médium. Výsledný roztok obsahuje 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ tryptonu, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kvasničného extraktu a 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Po úpravě pH na hodnotu 7,4 byl roztok sterilizován v autoklávu. Nakonec bylo k 0,9 l roztoku pipetováno 0,9 ml ampicilinu o koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Příprava LB agarových misek

Použit byl komerční LB Agar High Salt, přičemž 40 g bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu. Po sterilizaci a ochlazení na 51 °C byl přidán 1 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg·ml⁻¹. Takto připravený roztok byl rozlit do Petriho misek (přibližně 15 ml na 1 misku).

Skladování bakterií

Bakterie na Petriho miskách byly krátkodobě uchovávány při teplotě 4 °C. Při dlouhodobém skladování byly bakterie narostlé v LB médiu smíchány se sterilním glycerolem do výsledné koncentrace 30 % (v/v) a skladovány při -80 °C.

4.2.5. Preparativní centrifugace

Preparativní centrifugace je často využívanou metodou, která slouží k oddělení biologických složek kapalného média [39]. Princip centrifugace spočívá v zrychlení sedimentační rychlosti jednotlivých složek pomocí odstředivé síly. Rozdílná sedimentační rychlost složek roztoku závisí především na jejich hustotě a tento rozdíl následně vede k jejich oddělení v systému, nejčastěji na dvě části, kapalnou (supernatant) a pevnou (peleta).

Preparativní centrifugace byla využita nejprve po kultivaci bakterií (kap. 4.2.4.) pro jejich separaci od kapalných složek. Prováděna byla 20 min při 3400 rpm a 4 °C. Preparativní centrifugace byla dále využita pro přípravu rozpustné frakce po sonikaci buněk (kap. 4.2.6.). Centrifugace byla provedena při 13400 rpm, 4 °C po dobu 40 min, čímž byl roztok proteinu oddělen od zbytků rozbitých bakterií.

4.2.6. Sonikace

Sonikace je běžnou metodou pro rozrušení suspenze bakterií [39]. Sonikační sonda je vnořena do suspenze, kde generuje ultrazvukové vlny. Vzniklé vlny rozrušují buňky bakterií vytvořením třecí síly a kavitace. Ultrazvukové vlny jsou v roztoku schopny způsobit lokální podtlak a vytvořit zde dutiny, které po vymizení podtlaku implodují a vytváří tak rázové vlny, jež mají destruktivní účinky pro buňky bakterií. Tyto jevy však generují značné množství tepla a proto je sonikovanou směs neustále chladit.

Před sonikací byla peleta, získaná z 0,9 l bakteriální kultury, resuspendována ve 25 ml lyzačního pufru. Následně byl do suspenze přidán lysozym (finální koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a směs byla za konstantního míchání inkubována 30 min při 4 °C. Lysozym štěpí peptidoglykan, který vytváří buněčnou stěnu bakterií. Způsobí tedy rozklad buněčné stěny bakterií, čímž usnadní rozrušení celých buněk.

Sonikace byla prováděna 10 min po 3 s intervalech s 17 s odmlkami. Dále byla směs promíchána 15 min při 4 °C, po čemž následovala další sonikace s obdobnými parametry. Kádinka byla po celou dobu sonikace umístěna v ledové lázni.

Pro získání roztoku proteinu a jeho oddělení od zbytků bakteriální kultury byla směs odstředěna (kap. 4.2.5.).

Složení lyzačního pufru

1×	PBS
1M	NaCl
4mM	β -merkaptoethanol
2mM	imidazol
0,05%	NP40 (nebylo použito v případě proteinu 14-3-3)

Složení 10× PBS

1,36M	NaCl
27mM	KCl
50mM	Na_2HPO_4
18mM	KH_2PO_4

4.2.7. Dialýza

Jedná se o proces, při kterém rozpuštěné látky putují přes polopropustnou membránu z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku s nižší koncentrací až do ustavení rovnovážné koncentrace. Jelikož využívané membrány umožňují průchod nízkomolekulárních látek a zároveň zadržovat látky o větší molekulové váze, je dialýza využívána k separaci látek o různé velikosti. O možnosti průchodu látek rozhoduje velikost pórů v membráně, kterou popisuje hodnota MCO (molecular weight cut-off). Vhodnou volbou MCO je umožněno efektivní převedení proteinu do vhodného prostředí a zbavení se nízkomolekulárních nečistot.

Pro dialýzu byla použita umělá membrána s MCO 14000. Tedy membrána nepropouštějící molekuly o relativní molekulové hmotnosti 14000 nebo větší.

Složení dialyzačních pufřů

- *Eluční pufr po niklové chelatační chromatografii (kap. 4.2.8.1.)*
 - 20mM NaCl
 - 50mM Tris-HCl (pH 8)
 - 2mM EDTA
 - 5mM DTT

- *Eluční pufr po gelové permeační chromatografii (kap. 4.2.8.3.)*
 - 50mM Tris-HCl (pH 8)
 - 1mM EDTA
 - 5mM DTT
 - 150mM NaCl
 - 10% glycerol

- *Pufr po fosforylaci fosducinu (kap. 4.5.)*
 - 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 1mM EDTA
 - 5mM DTT
 - 150m NaCl
 - 10% glycerol

- *Pufr pro defosforylaci pomocí PP1 (kap. 4.7.)*
 - 50mM HEPES
 - 10mM NaCl
 - 2mM DTT
 - 1,5mM MnCl₂
 - 0,01% NP40

- *Pufr pro defosforylaci pomocí PP2A (kap. 4.7.)*
 - 40mM TRIS-HCL (pH 8,4)
 - 100mM NaCl
 - 2mM DTT
 - 34 mM MgCl₂

4.2.8. Chromatografie

Podstatou chromatografického procesu je rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární, na základě rozdílného efektivního distribučního koeficientu [39]. Látky, které interagují se stacionární fází silněji jsou zpomalovány a eluovány později než látky, jejichž interakce se stacionární fází jsou slabší.

Chromatografické metody jsou nejčastěji využívány pro kvantitativní a kvalitativní analýzy, nicméně jejich uplatnění v biochemii spočívá především v izolaci čistých látek, kdy mluvíme o tzv. preparativních metodách.

4.2.8.1. Niklová chelatační chromatografie

Jedná se o formu afinitní chromatografie. Na rozdíl od většiny ostatních metod se afinitní chromatografie nespolehá pouze na rozdíly ve fyzikálních vlastnostech látek [39]. Namísto toho využívá specifických, reversibilních interakcí. Teoreticky je tato metoda schopna absolutní purifikace látek i z komplexních směsí. Na povrch nosiče musí být tedy navázán specifický ligand pro adsorpci purifikované látky. Při průtoku mobilní fáze následně dochází k interakci ligandu s purifikovanou látkou, která je zachytávána a následně může být eluována.

V případě niklové chelatační chromatografie tvoří stacionární fází Ni^{2+} , které jsou imobilizovány na sepharosové matici. Ni^{2+} reagují s volnými elektronovými páry imidazolové skupiny histidinu a vytváří tak dostatečně silnou koordinační vazbu, která postačuje k zachycení proteinu. Vlivem této interakce tato metoda efektivně adsorbuje fúzní proteiny obsahující His-tag. Protein je poté eluován pufrům s vysokou koncentrací imidazolu, který se navazuje namísto histidinových zbytků.

Příprava stacionární fáze a adsorpce proteinu

Pro afinitní chromatografii byla použita kolona obsahující 4 ml chelatuující sepharosové matrice (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla nejdříve promyta (viz níže), čímž došlo k navázání Ni^{2+} iontů. Tato matrice byla poté přenesena do roztoku proteinu získaného sonikací bakterií (kap. 4.2.6.), se kterým byla v ledové lázni promíchávána 30 min, přičemž došlo k navázání proteinu.

- *Promytí kolony*
 - 10 ml deionizované vody
 - 10 ml Strip solution (50 mM EDTA; 0,5 M NaCl)
 - 15 ml deionizované vody
 - 50 ml 0,1M NiSO₄
 - 10 ml deionizované vody
 - 10 ml vazebného pufru

Promývání stacionární fáze a eluce proteinu

Vzniklá suspenze byla poté promývána puftrem, čímž byly vymyty nespecificky vázané proteiny. Suspenze byla nejprve centrifugována v 50ml zkumavkách (3000 rpm, 1 min), následně byl odlit supernatant a peleta byla resuspendována promývacím puftrem. Tento proces byl opakován až do spotřeby 400 ml pufru. Poté byla suspenze sepharosy s navázaným proteinem aplikována na kolonu a protein byl eluován 20 ml elučního pufru. Celý proces byl prováděn za neustálého chlazení, aby se zamezilo degradaci proteinů. Frakce byly jímány do připravených mikrozkuvek. Přítomnost a čistota proteinu v jednotlivých frakcích byl určen pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3.).

Složení pufrů

- *Vazebný pufr:*

1x	PBS
0,5M	NaCl
1mM	imidazol
2mM	β-merkaptoethanol
0,05%	NP40 (nebylo použito v případě proteinu 14-3-3)

- *Eluční pufr:*

1x	PBS
0,5M	NaCl
0,6M	imidazol
2mM	β-merkaptoethanol
0,05%	NP40 (nebylo použito v případě proteinu 14-3-3)

- *Promývací pufr:*

1x	PBS
0,5M	NaCl
0,06M	imidazol
2mM	β-merkaptoethanol
0,05%	NP40 (nebylo použito v případě proteinu 14-3-3)

4.2.8.2. Iontově-výměnná chromatografie

Separační mechanismus této chromatografické metody spočívá v rozdílné elektrostatické interakci ionizovaných molekul se stacionární fází. Ionty jsou elektrostaticky vázány k pevnému nosiči a reversibilně vyměňují ionty z roztoku. Rovnováhu výměny ovlivňují koncentrace, velikost a náboje iontů, relativní permitivita prostředí, disociační konstanta ionogenních skupin měniče iontů a tedy i pH roztoku.

Při purifikaci proteinů 14-3-3 ζ AC a PdQ52K bylo využito metody aniontově-výměnné chromatografie, kdy jsou na kladně nabitou stacionární fází adsorbovány anionty. Z tohoto důvodu je nutné, aby celkový náboj proteinů měl zápornou hodnotu, čehož je dosaženo jejich dialýzou do pufru o pH 8.

Kolona Tricorn 5/50 s náplní Q-sepharosy (kvarterní amoniová sůl) byla nejprve promyta filtrovanou deionizovanou vodou a dále elučním pufrém. Eluční pufr obsahuje značnou koncentraci NaCl, silně tedy zvyšuje iontovou sílu roztoku, čímž vymývá možné nečistoty, které by mohly být zachyceny na koloně. Tímto pufrém byla kolona promývána 10 min při průtoku 1,5 ml·min⁻¹. Kolona byla dále promyta 2% roztokem elučního pufru (98% vazebného pufru) a to do chvíle, kdy bylo dosaženo konstantní hodnoty vodivosti roztoku.

Po ustálení vodivosti roztoku byl protein nanášen na kolonu při průtokové rychlosti 1,5 ml·min⁻¹. Při této iontové síle a pH jsou pouze některé proteiny adsorbovány na matici kolony, čímž je roztok přečišťován. Následně byl nastaven 10% roztok elučního pufru. Tím dochází k eluci molekul s nízkou afinitou ke stacionární fází. Eluce proteinů byla provedena lineárním vzrůstem iontové síly a to zvyšováním koncentrace elučního pufru v mobilní fází.

Kolona byla připojena k přístroji FPLC (Watrex, Česká republika) a data byla analyzována pomocí programu Clarity. Eluát byl jímán do mikrozkušavek o objemu 1 ml. Přítomnost a čistota proteinů v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3.).

Složení pufrů

– *Vazebný pufr:*

50mM Tris-HCl (pH 8)
5mM DTT

– *Eluční pufr:*

50mM Tris-HCl (pH 8)
5mM DTT
1M NaCl

4.2.8.3. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC z anglického gel permeation chromatography, nebo také SEC z size exclusion chromatography) je metoda, při které se molekuly dělí na základě své velikosti a tvaru a to díky různým vlastnostem využívaných porézních materiálů [39].

Hlavní princip separačního mechanismu GPC je založen na možnosti různě velkých molekul procházet póry kopolymerů. Stacionární fáze je totiž tvořena mikročásticemi kopolymerů, které obsahují póry o definované velikosti [39]. Stacionární fáze je v rovnováze s mobilní fází, která obsahuje analyt. Velké molekuly se díky svým rozměrům nedostávají do pórů kopolymerů, nýbrž jsou unášeny mobilní fází mezi jednotlivými částicemi kopolymeru. Naopak malé molekuly pronikají do těchto pórů mnohem snadněji, tudíž jsou zadržovány a následně eluovány s větším retenčním časem, než objemné molekuly.

Pro gelovou chromatografii byla použita kolona Superdex™ 75, 20/60 (Amersham Biosciences, Švédsko), která byla připojena k přístroji FPLC (Watrex, Česká republika) a data byla analyzována pomocí programu Clarity.

Pro odstranění nečistot byla nejdříve promyta 20% roztokem ethanolu v deionizované vodě. Dále byla kolona promyta elučním pufrům a to do chvíle, než došlo k ustálení hodnoty konduktivity. Promývání kolony bylo prováděno průtokovou rychlostí 2,5 ml·min⁻¹.

Následuje nanášení roztoku proteinu do dávkovací smyčky. Tento roztok je nejprve koncentrován na objem menší než 2 ml, neboť takový je objem dávkovací smyčky. Poté je roztok nanesen na kolonu.

Jednotlivé frakce byly sbírány do 1,5 ml mikrozkušavek a eluce byla ukončena v okamžiku vyloučení veškerého proteinu. Gelová permeační chromatografie byla prováděna za pokojové teploty. Přítomnost proteinu a jeho čistota v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3.).

Složení elučního pufru

10% glycerol
20mM Tris-HCl (pH 7,5)
1mM EDTA
5mM DTT
150mM NaCl

4.2.9. Koncentrování roztoků proteinů

Jelikož dochází při purifikačních procesech a během dialýzy k naředění roztoku proteinů, je nutné pro zvýšení účinnosti purifikace tento roztok koncentrovat.

Ke koncentrování se používají koncentrátoři. Jedná se o zkumavky, které mají na dně umístěnou ultracentrifugační membránu, která je propustná pro molekuly s nižší relativní molekulovou hmotností, než je hodnota MCO. Tato zkumavka je vložena do sběrné zkumavky, do které je jímán roztok, který během odstředování protéká membránou.

Byly použity koncentrátoři s MCO 10000. Centrifugace byla prováděna při 4 °C, 3000 rpm po dobu nutnou k získání požadovaného objemu.

4.3. SDS-PAGE

Jedná se o typ elektromigrační metody, při kterých je k dělení látek využíváno elektrického pole. Ionizované částice se vlivem elektrického pole pohybují k opačnému pólu rychlostí přímo úměrnou velikosti jejich náboje a nepřímo úměrnou jejich velikosti. SDS-PAGE je elektroforéza prováděná na polyakrylamidovém gelu (PAGE) v prostředí dodecylsírany sodného (SDS).

SDS je aniontový detergent, který se na proteiny váže v konstantním poměru. Způsobuje jejich denaturaci a udává jim jednotný záporný náboj, který překrývá vlastní, přirozený náboj proteinu. Za takovýchto podmínek mají všechny proteiny obdobnou elektroforetickou pohyblivost, jelikož velikost přiděleného náboje je následně přímo úměrná velikosti proteinu.

Elektroforéza prováděná v polyakrylamidovém gelu dále dělí částice na základě jejich hydrodynamického objemu. Vlákničitá struktura polyakrylamidu vytváří síť hůře prostupnou pro velké molekuly. Menší molekuly se neseťkávají s velkým odporem, a proto putují rychleji, než molekuly větší.

SDS-PAGE lze tedy využít k rozdělení proteinů podle jejich molekulových hmotností. Při použití standardu můžeme touto metodou potvrdit přítomnost a čistotu žádaných proteinů.

Metody bylo využito po chromatografických metodách (kap. 4.2.8.) pro ověření přítomnosti a odhadnutí čistoty proteinů. Na základě SDS-PAGE byly vždy vybrány nejvhodnější frakce, které byly následně sloučeny a koncentrovány.

SDS-PAGE bylo také využito při metodách limitované proteolýzy (kap. 4.6.), defosforylace (kap. 4.7.) a SUMOylace (kap. 4.8.).

Příprava vzorků

Z frakcí získaných předešlou chromatografickou metodou bylo 8 μ l roztoku proteinu pipetováno do označených mikrozkušavek a smícháno s 2 μ l pufru pro přípravu vzorků. Roztok byl promíchán a 3 minuty povařen při 100 °C, čímž byla zajištěna denaturace proteinů.

Následovalo nanesení standardu molekulových hmotností Blue Protein Ladder (Central european Biosystems, ČR) a připravených vzorků na polyakrylamidový gel. Není-li uvedeno jinak, byla elektroforéza prováděna za konstantního napětí 200 V.

Vizualizace proteinů

Proteiny přítomné v gelu byly vizualizovány roztokem Coomassie Brilliant Blue R 250. V tomto roztoku byly nejprve ponechány 15 min při teplotě 70 °C, přičemž došlo k navázání barviva na proteiny. Následné odbarvení gelu bylo provedeno jeho ponecháním přes noc v odbarvovacím roztoku.

Příprava gelů, pufrů a roztoků použitých při SDS-PAGE

– Separační polyakrylamidový gel (15%)

1,8 ml	deionizovaná H ₂ O
3,75 ml	Rotiporese Gel 30
1,9 ml	pufr pro separační gel
45 μ l	10% persulfát amonný
5 μ l	TEMED

– Zaváděcí gel (4%):

2,25 ml	deionizovaná H ₂ O
0,5 ml	Rotiporese Gel 30
1 ml	pufr pro zaváděcí gel
45 μ l	10% persulfát amonný
5 μ l	TEMED

- *Pufř pro separační gel:*
 - 75 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
 - 4 ml 10% SDS
 - 21 ml deionizovaná voda

- *Pufř pro zavádějící gel:*
 - 50 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8)
 - 4 ml 10% SDS
 - 46 ml deionizovaná voda

- *Pufř pro přípravu vzorků (5x koncentrovány):*
 - 0,6 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8)
 - 5 ml 50% glycerol
 - 2 ml 10% SDS
 - 0,5 ml β -merkaproethanol
 - 1 ml 10% bromfenolová modř
 - 0,9 ml destilovaná H₂O

- *Pufř pro elektroforézu:*
 - 50mM Tris-HCl (pH 8,3)
 - 385mM glycin
 - 0,1% SDS

- *Barvicí roztok:*
 - 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250
 - 450 ml methanol
 - 100 ml kyselina octová
 - 450 ml destilovaná voda

- *Odbarvovací roztok:*
 - 100 ml methanol
 - 100 ml kyselina octová
 - 800 ml destilovaná voda

4.4. Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byly určeny měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Jako referenční vzorek byl použit čistý pufr, ve kterém byly proteiny rozpuštěny. Koncentrace proteinů c byla počítána podle Lambertova-Beerova zákona

$$A = cl\varepsilon \quad (4.1.)$$

kde A je absorbance, l délka optické dráhy a ε je molární absorpční koeficient, který byl pro jednotlivé proteiny určen na základě jejich primární struktury pomocí nástroje ProtParam.

4.5. Fosforylace fosducinu

Pro vytvoření komplexu proteinu 14-3-3 ζ AC s fosducinem, je nutná fosforylace fosducinu a to na Ser-54 a Ser-73 [37]. Fosfátová skupina PO_4^{3-} je reversibilně, kovalentní vazbou navázána na molekulu proteinu. Zdrojem fosfátové skupiny je přítom molekula ATP a reakce je katalyzována kinasami

Fosforylace těchto serinových zbytků byla prokázána PKA (Ser-73)[9] a CaMKII (mimo jiné i Ser-54) [18]. Při fosforylaci byl ovšem použit mutant fosducinu PdQ52K. Mutace Q52K totiž zpřístupňuje Ser-54 pro PKA a je tedy možné fosforylovat *in vitro* oba serinové zbytky pouze pomocí katalytické domény PKA (se specifickou aktivitou 127,6 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Pro správnou činnost kinasy je potřeba, aby byl v pufru také přítomen donor fosfátové skupiny (ATP) a zároveň Mg^{2+} (MgCl_2).

PdQ52K byl nejprve fosforylován 2 hodiny při 30 °C v pufru po gelové chromatografii (kap. 4.2.8.3.) a přítomnosti 0,75mM ATP, 15mM MgCl_2 a koncentraci PKA, aby výsledná aktivita činila přibližně 130 U na 1 mg PdQ52K. Následně byl k roztoku proteinu přidán roztok ATP (konečná koncentrace ATP byla 1mM). V tomto roztoku probíhala fosforylace PdQ52K 12 hodin při 6 °C.

Následně je potřeba roztok fosducinu zbavit přebytku ATP, což bylo provedeno dialýzou přes noc (kap. 4.2.7).

4.6. Limitovaná proteolýza

Metoda limitované proteolýzy je založena na štěpení peptidových vazeb v molekule proteinu specifickými enzymy – proteasami [40]. Výrazný přebytek studovaného proteinu je nejprve vystaven působení specifické proteasy (trypsin, chymotrypsin). Z probíhající reakce jsou poté v určitých časových intervalech odebírány alikvótní podíly, ve kterých je probíhající proteolýza zastavena, a štěpy jsou následně analyzovány.

Metody bylo využito ke studiu protektivních vlastností, které by mohla vazba fosducinu s proteinem 14-3-3 poskytnout.

K roztoku PdQ52K o 20 μ M koncentraci byl pipetován roztok chymotrypsinu v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 6×10^{-8} M. V případě trypsinu měla výsledná koncentrace hodnotu $1,5 \times 10^{-9}$ M. Pokud byly pokusy prováděny v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ Δ C, jeho koncentrace byla 40 μ M. Alikvótní podíly z reakce byly odebrány v časech 0, 1, 3, 5 min a reakce byla ihned zastavena promícháním s pufrům pro přípravu vzorků SDS-PAGE (kap. 4.3.) a povařením po dobu 5 min.

Výsledné vzorky byly nanесeny na 15% polyakrylamidový gel pro SDS-PAGE. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 90 min. Následně byl gel obarven a odbarven zmíněnými roztoky (kap. 4.3.).

4.7. Defosforylace

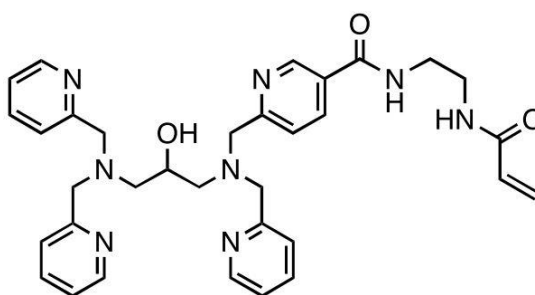
Metoda limitované defosforylace je v jistém smyslu obdobou limitované proteolýzy. Také jsou při této metodě z probíhající reakce odebírány alikvótní podíly, v nichž je následně reakce terminována, nicméně na rozdíl od štěpení peptidových vazeb, při defosforylaci dochází k odštěpení PO_4^{3-} . K této reakci jsou také využívány enzymy – fosfatasy. Defosforylace fosducinu byla pozorována u dvou fosfat: PP1 a PP2A [21].

Hlavním motivem pro tyto experimenty bylo zjistit, jaká fosforylační místa jsou zmíněnými fosfatasy defosforylována a zda vazba proteinu 14-3-3 s fosforylovaným fosducinem ovlivňuje rychlost, jakou je protein defosforylován.

Roztoky proteinů byly nejprve dialyzovány do příslušných pufrů, ideálních pro PP1 a PP2A (kap. 4.2.7.). Pro reakce byly připraveny roztoky s koncentrací fosforylovaného

PdQ52K 20 μM . Byl-li přítomen protein 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$, jeho koncentrace byla 40 μM . Vzorky a roztoky fosfatas byly nejprve vytemperovány, a to na teplotu 30 °C v případě PPI a 37 °C v případě PP2A. Dále byla zahájena reakce pipetováním příslušné fosfatasy a z reakce byly odebrány alikvótní podíly v 0, 0.5, 1, 3 a 7 min. Reakce byla vždy ihned zastavena smícháním s vzorkovacím pufrům pro SDS-PAGE (kap. 4.3.) s 100mM koncentrací inhibitoru fosfatas β -glycerofosfátem.

Získané vzorky byly analyzovány metodou SDS-PAGE za použití polyakrylamidových gelů s obsahem Phos-tagTM.



Obr. 4.1. Vzorec molekuly Phos-tagTM[41].

Jsou-li na molekulu Phos-tagTM navázány 2 Mn^{2+} ionty, je tato molekula schopna specificky vázat fosfátové zbytky [42]. V případě přidání této látky do polyakrylamidového gelu, mohou být následně metodou SDS-PAGE analyzovány různé fosforylované proteiny, popřípadě stupně jejich fosforylace, nebo přístupnost fosfátové skupiny k okolnímu prostředí. Jejich navázané fosfátové zbytky budou totiž molekulami Phos-tagTM vázány a tudíž zadržovány.

V mém případě byly použity 12% polyakrylamidové gely (kap. 4.3.) s koncentrací Phos-tagTM 75 μM a koncentrací MnCl_2 150 μM .

Jako standard byly připraveny 2 mutantní proteiny PdQ52K, které mají fosforylován pouze Ser-54 nebo Ser-73. Tyto proteiny mi byly poskytnuty Mgr. Miroslavou Kacířovou.

4.8. SUMOylace

Zkratka SUMO vychází z anglického small ubiquitin-related modifier. Jedná se tedy o malou molekulu proteinu, který je příbuzný ubiquitinu [43]. Obdobný je také

konjugační mechanismus, kterým je molekula SUMO navázána na cílový protein. Ten spočívá v kaskádové enzymatické reakci. Na rozdíl od ubiquitinylace však připojení SUMO nekončí degradací proteinů. Namísto toho je tato modifikace důležitá například pro utváření mimo-jaderných komplexů nebo kontrolu stability proteinu.

Pro SUMOylační reakce byl využit komerční kit (Enzo Life Sciences, Spojené státy americké) a postupováno bylo podle návodu v něm obsaženém.

Reakce probíhala v objemu 20 μ L. Do každé mikrozkušavky byl pipetován komerční pufr, roztok Mg^{2+} a ATP. Následně byly přidány enzymy E1 a E2. Dále byl pipetován roztok PdQ52K tak, aby finální koncentrace byla 400nM a nakonec byl pipetován roztok SUMO-1. Reakce byla inkubována po dobu 60 min při 37 °C a následně zastavena přidáním vzorkového pufru pro SDS-PAGE a povařením po dobu 3 min ve vroucí lázni.

Dále byly vzorky nanесeny na 12% polyakrylamidový gel a proteiny separovány při napětí 198 V po dobu přibližně 1 h. Gel byl následně ponořen do pufru pro western blot. Dále byla na gel přiložena nitroceluloseová membrána a vše bylo uzavřeno do cely. Přenos proteinů na membránu probíhal při 200 A po dobu 45 min.

Nespecifická vazebná místa membrány byla blokována 3% BSA v TBST po dobu jedné hodiny. Navázání primárních protilátek proti SUMO-1 probíhalo přes noc při 6°C. Následně byla membrána 3×10 min omývána 3% BSA v TBST a dále 1 h inkubována se sekundární protilátkou.

Membrána byla poté 1 min vystavena chemiluminescenčnímu činidlu a luminescence byla zachycena na fotografický film.

Složení pufrů

– *Pufr pro western blot*

25mM	Tris
190mM	glycin
20%	methanol

– *TBST (Tris-buffered saline with Tween 20)*

20 mM	Tris, pH 7,5
150mM	NaCl
0,1%	Tween 20

4.9. Fluorescenční měření

4.9.1.1. Fluorescence

Fluorescence je proces vyzáření energie ve formě elektromagnetického záření, při přechodu elektronu z excitovaného singletového stavu do stavu základního, přičemž dochází k emisi fotonu, jejíž rychlost se pohybuje okolo 10^{-8} s. [44].

Po absorpci světelné energie dochází nejčastěji k excitaci do některé z vyšších vibračních hladin prvního, či druhého singletového stavu [44]. Během 10^{-12} s dochází k vnitřní konverzi, přechodu do nejnižší vibrační hladiny S_1 . Následně nastává přechod do základního stavu, ovšem do některé z vyšších vibračních hladin. Střední čas mezi excitací a návratem do základního stavu se nazývá střední doba života excitovaného stavu a jeho hodnota se pohybuje okolo 10 ns. Výsledkem těchto procesů je často snížení energie emise oproti absorpci a prodloužení vlnové délky záření. Tento fenomén se nazývá Stokesův posun.

Látky, které mají schopnost fluorescence, se nazývají fluorofory. Typickým příkladem jsou aromatické molekuly, například chinin, fluorescein nebo pyridin.

4.9.1.2. Anizotropie fluorescence

Anizotropie fluorescence je jev, při kterém je intenzita fluorescence různá pod různými úhly polarizace. V homogenním roztoku budou fluorofory náhodně orientovány [44]. Po vystavení polarizovanému světlu budou excitovány primárně ty fluorofory, jejichž dipólové momenty jsou orientovány paralelně s rovinou elektrického vektoru polarizovaného excitačního záření. Tím pádem je emise světla excitovaných molekul polarizována.

Míru polarizace této fluorescence popisuje veličina anizotropie fluorescence r , definovaná vztahem

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4.2.)$$

kde I_{\parallel} je intenzita fluorescence orientované paralelně a I_{\perp} kolmo k rovině polarizace excitačního záření.

Pro počáteční hodnotu anizotropie fluorescence platí vztah

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (4.3.)$$

ve kterém faktor $\frac{2}{5}$ vyjadřuje snížení anizotropie vlivem fotoselekce a β je úhel, který svírají absorpční a emisní transitní dipólové momenty fluoroforu. Z tohoto vztahu vyplývá, že hodnota počáteční anizotropie fluorescence může nabývat maximální hodnoty 0,4. Anizotropie fluorescence je však ovlivněna depolarizačními efekty.

Depolarizace fluorescence nastává několika procesy [44]. V kapalném vzorku se jedná především o rotační difúzi molekul, která závisí na viskozitě rozpouštědla, velikosti a tvaru rotující molekuly. V případě malých fluoroforů rozpuštěných v rozpouštědlech o nízké viskozitě, je rotační difúze často rychlejší než rychlost emise. Výsledná emise je proto depolarizována a anizotropie se blíží k nule.

Právě závislost anizotropie fluorescence na rotačním pohybu fluoroforu umožňuje využití této metody při studiu biomolekul [44]. Rotační difúze biomolekul je totiž často srovnatelná s dobou dohasínání excitovaného stavu fluoroforů. Například protein o hmotnosti 25 kDa může mít rotační korelační čas okolo 10 ns, což je srovnatelná hodnota s dobou života excitovaných stavů mnoha fluoroforů.

4.9.1.3. Měření excitačních a emisních spekter

Emisní a excitační spektra byly vždy proměřeny před a po titraci roztoku peptidů proteinem 14-3-3 ζ ΔC.

Emisní spektra byla měřena od 500 nm do 650 nm s krokem po 1 nm. Šíře štěrbin byla nastavena na 3 nm za excitačním monochromátorem a 1 nm za emisním monochromátorem. Při měření excitačních spekter byla šířka štěrbin nastavena obráceně a spektrum bylo proměřeno od 250 nm do 500 nm.

4.9.1.4. Měření anizotropie fluorescence

Při měření anizotropie fluorescence byly studovány roztoky jednotlivých peptidů o 100nM koncentracích v objemu 300 μ l. Tyto peptidy mají na sobě navázány molekulu fluoresceinu, a proto byla vlnová délka excitačního záření nastavena na hodnotu 490 nm a vlnová délka záření emisního byla sledována při 520 nm. Štěrbin byly nastaveny na

hodnotu 4 nm a integrační čas na hodnotu 5 s, aby intenzita fluorescence měřené pod magickým úhlem dosahovala hodnoty přibližně 6×10^5 CPS.

Roztoky peptidů byly titrovány 10 μ l přidavky proteinu 14-3-3 ζ Δ C o koncentraci 741 μ M. Měření byla 3 \times zopakována a výsledky byly vyneseny do grafů (obr. 5.20. a 5.21.).

Složení pufru, při kterém byla měřena anizotropie fluorescence

20mM Tris-HCl (pH 7,5)

1mM EDTA

5mM DTT

150mM NaCl

5. Výsledky

5.1. Exprese a purifikace proteinů

14-3-3 ζ Δ C a PdQ52K

Pro měření byly purifikovány proteiny PdQ52K a 14-3-3 ζ Δ C. V této práci je dokumentován pouze jeden purifikační proces pro každý protein. Purifikace byly provedeny vícekrát, ovšem stejným postupem a s obdobnými výsledky.

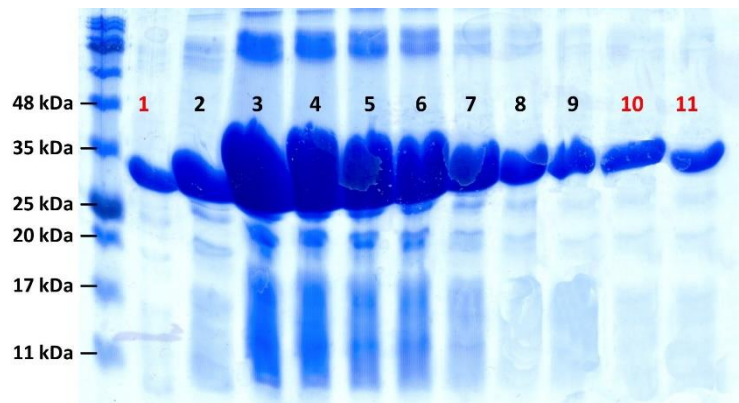
Chromatogramy z gelové permeační chromatografie (obr. 5.7. a 5.9.) a SDS-PAGE gely (obr. 5.8. a 5.10.) příslušných frakcí ukazují, že bylo dosaženo velmi dobré čistoty připravených proteinů. Celkové výtěžky přípravy obou proteinů byly dostačující (~20 mg 14-3-3 ζ Δ C z 2,7 litrů bakteriální kultury, ~10 mg fosducinu z 2,7 litrů bakteriální kultury).

5.1.1. Exprese

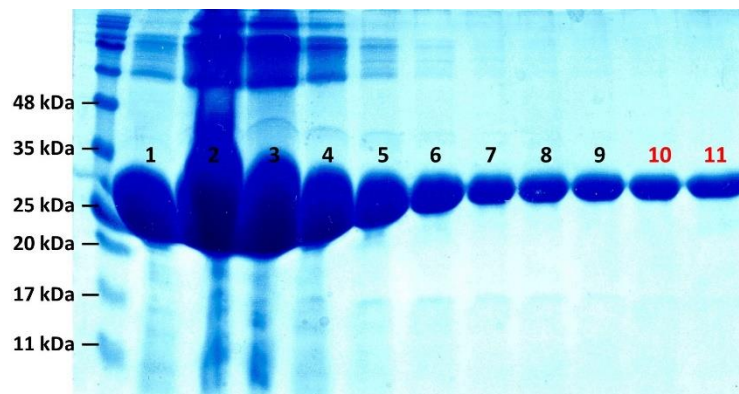
Plasmidová DNA proteinu PdQ52K a proteinu 14-3-3 ζ Δ C byla nejprve vnesena do kompetentních buněk bakterií *E. coli* BL21DE3 (kap. 4.2.3.). Dále byly oba proteiny inkubovány ve 3 Erlenmayerových báních s obsahem 0,9 l LB média (kapitola 4.2.4.). Roztoky buněčné kultury byly odstředěny (kapitola 4.2.5.) a pelety resuspendovány lyzačním pufrem. Získané roztoky byly sonikovány a odstředěny pro získání roztoku proteinu (kapitola 4.2.6.). Následně byla provedena purifikace chromatografickými metodami (kap. 4.2.8.).

5.1.2. Niklová chelatační chromatografie

Chromatografická metoda umožněná přítomností His-tag v molekule proteinu (kap. 4.2.8.1.). Eluováno bylo celkem 11 frakcí o objemu 1,5 ml. Z každé z nich byly odebrány vzorky, které byly spolu se standardem molekulových hmotností analyzovány SDS-PAGE (kap. 4.3.). Na základě vizualizovaného gelu byly vybrány frakce, které byly podrobeny dalším purifikačním krokům.



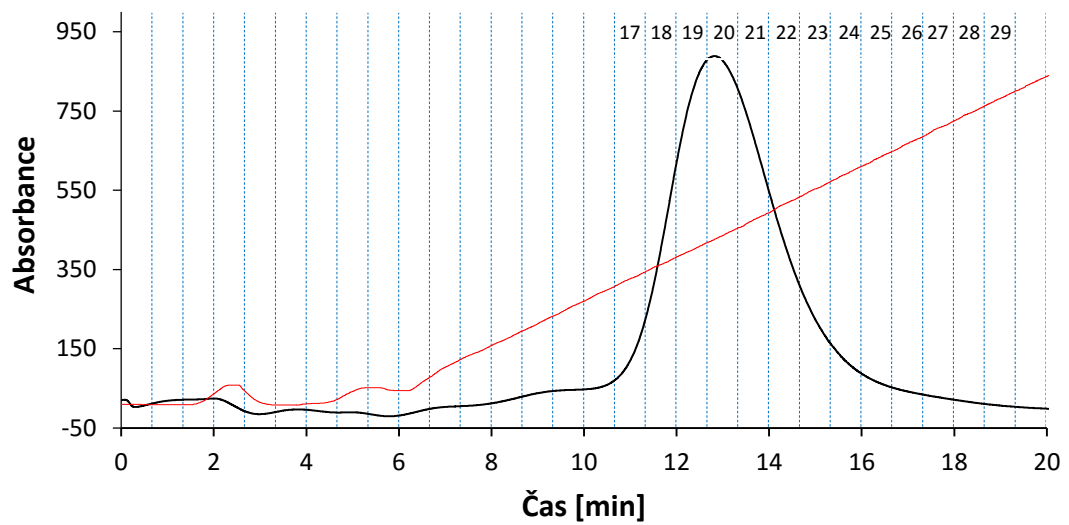
Obr. 5.1. Vizualizovaný 12% polyakrylamidový gel SDS-PAGE frakcí eluovaných při niklové chelatační chromatografii PdQ52K. Přítomnost žádaného proteinu je potvrzena jeho putováním v oblasti kolem 33 kDa. Černě jsou značeny frakce, které byly sloučeny a podrobeny dalším purifikačním krokům.



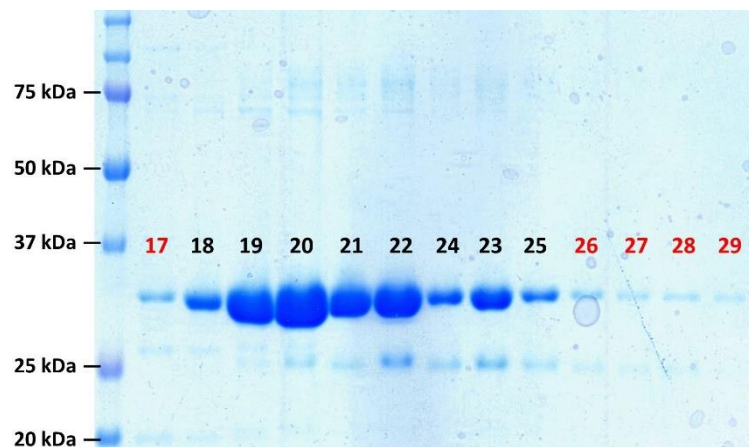
Obr. 5.2. Vizualizovaný 12% polyakrylamidový gel SDS-PAGE frakcí eluovaných při niklové chelatační chromatografii proteinu 14-3-3ζAC. Přítomnost žádaného proteinu je potvrzena jeho putováním v oblasti kolem 25 kDa. Černě jsou značeny frakce, které byly sloučeny a podrobeny dalším purifikačním krokům.

5.1.3. Aniontově výměnná chromatografie

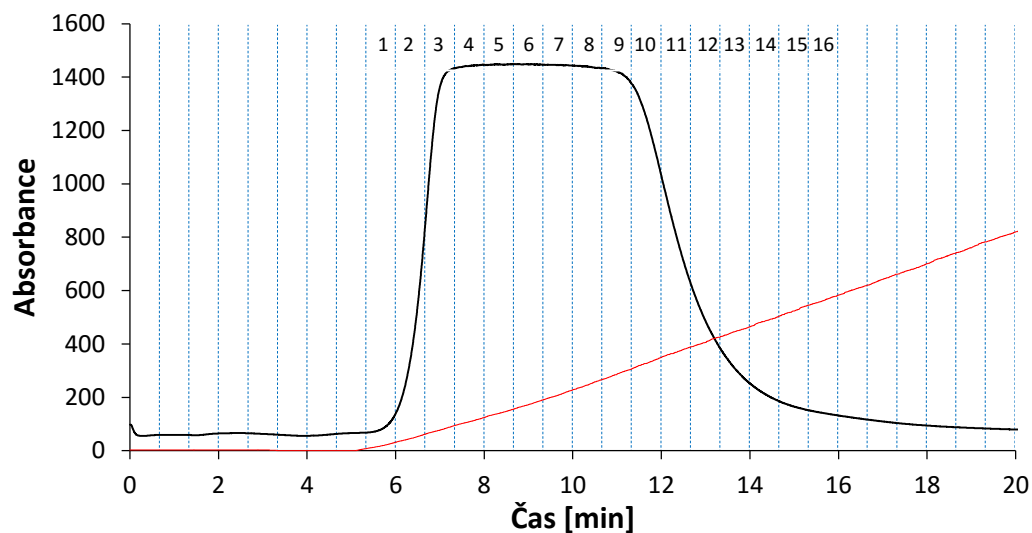
Sloučené frakce po niklové chelatační chromatografii byly dialyzovány (kap. 4.2.7.) a následně podrobeny aniontově výměnné chromatografii (kap. 4.2.8.2.). Roztok proteinu byl nanesen na kolonu s obsahem Q-Sepharosy a poté eluován se získáním frakcí o objemu 1 ml. Čistota proteinu byla porovnána vizualizací gelu SDS-PAGE (kap. 4.3.) a je patrné, že došlo k výraznému zlepšení.



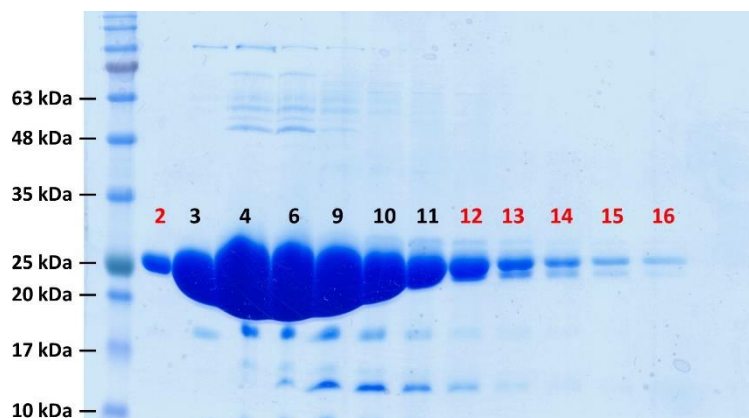
Obr. 5.3. Chromatogram získaný aniontově výměnnou chromatografií PdQ52K. Černě je značena absorbance při 280 nm, červeně konduktivita roztoku (popisující gradient iontové síly) a modře rozdělení eluátu do jednotlivých frakcí.



Obr. 5.4. Vizualizovaný 12% polyakrylamidový gel SDS-PAGE frakcí získaných při aniontově výměnné chromatografii PdQ52K, který se pohybuje v oblasti okolo 33 kDa. Z gelu je patrné zlepšení čistoty proteinu. Černě jsou značeny frakce, které byly sloučeny a podrobeny dalším purifikačním krokům.



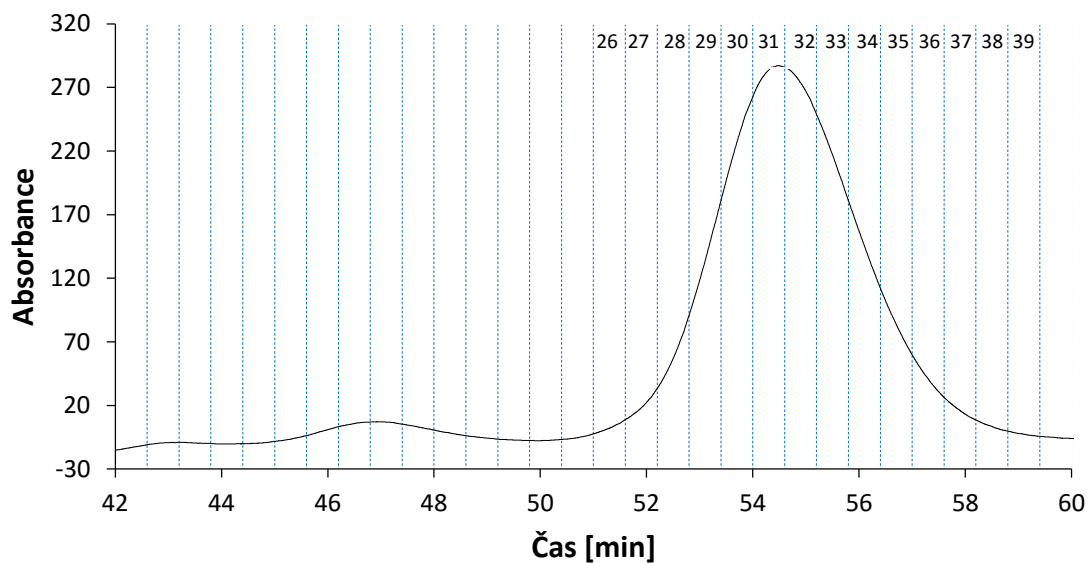
Obr. 5.5. Chromatogram získaný aniontově výměnnou chromatografií proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Černě je značena absorbance při 280 nm, červeně konduktivita roztoku (popisující gradient iontové síly) a modře rozdělení eluátu do jednotlivých frakcí.



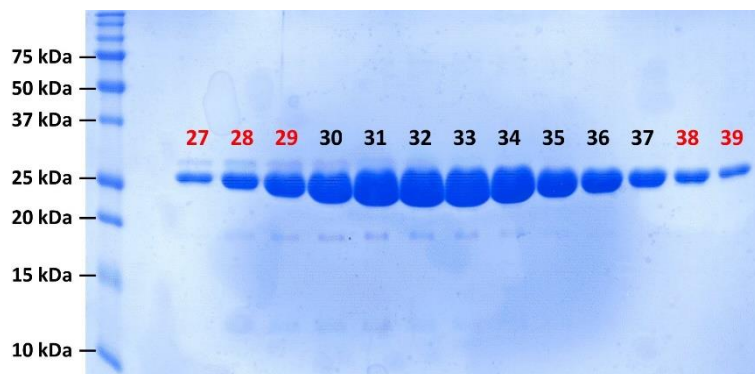
Obr. 5.6. Vizualizovaný 12% polyakrylamidový gel SDS-PAGE frakcí získaných při aniontově výměnné chromatografii proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, který se pohybuje v oblasti okolo 25 kDa. Z gelu je patrné zlepšení čistoty proteinu. Černě jsou značeny frakce, které byly sloučeny a podrobeny dalším purifikačním krokům.

5.1.4. Gelová permeační chromatografie

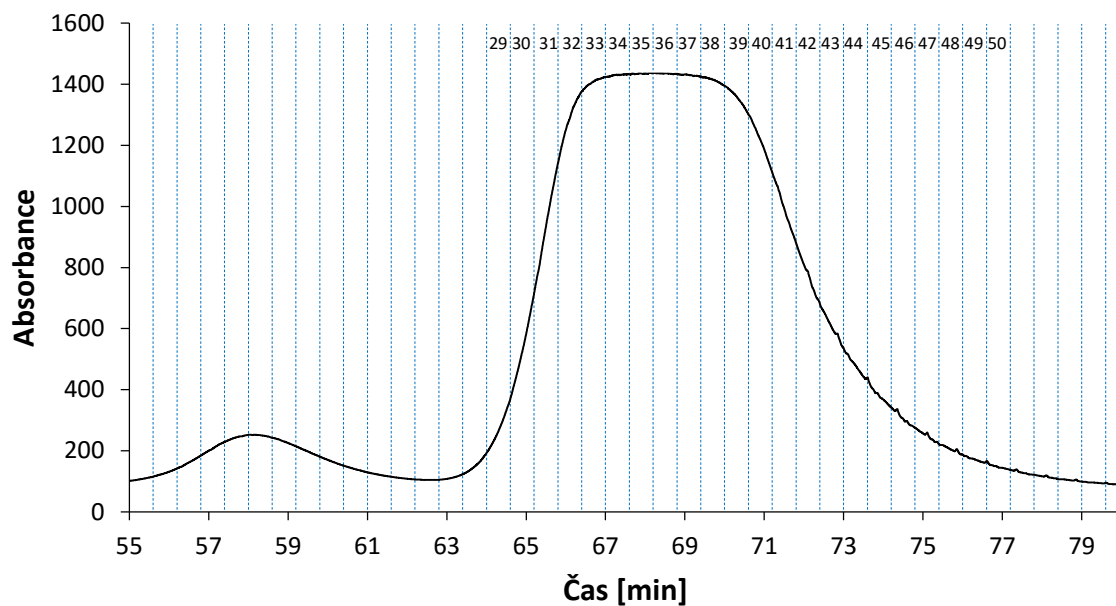
Sloučené frakce byly koncentrovány (kap 4.2.9.) na objem dávkovací smyčky, tedy 2 ml a aplikovány na kolonu HL Superdex 26/60 (kap 5.2.8.3.). Eluovány byly frakce o objemu 1,5 ml. Na základě chromatogramu byly vybrány vzorky pro SDS-PAGE. Nejčistší frakce byly sloučeny a koncentrovány.



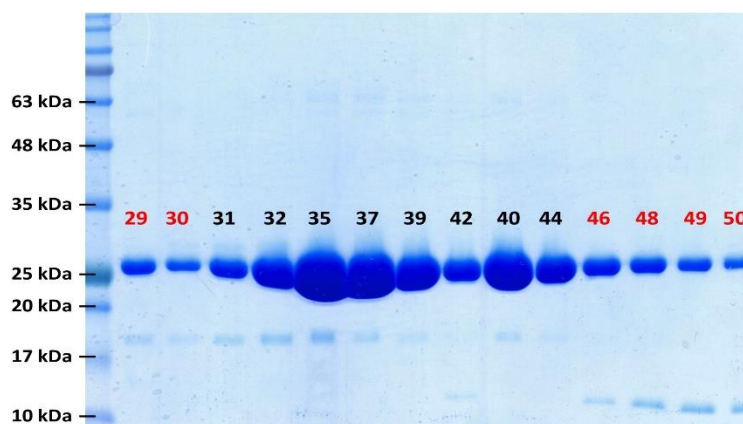
Obr. 5.7. Chromatogram získaný gelovou permeační chromatografií PdQ52K. Černě je značena závislost absorbance při 280 nm na čase a modře rozdělení eluátu do jednotlivých frakcí.



Obr. 5.8. Vizualizovaný 12% polyakrylamidový gel SDS-PAGE frakcí získaných při gelové permeační chromatografii PdQ52K, který se pohybuje v oblasti okolo 33 kDa. Z gelu je patrná výborná čistota proteinu. Černě jsou značeny frakce, které byly sloučeny a použity pro různá měření.



Obr. 5.9. Chromatogram získaný gelovou permeační chromatografií proteinu 14-3-3 ζ Δ C. Černě je značena závislost absorbance při 280 nm na čase a modře rozdělení do jednotlivých frakcí.



Obr. 5.10. Vizualizovaný 12% polyakrylamidový gel SDS-PAGE frakcí získaných při gelové permeační chromatografii proteinu 14-3-3 ζ Δ C, který se pohybuje v oblasti okolo 25 kDa. Z gelu je patrná vysoká čistota proteinu. Černě jsou značeny frakce, které byly sloučeny a použity pro měření.

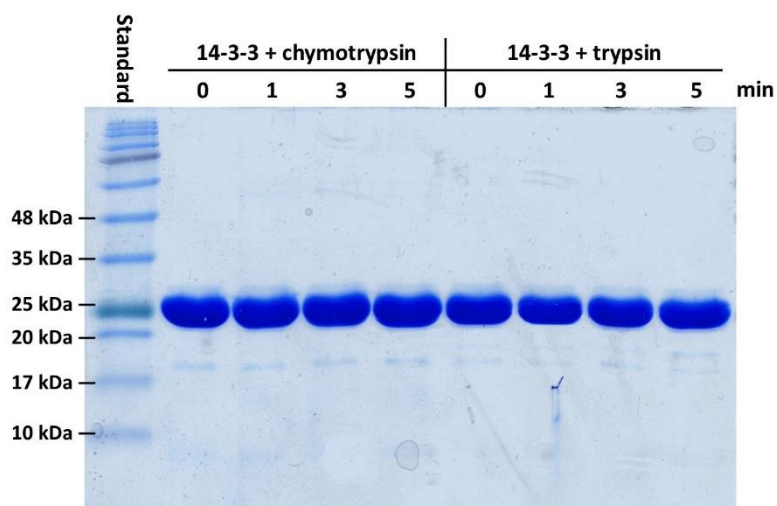
5.2. Studium posttranslačních modifikací fosducinu

Vazba fosducinu a proteinu 14-3-3 úplně inhibuje schopnost fosducinu vázat $G_{\beta\gamma}$. Mimo to by však tvorba tohoto komplexu mohla mít další funkce [18]. Jedná se především o možnou ochranu proti defosforylaci fosfatasami a také proteolytické degradaci. N-terminální doména fosducinu je značně nestrukturovaná a proto snadno přístupná cytosolickým proteasám. Pokud vazba proteinu 14-3-3 N-terminální doménu stabilizuje, pak by mohla poskytnout fosducinu určitý stupeň ochrany.

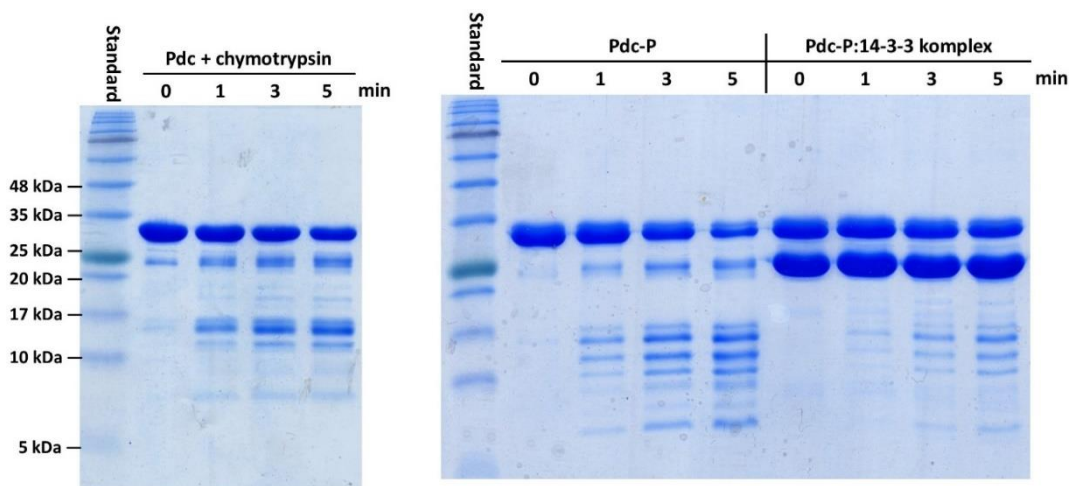
5.2.1. Limitovaná proteolýza PdQ52K v nepřítomnosti a přítomnosti proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C

Limitovaná proteolýza (kap. 4.6.) byla použita ke sledování vlivu fosforylace a vazby proteinu 14-3-3 na rychlost proteolytické degradace. Koncentrace proteinů v použitých vzorcích byly vždy 20 μ M pro PdQ52K a 40 μ M pro 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Byly použity proteasy trypsin a chymotrypsin, které na proteiny působily po dobu 0, 1, 3 a 5 min. Koncentrace proteas byla optimalizována tak, aby během inkubace došlo pouze k částečné degradaci PdQ52K. Aktivita proteas byla zastavena denaturací vzorkovacím pufrem a rychlým povařením vzorku. Vzorky byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

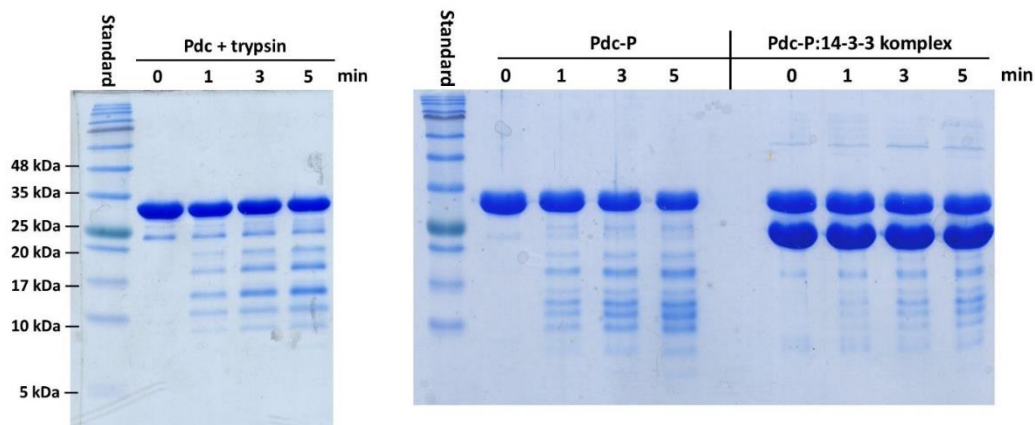
Nejprve byl sledován účinek proteas na protein 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Ten v podmínkách experimentu nebyl vůbec štěpen, což poukazuje na mnohem větší stabilitu v porovnání s PdQ52K. Dále byla porovnáno štěpení nefosforylovaného PdQ52K. Pro obě proteasy bylo pozorováno značné štěpení proteinu. Nakonec byla porovnána účinnost proteas na fosforylovaném PdQ52K v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.



Obr. 5.11. Vizualizovaný 15% polyakrylamidový gel SDS-PAGE po limitované proteolýze. Z gelu je patrný nevelký účinek chymotrypsinu a trypsinu na protein 14-3-3 ζ Δ C. Štěpy proteinu 14-3-3 ζ Δ C tedy nebudou interferovat při dalších měřeních.



Obr. 5.12. Vizualizovaný 15% polyakrylamidový gel SDS-PAGE po limitované proteolýze při použití chymotrypsinu. Na levém gelu je chymotrypsinem degradován pouze nefosforylovaný fosducin (Pdc), vpravo je účinku chymotrypsinu vystaven fosducin fosforylovaný (Pdc-P) samotný a v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Lze pozorovat zvýšenou míru degradace v případě Pdc-P oproti Pdc, která je však potlačena vytvořením komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Štěpy jsou méně výrazné a v 5. min je přítomno více Pdc-P.



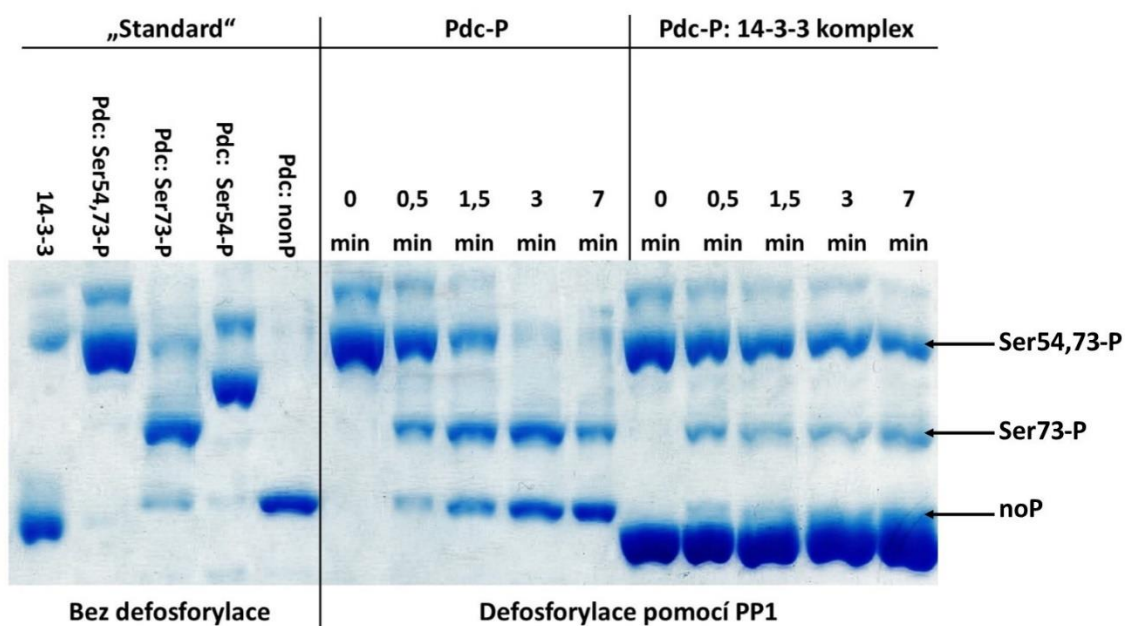
Obr. 5.13. Vizualizovaný 15% polyakrylamidový gel SDS-PAGE po limitované proteolýze při použití trypsinu. Na levém gelu je trypsinem degradován pouze nefosforylovaný fosducin (Pdc), vpravo je účinku trypsinu vystaven fosducin fosforylovaný (Pdc-P) samotný a v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Lze pozorovat zvýšenou míru degradace v případě Pdc-P oproti Pdc, jelikož vznikají štěpy nižších molekulových hmotností. Degradace je však potlačena vytvořením komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Štěpy jsou méně výrazné a v 5. min je přítomno více Pdc-P.

Výsledky ukazují zpomalení degradace fosducinu v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ Δ C. Je tedy zcela možné, že vazba proteinu 14-3-3 by mohla chránit fosforylovaný fosducin (zejména N-terminální doménu) před degradací intracelulárními proteasami.

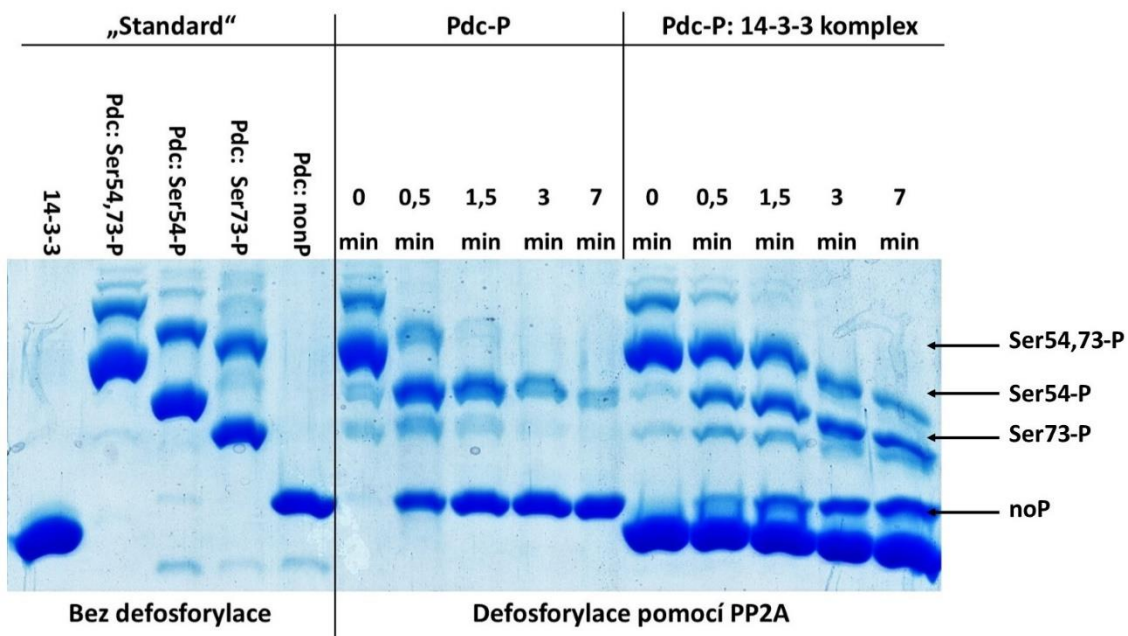
5.2.2. Limitovaná defosforylace PdQ52K pomocí PP1, PP2A a vliv vazby proteinu 14-3-3 ζ Δ C

Metodou limitované defosforylace (kap. 4.7.) byl zkoumán efekt vazby PdQ52K a proteinu 14-3-3 ζ Δ C při působení fosfatasy. Obě fosforylovaná místa Ser-54 a Ser-73 se nachází v nestrukturované N-terminální doméně fosducinu. Jelikož protein 14-3-3 váže právě N-terminální doménu, předpokládá se protekční efekt této interakce na defosforylaci fosducinu.

Fosforylovaný PdQ52K (Pdc-P) o 20 μ M koncentraci byl vystaven působení PP1 a PP2A po dobu 0, 0.5, 1.5, 3 a 7 min. Stejně tak tomu bylo v přítomnosti 40 μ M proteinu 14-3-3 ζ Δ C. Reakce byla zastavena přidáním β -glycerolfosfátu a povařením. Získané vzorky byly naneseny na polyakrylamidový gel s obsahem 75 μ M Phos-tagTM. Spolu se vzorky byly na gel naneseny proteiny poskytnuté Mgr. Miroslavou Kacířovou, Pdc-wt (fosforylovaný pouze Ser-73) a PdQ52KS73A (fosforylovaný pouze Ser-54), které slouží jako standardy.



Obr. 5.14. 12% polyakrylamidový gel s obsahem 75 μ M Phos-tagTM, na který byly naneseny vzorky získané metodou limitované defosforylace za použití PP1. Na gelu pozorujeme zpomalení míry defosforylace, pokud je fosforylovaný PdQ52K (Pdc-P) v komplexu s 14-3-3 ζ AC. Dále je patrné, že PP1 primárně defosforyluje Ser-54, jelikož není při defosforylaci na gelu pozorován. (Ser54,73-P značí fosforylaci fosducinu na těchto zbytcích, nonP je fosducin nefosforylovaný).

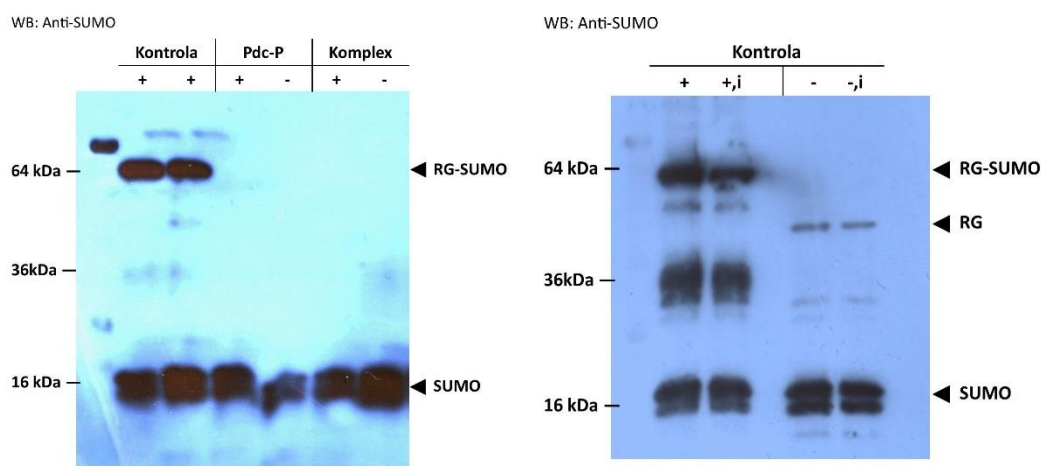


Obr. 5.15. 12% polyakrylamidový gel s obsahem 75 μ M Phos-tagTM, na který byly naneseny vzorky získané metodou limitované defosforylace za použití PP2A. Na gelu pozorujeme zpomalení míry defosforylace, pokud je fosforylovaný PdQ52K (Pdc-P) v komplexu s 14-3-3 ζ AC. Dále je patrné, že PP2A primárně defosforyluje Ser-73, Ser-54 je defosforylován v menší míře. (Ser54,73-P značí fosforylaci fosducinu na těchto zbytcích, nonP je fosducin nefosforylovaný).

Výsledky ukazují signifikantní snížení rychlosti defosforylace v případě vazby proteinu 14-3-3 ζ AC při působení fosfatasy na fosforylovaný PdQ52K. Tyto výsledky tedy přispívají k hypotéze protektivní funkce proteinu 14-3-3 ζ AC v tomto komplexu. Dále bylo zjištěno rozdílné působení fosfatasy PP1 a PP2A. PP1 rychleji defosforyluje Ser-54, zatímco PP2A Ser-73. Obě fosfatasy jsou však schopny defosforylace obou aminokyselinových zbytků.

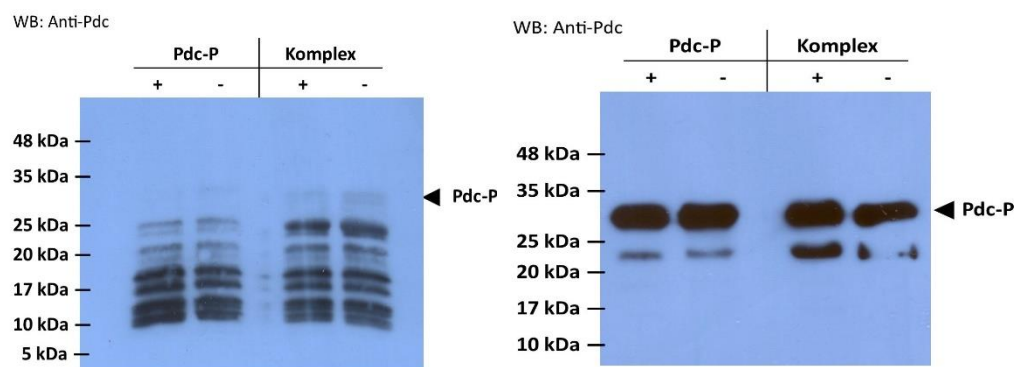
5.2.3. SUMOylace fosducinu

C. Klenk et al. poukázali na schopnost SUMO-1 navázat se na fosducin a to jak *in vivo*, tak *in vitro* [22]. Pro ověření této SUMOylace a možného vlivu proteinu 14-3-3 byl použit kit pro *in vitro* reakci (Enzo Life Sciences, Spojené státy americké), který byl použit podle postupu popsaném v kapitole 4.8.



Obr. 5.16. Fotografické filmy ukazující výsledky SUMOylace. Kontrola účinnosti kitu byla provedena SUMOylací proteinu RanGAP (RG). Byly provedeny pozitivní (+) a negativní (-) kontroly. Při vizualizaci byly použity protilátky proti SUMO. Na levém filmu jsou také výsledky SUMOylace fosforylovaného PdQ52K (Pdc-P) samotného i v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ AC, tato reakce však byla negativní. Pravý film znázorňuje kontrolu kitu při použití inhibitoru proteas (i) (viz obr. 6.17.), který na reakci nemá žádný efekt.

Jelikož nebyla pozorována SUMOylace ani při několikerém opakování a změně reakčních podmínek, byly použity protilátky proti fosducinu (Sigma Life Sciences, Německo).



Obr. 5.17. Fotografický film ukazující výsledky SUMOylace. Byly provedeny pozitivní (+) a negativní (-) kontroly. Při vizualizaci byly použity protilátky proti fosducinu. Filmy znázorňují SUMOylace fosforylovaného PdQ52K (Pdc-P) samotného, i v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Byla pozorována silná degradace fosducinu (levý film), proto byly použity inhibitory proteas (pravý film), nicméně ani přesto nebyla SUMOylace *in vitro* úspěšná.

Přes opakované provedení reakce a změnách reakčních podmínek se nepodařilo PdQ52K *in vitro* SUMOylovat. Z obr. 5.17. je však patrná protektivní funkce proteinu 14-3-3, neboť malá část fosducinu (i při takto masivní degradaci) zůstala zachována.

5.2.4. Porovnání vazebné afinity fosforylovaných peptidů obsahujících vazebné motivy fosducinu k proteinu 14-3-3 ζ Δ C

Pro vazbu fosducinu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C je nutná jeho fosforylace na obou vazebných místech (Ser-54 a Ser-73) [37]. Nicméně je nejasné, jaký je podíl jednotlivých motivů na celkové stabilitě komplexu. Cílem těchto fluorescenčních měření je odhad vazebné afinity a porovnání jednotlivých fosforylačních motivů PdQ52K při interakci s proteinem 14-3-3 ζ Δ C.

Pro měření byly použity syntetické fluorescenčně označené fosfopeptidy a purifikovaný protein 14-3-3 ζ Δ C.

5.2.4.1. Peptidy

Jednotlivé peptidy obsahují motiv 14-3-3 vazebných míst fosducinu a na svém konci mají navázanou molekulu fluoresceinu (Flc). Peptidy byly syntetizovány firmou VIDIA spol. s r.o. (Česká republika).

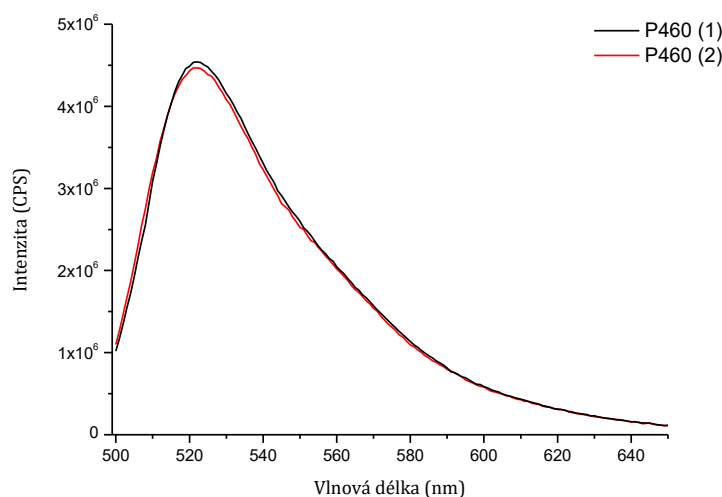
Tab. 5.1. Zkratky a sekvence použitých peptidů. Peptidy jsou na N-konci modifikovány fluoresceinem (Flc) a některé obsahují fosforylovaný Ser (pS). Peptidy P460-462 obsahují vazebný motiv se Ser-54, přičemž peptid P460 obsahuje motiv s mutací Q52K, zatímco peptidy P461 a P462 obsahují přirozeně se vyskytující sekvenci. Peptidy P463 a P464 obsahují vazebný motiv se Ser-73. M_r je monoizotopická, relativní molekulová váha.

Zkratka	Sekvence peptidu	M_r	Fosforylační místo
P460	Flc-SKKEILRKM (pS) SPQSRDD-OH	2243	Ser-54
P461	Flc-SKKEILRQM (pS) SPQSRDD-OH	2443	Ser-54
P462	Flc-SKKEILRQMSSPQSRDD-OH	2363	Ser-54
P463	Flc-MSRKM (pS) IQEYELIH-OH	2203	Ser-73
P464	Flc-MSRKMSIQEYELIH-OH	2123	Ser-73

5.2.4.2. Emisní a excitační spektra

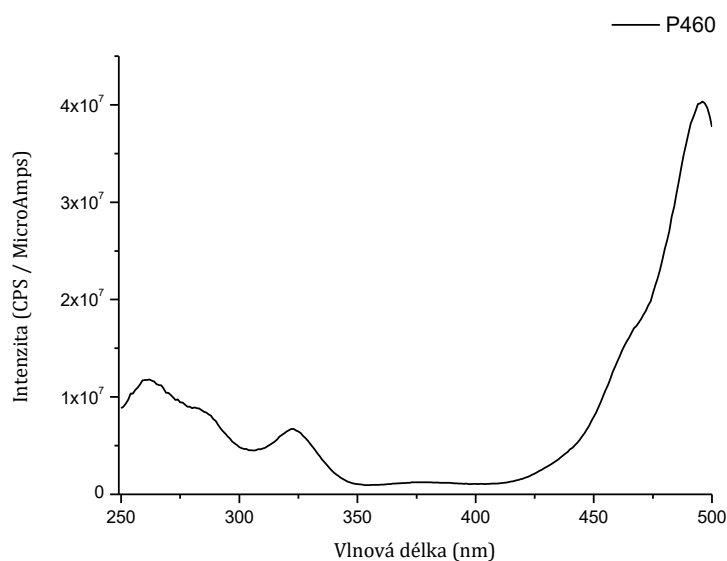
Byla proměřena emisní a excitační spektra jednotlivých peptidů. Postup je uveden v kapitole 4.9.1.3. Po proměření spekter byly zvoleny vlnová délky excitace (490 nm) a emise (520 nm) záření, při kterých byly také měřeny stacionární anizotropie fluorescence. Spektra byla naměřena pro všechny peptidy, nicméně s obdobnými výsledky a proto jsou uvedena pouze spektra peptidu P460.

Emisní spektra



Obr. 5.18. Emisní spektra peptidu P460 naměřená před (1) a po (2) titraci proteinem 14-3-3 ζ AC. Intenzita po titraci byla korigována na změnu objemu. Z grafu je patrné, že nedochází k posunu emisního maxima fluoresceinu.

Excitační spektrum



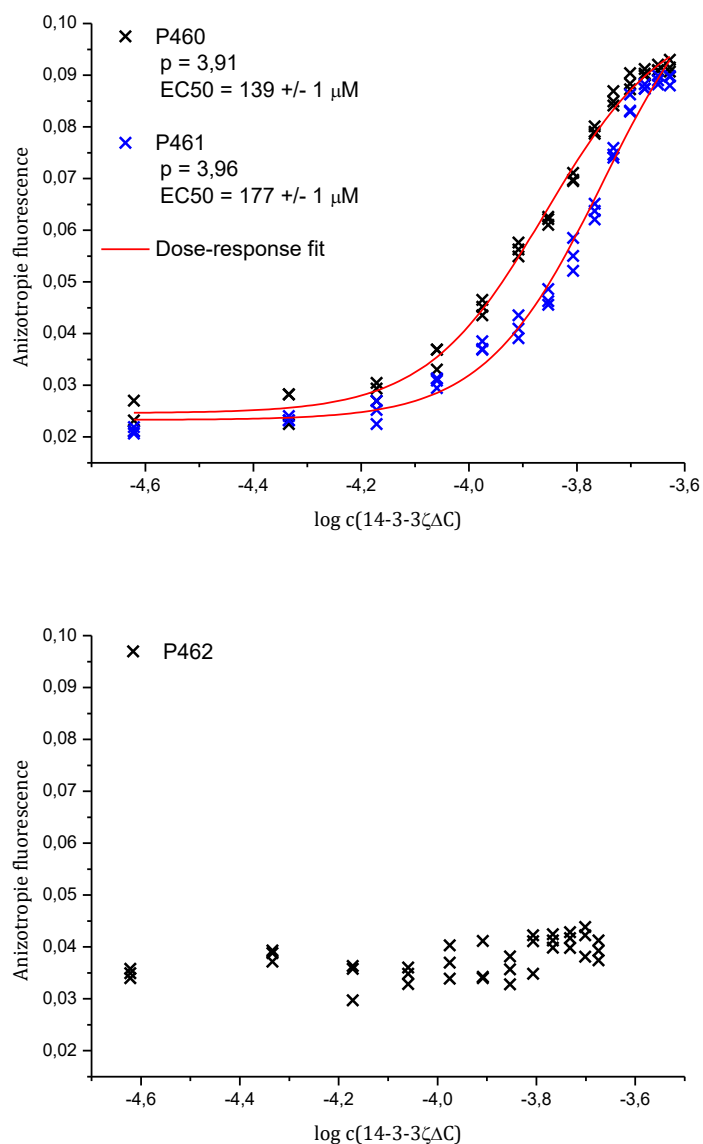
Obr. 5.19. Excitační spektrum peptidu P460.

5.2.4.3. Stacionární měření anizotropie fluorescence

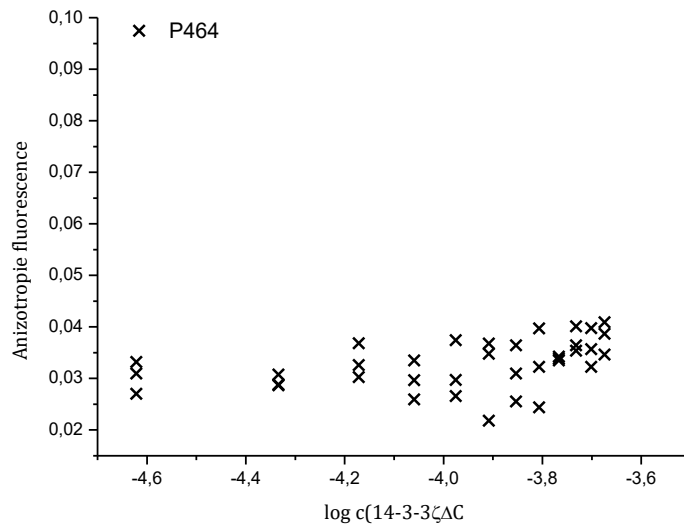
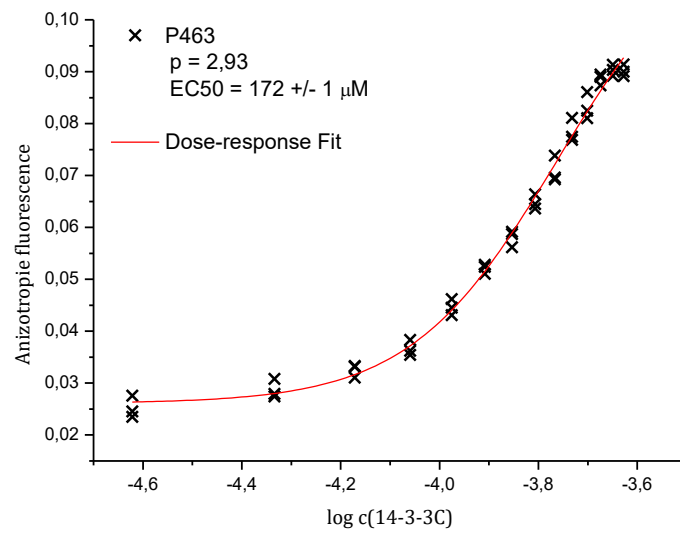
Naměřená data vykazovala sigmoidální závislost. Hodnoty tedy byly fitovány (program OriginPro 8) tzv. dose-response křivkou, jež je dána rovnicí

$$r_s = r_{s_0} + \frac{r_{s_{max}} - r_{s_0}}{1 + 10^{\log(\text{EC}_{50} - p)}} \quad (5.1.)$$

kde r_{s_0} značí minimální a $r_{s_{max}}$ maximální hodnotu anizotropie fluorescence, EC_{50} vyjadřuje koncentraci proteinu 14-3-3 ζ AC, při které je pozorována 50% změna anizotropie (tedy o $0.5 \times (r_{s_{max}} - r_{s_0})$) a p je Hillova směrnice, která udává míru kooperativity vazby.



Obr. 5.20. Grafy závislosti změny anizotropie fluorescence vzorků obsahujících určitý Flc značený peptid na $\log c(14-3-3\zeta\Delta C)$. Tyto peptidy obsahují vazebné místo fosducinu okolo Ser-54. Pouze u fosforylovaných peptidů dochází k zvýšení anizotropie a tím tedy i k navázání peptidu na protein 14-3-3ζΔC. Uvedené hodnoty byly získány proložení experimentálních bodů rovnicí (5.1.) a následně zaneseny do tab. 2.



Obr. 5.21. Graf závislosti změny anizotropie fluorescence vzorků obsahujících určitý Flc značený peptid na $\log c(14-3-3\zeta\Delta C)$. Tyto peptidy obsahují vazebné místo fosducinu okolo Ser-73. Pouze u fosforylovaného peptidu P463 dochází k zvýšení anizotropie a tím tedy i k navázání peptidu na protein 14-3-3 $\zeta\Delta C$. Uvedené hodnoty byly získány proložení experimentálních bodů rovnicí (5.1.) a následně zaneseny do tab. 2.

Tab. 5.2. Výsledky měření stacionární anizotropie fluorescence. Hodnota vazebné konstanty je znázorněna pomocí EC50, jež značí koncentraci, při které je dosaženo poloviční hodnoty maximální anizotropie. Malé p je tzv. Hillova směrnice, která popisuje kooperativu vazby.

Zkratka peptidu	Fosforylační místo	p	EC50 (μM)
P460	Ser-54	3,91	139 ± 1
P461	Ser-54	3,96	177 ± 1
P462	Ser-54	-	-
P463	Ser-73	2,93	172 ± 1
P464	Ser-73	-	-

Výsledky měření stacionární anizotropie fluorescence poukazují na existenci kooperativity při vazbě fosforylovaných peptidu na protein 14-3-3ζΔC.

Z naměřených hodnot je zřejmé, že pro interakci proteinů je nutná fosforylace příslušných serinových zbytků. Zdá se, že při vazbě se obě fosforylovaná místa podílí stejnou mírou, nicméně vazebná konstanta má 50× nižší hodnotu oproti K_D vazby fosducinu s proteinem 14-3-3ζΔC. Tyto hodnoty poukazují na synergii jednotlivých míst při tvorbě komplexu. Dále byl prověřen vliv mutace Q52K na vazebnou afinitu peptidu obsahujícího motiv Ser-54, která způsobila mírné zvýšení vazebné afinity oproti peptidu s nemutovanou sekvencí.

6. Diskuze

V rámci této diplomové práce byla studována úloha posttranslačních modifikací fosducinu na jeho interakci s proteinem 14-3-3 a posouzen vliv tvorby komplexu na tyto modifikace.

Fosducin se nachází v mnoha tkáních, především v oční sítnici. Spekuluje se o jeho vlivu při regulaci signální dráhy oční sítnice [14], krevního tlaku [11] a exprese G-proteinů [13]. Funkce fosducinu je regulována proteinem 14-3-3, jenž hraje roli v mnohých biochemických procesech [18], ovšem úloha proteinu 14-3-3 v regulaci fosducinu je stále nejasná.

Vazba fosforylovaného fosducinu s proteinem 14-3-3 může plnit více funkcí [18]. Postulovány byly funkce regulační, které spočívají v další inhibici interakce fosducinu s $G_{\beta\gamma}$ a také funkce protektivní, jež by mohly fosforylovaný fosducin chránit před defosforylací a proteolytickou degradací. Pro prozkoumání možných protektivních funkcí byly exprimovány a purifikovány proteiny 14-3-3 $\zeta\Delta C$ a fosducin (s mutací Q52K) s výtěžky miligramových množství (kap. 5.1.). Vliv tvorby komplexu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta C$ na posttranslační modifikace fosducinu byl studován metodami limitované proteolýzy (kap. 5.2.1.) a defosforylace (kap. 5.2.2).

Z polyakrylamidových gelů je patrné, že tvorba komplexu PdQ52K s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta C$ zpomaluje rychlost proteolytické degradace fosducinu. Přítomnost proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta C$ zpomalila účinek obou proteas, trypsinu (obr. 5.13.) a chymotrypsinu (obr. 5.12.). Z gelů je také možné pozorovat, že samotná fosforylace PdQ52K pravděpodobně destabilizuje jeho strukturu, neboť fosforylovaný fosducin je degradován rychleji, než nefosforylovaný (obr. 5.12.). Tyto výsledky přispívají k názoru, že tvorba komplexu fosducinu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta C$ chrání fosforylovaný fosducin před intracelulární degradací.

Fosforylace fosducinu má značný efekt na jeho regulační funkci [14]. *In vivo* byla prokázána jeho defosforylace pomocí PP1 a PP2A [21]. V této práci byl zjišťován efekt zmíněných fosfatů a vliv tvorby komplexu fosforylovaného fosducinu s proteinem 14-3-3. Proteiny byly vystaveny účinku jednotlivých fosfatů a analyzovány SDS-PAGE na polyakrylamidových gelech s obsahem Phos-tagTM. Tyto gely ukazují rozdílnou aktivitu jednotlivých fosfatů. PP1 rychleji defosforyluje fosducin na Ser-54

(obr. 5.14.), zatímco PP2A na Ser-73 (obr. 5.15.), nicméně obě fosfatasy jsou schopny defosforylovat oba serinové zbytky. V obou případech však bylo pozorováno snížení rychlosti defosforylace. Byl-li fosforylovaný PdQ52K přítomen v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Tyto výsledky podporují hypotézu, podle které protein 14-3-3 ζ Δ C ochraňuje fosforylovaný fosducin před defosforylací.

C. Klenk et al. objevili *in vivo* 48kDa formu fosducinu a poukázali na jeho modifikaci molekulou SUMO [22]. Zároveň dokázali na fosducin navázat molekulu SUMO *in vitro*. SUMOylace fosducinu však ověřena nebyla. Přes mnohačetná opakování a změny reakčních podmínek reakcí se nepodařilo fosducin *in vitro* SUMOylovat (obr. 5.17.).

Pro vazbu proteinů je nutná fosforylace fosducinu na Ser-54, Ser-73 a tvorba homodimeru proteinu 14-3-3 ζ Δ C [35]. Jaký je však podíl jednotlivých vazebných míst na interakci těchto proteinů není zatím známo. Proto byla provedena měření stacionární anizotropie fluorescence se syntetickými fosfopeptidy, která tyto vazebná místa obsahují. Fluorescenční měření ukázaly podobné a přibližně 50 \times menší vazebné afinity jednotlivých vazebných míst okolo Ser-54 a Ser-73 k proteinu 14-3-3 ζ Δ C (tab. 5.2), než je vazebná afinita, kterou vykazuje PdQ52K k proteinu 14-3-3 ζ Δ C ($3 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Tyto výsledky naznačují nutnost spolupráce obou vazebných míst při tvorbě komplexu s proteinem 14-3-3 ζ Δ C. Zároveň byl prozkoumán vliv mutace fosducinu Q52K, která způsobila mírné zvýšení vazebné afinity zkoumaného fosfopeptidu. Výsledky také naznačují existenci kooperativity při vazbě peptidu na protein 14-3-3 ζ Δ C.

7. Závěr

Proteiny 14-3-3 $\zeta\Delta$ C a fosducin (mutant Q52K) byly exprimovány a purifikovány v dostatečné čistotě a miligramových výtěžcích. Fosducin byl úspěšně fosforylován pomocí PKA na Ser-73 i Ser-54, což umožnilo vytvoření komplexu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.

Byl prostudován vliv vazby proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C na posttranslační modifikace fosducinu metodami limitované proteolýzy a defosforylace. V obou případech byla podpořena hypotéza protektivní funkce proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, neboť došlo k zpomalení rychlosti jednotlivých reakcí. SUMOylace fosducinu *in vitro* však potvrzena nebyla.

Měřením stacionární anizotropie fluorescence byly porovnány vazebné afinity peptidů obsahujících fosforylované motivy fosducinu k proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Vazebné afinity jednotlivých míst, obsahující vazebná místa k proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, mají obdobnou hodnotu, která je však přibližně 50 \times nižší, než je hodnota vazebné afinity celého proteinu. Tyto výsledky ukazují nutnou součinnost obou míst při vzniku komplexu fosducinu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Měření zároveň poukázaly na existenci kooperativity při vazbě jednotlivých peptidů na protein 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.

8. Seznam citované literatury

- [1] R. H. Lee, B. S. Lieberman, and R. N. Lolley, "A Novel Complex from Bovine Visual Cells of a 33 000-Dalton Phosphoprotein with p- and y-Transducin: Purification and Subunit Structure," *Biochemistry*, vol. 26, pp. 3983–3990, 1987.
- [2] R. H. Lee, B. M. Brown, and R. N. Lolley, "Light-induced dephosphorylation of a 33K protein in rod outer segments of rat retina," *Biochemistry*, vol. 23, no. 9, pp. 1972–7, 1984.
- [3] R. H. Lee, B. M. Brown, and R. N. Lolley, "Protein kinase A phosphorylates retinal phosducin on serine 73 in situ," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 26, pp. 15860–6, Sep. 1990.
- [4] N. Beetz and L. Hein, "The physiological roles of phosducin: From retinal function to stress-dependent hypertension," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 4, pp. 599–612, 2011.
- [5] T. Yoshida, B. M. Willardson, J. F. Wilkins, G. J. Jensen, B. D. Thornton, and M. W. Bitensky, "The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 39, pp. 24050–24057, 1994.
- [6] R. Gaudet, A. Bohm, and P. B. Sigler, "Crystal Structure at 2.4 Å resolution of the Complex of Transducin $\beta\gamma$ and Its Regulator, Phosducin," *Cell*, vol. 87, pp. 577–588, 1996.
- [7] B. M. Willardson and A. C. Howlett, "Function of phosducin-like proteins in G protein signaling and chaperone-assisted protein folding," *Cell. Signal.*, vol. 19, no. 12, pp. 2417–2427, 2007.
- [8] R. H. Lee, T. D. Ting, B. S. Lieberman, D. E. Tobias, R. N. Lolley, and Y. K. Ho, "Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 35, pp. 25104–12, Dec. 1992.
- [9] R. H. Lee, A. Fowler, J. F. McGinnis, R. N. Lolley, and C. M. Craft, "Amino acid and cDNA sequence of bovine phosducin, a soluble phosphoprotein from photoreceptor cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 26, pp. 15867–73, Sep. 1990.
- [10] G. Grassi, "Phosducin - A candidate gene for stress-dependent hypertension," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 12, pp. 3515–3518, 2009.
- [11] U. Broeckel, M. Stoll, and L. Hein, "The identification of phosducin as a novel candidate gene for hypertension and its role in sympathetic activation," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 20, no. 2, pp. 118–24, 2011.
- [12] P. Palatini, G. Ceolotto, F. Ragazzo, L. Mos, M. Santonastaso, G. Zanata, F. Saladini, and E. Casiglia, "Phosducin rs12402521 polymorphism predicts development of hypertension in young subjects with overweight or obesity," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 23, no. 4, pp. 323–329, 2013.

- [13] C. M. Krispel, M. Sokolov, Y.-M. Chen, H. Song, R. Herrmann, V. Y. Arshavsky, and M. E. Burns, "Phosducin regulates the expression of transducin betagamma subunits in rod photoreceptors and does not contribute to phototransduction adaptation.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 130, no. 3, pp. 303–312, 2007.
- [14] R. Gaudet, J. R. Savage, J. N. McLaughlin, B. M. Willardson, and P. B. Sigler, "A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin," *Mol. Cell*, vol. 3, no. 5, pp. 649–660, 1999.
- [15] A. K. Dunker, S. E. Bondos, F. Huang, and C. J. Oldfield, "Intrinsically disordered proteins and multicellular organisms.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 37, pp. 44–55, 2015.
- [16] M. Fuxreiter, "Fuzziness: linking regulation to protein dynamics," *Mol. Biosyst.*, vol. 8, no. 1, p. 168, 2012.
- [17] D. Eliezer, "Biophysical characterization of intrinsically disordered proteins," *Curr Opin Struct Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 23–30, 2009.
- [18] C. D. Thulin, J. R. Savage, J. N. McLaughlin, S. M. Truscott, W. M. Old, N. G. Ahn, K. a Resing, H. E. Hamm, M. W. Bitensky, and B. M. Willardson, "Modulation of the G protein regulator phosducin by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 26, pp. 23805–15, 2001.
- [19] B. M. Willardson, J. F. Wilkins, T. Yoshida, and M. W. Bitensky, "Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca²⁺/calmodulin-dependent adenylyl cyclase.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 4, pp. 1475–1479, 1996.
- [20] A. Ruiz-Gomez, J. Humrich, C. Murga, U. Qwitterer, M. J. Lohse, and F. Mayor, "Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 38, pp. 29724–29730, 2000.
- [21] K. Pagh-Roehl, D. Lin, L. Su, and B. Burnside, "Phosducin and PP33 are in vivo targets of PKA and Type 1 or 2A Phosphatases, Regulators of Cell Elongation in Teleost Rod Inner-Outer Segments.," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 10, pp. 6475–88, Oct. 1995.
- [22] C. Klenk, J. Humrich, U. Qwitterer, and M. J. Lohse, "SUMO-1 Controls the Protein Stability and the Biological Function of Phosducin," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 13, pp. 8357–8364, Mar. 2006.
- [23] H. Song, M. Belcastro, E. J. Young, and M. Sokolov, "Compartment-specific phosphorylation of phosducin in rods underlies adaptation to various levels of illumination," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 32, pp. 23613–23621, 2007.
- [24] R. Schulz, "The pharmacology of phosducin," *Pharmacol. Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–10, 2001.

- [25] M. Sokolov, K. J. Strissel, I. B. Leskov, N. A. Michaud, V. I. Govardovskii, and V. Y. Arshavsky, "Phosducin Facilitates Light-driven Transducin Translocation in Rod Photoreceptors: EVIDENCE FROM THE PHOSDUCIN KNOCKOUT MOUSE," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 18, pp. 19149–19156, Apr. 2004.
- [26] L. Stryer, "Visual Excitation and Recovery*," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 17, pp. 10711–10714, 1991.
- [27] J. F. Wilkins, M. W. Bitensky, and B. M. Willardson, "Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 32, pp. 19232–19237, 1996.
- [28] S. M. Hauck, "Differential Modification of Phosducin Protein in Degenerating rd1 Retina Is Associated with Constitutively Active Ca²⁺/Calmodulin Kinase II in Rod Outer Segments," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 5, no. 2, pp. 324–336, 2005.
- [29] N. Beetz, M. D. Harrison, M. Brede, X. Zong, M. J. Urbanski, A. Sietmann, J. Kauffling, M. Barrot, M. W. Seeliger, M. A. Vieira-Coelho, P. Hamet, D. Gaudet, O. Seda, J. Tremblay, T. A. Kotchen, M. Kaldunski, R. N??sing, B. Szabo, H. J. Jacob, A. W. Cowley, M. Biel, M. Stoll, M. J. Lohse, U. Broeckel, and L. Hein, "Phosducin influences sympathetic activity and prevents stress-induced hypertension in humans and mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 12, pp. 3597–3612, 2009.
- [30] A. Aitken, "14-3-3 proteins: A historic overview," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 162–172, 2006.
- [31] A. K. Freeman and D. K. Morrison, "14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 22, no. 7, pp. 681–687, 2011.
- [32] N. Ostrerova, L. Petrucelli, M. Farrer, N. Mehta, P. Choi, J. Hardy, and B. Wolozin, "alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins," *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 14, pp. 5782–91, Jul. 1999.
- [33] R. Layfield, J. Fergusson, A. Aitken, J. Lowe, M. Landon, and R. J. Mayer, "Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins," *Neurosci. Lett.*, vol. 209, no. 1, pp. 57–60, 1996.
- [34] T. Obsil and V. Obsilova, "Structural basis of 14-3-3 protein functions," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 663–672, 2011.
- [35] V. Obsilova, M. Kopecka, D. Kosek, M. Kacirova, S. Kylarova, L. Rezacikova, and T. Obsil, "Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation.," *Physiol. Res.*, vol. 63 Suppl 1, pp. S155–64, 2014.
- [36] M. Kacirova, D. Kosek, A. Kadek, P. Man, J. Vecer, P. Herman, V. Obsilova, and T. Obsil, "Structural characterization of Phosducin and its complex with the 14-3-3 protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 26, pp. 16246–16260, 2015.

- [37] L. Rezabkova, M. Kacirova, M. Sulc, P. Herman, J. Vecer, M. Stepanek, V. Obsilova, and T. Obsil, "Structural modulation of phosphducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding," *Biophys. J.*, vol. 103, no. 9, pp. 1960–1969, 2012.
- [38] BioDynamics Laboratory, "Product information, Competent Cell BL21(DE3)pLysS," pp. 1–5.
- [39] K. Wilson and J. Walker, *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7th edition. 2010.
- [40] V. Jurga and M. Kodíček, "LIMITOVANÁ A PULZNÍ PROTEOLÝZA LIDSKÉHO HEMOGLOBINU," *Chem. List.*, vol. 104, pp. 232–235, 2010.
- [41] E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, "Mobility Shift Detection of Phosphorylated Proteins - Phosphate Affinity SDS-PAGE using Acrylamide-pendant Phos-tag™," 2010.
- [42] Wako Pure Chemical Industries, "Phos-tag™ PAGE GUIDEBOOK," 2013.
- [43] Enzo Life Sciences Inc., "Product Manual: SUMOylation Kit," 2013.
- [44] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006.