

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

**Studium konformace C-koncového segmentu kvasničných
isoform 14-3-3 proteinů**

**Study of the conformation of the C-terminal tail of yeast
14-3-3 isoforms**

Bc. Dana Urychová

2009

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

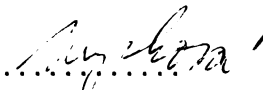
Garant diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 4.5.2017

Dana Urychová 

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za veškeré rady, připomínky, odborné vedení, trpělivost a pomoc, kterou mi v průběhu diplomové práce poskytl. Dále bych chtěla velmi poděkovat RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odbornou pomoc k danému tématu, Ing. Janu Teisingerovi, CSc. za cenné rady a všem ostatním členům Oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc. z Fyzikálního ústavu Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy za realizaci časově rozlišených fluorescenčních měření.

Děkuji svým rodičům a Liborkovi.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	1
1. Úvod	3
2. 14-3-3 proteiny	4
2.1 Historie 14-3-3 proteinů a jejich komplexů	4
2.2 Struktura 14-3-3 proteinů	7
2.2.1 Vazebný žlábek	8
2.2.1.1 Vazebné motivy 14-3-3 proteinů	9
2.2.2 C-terminální konec 14-3-3 proteinů	10
2.3 Funkce 14-3-3 proteinů	11
2.4 Isoformy 14-3-3 proteinů	12
2.5 Vazební partneři 14-3-3 proteinů	12
3. Cíle diplomové práce	14
4. Použitý materiál	15
4.1 Chemikálie	15
4.2 Materiál	15
4.3 Přístroje	16
5. Metody	17
5.1 Používané vektory	17
5.2 Cílená mutageneze BMH2	17
5.3 Odstranění templátové DNA	18
5.4 Kontrola výsledku PCR reakce pomocí TBE agarosové elektroforézy	18
5.5 Transformace plazmidu do buněk	19
5.6 Izolace plazmidové DNA	19
5.7 Exprese BMH2 proteinů	20
5.8 Glycerolový roztok transformovaných bakterií	21
5.9 Purifikace BMH2 proteinů	21
5.9.1 Sonikace buněk	21
5.9.2 Chelatační afinitní chromatografie	22
5.9.3 SDS-PAGE	23
5.9.4 Dialýza	25
5.9.5 Thrombinové štěpení	26
5.9.6 Aniontově-výměnná chromatografie	26
5.9.7 Zkoncentrování proteinu	27

5.9.8 Gelová permeační chromatografie.....	27
5.10 Charakterizace vazebných vlastností BMH2 proteinů pomocí stacionární anizotropie fluorescence.....	28
5.11 Označení BMH2 proteinů fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS.....	30
5.12 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie.....	31
5.13 Dynamický rozptyl světla	33
6. Výsledky	34
6.1 Cílená mutagenese BMH2.....	34
6.2 Exprese a purifikace proteinů	36
6.2.1 Chelatační afinitní chromatografie.....	36
6.2.2 Thrombinové štěpení.....	37
6.2.3 Aniontově-výměnná chromatografie	37
6.2.4 Gelová permeační chromatografie.....	39
6.3 Charakterizace vazebných vlastností BMH2 proteinů pomocí stacionární anizotropie fluorescence.....	40
6.4 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie.....	42
6.4.1 Studium konformace C-konce pomocí tryptofanové fluorescence.....	42
6.4.2 Studium oligomerního stavu BMH2 pomocí dansylové fluorescence	43
6.5 Dynamický rozptyl světla	44
7. Diskuze	46
8. Závěrečné shrnutí.....	48
Přehled literatury	49

Seznam použitých zkratek a symbolů

14-3-3	označení proteinu podle čísla frakce při eluci na DEAE chrom. a pozici na elfo
AANAT	arylalkylamin N-acetyltransferasa
Abl	z angl. Abelson tiro sine kinase gen; Philadelphský chromosom (Bcr-Abl)
AKAP	z angl. A-kinase anchoring protein
Akt	protein kinasa B
ATP	adenosintrifosfát
BamH I	restrikční enzym
BAP-1	z angl. Bcr associated protein 1
Bcr	z angl. Break-point cluster region
BL21	buněčný kmen
BMH1	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu
BMH2	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu
BMH2 W243	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu s tryptofanovou mutací na 243 pozici
BMH2 W264	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu s tryptofanovou mutací na 264 pozici
BMH2 WT	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu divokého typu, z angl. Wild Type
BMH2 ΔC	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu s odštěpeným C-koncovým segmentem
CBP	z angl. Cruciform Binding Protein
cDNA	komplementární DNA
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CJN	Creutzfeldt-Jakobova nemoc
CV	z angl. Column volume
DBD	z angl. DNA binding domain, DNA vazebná doména FoxO4
DEAE	iontosorb obsahující DiEthylAminoEthylové funkční skupiny
DER	Drosophila receptor
DLS	z angl. Dynamic Light Scattering; Dynamický rozptyl světla
Dpn I	enzym, který specificky štěpí methylovanou DNA
DTT	dithiotreitol
EDTA	EthylenDiaminTetraoctová kyselina (Acid)
Exo1	isoformy 14-3-3 proteinů
ExoS	Exoenzym S
FAS	z angl. Factor activating Exoenzyme S
f _B	frakce navázaného peptidu
FBP	z angl. Fusicocin binding protein
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FKHRL1	člen Forkhead rodiny; FoxO1
FoxO	Forkhead rodina
FoxO1	člen Forkhead rodiny
FoxO4	člen Forkhead rodiny
FRET	z angl. Förster resonance energy transfer
G ₂	fáze buněčného cyklu
GF14	rostlinná isoforma 14-3-3 proteinu
H1-H9	α-helixy 1-9
His-Tag	tzv. histidinová kotva; šest po sobě jdoucích histidinů

HPLC	z angl. High performance liquid chromatography, vysoce účinná kap. chrom.
hTERT	lidská telomerasa
CHC1	z angl. Clathrin Heavy-Chain; gen pro protein kladin
chc1	protein kladin
IMAC	z angl. Immobilized Metal Affinity Chromatography; afinitní chromatografie
IPTG	isopropylthiogalaktosid
KCIP-1	z angl. Protein kinase C inhibitor 1
K_D	disociační konstanta
LB	Lauria-Bertani médium
M	fáze buněčného cyklu; mitóza
MBÚ AV ČR	Mikrobiologický Ústav Akademie Věd České Republiky
MSF	z angl. Mitochondrial import Stimulation Factor
MST1	protein kinasa
Nde I	restrikční enzym
NIP	z angl. Nitrate reductase Inhibitor Protein
p53	protein zastávající klíčovou úlohu v procesu vzniku rakoviny
Par5	14-3-3 protein <i>C. elegant</i>
PCR	z angl. Polymerase Chain Reaction; polymerasová řetězová reakce
PCS	fotokorelační spektroskopie (dynamický rozptyl světla)
pET-15b	označení vektoru
Pfu	z <i>Pyrococcus furiosus</i> ; Pfu DNA polymerasa
PKB	protein kinasa B (Akt)
polyQ	polyglutaminový segment
pRaf-259	fosforylovaný Raf protein
QELS	kvasielastický rozptyl světla (dynamický rozptyl světla)
R18	označení proteinu
Rad24	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu
Rad25	kvasničná isoforma 14-3-3 proteinu
Raf-259	označení proteinu
r_{max}	maximální anizotropie
r_{min}	minimální anizotropie
r_{obs}	pozorovaná anizotropie
rpm	z angl. revolutions per minute; otáčky za minutu
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SDS/ SDS-PAGE	dodecylsulfát sodný/ polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS
TBE	Tris-HCl, Boritá kyselina, EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
TOP10	buněčný kmen
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC1	z angl. Tuberous sclerosis complex 1, tumor supresorový gen
TSC2	z angl. Tuberous sclerosis complex 2, tumor supresorový gen
UV	z angl. Ultra Violet
W1	z angl. wing 1; označení smyčky DNA vazebné domény FoxO4
W2	z angl. wing 2; označení pro C-konec DNA vazebné domény FoxO4
α A- α I	označení α -helixů 14-3-3 proteinů

1. Úvod

Všechny živé organismy od virů až po člověka obsahují dva základní typy informačních biomakromolekul – nukleové kyseliny a bílkoviny. Nukleové kyseliny jsou nositelé genetické informace, resp. jsou materiálním základem dědičnosti. Nejdůležitější vlastností nukleových kyselin je replikace. Genetická informace zakódovaná v nukleových kyselinách obsahuje nutné předpoklady pro syntézu specifických bílkovin, které zajišťují životní funkce a pochody v buňce. Nukleové kyseliny jsou samy ve své syntéze závislé na bílkovinných molekulách [1, 2].

Z výše uvedeného vyplývá, že bílkoviny zajišťují rozmanité funkce, kterými se podílí na celkovém životním pochodu buňky.

Jednou z nejdůležitějších funkcí bílkovin je funkce enzymatická uskutečňující se např. při rozkladu nebo syntéze sloučenin [1].

Další důležitou funkcí bílkovin je funkce ochranná. Po vniknutí cizorodé látky do buňky se aktivují imunologické reakce [1].

Přeměna chemické energie na mechanickou práci je podstatou tzv. molekulových motorů. Ty jsou odpovědné za aktivní pohyb organismů vůči okolí, ale například i za pohyb buněčných organel, za neustálé proudění látek v nervových vláknech k nervovým zakončením a opačným směrem, u měňavek za ameboidní pohyb atd. Molekulový motor je komplex několika molekul bílkovin, který má svou vlastní enzymovou aktivitu, tzn., že katalyzuje hydrolýzu ATP. Hydrolýzou ATP se uvolní energie, která změní tvar motoru, a tím dojde k posunutí motoru po strukturách cytoskeletu (mikrotubuly, mikrofilamenta). Molekulové motory tedy mohou fungovat jako přenašeče při vnitrobuněčném transportu [1, 3, 4].

Protože bílkoviny tvoří více než 50 % protoplazmy, jsou podstatnou součástí buněčných struktur a z toho vyplývá jejich další funkce – strukturní. Organely jsou chráněny lipoproteinovými membránami, ribozomy jsou tvořeny rRNA a bílkovinami, v cytoskeletu se nacházejí mikrotubuly a mikrofilamenta atd. Typickými strukturními bílkovinami jsou např. kolagen, fibrinogen a skleroprotein [1, 2].

Důležitou transportní bílkovinou je hemoglobin, který na sebe reverzibilně navazuje molekulární kyslík, dále albumin krevní plazmy na sebe váže mastné kyseliny, steroidy a jiné lipoidní látky. Transferrin je bílkovina krevní plazmy, která má transportní funkci pro Fe (váže na sebe Fe^{2+}) a ceruloplasmin slouží jako transportní protein pro Cu v krevním séru atd. [1, 5].

14-3-3 proteiny jsou důležité v mnoha buněčných dějích, kde se váží na fosforylované proteiny a tím ovlivňují jejich funkce, např. při přenosu signálu, diferenciaci a proliferaci buňky, regulaci buněčného cyklu (např. přechody mezi G2 a M fází), apoptóze, i jako indikátory diagnostiky neurodegenerativních onemocnění zvaných sporadická Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJN), Alzheimerova a Parkinsonova choroba [6, 7, 8].

2. 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou dimerní bílkovinné molekuly, které se vyskytují ve všech eukaryotických organismech. V lidských buňkách bylo identifikováno sedm isoform, (které jsou běžně označovány řeckými písmeny), v rostlinných buňkách patnáct isoform a dvě isoformy v kvasinkách. Relativní molekulová hmotnost se pohybuje okolo 30 tisíc. Celkem bylo nalezeno přes 300 odlišných vazebných partnerů 14-3-3 proteinů. V rostlinných organismech jsou 14-3-3 proteiny a jejich vazební partneři důležití v procesech transportu iontů, metabolismu a při regulaci růstu [9].

2.1 Historie 14-3-3 proteinů a jejich komplexů

1967-1968 14-3-3 proteiny byly poprvé izolovány Moorem a Perezem z extraktu mozkové tkáně. Jejich název je odvozen podle čísla frakce (14.) při eluci na DEAE-celulózové chromatografii a podle pozice na škrobové gelové elektroforéze (3.3). Členové této rodiny jsou nazýváni různými alternativními jmény (viz. Tab. 1) např. podle jejich biologické funkce.

název	14-3-3 isoforma
BAP-1	z angl. Bcr-associated protein 1; 14-3-3 τ/θ [10]
Bilardo	14-3-3 ζ [11]
BMH1 a BMH2	kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů, <i>S. cerevisiae</i> [12]
CBP	z angl. Cruciform-binding Protein; relativní molekulová hmotnost CBP je 66 tisíc a je možnou kombinací jakýchkoliv dvou lidských isoform 14-3-3 proteinů [13]
DER	<i>Drosophila</i> receptor; část z <i>Drosophila</i> 14-3-3 (14-3-3 ζ) [14]
Exo1	regulace exocytosy; isoformy 14-3-3 [15]
FAS	z angl. Factor Activating exoenzyme S, 14-3-3 ζ/δ [16]
FBP	z angl. Fusicoccin-binding Protein, <i>Zea mays L.</i> [17]
GF14	rostlinná isoforma 14-3-3 proteinů, <i>Arabidopsis thaliana</i> [18]
KCIP-1	z angl. Protein kinase C inhibitor-1; 14-3-3 ζ/δ [19]
Leonardo	<i>Drosophila</i> 14-3-3 ζ [20]
MSF	z angl. Mitochondrial import Stimulation Factor; 14-3-3 ϵ [21]
NIP	z angl. Nitrate reductase Inhibitor Protein, rostlinné 14-3-3 proteiny [22]
Par5	<i>C. elegant</i> 14-3-3 protein [23]
Rad24 a Rad25	kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů, <i>Sz. pombe</i> [12]
Stratifin	14-3-3 σ [24]

Tab. 1 Příklady alternativních názvů 14-3-3 proteinů [11].

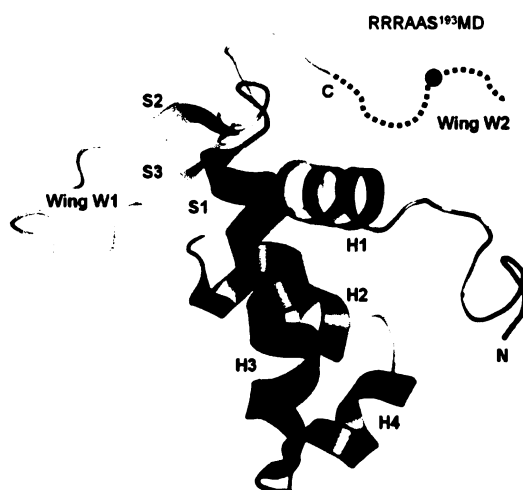
1980 Purifikace 14-3-3 proteinů (spolu s 14-3-2 proteiny, které se liší od 14-3-3 proteinů tím, že se skládají pouze z jednoho polypeptidového řetězce a

- jejich relativní molekulová hmotnost je okolo 50 tisíc [25].
- 1982 Nalezení 14-3-3 proteinů v cerebrospinální tekutině a označení za potenciální indikátory neurodegenerativních onemocnění [26].
- 1987 Enzymová regulace. Aktivace tryptofan a tyrosinhydroxylasy za přítomnosti Ca^{2+} [27].
- 1988 Separace na HPLC a pojmenování sedmi 14-3-3 proteinů nalezených v mozkové tkáni řeckými písmeny. Klonování cDNA pro 14-3-3 η [28].
- 1992 Nalezení 14-3-3 proteinů v ostatních eukaryotech: v kvasinkách [29], v rostlinách (špenát, hrách, pupalka) [30], *Xenopus (drápatka)* [31].
- 1993 Exoenzym S. ExoS vyžaduje faktor zvaný FAS pro svou enzymatickou aktivitu. FAS faktor patří do rodiny 14-3-3 proteinů. ExoS je virulentní faktor z *Pseudomonas aeruginosa* [16].
- 1994 Interakce 14-3-3 proteinů s c-Bcr a Bcr-Abl. Podstatou chronické myeloidní leukémie (CLM) je objevení Philadelphia (Ph) chromozomu. Ten vzniká reciproční translokací genetického materiálu mezi dlouhými raménky 9. a 22. chromosomu. Při tom dojde k přesunu protoonkogenu c-Abl do oblasti chromosomu 22, která je označovaná jako Bcr (Breakpoint Cluster Region) a k fúzi Bcr-Abl. Produktem Bcr-Abl genu je protein s konstitutivně aktivovanou tyrosinkinásou, na rozdíl od Abl, který kóduje tyrosinkinásu, jejíž aktivita je v buňce přísně regulována [10], [32].
- 1995 Krystalová struktura 14-3-3 τ z lidských T-buněk o rozlišení 2,6 Å. 14-3-3 τ tvoří dimerní molekulu, skládající se ze dvou monomerních jednotek. Každá monomerní jednotka je složena z devíti antiparalelních α -helixů. Spojením těchto jednotek vzniká hluboká centrální dutina o rozměrech 35 Å x 35 Å x 20 Å [33].
Krystalová struktura 14-3-3 ζ o rozlišení 2,9 Å [34].
- 1996 Prokázání úlohy 14-3-3 proteinů v mozkové tkáni u pacientů s Alzheimerovou chorobou [35].
Vazba 14-3-3 proteinů s vazebnými partnery je zprostředkována skrze motiv obsahující fosforylovaný serin [36].
- 1997 Protein 14-3-3 σ je proteinem p53 regulovaný inhibitor pro vstup buňky do G₂/M fáze buněčného cyklu [37].
- 1998 Interakce 14-3-3 proteinů s nefosforylovaným proteinovým ligandem skrze vazebný motiv WLDLE. Tento ligand je uměle syntetizovaný peptid R18 a do vazebného žlábků 14-3-3 proteinu se váže opačně než většina ostatních ligandů [38].
- 1999 Akt reguluje aktivitu FKHR1 (člen Forkhead rodiny, FoxO1) tím, že fosforyluje FKHL1, který pak interaguje se 14-3-3 proteiny za vzniku komplexu FKHL1/14-3-3 a transportuje se z jádra do cytoplazmy, čímž zaniká funkce FKHL1 [39].
- 2000 Jako odpověď na poškození DNA je indukována exprese 14-3-3 σ , která

způsobí, že se buněčný cyklus zastaví v G₂ fázi. Bylo zjištěno, že při onemocnění rakovinou prsu je exprese genu pro 14-3-3σ 7x nižší než ve zdravém prsním epitelu. To je způsobeno hypermethyloací 14-3-3σ genu v místech bohatých na CpG opakování [40].

- 2001 Vyřešení krystalové struktury komplexu 14-3-3/AANAT. AANAT je látka účastnící se syntézy melatoninu. AANAT se váže do centrální části dimerního 14-3-3ζ. Vazba 14-3-3 proteinu s AANAT chrání AANAT před proteolýzou a zvyšuje její afinitu k substrátům [41].
- 2002 Fosforylace 14-3-3 proteinů Akt (PKB). Akt (nebo také Protein Kinasa B) je členem ACG serin/threonin kinasové rodiny. Tento třípísmenný název označuje „nejstarší“ členy této rodiny. A – protein kinasa A, G – cGMP protein kinasa a C – protein kinasa C. PKB/Akt fosforyluje in vitro 14-3-3ζ na Ser-58 [42].
- 2003 Vyřešení struktury komplexu 14-3-3/fusicoccin. Fusicoccin je toxická látka produkovaná houbou *Fusicoccum amygdalii*, která způsobuje vadnutí rostlin. Fusicoccin stabilizuje interakci mezi 14-3-3 proteinem a C-koncovou částí H⁺-ATPasy a aktivuje skrze tuto vazbu neustálý H⁺-ATPasový transport vedoucí nevratně kotevření průduchů rostlin. Výsledkem je zvadnutí rostliny [43].
- 2004 AKAP-Lbc je členem (z angl. A-Kinase Anchoring Protein) AKAP rodiny. Rho-GEF aktivita je stimulována α-podjednotkou heterotrimerického G proteinu (G₁₂), přičemž fosforylace AKAP-Lbc pomocí ukotvené PAK navozuje přísun 14-3-3 proteinů, které inhibují GEF funkci. AKAP-Lbc může formovat homooligomery uvnitř buněk. Oligomerizace je zprostředkována pomocí dvou sousedících motivů leucinového zipu, které jsou umístěné v C-koncové části proteinové kotvy. AKAP-Lbc aktivita je inhibována skrze vazbu se 14-3-3 proteiny [44].
- 2005 Navržení vazebného motivu III. Vazebný motiv III. *pS/pT(X₁₋₂)-COOH* neobsahuje aminokyselinu prolin (jako vazebný motiv I. a II.), ale obsahuje C-terminální sekvenci COOH, která funkčně nahrazuje smyčku pro zvýšení vazebných schopností [45].
- 2006 Protein kinasa MST1 vyvolává oxidativní stres vedoucí k zániku savčích neuronů prostřednictvím FoxO transkripčních faktorů. MST1 fosforyluje FoxO proteiny na konzervativních aminokyselinových zbytcích uvnitř Forkhead domény a tím je znemožněna interakce se 14-3-3 proteiny, které transportují v komplexu FoxO/14-3-3 FoxO z jádra do cytoplazmy [46].
- 2007 DNA vazebná doména (DBD, z angl. DNA Binding Domain) FoxO4 je složena z N-koncové části umístěné nad helixem H1, tří α-helixů a antiparalelních β-skládaných listů, které formují na jedné straně smyčku zvanou *wing* W1 a na druhé straně úsek *wing* W2, který představuje C-

koncový segment (viz. Obr. 1). Fosforylační místo pro PKB a vazebný motiv pro 14-3-3 proteiny je umístěn na úseku zvaném *wing* W2, tedy na C-koncové části FoxO4-DBD. Vazba 14-3-3 proteinu s FoxO4 je nezbytná pro úplnou inhibici interakce FoxO4 s DNA. Pro vazbu FoxO4 s DNA jsou důležité obě koncové části (N-koncová část a C-koncová část W2). Odstranění jedné ze dvou koncových částí snižuje schopnost vazby FoxO4 s DNA a odstranění obou koncových částí významně inhibuje vazbu FoxO4 s DNA [47].



Obr. 1 Stužková reprezentace krystalové struktury FoxO4-DBD (sekvence Ser⁹²-Gly¹⁸¹), černý kruh naznačuje přibližné místo (Ser¹⁹³) pro fosforylaci PKB, přerušovaná čára naznačuje chybějící úsek W2.

- | | |
|------|---|
| 2008 | Zvýšená exprese lidské isoformy 14-3-3ζ určuje vysoké riziko vzniku recidivy rakoviny prsu. Tato zvýšená exprese 14-3-3ζ nastává v raném stadiu této choroby a přispívá k přeměně zdravých lidských buněk na rakovinové bujení. 14-3-3ζ proteiny negativně regulují p53 [48]. |
| 2009 | Protein GF14c (člen 14-3-3 rodiny proteinů) hraje důležitou roli v procesu kvetení u rýže prostřednictvím interakce s Hd3a proteinem (Hd3a protein podporuje kvetení u rýže). Zvýšená exprese proteinu GF14c způsobí zpoždění doby kvetení [49]. |

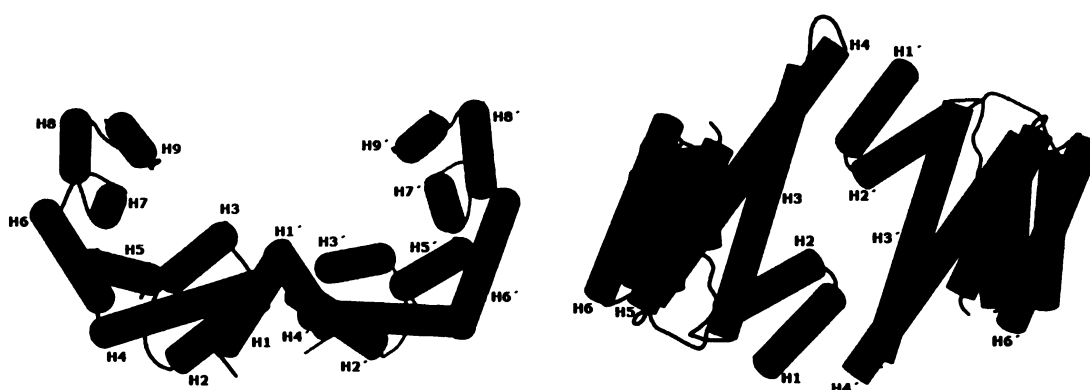
Tab. 2 Důležitá data v historii 14-3-3 proteinů [11].

2.2 Struktura 14-3-3 proteinů

Všechny 14-3-3 proteiny jsou stálé homo- a heterodimerní molekuly s charakteristickým tvarem a velikostí. Každá monomerní jednotka je složena z devíti antiparalelních α -helixů (zde značeno H1-H9 možné je i značení α A- α I), které se formují

do tvaru písmene L a jsou propojeny různě dlouhými ohyby. Vnitřní část L-struktury je tvořena čtyřmi α -helixy (H3, H5, H7 a H9), které tvoří tzv. amfipatický žlábek (Obr. 2). Tento žlábek formuje vazebné místo, do kterého se váží fosforylované ligandy. Primární struktura 14-3-3 proteinů je vysoce konzervovaná se zcela konzervovanými aminokyselinovými zbytky tvořícími amfipatický žlábek. Různorodost jednotlivých isoform 14-3-3 proteinů tedy spočívá zejména v odlišné délce a sekvenci C-terminálního segmentu. Nekonzervované aminokyseliny se nachází i na N-terminálním konci, na povrchu a v ohybech mezi α -helixy. Čtyři N-terminální α -helixy (H1, H2, H3 a H4) se podílí na dimerizaci proteinu. Helixy H1 a H2 jedné monomerní jednotky interagují s helixy H3' a H4' druhé monomerní jednotky (Obr. 2). Spojením dvou monomerních jednotek vzniká hluboká centrální dutina (35 Å x 35 Å široká a 20 Å hluboká, popsáno u 14-3-3 τ a 14-3-3 ζ), která je tvořena dvěma vazebnými místy. Obě jednotky jsou spojeny hydrofobními a elektrostatickými interakcemi [6, 50].

Některé isoformy jsou tvořeny stejnými monomerními jednotkami – vzniká homodimerní molekula (lidský 14-3-3 σ , 14-3-3 γ), jiné isoformy tvoří heterodimerní molekuly (lidský 14-3-3 ϵ , kvasničné isoformy BMH1 a BMH2) [50].



Obr. 2: Reprezentace krystalové struktury dimeru 14-3-3 proteinu.

Vlevo: Boční pohled na červenou a zelenou monomerní jednotku tvořící dimer 14-3-3 proteinu; H1-H9 (resp. H1'-H9') je označení pro α -helixy; helixy H3, H5, H7, H9 (resp. H3', H5', H7', H9') tvoří vazebné místo pro ligand; na dimerizaci proteinu se podílí helixy H1 a H2 červené monomerní jednotky a H3' a H4' helixy zelené monomerní jednotky.

Vpravo: Pohled shora na červenou a zelenou monomerní jednotku tvořící dimer 14-3-3 proteinu; z tohoto pohledu je lépe pozorovatelná dimerizace proteinu; převzato z [51].

2.2.1 Vazebný žlábek

Vazebný žlábek je tvořen čtyřmi α -helixy – H3, H5, H7 a H9 (Obr. 2). Helixy H3 a H5 obsahují především polární aminokyseliny, helixy H7 a H9 obsahují zejména hydrofobní aminokyseliny. Uvnitř vazebného žlábků každé monomerní jednotky se nachází tři

vysoce konzervované pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky Lys⁴⁹, Arg⁵⁶ a Arg¹²⁷, které interagují s pSer/pThr vazebného partnera 14-3-3 proteinu. Celkový elektrostatický potenciál 14-3-3 proteinů je negativní [50].

2.2.1.1 Vazebné motivy 14-3-3 proteinů

14-3-3 proteiny interagují s fosforylovanými ligandy, které ve své konsensus sekvenci obsahují fosforylovaný serin nebo treonin (14-3-3 proteiny byly první skupinou proteinů, u kterých byla objevena tato interakce s ligandy skrze přesně definovaný fosforylovaný vazebný motiv [52]). Byli ovšem nalezeni i nefosforylovaní vazební partneři. Vazebné motivy, kterými se váží ligandy s 14-3-3 proteiny, jsou rozděleny do čtyř základních typů.

Vazebný motiv I. je určen konsensus sekvencí *RSX(pS/pT)XP*, kde R značí aminokyselinu arginin, S značí aminokyselinu serin, X značí libovolnou aminokyselinu, pS/pT značí fosforylovaný serin/threonin a P značí aminokyselinu prolin.

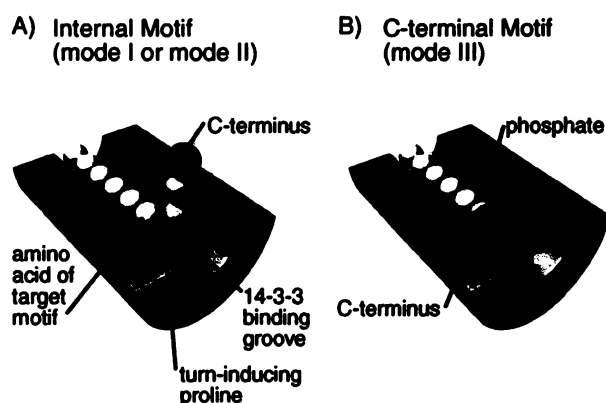
Vazebný motiv II. je určen konsensus sekvencí *RX(Y/F)X(pS/pT)XP*, kde R značí aminokyselinu arginin, X značí libovolnou aminokyselinu, Y značí aminokyselinu tyrosin, F značí aminokyselinu fenylalanin, pS/pT značí fosforylovaný serin/threonin a P značí aminokyselinu prolin.

Konsensus sekvence vazebného motivu III. neobsahuje aminokyselinu prolin, existuje ale nápadná podobnost mezi těmito vazebnými partnery 14-3-3 proteinů: AANAT (*-RRNpSDR-COOH*), rostlinnou H⁺-ATPasou (*-QQYpTV-COOH*) a Iba podjednotkou glykoproteinu Ib-IX-V (*-RYSGHSL-COOH*). V závorkách jsou uvedeny vazebné motivy, z nichž je patrné, že všechny jsou C-terminální sekvence. Terminální COOH funkčně nahrazuje smyčku, kterou jinak poskytuje prolin ke zvýšení vazebných schopností (viz. Obr. 3). Vazebné sekvence AANAT a H⁺-ATPasy obsahují pS nebo pT, mohou tedy zprostředkovat vazbu závislou na fosforylaci. Vazebný motiv III. je určen konsensus sekvencí *pS/pT(X₁₋₂)-COOH*, kde pS/pT značí fosforylovaný serin nebo threonin a X značí libovolnou aminokyselinu [45, 53].

Vazebný motiv IV. je příkladem na fosforylaci nezávislé interakce mezi 14-3-3 proteinem a exoenzymem S (ExoS, cytotoxin s ADP-ribosyltransferasovou aktivitou z *Pseudomonas aeruginosa*). Tento kontakt je zprostředkován převážně hydrofobními interakcemi (na rozdíl od motivů I.-III., které jsou zprostředkované zejména elektrostatickými interakcemi), které jsou nutné pro funkci ExoS. Do této skupiny patří i lidská telomerasa (hTERT), enteropatogenní Tir protein (z *Escherichia coli*), amyloidní β-protein prekurzor a ExoS cytotoxin. Vazebná doména ExoS (⁴²³LDS/⁴²⁸ALDL) může nahrazovat fosforylované aminokyseliny. Leuciny na pozicích 422, 423, 426 a 428 ExoS jsou nezbytné pro vazbu se 14-3-3 proteiny a interagují s hydrofobním povrchem amfipatického žlábků 14-3-3 proteinů. Kromě hlavních hydrofobních interakcí se podílí

na vazbě 14-3-3/ExoS i elektrostatické interakce (zprostředkované pomocí His⁴¹⁸, Asp⁴²⁴, Asp⁴²⁷ ExoS) [54].

Uměle nasyntetizovaný peptid R18 (*PHCVPRDLSWLDLEANMCLP*) není zařazován k žádnému ze čtyř výše uvedených vazebných motivů. Váže se do vazebného žlábků 14-3-3 proteinů přes *WLDLE* konsensus sekvenci [38].



Obr. 3

A) Konsensus sekvence vazebného motivu I. a II. obsahuje aminokyselinu prolin, která způsobí ohyb vazebného partnera ven z vazebného žlábků 14-3-3 proteinu C-koncovou částí.

B) Konsensus sekvence vazebného motivu III. neobsahuje aminokyselinu prolin, ale -COOH skupinu, která se nachází uvnitř vazebného žlábků 14-3-3 proteinu; převzato z [55].

2.2.2 C-terminální konec 14-3-3 proteinů

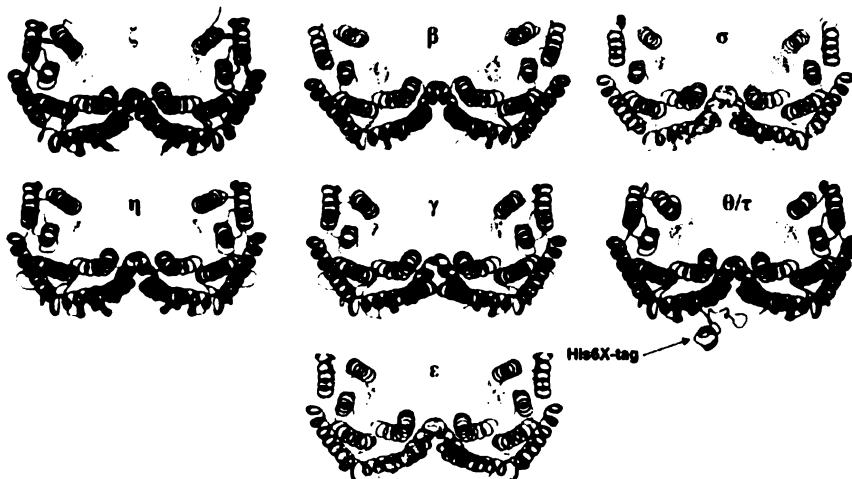
Dva kvasničné (*Saccharomyces cerevisiae*) 14-3-3 proteiny kódované geny BMH1 a BMH2 jsou z více než 60 % identické k lidské ε isoformě, resp. BMH1 je z 91 % identický a BMH2 je z 97 % identický k ε isoformě v pořadí prvních 250 aminokyselinových zbytků. Proto pravděpodobně spočívá specifická funkce jednotlivých isoform v odlišném C-terminálním konci [12].

C-terminální konec u savčích isoform 14-3-3 proteinu – FRET měření mezi Trp²⁴², který je umístěný na konci C-terminálního segmentu a dansylovou skupinou připojenou k Cys²⁵ nebo Cys¹⁸⁹ ukázalo, že v nepřítomnosti ligandu C-terminální konec obsazuje vazebné místo 14-3-3 proteinu pro ligand. C-terminální segment většinou obsahuje negativně nabitě aminokyseliny, které mohou napodobit fosfát vazebného partnera, tedy C-terminální segment může působit jako autoinhibitor potlačující nespécifické interakce 14-3-3 proteinu [53].

C-terminální konec kvasničných isoform BMH1 a BMH2 je ve srovnání s lidskými a rostlinnými isoformami významně delší a obsahuje tzv. polyglutaminovou (polyQ) sekvenci (viz. Obr. 4).

2.4 Isoformy 14-3-3 proteinů

14-3-3 proteiny byly nalezeny ve všech eukaryotických buňkách. V lidských buňkách bylo identifikováno sedm isoform 14-3-3 proteinu – β , γ , ϵ , η , σ , τ a ζ a všechny isoformy jsou si strukturně velmi podobné (viz. Obr. 5). Pět z těchto isoform (β , γ , ϵ , η a ζ) bylo nalezeno v mozkové tkáni a tvoří téměř 1 % ze všech rozpustných proteinů v mozku. Těchto pět isoform může nést označení α - η podle pořadí, v jakém byly eluovány na HPLC, ale isoformy α a δ jsou fosfoformy β a ζ [7].



Obr. 5 Stužkové reprezentace krystalových struktur sedmi lidských isoform 14-3-3 proteinů. Na obrázku je zřejmá vysoká podobnost všech lidských isoform (u každé isoformy je vidět navázaný vazebný partner); u isoformy τ je vidět tzv. His-Tag (histidinová kotva) převzato z [50].

V rostlinných buňkách bylo nalezeno patnáct isoform 14-3-3 proteinů [57]. Hlavní funkcí rostlinných 14-3-3 proteinů je regulace metabolismu uhlíku a dusíku.

V kvasinkách byly nalezeny dvě isoformy 14-3-3 proteinů. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nesou 14-3-3 proteiny označení Bmh1p a Bmh2p (geny BMH1 a BMH2) u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* Rad24p a Rad25p (geny rad24, rad25) [12].

2.5 Vazební partneři 14-3-3 proteinů

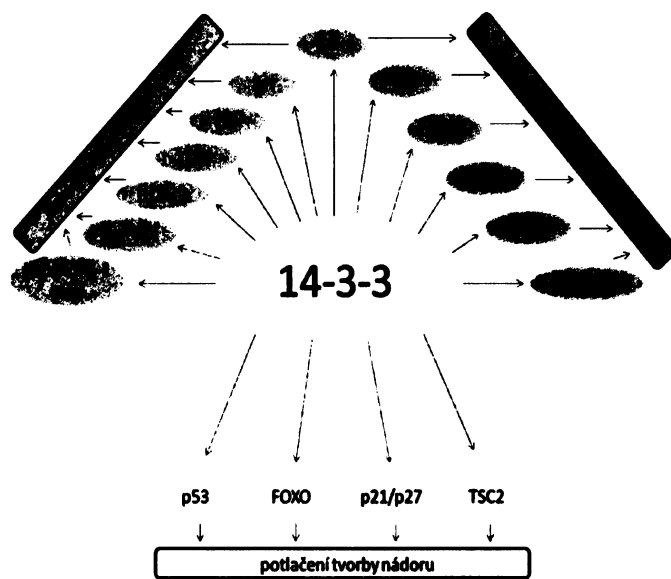
Zatím je známo přes 300 vazebných partnerů 14-3-3 proteinů, které zahrnují např. kinasy, proteiny účastnící se regulace buněčného cyklu, apoptózy, transkripční faktory, cytoskeletální proteiny aj. Některé příklady vazby 14-3-3 proteinů jsou uvedeny níže (viz. Obr. 6).

Jedním z ligandů 14-3-3 proteinů je protein p53. Tento protein zastává klíčovou funkci v procesu vzniku rakoviny. Jeho mutovaná forma byla nalezena ve více než 50 % lidských nádorů a je spojena s přechodem nádoru z benigní do maligní formy. Protein

p53 se váže na DNA a aktivuje přepis příslušných genů. V případě buněčného stresu a poškození DNA je p53 aktivován, spustí další obranné mechanismy, které zastaví buněčný cyklus a tím poskytuje čas pro opravu DNA. Je známo, že jednotlivé isoformy 14-3-3 proteinů v interakci s p53 proteinem ovlivňují pozitivně jeho funkci. Protein p53 může být fosforylován na dvou místech – Ser³⁷⁶ a Ser³⁷⁸. Fosforylace místa Ser³⁷⁶ maskuje vazebné místo pro 14-3-3 protein na Ser³⁷⁸. V případě buněčného stresu je Ser³⁷⁶ defosforylován a může tedy dojít k navázání 14-3-3 proteinu. Protein p53 v komplexu s 14-3-3 proteinem má větší afinitu k DNA a tím i větší transkripční aktivitu. Cílem těchto dějů je zamezení přenosu poškozené DNA na další buňky [4, 57, 58].

Dalším vazebným partnerem 14-3-3 proteinů je tuberin. Tuberin je protein s relativní molekulovou hmotností 200 000 a je kódován TSC2 (z angl. *Tuberous Sclerosis Complex*) tumor supresorovým genem. Mutace v TSC2 popř. v TSC1 (kóduje protein hamartin) vede k onemocnění zvané tuberózní skleróza, která je charakterizovaná vznikem hamartomat (útvary podobné nádorům), které postihují nejčastěji mozek, srdce, ledviny a kůži. Komplex TSC1/TSC2 inhibuje buněčný růst. 14-3-3 proteiny interagují s tímto komplexem prostřednictvím TSC2 a inhibují jeho funkci [57, 59, 60].

FOXO (z angl. *Forkhead box O*) transkripční faktory jsou důležité faktory při procesech kontroly buněčného cyklu, metabolismu, diferenciaci, buněčného stresu a apoptóze. Specificky se váží DNA sekvenci T(G/A)TTTTG, která je známá jako “insulin response element (IRE)“. Aktivita FOXO transkripčních faktorů je regulována fosforylací proteinkinasou B (PKB). Po fosforylaci dochází k navázání 14-3-3 proteinu za vzniku komplexu FOXO/14-3-3, který se transportuje z jádra buňky do cytoplasmy. 14-3-3 proteiny tedy negativně regulují funkci FOXO faktorů, protože transportem z jádra do cytoplasmy dochází k inhibici jejich funkce [61].



Obr. 6 Příklady vazebných partnerů 14-3-3 proteinů.

3. Cíle diplomové práce

1. Exprese a purifikace proteinů BMH2 WT, BMH2 W243, BMH2 W264 a BMH2 Δ C v bakteriálním expresním systému.
2. Studium vazebné afinity výše uvedených proteinů.
3. Studium konformace C-konce BMH2 proteinů pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie.
4. Studium oligomerního stavu BMH2 proteinů pomocí dynamického rozptylu světla a fluorescenční spektroskopie.

4. Použitý materiál

4.1 Chemikálie

agarosa	Roth (Karlsruhe, SRN)
akrylamid	Roth (Karlsruhe, SRN)
ampicilin	Biotika (Slovenská L'upca, Slovenská republika)
boritá kyselina	Lachema (Neratovice, Česká republika)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth (Karlsruhe, SRN)
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema (Neratovice, Česká republika)
1,4-dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe, SRN)
dodecylsulfát sodný (SDS)	Roth (Karlsruhe, SRN)
DpnI (restrikční enzym)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
ethanol	Lachema (Neratovice, Česká republika)
ethidium bromid	Sigma (St. Louis, USA)
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Roth (Karlsruhe, SRN)
glycerol	Penta (Chrudim, Česká republika)
heptahydrát síranu nikelnatého	Penta (Chrudim, Česká republika)
hydroxid sodný	Lachema (Neratovice, Česká republika)
chlorid draselný	Lachema (Neratovice, Česká republika)
chlorid sodný	Penta (Chrudim, Česká republika)
chlorovodíková kyselina	Lachema (Neratovice, Česká republika)
imidazol	Roth (Karlsruhe, SRN)
isopropanol	Lachema (Neratovice, Česká republika)
isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe, SRN)
LB Agar (Luria/Miller)	Roth (Karlsruhe, SRN)
LB Medium (Luria/Miller)	Roth (Karlsruhe, SRN)
lysozym	Serva (Heidelberg, SRN)
β -merkapt ethanol	Roth (Karlsruhe, SRN)
methanol	Lachema (Neratovice, Česká republika)
octová kyselina	Lachema (Neratovice, Česká republika)
oligonukleotidy	VBC-Genomics (Viedeň, Rakousko)
peptidy značené FITC (Raf-259, pRaf-259)	EZ Biolab (Westfield, USA)
persulfát amonný	Roth (Karlsruhe, SRN)
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, SRN)
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, SRN)

4.2 Materiál

dialyzační membrána, typ 27/32, cut off 14000	Roth (Karlsruhe, SRN)
---	-----------------------

E. coli BL21 (DE3)	Stratagene (La Jolla, USA)
E. coli TOP10	Stratagene (La Jolla, USA)
filtry 45 µm Rotilabo-Spritzenfilter (PVDF)	Roth (Karlsruhe, SRN)
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
JetQuick Plasmid Miniprep Spn Kit	Genomed (Löhne, SRN)
koncentrátor Centricon	Millipore (USA)
křemenné kyvety	Agilent (Santa Clara, USA)
MonoQ Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
Precisions Plus Protein Standards, Dual Color	Bio-Rad (Hercules, USA)
Superdex 75 prep grade	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
thrombin lidský	Sigma-Aldrich (USA)
vektor pET-15b	Novagen, Merck (Darmstadt, SRN)

4.3 Přístroje

Analytické váhy R160V	Sartorius (Goettingen, SRN)
Centrifuga 5415D (rotor F45-24-11)	Eppendorf (Hamburg, SRN)
Centrifuga 5804R (rotor A-4-44)	Eppendorf (Hamburg, SRN)
Centrifuga Biofuge 28 RS (rotor 3746)	Heraeus Sepatech (Hanau, SRN)
Centrifuga K80 (rotor S6/6,6)	MLW (Leipzig, SRN)
Horizontální agarosová elektroforéza	Omni-bio (Brno, Česká republika)
HPLC AKTA	Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko)
Iluminátor UVT 14-M	Herolab (Wiesloch, SRN)
Inkubátor	Melag (Berlín, SRN)
Magnetická míchačka Variomag Maxi, Komet	Thermo Scientific (Waltham, USA)
MasterCycler Personal	Eppendorf (Hamburg, SRN)
Peristaltická pumpa	Ismatec (Glattbrugg, Švýcarsko)
pH metr JenWay 3505	Felsted (Velká Británie)
Sonikátor 3 000 Misonix	Cole-Parmer (Vernon Hills, USA)
Spektrofluorimetr Photon Counting Spectrofluorimeter PC1	ISS (Champaign, USA)
Spektrofotometr Agilent 8453	Agilent (Santa Clara, USA)
SpectroScatter 201 (pro DLS)	RiNA (Berlin, SRN)
Třepačka Orbital Incubator	Gallenkamp (Loughborough, Velká Británie)
Třepačka HT Multitron	Infors (Bottmingen, Švýcarsko)
Vertikální polyakrylamidová elektroforéza	Bio-Rad (Hercules, USA)
Vodní lázeň	Memmert (Schwabach, SRN)
Vortex Zx3	Velp Scientifica (Milán, Itálie)
Zdroj pro horizontální elektroforézu	Omni-bio (Brno, Česká republika)
Zdroj pro vertikální elektroforézu Consort EV243	Sigma-Aldrich (USA)

5. Metody

5.1 Používané vektory

Pro práci byl použit expresní vektor pET-15b od firmy Novagen. Tento vektor obsahuje tzv. histidinovou kotvu (His-Tag) tzn. šest po sobě jdoucích histidinů. Po expresi tedy vznikl fúzní protein s histidinovou kotvou na N-konci odštěpitelnou thrombinem. Mezi místa pro restrikční endonukleasy BamH I a Nde I byla zaklonována cDNA pro BMH2 WT. Zaklonování cDNA bylo provedeno dříve v laboratoři Doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D.

5.2 Cílená mutagenese BMH2

Cílená mutagenese provedená pomocí PCR je metoda, která umožňuje získat mutace na vyžadovaném genu v přesně definovaném místě. Při mutagenesi se využívají komplementární oligonukleotidy (délky okolo 20 nukleotidů), které přibližně uprostřed obsahují žádanou mutaci. Kromě střední části musí být komplementarita oligonukleotidů s původní DNA maximální. Mým cílem byly mutace I237Stop, E243W a A264W v genu BMH2.

PCR (z angl. *Polymerase chain reaction*, polymerasová řetězová reakce) je amplifikační metoda, která umožňuje mnohonásobně namnožit daný úsek DNA, což usnadňuje její další analýzu. PCR byla vynalezena v roce 1983 K. B. Mullisem.

Reakční směs (viz. Tab. 3) byla vložena do termocyklátoru, na kterém byl nastaven cyklus, který popisuje Tab. 4.

10x Pfu ultra pufr	5 μ l
templátová DNA	1 μ l
dNTP mix	2,5 μ l
1. primer	2 μ l
2. primer	2 μ l
sterilní voda	36,5 μ l
polymerasa Pfu ultra	1 μ l

Tab. 3 Složení reakční směsi v mikrozkušavce pro provedení bodové mutagenese pomocí PCR.

95 ° C	1 min	
95 ° C	30 s	← 20x opakováno
49,1 ° C	1 min	
68 ° C	12 min	
68 ° C	12 min	
4 ° C	neomezeně dlouho	

Tab. 4 Podmínky nastavení programu na termocyklátoru.

Dvouvláknová DNA je při 95 ° C po dobu 30 s denaturována na dvě jednovláknové templátové molekuly DNA. Oligonukleotidové primery, které hybridizují při teplotě 49,1 ° C po dobu 1 min na obou stranách cílové DNA, řídí syntézu nových vláken. Jejich syntézu katalyzuje termostabilní DNA polymerasa od 5' konce k 3' konci vždy začínající od primerů.

5.3 Odstranění templátové DNA

Pro odstranění templátové DNA byl použit restriční enzym Dpn I, který specificky štěpí methylovanou DNA.

K reakční směsi po PCR bylo přidáno 1,5 µl enzymu Dpn I. Tato směs byla inkubována 90 minut při teplotě 37 ° C. Po inkubaci byl vzorek zmražen na -20 ° C.

5.4 Kontrola výsledku PCR reakce pomocí TBE agarosové elektroforézy

Pro kontrolu čistoty DNA vzniklé PCR reakcí byla provedena TBE agarosová elektroforéza. K tomu byl připraven 0,9 % agarosový gel smícháním agarosy a TBE pufru (viz. Tab. 5). Směs byla zahřívána k varu v baňce v mikrovlnné troubě a po mírném vychladnutí byla nalita do stojanu pro elektroforézu a vložen hřeben pro vytvoření jamek. Po vychladnutí gelu byl vložen stojan s gelem do elektroforetické vany, přelit TBE pufrem a odstraněn hřeben. Poté byly napipetovány vzorky roztoku DNA (k 15 µl směsi po PCR reakci bylo přidáno 10 µl vody a 4 µl vzorkového pufru) a standard velikostí DNA do vytvořených jamek. Přístroj byl připojen ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí (75 V) a elektroforéza probíhala 120 minut. Poté byl gel inkubován s roztokem ethidiumbromidu, který interkaluje mezi jednotlivé báze DNA a umožňuje vizualizaci v UV světle.

10x TBE pufr, 1 l	
Tris	107,8 g
EDTA	7,44 g
kyselina boritá	55 g
H ₂ O	dolít do 1 l

Tab. 5 Složení TBE pufru pro agarosovou elektroforézu.

5.5 Transformace plazmidu do buněk

Po ukončení inkubace směsi s enzymem Dpn I byla provedena transformace DNA do buněk *Escherichia coli* kmene TOP10 metodou tzv. teplotního šoku. Zmrazená směs buněk TOP10 (45 µl) byla opatrně rozehrívána na ledu a k ní bylo přidáno 3 µl směsi po PCR s odstraněnou templátovou DNA. Tato směs byla inkubována 20 minut na ledu (0 ° C). Poté byla zvýšena teplota mikrozkušavky obsahující směs buněk TOP10 a DNA ve vodní lázni na 42 ° C po dobu 45 s. Následovala inkubace mikrozkušavky se směsí 2 minuty na ledu (0 ° C). Poté bylo přidáno 450 µl tekutého LB média (viz. Tab. 6) temperovaného na 37 ° C. Výsledná směs byla inkubována 1 h při 37 ° C na třepačce při 200 rpm.

Po této inkubaci byla suspenze bakterií přelita na Petriho misky s pevným LB médiem (viz. Tab. 6) temperovaného na 37 ° C obsahující ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml. Roztok bakterií byl sterilně rozetřen po celé ploše Petriho misky. Následně byla miska s bakteriemi inkubována v inkubátoru při 37 ° C po dobu 15 hodin.

složení tekutého LB média, 1 l		složení pevného LB média, 0,5 l	
trypton	10 g	trypton	5 g
kvasničný extrakt	5 g	kvasničný extrakt	2,5 g
NaCl	10 g	NaCl	5 g
H ₂ O	doplnit do 1 l	agar	10 g
		H ₂ O	doplnit do 500 ml

Tab. 6 Složení tekutého a pevného LB média.

5.6 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí sady od firmy Qiagen. Nejprve byla připravena bakteriální kultura vždy z jedné kolonie, která vyrostla na agarosových miskách s ampicilinem. Jednotlivé kolonie byly přeneseny platinovým drátkem s očkem

do zkumavek s 5 ml tekutého LB média, do kterého bylo přidáno 5 μ l ampicilinu. Zkumavky s LB médiem byly předem vysterilizovány, platinový drátek pro přenos kolonií a hrdlo zkumavky bylo sterilizováno v plameni. Takto připravené zkumavky s přenesenými koloniemi byly inkubovány na třepačce při 37° C, 200 rpm po dobu 15 hodin.

Dalším krokem byla izolace plazmidové DNA. Sada od firmy Qiagen obsahuje podrobný návod a všechny pomůcky (roztoky G1-G4, GX, TE a mikrozskumavky) pro provedení izolace.

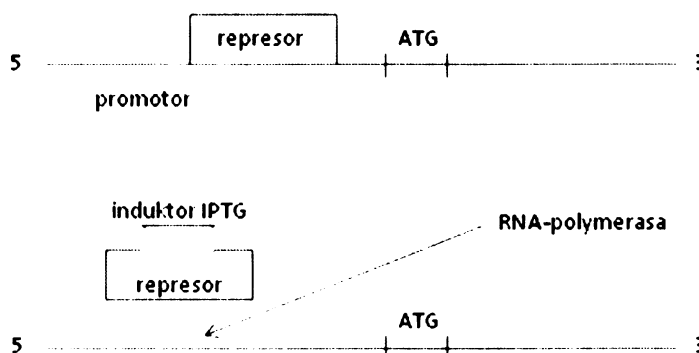
Konečnou fází tohoto procesu bylo získání čisté plazmidové DNA, jejíž část byla zaslána na sekvenaci.

5.7 Exprese BMH2 proteinů

Po ověření výsledku ze sekvenace byla provedena transformace plazmidové DNA do buněk BL21 (DE3) metodou teplotního šoku podle **kap. 5.5**. Výsledkem byla Petriho miska s narostlými bakteriálními koloniemi. Do 5 ml tekutého LB média temperovaného na 37° C bylo přidáno 5 μ l ampicilinu a sterilně přeneseny bakteriální kolonie. Tato směs byla inkubována 15 hodin při teplotě 37° C a 200 rpm.

Po inkubaci byla směs bakterií přenesena do 1 l tekutého LB média obsahující ampicilin (o finální koncentraci 100 μ g/ml) temperovaného na 37° C za konstantního třepání při 200 rpm. Pravidelně byla kontrolována absorbance při vlnové délce 600 nm vzhledem k čistému LB médiu.

Jakmile absorbance dosáhla hodnoty 0,8, byla indukována exprese tím, že bylo přidáno ke kultuře 2,5 ml 0,2 mol.dm⁻³ roztoku IPTG viz. **Obr. 7**. Exprese probíhala po dobu 12-ti hodin.



Obr. 7 Zahájení exprese induktorem IPTG.

5.8 Glycerolový roztok transformovaných bakterií

Glycerolový roztok transformovaných bakterií byl připraven ze směsi 5 ml tekutého LB média temperovaného na 37 ° C s 5 µl ampicilinu a sterilně přenesených bakterií. Tato směs byla inkubována 15 hodin při 37 ° C za konstantního třepání 200 rpm. Poté byla směs promíchána a bylo napipetováno 700 µl kultury do sterilní mikroskopické zkumavky s 300 µl sterilního glycerolu. Tato směs byla opět promíchána a zamrazena na -80 ° C.

5.9 Purifikace BMH2 proteinů

Po expresi následovala centrifugace buněk při teplotě 4° C, 3400 rpm po dobu 30 minut. Peleta buněk, která byla získána z exprese a centrifugace byla resuspendována ve 40 ml resuspendačního pufru (složení viz. Tab. 7) a zamrazena na -20° C.

resuspendační pufr	1x PBS pufr
1x PBS	$138 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$
1 mol.dm ⁻³ NaCl	$3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$
$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ imidazol	$8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$
$4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ β-merkptoethanol	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$

Tab. 7 Složení resuspendačního a 1x PBS pufru.

5.9.1 Sonikace buňek

K rozmrzlé suspenzi buněk byl přidán lysozym (finální koncentrace 100 µg/ml), který štěpí polysacharidy v buněčné stěně, aby byla přístupnější pro sonikaci. Suspenze buněk s lysozymem byla míchána 30 minut při teplotě 4° C. Poté byly buňky sonikovány na přístroji Sonicator3000 Misonix (Cole-Parmer, USA) při nastavení programu 6 (Tab. 8). S buňkami bylo manipulováno na ledu. Po sonikaci byly buňky centrifugovány 45 minut, 13500 rpm při 4° C. Pro afinitní chromatografii byl použit supernatant, který se dá skladovat při -80° C.

podmínky nastavení programu 6	
pulzy	10 s
pauza	20 s
výkon	57 W
pulzní doba	20 min

Tab. 8 Podmínky nastavení programu 6 při sonikaci.

5.9.2 Chelatační afinitní chromatografie

Chelatační afinitní chromatografie (IMAC, z angl. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) je založena na interakci iontů přechodných kovů s ligandy. Jako stacionární fáze byla použita chelatuující sepharosa (iminodiacetát-sepharosa) s navázanými Ni^{2+} ionty. Tento materiál velmi dobře váže exprimované fúzní proteiny obsahující na svém N-konci tzv. histidinovou kotvu (šest histidinů za sebou, angl. His-Tag), která umožňuje vazbu na imobilizované Ni^{2+} kationty. Samotná interakce mezi kovem a proteinem je způsobena vznikem koordinační vazby mezi akceptorem elektronů – kovem a donorem elektronů – aminokyselinovým zbytkem s vysokou elektronovou hustotou (His) orientovaném na povrchu proteinu.

Nejprve byla kolona naplněná chelatuující sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko) připojena na peristaltickou pumpu a promyta při rychlosti průtoku 3 ml/min:

- 3 CV H_2O (zkr. CV, z angl. Column Volume, objem kolony, 3 ml)
- 3 CV regeneračního (tzv. Stripp, pro regeneraci kolony, složení regeneračního roztoku viz. **Tab. 9**) roztoku
- 4 CV H_2O
- 10 CV $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NiSO}_4$ (pro aktivaci kolony, resp. pro navázání Ni^{2+} na iminodiacetát)
- 6 CV H_2O
- 4 CV pufru E (složení pufru E viz. **Tab. 10**)
- nanesení supernatantu získaného po sonikaci a centrifugaci buněk
- 6 CV pufru E (složení pufru E viz. **Tab. 10**)
- 6 CV 10 % pufru F (složení pufru F viz. **Tab. 10**) v pufru E (složení pufru E viz. **Tab. 10**)
- eluce 2 CV pufru F (složení pufru F viz. **Tab. 10**)

Všechny roztoky byly vychlazeny na teplotu 4°C , kolona byla v průběhu chromatografie ochlazována z vnější strany vlhkou buničinou. Frakce byly jímány do připravených 1,5 ml mikrozkušavek temperovaných na 0°C .

K regeneraci kolony bylo použito:

3 CV regeneračního roztoku (složení regeneračního roztoku viz. **Tab. 9**)

4 CV H₂O

regenerační roztok	aktivující roztok
0,5 mol.dm ⁻³ NaCl	0,1 mol.dm ⁻³ NiSO ₄
0,1 mol.dm ⁻³ EDTA	

Tab. 9 Složení regeneračního roztoku pro regeneraci kolony a aktivujícího roztoku.

Pro uskladnění byla kolona částečně promyta 4 CV 20 % ethanolu v H₂O a uložena do 4° C.

pufř E (promývací)	pufř F (eluční)
1x PBS	1x PBS
0,5 mol.dm ⁻³ NaCl	0,5 mol.dm ⁻³ NaCl
2.10 ⁻³ mol.dm ⁻³ β-merkptoethanol	2.10 ⁻³ mol.dm ⁻³ β-merkptoethanol
1.10 ⁻³ mol.dm ⁻³ imidazol	0,6 mol.dm ⁻³ imidazol
	10 % glycerol

Tab. 10 Složení vodícího pufř E a elučního pufř F pro afinitní chromatografii.

5.9.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE je označení pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu, která se provádí v prostředí 0,1 % dodecylsulfátu sodného. Proteiny v gelu mají uniformní záporný náboj a pro jejich separaci je proto důležitá jen jejich velikost. Tato metoda nás informuje o čistotě proteinu ve vzorku.

Polyakrylamidová elektroforéza byla prováděna ve vertikálním uspořádání na přístroji Consort EV243 (Sigma-Aldrich, USA) s 12 % separačními gely (schopnost separace je 15-60 tisíc, složení gelu viz. **Tab. 11**). Plochá skla, která tvoří deskový gel o tloušťce 1 mm byla svorkami upevněna do stojanu. Mezi ně byl nalit roztok separačního gelu (složení separačního gelu viz. **Tab. 11**), který byl ihned převrstven isopropanolem pro odstranění vzduchových bublin a případných nerovností. Po ztuhnutí separačního gelu byl filtračním papírem odstraněn isopropanol a na gel nalit roztok zaváděcího gelu (složení zaváděcího gelu viz. **Tab. 11**), do kterého byl ihned vsunut hřebínek pro vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí zaváděcího gelu byl odstraněn hřebínek a gel byl vložen do stojanu pro SDS-PAGE a zalit vodícím pufřem (složení vodícího pufř viz. **Tab. 12**).

separační gel, 12 %		zaváděcí gel	
3 ml	akrylamid/ bis-akrylamid	0,5 ml	akrylamid/ bis-akrylamid
2 ml	pufř pro separační gel s 10 % SDS	1 ml	pufř pro zaváděcí gel s 10 % SDS
2,6 ml	H ₂ O	2,25 ml	H ₂ O
70 µl	10 % persulfát amonný	70 µl	10 % persulfát amonný
8 µl	TEMED	8 µl	TEMED

Tab. 11 Složení 12 % separačního a zaváděcího gelu.

Jednotlivé jamky byly pufřem důkladně promyty pro odstranění zbytků ztuhlého gelu. Dále bylo připraveno 9 mikrozkuvek, do kterých bylo napipetováno 10 µl vzorku z jednotlivých frakcí z chelatační afinitní chromatografie a ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl vzorkového pufřu. Vzorkový pufř obsahuje β-merkptoethanol, díky jeho působení dochází k rozrušení kvartérní a terciární struktury. Vzorky se vzorkovým pufřem byly krátce povařeny (1 min, 100 ° C) a Hamiltonovou injekční stříkačkou byly nanoseny do jamek gelu. Do první jamky byl nanesen standard molekulových hmotností.

Vzorky byly separovány aplikací stejnosměrného proudu o napětí 200 V. Po dokončení elektroforézy byl gel vložen do barvicí lázně (složení barvicí lázně viz. **Tab. 13**) pro vizualizaci separovaných proteinů na dobu 60 minut. Pro odbarvení byl gel vložen do odbarvovací lázně (složení odbarvovací lázně viz. **Tab. 13**) na dobu 120 minut. Složení ostatních roztoků použitých při SDS elektroforéze viz. **Tab. 14 a 15**.

10x vodící pufř pro SDS	
Tris	30 g
glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	doplnit do 1 l

Tab. 12 Složení vodícího pufřu.

barvicí lážeň		odbarvovací lážeň	
Coomasie Blue R-250	1 g	methanol	100 ml
methanol	450 ml	konc. kyselina octová	100 ml
H ₂ O	450 ml	H ₂ O	800 ml
konc. kyselina octová	100 ml		

Tab. 13 Složení barvicí a odbarvovací lázně.

4x pufr pro separační gel		4x pufr pro zaváděcí gel	
75 ml	1,5 M Tris-HCl o pH 8,8	50 ml	1 M Tris-HCl o pH 6,8
4 ml	10 % SDS	4 ml	10 % SDS
21 ml	H ₂ O	46 ml	H ₂ O

Tab. 14 Složení pufrů pro separační a zaváděcí gel.

5x pufr pro přípravu vzorků		akrylamid/bis-akrylamid	
1 mol.dm ⁻³ Tris-HCl o pH 6,8	0,6 ml	akrylamid	29,2 g
50 % glycerol	5 ml	bis-akrylamid	0,8 g
10 % SDS	2 ml	H ₂ O	dolít do 100 ml
β-merkapt ethanol	0,5 ml		
1 % bromfenolová modř	1 ml		
H ₂ O	0,9 ml		

Tab. 15 Složení pufru pro přípravu vzorků a akryl/bis-akrylamidu.

5.9.4 Dialýza

Dialýza je děj, při kterém jsou od sebe odděleny látky s rozdílnou velikostí. Prakticky pak přechází látky přes polopropustnou membránu z prostředí s vyšší koncentrací těchto látek do prostředí s nižší koncentrací.

Dialýza byla provedena pomocí dialyzační membrány (pro proteiny, které mají relativní $M_w > 14\ 000$), do které byl napipetován vzorek proteinu a uzavřen dialyzačními svorkami. Poté byla dialyzační membrána se vzorkem vložena do 1 l dialyzačního pufru temperovaného na 4° C (složení dial. pufru viz. **Tab. 16**) na dobu 15 hod při teplotě 4° C za konstantního míchání.

dialyzační pufr, 1 l	
20.10 ⁻³ mol.dm ⁻³	Tris pH 7,5
5.10 ⁻³ mol.dm ⁻³	EDTA
2.10 ⁻³ mol.dm ⁻³	β-merkapt ethanol
10%	glycerol

Tab. 16 Složení dialyzačního pufru.

5.9.5 Thrombinové štěpení

cDNA pro BMH2 WT byla zaklonována do vektoru pET-15b, který obsahuje tzv. His-Tag (histidinovou kotvu). Po expresi proteinu vznikl fúzní BMH2 WT protein, který na svém N-terminálním konci nesl histidinovou kotvu, jejíž vazby s nikelnatými ionty bylo využito při chelatační afinitní chromatografii.

Pro odštěpení His-Tagu byl použit lidský trombin (Sigma-Aldrich, USA) v poměru 2 U/mg proteinu. Složení pufru, ve kterém byla provedena dialýza s trombinem viz. **Tab. 17**.

Dialýza byla provedena při 4° C po dobu 24 hodin.

dialyzační pufr, 1 l	
20.10 ⁻³ mol.dm ⁻³	Tris pH 7,5
1.10 ⁻³ mol.dm ⁻³	EDTA
1.10 ⁻³ mol.dm ⁻³	DTT
10 %	glycerol

Tab. 17 Složení dialyzačního pufru pro odštěpení histidinové kotvy pomocí trombinu.

Pro kontrolu odštěpení histidinové kotvy trombinem byla použita metoda SDS-PAGE viz. **kap. 5.9.3**. Na gel bylo nanášeno 10 µl vzorku před trombinovým štěpením a 10 µl vzorku po trombinovém štěpení smíchaného vždy s 5 µl vzorkového pufru. Jako marker byl použit standard molekulových hmotností Dual Color (Bio-Rad).

5.9.6 Aniontově-výměnná chromatografie

Aniontově-výměnná chromatografie byla provedena na koloně s náplní MonoQ Sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko) připojené k přístroji AKTApriTM (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC. Pro vyhodnocení dat byl použit program Unicorn 5.01.

Kolona o objemu 1 ml byla proplachována vodícím pufrem QE (viz. **Tab. 18**) do té doby, než dosáhla vodivosti a absorpance při vlnové délce 280 nm konstantní hodnoty. Rychlost průtoku byla nastavena na 0,5 ml/min. Po dosažení konstantních hodnot byly na kolonu nanášeny vzorky. Maximální objem nanášecí smyčky je 2 ml. Mezi jednotlivými nánosy byla kolona proplachována vodícím pufrem. Frakce eluovaly při 0 % - 100 % gradientu elučního pufru (**Tab. 18**) a byly jímány po 1,5 ml. Tlak v koloně byl 0,42 MPa a všechny pufrы a kolona byly vychlazeny na teplotu 4° C. Z jednotlivých frakcí bylo odebráno vždy 10 µl pro SDS-PAGE.

pufr QE (vodící)	pufr QF (eluční)
$50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 8	$50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 8
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DTT	$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DTT
	$1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl

Tab. 18 Složení vodícího a elučního pufru používaných při aniontově-výměnné chromatografii.

Vybrané frakce z aniontově-výměnné chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, která je uvedena v **kap. 5.9.3**.

5.9.7 Zkoncentrování proteinu

Pro zkoncentrování proteinu byly smíseny všechny požadované frakce, které byly získány elucí při aniontově-výměnné chromatografii. Tyto frakce byly přelity do koncentrátoru Centricon YM-10 (Milipore, USA), vloženy do centrifugy Centrifuge 5804R s rotorem A-4-44 a ponechány centrifugovat při podmínkách 3500 rpm, 4° C a 30 min do objemu 0,5 ml.

5.9.8 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metoda, která umožňuje dělit molekuly podle jejich velikostí. Molekuly jsou vymývány z kolony postupně od největších k nejmenším. Tato metoda je vhodná i pro čištění (např. k odstranění agregovaného proteinu) a k charakterizaci biomakromolekul.

Gelová permeační chromatografie byla provedena na přístroji HPLC AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona s náplní Superdex 75 (Amersham Biosciences, Švédsko) byla proplachována vodícím pufrém (viz. **Tab. 19**) rychlostí průtoku 0,5 ml/min temperovaným na teplotu 4° C. Po ustálení kolony byl nanesen vzorek o objemu 0,5 ml pro tuto kolonu a jímány frakce po 0,5 ml, ze kterých bylo odebráno 10 µl pro následnou SDS-PAGE, pomocí které byla ověřena čistota proteinu. Tlak v koloně byl 0,42 MPa.

Pro zaznamenání a vyhodnocení dat byl použit program *Unicorn 5.01*.

Koncentrace vypurifikovaného proteinu byla stanovena pomocí měření absorbance na spektrofotometru Agilent při vlnové délce 280 nm. K výpočtu koncentrace proteinu byly použity hodnoty (viz. **Tab. 20**) nalezené na serveru *www.expasy.org* v programu *ProtParam tool*.

pufr pro gelovou permeační chromatografii

$20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 7,5

$500 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl

$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA

10 % glycerol

$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DTT

Tab. 19 Složení pufru používaného při gelové permeační chromatografii.

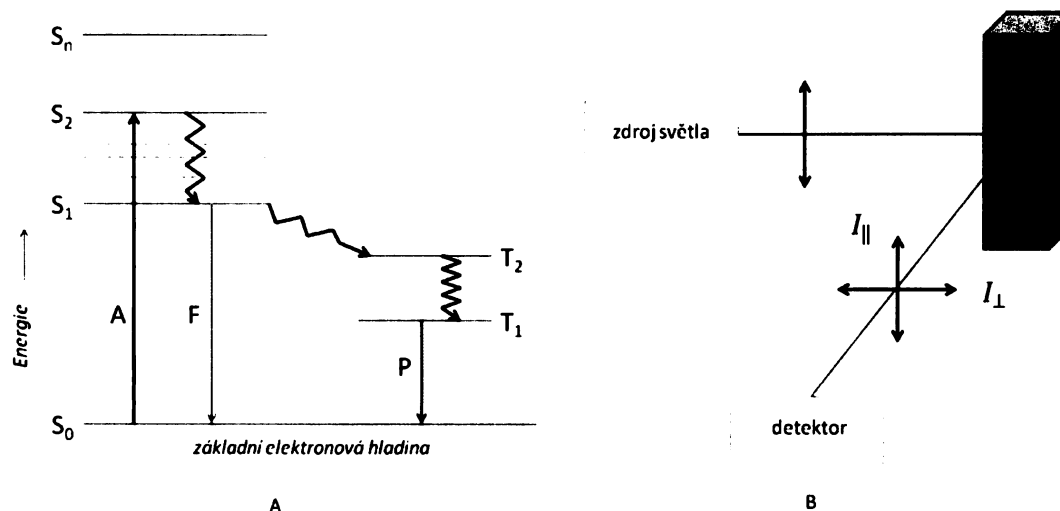
název proteinu	molární absorpční koeficient při $\lambda_{280} \text{ nm}$ [$\text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	relativní molekulová hmotnost
BMH2 WT	0,930	31061,3
BMH2 ΔC	1,073	26912,1
BMH2 W243	0,753	31040,3
BMH2 W264	0,752	31098,3

Tab. 20 Hodnoty použité k výpočtu koncentrace proteinů [zdroj www.expasy.org].

Vybrané frakce z gelové permeační chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, která je uvedena v kap. 5.9.3.

5.10 Charakterizace vazebných vlastností BMH2 proteinů pomocí stacionární anizotropie fluorescence

Fluorescence se teoreticky popisuje Jablonskiho diagramem (Obr. 8 A).



Obr. 8

A) *A - absorpce fotonů, F - fluorescence (emise), P - fosforescence, S - singletní hladiny, T - tripletní hladiny*

Nejméně vázaný elektron se v molekule nachází na hladině S_0 . Tento elektron je schopen absorbovat světelné kvantum a přejít ze singletního stavu S_0 do singletních stavů S_1, S_2, \dots, S_n a vybudit fluorescenci. Fluorescenční spektra nejsou závislá na budící vlnové délce. To je způsobeno tím, že po absorpci elektron vždy přejde do S_1 nejnižší vibrační hladiny a odtud zpět do základní hladiny. Na hladině S_1 se může elektron zpozdit – doba, po kterou elektron zůstane na hladině S_1 se nazývá doba života τ a je charakteristická pro daný fluorofor. Pro pozorování fluorescence musíme látku nejen excitovat, ale musí být i nenulový kvantový výtěžek. Pokud má látka malý kvantový výtěžek, nemusí docházet k žádnému zářivému přechodu, nebude tedy pozorována fluorescence. Kvantový výtěžek je dán poměrem počtu emitovaných fluorescenčních fotonů k počtu fotonů absorbovaných podle rovnice 1 [62].

$$\Phi = n_e/n_w, \Phi \leq 1 \quad (1)$$

B) *Měření v pravouhlém uspořádání. Měření intenzity v rovnoběžném a kolmém směru k vektoru intenzity elektrického pole použitého záření.*

Disociační konstanty vazby fosforylovaného peptidu na BMH2 proteiny byly stanovoveny pomocí změn stacionární anizotropie fluorescence. K těmto studiím byl použit peptid označovaný jako pRaf-259 (EZBiolab, USA) s FITC fluorescenční značkou na N-konci o koncentraci $18 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (sekvence peptidu je FITC-Ahx-LSQRQRST(pS)TPNVHVMV, kde, pS značí fosfoserin, Ahx značí 6-aminohexanovou kyselinu, přes kterou je vázán fluoresceinisothiokyanát FITC).

Vzorky BMH2 WT, BMH2 ΔC , BMH2 W264 a BMH2 W243 byly dialyzovány po dobu 24 hodin při teplotě 4°C v dialyzačním pufru o složení (viz. Tab. 21). Poté byla spektrofotometricky stanovena jejich koncentrace. K fluorescenčním měřením byla používána křemenná kyveta, ve které byla nejprve proměřena excitační a emisní spektra peptidu pRaf-259. Spektra byla měřena na spektrofluorimetru ISS PC1 při 20°C a nastavení lampy na 12 A. Peptid byl naředěn puftrem (složení viz. Tab. 21) na finální koncentraci $300 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Fluorescence byla excitována při 490 nm a emise byla detekována při 520 nm. Poté byl do kyvety titrován roztok proteinu, obsah kyvety byl promíchán pipetou, ponechán 2 minuty inkubovat při teplotě 20°C a následně byla změřena anizotropie fluorescence roztoku r_{obs} . Vzorky byly excitovány lineárně polarizovaným světlem a intenzita fluorescence byla měřena v rovnoběžném a kolmém směru vzhledem k rovině polarizace záření použitého k excitaci (viz. Obr. 8 B). Hodnoty anizotropie fluorescence byly počítány pomocí rovnice 2. Takto bylo změřeno 14 bodů titrační křivky a každé měření bylo 5-krát opakováno pro každou formu BMH2 proteinu.

dialyzační pufr	
$50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	Tris-HCl pH 7,5
$100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	NaCl
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	EDTA
10 % (v/w)	glycerol
$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	DTT

Tab. 21 Složení dialyzačního pufru pro fluorescenční měření.

Z těchto měření byly získány hodnoty anizotropie fluorescence r_{obs} , které jsou závislé na velikosti a tvaru molekuly fluoroforu a viskozitě okolního prostředí a charakterizují míru depolarizaci fluorescence. Naměřená data byla zpracována v programech LabDat_v.1.6, Microsoft Office Excel a Microcal Origin 6.0. Ze získaných hodnot r_{obs} byla vypočítána frakce navázaného peptidu f_B podle rovnice 3. Parametr r_{min} je hodnota anizotropie fluorescence samotného peptidu, r_{max} je hodnota anizotropie fluorescence v saturaci. Parametr Q (korekce na změnu kvantového výtěžku) byl vypočítán jako podíl i-té naměřené a počáteční intenzity. Výsledná závislost f_B na koncentraci BMH2 (korigovaná na změnu objemu během titrace) byla fitována podle rovnice 4 pro určení hodnoty K_D [62].

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

$$f_B = \frac{(r_{obs} - r_{min})}{(r_{max} - r_{obs}) \cdot Q + (r_{obs} - r_{min})} \quad (3)$$

$$f_B = \frac{1}{2 [peptid]} \cdot (K_D + [peptid] + [1433] - \sqrt{(K_D + [1433] + [peptid])^2 - 4 \cdot [peptid] \cdot [1433]}) \quad (4)$$

5.11 Označení BMH2 proteinů fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS

Kovaletní modifikace BMH2 proteinů obsahující jeden cysteinový zbytek na pozici 194 se sondou 1,5-IAEDANS, která interaguje se sulfhydrylovou (-SH) skupinou cysteinu, byla provedena následovně. Protein (o koncentraci $50\text{-}70 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$) byl v pufru

(viz. **Tab. 22**) smíchán s fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS v molárním poměru 1:40 a inkubován při 30 ° C 2 hodiny. Poté byl inkubován 15 hodin ve tmě. Nenavázaná sonda 1,5-IAEDANS byla odstraněna gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 75 10/300 GL. Pufr pro gelovou permeační chromatografii viz. **Tab.22**. Stechiometrie byla určena porovnáním absorbance proteinu při 280 nm s absorbancí navázané IAEDANS sondy měřené při 336 nm (molární absorpční koeficient 1,5-IAEDANS je $5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

pufr pro značení BMH2 proteinů 1,5-IAEDANS	
$50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	Tris-HCl pH 7,5
$100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	NaCl
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	EDTA
10 % (v/w)	glycerol

Tab. 22 Složení pufru pro značení fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS.

5.12 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie se měří pomocí pulzní excitace (nebo fázově modulovaného budícího záření) na rozdíl od ustálené (stacionární, steady state) fluorescenční spektroskopie. Délka pulzu bývá obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku. Metodou časově rozlišené fluorescenční spektroskopie je možné přímo sledovat časový průběh deaktivace excitovaného stavu fluoroforů a podává nám také informaci o dynamice - rotaci molekul.

Důležitým parametrem je doba dohasínání τ (doba života excitovaného stavu), která udává dobu mezi excitací molekuly (absorbací fotonu) a emisí světla při návratu molekuly do základního stavu. Měřením časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence můžeme určit rotačně-korelační časy molekul. Tyto parametry popisují rychlost rotační difuze fluoroforu. Měření časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence při pulzním buzení poskytuje mnohem více informací o rotačních pohybech fluoroforu než ustálená (steady-state) fluorescence. Ustálená fluorescence totiž poskytuje zprůměrované hodnoty měřených parametrů [62].

Všechna časově rozlišená měření byla provedena ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. K měřením byl využit fluorimetr pro časově rozlišenou fluorescenci. Jako zdroj excitačního záření sloužil pikosekundový barvivový laser (Spectra Physics, model 375). Detekce byla založena na

časově korelovaném sčítání jednotlivých fotonů (single photon counting detector) a detektor obsahoval fotonásobič (Hamamatsu, R3809U-50). Fluorescence dansylu byla excitována při vlnové délce 315 nm a emise byla měřena při vlnové délce 400 nm pomocí monochromátoru a tzv. cut-off filtru, který blokoval všechny vlnové délky kratší než 400 nm. Tryptofanová fluorescence byla excitována při 298 nm (původní emise laseru byla při 596 nm, následovalo zdvojení frekvence – výsledná vlnová délka 298 nm). Šířka vstupních a výstupních štěrbin byla nastavena na 15 nm, před první štěrbinou se nacházel barevný filtr (Zeiss, UG1) pro odstranění rozptýleného světla. Vzorky byly umístěny do termostatického držáku a všechna měření byla provedena v 22 ° C v pufru viz. **Tab. 23**. Koncentrace BMH2 proteinů byla $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

pufr pro měření	
$20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Tris-HCl pH 7,5
$100-500 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	NaCl
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	EDTA
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	DTT

Tab. 23 Složení pufru pro měření časově rozlišené fluorescenční spektroskopie.

Bylo předpokládáno multiexponenciální dohasínání fluorescence:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (5)$$

kde τ_i jsou střední doby života excitovaného stavu a α_i jsou odpovídající amplitudy. Naměřené intenzity byly analyzovány metodou maximální entropie (SVD-MEM) [63]. Takto byly získány amplitudy α_i , které reprezentují distribuci doby života τ_i v i-tém dohasínání. Střední doby života excitovaného stavu byly vypočítány podle rovnice:

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \tau_i \quad (6)$$

Frakční intenzita f se vypočítá podle rovnice:

$$f_i = \alpha_i \tau_i / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (7)$$

Dohasínání anisotropie fluorescence $r(t)$ bylo měřeno na základě dohasínání rovnoběžné $I_{||}(t)$ a kolmé $I_{\perp}(t)$ složky. Data byla získána za stejných podmínek a analyzována metodou maximální entropie (SVD-MEM). Anisotropie byly analyzovány pro sadu exponenciál podle rovnice:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-t/\phi_i} \quad (8)$$

kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačně korelačních časů ϕ_i . β_i souvisí s počáteční anisotropií r_0 podle následující rovnice:

$$r_0 = \sum_i \beta_i \quad (9)$$

5.13 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS) je také znám jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo jako fotokorelační spektroskopie (PCS). Principem dynamického rozptylu je měření světla rozptýleného molekulami ve vzorku v průběhu času. Všechny molekuly se v roztoku pohybují Brownovým pohybem, který způsobí změnu intenzity. Pokud by byly molekuly v roztoku stacionární, množství rozptýleného světla (intenzita) by bylo konstantní.

Změna intenzity je tedy přímo závislá na pohybu molekuly. Pohyb molekul je ovlivněn teplotou (čím vyšší teplota, tím rychleji se molekuly pohybují), viskozitou rozpouštědla (čím vyšší viskozita rozpouštědla, tím pomaleji se molekuly pohybují) a velikostí molekul (čím vyšší je velikost molekul, tím pomaleji se molekuly pohybují). Pokud jsou teplota a viskozita rozpouštědla konstantní, proměnlivost intenzity rozptýleného světla je potom pouze závislá na velikosti (hydrodynamickém objemu) molekuly.

Metodou dynamického rozptylu světla byly měřeny vzorky BMH2 W243, BMH2 W264 a BMH2 ΔC , které byly nejprve přefiltrovány přes 45 μm filtr. K měřením byla použita kyveta dodávaná s přístrojem SpectroScatter 201 (RiNA, SRN).

6. Výsledky

6.1 Cílená mutagenese BMH2

Hlavním cílem této práce bylo studium konformace C-koncového segmentu BMH2 proteinu. Vhodnou technikou pro studium struktury proteinů je fluorescenční spektroskopie. Kvasničný gen pro BMH2 obsahuje přirozeně dva tryptofany (W) na pozicích 61 a 233. Abych mohla ke studiu vlastností C-konce použít tryptofanovou fluorescenci, musela jsem nejdříve připravit mutanty proteinu BMH2, které obsahují pouze jeden tryptofanový zbytek umístěný na C-konci (více W zbytků by znemožnilo detailní analýzu fluorescenčních dat). Pro vytvoření těchto mutantů byla použita verze BMH2, kde již byly oba přirozeně se vyskytující W nahrazeny za F (tento konstrukt jsem dostala od RNDr. V. Obšilové, Ph.D.). Cílem bodové mutagenese bylo vnesení W zbytku buď na pozici 243 (tzn. před polyQ sekvenci, mutace E243W) nebo 264 (za polyQ sekvenci, mutace A264W) na C-konci BMH2. Tyto mutanty umožní studium konformace C-konce pomocí tryptofanové fluorescence. Dále byl připraven mutant BMH2, který byl zkrácen na C-konci tak, aby zcela chyběl C-terminální segment. Tento mutant byl připraven mutací na pozici 237 (na této pozici byl zaměněn isoleucin (I) za stop kodon). C-terminálně zkrácený BMH2 mi umožní zjistit do jaké míry je přítomnost C-konce důležitá pro vazebné vlastnosti BHM2 proteinu.

K mutaci byly použity oligonukleotidy (dlouhé 33 bází) shodné s verzí genu pro BMH2 kromě prostředního kodonu, který je zvýrazněn. Kodon pro isoleucin ATT byl nahrazen stop kodonem TAA, kodon pro kyselinu glutamovou GAA byl nahrazen kodonem pro tryptofan TGG a kodon pro alanin GCT byl nahrazen kodonem pro tryptofan TGG.

Část sekvence kvasničného BMH2 před mutací na 237 pozici:

	L232	W233	T234	S235	D236	I237	S238	E239	S240	G241	Q242	
5'	TTA	TGG	ACC	TCT	GAT	ATT	TCT	GAA	TCT	GGT	CAA	3'

Primery pro mutaci BMH2 I237Stop:

	L232	W233	T234	S235	D236	I237	S238	E239	S240	G241	Q242	
up 5'	TTA	TGG	ACC	TCT	GAT	TAA	TCT	GAA	TCT	GGT	CAA	3'
down 5'	TTG	ACC	AGA	TTC	AGA	TTA	ATC	AGA	GGC	CCA	TAA	3'

Část sekvence kvasničného BMH2 před mutací na 243 pozici:

	S238	E239	S240	G241	Q242	E243	D244	Q245	Q246	Q247	Q248	
5'	TCT	GAA	TCT	GGT	CAA	GAA	GAT	CAA	CAA	CAA	CAA	3'

Primery pro mutaci BMH2 E243W:

	S238	E239	S240	G241	Q242	E243	D244	Q245	Q246	Q247	Q248	
up 5'	TCT	GAA	TCT	GGT	CAA	TGG	GAT	CAA	CAA	CAA	CAA	3'
down 5'	TTG	TTG	TTG	TTG	ATC	CCA	TTG	ACC	AGA	TTC	AGA	3'

Část sekvence kvasničného BMH2 před mutací na 264 pozici:

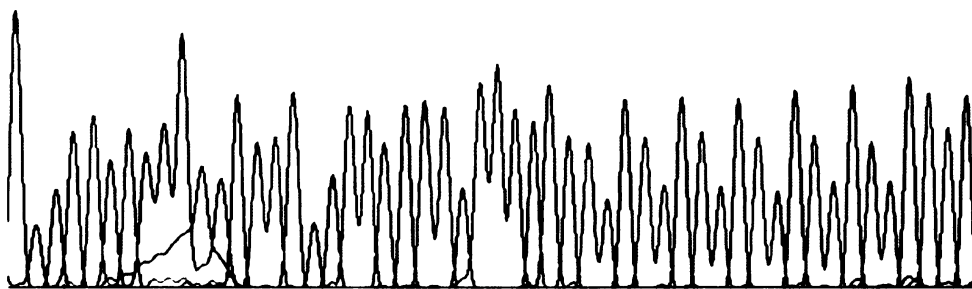
	Q259	Q260	Q261	A262	P263	A264	E265	Q266	T267	Q268	G269	
5'	CAA	CAA	CAA	GCT	CCA	GCT	GAA	CAA	ACT	CAA	GGT	3'

Primery pro mutaci BMH2 A264W:

	Q259	Q260	Q261	A262	P263	A264	E265	Q266	T267	Q268	G269	
up 5'	CAA	CAA	CAA	GCT	CCA	TGG	GAA	CAA	ACT	CAA	GGT	3'
down 5'	ACC	TTG	AGT	TTG	TTC	CCA	TGG	AGC	TTG	TTG	TTG	3'

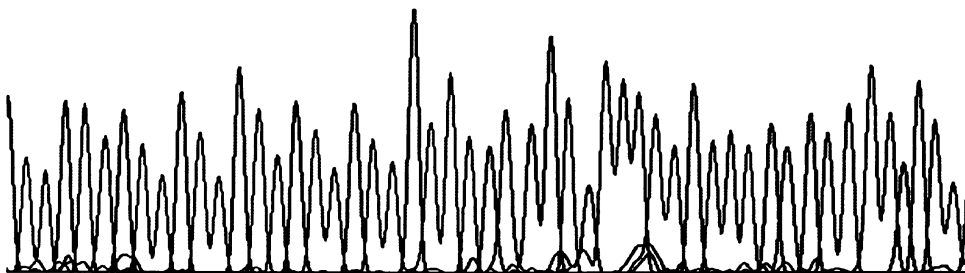
Výsledné zmutované plasmidové DNA byly zaslány na sekvenaci (viz. Obr. 9, 10, 11) do sekvenační laboratoře Dr. J. Felsberga v MBÚ AV ČR, v.v.i.

800 810 820 830 840 850
 T C I G A T A T T T C I G A A T C I G G T C A A T G G G A T C A A C A A C A A C A A C A A C A C A G C



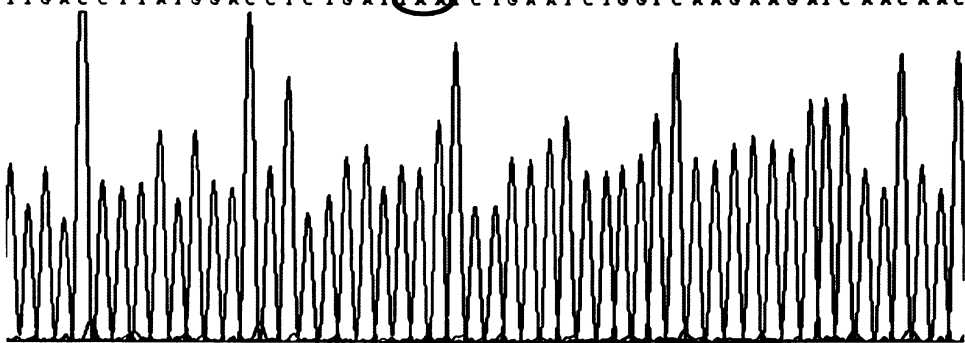
Obr. 9 Část sekvenačního elektroforeogramu pro mutovaný gen BMH2. Červeně označený triplet ukazuje místo mutace, kde byl mutagenézí změněn kodon GAA pro E za kodon TGG pro W (v textu značeno BMH2 W243).

880 890 900 910 920 9
 C A C A G C A A C A A C A G C A A C A A C A A G C T C C A **TGG** A A C A A A C T C A A G G T G A A



Obr. 10 Část sekvenčního elektroforeogramu pro mutovaný gen BMH2. Červeně označený triplet ukazuje místo mutace, kde byl mutagenézí změněn kodon GCT pro A za kodon TGG pro W (v textu značeno BMH2 W264).

930 940 950 960 970 980
 I T G A C C I I A I G G A C C I C I G A I T **TAA** C I G A A T C I G G I C A A G A A G A T C A A C A A C



Obr. 11 Část sekvenčního elektroforeogramu pro mutovaný gen BMH2. Červeně označený triplet ukazuje místo mutace, kde byl mutagenézí změněn kodon ATT pro I za kodon TAA pro Stop (v textu značeno BMH2 ΔC).

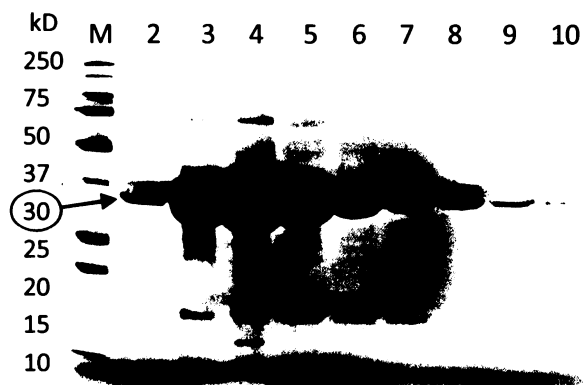
6.2 Expese a purifikace proteinů

Expresi každého z BMH2 proteinů jsem provedla v buňkách BL21 (DE3) v osmi litrech LB média. Expese byla zahájena induktorem IPTG viz. **kap. 5.7**.

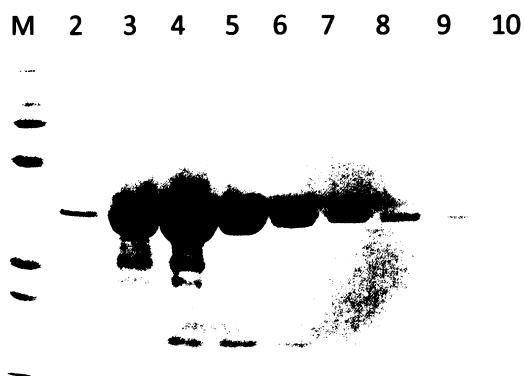
6.2.1 Chelatační afinitní chromatografie

Kvasničný 14-3-3 protein označovaný jako BMH2 má díky vektoru pET-15b na svém N-terminálním konci tzv. histidinovou kotvu (His-Tag), tedy šest po sobě jdoucích histidinů, jejichž afinita k dvojmocným kationtům kovů se využívá při chelatační afinitní chromatografii. V mém případě byly použity kationty Ni^{2+} . Pomocí vazby histidinů s Ni^{2+} chelatovanými na koloně se BMH2 protein zachytil, na rozdíl od ostatních proteinů, které kolonou nebyly zadržovány. SDS-PAGE byla použita k ověření čistoty proteinu viz. **Obr. 12 a 13**. Jako standard molekulových hmotností byl použit standard Dual Color od

firmy BioRad. Tyto gely ukazují, že čistota vzorku je nedostačující a je zapotřebí provést další purifikační krok.



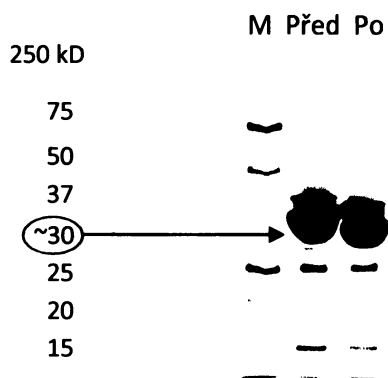
Obr. 12 12 % SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při chelatační afinitní chromatografii mutantní formy BMH2 W243.



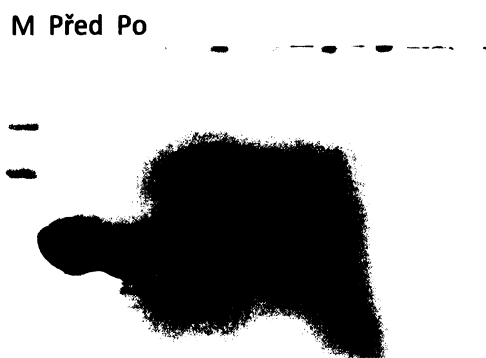
Obr. 13 12 % SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při chelatační afinitní chromatografii mutantní formy BMH2 W264.

6.2.2 Thrombinové štěpení

Pro odštěpení histidinové kotvy (His-Tagu) z N-konce BMH2 proteinů (se kterou byly proteiny exprimovány) byl použit lidský thrombin od firmy Sigma-Aldrich. Pomocí SDS-PAGE bylo ověřeno odštěpení His-Tagu viz. **Obr. 14 a 15**.



Obr. 14 12 % SDS-PAGE gel ukazující frakce před a po trombinovém štěpení u mutantní formy BMH2 W243.

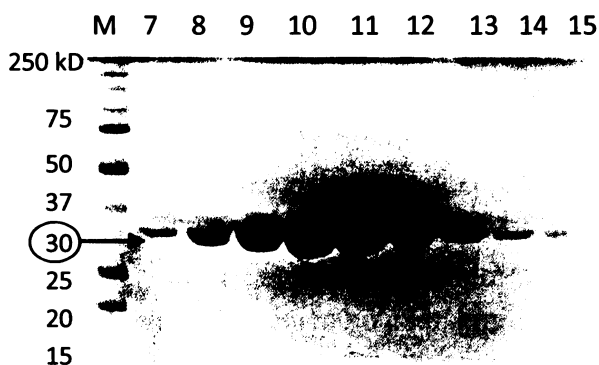


Obr. 15 12 % SDS-PAGE gel ukazující frakce před a po trombinovém štěpení u mutantní formy BMH2 W264.

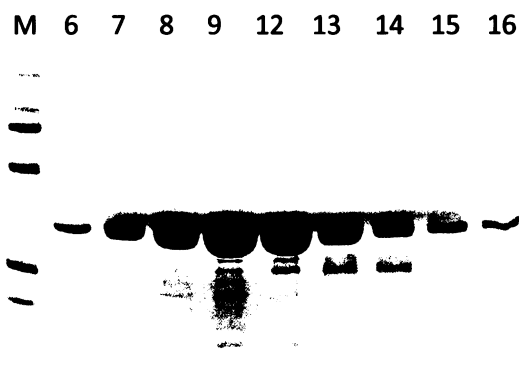
6.2.3 Aniontově-výměnná chromatografie

Po ukončení jímání frakcí po aniontově-výměnné chromatografii (viz. chromatografický záznam na **Obr. 16**) byla ověřena čistota vzorku pomocí SDS-PAGE (viz. **Obr. 17 a 18**). Z obrázků **17 a 18** je patrné, že čistota proteinů je již vysoká, ale

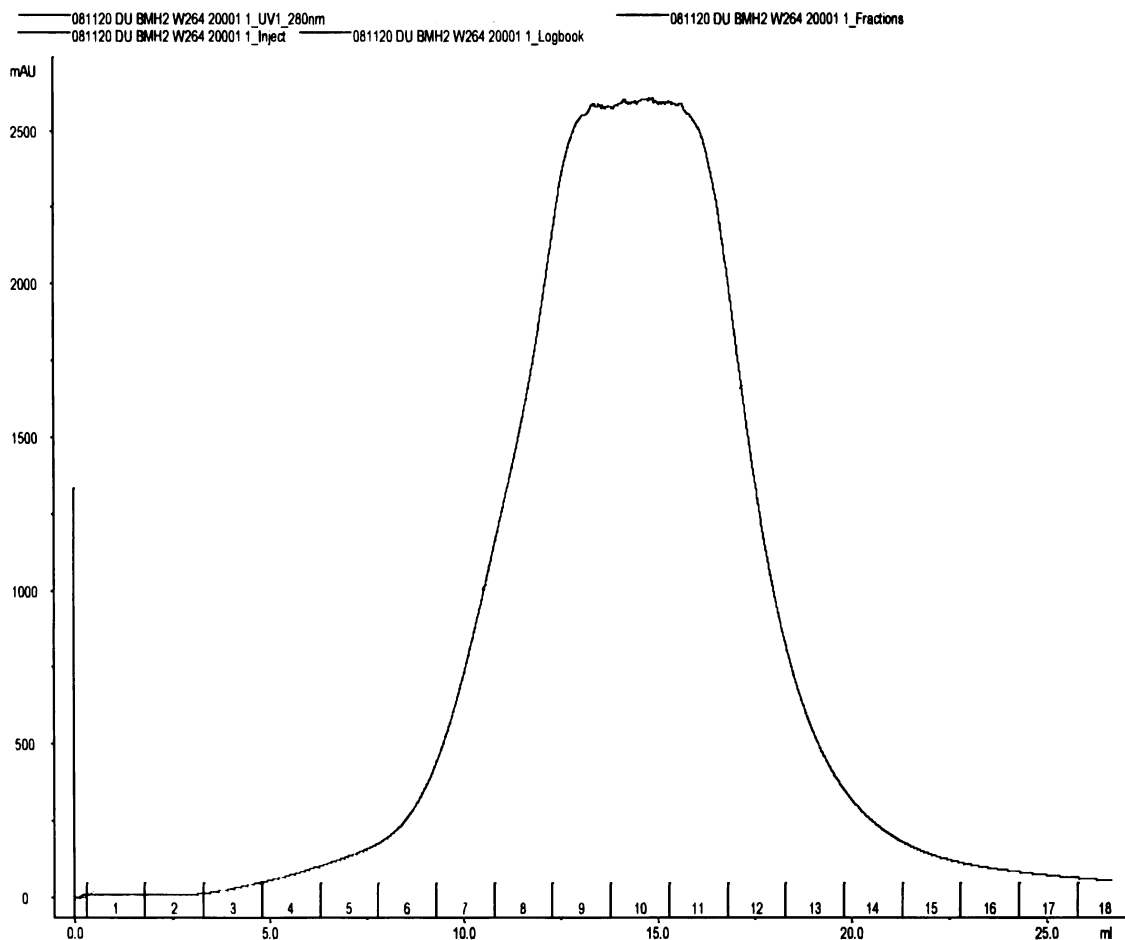
v roztoku se ještě mohou vyskytovat agregáty. Pro odstranění zbylých nečistot a agregovaných proteinů byl proveden poslední purifikační krok - gelová permeační chromatografie.



Obr. 17 12 % SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při aniontové chromatografii mutantní isoformy BMH2 W243.



Obr. 18 12 % SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při aniontové chromatografii mutantní isoformy BMH2 W264.

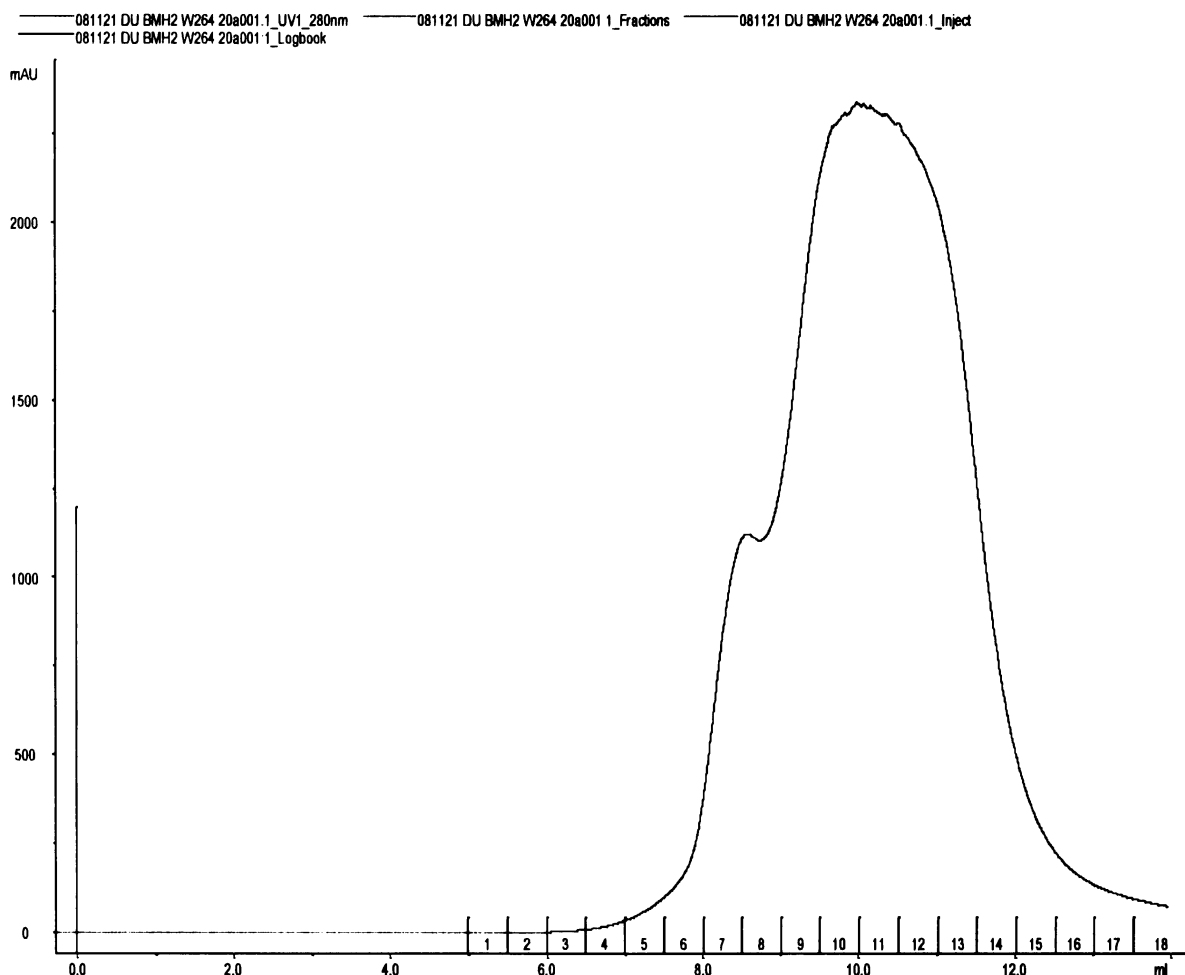


Obr. 16 Chromatografický záznam eluce při aniontově-výměnné chromatografii. Na ose x je znázorněn eluční objem, na ose y absorbance při vlnové délce 280 nm. Zelená křivka znázorňuje průběh gradientu iontové síly. Neostré maximum lze vysvětlit nanesením příliš velkého množství proteinu na kolonu.

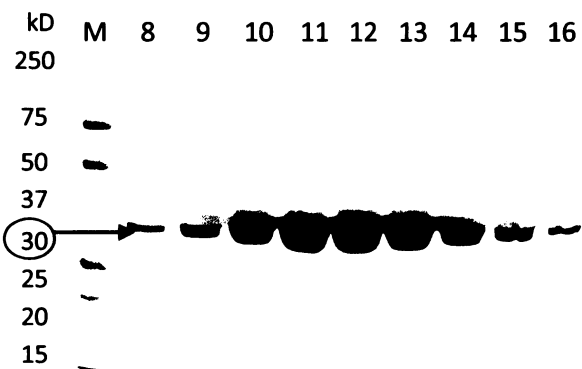
6.2.4 Gelová permeační chromatografie

Pro zvýšení čistoty (odstranění agregátů) jednotlivých mutantů proteinu BMH2 byla použita gelová permeační chromatografie s náplní Superdex 75.

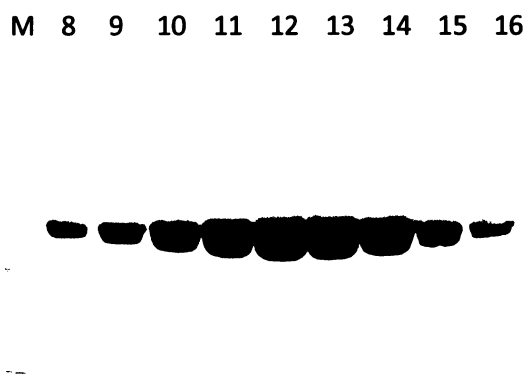
Chromatografický záznam purifikace je znázorněn na **Obr. 19**. Jednotlivé frakce, které odpovídají píku (zbarven modře) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE viz **Obr. 20, 21, 22, 23**. Pomocí této metody byla ověřena čistota a množství proteinu odpovídající jednotlivým frakcím získaným elucí při gelové permeační chromatografii. Na gel jsem nanášela 10 μ l vzorku s 5 μ l vzorkového pufru. Poté jsem vybrala frakce, které vyhovovaly svou čistotou a obsahem proteinu, přičemž jsem do výběru nezahrnovala frakce z levé strany elučního píku, které mohou obsahovat nečistoty a agregáty.



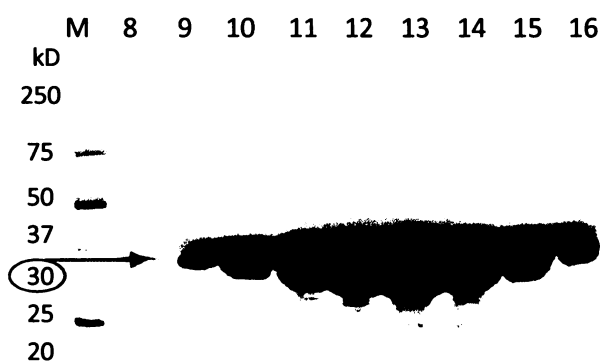
Obr. 19 Chromatografický záznam eluce získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je znázorněn eluční objem, na ose y absorbance při vlnové délce 280 nm.



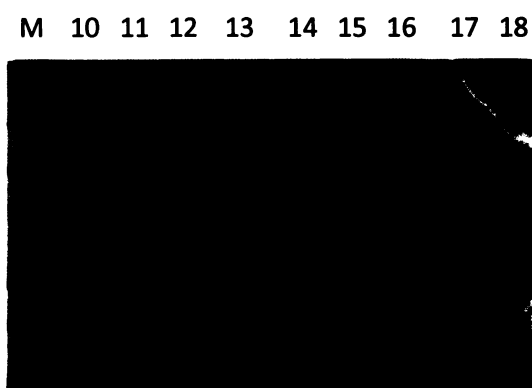
Obr. 20 12% SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při gelové permeační chromatografii mutantní formy BMH2 W243.



Obr. 21 12% SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při gelové permeační chromatografii mutantní formy BMH2 W264.



Obr. 22 12% SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při gelové permeační chromatografii mutantní formy BMH2 WT.



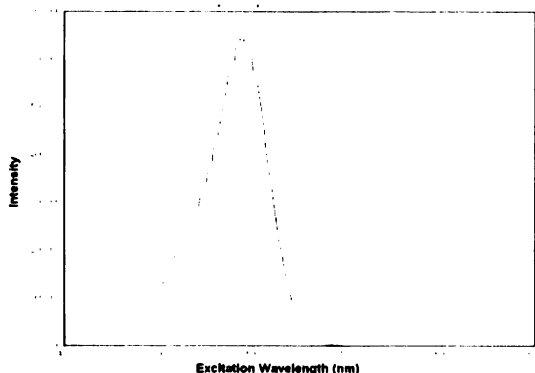
Obr. 23 12% SDS-PAGE gel ukazující frakce získané elucí při gelové permeační chromatografii mutantní formy BMH2 ΔC.

Takto vypořifikované proteiny byly svou čistotou již vhodné ke spektroskopickým studiím, pomocí kterých byly stanoveny disociační konstanty vazby fosfopeptidu na BMH2 proteiny, studium konformaci C-konce a oligomerní stavy BMH2 proteinů.

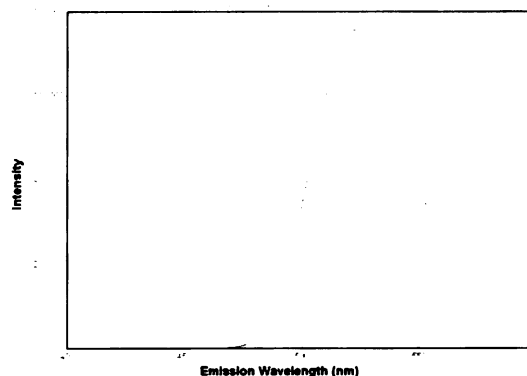
6.3 Charakterizace vazebných vlastností BMH2 pomocí stacionární anizotropie fluorescence

Po získání dostatečného množství čistých BMH2 proteinů jsem provedla kontrolu jejich vazebných vlastností. Studovala jsem vazbu peptidu pRaf-259 označeného na N-konci fluorescenční sondou FITC. Nejdříve jsem provedla základní charakterizaci fluorescenčních vlastností peptidu. Emisní a excitační spektra jsem měřila pro $300 \cdot 10^{-9}$

mol.dm⁻³ peptid pRaf-259 značený na N-konci FITC. Excitační spektrum má maximum při 490 nm a emisní spektrum při 520 nm.

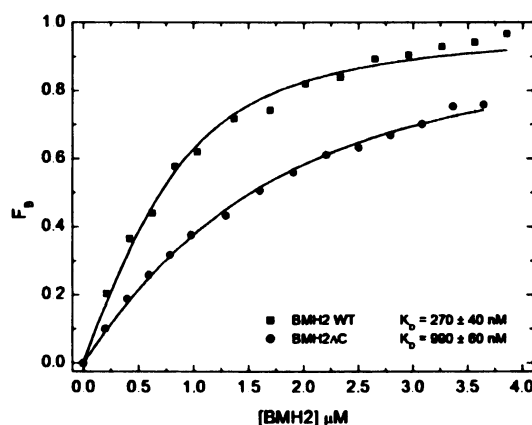


Obr. 24 Excitační spektrum peptidu pRaf-259 značeného FITC při emisní vlnové délce 520 nm.



Obr. 25 Emisní spektrum peptidu pRaf-259 značeného FITC při excitační vlnové délce 490 nm.

Pro určení disociační konstanty vazby peptidu pRaf-259 jsem k 300.10⁻⁹ mol.dm⁻³ peptidu pRaf-259 v pufru titrovala roztok BMH2 proteinu (BMH2 WT, BMH2 ΔC, BMH2 W243, BMH2 W264). Z naměřených hodnot stacionární anizotropie fluorescence jsem sestavila graf (podle kap. 5.10) závislosti frakce navázaného peptidu na koncentraci proteinu (viz. Obr. 26). Získané závislosti jsem fitovala pomocí rovnice 4. Na obr. 26 je porovnání vybraných vazebných isoterm pro proteiny BMH2 WT a BMH2 ΔC. Získané hodnoty K_D jsou uvedeny v tabulce 24. Z těchto hodnot je patrné, že po odstranění C-koncové části klesá vazebná afinita BMH2 proteinů k peptidu pRaf-259. U mutantních verzí BMH2 proteinů s jedním W (BMH2 W243 a BMH2 W264) jsme také pozorovala pokles vazebné afinity.



Obr. 26 Porovnání vazebných křivek BMH2 WT versus BMH2 ΔC a BMH2 W243 versus BMH2 W264 pomocí stacionárního měření anizotropie fluorescence. Je patrné, že po odstranění C-koncové části se sníží vazebná afinita BMH2 proteinu ke svému partneru (peptidu pRaf-259).

BMH2 WT	$K_D = 294 \pm 17$ nM
BMH2 Δ C	$K_D = 905 \pm 156$ nM
BMH2 W243	$K_D = 1326 \pm 156$ nM
BMH2 W264	$K_D = 1183 \pm 140$ nM

Tab. 24 Souhrn průměrných hodnot disociačních konstant mutantních verzí BMH2 proteinů. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka. Každé měření bylo opakováno nejméně 4x.

6.4 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Metodou časově rozlišené fluorescenční spektroskopie byla studována konformace C-koncové části a oligomerní stavy BMH2 proteinů.

6.4.1 Studium konformace C-konce BMH2 pomocí tryptofanové fluorescence

Tryptofan je nejvýznamnějším fluoroforem aminokyselin. Je to aromatická aminokyselina, která absorbuje záření v blízké ultrafialové oblasti (250-300 nm). Tryptofanová fluorescence je pro své vhodné vlastnosti a přirozený výskyt W zbytků v molekulách proteinů často používána ke studiu struktury bílkovin. Abych mohla studovat konformaci C-konce BMH2 proteinů, tak jsem pomocí cílené mutagenese vložila W zbytek na dvě různé pozice na C-konci molekuly BMH2. První W zbytek jsem umístila na pozici 243 před polyQ sekvenci a druhý W zbytek na pozici 264 za polyQ sekvenci. Výsledky časově rozlišeného dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence jsou uvedeny v **tabulce 25**. Z výsledků je patrné, že vazba peptidu nezpůsobuje žádné dramatické konformační změny C-konce molekuly BMH2, protože po navázání ligandu nedochází k významnému poklesu střední doby života excitovaného stavu (τ_{mean}). Získaná data dále ukazují, že u proteinu **BMH2 W264** vazba peptidu potlačuje rychlé pohyby (klesá amplituda β_1) a ovlivňuje segmentální pohyby C-koncové části v oblasti kolem W264 (amplituda β_2 roste). Změny dynamiky oblasti kolem W243 nejsou významné. Krátká doba života excitovaného stavu tryptofanových zbytků neumožnila přesné rozlišení rotačně korelačního času ϕ_3 , který odpovídá rotaci celé molekuly (hodnoty uvedené v červeném rámečku). To naznačuje, že BMH2 proteiny tvoří oligomery větší než předpokládané dimery (hodnota rotačně korelačního času pro monomer je 35 ± 5 ns [53]).

vzorek	τ_{mean} (ns)	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)	β_3	ϕ_3 (ns)
BMH2 W243	2,92	0,023	0,2	0,109	1,1	0,088	>50
BMH2 W243 + peptid	2,89	0,022	0,3	0,113	1,1	0,087	>50
BMH2 W264	3,65	0,077	0,3	0,103	1,2	0,042	>50
BMH2 W264 + peptid	3,52	0,069	0,2	0,114	1,2	0,039	>50

Tab. 25 Tabulka shrnující hodnoty získané analýzou časově rozlišené tryptofanové fluorescenční spektroskopie.

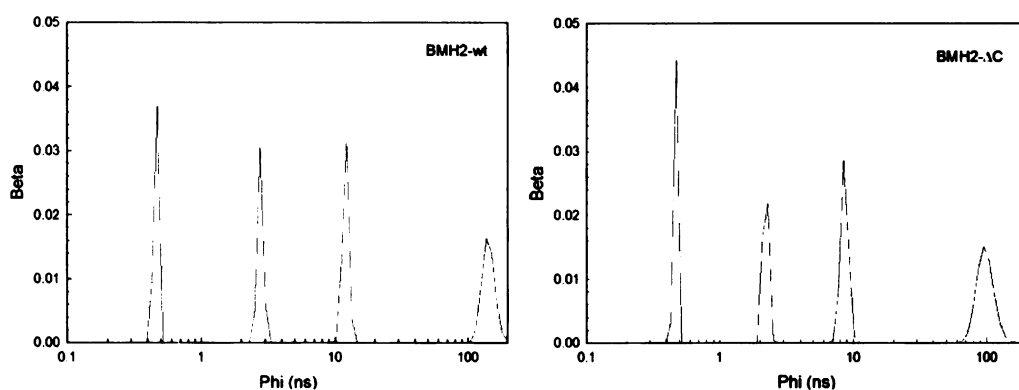
6.4.2 Studium oligomerního stavu BMH2 pomocí dansylové fluorescence

Výsledky tryptofanové fluorescence naznačily, že BMH2 s velkou pravděpodobností vytvářejí v roztoku oligomery či agregáty větší než očekávaný dimer. Všechny dosud známé isoformy 14-3-3 proteinů vytvářejí velmi stabilní dimery a tvorba větších oligomerů nebyla zatím popsána [50]. Vzhledem k tomuto rozporu jsem se rozhodla oligomerní stav prostudovat pomocí dansylové fluorescence. Dansylová skupina má mnohem delší střední dobu života excitovaného stavu než tryptofan a je proto mnohem vhodnější pro studium oligomerního stavu BMH2 proteinu. Pro označení molekuly BMH2 dansylovou skupinou jsem využila přítomnosti jediného cysteinového zbytku v sekvenci molekuly BMH2 (C194). Derivát dansylu 1,5-IAEDANS umožňuje kovalentní navázání dansylové skupiny na sulfhydrylovou skupinu cysteinu. Výsledky časově rozlišeného dohasínání anizotropie dansylové fluorescence jsou uvedeny v **tabulce 26**. Dostatečně dlouhá střední dobu života excitovaného stavu (~ 14 ns) umožnila rozlišení nejdelšího rotačního korelačního času ϕ_4 . Získané hodnoty ukazují, že všechny testované proteiny (BMH2 WT, BMH2 ΔC , BMH2 W243, BMH2 W264) mají stejný oligomerní stav charakterizovaný hodnotou $\phi_4 = \sim 120$ ns. Tato hodnota odpovídá pravděpodobně tetrametru.

vzorek	τ_{mean} (ns)	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)	β_3	ϕ_3 (ns)	β_4	ϕ_4 (ns)
BMH2 WT	14,4	0,062	0,5±0,1	0,041	2,8±0,4	0,048	12±2	0,049	140±20
BMH2 ΔC	13,9	0,050	0,5±0,1	0,039	2,2±0,4	0,052	9±2	0,059	100±20
BMH2 W243	14,6	0,046	0,4±0,1	0,047	2,1±0,4	0,060	10±2	0,057	120±20
BMH2 W264	14,0	0,043	0,5±0,1	0,056	2,7±0,4	0,060	12±2	0,051	140±20

Tab. 26 Tabulka naměřených hodnot časového dohasínání anizotropie fluorescence.

Obrázek 27 ukazuje distribuce rotačních korelačních časů C194-AEDANS proteinu BMH2 WT a BMH2 ΔC . V obou případech je zřejmá přítomnost čtyř komponent v dohasínání anizotropie fluorescence. Nejdelší komponenta $\phi_4 = \sim 120$ ns odpovídá rotaci celé molekuly (oligomeru).

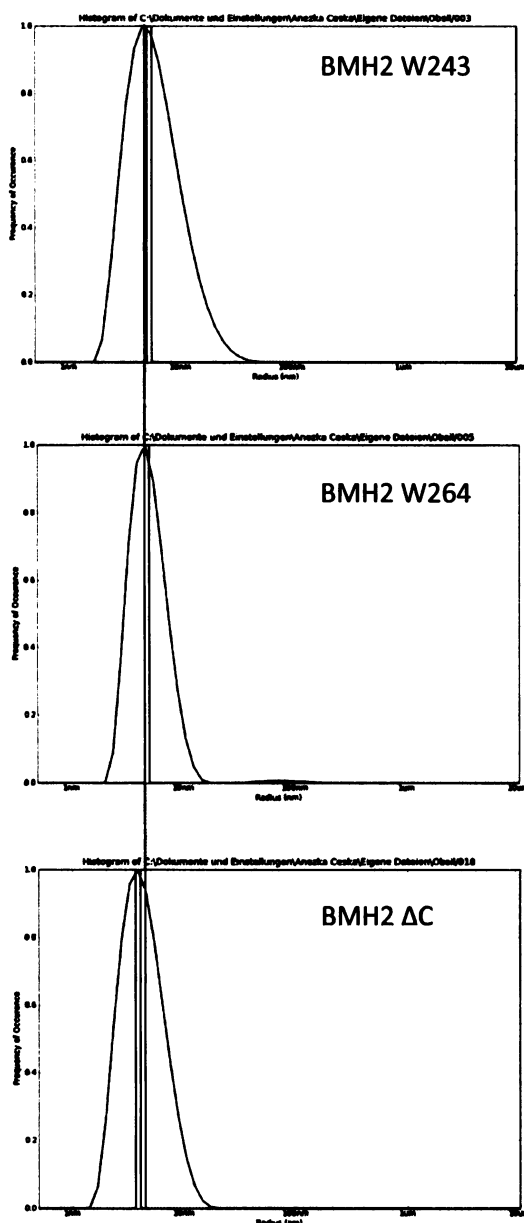


Obr. 27 Grafy ukazující distribuce rotačně korelačních časů AEDANS sondy navázané na BMH2 WT a BMH2 ΔC .

6.5 Dynamický rozptyl světla

Výsledky vazebných studií ukázaly, že tryptofanové mutanty BMH2 W243 a BMH2 W264 váží peptid pRaf-259 s nižší afinitou než BMH2 WT a BMH2 ΔC (Tab. 24). Přestože časově rozlišená fluorescence ukázala, že všechny studované verze BMH2 proteinu vykazují stejnou oligomerní strukturu, rozhodli jsme se otestovat tryptofanové mutanty pomocí dynamického rozptylu světla (vnesejí zbytků na C-konec mohlo mít vliv na interakce proteinů). Tyto experimenty byly provedeny v laboratoři strukturní biologie UMG AV ČR, v.v.i. Tato metoda vyžaduje relativně hodně koncentrované vzorky roztoků proteinů ($\sim 170 \cdot 10^{-6}$ mol.dm⁻³). Naším cílem však bylo porovnání proteinů za podmínek použitých během fluorescenčních měření (koncentrace $< 10 \cdot 10^{-6}$ mol.dm⁻³). Tyto nízké koncentrace však značně komplikovaly měření (nízká intenzita signálu) a získaná data

jsou proto pouze orientační. Na **obr. 28** jsou ukázány distribuce velikosti částic pro proteiny BMH2 W243, W264 a ΔC . Je zřejmé, že všechny tři distribuce mají téměř totožné maximum (viz zelená linka). Pouze v případě BMH2 W243 je distribuce širší směrem k větším poloměrům částic v roztoku. Tento jev jsme však nepozorovali při fluorescenčních měřeních. Tento rozdíl je nejspíše artefaktem způsobeným nízkou koncentrací během akumulace signálu.



Obr. 28 Distribuce velikosti částic pro proteiny BMH2 W243, W264 a ΔC .

7. Diskuze

Kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů se vyznačují významně delší C-koncovou částí ve srovnání s lidskými a rostlinnými isoformami (viz. **Obr. 4, Kap. 2.2.2**). BMH2 isoforma navíc obsahuje ve své C-koncové části tzv. polyglutaminový (polyQ) segment, který je dlouhý 17 po sobě jdoucích aminokyselin glutaminů (Q). Tento polyQ segment je v literatuře označován za původce agregace a toxicity proteinů. Tvorba nerozpustných proteinových agregátů v neuronech je známkou neurodegenerativních onemocnění způsobených proteiny s rozvinutým polyQ segmentem. V roce 1994 Perutz a kol. navrhli, že dlouhé polyQ sekvence jsou schopné tvořit stabilní β vlásenky. Tyto struktury jsou složeny z β řetězců obsahující polyQ opakování a jsou spojeny vodíkovými vazbami. Tyto vlásenky obsahující polyQ opakování mohou samy asociovat a tvořit stabilní agregáty β skládaných listů.

Cílem mé diplomové práce bylo studium vlastností C-koncového segmentu proteinu BMH2. Předchozí studie na savčích isoformách ukázaly, že C-koncový segment má důležitou autoinhibiční úlohu [6, 53]. V nepřítomnosti ligandu se sám váže do vazebného místa a brání tak vazbě nevhodných ligandů. Odstranění C-koncového segmentu proto vedlo ke zvýšení vazebné afinity a také ke snížení vazebné specifity. U savčí isoformy 14-3-3 ζ bylo dále zjištěno, že vazba fosforylovaného peptidu vytěsňuje C-koncový segment z vazebného místa a tím zvýší jeho pohyblivost [53]. Protože kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů mají zcela unikátní C-koncový segment, rozhodli jsme se prostudovat jeho vlastnosti. Nejdříve jsme studovali vliv odstranění C-koncového segmentu na vazebnou afinitu BMH2 proteinu. Tyto experimenty ukázaly, že BMH2 protein s odstraněným C-koncovým segmentem váže modelový fosforylovaný peptid s výrazně nižší vazebnou afinitou v porovnání s divokým typem (**Tab. 24**). To naznačuje, že C-konec BMH2 proteinu by nemusel mít autoinhibiční funkci. Dále jsme se rozhodli prostudovat vliv vazby fosforylovaného peptidu na mobilitu C-koncového segmentu BMH2 proteinu pomocí tryptofanové fluorescence. Cílenou mutagenézí jsme na dvě různé pozice (před a za polyQ úsek) vložili tryptofanový zbytek a původní dva tryptofany jsme změnili na fenylalaniny. Tyto záměny nám umožnili použít tryptofanovou fluorescenci ke studiu mobility C-koncového segmentu. Výsledky časově rozlišených měření tryptofanové fluorescence ukázaly, že C-konec proteinu BMH2 se chová jinak než C-konec savčí izoformy 14-3-3 ζ . Vazba fosforylovaného peptidu neměla velký vliv na strukturu a dynamiku C-konce BMH2. Z toho můžeme usuzovat, že C-koncový segment molekuly BMH2 s velkou pravděpodobností nemá funkci autoinhibitoru.

Analýza dohasínání anizotropie fluorescence dále naznačila, že BMH2 vytváří v roztoku podstatně větší částice (oligomery či agregáty) než očekávané dimery. Díky relativně krátké střední době života excitovaného stavu tryptofanu jsme nebyli schopni rozlišit rotační korelační čas, který odpovídá rotaci celé molekuly (**Tab. 25**), rotaci

dimeru odpovídá rotační korelační čas ~35 ns). Protože všechny známé isoformy 14-3-3 proteinů vytvářejí dimery, rozhodli jsme se tento oligomerní stav molekuly BMH2 dále prozkoumat. BMH2 obsahuje ve své sekvenci pouze jeden cysteinový zbytek, který jsme modifikovali fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS. Dansylová skupina má mnohem delší dobu života excitovaného stavu než tryptofan. Časově rozlišená měření dansylové fluorescence nám proto umožnily rozlišit nejdelší rotačně korelační čas spojený s rotací celé molekuly BMH2 (Tab. 26). Ze získaných dat můžeme říci, že BMH2 opravdu vytváří oligomery větší než dimer. Jedná se pravděpodobně o tetramery či hexamery. Rozhodně se nejedná o velké agregáty. Zajímavé je, že odstranění C-konce, který obsahuje polyQ úsek, nemělo žádný vliv na oligomerní stav molekuly BMH2 proteinu. Zdá se tedy, že polyQ úsek není příčinou pozorovaného oligomerního stavu BMH2.

Oligomerní stav BMH2 proteinů jsme se také pokusili studovat pomocí DLS. Tato měření však nebylo možné provést s velkou přesností díky nízké koncentraci proteinových roztoků (pracovali jsme s roztoky o koncentraci $\sim 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Při vyšších koncentracích jsme se obávali nespecifické agregace. DLS měření ukázala podobné výsledky jako dansylová fluorescence, tedy přibližně stejnou velikost (oligomerní stav) s C-koncem či bez něho.

Data získaná v této diplomové práci ukazují, že kvasničné 14-3-3 proteiny mají velmi odlišné vlastnosti v porovnání s ostatními isoformami 14-3-3 proteinů. Jejich C-konec pravděpodobně nemá funkci autoinhibitoru. Pro finální závěry však ještě bude nutné získat další data, např. z analytické ultracentrifugace či jiných biofyzikálních technik.

8. Závěrečné shrnutí

1. Pomocí cílené mutagenese jsme připravili mutantní formy kvasničného 14-3-3 proteinu BMH2 s mutacemi I237Stop (BMH2 Δ C), E243W (BMH2 W243) a A264W (BMH2 W264). Následně jsme tyto proteiny, spolu s BMH2 WT, exprimovali v bakteriálním expresním systému a provedli jejich purifikaci. Podařilo se nám získat dostatečná množství všech čtyř proteinů a čistotě umožňující další studium.

2. U všech čtyř proteinů jsme změřili vazebnou afinitu vůči fluorescenčně označenému fosforylovanému peptidu pRaf-259. Zjistili jsme, že po odstranění C-koncové části BMH2 proteinu klesá vazebná afinita k peptidu pRaf-259. U mutantních verzí BMH2 proteinů s jedním W (BMH2 W243 a BMH2 W264) jsme také pozorovali pokles vazebné afinity.

3. Pomocí časově rozlišené tryptofanové fluorescenční spektroskopie jsme studovali vliv vazby pRaf-259 peptidu na konformaci C-koncového segmentu. Tato měření ukázala, že vazba peptidu ovlivňuje dynamiku C-konce v oblasti W264. Nicméně vazba peptidu nezpůsobuje dramatickou změnu konformace C-koncového segmentu. Tím se BMH2 protein liší od jiných isoform 14-3-3 proteinů (např. savčí ζ isoforma), kde bylo zjištěno, že vazba peptidu způsobuje značnou strukturní změnu C-konce spojenou s uvolněním C-konce z vazebného místa molekuly 14-3-3 proteinu. Z toho usuzujeme, že C-konec BMH2 nefunguje jako autoinhibitor. Toto odlišné chování může souviset s přítomností polyQ sekvence.

4. Fluorescenční měření ukázala, že všechny čtyři studované formy BMH2 proteinu vykazují stejný oligomerní stav (nejspíše tetramerní). Odstranění C-konce s polyQ sekvencí nemělo vliv na oligomerní stav BMH2.

Přehled literatury

- [1] S. J. Bresler, *Molekulární biologie*, Academia (1979).
- [2] V. Benda, J. Zdarsky, V. Vymetalova, *Biologie I.*, VŠCHT (1996).
- [3] O. Necas, *Vesmír* **6/75**, 309 (1996).
- [4] K. Bezouska, *Prednasky z Molekulární biologie a genetiky I.* (2009).
- [5] D. Sofrova a kol., *Biochemie, základní kurz*, 3. vydání, SPN Praha, Praha (1999).
- [6] J. Silhan, V. Obsilova, J. Vecer, P. Herman, M. Sulc, J. Teisinger and T. Obsil, *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 49113 (2004).
- [7] A. J. Green, *Biochemical Society Transactions* **30**, 382 (2002).
- [8] S. Mackie, A. Aitken, *FEBS Journal* **272**, 4202 (2005).
- [9] A. H. de Boer, *Biochemical Society Transactions* **30**, 416 (2002).
- [10] G. W. Reuther, H. Fu, L. D. Cripe, R. J. Collier, A. M. Pendergast, *Science* **266**, 129 (1994).
- [11] A. Aitken, *Seminars in Cancer Biology* **16**, 162 (2006).
- [12] M. J. van Hemert, G. P. H. van Heusden and H. Y. Steensma, *Yeast* **18**, 889 (2001).
- [13] O. Novac, D. Alvarez, Ch. E. Pearson, G. B. Price and M. Zannis-Hadjopoulos, *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 11174 (2002).
- [14] J. E. McConnell, P. E. Hodges, *Gene* **113**, 183 (1993).
- [15] D. Roth, A. Morgan, H. Martin, D. Jones, G. J. M. Martens, A. Aitken and R. D. Burgoyne, *Biochem. J.* **301**, 305 (1994).
- [16] H. Fu, J. Coburn and R. J. Collier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2320 (1993).
- [17] M. Marra, M. R. Fullone, V. Fogliano, J. Pen, M. Mattei, S. Masi and P. Aducci, *Plant Physiology* **106**, 1497 (1994).
- [18] K. Wu, M. F. Rooney and R. J. Ferl, *Plant Physiology* **114**, 1421 (1997).
- [19] A. Toker, L. A. Sellers, B. Amess, Y. Patel, A. Harris and A. Aitken, *European Journal of Biochemistry* **206**, 453 (1992).
- [20] K. Broadie, E. Rushton, E. M. C. Skoulakis and R. L. Davis, *Neuron* **19**, 391 (1997).
- [21] R. Alam, N. Hachiya, M. Sakaguchi, S. Kawabata, S. Iwanaga, M. Kitajima, K. Mihara and T. Omura, *The Journal of Biochemistry* **116**, 416 (1994).
- [22] G. Moorhead, P. Douglas, N. Morrice, M. Scarabel, A. Aitken, C. MacKintosh, *Current Biology* **6**, 1104 (1996).
- [23] D. G. Morton, D. C. Shakes, S. Nugent, D. Dichoso, W. Wang, A. Golden and K. J. Kemphues, *Developmental Biology* **241**, 47 (2002).
- [24] H. Leffers, P. Madsen, H. H. Rasmussen, B. Honore, A. H. Andersen, E. Walbum, J. Vandekerckhove and J. E. Celis, *Journal of Molecular Biology* **231**, 982 (1993).
- [25] P. F. Erickson and B. W. Moore, *Journal of Neurochemistry* **35**, 232 (1980).
- [26] P. F. Boston, P. Jackson and R. J. Thompson, *Journal of Neurochemistry* **38**, 1475 (1982).
- [27] T. Ichimura, T. Isobe, T. Okuyama, T. Yamauchi and H. Fujisawa, *FEBS* **219**, 79 (1987).

- [28] T. Ichimura, T. Isobe, T. Okuyama, N. Takahashi, K. Araki, R. Kuwano and Y. Takahashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7084 (1988).
- [29] G. P. H. van Heusden, T. J. Wenzel, E. L. Lagendijk, H. Y. de Steensma and J. A. van den Berg, *FEBS* **302**, 145 (1992).
- [30] S. Hirsch, A. Aitken, U. Bertsch and J. Soll, *FEBS* **296**, 222 (1992).
- [31] G. J. M. Martens, P. A. Piosik and E. H. J. Danen, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**, 1456 (1992).
- [32] B. J. Druker, M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, N. B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones and Ch. L. Sawyers, *The New England Journal of Medicine* **344**, 1031 (2001).
- [33] B. Xiao, S. J. Smerdon, D. H. Jones, G. G. Dodson, Y. Soneji, A. Aitken and S. J. Gamblin, *Nature* **376**, 188 (1995).
- [34] D. Liu, J. Bienkowska, C. Petosa, R. J. Collier, H. Fu and R. Liddington, *Nature* **376**, 191 (1995).
- [35] R. Layfield, J. Fergusson, A. Aitken, J. Lowe, M. Landon and R. J. Mayer, *Neuroscience Letters* **209**, 57 (1996).
- [36] A. J. Muslin, J. W. Tanner, P. M. Allen and A. S. Shaw, *Cell* **84**, 889 (1996).
- [37] H. Hermeking, Ch. Lengauer, K. Polyak, T. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler and B. Vogelstein, *Molecular Cell* **1**, 3 (1997).
- [38] C. Petosa, S. C. Masters, L. A. Bankston, J. Pohl, B. Wang, H. Fu and R. C. Liddington, *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 16305 (1998).
- [39] A. Brunet, A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg, *Cell* **96**, 857 (1999).
- [40] A. T. Ferguson, E. Evron, Ch. B. Umbricht, T. K. Pandita, T. A. Chan, H. Hermeking, J. R. Marks, A. R. Lambers, P. A. Futreal, M. R. Stampfer and S. Sukumar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**, 6049 (2000).
- [41] T. Obsil, R. Ghirlando, D. C. Klein, S. Ganguly, F. Dyda, *Cell* **105**, 257 (2001).
- [42] D. W. Powell, M. J. Rane, Q. Chen, S. Singh and K. R. McLeish, *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 21639 (2002).
- [43] M. Würtele, Ch. Jelich-Ottmann, A. Wittinghofer and C. Oecking, *The EMBO Journal* **22**, 987 (2003).
- [44] L. Baisamy, N. Jurisch and D. Diviani, *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 15405 (2005).
- [45] S. Ganguly, J. L. Weller, A. Ho, P. Chemineau, B. Malpoux and D. C. Klein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1222 (2005).
- [46] M. K. Lehtinen, Z. Yuan, P. R. Boag, Y. Yang, J. Villén, E. B. E. Becker, S. DiBacco, N. de la Iglesia, S. Gygi, T. K. Blackwell and Azad Bonni, *Cell* **125**, 987 (2006).
- [47] E. Boura, J. Silhan, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, J. Teisinger, V. Obsilova and T. Obsil, *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 8265 (2007).
- [48] Ch. G. Danes, S. L. Wyszomierski, J. Lu, Ch. L. Neal, W. Yang and D. Yu, *Cancer Research* **68**, 1760 (2008).

- [49] Y. A. Purwestri, Y. Ogaki, S. Tamaki, H. Tsuji and K. Shimamoto, *Plant Cell Physiology* **50**, 429 (2009).
- [50] A. K. Gardino, S. J. Smerdon, M. B. Yaffe, *Seminars in Cancer Biology* **16**, 173 (2006).
- [51] M.B. Yaffe, *FEBS Letters* **513**, 53 (2002).
- [52] H. Hermeking, *Seminars in Cancer Biology* **16**, 161 (2006).
- [53] V. Obsilova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, J. Teisinger and T. Obsil, *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 4531 (2004).
- [54] Ch. Ottmann, L. Yasmin, M. Weyand, J. L. Veessenmeyer, M. H. Diaz, R. H. Palmer, M. S. Francis, A. R. Hauser, A. Wittinghofer and B. Hallberg, *The EMBO Journal* **26**, 902 (2007).
- [55] B. Coblitz, M. Wu, S. Shikano and M. Li, *FEBS Letters* **580**, 1531 (2006).
- [56] H. Lüllmann, K. Mohr, L. Hein, *Barevný atlas farmakologie*, GRADA (2006).
- [57] G. Tzivion, V. S. Gupta, L. Kaplun and V. Balan, *Seminars in Cancer Biology* **16**, 203 (2006).
- [58] M. Schuler and D. R. Green, *Biochemical Society Transactions* **29**, 684 (2001).
- [59] R. Vrtel, *Zurnal UP* **15**, 5 (1999).
- [60] M. Nellist, M. A. Goedbloed, Ch. de Winter, B. Verhaaf, A. Jankie, A. J. J. Reuser, A. M. W. van den Ouweland, P. van der Sluijs and D. J. J. Halley, *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 39417 (2002).
- [61] V. Obsilova, J. Vecer, P. Herman, A. Pabianova, M. Sulc, J. Teisinger, E. Boura and T. Obsil, *Biochemistry* **44**, 11608 (2005).
- [62] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence Spectroscopy*, 2nd edition, Plenum Publ.Corp., New York (1999).
- [63] J. C. Brochon, *Fluorescence Anisotropy Decay Analysis by Quantified Maximum Entropy Method*, User Manual for PULSE5QT Program, p. 33, MaxEnt Solutions, Ltd., Cambridge, UK (1999).