

Univerzita Karlova v Praze

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Studium struktury komplexu 14-3-3:fosducin.

Study of the structure of the 14-3-3:phosducin complex

Diplomová práce

Biofyzikální chemie

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

Praha 2011

Miroslava Kacířová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali během mé diplomové práce, především svému školiteli Doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za cenné rady, korekturu mé práce a umožnění provádět diplomovou práci v kolektivu příjemných lidí. Dále bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Lence Řežábkové za rady, věnovaný čas, trpělivost a spolupráci.

Děkuji Doc. RNDr. P. Heřmanovi, CSc., Doc. RNDr. J. Večeřovi, CSc. z MFF UK a Doc. RNDr. M. Šulcovi, Ph.D. z MBÚ AV ČR, v.v.i. za analýzu vzorků.

V neposlední řadě bych pak ráda poděkovala své rodině a svým blízkým za podporu a všestrannou pomoc během mých studií.

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Miroslava Kacířová

Seznam použitých zkratek

14-3-3 ζ	isoforma 14-3-3 proteinu
Å	Angström (jednotka délky, $1 \cdot 10^{-10}$ m)
A	Ampér (jednotka elektrického proudu)
A	u mutace značí aminokyselinu alanin
Arg	aminokyselina arginin
ATP	adenosin-5'-trifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
BamH I	restrikční enzym (EC 3.1.21.4)
BL21(DE3)	kmen bakterií <i>E. coli</i>
BMH1	isoforma 14-3-3 proteinu
BMH2	isoforma 14-3-3 proteinu
CaMKII	Ca^{2+} /calmodulin-dependentní kinasa II (EC 2.7.1.123)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
C-konec	konec proteinu obsahující karboxylovou skupinu -COOH
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleotic acid</i>)
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F	u mutace značí aminokyselinu fenylalanin
FgÚ	Fyziologický ústav
GDP	guanosin-5'-difosfát
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	guanosin-5'-trifosfát
G $_{\alpha}$, G $_{\beta\gamma}$, G $_{\gamma}$	α , β , γ podjednotka G-proteinu zvaného transducin
His	aminokyselina histidin
His-tag	motiv šesti histidinů v řadě za sebou
HPLC	vysocetúčinná kapalinová chromatografie
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
K	u mutace značí aminokyselinu lysin
kDa	kiloDalton
LB	médium dle Luria-Bertaniho

Leu	aminokyselina leucin
LF	Lékařská fakulta
MF	mobilní fáze
MFF UK	Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy
MBÚ	Mikrobiologický ústav
MCO	Molecular cut off
Mr	relativní molární hmotnost
N-konec	konec proteinu obsahující aminoskupinu –NH ₂
Nde I	restrikční enzym (EC 3.1.21.4)
NMR	nukleární magnetická rezonance
noW	neobsahující tryptofany
ot./min.	otáčky za minutu
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
Pd	fosducin
PDE	<i>cGMP-fosfodiesterasa</i> (EC 3.1.4.17)
PdQ52K	mutantní forma fosducinu (mutace Q52K)
PdQ52KS73A	mutantní forma fosducinu (mutace Q52K a S73A)
Pd wt	přirozeně se vyskytující forma fosducinu (z angl. <i>wild type</i>)
pET-15b	komerčně dostupný plasmid
PKA	<i>cAMP-dependentní proteinkinasa A</i> (EC 2.7.11.11)
PKC	<i>proteinkinasa C</i> (EC 3.7.11.13)
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
pS	fosforylovaný serinový zbytek
Q	u mutace značí aminokyselinu glutamin
RGS	regulátor G-proteinové signalizace
S	u mutace značí aminokyselinu serin
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS - polyakrylamidová gelová elektroforéza
Ser	aminokyselina serin
SF	stacionární fáze
TEMED	N,N,N',N' - tetrametyletyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymetyl)-aminometan
Trp	aminokyselina tryptofan
u	unit, tj. jednotka katalytické aktivity

Obsah

Seznam použitých zkratek	- 4 -
Obsah	- 6 -
Abstrakt	- 8 -
Abstract.....	- 9 -
1 Úvod	- 10 -
2 Literární přehled	- 12 -
2.1 Biochemie vidění – obecné schéma	- 12 -
2.1.1 Role G-proteinů v procesu vidění	- 12 -
2.1.2 G-proteinová signální dráha v procesu vidění – za světla	- 14 -
2.1.3 G-proteinová signální dráha v procesu vidění – za tmy	- 16 -
2.1.4 Doprovodné procesy při světelné adaptaci sítnice	- 16 -
2.2 Fosducin	- 17 -
2.2.1 Základní informace o struktuře a výskytu	- 17 -
2.2.2 Funkce	- 20 -
2.2.3 Role 14-3-3 proteinu v regulaci fosducinu	- 23 -
2.3 14-3-3 proteiny	- 24 -
2.3.1 Struktura a výskyt	- 24 -
2.3.2 Funkce	- 28 -
2.3.3 Regulace 14-3-3 proteinů	- 29 -
3 Cíl práce	- 31 -
4 Metody a materiál.....	- 32 -
4.1 Použitý materiál	- 32 -
4.1.1 Chemikálie	- 32 -
4.1.2 Přístroje.....	- 32 -
4.1.3 Ostatní materiál	- 33 -
4.2 Plasmid	- 33 -
4.3 Kultivace bakterií.....	- 34 -
4.4 Skladování bakterií	- 34 -
4.5 Expresní systém.....	- 34 -
4.6 Transformace bakterií	- 35 -
4.7 Preparativní centrifugace.....	- 36 -
4.8 Sonikace	- 36 -
4.9 Dialýza	- 37 -
4.10 Chromatografie	- 38 -
4.10.1 Niklová chelatační chromatografie	- 39 -
4.10.2 Aniontová iontově-výměnná chromatografie	- 41 -
4.10.3 Gelová permeační chromatografie	- 42 -
4.11 SDS elektroforéza	- 44 -
4.12 Nativní elektroforéza.....	- 45 -
4.13 Zakoncentrování roztoků proteinů.....	- 45 -
4.14 Fosforylace fosducinu	- 46 -
4.15 Limitovaná proteolýza	- 47 -
4.16 Analytická ultracentrifugace	- 47 -
4.17 Fluorescenční měření	- 50 -
4.17.1 Fluorescence	- 50 -
4.17.2 Měření stacionární Trp fluorescence PdQ52K	- 51 -
4.17.3 Časově-rozlišená fluorescence.....	- 52 -

5	Výsledky	- 55 -
5.1	Příprava proteinů.....	- 55 -
5.1.1	Exprese	- 55 -
5.1.2	Niklová chelatační chromatografie	- 55 -
5.1.3	Aniontová iontově-výměnná chromatografie	- 56 -
5.1.4	Gelová permeační chromatografie	- 58 -
5.2	Interakce 14-3-3 proteinu s fosducinem.....	- 60 -
5.2.1	Nativní elektroforéza.....	- 60 -
5.2.2	Měření stacionární Trp fluorescence PdQ52K	- 64 -
5.3	Limitovaná proteolýza	- 66 -
5.4	Analytická ultracentrifugace	- 67 -
5.5	Časově-rozlišená fluorescenční měření Trp29	- 68 -
6	Diskuze	- 72 -
7	Závěr	- 74 -
	Seznam citované literatury	- 75 -

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá biofyzikální charakterizací komplexu dvou regulačních proteinů, fosducinu (Pd) a 14-3-3. Oba proteiny jsou zapojeny do regulační kaskády přenosu signálu v oční sítnici obratlovců. Pd je 33kDa protein nacházející se ve fotoreceptorových buňkách sítnice, ale také i v jiných tkáních. Za jeho hlavní funkci v oku se považuje regulace přenosu signálu jdoucího z oka k očnímu nervu, jako odpověď na ostré světlo, a to vazbou $G_{t\beta\gamma}$ podjednotky heterotrimerního transducinu, jež je součástí tzv. G-proteinové signální dráhy. Vazba znemožní spojení $G_{t\beta\gamma}$ s $G_{t\alpha}$ transducinu, což zabrání dalšímu přenosu signálu. Dysfunkce Pd by v důsledku dopadu intenzivního světla vedla k poškození sítnice. Dále se také zjistilo, že Pd ovlivňuje hypertensi a to tak, že snižuje krevní tlak u lidí a myši ve spánku. Ve tmou adaptované sítnici je funkce Pd regulována 14-3-3 proteinem. 14-3-3 je 28kDa protein nacházející se v mnohých tkáních eukaryot, především v mozku, a hrající roli v mnohých biochemických procesech, např. apoptose. Role 14-3-3 v sítnici oka spočívá ve vazbě fosforylovaného Pd, jeho udržení ve vnitřním segmentu tyčinek a zabránění tak jeho vazbě s $G_{t\beta\gamma}$, čímž se zajistí další možnost přenosu signálu k očnímu nervu. Pro vazbu je nutná fosforylace Pd na Ser54 a Ser73. Tvorba homodimeru 14-3-3 je nezbytná pro jeho funkci. Možná je i ochrana Pd vůči *proteasam* a *fosfatasam*.

Během diplomové práce byly exprimovány proteiny Pd wt, PdQ52K, PdQ52KS73A, 14-3-3 ζ wt a 14-3-3 ζ noW v bakteriálním systému *E.coli* BL21(DE3) a úspěšně purifikovány s výtěžkem miligramových množství. Bylo použito několika biofyzikálních technik ke studiu komplexu. Nativní elektroforéza ověřila vznik komplexu po fosforylaci obou fosforylačních míst Pd (Ser54, Ser73), limitovaná proteolýza odhalila strukturní změny Pd po jeho vazbě se 14-3-3, analytická ultracentrifugace ukázala, že stechiometrie komplexu 14-3-3/Pd je 2:1, tedy dva monomery 14-3-3 vážou jeden fosducin. Dále byla touto technikou odhadnuta disociační konstanta komplexu K_d s výsledkem 5 μ M. Měření časově-rozlišeného dohasínání anizotropie Trp fluorescence umožnilo pozorovat změny flexibility Pd při vzniku komplexu z Pd fosforylovaného v obou místech, oproti mutantům Pd, kde je pouze jedno fosforylační místo (Ser54, nebo Ser73). Nebyl pozorován signifikantní vliv samotné fosforylace na strukturu Pd.

Abstract

The aim of this diploma thesis is a biophysical characterization of the protein complex that consists of two regulatory proteins, the phosducin (Pd) and the 14-3-3 protein. These proteins are involved in the regulation of a signal cascade in vertebrate eye's retina. Pd is a 33kDa protein located in photoreceptor cells in retina, but it has been found in other tissues as well. In retina, phosducin affects transfer of light signaling from eye to brain, by binding $G_{t\beta\gamma}$ subunit of transducin that is the main part of G-protein signaling. In light-adapted retina, unphosphorylated phosducin down-regulates the light response by binding to $G_{t\beta\gamma}$. This process is important for protecting retina in eyes in response to very intense light. It has also been found that phosducin affects hypertension. Phosducin reduces blood pressure of human and mice, especially during sleep. The function of phosducin is regulated in dark-adapted retina by 14-3-3. 14-3-3 is a 28kDa protein that has been found in many eukaryotic tissues, e.g. brain, and is involved in many processes, e.g. apoptosis. The 14-3-3 protein binds phosphorylated Pd and keeps him in a rod inner segment. For 14-3-3 to Pd binding, two sites on Pd must be phosphorylated, Ser54 and Ser73. This interaction, hinders Pd binding to $G_{t\beta\gamma}$, and hence enables the formation of heterotrimeric transducin. Transducin is then prepared to transfer a new signal. It is also possible that 14-3-3 protects phosducin against *proteases* and *phosphatases*.

Pd wt, PdQ52K, PdQ52KS73A, 14-3-3 ζ wt a 3-3 ζ noW have been produced in *E. coli* BL21(DE3) cells and purified. Several biophysical techniques were used to study the 14-3-3/Pd complex. Native electrophoresis showed the formation of the complex with doubly phosphorylated Pd (Ser54, Ser73). Limited proteolysis revealed structural changes of Pd in response to 14-3-3 binding. Analytical ultracentrifugation revealed the stoichiometry of the 14-3-3/Pd complex (2:1), where two monomers of 14-3-3 bind one Pd. The dissociation constant was estimated to be 5 μ M. Time-resolved tryptophan fluorescence measurements were used to study the flexibility of Pd upon the 14-3-3 protein binding. No significant structural change of Pd was observed in response to phosphorylation.

1 Úvod

Každý si jistě dokáže představit, jak moc by byl život složitý, kdyby člověka zradil jeden z jeho pěti smyslů. Největší význam ze všech pěti smyslů se přisuzuje zraku. Zrakem člověk okamžitě rozpozná útok predátora, nebo příjezd rychle jedoucího auta. Aniž by použil čich, nebo chuť, dokáže poznat, které ovoce je zkažené a kam nemá šlápnout. Díky zraku dokážeme rozlišit den od noci a ovlivnit tak vnitřní pochody v našem těle a přizpůsobit okolnímu světu svůj biorytmus.

Zrak, stejně jako ostatní smysly, využívá přenos signálu, který přichází z vnějšího prostředí, a přes signální dráhy nese signál až do mozku, který signál vyhodnotí a zajistí reakci – odezvu na daný signál. Prvotní krok přenosu signálu z vnějšího prostředí zajišťuje tzv. G-proteinová signální dráha, tvořená G-proteiny interagujícími s receptory G-proteinové signalizace (GPCRs, z anglického *G-proteins coupled receptors*), jakožto receptory zachycujícími vnější signál. G-proteiny dále interagují s dalšími proteiny a tím umožní přenos signálu hlouběji do buňky a dále pak až k nervům. Dalším krokem přenosu signálu jsou elektrické impulsy nervů, které zajišťují přenos signálu až do mozku [1, 2]. Jelikož má G-proteinová dráha nenahraditelný význam při přenosu signálu, musí podléhat přísné regulaci a kontrole. K tomuto účelu slouží množství proteinů a biochemických sloučenin a mezi tyto proteiny se řadí i protein fosducin a 14-3-3 protein.

Fosducin je protein ovlivňující přenos signálu ze sítnice oka do mozku vazbou $G_{\beta\gamma}$ podjednotky heterotrimerního G-proteinu nacházejícího se v tyčinkách sítnice oka [3]. Za jeho hlavní funkci se považuje jeho ochrana nervů vůči přesycení dopadajícím signálem, zde myšleno ostrým světlem. Za ostrého světla tedy fosducin negativně reguluje přenos signálu [4, 5]. Pokud by fosducin působil stále, signál by nemohl být přenesen a ani za mírného světla bychom nebyli schopni rozpoznat obrysy předmětů v okolí. Proto je tento regulační protein - fosducin - také regulován dalším regulačním proteinem – 14-3-3 proteinem. Jeho působení vůči fosducinu se projevuje ve tmou adaptované sítnici, kdy dochází k fosforylaci fosducinu a tato fosforylace umožňuje vazbu fosducinu ke 14-3-3. 14-3-3 zachytí fosducin a znemožní mu vazbu s $G_{\beta\gamma}$ podjednotkou, což vede k možnosti znovuoobnovení heterotrimerního G-proteinu a další možnosti přenosu signálu do buňky [6 - 9].

Ve své diplomové práci se zabývám biofyzikální charakterizací komplexu 14-3-3 proteinu s fosducinem. Tato práce představuje první krok projektu, jehož hlavním cílem je studium struktury komplexu 14-3-3/fosducin a pochopení mechanismu regulace funkce fosducinu. Hlavní pozornost byla věnována zjištění molární stechiometrie komplexu a disociační konstanty komplexu K_d , odhalení nekrytých míst na fosducinu interagujícího se 14-3-3 proteinem a studiu konformačních změn fosducinu způsobených vazbou 14-3-3 proteinu.

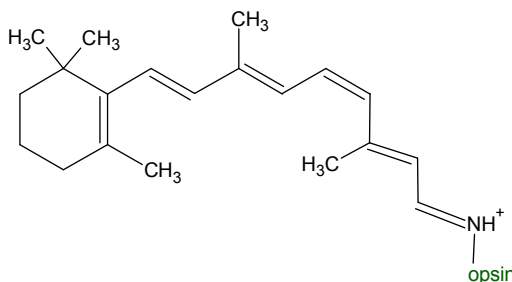
2 Literární přehled

2.1 Biochemie vidění – obecné schéma

Proces vidění sestává z mnoha kroků, které v základu představují propojené procesy vedoucí k přenosu signálu od dopadu fotonu na sítnici oka, až do mozku. Prvotní roli v přenosu signálu hraje G-proteinová signální dráha. G-proteinové signální dráhy se obecně vyskytují v různých tkáních a nesouvisí jen se smysly. Podílejí se na spouštění i vypínání mnoha biochemických procesů a jejich narušení může vést až i k úhynu organismu. V následujícím textu se zaměřím pouze na G-proteinovou signální dráhu týkající se procesu vidění.

2.1.1 Role G-proteinů v procesu vidění

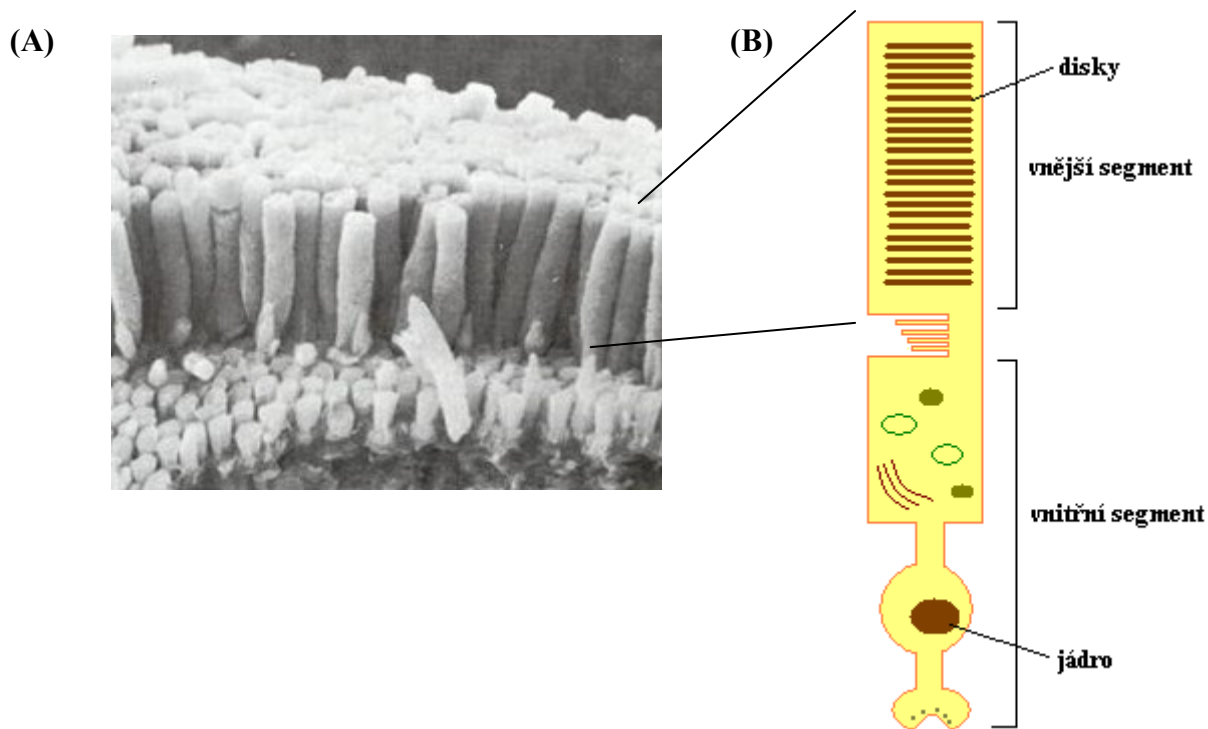
G-proteinu hrajícímu roli v procesu vidění se říká *transducin*. Jedná se, stejně jako v případě jiných G-proteinů, o heterotrimerní protein sestávající ze tří podjednotek nazvaných G_{α} , G_{β} a G_{γ} . Transducin se nachází v blízkosti membrány disku (viz. dále), kde interaguje s receptorem G-proteinové signalizace (tzv. GPCR, z angl. *G-protein coupled receptor*). Tento receptor byl v procesu vidění nazván *rhodopsin*. Rhodopsin sestává ze dvou základních částí. První částí je *opsin*, což je proteinová část rhodopsinu, která prochází skrz membránu disku svými sedmi α -helixy a dále obsahuje část umožňující vazbu s transducinem. Jedná se asi o 40kDa velký protein, jehož N-koncová část je vázána do membrány disku a C-koncová část visí volně do cytosolu vnějšího segmentu tyčinky. Druhou součástí rhodopsinu je kovalentně vázaná prostetická skupina nazývaná *11-cis-retinal*. 11-cis-retinal je chromofor, což je látka umožňující absorbovat světelnou energii a přeměnit ji ve formu elektrickou. Jedná se o polyen, isoprenoid, jak je patrné z Obr. 1.



Obr. 1 Struktura 11-cis-retinalu.

Jeho šest střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb představují dlouhou nenasycenou síť elektronů. Aldehydická skupina 11-*cis*-retinalu formuje Schiffovu bázi s ϵ -amino skupinou lysinu 296, který leží v centru sedmi transmembránových helixů opsinu. Polyeny obecně velmi dobře absorbují záření ve viditelné oblasti spektra (400 – 750 nm). Absorpční maximum 11-*cis*-retinalu se nachází při vlnové délce 370 nm a jeho neprotonované Schiffovy báze při 380 nm. Protonovaná Schiffova báze má absorpční maximum při 440 nm. Jelikož rhodopsin absorbuje nejvíce v okolí 500 nm, odhaduje se, že Schiffova báze je v rhodopsinu při absorpci fotonu protonovaná. Interakce protonované Schiffovy báze s opsinem způsobí bathochromní posun maxima absorpce. Pozitivní náboj protonované Schiffovy báze je kompenzován záporným nábojem glutaminu 113 lokalizovaném v helixu 2. Retinal je derivátem vitamínu A. Lidé si jej neumí syntetizovat z jednoduchých prekurzorů, proto je tolik potřebný přísun vitamínu A např. z mrkve. Nedostatek vitamínu A se poté projevuje např. horším viděním za šera.

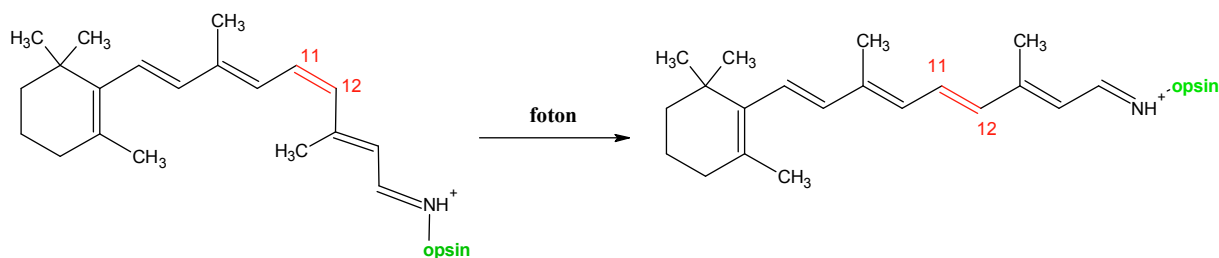
Rhodopsin i transducin se nachází v sítnici oka obratlovců, konkrétně v tyčinkách a čípcích, což jsou primární nervové buňky, v nichž probíhá G-proteinová signalizace. Sítnice oka obsahuje okolo 10^9 tyčinek a $3 \cdot 10^6$ čípků. Tyčinky jsou fotoreceptory zodpovědné za vnímání světla jako takového, kdežto čípky umožňují rozeznávání barev. Na *Obr. 2, na str. 14* je patrné, jak jsou tyčinky uspořádány na sítnici oka a jaký je tvar tyčinek a čípků. Skládají se z vnitřního a vnějšího segmentu. Vnější segment tyčinek sestává ze stohu tisíce disků, což jsou membránově uzavřené vaky hustě protkané fotoreceptory uvnitř membrány. Tyto lidské buňky obsahují okolo $4 \cdot 10^7$ fotoreceptorových molekul rhodopsinu. Vnitřní segment tyčinek obsahuje mitochondrie produkující ATP potřebné pro fototransdukcii a jádro. Vnitřní segment je zakončen synapsí navazující na interneurony a ty pak na další nervové buňky [10 - 14].



Obr. 2 (A) Zobrazení uspořádání tyčinek v sítnici oka [11]. (B) Schematické zobrazení tvaru tyčinek a čípků.

2.1.2 G-proteinová signální dráha v procesu vidění – za světla

Samotný proces vidění začíná dopadem fotonu na 11-*cis*-retinal rhodopsinu. Dopad fotonu způsobí izomerizaci 11-*cis*-retinalu na tzv. all-*trans*-retinal (*all*, z angl. vše), přičemž dojde k posunu dusíku v Schiffově bázi o 5 Å (viz. Obr. 3).



Obr. 3 Trans-izomerizace 11-*cis*-retinalu na all-*trans*-retinal.

Opsinu vázajícímu all-*trans*-retinal se často říká *aktivovaný opsin* (případně *trans-rhodopsin*, nebo *meta-rhodopsin II*). Trans izomerizace způsobí strukturální změny v opsinu. Aktivovaný opsin je dosti nestabilní a spontánně disociuje na samotný opsin a all-*trans*-retinal. Pro zaznamenání záblesku světla lidským mozkiem je potřeba dopadu pěti fotonů. Volný opsin váže neaktivní GDP-transducin a přinutí ho vyměnit GDP za GTP. Vazba GTP způsobí disociaci heterotrimerního transducinu na dvě podjednotky, G_{α}

vázající GTP a $G_{i\beta\gamma}$. Jediná molekula aktivovaného opsinu může takto aktivovat pětset molekul G_{α} . Každá aktivovaná G_{α} podjednotka aktivuje jednu molekulu enzymu *cGMP-fosfodiesterasy* (dále jen PDE) a to vazbou na jeho inhibiční γ podjednotku. Procesu aktivace většího množství molekul jedinou molekulou se říká amplifikace, neboli zesílení signálu. Po této první amplifikaci následuje ještě řada dalších amplifikací. Po aktivaci PDE následuje disociace enzymové γ podjednotky od jeho α a β podjednotky. Enzymová α a β podjednotka pak není inhibována a enzym PDE může začít provádět svou funkci, která spočívá v hydrolyze tzv. druhého posla cGMP na 5'-GMP. Tento krok vede k celkovému snížení cytosolického cGMP. Dopadem jediného fotonu se hydrolyzuje 10^5 molekul cGMP.

V plasmatické membráně vnějšího segmentu tyčinky se nachází množství cGMP-spřažených Na^+/Ca^{2+} iontových kanálů skládajících se ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka je schopná vázat cGMP. Pokud je cytosolického cGMP dostatek, každý Na^+/Ca^{2+} kanál váže minimálně tři molekuly cGMP, zůstává otevřený a umožňuje průchod Na^+ a Ca^{2+} iontů do vnitřku buňky. Po působení PDE se ovšem koncentrace cGMP sníží a iontové kanály vpouštějící Na^+ a Ca^{2+} ionty do buňky se uzavrou. Kanály ve vnějším segmentu tyčinek přispívají k celkovému membránovému potenciálu buňky. Ve vnějším segmentu tyčinek se nacházejí ještě další iontové kanály, které umožňují po vstupu čtyř Na^+ do buňky uvolnit jeden Ca^{2+} z buňky ven, ovšem za spotřeby molekuly ATP. I tyto kanály se podílejí na celkovém membránovém potenciálu buňky. Přebytké Na^+ v buňce pak odchází díky dalšímu iontovému výměnnému ATP-závislému kanálu, nacházejícímu se ve vnitřním segmentu tyčinek. Jedná se o Na^+/K^+ kanály, které dovolují průchod tří Na^+ ven z buňky při současném vtoku dvou K^+ iontů do buňky. I tyto Na^+/K^+ iontové kanály přispívají k celkovému membránovému potenciálu buňky tyčinky.

Uzavření cGMP-spřažených iontových Na^+/Ca^{2+} kanálů způsobí snížení koncentrace Ca^{2+} iontů uvnitř buňky z 500nM na 50nM, čímž dojde ke snížení membránového potenciálu o 1 mV. Důsledkem snížení membránového potenciálu je snížení počtu uvolňovaných molekul neurotransmiteru glutamátu v synapsích. Snížení koncentrace glutamátu a změnu potenciálu zaznamenají interneurony a dále ji už jako elektrický signál předají neuronům, které signál předají až do mozku.

Celkový čas od záblesku až k vytvoření odpovědi v mozku trvá 20 ms. Membránový potenciál dosahuje za světla hodnoty -75 mV [10 - 14].

2.1.3 G-proteinová signální dráha v procesu vidění – za tmy

Snížení koncentrace Ca^{2+} v buňce tyčinky vede k aktivaci enzymu *guanylylcyklasy*, který se zdá být neovlivněný světlem a který začne přeměňovat GTP nacházející se v cytosolu na cGMP. Za koncentrace Ca^{2+} vyšší, než 100nM je tato reakce silně inhibována. Vznikající cGMP se opět začne vázat na cGMP-spřažené iontové $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanály, které se otevrou a opět začnou do buňky vpouštět Na^+ a Ca^{2+} ionty. Koncentrace Ca^{2+} se opět zvýší na hodnotu 500nM a membránový potenciál v klidovém stádiu dosahuje hodnoty od -30 mV do -45 mV. Dojde k depolarizaci membrány. Za tmy dosahuje koncentrace cGMP vysoké hodnoty 70 μM . Vtok Na^+ a Ca^{2+} do buňky vede k uvolnění neurotransmiteru glutamátu do synapsí, které jsou tímto klidovým neurotransmiterem neustále stimulovány.

G_{α} podjednotka transducinu má vlastní tzv. GTPasovou aktivitu, kterou zajistí hydrolyzu navázaného GTP na GDP za uvolnění fosfátu. G_{α} -GDP opustí inhibiční γ podjednotku PDE a reasociuje s $G_{\beta\gamma}$ za tvorby trimerního transducinu připraveného k další fotonové aktivaci. G_{α} -GTP podjednotka bývá aktivní po dobu asi 1 s. γ podjednotka PDE reasociuje s α a β podjednotkou a tak inhibuje funkci enzymu PDE, který tak nemůže hydrolyzovat cGMP.

Během několika sekund po *trans*-izomerizaci dojde pomocí enzymů *isomeras* ke vzniku 11-*cis*-retinalu, který je schopný vázat volný opsin a vytvořit opět rhodopsin připravený absorbovat další fotony [10 - 14].

2.1.4 Doprovodné procesy při světelné adaptaci sítnice

Během osvětlení sítnice ostrým světlem musí fungovat v tyčinkách mechanismy, kterými se zabrání destrukci celého systému. Bylo objeveno několik mechanismů, které chrání oční nervy proti jejich zničení. V žádné z doposud publikovaných učebnic biochemie a molekulární biologie se ovšem nesetkáme s fosducinem, jakožto dalším prvkem chránícím oko v přítomnosti velmi ostrého světla. V následujícím textu popíši obecné mechanismy ochrany oka v přítomnosti intenzivního světla a zároveň mechanismy umožňující přizpůsobit intenzitě světla odezvu vedoucí do mozku. O funkci fosducinu v sítnici se zmíním v kapitole 2.2.2, která je fosducinu věnována.

Rhodopsin, resp. opsin obsahuje na svém C-konci několik serinových (Ser) a threoninových (Thr) residuí. Ser a Thr jsou aminokyseliny vhodné k vazbě fosfátové skupiny PO_4^{3-} . Enzym *rhodopsinkinasa* fosforyluje aktivovaný opsin, který může nést až

tři fosfáty. Jedná se ovšem o aktivovaný opsin, který je již přeměněn na svou *cis* formu. Doba vystavení takto aktivovaného opsinu je závislá na době vystavení oka světelnému záření a na jeho intenzitě. Fosforylaci opsinu stimuluje nízká koncentrace cytosolického Ca^{2+} . Při vysoké koncentraci Ca^{2+} se aktivuje Ca^{2+} -vazebný protein *recoverin*, který váže *rhodopsinkinasu* a tím inhibuje její funkci. Podle intenzity dopadajícího záření a podle doby ozařování je opsin fosforylován postupně jedním až třemi (někdy i více) fosfáty. Za velmi intenzivního světla se musí zajistit zastavení přenosu signálu k nervům, aby nedošlo k jejich přehlcení signálem, tedy nové a nové aktivaci transducinu. V tom okamžiku je opsin fosforylován na všech třech místech a takto fosforylovaný opsin váže protein zvaný *β -arrestin*. Fosforylovaný opsin držený *β -arrestinem* nedokáže aktivovat transducin, čímž se zajistí ztlumení přicházejícího světelného signálu. I pouze fosforylovaný opsin nedokáže aktivovat transducin. *β -arrestin* váže fosforylovaný protein do té doby, dokud se intenzita dopadajícího záření nezmírní.

Při ostrém světle se tímto způsobem sníží amplifikace signálu až $10^4\times$. Tento proces vede nejen k ochraně očních nervů, ale také možnosti tyčinek rozeznávat intenzitu světla a to ať její zvýšení, nebo i snížení, což by ve chvíli přehlcení tyčinek intenzivním zářením nebylo možné [10 - 14].

2.2 Fosducin

2.2.1 Základní informace o struktuře a výskytu

Fosducin je protein o hmotnosti 33 kDa, vyskytující se především u savců, ovšem znám je také jeho, případně jemu homologicky podobných proteinů, výskyt i u jiných nesavčích eukaryotních organismů, jako jsou kostnatí, nálevníci, houby a kvasinky (viz. *Obr. 4, str. 18*) [15 - 24].

Human Pdc (1-246)	1	MEEAKSQSLEEDFEGQATHGPKGVI	NDWRKFKLESQDSDSI	PPSKKE	ILROMSSPQSRNGKDSKERVSRKMSI	DEYELIHKE	83
Human PhiOP1 (1-194)	1	-----	-----	-----	MSSPQSRNGKDSKERVSRKMSI	DEYELIHKE	31
Murine Pdc (1-244)	1	MEEAASQSLEEDFEGQATHGPKGVI	NDWRKFKLESSEGGDSI	PPSKKE	ILROMSSPQSRDD--	SKERMSRKMSI	81
Rat Pdc (1-246)	1	MEEAASQSLEEDFEGQATHGPKGVI	NDWRKFKLESSEGGDSI	PPSKKE	ILROMSSPQSRDDKSKERMSRKMSI	DEYELIHQD	83
Bovine Pdc (1-245)	1	MEKAKSKSLEEDFEGQASHGPKGVI	NDWRKFKLESSEDSVA	PPSKKE	ILROMSSPQSRDDKSKERFSRKMSV	DEYELIHKD	83
Danio rerio Pdc 2 (1-237)	1	----MSDRIVDEDPVTVTHGPKGVI	NDWRKFKLESMDQAL	PPNKR	LLROMSSPQ--	KPKDSCVGGNLRKMSADEYELIHKE--	77
Blepharisma Pdc (1-163)	1	-----	TGVKGV	TFDKRAREQS	PQPLFE	PGGKR	64
Human Pdc (1-246)	84	KEDENCLRKYRRCQMDDMHQKLS	FGPRYGFVYELET	SKQFLET	IEKELK	ITTI	166
Human PhiOP1 (1-194)	32	KEDENCLRKYRRCQMDDMHQKLS	FGPRYGFVYELET	SKQFLET	IEKELK	ITTI	114
Murine Pdc (1-244)	82	KEDESCLRKYRRCQMDDMHQKLS	FGPRYGFVYELET	GEQFLET	IEKEQKVT	IVVNI	164
Rat Pdc (1-246)	84	KEDEGCLRKYRRCQMDDMHQKLS	FGPRYGFVYELET	GEQFLET	IEKEQKVT	IVVNI	166
Bovine Pdc (1-245)	84	KEDENCLRKYRRCQMDDMHQKLS	FGPRYGFVYELES	GEQFLET	IEKEQKVT	IVVNI	166
Danio rerio Pdc 2 (1-237)	78	-EDEKSLRKYRRCQCMEMHERLS	FGPKFEGVYD	LDSE	GEAFLEVI	EKEHRL	159
Blepharisma Pdc (1-163)	65	EDAE	RSFAQTI	REMKR	DEENKI	FGFAYID	139
Human Pdc (1-246)	167	FCKIKASNTGAGDRFSLDVLPTLLI	YKGGELISNFI	SVAEQFAEEFF	AGDVESFLNEYGLLPERE	VHVLEHTKIEEEDVE	246
Human PhiOP1 (1-194)	115	FCKIKASNTGAGDRFSLDVLPTLLI	YKGGELISNFI	SVAEQFAEEFF	AGDVESFLNEYGLLPERE	VHVLEHTKIEEEDVE	194
Murine Pdc (1-244)	165	FCKIKASNTGAGDRFSTDVLPTLLI	YKGGELISNFI	SVAEQFAEEFF	AVDVESFLNEYGLLPERE	IHDLEQTNMEDIE	244
Rat Pdc (1-246)	167	FCKIKASNTGAGDRFSSDVLPTLLI	YKGGELISNFI	SVAEQFAEDFF	AADVESFLNEYGLLPERE	IHDLGQTNMEDIE	246
Bovine Pdc (1-245)	167	FCKIKASNTGAGDRFSSDVLPTLLI	YKGGELISNFI	SVTEQLAEEFF	TGDVESFLNEYGLLPERE	EMHVLEQSNMEDME	245
Danio rerio Pdc 2 (1-237)	160	FRICACDTGAGDRFCDVLPALLVY	KAGELLGNFLAM	TQHFSE	EFFATDVEAF	FLNAYGLLPERE	237
Blepharisma Pdc (1-163)	140	VLLK	ILSIDR--	GNCHTEAL	PLNLLV	-----	163

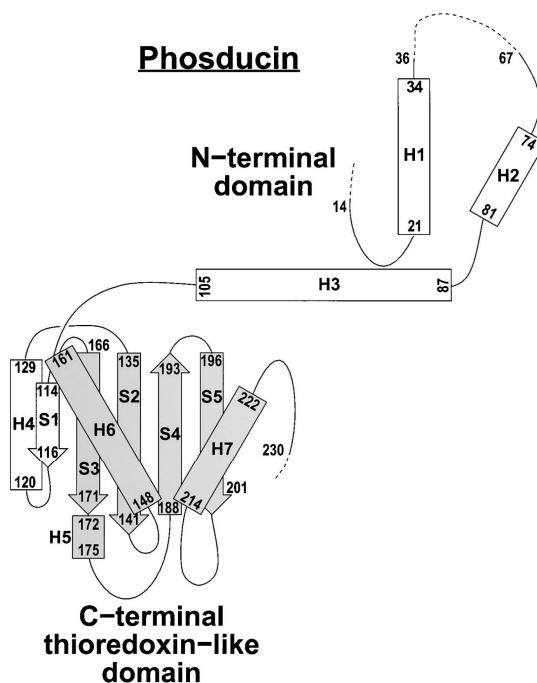
Obr. 4 Srovnání primární struktury fosducinu různých organismů. Stupeň sytosti barvy vypovídá o sekvenční shodě v rámci uvedených organismů [25].

Zprvu byl fosducin identifikován jako protein vyskytující se výhradně ve fotoreceptorových buňkách oční sítnice, ovšem pozdější studie prokázaly jeho výskyt i v místech, jako jsou neuroendokrinní buňky šišinky v mozku a pinealocyty šišinky. V obou případech se jedná o buňky embryologicky příbuzné oční sítnici [15-19]. Evolucí bylo těmto buňkám umožněno během noci tvořit neurohormon melatonin [26]. Fosducin byl ovšem nalezen i ve tkáních jako jsou játra [27], sympatický nervový systém [28], mozek [29], ledviny, plíce, slezina a kosterní svalstvo [30].

Ve své práci se zabývám fosducinem nacházejícím se především v tyčinkách oční sítnice. Nedávno bylo zjištěno, že v závislosti na osvětlení a také na jeho intenzitě, dochází k rozprostírání fosducinu po celé délce tyčinky, dokonce byl nalezen obsah fosducinu i v místě jádra tyčinky. Studie ukazují, že ve tmou adaptované sítnici se fosducin nachází především ve vnějším segmentu tyčinky. Po ozáření oka zábleskem světla dochází k postupnému přesouvání fosducinu z vnějšího segmentu do cytosolu vnitřního segmentu tyčinky [3, 31]. Tento přesun souvisí s funkcí fosducinu, kterou zmiňuji v kapitole 2.2.2.

Savčí fosducin sestává z 244 - 246 aminokyselin, v závislosti na živočišném druhu [32]. První krystalová struktura fosducinu byla získána v komplexu s jeho vazebným partnerem, tj. $G_{\beta\gamma}$ podjednotkou trimerního proteinu transducinu [33]. Jedná se o protein, který lze pomyslně rozdělit na dvě domény spojené flexibilním peptidovým spojem. Každá doména je pojmenována podle proteinového konce, na kterém se nachází, tj. N- a C-koncová doména. Strukturní analýza ukázala, že N-koncová doména je značně nestrukturovaná a je tvořena třemi α -helixy pojmenovanými postupně od N-konce H1, H2

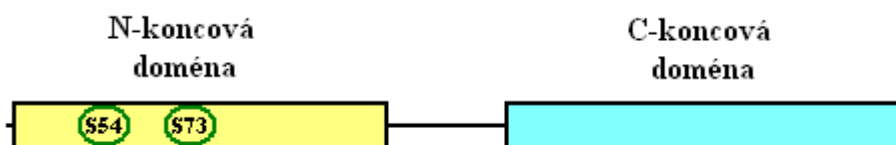
a H3. C-koncová doména byla nazvána thioredoxin-like doménou (*like*, z angl. podobný), jelikož se strukturně velmi podobá malému antioxidačnímu proteinu thioredoxinu, jehož hlavní funkci můžeme shrnout jako redukci ostatních proteinů (viz. *Obr. 5*) [33].



Obr. 5 Zobrazení sekundární struktury fosducinu [33].

Thioredoxin obsahuje thiolové –SH skupiny, jejichž vodíky redukují -S-S- můstky ostatních proteinů, nebo např. ribonukleosiddifosfátů [34]. Thioredoxinová C-koncová doména fosducinu ovšem ztratila schopnost redukce a to díky obsahu pouze jedné ze dvou aktivních cysteinových –SH skupin. V případě fosducinu zastává jeho C-koncová doména pravděpodobně pouze strukturní funkci [33].

Bylo zjištěno, že fosducin je protein, který je v buňce fosforylován. Za dvě nevyznamnější fosforylační místa na fosducinu byly označeny dva seriny a to Ser54 a Ser73 (viz. *Obr. 6*) [6, 35].



Obr. 6 Schematické znázornění struktury fosducinu s označením dvou nevyznamnějších fosforylačních míst. „S“ znamená serin.

Obě fosforylační místa mohou být fosforylována pomocí *cAMP-dependentní proteinkinasy A* (PKA), ovšem další studie ukázaly, že fosforylace serinu 54 i serinu 73 pomocí Ca^{2+} /calmodulin-dependentní kinasy II (CaMKII), je mnohem více účinná (300×, oproti 3× pomocí PKA) a mnohem rychlejší [8, 9], jak bude vysvětleno později v kapitole 2.2.2. Zároveň se zjistilo, že fosforylací pomocí CaMKII dochází k přenosu fosfátu i na další aminokyseliny v proteinu, konkrétně Ser6, Ser36 a Ser106. Tato aditivní fosforylace pravděpodobně zvyšuje celkový význam předchozích fosforylací [8] (viz. kapitola 2.2.2). Defosforylace fosducinu je zajištěna enzymy *fosfatasami*, konkrétně *fosfatasy* typu 1 a 2A [36].

Obě klíčová fosforylační místa, Ser54 a Ser73, se nacházejí v N-koncové doméně proteinu (viz. Obr. 5, str. 19) a flexibilita této domény se zdá být výhodnou pro funkci fosducinu [33].

2.2.2 Funkce

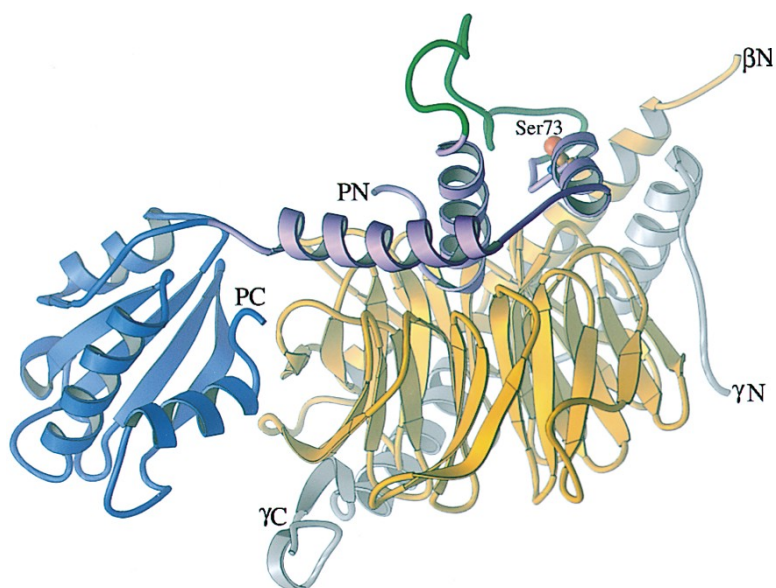
Jak již bylo několikrát naznačeno v předchozí kapitole, struktura fosducinu je úzce spjata s jeho funkcí. Fosducin je regulační protein, který reguluje intenzitu signálu přenášeného G-proteinem transducinem. V této souvislosti mluvíme o jeho funkci v sítnici oka [3]. Nedávné studie odhalily i další funkci fosducinu, jako regulátoru hypertenze, zejména v klidových podmínkách organismu, tj. ve spánku. Studie byly prováděny na myších a dále pak i na vybraných skupinách lidí. Bylo zjištěno, že u myší, kterým byl zmutován gen pro fosducin (tzv. *Pdc*^{-/-}), se zvýšil v době spánku diastolický tlak o 10 mm Hg sloupce, oproti zdravým myším. U lidí se zvýšeným krevním tlakem pak bylo prokázáno okolo 49 bodových mutací genu pro fosducin, tzv. SNP (z angl. *single nucleotide polymorphism*). V tomto ohledu je tedy fosducin protein ovlivňující sympatetický nervový systém a při jeho dysfunkci dochází ke zvýšení krevního tlaku u myší a lidí [28]. Molekulární mechanismus vlivu fosducinu na krevní tlak je zatím neznámý.

Ve své diplomové práci se zabývám fosducinem nacházejícím se v tyčinkách sítnice oka. Zaměřím se tedy na jeho funkci v těchto nervových buňkách.

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1.4, existují v oku určité ochranné mechanismy bránící zahlcení očního nervu signálem vzniklým dopadem velmi intenzivního světla. Jen pro připomenutí, jedná se o fosforylací aktivovaného opsinu a následná vazba takto fosforylovaného opsinu β -arrestinem. Podobnou roli v regulaci intenzity hraje i fosducin.

Ve světle adaptované sítnici dochází k rozpadu transducinu na dvě podjednotky, G_{α} a $G_{\beta\gamma}$. G_{α} podjednotka váže inhibiční γ podjednotku enzymu PDE (viz. kapitola 2.1.2), ovšem o $G_{\beta\gamma}$ se v učebnicích autoři příliš nezmiňují. Hovoří se pouze o jejím přesunu z vnějšího segmentu tyčinky do jejích ostatních částí. Právě zde hraje svou roli fosducin. Nefosforylovaný fosducin totiž váže $G_{\beta\gamma}$ podjednotku transducinu a přenáší ji z vnějšího segmentu tyčinek do vnitřního segmentu, tj. pryč od membrány disku. Touto vazbou zabrání reasociaci $G_{\beta\gamma}$ s G_{α} za tvorby trimerního transducinu, který by byl jinak opět schopen interagovat s rhodopsinem a přenášet tak další a další signál, čímž by za ostrého světla mohl přehltnout oční nerv a způsobit tak destrukci celé sítnice [3].

Krystalická struktura komplexu $G_{\beta\gamma}$ s fosducinem odhalila mnohé detaily týkající se vazby obou proteinů (viz. Obr. 7) [33].



Obr. 7 *Stužkovité znázornění komplexu $G_{\beta\gamma}$ s fosducinem [33]. Thioredoxinová C-koncová doména fosducinu je znázorněna modrou barvou. Tři fialové α -helixy N-koncové domény fosducinu obklopují zlatě značenou β -podjednotku $G_{\beta\gamma}$, seshora. Doposud přesně strukturně nedefinovaný region na N-konci fosducinu mezi aminokyselinami 37 až 66 je označen zelenou barvou.*

N-koncová doména fosducinu interaguje s částí $G_{\beta\gamma}$, která jinak zajišťuje interakci s G_{α} . N-koncová doména se zdá být poněkud flexibilní a spíše méně strukturovaná, především v místech, která nejsou v kontaktu s $G_{\beta\gamma}$, proto je obtížné získat krystal samotného fosducinu, případně použít jiných biofyzikálních technik, jako je nukleární

magnetická rezonance (NMR), ale v dnešní době už je možné i tyto nestrukturované proteiny pomocí NMR řešit. Za příčinu značné flexibility N-koncové domény fosducinu se považuje její značná hydrofilita. Helix 1 (H1) formuje jádro N-terminální domény a obsahuje funkčně velmi důležitý Trp29 [37]. Obě důležitá fosforylační místa, Ser54 a Ser73, se nacházejí ve flexibilní oblasti mezi helixy H1 a H2 (viz. *Obr 5, str. 19*). Poloha těchto míst je výhodná pro přicházející PKA a CaMKII, které mají takto lepší přístup pro fosforylaci, ale také samozřejmě pro přicházející *fosfatasy* [33]. Účinnost blokace vazby mezi fosducinem a $G_{t\beta\gamma}$ se zvýší až třístokrát v případě fosforylace pomocí CaMKII, oproti PKA, která blokuje interakci pouze s třikrát větší účinností [8]. C-koncová doména fosducinu sestává z pěti β -listů a čtyř α -helixů [33].

Při interakci fosducinu s $G_{t\beta\gamma}$ nedochází k vzájemné interakci obou jeho domén, naopak obě domény obklopí β -listy $G_{t\beta}$ a vytvoří tak rozsáhlý interakční povrch mezi fosducinem a $G_{t\beta\gamma}$. N-terminální doména interaguje se všemi β -listy $G_{t\beta}$ a to právě ve stejném místě, v jakém se $G_{t\beta\gamma}$ váže s $G_{t\alpha}$ -GDP. Dochází tedy k fyzickému zabránění kontaktu $G_{t\beta\gamma}$ s $G_{t\alpha}$ -GDP. C-terminální doména váže částečně $G_{t\beta}$ a obklopí místo, kterým se transducin běžně zachytává do plasmatické membrány, a zároveň se zakryje i místo, které umožňuje transducinu interagovat s rhodopsinem. Thioredoxinová doména fosducinu má značně negativní náboj, což může vést k tomu, že (i) může mimikovat negativní elektrostatický potenciál membrány a umožnit tak fosducinu lépe odvést $G_{t\beta\gamma}$ od membrány, nebo (ii) může docházet k elektrostatické repulzi mezi negativně nabitou membránou a thioredoxinovou doménou fosducinu, což může ulehčit odtah komplexu od membrány. Celková plocha $G_{t\beta\gamma}$ původně odkrytá a přístupná okolí se vazbou fosducinu zmenší o 2300 \AA^2 . Výše zmíněný Trp29 pravděpodobně hraje důležitou roli ve stabilizaci N-terminální domény fosducinu při jeho vazbě s $G_{t\beta\gamma}$ a to tvorbou malého hydrofobního jádra při jeho interakci s okolními aminokyselinami $G_{t\beta}$ podjednotky (Trp99 a Leu117) [33]. Některé strukturní defekty vazby C-koncové domény k $G_{t\beta}$ pravděpodobně vedou ke vzniku onemocnění sítnice [38]. Vazba fosducinu s $G_{t\beta\gamma}$ způsobí větší zakrytí povrchu $G_{t\beta\gamma}$, než vazba $G_{t\alpha}$ s $G_{t\beta\gamma}$ a to až o 700 \AA^2 [33]. Počet iontových a hydrofobních interakcí v komplexu fosducin/ $G_{t\beta\gamma}$ je také větší, než v samotném transducinu $G_{t\alpha\beta\gamma}$. Disociační konstanta komplexu fosducin/ $G_{t\beta\gamma}$ má hodnoty od 17nM do 110nM [36, 39, 40], oproti mnohem nižší afinitě v transducinu, kde má disociační konstanta mezi $G_{t\alpha}$ -GDP a $G_{t\beta\gamma}$ hodnotu cca 150nM [41]. Je zajímavé, že ani $G_{t\alpha}$, ani fosducin neváže $G_{t\gamma}$. C-koncová doména fosducinu je pouze v těsné blízkosti s $G_{t\gamma}$. Toto je pouhý odhad, neboť při tvorbě

krystalu byla záměrně odstraněna C-koncová část G_{ty} , takže je tedy možné, že thioredoxinová doména fosducinu nějakým dalším způsobem interaguje s farnesylovaným C-koncem G_{ty} [33]. Dále bylo zjištěno, že N-koncová doména fosducinu váže $G_{\text{t}\beta\gamma}$ mnohem silněji než C-koncová doména a obě domény jsou na sobě nezávislé [6].

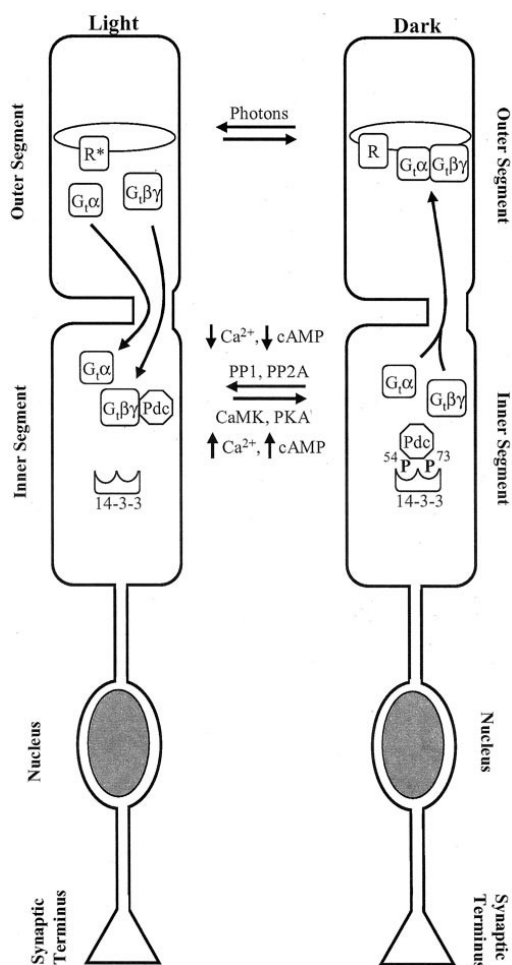
Pokud by fosducin působil stále a stále by vázal $G_{\text{t}\beta\gamma}$, transducin by nemohl být obnoven a nedocházelo by k přenosu signálu do mozku ani za mírného světla. Proto musí být fosducin také regulován a k tomuto účelu slouží právě 14-3-3 protein.

2.2.3 Role 14-3-3 proteinu v regulaci fosducinu

Funkce 14-3-3 proteinu v tyčinkách sítnice oka pravděpodobně spočívá v zachycení fosforylovaného fosducinu tak, aby nemohl interagovat s $G_{\text{t}\beta\gamma}$ [7]. Další možnou funkcí této interakce je ochrana fosducinu před proteolytickou degradací či defosforylací. Objasnění struktury komplexu 14-3-3/fosducin by mohlo významně pomoci při řešení těchto otázek. V rámci své diplomové práce jsem se proto snažila provést základní biofyzikální charakterizaci tohoto komplexu.

Ve tmou adaptované sítnici dochází k fosforylaci fosducinu pomocí PKA a CaMKII. Fosforylační místa Ser54 a Ser73 jsou pro obě *kinasy* dostupná i v komplexu fosducin/ $G_{\text{t}\beta\gamma}$ [42], proto samotná fosforylace nevede přímo k rozpadu komplexu, naopak se uvažuje o konformačních změnách v N-koncové doméně fosducinu v důsledku fosforylace, speciálně v segmentu 37 až 66, což může vést ke slabé změně interakčního povrchu fosducinu s $G_{\text{t}\beta\gamma}$. Ke konformační změně mohou přispívat i pozitivně nabitě aminokyseliny (Lys23, Arg30, Lys71) nacházející se v těsné blízkosti fosforylačního místa Ser73 [6, 33]. Nedávné studie ukázaly, že fosforylace fosducinu v místě Ser73 vede k posunu helixu H2 v N-koncové doméně fosducinu. Posun helixu je pravděpodobně způsoben sférickými důvody a elektrostatickými silami mezi H2 a fosfátem [6].

Po fosforylaci fosducinu a jeho zachycení 14-3-3 proteinem, udržuje 14-3-3 protein fosducin ve vnitřním segmentu tyčinek a pravděpodobně tak i brání jeho vazbě s $G_{\text{t}\beta\gamma}$ (viz. Obr. 8, str. 24) [7]. Naskýtá se však i otázka, zda je další funkcí 14-3-3 proteinu vzhledem k fosducinu např. i jeho ochrana vůči *proteasam* či *fosfatasam* po dobu, kdy fosducin neváže $G_{\text{t}\beta\gamma}$. Tyto a další otázky jsou motivací pro další zkoumání komplexu 14-3-3/fosducin.



Obr. 8 Hypotetické schéma procesu adaptace tyčinky v sítnici oka a to především translokace transducinu a fosducinu (Pdc). Obrázek zachycuje vazbu $G_{i\beta\gamma}$ fosducinem v důsledku ozáření tyčinky světlem. Ve tmou adaptované sítnici naopak dochází k fosforylaci fosducinu („P“), který upustí $G_{i\beta\gamma}$. $G_{i\beta\gamma}$ přechází do vnějšího segmentu (Outer segment), kde může reasociovat s $G_{i\alpha}$ a vytvořit heterotrimerní transducin. Fosforylovaný fosducin je držen 14-3-3 proteinem ve vnitřním segmentu tyčinky (Inner segment). „R“ znamená rhodopsin, „R*“ znamená aktivovaný rhodopsin, „PP“ značí fosfatasy podílející se na defosforylaci fosducinu [9].

2.3 14-3-3 proteiny

2.3.1 Struktura a výskyt

14-3-3 proteiny jsou rodinou kyselých regulačních proteinů, jejichž hmotnost se pohybuje od 28 do 33 kDa. 14-3-3 proteiny byly nalezeny ve všech eukaryotních buňkách [43, 44] a hrají roli v mnoha procesech v organismu, např. apoptosa, transkripce, regulace

buněčného cyklu, růst a diferenciaci buněk, intracelulární transport, buněčná adheze, strukturace cytoskeletu a další [45 - 48]. 14-3-3 proteiny jsou také zapojeny do komplexů vyskytujících se v široké škále neurodegenerativních chorob, včetně Creutzfeldt-Jakobovy choroby [49-51], Alzheimerova [52], Parkinsonovy choroby [53] a dalších. V dnešní době je známo několik isoform 14-3-3 proteinů. U savců bylo identifikováno sedm isoform označených písmeny římské abecedy $\beta - \eta$ [54] (viz. Obr. 9). U kvasinek jsou známy dvě isoformy nazvané BMH1 a BMH2 [55]. V rostlinné říši bylo nalezeno doposud největší množství 14-3-3 proteinů a to patnáct [56].

beta	MTMDKSELVQKAKLAEQAERYDDMAAAMKAVTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE--RNEKKQQMGKEYREKIE
zeta	--MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTE--GAENKQQMAREYREKIE
theta	--MEKTELIQKAKLAEQAERYDDMATCMKAVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGRRSAWRVSSIEQKTD--TSDKLLQLIKDYREKVE
sigma	--MERASLIQKAKLAEQAERYDDMAAFMKGAVEKGEELSCERNLLSVAYKNVVGQRAAWRVLSIEQKSNEEGSEKGPVEYREKVE
eta	--MGDREQLLQARLAEQAERYDDMASAMKAVTELNEPLSNEDRNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTMADGNEKKLEKVKAYREKIE
gamma	--MVDREQLVQKAKLAEQAERYDDMAAMKNVTELNEPLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTSADGNEKKIEMVRAIYREKIE
epsilon	--MDDREDLVQAKLAEQAERYDEMVESEMKKVAGMDVELTVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRISSIEQKEENKGGEDKLMIREYRQMV
beta	AELQDICNDVLELLDKYLIF--NATQFESKVFYLMKMGDYFRYLSEVAGDNKQTTVSNQQAYQEAPEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSV
zeta	TELKRDICNDVLSLEKFLIF--NASQAESKVFYLMKMGDYFRYLAEVAAGDDKGIQVDSQQAYQEAPEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSV
theta	SELRISICTTVLELLDKYLIA--NATNPFESKVFYLMKMGDYFRYLAEVACGDDRRQTTIDNSQGAAYQEAPEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSV
sigma	TELQGVCDTVLGLLDSHLIK--EAGDAESRVFYLKMGDYFRYLAEVATGDDKKRIIDRSARAYQEAPEISKKEMPPPTNPIRLGLALNFSV
eta	KELETCNDVLSLLDKFLIKNCNDFQYESKVFYLMKMGDYFRYLAEVAGGKKNVVEASEAAYKEAPEISKEEMQPTHPIRLGLALNFSV
gamma	KELEAVCQDVLSDNYLIKNCSETQYESKVFYLMKMGDYFRYLAEVATGKRRATVVESEKAYSEAEISKEEMQPTHPIRLGLALNFSV
epsilon	TELKLIICCDILDLVLDKHLIF--AANTGESKVFYLMKMGDYFRYLAEVATGNDRKAENSLVAYKAASDIAMTELPPPTHPIRLGLALNFSV
beta	FYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKSTLIMQLLRDNLTLWTSNQDGEDGAGEG-----
zeta	FYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKSTLIMQLLRDNLTLWTSNQDGEAEAGEG-----
theta	FYYEILNPNELACTLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKSTLIMQLLRDNLTLWTSNDSAGECDAAEAGEG-----
sigma	FHYEIANSPPEAISLAKTTFDEAMADLHTLSEDSYKSTLIMQLLRDNLTLWTSADNAGEEGEAPQEPQS-----
eta	FYYEIQNAPEQACLAKQAFDDAIAELDTLNEESYKSTLIMQLLRDNLTLWTSNQDDEEAGEGN-----
gamma	FYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLNEESYKSTLIMQLLRDNLTLWTSNQDQDDGEGGN-----
epsilon	FYYEILNSPDRACRLAKAFAFDIAELDTLSEESYKSTLIMQLLRDNLTLWTSNQDGGEGEQNKALQDVEDENQ

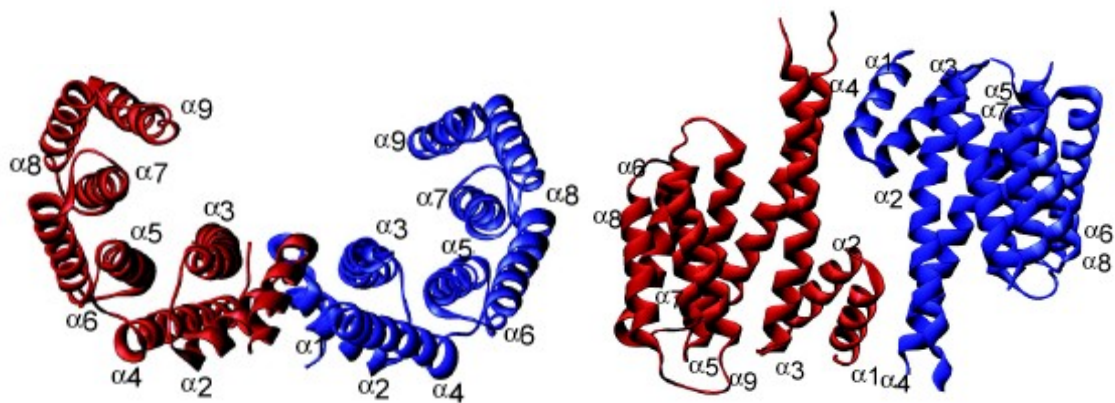
Obr. 9 Porovnání sekvencí lidských isoform 14-3-3 proteinů. Stínování vypovídá o sekvenci shodě jednotlivých isoform [57].

Všechny isoformy tvoří v buňce dimery. Tvorba dimeru souvisí s jejich funkcí a je pro jejich funkci nezbytná [58 - 61]. Isoformy mohou tvořit buď homodimery, nebo heterodimery, výjimkou je savčí σ isoforma, která je schopná tvořit pouze homodimer [62].

Vznik názvu 14-3-3 proteinu se datuje do 60. let 20. století zásluhou Moora a Pereze, kteří identifikovali 14-3-3 proteiny jako malé kyselé proteiny nacházející se v extraktu z mozkových tkání savců (krysa, králík, skot). Následná purifikace proteinu pomocí dvojdimenzionální DEAE-celulosové chromatografie ukázala jeho polohu ve frakci 14. V dalším kroku purifikace zahrnujícím škrobovou elektroforézu byla migrační poloha proteinu ve frakci 3.3 [63].

Doposud bylo identifikováno přes 300 vazebných partnerů, kteří jsou schopni se 14-3-3 proteiny interagovat. V roce 1996 bylo zjištěno, že pro interakci vazebného partnera se 14-3-3 proteinem je nutná fosforylace partnera a byly navrženy dva vazebné motivy, které by měl vazebný partner pro interakci se 14-3-3 obsahovat: **RSXpSXP** a **RX(Y/F)XpSXP**, kde pS značí fosforylovaný serin (nebo threonin) a X značí libovolnou aminokyselinu, kromě cysteinu [64, 65]. Tyto motivy byly charakterizovány studiem vazby malých fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů [45, 46, 64, 66]. Další studie ukázaly, že existuje i jiný, třetí vazebný motiv **-pS/pTX₁₋₂-CO₂H**, kde X není prolin [67]. Dlouho se myslelo, že pro interakci je nutná fosforylace vazebného partnera, ovšem později se ukázalo, že existují i nefosforylovaní vazební partneři, kteří jsou schopni se 14-3-3 interagovat a to dokonce s větší afinitou, než v případě fosforylovaných vazebných partnerů. Jedná se o synteticky vyrobený peptid R18, obsahující aminokyselinovou sekvenci **WLDLE**, která je pro vazbu důležitá [68, 69]. Dále se zjistilo, že všichni vazební partneři nemusí obsahovat přesnou sekvenci jednoho ze tří vazebných motivů [70] a navíc mohou k vzájemné interakci přispívat i jiné druhy vazebných sil [71]. Mezi vazebné partnery 14-3-3 proteinů se řadí např. *proteinkinasy* (např. PKC [72]), *fosfatasy* (např. Cdc25A [73]), receptory, G-proteiny a s nimi spojené proteiny (např. RGS3 [71, 74]), enzymy podílející se na syntéze neuropřenašečů (např. *serotonin N-acetyltransferasa* [75]), některé strukturní a cytoskeletární proteiny a další.

Často vazební partneři obsahují dva vazebné motivy, proto je pro vazebného partnera i 14-3-3 protein výhodná tvorba dimerů 14-3-3 proteinů. 14-3-3 proteiny ovšem mohou vázat i dva proteiny naráz a to každý s jiným vazebným motivem [58 - 61]. Každý monomer dimerního 14-3-3 proteinu sestává z devíti antiparalelních α -helixů, které jsou od N-konce postupně očíslovány od 1 do 9. Jednotlivé helixy jsou propojeny různě dlouhými flexibilními ohyby [52, 76, 77]. Každý monomer obsahuje amfifilní žlábek a ten pak po spojení obou monomerů tvoří vazebné místo pro ligand (viz. *Obr. 10, str. 27*). Kanál vytvořený po spojení obou žlábků je asi 20 Å hluboký a asi 40 Å široký a dlouhý [45].



Obr. 10 Krystalová struktura lidské isoformy 14-3-3 σ ve stužkové reprezentaci v pohledu zepředu a zespoda [78]. Tato isoforma tvoří homodimer. Jednotlivé monomery mají vyznačeny α -helixy a jsou označeny červeně a modře.

Sekvence aminokyselin v amfifilním žlábků zůstává v rámci všech isoform značně konzervovaná, proměnlivé sekvence jsou pak pozorovány na povrchu dimeru [77]. Dimerní struktura je zajištěna elektrostatickými a hydrofobními interakcemi aminokyselin z helixů H1 a H2 jednoho z monomerů společně s aminokyselinami z helixů H3 a H4 druhého monomeru [45, 62].

Na vazbě vazebného partnera se podílí aminokyseliny helixů H3, H5, H7 a H9, konkrétně aminokyseliny Lys49, Arg56 a Tyr128, jež mají hlavní funkci při vazbě fosfátu u isoformy ζ a nacházejí se v centrálním kanálu [79].

Dimerní struktura 14-3-3 proteinu je značně rigidní. Výjimku tvoří flexibilní C-konec monomeru 14-3-3 proteinu, jehož struktura se liší v rámci různých isoform. Přesná struktura C-koncové části nebyla doposud charakterizována, vzhledem k její flexibilní povaze [65, 76, 77, 79, 80]. Několik studií naznačuje, že je C-terminální segment zapojen do regulace vazby ligandu [76, 81, 82]. C-konec obsahuje jedno ze čtyř fosforylačních míst, nacházejících se u 14-3-3 proteinů. Jedná se o Ser/Thr232. Studie ukázaly, že přítomnost vazebného partnera – fosfopeptidu – a fosforylace Thr232 kaseinkinasou *Ia* způsobí značný nárůst flexibility C-koncové domény 14-3-3 proteinu [83]. Naopak v nepřítomnosti vazebného partnera dochází k okupaci vazebného žlábků 14-3-3 proteinu jeho C-koncem [84, 85]. Také bylo dokázáno, že některé isoformy (např. ječmenná isoforma 14-3-3A) přirozeně odstraňují svůj C-konec [86]. U některých isoform byla prokázána lepší afinita k vazebnému partnerovi, jiné isoformy pak naopak odstraněním

C-konce ztratily úplnou schopnost vazebného partnera vázat. Tento fakt poukazuje na důležitost C-koncové části 14-3-3 proteinu.

Vazbu vazebného partnera může ovlivnit i jeho acylace. Např. nepalmitoylovaný protein CD81 prokázal silnou asociaci se 14-3-3 ϵ [87]. Bylo zjištěno, že některé malé molekuly, např. terpenoid fusicoccin, zesilují vazbu 14-3-3 proteinu k plasmatické membráně H^+ -ATPasy v rostlinách a to stabilizací interakce mezi C-koncem H^+ -ATPasy a vazebným žlábkem 14-3-3 proteinu [88].

2.3.2 Funkce

Funkce 14-3-3 proteinů může být v základu rozdělena do tří mechanismů [89]:

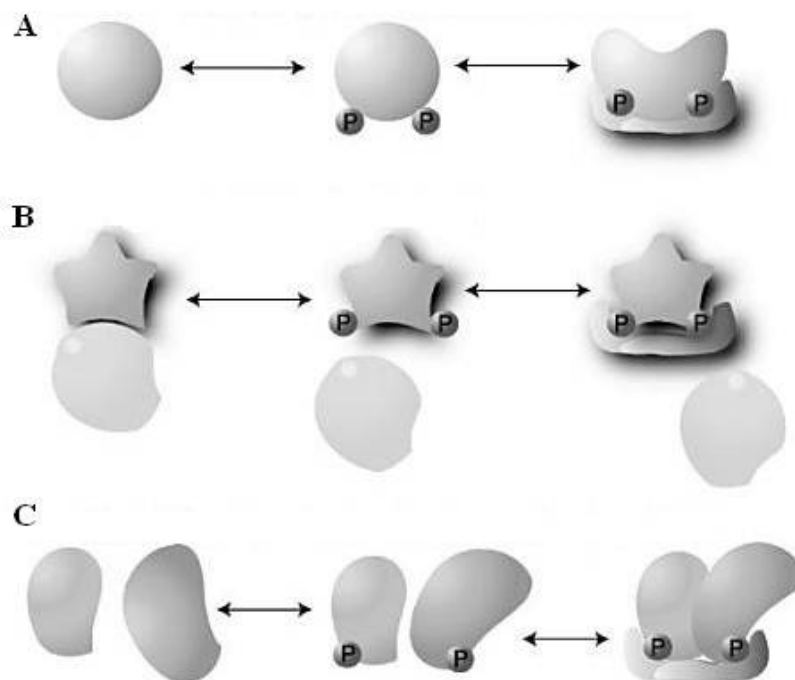
a) *14-3-3 proteiny mohou měnit konformaci svých vazebných partnerů.* Pokud je vazebným partnerem např. enzym, změna konformace enzymu může vést k aktivaci, nebo deaktivaci jeho enzymové aktivity. Např. *serotonin N-acetyltransferasa* (AANAT) je vazbou se 14-3-3 aktivována [75, 80]. Naopak *nitrát reduktasa* je vazbou inhibována [90].

b) *14-3-3 mohou fyzicky obklopit určitou sekvenci, nebo strukturní motiv vazebného partnera, nebo jej mohou naopak zpřístupnit.* Např. vazbou transkripčního faktoru FKHL1 může regulovat jeho pohyb mezi cytoplasmou a jádrem [91].

c) *14-3-3 proteiny mohou fungovat jako jakési lešení (angl. scaffolding protein) a zprostředkovat vazbu mezi dvěma jinak neinteragujícími proteiny.* Každý z monomerů 14-3-3 váže jeden protein. Příkladem může být zprostředkování interakce mezi *Raf-1 kinasou* a *proteinkinasou PKC- ζ* [92].

Všechny tři mechanismy jsou zobrazeny na *Obr. 11, str. 29*.

Dále bylo navrženo, že vazba 14-3-3 proteinu na vazebného partnera může zabránit jeho defosforylaci a tím i degradaci [67, 75]. Tato funkce by možná mohla být spojována i s fosducinem.



Obr. 11 Schématické znázornění funkce 14-3-3 proteinů. V části „A“ způsobuje 14-3-3 protein změnu konformace fosforylovaného („P“) vazebného partnera. V části „B“ 14-3-3 maskuje určitou aminokyselinovou sekvenci, která je zodpovědná za vazbu proteinu s jiným vazebným partnerem. V části „C“ zprostředkovává 14-3-3 protein vazbu dvou navzájem neinteragujících proteinů a funguje tak jako jakési molekulové lešení („molecular scaffold“). Převzato a upraveno z [89].

2.3.3 Regulace 14-3-3 proteinů

Jelikož hrají 14-3-3 proteiny důležitou roli v mnohých buněčných procesech, jejich funkce musí být regulována a tím i kontrolována. Mnoho isoform 14-3-3 proteinů, s výjimkou σ isoformy, je přítomno v různých tkáních a vážou své vazebné partnery s podobnou afinitou. Proto se zdá, že jsou vazebné vlastnosti 14-3-3 proteinů regulovány na úrovni translace, respektive během post-translační modifikace, nebo vazbou kofaktorů [88, 93 - 95]. Jednou z dobře prostudovaných post-translačních modifikací je fosforylace 14-3-3 proteinu. 14-3-3 proteiny obsahují tři až čtyři fosforylační místa (v závislosti na obsahu C-koncové části), konkrétně Ser58, Ser63, Ser184 a Ser/Thr232. Tato fosforylační místa bývají fosforylována mnohými *kinasami* účastnicími se buněčné signalizace a regulace [95 - 97]. Ser58 a Ser63 jsou v lidské izoformě ζ lokalizovány na rozhraní obou monomerů. Fosforylace Ser58 pravděpodobně zapříčiňuje rozpad dimeru na monomery,

což vede ke ztrátě funkce 14-3-3 proteinu [98, 99]. Ser184 a Ser/Thr232 jsou umístěny v sousedství vazebného žlábků a jejich fosforylace pravděpodobně způsobuje snížení schopnosti vázat vazebného partnera [83, 84, 100 - 102]. Fosforylační místo Ser/Thr232 se nachází na C-konci 14-3-3 proteinu, jehož funkce je popsána v kapitole 2.3.1.

Dalšími způsoby regulace jsou exprese genů 14-3-3 proteinů a regulace na úrovni ligandu – vazebného partnera.

3 Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce je příprava a biofyzikální charakterizace komplexu proteinů 14-3-3 a fosducinu (Pd).

Dílčí cíle této práce jsou:

- Expres 14-3-3 proteinu isoformy ζ wt (zkratka z angl. *wild type*, tj. divoký, přirozeně se vyskytující typ) v bakteriích (kmen *E. coli*, BL21(DE3)) a jeho následná purifikace s cílem získu miligramových množství.
- Expres 14-3-3 proteinu isoformy ζ noW (mutant W59F a W228F neobsahující aminokyselinu tryptofan) v bakteriích (kmen *E. coli*, BL21(DE3)) a jeho následná purifikace s cílem získu miligramových množství.
- Expres proteinu fosducinu (Pd wt) v bakteriích (kmen *E. coli*, BL21(DE3)) a jeho následná purifikace s cílem získu miligramových množství.
- Expres mutantních forem fosducinu (PdQ52K, PdQ52KS73A) v bakteriích (kmen *E. coli*, BL21(DE3)) a jeho následná purifikace s cílem získu miligramových množství.
- Pomocí PKA *in vitro* fosforylovat všechny purifikované formy fosducinu.
- Pomocí nativní elektroforézy sledovat vznik komplexu 14-3-3/Pd.
- Pomocí limitované proteolýzy charakterizovat flexibilní oblasti fosducinu v závislosti na jeho vazbě se 14-3-3.
- Pomocí ultracentrifugačních technik zjistit stechiometrii komplexu a odhadnout disociační konstantu K_d .
- Pomocí časově-rozlišené tryptofanové fluorescence popsat konformační změny fosducinu způsobené vazbou proteinu 14-3-3.

4 Metody a materiál

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

- agar - Carl Roth GmbH, Německo
- agarosa - Carl Roth GmbH, Německo
- akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo
- ampicilin - Sigma, USA
- ATP - Sigma, USA
- bacto trypton (pepton) - Carl Roth GmbH, Německo
- bacto yeast extract (kvasniční extrakt) - Carl Roth GmbH, Německo
- běžné chemikálie - Lachema a.s., Neratovice
- bis-akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo
- bromfenolová modř - Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 - Lachema a.s, ČR
- DTT (dithiotreitol) - Carl Roth GmbH, Německo
- EDTA - Sigma, USA
- glycin - Carl Roth GmbH, Německo
- imidazol - Carl Roth GmbH, Německo
- IPTG - Sigma, USA
- NP40 - Sigma, USA
- persulfát amonný - Sigma, USA
- SDS - Sigma, USA
- síran nikelnatý - Penta, ČR
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) - Carl Roth GmbH, Německo
- TRIS (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) - Carl Roth GmbH, Německo
- trypton - Carl Roth GmbH, Německo
- β -merkaptoethanol - Carl Roth GmbH, Německo

Všechny chemikálie byly nejméně čistoty p.a.

4.1.2 Přístroje

- centrifuga - pro koncentrování proteinů – Eppendorf 5804R, rotor A-4-44
- centrifuga - pro mikrozkušavky – MPW 52, rotor no. 11 3271, Austrálie

- centrifuga - rotor GSA a SS34 – Sorval RC-5B, DuPont Instruments, USA
- fotonásobič - Hamamatsu, R3809U-50, Japonsko
- chromatografie - HPLC-AKTA, Amersham Biosciences, Švédsko
- sonikátor - Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA
- Spektrofluorimetr - Photon Counting PC1 ISS, USA
- Spektropolarimetr - J-810 - Jasco, Japonsko
- třepačka miniprepů – Shaking Incubator HandyLab[®] System, N-Biotek, Korea
- třepačka litrových LB médií – InforsHT Multitron, Inforsag, Německo
- ultracentrifuga ProteomeLab-XL I, USA
- UV-LED excitace - PicoQuant, PLS 295-10, Německo
- UV-VIS absorpční spektrofotometr - Agilent 8453, USA

4.1.3 Ostatní materiál

- dialyzační membrána - MCO (Molecular weight cut off) 14000 - Roth, Německo
- *E.coli* BL21(DE3) - Stratagene, USA
- *chymotrypsin A* – Sigma-Aldrich, USA
- inhibitor *proteasa* SigmAFAS[™] Protease Inhibitor, Sigma-Aldrich, USA
- *lysozym* - New England BioLabs, USA
- náplně do kolon a kolony - Amersham Biosciences, Švédsko
- vektor - pET-15b - Invitrogen, USA
- PKA - Promega, USA
- standard molekulových vah - Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, USA
- *trypsin* - Sigma-Aldrich, USA

4.2 Plasmid

Pro pokusy byly použity plasmidy (vektory) pET15b. V nich byly zaklonovány geny kódující fosducin Pd wt, mutantní protein fosducinu PdQ52K, PdQ52KS73A, 14-3-3ζ wt protein a 14-3-3ζnoW protein. Gen se ve vektoru nachází ve všech případech mezi dvěma restrikčními místy pro *endonukleasy* Nde I a BamH I. Výhoda plasmidu pET15b spočívá v jeho rezistenci vůči antibiotiku ampicilinu. Další výhodou je obsah míst kódujících tzv. His-Tag, což je motiv šesti za sebou jdoucích histidinů na N-konci proteinu, usnadňujících purifikaci proteinu za použití niklové chelatační chromatografie (viz. kapitola 4.10.1). Plasmid dále obsahuje štěpné místo pro *proteasu thrombin*, umožňující odštěpení His-Tagu od proteinu.

4.3 Kultivace bakterií

Bakterie byly nejdříve kultivovány na pevném LB agaru v Petriho miskách při 37 °C. Následně byly přeneseny do kapalného LB média a kultivovány při 210 ot./min. opět při 37 °C. Do kultivačních směsí (pevné i kapalné) bylo přidáno antibiotikum ampicilin tak, aby jeho finální koncentrace činila $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Bakterie nesoucí plasmid pET15b jsou odolné vůči ampicilinu, tudíž se mohou množit v prostředí obsahujícím toto antibiotikum. Ostatní nerezistentní bakterie v tomto prostředí nerostou.

Příprava LB média

Do litrové Erlenmayerovy baňky byla připravena směs 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl a doplněna do 1 l destilovanou vodou. pH bylo upraveno na 7,4. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu.

Příprava LB agarových misek

Směs 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl, 20 g agaru byla doplněna do 1 l destilovanou vodou. Následně byl roztok sterilizován v autoklávu a ochlazen. Poté byl přidán 1 ml ampicilinu o koncentraci $100 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a roztok byl promíchán. Takto připravený roztok byl nalit do Petriho misek (cca 15 ml na jednu Petriho misku).

4.4 Skladování bakterií

Při krátkodobém skladování byly bakterie na Petriho miskách uchovávány při teplotě 4 °C tak, aby nedošlo k jejich vyschnutí. Při dlouhodobějším skladování byly čerstvě narostlé bakterie v živném bujónu smíchány se sterilním glycerolem do výsledné koncentrace 30 % a uloženy v mrazicím boxu při -80 °C.

4.5 Expresní systém

Expese proteinů byla prováděna v bakteriálním expresním systému. Byly použity bakterie *E. coli* BL21(DE3). Tyto kmeny bakterií jsou vhodné pro dlouhodobé uchování a efektivní expresi proteinů umožňující indukci pomocí IPTG. IPTG (isopropyl – β – D – thio - galaktopyranosid), derivát galaktosy, je induktorem exprese rekombinantních proteinů. Po jeho přidání k bakteriální kultuře transformované vektorem pET15b

obsahujícím gen pro daný protein, dojde ke spuštění proteosyntézy rekombinantního proteinu.

Bakterie *E. coli* BL21(DE3) mají ve svém genomu gen pro *T7 RNA polymerasu*. Tento gen je pod kontrolou lacUV5 promotoru. Navíc tento kmen bakterií neprodukuje proteasy Lon a OmpT, které by mohly protein našeho zájmu degradovat. Gen pro *T7 RNA polymerasu* byl získán z bakteriofága T7 a kóduje vysoce procesivní *RNA polymerasu* rozeznávající pouze T7 promotor. Jelikož je tento gen pod kontrolou lacUV5 promotoru, chová se jako lac operon, tj. lac represor, který je produktem lacI genu, je navázán na lacO operátorovou sekvenci obsaženou v lacUV5 promotoru a brání bakteriální *RNA polymerase* v nasednutí. Přídavek IPTG do média způsobí jeho vazbu na lac represor, čímž dojde k jeho inhibici. To vede k nasednutí bakteriální *RNA polymerasy* a následné transkripci genu pro *T7 RNA polymerasu*. Tato *polymerasa* rozeznává pouze T7 promotor, který se nachází před genem pro protein našeho zájmu. Tento systém je velmi účinný a po několika hodinách po indukci může náš protein tvořit až 50 % z celkového množství všech bakteriálních proteinů.

Do LB média bylo napipetováno antibiotikum (ampicilin) tak, aby jeho finální koncentrace činila $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Jedna kolonie bakterií byla naočkována pomocí sterilního očka do 5 ml LB média. Následně byly bakterie inkubovány přes noc při 37°C v třepačce za konstantního třepání (210 ot./min.). Dále bylo 5 ml bakteriální kultury přeneseno do 1 l LB média spolu s antibiotikem, jehož finální koncentrace byla opět $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Následně byly bakterie inkubovány do té doby, než dosáhly optické density 0,6 – 0,7 při $\lambda = 600 \text{ nm}$. Poté byla exprese rekombinantního proteinu indukována pomocí IPTG (finální koncentrace 0,5mM). Bakteriální kultura byla inkubována přes noc v třepačce za konstantního třepání (200 ot./min.) při 25°C .

4.6 Transformace bakterií

Transformace je proces vniknutí (resp. vnesení) DNA plasmidu do buňky recipienta. Dojde tak k horizontálnímu přenosu genetické informace z donorového kmene bakterií do kompetentních buněk. Tento proces se provádí tzv. metodou teplotního šoku (angl. *heat shock*), kdy jsou bakterie nejdříve inkubovány v ledu a následně se vnoří na 45 s do lázně o teplotě 42°C . V tu chvíli dojde k vnesení plasmidové DNA. Následně se suspenze bakterií vnoří na 2 minuty do vody o teplotě 0°C .

50 μl kompetentních buněk (*E. coli* BL21(DE3)) bylo přeneseno do zkumavky. Následně k nim byl přidán 1 μl plasmidové DNA. Roztok byl inkubován 20 minut v ledové lázni za občasného jemného promíchání. Následoval „*heat shock*“. Bakterie s vneseným plasmidem byly dále přidány k 10 \times násobku LB média a vloženy do inkubátoru na 1 h při 37 °C. Následně byla směs bakterií s LB médiem nanesena na Petriho misky obsahující pevné LB médium a ampicilin o finální koncentraci 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Misky byly umístěny do inkubátoru a naočkovaná bakteriální kultura byla inkubována přes noc při 37 °C. Jelikož vnesený plasmid nesl gen pro rezistenci vůči ampicilinu, na Petriho miskách narostly pouze bakterie, které plasmid úspěšně přijaly.

4.7 Preparativní centrifugace

Preparativní centrifugace je metoda sloužící k separaci komplexních směsí a frakcionaci buněčných komponent. Preparativní centrifugace byla použita pro oddělení bakteriálního podílu od kapalné části LB média a to při otáčkách 3400 ot./min. po dobu 20 minut při 4 °C, a pro získání roztoku proteinu zbaveného zbytků bakterií po sonikaci (viz. kapitola 4.8), a to při 13500 ot./min. ve 4 °C po dobu 40 minut.

4.8 Sonikace

Sonikace je dezintegrační metoda, která k rozrušování buněk a tkání využívá ultrazvukových vln. Šířící se ultrazvukové vlny způsobují jev zvaný kavitace. Ten je založen na faktu, že během šíření ultrazvukových vln dochází v některých místech roztoku k jejich zředění a někde naopak stlačení. V místech zředění pak vznikají dutiny určitých velikostí, které v místech stlačení opět zaniknou. Při zániku dutin pak dochází ke vzniku tlakové vlny, která umožňuje samotnou destrukci, je tedy destruktivním prvkem.

Před samotnou sonikací byla peleta získána z 1 l bakteriální kultury a resuspendována ve 25 ml lyzovacího pufru a dále inkubována s *lysozymem* (konečná koncentrace činila 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) při 4 °C, za stálého konstantního míchání po dobu 30 minut. *Lysozym* je enzym obsažený ve slinách, krevní plazmě, nebo vaječném bílku. Tento enzym specificky štěpí některé glykosidové vazby v proteoglykanech buněčných stěn bakterií.

Během sonikace byla kádinka s obsahem bakteriální kultury chlazená (umístěním do misky s ledem). Samotný proces sonikace byl prováděn přerušovaně, aby nedošlo k zahřátí

vzorku, a to následovně. Na 6 l původního roztoku bakterií v LB médiu byl nejdříve nastaven celkový čas sonikace na 13 minut, při třísekundovém působení ultrazvuku a sedmnáctisekundovými odmlkami. Následně byl roztok míchán v chladu po dobu 5 minut. Následovala další sonikace s celkovým časem 6 minut a stejnými intervaly sonikace a odmlk (3 s/ 17 s).

Následně byl roztok odstředěn (viz. kapitola 4.7) po dobu 40 minut, při $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 13500 ot./min. Byl použit rotor SS34. Vzniklá peleta obsahovala rozrušené části buněčné stěny, organely apod., supernatant pak obsahoval proteinové frakce.

Složení lyzovacího pufru:

- 1× PBS; 1M NaCl; 2mM imidazol; 0,01% NP40 (v případě 14-3-3 nebyl použit); 4mM β – merkaptoethanol

Složení 10× PBS:

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

4.9 Dialýza

Při většině biochemických experimentů je často potřeba přečistit roztok získávaného proteinu, čili zbavit roztok nízkomolekulárních látek, změnit pH apod. Právě k tomuto účelu se používá metoda zvaná dialýza.

Dialýza je tedy metoda, umožňující oddělení látek na základě jejich velikosti a to přes semipermeabilní membránu, která propouští pouze částice (molekuly, atomy, ionty) o malé velikosti (nízkomolekulární látky). Naopak zabraňuje průchodu velkým částicím (např. makromolekulám, biomakromolekulám). Nízkomolekulární látky se pohybují přes membránu ve směru koncentračního gradientu. V okamžiku, kdy se koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách vyrovnají, proces se zastaví. O tom, jaké částice dané velikosti projdou skrz membránu, rozhoduje především velikost pórů v membráně. Dále slouží dialýza k výměně prostředí, ve kterém je látka rozpuštěna.

Rychlost dialýzy závisí na koncentračním spádu (zpočátku je nejrychlejší, postupně se zpomaluje), který je především ovlivněn poměrem objemů vně a uvnitř membrány, čili i tlakem, který uvnitř membrány vzniká (přetlak). Dále rychlost tohoto procesu závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na síle membrány, na elektrických vztazích mezi membránou a difundujícími částicemi a na velikosti plochy membrány [103].

Semipermeabilní membrána, se kterou jsem pracovala, je „konstruována“ jako dutá trubice do které se vnáší roztok, který chceme dialyzovat. Byla ustřižnuta potřebná délka dialyzační trubice a do ní byl napipetován proteinový roztok. Následně byla dialyzační trubice z obou stran utěsněna pomocí svorek a poté byla takto naplněná dialyzační trubice celá ponořena do kádinky s pufrem (používá se kvůli malé stabilitě některých biomolekul v oblasti s nízkou iontovou silou a kvůli vhodnému pH). Proteinový roztok byl dialyzován přes noc za stálého míchání ve 4 °C. Chlazení se používá k předcházení denaturace proteinu, případně množení mikroorganismů.

Materiál dialyzačních membrán se mění. Dříve se používaly membrány např. z celofánu, pergamenu, nebo membrány zvířecího původu – střeva, vaječná blanka, různé měchýře. Nyní je na trhu velké množství různých membrán, které je možno zakoupit a vybrat si např. podle jejich pórovitosti, materiálu a především ceny. Z dnešních materiálů použitých pro dialyzační membrány je možno zmínit např. přírodní celofán, ale i jiné umělé polymery.

Použitá membrána: MCO (Molecular weight cut off) 14000 (propustná pro molekuly s $M_r < 14000$).

Složení dialyzačního pufru po niklové chelatační chromatografii (viz. kapitola 4.10.1):

- 20mM NaCl, 50mM TRIS (pH = 8), 2mM EDTA, 5mM DTT

Složení dialyzačního pufru po aniontové iontově-výměnné chromatografii (viz. kapitola 4.10.2):

- 20mM TRIS (pH = 7,5); 1mM EDTA; 5mM DTT; 100mM NaCl; 10% glycerol (pro případ zamražení)

Složení dialyzačního pufru pro odstranění ATP (viz. kapitola 4.14):

- 20mM TRIS (pH = 7,5); 1mM EDTA; 100mM NaCl; 3mM β -merkaptoethanol; 10% glycerol

4.10 Chromatografie

Chromatografické metody všeobecně slouží k separaci dvou látek, z nichž jedna se zachytává na tzv. stacionární fázi (SF) a druhá přechází do tzv. mobilní fáze (MF). Obě

tyto fáze jsou vzájemně nemísitelné. Stacionární fáze může být kapalina, nebo pevná látka. Mobilní fáze pak kapalina (nemísitelná s kapalnou MF), nebo plyn. Podle toho, v jakém skupenství se jednotlivé fáze nachází, dělí se chromatografie na kapalinovou (LC – *Liquid Chromatography*) (MF – kapalina, SF – pevná látka (LSC – *Liquid-Solid Chromatography*)), nebo kapalinou (LLC – *Liquid-Liquid Chromatography*)), a plynovou (GC – *Gas Chromatography*) (MF – plyn, SF – většinou sorbent nebo nosič pokrytý kapalnou fází).

Dále se chromatografické metody dělí podle uspořádání stacionární fáze:

- Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v koloně
- Plošné techniky:

Papírová chromatografie (PC – *Paper Chromatography*) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC – *Thin Layer Chromatography*) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii).

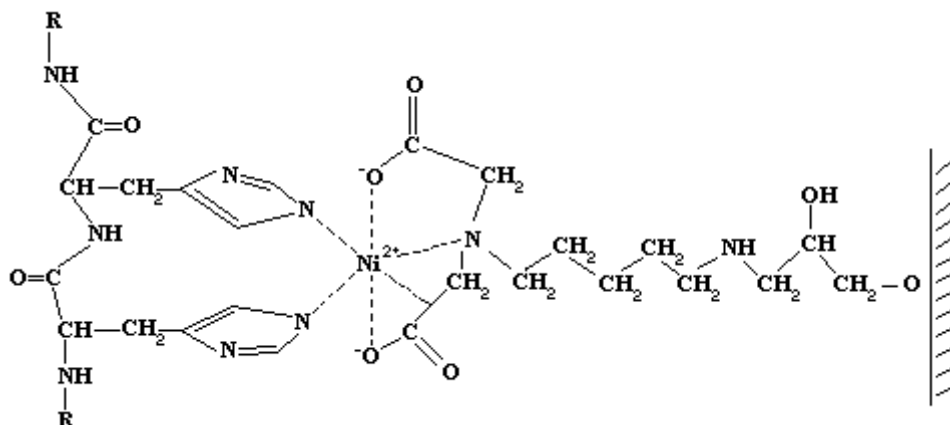
Další dělení chromatografických metod spočívá v dělení podle povahy děje, který převládá při separaci (adsorpce, absorpce, dělení podle pórovitosti stacionární fáze, dělení podle elektrostatických přitažlivých sil, jiné specifické afinity ke stacionární či mobilní fázi, apod.)

Často se využívá i tzv. vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), která se provádí za vyššího tlaku, než je běžný pro LC [104].

Detekce proteinů na chromatografickém zařízení AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC v naší laboratoři se děje pomocí absorbance eluátu při 280 nm.

4.10.1 Niklová chelatační chromatografie

Jedná se o obdobu afinitní chromatografie. U této chromatografické metody dochází k navázání Ni^{2+} iontů do stacionární fáze, která byla v mém případě tvořena chelatující sepharosovou maticí (Amersham Biosciences, Švédsko). Navázané Ni^{2+} mohou reagovat jako elektrofil s některými proteiny obsahujícími volné elektronové páry a vytvořit tak koordinační vazby. Takovouto aminokyselinou je např. histidin. Interakční produkt pak vypadá jako na *Obr. 12, str. 40*.



Obr. 12 Interakce chelatovaného Ni^{2+} s imidazolovými heterocykly histidinu.

Tato metoda umožňuje oddělit proteiny obsahující His-Tag, což je motiv šesti histidinů za sebou, od ostatních proteinů, které His-Tag neobsahují. Motiv šesti histidinů lze do proteinu zakomponovat vložením daného kódujícího úseku do plasmidové DNA.

Postup při přípravě kolony byl následující. Do speciální plastové kolony byla vnesena chelatující sepharosová matrice. Sepharosový gel byl nejdříve promyt. Během promytí došlo k navázání Ni^{2+} iontů na stacionární fázi – chelatující sepharosu. Dále bylo možné na kolonu nanést roztok proteinu, obsahujícího histidinový konec. Po vytvoření koordinačních vazeb mezi Ni^{2+} a His konci, bylo možné kolonu prolít 300 ml 10% pufru F v E, obsahujícího imidazol o koncentraci $0,06 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Imidazol obsahuje také volné elektronové páry a v tomto případě „vytlačí“ nežádoucí proteiny (např. ty s menším počtem His konců) tím, že interaguje s matricí s vyšší afinitou. Na koloně tedy zůstal pouze potřebný „His-Tag protein“, který bylo potřeba získat. Protein byl z kolony získán prolitím kolony 20 ml pufru F. Vzniklý eluát s obsahem „His-Tag proteinu“ byl zachytáván do připravených mikrozkuvek. Celý proces bylo potřeba provádět rychle a za stálého chlazení, aby nedošlo k denaturaci proteinů. Částečného chlazení bylo docíleno tím, že sepharosa i jednotlivé pufrы byly již předem chlazeny na teplotu $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích a jeho čistota byl zkontrolován pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz. kapitola 4.11 a 5.1.2).

Konstantní průtok nanášených roztoků na kolonu byl zajištěn peristaltickou pumpou o objemovém průtoku $7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Promytí kolony:

- 10 ml destilovaná voda
- 10 ml Stripp solution (50mM EDTA; 0,5M NaCl)
- 15 ml destilovaná voda
- 50 ml Ni²⁺ (0,1M NiSO₄)
- 10 ml destilovaná voda
- 10 ml pufr E

Složení pufrů:

Pufr E:

- 1× PBS; 0,5M NaCl; 1mM imidazol; 2mM β-merkptoethanol; 0,01% NP40 (pouze v případě 14-3-3)

Pufr F:

- 1× PBS; 0,5M NaCl; 0,6M imidazol; 2mM β-merkptoethanol; 0,01% NP40 (pouze v případě 14-3-3)

10% Pufr F v E:

- 1× PBS; 0,5M NaCl; 0,06M imidazol; 2mM β-merkptoethanol; 0,01% NP40 (pouze v případě 14-3-3)

4.10.2 Aniontová iontově-výměnná chromatografie

Jedná se o chromatografickou techniku, při které dochází k dělení molekul na základě jejich náboje. Pro aniontovou iontově-výměnnou chromatografii byla použita kolona Tricorn 5/50 s náplní Q-Sepharosy. Kolona byla připojena k přístroji AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC a data byla analyzována pomocí programu Unicorn 4.11 dodaným spolu s přístrojem.

Fosducin i 14-3-3 protein mají pI v kyselé oblasti a v pufru o pH = 8 tudíž získají záporný náboj a je možno je pomocí této techniky přečistit. Po niklové chelatační chromatografii byl protein v roztoku o pH = 7,5, proto bylo potřeba jej dialyzovat do pufru o pH = 8 (složení pufru viz. kapitola 4.9). Dialýza také posloužila k odstranění velkého množství soli, která by jinak bránila adsorpci polyaniontu na SF.

Kolona byla nejdříve promyta filtrovanou destilovanou vodou (průtoková rychlost 2 ml · min⁻¹) a následně elučním puftrem E s nulovým obsahem NaCl (průtoková rychlost 2 ml · min⁻¹). Dále byl na kolonu nastaven 50% gradient mezi puftrem E a F, přičemž

docházelo ke vzrůstu konduktivity na koloně, jelikož pufr F NaCl obsahuje. Tímto krokem se kolona zbaví případných nežádoucích iontů a vytvoří vhodné prostředí pro polyanionty. Následovalo nastavení 2% gradientu na kolonu do ustálení konduktivity a postupný nástřik proteinu při průtokové rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Po několika nástřicích se protein v koloně zachytil a odstranily se nečistoty s nevhodným nábojem. Dále bylo potřeba protein z kolony získat a to tak, že byl nastaven 10% gradient a následně 0% gradient. Polyanionty byly eluovány lineárním gradientem iontové síly mezi pufrů E a F. Frakce byly zachytávány po 0,5 ml do předem připravených mikrozkuumavek. Proces byl manuálně ukončen tehdy, když eluční křivka jasně poukazovala na vyloučení veškerého proteinu.

Aniontová iontově-výměnná chromatografie probíhala za laboratorní teploty. Obsah proteinu ve frakcích a jeho čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz. kapitola 4.11 a 5.1.3).

Složení pufrů:

Pufr E:

- 50mM TRIS (pH = 8); 5mM DTT

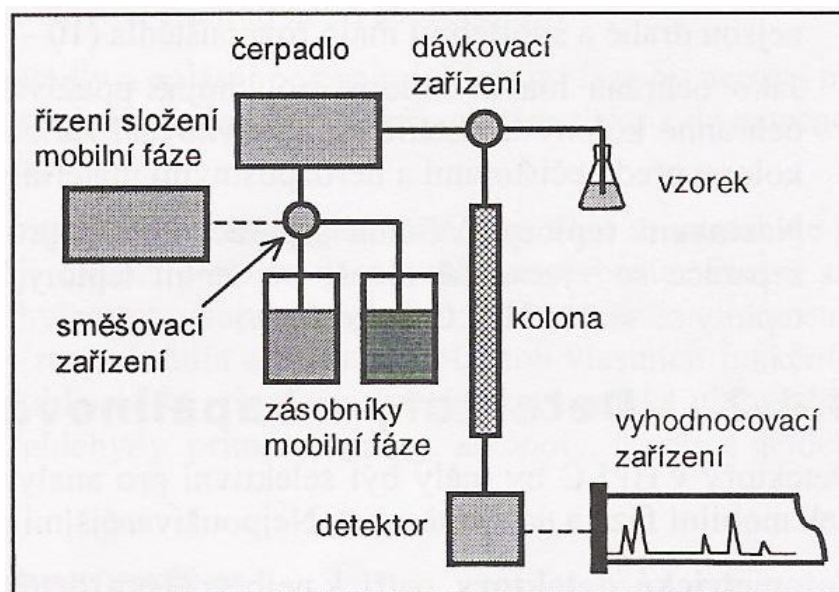
Pufr F:

- 50mM TRIS (pH = 8); 5mM DTT; 1M NaCl

4.10.3 Gelová permeační chromatografie

Jedná se o kapalinovou chromatografii, kde stacionární fází je gel, v mém případě Superdex, který obsahuje množství pórů. Princip rozdělení spočívá v tom, že malé částice mají větší tendenci pronikat do pórů stacionární fáze, než větší částice, a určitou dobu v pórech strávit. Proto se nachází v eluátu později. Na chromatogramu, což je graf vzniklý jako důsledek chromatografického procesu, jsou pak patrné píky s různým časovým posunem.

Schéma běžné kapalinové chromatografie vypadá přibližně jako na *Obr. 13, str. 43*.



Obr. 13 Obecné schéma kapalinového chromatografu [104].

V případě gelové permeační chromatografie byla použita pouze jedna mobilní fáze a to pufr (složení viz. níže). Byla použita kolona SuperdexTM200 (Amersham Biosciences, Švédsko) s obsahem Sepharosy, která byla nejdříve promyta destilovanou vodou (průtoková rychlost $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; cca 40 min.) a následně elučním pufrem o známém složení (průtoková rychlost $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku. Kolona byla připojena k přístroji AKTAprimeTM (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC a data byla analyzována pomocí programu Unicorn 4.11 dodaného spolu s přístrojem.

Než se vzorky tzv. injektovaly na kolonu, bylo potřeba je zakoncentrovat tak, aby jejich objem byl max. 2 ml. Jednotlivé frakce po chromatografickém procesu byly zachytávány po 0,5 ml do předem připravených mikrozkuvek.

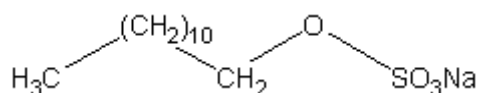
Chromatografický proces (eluce) byl ukončen manuálně tehdy, když bylo z chromatogramu jasně patrné, že už byl z kolony vyloučen veškerý protein. Gelová permeační chromatografie byla prováděna za pokojové teploty. Přítomnost proteinu a jeho čistota v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz. kapitola 4.11 a 5.1.4).

Složení elučního pufru:

- 10% glycerol; 20mM TRIS (pH = 7,5); 1mM EDTA; 6mM DTT (5mM DTT v případě 14-3-3); 200mM NaCl (100mM NaCl v případě 14-3-3)

4.11 SDS elektroforéza

SDS elektroforéza je migrační metoda sloužící k rozdělení směsi proteinů na základě jejich hmotnosti. Pokud se proteiny vloží do elektrického pole, pohybují se ke katodě nebo anodě na základě svého náboje. Pokud se ale proteiny vloží do prostředí aniontového tenzidu (detergentu) dodecylsulfátu sodného (SDS), který se na proteiny váže v konstantním poměru, získají všechny proteiny záporný náboj a pohybují se tedy směrem ke kladné elektrodě – anodě. Jejich pohyb se liší v závislosti na jejich hmotnosti tak, že menší (resp. lehčí) molekuly se pohybují rychleji. Při nanášení vzorku na gel se do první jamky aplikuje vždy tzv. standard molekulových vah, tedy roztok proteinů, jejichž hmotnosti jsou známy. Podle něj se usuzuje na hmotnost zkoumaného proteinu.



Obr. 14 Dodecylsulfát sodný (SDS)

Pro pokusy byl použit 4% zaváděcí gel (Stacking Gel Solution) a 15% separační gel. Elektroforéza byla prováděna za konstantního napětí 190 V. Nakonec byl gel obarven (vizualizován) roztokem Coomassie Brilliant Blue R 250.

Složení gelů, pufrů a roztoků použitých při SDS-PAGE:

- *Separační gel (15%):* 3,75 ml akrylamid/bis-akrylamid; 1,9 ml pufr pro separační gel; 1,8 ml destilovaná voda; 45 µl 10% persulfát amonný; 5 µl TEMED
- *Zaváděcí gel (4%):* 0,5 ml akrylamid/bis-akrylamid; 1 ml pufr pro zaváděcí gel; 2,25 ml destilovaná voda; 30 µl 10% persulfát amonný; 6 µl TEMED
- *Akrylamid/bisakrylamid:* 29,2 g akrylamid; 0,8 g bisakrylamid; destilovaná voda do 100 ml
- *Pufr pro separační gel:* 75 ml 1,5M TRIS-HCl (pH = 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml destilovaná voda
- *Pufr pro zaváděcí gel:* 50 ml 1M TRIS-HCl (pH = 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml destilovaná voda
- *Pufr pro přípravu vzorků (5× koncentrovaný):* 0,6 ml 1M TRIS-HCl (pH = 6,8); 5 ml 50% glycerol; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml β-merkptoethanol; 1 ml 10% bromfenolová modř; 0,9 ml destilovaná voda

- *Pufr pro elektroforézu*: 50mM TRIS-HCl (pH = 8,3); 385mM glycin; 0,1% SDS
- *Barvicí roztok*: 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 450 ml methanol; 100 ml ledová kyselina octová; 450 ml destilovaná voda
- *Odbarvovací roztok*: 100 ml methanol; 100 ml ledová kyselina octová; 800 ml destilovaná voda
- *Standard molekulových vah*: Precision Plus Protein Standards, Dual Color, BioRad; obsahuje směs fragmentů 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa.

4.12 Nativní elektroforéza

U nativní elektroforézy se vzorek proteinu nanáší v tzv. nativním stavu. To znamená, že není používán žádný detergent, jako v případě SDS elektroforézy, a protein není denaturován. Tudíž dochází k rozdělení proteinů na základě jejich tzv. elektroforetické mobility. Ta je ovlivněna nábojem a tvarem proteinu. Aby nedocházelo během elektrolýzy k denaturaci proteinu, je zapotřebí celou aparaturu chladit, např. ponořením do ledu.

Pro pokusy byl používán 15% gel a elektroforéza byla zapnuta po dobu 2 hodin a 55 minut při 145 V. Gel byl vizualizován obdobným způsobem, jako v případě SDS elektroforézy.

Složení gelu a pufrů použitých při nativní elektroforéze:

Složení gelu:

- 4 ml akrylamid/bis-akrylamid; 0,5 ml 20× TBE; 5,45 ml destilovaná voda; 75 μl 10% (w/w) (NH₄)₂SO₅; 8 μl TEMED

Složení elektroforetického pufru:

- vychlazený 1× TBE (10x TBE: 107,88 g TRIS, 55 g kyselina boritá, 7,44 g Na₂-EDTA, destilovaná voda do 1 l)

4.13 Zakoncentrování roztoků proteinů

Během purifikačních procesů a během dialýzy dochází k naředování roztoku proteinu. Aby byla purifikace účinná, je třeba přečištěný protein zakoncentrovat, aby bylo možné s ním dále lépe pracovat.

K zakoncentrování se používají speciální koncentrátoři, které se skládají ze zkumavky, na jejímž dně je umístěna celulosová ultracentrifugační membrána propustná

pro molekuly určité velikosti, a ze sběrné zkumavky, do které je jímán roztok, který během centrifugace proteče skrz celulosovou membránu.

Pro zakoncentrování roztoků proteinů byl používán filtr (koncentrátor) s MCO 10000. Centrifugace byla prováděna při 4 °C a 3500 ot./min. tak dlouho, dokud roztok proteinu nedosáhl požadované koncentrace (cca 18 minut). Byl použit rotor A-4-44.

Pro zjištění koncentrace proteinu byla využita absorpční spektroskopie ve viditelné oblasti světla (280 nm), tedy v oblasti nejvyšší absorpce roztoku proteinu. Koncentrace byla vypočtena z Lambert-Beerova zákona, pro nějž platí

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

ε_{λ} molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

c látková koncentrace absorbující látky [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]

l tloušťka absorbující vrstvy [cm]

Molární absorpční koeficient ε_{λ} byl vypočítán pomocí „Protparam tool“, který je volně dostupný na www.expasy.org/tools/protparam.html [104].

4.14 Fosforylace fosducinu

Aby mohl fosducin interagovat se 14-3-3 proteinem, je nutné jej fosforylovat. Fosforylace je proces zavádění PO_4^{3-} skupiny do struktury proteinu (obecně organické látky). Běžným fosforylačním činidlem je ATP, jako vhodný zdroj fosfátových skupin. Aby reakce proběhla, musí být katalyzována enzymy – *kinasami*.

Přirozeně se vyskytující fosducin (tzv. Pd wt) je fosforylován dvěma *kinasami* (PKA, CaMKII). Pro naše účely bylo výhodné vyrobit mutant fosducinu, který by bylo možné fosforylovat pouze jednou, levnější *kinasou* (PKA). Pomocí technik molekulární biologie (mutagenese, PCR) byl již dříve v naší laboratoři připraven mutant fosducinu s mutací Q52K, tzv. PdQ52K. Tato mutace by neměla ovlivnit funkci proteinu.

K fosforylaci byla použita katalytická doména PKA ($127,6 \text{ u} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Její katalytická činnost spočívá v přenosu koncové fosfátové skupiny ATP na hydroxylovou skupinu serinu či threoninu. Pro správnou účinnost *kinasy* je zapotřebí, aby byl v prostředí fosforylace obsažen Mg^{2+} ion. Ten se nacházel ve formě $MgCl_2$.

Fosforylace probíhala 2 hodiny při 30 °C a poté bylo ke směsi přidány ještě 2/3 původního množství ATP a pokračovala fosforylace v 6 °C. Následně bylo potřeba roztok

fosducinu zbavit přebytku ATP, což se provedlo dialýzou přes noc (složení pufru na dialýzu viz. kapitola 4.9).

Složení reakční směsi:

- protein rozpuštěný v pufru (20mM TRIS (pH = 7,5); 200mM NaCl (100mM NaCl v případě 14-3-3); 1mM EDTA; 6mM DTT (5mM DTT v případě 14-3-3); 10% glycerol); 0,75mM ATP; 15mM MgCl₂; 7,05 μl PKA

4.15 Limitovaná proteolýza

Limitovaná proteolýza je metoda využívající proteolytické schopnosti enzymů *proteas*. Pro tyto účely byly použity enzymy *chymotrypsin A* a *trypsin*. Metoda byla použita pro otestování případných strukturních změn fosducinu po vazbě na 14-3-3 protein. Metodou lze také získat nejstabilnější část fosducinu, interagujícího se 14-3-3 proteinem, na jejímž základě by se dal navrhnout konstrukt DNA kódující právě tento stabilní segment. Tento segment se pak může dále používat při tvorbě proteinových krystalů a při práci s využitím dalších biofyzikálních technik (např. rentgenové krystalografie, NMR).

Enzym o koncentraci $1,2 \cdot 10^{-8}$ M byl smísen postupně se směsí 10μM fosducinu, 10μM fosforylovaného fosducinu, 20μM 14-3-3 proteinu, se směsí nefosforylovaného fosducinu se 14-3-3 a s komplexem 14-3-3/fosducin o stejných koncentracích, jako u samotných proteinů. Enzym působil na protein (resp. komplex) po dobu 0 (žádný enzym nepřidán), 15 a 30 minut. V případě komplexu i 60 minut. Aktivita enzymu byla ukončena denaturací směsi při 100 °C.

Roztoky byly nanášeny na 15% gel SDS-PAGE, přičemž došlo k rozdělení frakcí na základě jejich hmotností. Frakce byly předány k analýze na hmotnostním spektrometru metodou MALDI-TOF ve spolupráci s Doc. RNDr. M. Šulcem, Ph.D. z MBÚ AV ČR, v.v.i.

4.16 Analytická ultracentrifugace

Analytická centrifugace je metoda umožňující studium hydrodynamických a termodynamických vlastností biomolekul (makromolekul) v nepřítomnosti pevného nosiče. Dělí se na dvě metody:

a) Metoda sedimentačních rychlostí

U této metody jsou používány relativně vysoké uhlové rychlosti, což umožní rychlou sedimentaci molekul. Metoda umožňuje získat informaci o hydrodynamice makromolekuly, relativní molekulové hmotnosti, molekulárním tvaru a agregačním chování. Sleduje se rychlost migrace makromolekul.

Při odstředování se vytvoří ostré rozhraní mezi oblastí bez proteinu blízko centra rotace a oblastí s konstantní koncentrací proteinu ve zbytku květy. Na rozhraní vznikne koncentrační gradient, který definuje pozici rozhraní.

Šířka sedimentačního rozhraní souvisí s difúzí molekul, která souvisí s jejich velikostí a sbalením. Ve výsledku získáme distribuci sedimentačního koeficientu $g(s^*)$, která nastane díky různým sedimentačním koeficientům jednotlivých složek odstředované směsi.

Svedbergova rovnice (1) definuje sedimentační koeficient S :

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho_{sol})}{f}, \quad (1)$$

kde v je lineární rychlost [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$], ω je úhlová rychlost [$\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$], r je vzdálenost od centra rotace [m], m je hmotnost odstředované částice [kg], \bar{v} je parciální specifický objem částice [$\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$], ρ_{sol} je hustota rozpouštědla [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$] a f je frikční koeficient.

S je konstanta pro daný systém částice/rozpouštědlo a její rozměr jsou sekundy. Pro ulehčení se začaly užívat Svedbergovy S jednotky ($1 S = 1 \cdot 10^{-13} s$).

Rovnice používaná pro metodu sedimentačních rychlostí vychází ze *Svedbergovy rovnice* (1) a její tvar je:

$$v = r_b \omega^2 S = \frac{dr_b}{dt}, \quad (2)$$

kde r_b je definováno jako vzdálenost rozhraní od centra rotace [m], t znamená čas [s].

Řešením rovnice (2) dostaneme tvar

$$\ln\left(\frac{r_b(t)}{r_b(0)}\right) = \omega^2 S(t - t_0), \quad (3)$$

kde t_0 značí v čase 0. Výnos $\ln(r_b)$ vs. t nám dá sedimentační koeficient S .

Dosazením za frikční koeficient f v rovnici (1)

$$f = \frac{RT}{N_A D}, \quad (4)$$

kde R je molární plynová konstanta [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$], T je termodynamická teplota [K], N_A je Avogadrova konstanta [mol^{-1}] a D je difúzní koeficient [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], dostaneme rovnici pro relativní molekulovou hmotnost

$$M_r = \frac{RTS}{D(1-\bar{v}\rho)} \quad (5)$$

b) Metoda sedimentační rovnováhy

Metoda poskytuje informace o termodynamice makromolekuly, absolutní molekulové hmotnosti, agregačním chování a protein-proteinových interakcích. Tato metoda je nezávislá na tvaru molekul. Metodou lze získat informaci o asociaci makromolekul, tedy metoda poskytuje rovnovážnou konstantu tvorby komplexu K_d (disociační konstanta).

Vzorek je centrifugován při rychlosti umožňující sedimentaci studovaných částic. Během sedimentace dochází i k difúzi částic. Po určité době dojde k vytvoření rovnováhy mezi oběma protichůdnými silami v každém bodě kyvety a distribuce koncentrace c makromolekul v rámci kyvety monotónně vzrůstá. Pomocí nelineárního fitování distribuce koncentrace lze získat molekulovou hmotnost dané látky. Fitováním pro daný model (např. monomer-monomer, monomer-dimer,...) lze získat K_d .

Rovnice používaná v této metodě má následující tvar a vychází v základu také z rovnice (1):

$$c(r) = c(a) \exp\left(\frac{\omega^2 M(1-\bar{v}\rho)(r^2 - a^2)}{2RT}\right), \quad (6)$$

kde a je konstanta, která se odvozuje od polohy menisku, M je absolutní molekulová hmotnost [105].

Proteiny byly difundovány do pufru. Měření bylo prováděno na ultracentrifuze ProteomeLab XL-1, Beckman Coulter (USA), data byla vyhodnocována v programech Sedphit a Sedphat. Měření a vyhodnocování naměřených dat bylo prováděno ve spolupráci s Mgr. Lenkou Řežábkovou z PřF UK.

Složení pufru pro měření:

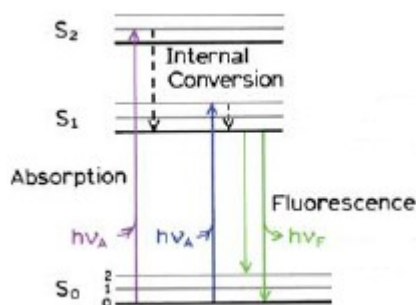
- 20mM TRIS-HCl (pH = 7,5), 200mM NaCl, 2mM β -merkaptoethanol

4.17 Fluorescenční měření

4.17.1 Fluorescence

Fluorescence je proces, při kterém dochází k vyzáření (emisi) energie ve formě světla (zářivý proces) po předešlé absorpci energie, která se může pohybovat v širokém rozmezí vlnových délek (nejčastěji v UV (10 – 400 nm) a VIS (400 – 750 nm) oblasti, ale možná je i absorpce v oblasti RTG záření (10 nm – 100 pm)). Vlnová délka vyzářeného světla je delší, než světla dopadajícího. Výjimkou jsou případy, kdy dojde k absorpci dvou a více fotonů, pak může emisní záření dosahovat i kratších vlnových délek, než je záření dopadající. V předchozím jednofotonovém případě dochází ke ztrátě energie v důsledku spotřeby energie pro vibrační a rotační pohyby molekul, což se projeví jako tepelné sálání.

Fluorescenci zobrazuje následující obrázek, tzv. Jablonskiho diagram.



Obr. 15 Jablonskiho diagram zobrazující fluorescenci. Šipky s hrotem směřujícím nahoru představují absorpci záření o energii $h\nu_A$. Při tomto ději se atom dostává ze základního elektronového singletového stavu S_0 do některého z excitovaných elektronových stavů S_1 , S_2 , ... v závislosti na dodané energii. Celistvé šipky směřující hrotem dolů představují fluorescenci. Jedná se o zářivý přechod s energií $h\nu_F$. Přerušované šipky představují nezářivé vibrační přechody, při nichž se energie vyzáří ve formě tepla [převzato a upraveno z 106].

Rychlost absorpce se pohybuje řádově okolo 10^{-15} s a rychlost emise 10^{-8} s. Vnitřní konverze (angl. *internal conversion*) zobrazená v Jablonskiho diagramu trvá řádově 10^{-12} s nebo i méně [106].

Fluorescence dané fluoreskující látky je charakterizována **dobou excitovaného stavu** τ fluoreskující látky. Tato doba je dána rovnicí

$$\tau = \frac{1}{k}, \quad (7)$$

kde k je monomolekulární rychlostní konstanta dohasínání fluorescence a určuje se experimentálně z kinetiky dohasínání.

Fluorescence dohasíná exponenciálně podle vztahu

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (8)$$

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

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

$$Q = \frac{N_{emit}}{N_{abs}}, \quad (9)$$

kde N_{emit} je počet emitovaných fotonů a N_{abs} je počet absorbovaných fotonů [106].

Látky schopné fluoreskovat se nazývají fluorofory a při měření jejich fluorescence jsou často využívány jako biosenzory, neboli fluorescenční značky.

4.17.2 Měření stacionární Trp fluorescence PdQ52K

Metoda byla nejdříve použita se záměrem získat disociační konstantu K_d komplexu 14-3-3 ζ noW/PdQ52K. Vzhledem ke špatné kvalitě dat (malá změna intenzity fluorescence během interakce) byla tato metoda používána pouze k orientačnímu sledování interakce a ne k určení K_d .

Pro tato orientační měření byl použit PdQ52K o koncentracích 30 μ M, 50 μ M a 70 μ M. K němu byl postupně přidáván 14-3-3 ζ noW o původní koncentraci 204 μ M. Byla měřena intenzita I tryptofanové fluorescence fosducinu (jelikož 14-3-3 ζ noW tryptofan neobsahuje) a vynesena do grafu proti koncentraci přidávaného 14-3-3 ζ noW c_{14-3-3} (viz. kapitola 5.2.2).

Měření byla prováděna na fluorimetru Photon Counting Spectrofluorimetr PC1 ISS ve FgÚ AV ČR.

Složení pufru pro měření:

- 10% glycerol; 20mM TRIS (pH = 7,5); 1mM EDTA; 5mM DTT; 100mM NaCl

Tab. 1 Podmínky při měření

Excitační spektrum	220 – 320 nm
Emisní spektrum	210 – 450 nm
Šířka štěrbin	1,0 nm
Proud na lampě	14 A
Excitace	297 nm
Emise	350 nm
Počet akumulací	10
Tloušťka kyvety	1 mm
Teplota	25 °C

4.17.3 Časově-rozlišená fluorescence

Časově-rozlišená fluorescence [107, 108] je metoda, která podává informaci o poklesu intenzity fluorescence v závislosti na čase. Tato metoda je velmi citlivá na změny v mikrookolí fluoroforu. Díky této citlivosti lze metodou získat informace o dynamice makromolekul. Nejedná se pouze o rotaci makromolekul, ale také např. informace o interakci s ostatními makromolekulami, molekulárních pohybech a procesech, které je modulují. K získání většího množství informací o pohybech v makromolekulách bylo použito i časově-rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence. Pokud je doba dohasínání fluorescence srovnatelná s dobou reorientace molekul, polarizace fluorescence bude modulována molekulárním pohybem a analýza anizotropie v závislosti na čase bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází. Měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence souvisí s rotačním korelačním časem molekuly Φ .

Měření bylo prováděno ve spolupráci s Doc. RNDr. P. Heřmanem, CSc. a Doc. RNDr. J. Večeřem, CSc. z Fyzikálního ústavu MFF UK. Pro měření bylo využito fluorimetru pro časově-rozlišenou fluorescenci. Excitace byla zajištěna lampou UV-LED (PicoQuant, PLS 295-10), detekce byla založena na sčítání jednotlivých fotonů (angl. *single photon counting detector*) detektorem s obsahem fotonásobiče (Hamamatsu, R3809U-50). Šířka vstupních a výstupních štěrbin byla nastavena na 15 nm. Před vstupem se nacházel barevný filtr (Zeiss, UG1) odstraňující rozptýlené světlo. Vlnová délka subnanosekundového excitačního pulsu dosahovala hodnoty 295 nm, emisní fluorescenční signál byl sbírán při 355 nm. Časová škála byla 100 ps/kanál. Vzorky byly umístěny do termostatického držáku a všechna měření byla provedena při 22 °C v pufru. Koncentrace fosducinu byla 30 μM a koncentrace 14-3-3ζnoW proteinu byla 60 μM.

Při výpočtech byl uvažován multiexponenciální pokles intenzity fluorescence $I(t)$ podle rovnice

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (10)$$

kde t značí čas, τ_i jsou střední doby života excitovaného stavu daného fluoroforu a α_i značí amplitudy související s poměrným zastoupením fluoroforu. Naměřené intenzity $I(t)$ byly analyzovány metodou maximální entropie (SVD-MEM) [84]. Tímto způsobem byly získány sady amplitud α_i , které reprezentují distribuci doby života τ_i v i -tém dohasínání.

Střední doba života excitovaného stavu τ_{mean} byla vypočítána podle vzorce

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \cdot \tau_i, \quad (11)$$

kde f_i značí frakční intenzitu, která se vypočítá podle vztahu

$$f_i = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i}. \quad (12)$$

Pokud je molekula obsahující fluorofor ozářena polarizovaným zářením a orientace jejího absorpčního dipólového momentu přechodu elektronu je ve stejné rovině, jako je rovina elektrické složky dopadajícího záření, dochází k emisi také polarizovaného záření. Stupeň polarizace emitovaného záření fluoroforem popisuje veličina anizotropie $r(t)$ (nestejnorodost). Stupeň polarizace závisí na průmětu absorpčního přechodového momentu molekuly do směru polarizovaného záření. Pokud je průmět nulový, k anizotropii nedochází.

Celková intenzita dohasínání anizotropie $I(t)$ byla vypočítána podle vzorce

$$I(t) = I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t), \quad (13)$$

kde $I_{||}(t)$ značí rovnoběžnou složku dohasínání a $I_{\perp}(t)$ značí kolmou složku dohasínání, za využití programu SVD-MEM (metoda maximální entropie). Měření probíhalo za stejných podmínek a bylo analyzováno obdobně, jako v případě středních dob života, tj. anizotropie byla vyhodnocena pomocí distribuce rotačních korelačních časů Φ , bez předchozího nastavení limitu pro tvar distribuční křivky.

Anizotropie byly analyzovány pro sérii exponenciál

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-\frac{t}{\phi_i}}, \quad (14)$$

kde β_i značí amplitudy popisující distribuci rotačních korelačních časů Φ_i . Amplitudy β_i souvisí s počáteční anizotropií r_0 vztahem

$$r_0 = \sum_i \beta_i . \quad (15)$$

Pro fluorescenční měření byly použity vzorky Pd wt, PdQ52K, PdQ52KS73A a 14-3-3ζnoW.

Složení pufru pro měření:

- 10% glycerol, 20mM TRIS-HCl (pH = 7,5), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM β -merkaptoethanol

5 Výsledky

5.1 Příprava proteinů

5.1.1 Exprese

Byly purifikovány proteiny PdQ52K, PdQ52KS73A, Pd wt, 14-3-3 ζ wt a 14-3-3 ζ noW. Plasmidová DNA pro jednotlivé proteiny již byla připravena v naší laboratoři dříve, začínala jsem tedy transformací plasmidové DNA do buněk bakterií (viz. kapitola 4.6).

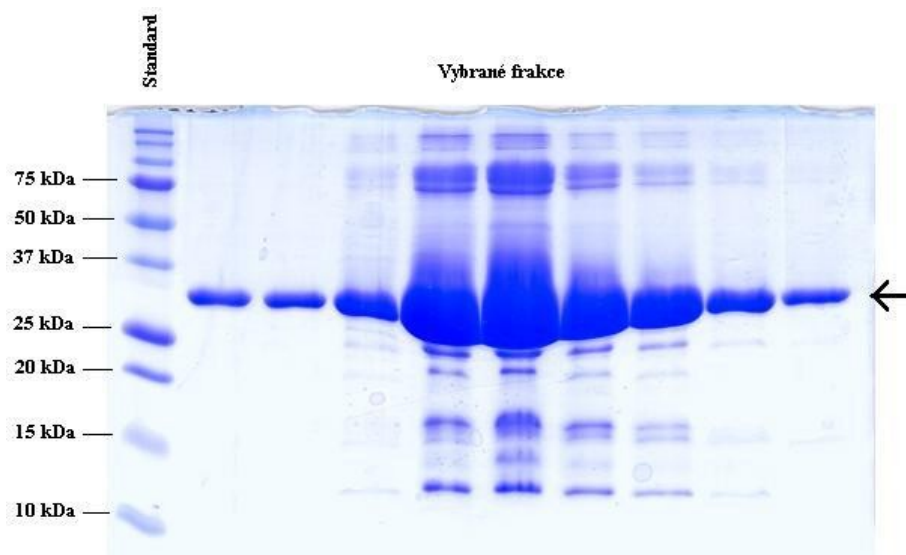
Všechny proteiny bylo potřeba připravit v dostatečném množství (viz. kapitola 4.5). Pro získání proteinu bylo inkubováno 6 l buněčné kultury. Roztoky buněčné kultury byly po 1 l odstředovány a pelety resuspendovány v lyzačním pufru a následně inkubovány s *lysozymem* v chladu. Následovala sonikace (viz. kapitola 4.8) a odstředování se získáním supernatantu obsahujícím protein (viz. kapitola 4.7).

5.1.2 Niklová chelatační chromatografie

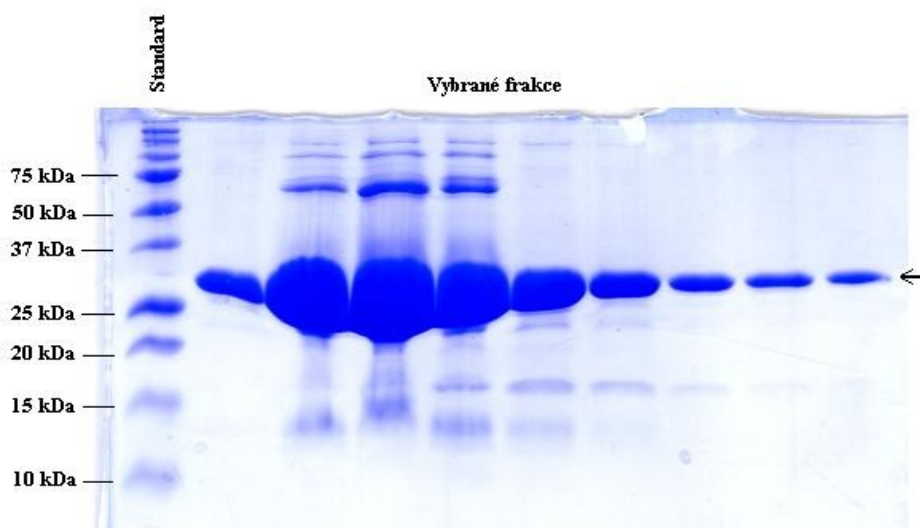
Vektor nesoucí gen pro daný protein měl v sobě zaklonován i gen pro His-Tag, což je motiv šesti histidinů za sebou navázaných na N-konci proteinu, umožňující purifikaci proteinu pomocí niklové chelatační chromatografie (viz. kapitola 4.10.1).

Obsah proteinu a jeho čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz. kapitola 4.11). Na gel SDS-PAGE byly naneseny vybrané frakce. Frakce byly vybrány na základě obsahu proteinu, což se provedlo odebráním 1 μ l proteinu a jeho smícháním s 9 μ l barviva *Bradford*. Toto barvivo reaguje s proteiny za vzniku modrého zbarvení. Do první jamky 15% SDS-PAGE gelu bylo naneseno 9 μ l standardu molekulových vah Precision Plus ProteinTM Standard Dual Color, BioRad, do dalších jamek pak vždy směs 2 μ l SDS-barviva se 7 μ l proteinu z dané frakce. Elektroforéza byla spuštěna po dobu cca 40 minut při 190 V.

Na *Obr. 16* a *Obr. 17* na *str. 56* je zobrazen výsledný gel z SDS-PAGE elektroforézy pro mutant PdQ52K a protein 14-3-3 ζ wt. V následujícím textu zaměřeném na purifikaci proteinů, budou ukazována data pro fosducin PdQ52K a protein 14-3-3 ζ wt. Data pro ostatní purifikované proteiny se s daty pro daný typ proteinu shodují a nebudou zde tudíž prezentována.



Obr. 16 Výsledek 15% gelu SDS-PAGE frakcí eluovaných při niklové chelatační chromatografii PdQ52K. Na obrázku je černou šipkou vyznačena oblast nacházející se v rozmezí 25 – 37 kDa, ve které se nachází purifikovaný PdQ52K (30,5 kDa). V oblasti mezi 50 – 75 kDa se vyskytují bakteriální proteiny s obsahem histidinů.

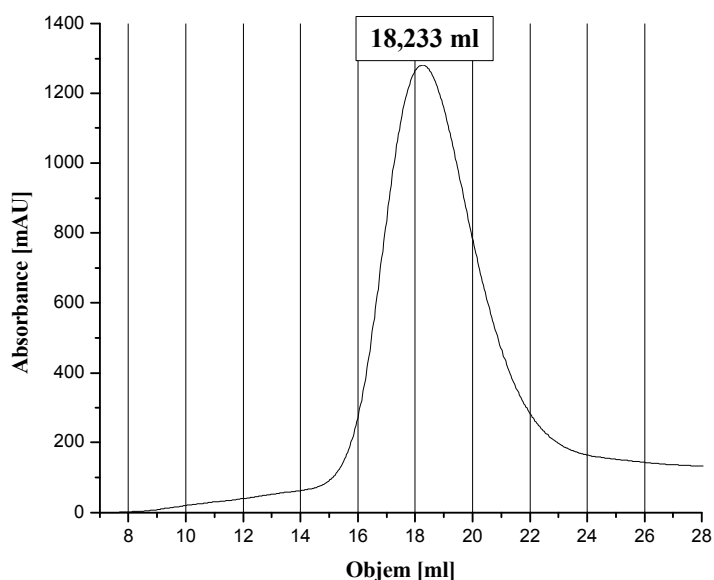


Obr. 17 Výsledek 15% gelu SDS-PAGE frakcí eluovaných při niklové chelatační chromatografii proteinu 14-3-3ζwt. Na obrázku je černou šipkou vyznačena oblast nacházející se v rozmezí 25 – 37 kDa, ve které se nachází purifikovaný 14-3-3ζwt (28 kDa). V oblasti mezi 50 – 75 kDa se vyskytují bakteriální proteiny s obsahem histidinů.

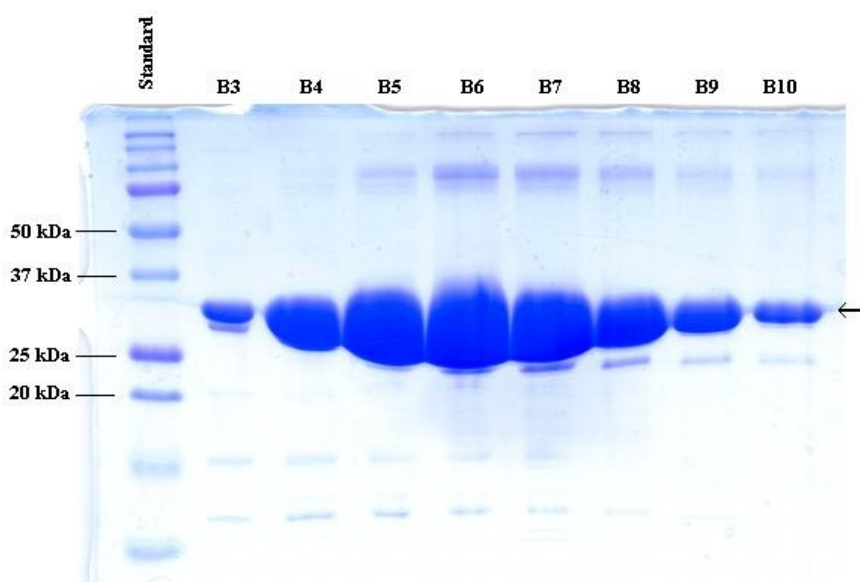
5.1.3 Aniontová iontově-výměnná chromatografie

Na základě SDS-PAGE gelu po niklové chelatační chromatografii byly vybrány frakce, které byly smíchány a dialyzovány přes noc v pufru o složení 20mM NaCl, 50mM TRIS (pH = 8), 2mM EDTA a 5mM DTT (viz. kapitola 4.9). Dialyzovaný protein byl nanesen na kolonu s obsahem Q-Sepharosy a výsledně eluován do mikrozkušavek

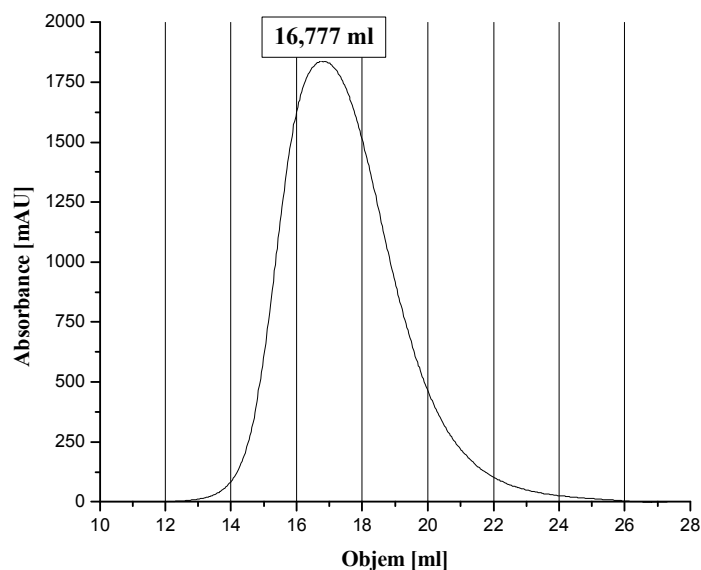
po 0,5 ml (viz. kapitola 4.10.2). Na základě chromatogramu byly vybrány frakce k ověření přítomnosti proteinu a jeho čistoty. Toto ověření proběhlo opět pomocí SDS-PAGE elektroforézy, jako v případě niklové chelatační chromatografie. Výsledná data tohoto kroku purifikace jsou opět ukázána pro fosducin PdQ52K a protein 14-3-3ζwt na následujících obrázcích.



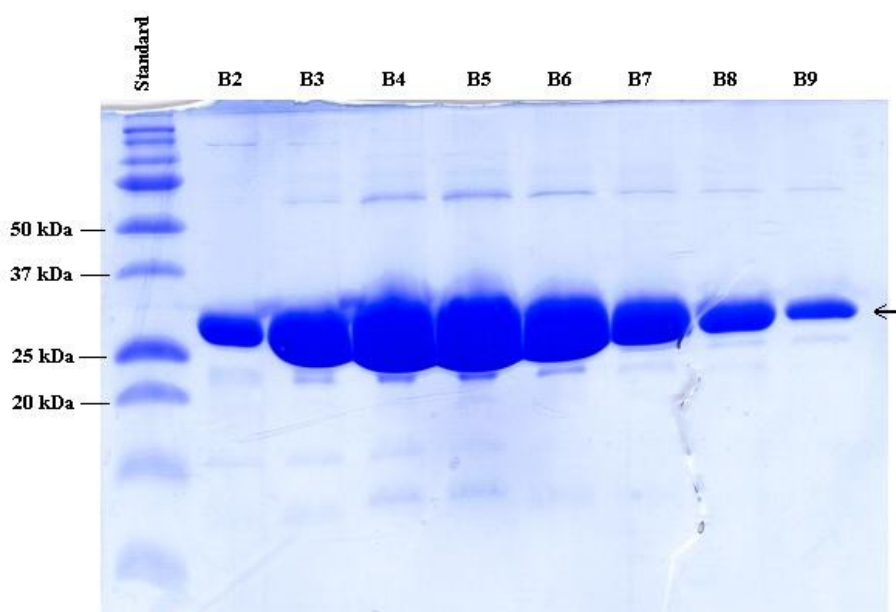
Obr. 18 Chromatogram získaný po aniontové chromatografii PdQ52K. Na grafu je patrný jeden pík zobrazující eluci proteinu do příslušných frakcí.



Obr. 19 Výsledek 15% SDS-PAGE frakcí eluovaných při aniontové chromatografii PdQ52K. Na obrázku je černou šipkou znázorněna oblast mezi 25 – 37 kDa, ve které se nachází PdQ52K (30,5 kDa).



Obr. 20 Chromatogram získaný po aniontové chromatografii proteinu 14-3-3 ζ wt. Na grafu je patrný jeden pík zobrazující eluci proteinu do příslušných frakcí.



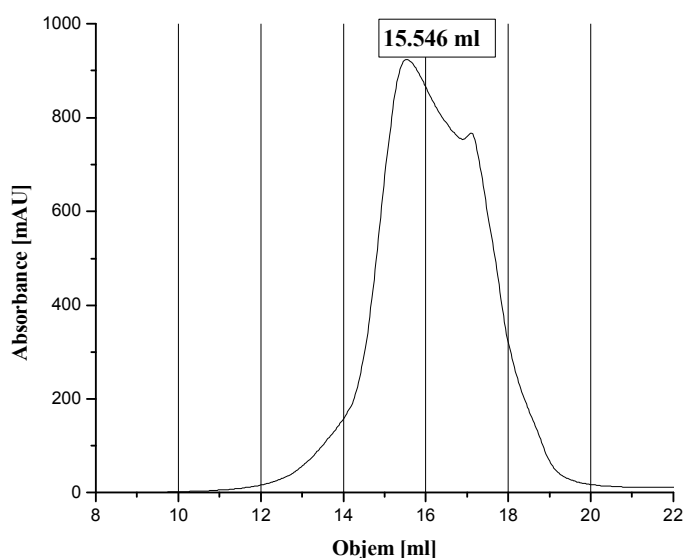
Obr. 21 Výsledek 15% SDS-PAGE frakcí eluovaných při aniontové chromatografii proteinu 14-3-3 ζ wt. Na obrázku je černou šipkou znázorněna oblast mezi 25 – 37 kDa, ve které se nachází protein 14-3-3 ζ wt (28 kDa).

5.1.4 Gelová permeační chromatografie

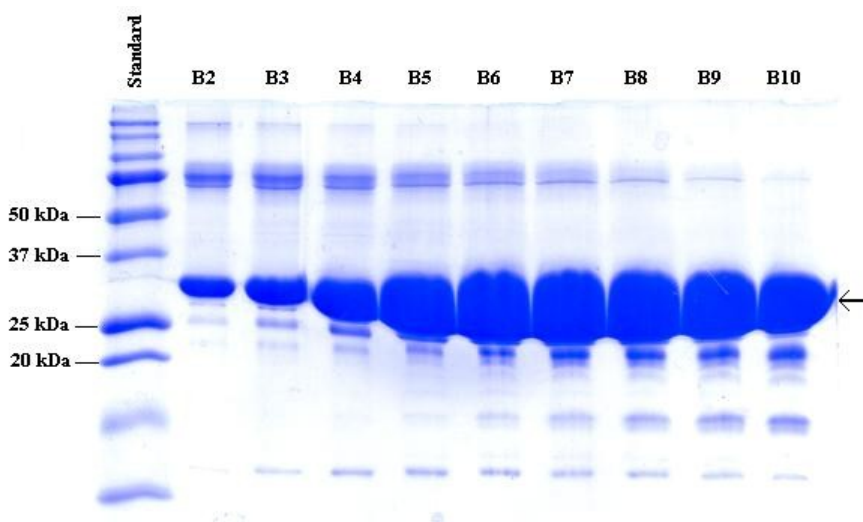
Vybrané frakce byly opět smíchány a dialyzovány v pufru o složení 100mM NaCl, 20mM TRIS (pH = 7,5), 1mM EDTA a 5mM DTT (viz. kapitola 4.9). Protein byl zakoncentrován na objem cca 0,5 ml (viz. kapitola 4.13) a nanesen na kolonu obsahující

Sepharosovou maticí (Amersham Biosciences, Švédsko). Následně byla spuštěna metoda a eluát byl jímán do mikrozkuvek po 0,5 ml (viz. kapitola 4.10.3).

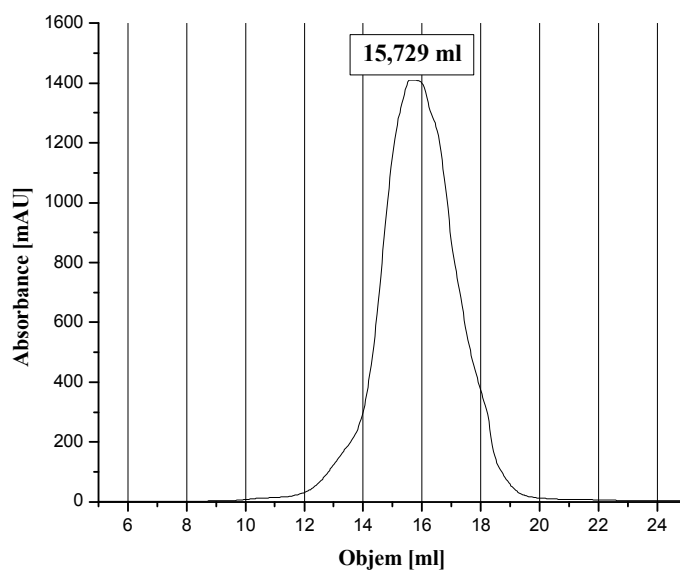
Na základě chromatogramu byly vybrány frakce obsahující protein. Jejich čistota byla opět ověřena pomocí elektroforézy SDS-PAGE, jako v případě niklové chelatační chromatografie (viz. kapitola 5.1.2) a aniontové iontově-výměnné chromatografie (viz. kapitola 5.1.3). Výsledná data tohoto kroku purifikace jsou opět ukázána pro fosducin PdQ52K a protein 14-3-3ζwt na následujících obrázcích.



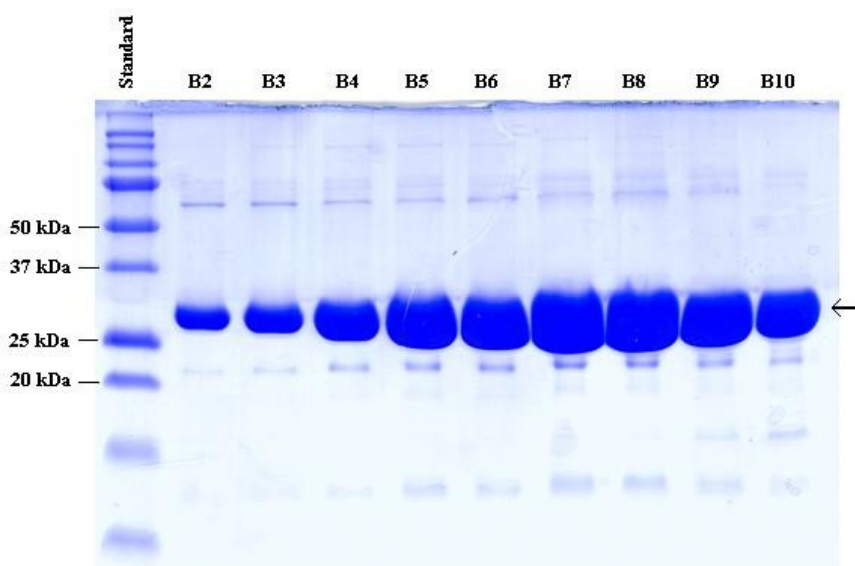
Obr. 22 Chromatogram získaný po gelové permeační chromatografii PdQ52K. Na grafu je patrný jeden pík zobrazující eluci proteinu do příslušných frakcí. Pík je asymetrický, což je pravděpodobně způsobeno vznikem různých nábojových forem fosducinu.



Obr. 23 Výsledek 15% SDS-PAGE frakcí eluovaných při gelové permeační chromatografii PdQ52K. Na obrázku je černou šipkou znázorněna oblast mezi 25 – 37 kDa, ve které se nachází PdQ52K (30,5 kDa).



Obr. 24 Chromatogram získaný po gelové permeační chromatografii proteinu 14-3-3ζwt. Na grafu je patrný jeden pík zobrazující eluci proteinu do příslušných frakcí.

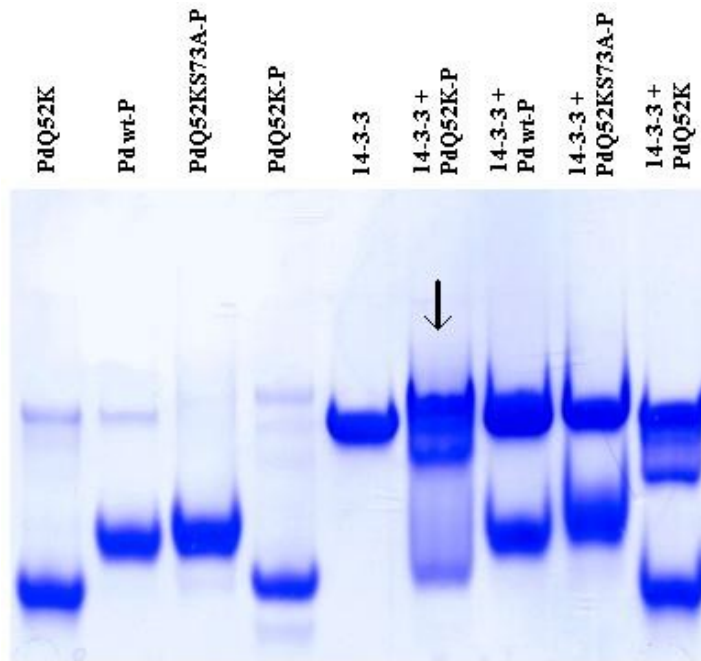


Obr. 25 Výsledek 15% SDS-PAGE frakcí eluovaných při gelové permeační chromatografii 14-3-3ζwt proteinu. Na obrázku je černou šipkou znázorněna oblast mezi 25 – 37 kDa, ve které se nachází protein 14-3-3ζwt (28 kDa).

5.2 Interakce 14-3-3 proteinu s fosducinem

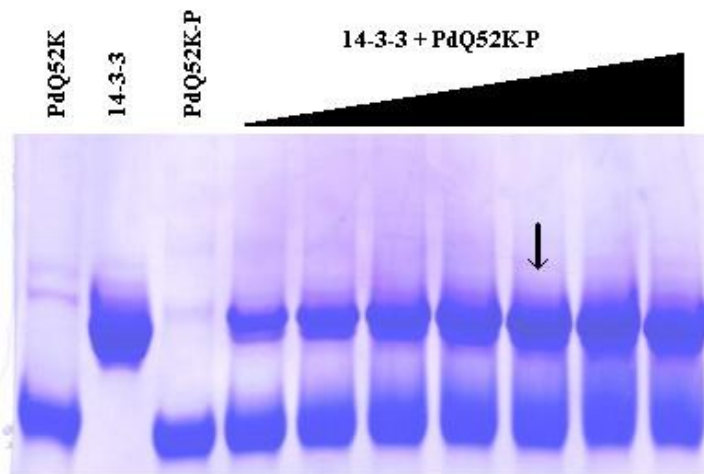
5.2.1 Nativní elektroforéza

Pro vazbu fosducinu ke 14-3-3 proteinu je nutná jeho fosforylace. K fosforylaci byla použita katalytická doména PKA v přítomnosti ATP a $MgCl_2$. Přebytečné ATP bylo z roztoku odstraněno dialýzou v pufru s obsahem 100mM NaCl, 20mM TRIS (pH = 7,5),



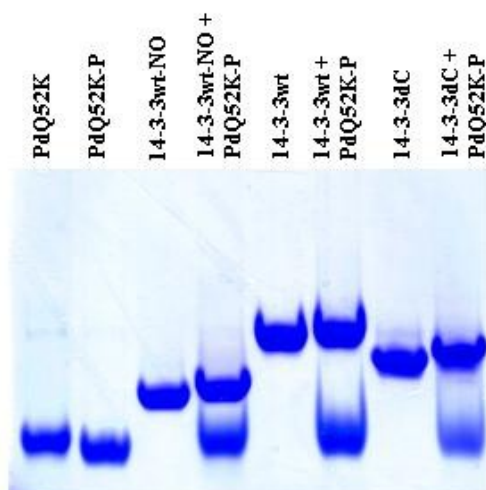
Obr. 27 Gel z 15% TBE nativní elektroforézy dokazující nutnost fosforylace v obou fosforylačních místech (Ser54 i Ser73) pro vznik komplexu. Obsah fosforylačních míst pro jednotlivé formy fosducinu viz. Tab. 2, str. 61. Vznik komplexu a úbytek fosforylovaného PdQ52K je naznačen černou šipkou. „P“ u jednotlivých forem značí, že je daná forma fosducinu fosforylována.

Postupný vznik komplexu se zvyšující se koncentrací 14-3-3 proteinu je viditelný na Obr. 28, str. 63. Komplex se stechiometrií 2:1 (14-3-3/PdQ52K-P) by pak měl být pozorován v osmé linii. Vznik komplexu je ovšem pozorován i v dalších liniích, což je pravděpodobně způsobeno dalšími, nespecifickými interakcemi mezi 14-3-3 a fosforylovaným Pd.



Obr. 28 Gel z 15% TBE nativní elektroforézy ukazující postupný vznik komplexu 14-3-3/PdQ52K-P s přibývající koncentrací 14-3-3 proteinu (zobrazeno černým trojúhelníkem). Vznik komplexu se stechiometrií 2:1 by měl být pozorován v linii 8, která je označena šipkou.

Dále bylo zjišťováno, jaký vliv mají na vazbu s fosducinem různé formy 14-3-3 proteinu. Pro interakci byl použit 14-3-3 ζ wt s odštěpeným His-Tagem, 14-3-3 ζ wt obsahujícím His-Tag a 14-3-3 Δ C, což je mutant neobsahující inhibující C-konec. 14-3-3 ζ wt s odštěpeným His-Tagem a 14-3-3 Δ C již byly vyrobeny v naší laboratoři. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 29. Pro pokus byl použit PdQ52K o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M a koncentrace 14-3-3 proteinů byla $2 \cdot 10^{-4}$ M. Při této elektroforéze není použit 14-3-3 ζ noW, ale z námi získaných dat bylo ověřeno, že tato forma 14-3-3 proteinu patří mezi formy nejlépe interagujícími s PdQ52K-P (data nezobrazena), stejně jako 14-3-3 Δ C.



Obr. 29 Vliv mutantní formy 14-3-3 na její vazbu s PdQ52K-P. 14-3-3wt-NO značí 14-3-3 ζ wt bez His-Tagu, 14-3-3wt značí 14-3-3 ζ wt s His-Tagem, 14-3-3dC značí 14-3-3 Δ C. Z obrázku je patrné, že všechny formy 14-3-3 proteinu interagují s fosducinem za vzniku komplexu (posun zóny) a zdá se, že nejlepší komplex je tvořen se 14-3-3 Δ C.

5.2.2 Měření stacionární Trp fluorescence PdQ52K

Metoda původně zamýšlená k získání disociační konstanty K_d se stala pouze ověřovací. Nárůst intenzity fluorescence jediného tryptofanu fosducinu (Trp29), který se nachází v těsné prostorové blízkosti fosforylačních míst Ser54 a Ser73, vypovídá o vzájemné interakci fosducinu PdQ52K-P („P“ značí fosforylovaný) se 14-3-3ζnoW proteinem. Pro měření byl použit mutant 14-3-3 neobsahující tryptofany, které by rušily signál fosducinového Trp29 (viz. kapitola 4.17.2).

K měření byly použity PdQ52K-P o původních koncentracích 30, 50 a 70 μM a k nim byl přidáván 14-3-3ζnoW. Koncentrace obou proteinů se s rostoucím objemem snižovala. Tab. 3 na str. 64 zobrazuje koncentrace jednotlivých proteinů během měření s přidavkem 14-3-3ζnoW. V tabulce jsou barevně vyznačeny koncentrace, kdy dochází ke vzniku komplexu 14-3-3ζnoW/PdQ52K-P se stechiometrií 2:1. Je přidán sloupec s poloviční koncentrací 14-3-3ζnoW pro přehledné srovnání koncentrací obou proteinů, které by se měly přibližně rovnat. Excitace byla nastavena na 297 nm, aby nedocházelo k přílišné excitaci tyrosinů (280 nm) obsažených v obou proteinech, emise byla nastavena na 350 nm, aby nedocházelo ke zbytečnému zkreslování spektra rozptýleným zářením, nebo emitujícími tyrosiny.

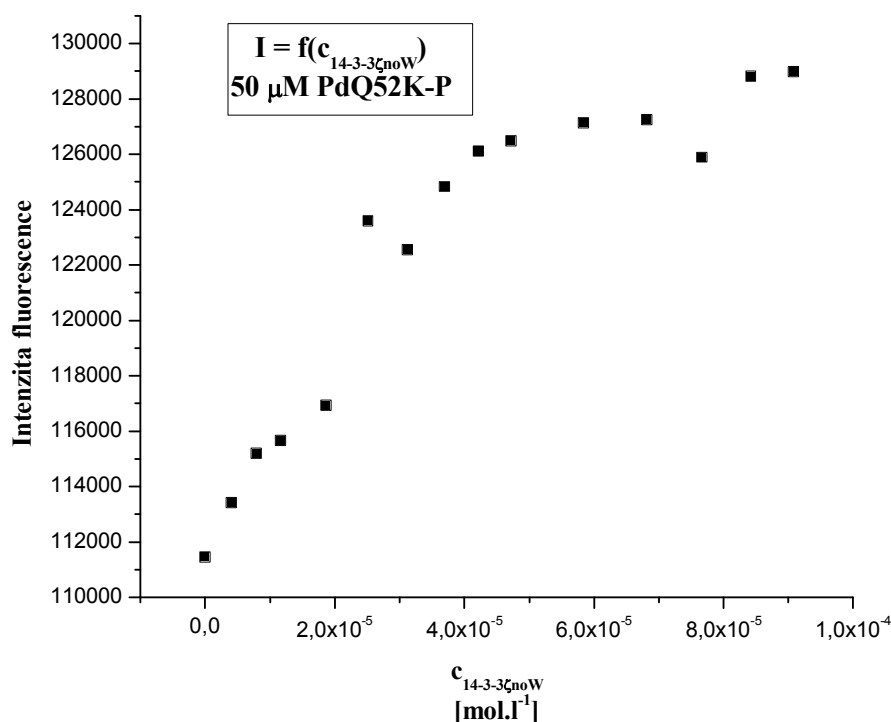
Pro prezentaci byl vybrán graf pro 50 μM PdQ52K-P (viz. Obr. 30, str. 66), u kterého byl nejlépe patrný nárůst intenzity fluorescence. Jelikož je tato metoda velmi citlivá, je náchylná k velké chybě při měření, proto nebylo u obou dalších grafů možné pozorovat jasný nárůst intenzity a zároveň proto nebylo možné data proložit pro získání disociační konstanty komplexu K_d .

Tab. 3 Zobrazení koncentrací proteinů během měření stacionární Trp fluorescence

$V_{14-3-3\zeta noW}$ [ul]	$C_{PdQ52K-P}$ (30 μ M) [mol · l ⁻¹]	$C_{PdQ52K-P}$ (50 μ M) [mol · l ⁻¹]	$C_{PdQ52K-P}$ (70 μ M) [mol · l ⁻¹]	$C_{14-3-3\zeta noW}$ [mol · l ⁻¹]	$C_{14-3-3\zeta noW}/2$ [mol · l ⁻¹]
0	3,00E-05	5,00E-05	6,00E-05	0,00E+00	0,00E+00
10	2,94E-05	4,90E-05	5,88E-05	4,01E-06	2,00E-06
20	2,89E-05	4,81E-05	5,77E-05	7,86E-06	3,93E-06
30	2,83E-05	4,72E-05	5,66E-05	1,16E-05	5,78E-06
50	2,73E-05	4,55E-05	5,46E-05	1,86E-05	9,29E-06
70	2,63E-05	4,39E-05	5,26E-05	2,51E-05	1,26E-05
90	2,54E-05	4,24E-05	5,09E-05	3,12E-05	1,56E-05
110	2,46E-05	4,10E-05	4,92E-05	3,69E-05	1,84E-05
130	2,38E-05	3,97E-05	4,76E-05	4,22E-05	2,11E-05
150	2,31E-05	3,85E-05	4,62E-05	4,72E-05	2,36E-05
200	2,14E-05	3,57E-05	4,29E-05	5,84E-05	2,92E-05
250	2,00E-05	3,33E-05	4,00E-05	6,81E-05	3,41E-05
300	1,88E-05	3,13E-05	3,75E-05	7,66E-05	3,83E-05
350	1,76E-05	2,94E-05	3,53E-05	8,42E-05	4,21E-05
400	1,67E-05	2,78E-05	3,33E-05	9,08E-05	4,54E-05

Vysvětlení k tabulce 3:

Tabulka 3 zobrazuje skutečné koncentrace proteinů během měření. Barevně jsou vyznačeny ty koncentrace, při kterých by mělo dojít ke vzniku komplexu 14-3-3 ζ noW/PdQ52K-P se stechiometrií 2:1. Poslední sloupec udává poloviční koncentraci 14-3-3 ζ noW pro lehčí srovnání koncentrací. V případě vzniku komplexu se stechiometrií 2:1 by se koncentrace PdQ52K-P a koncentrace v posledním sloupci tabulky měly přibližně rovnat.

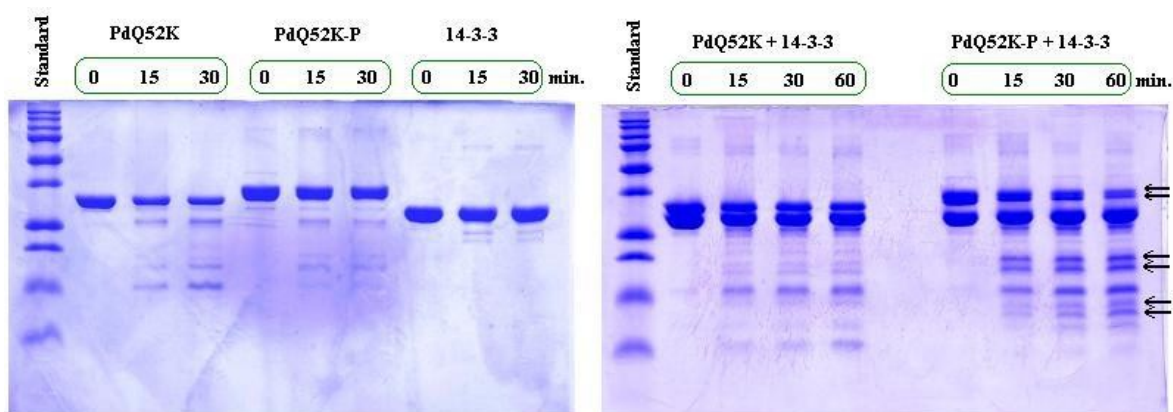


Obr. 30 Zobrazení nárůstu tryptofanové fluorescence PdQ52K-P po přidavku 14-3-3ζnoW.

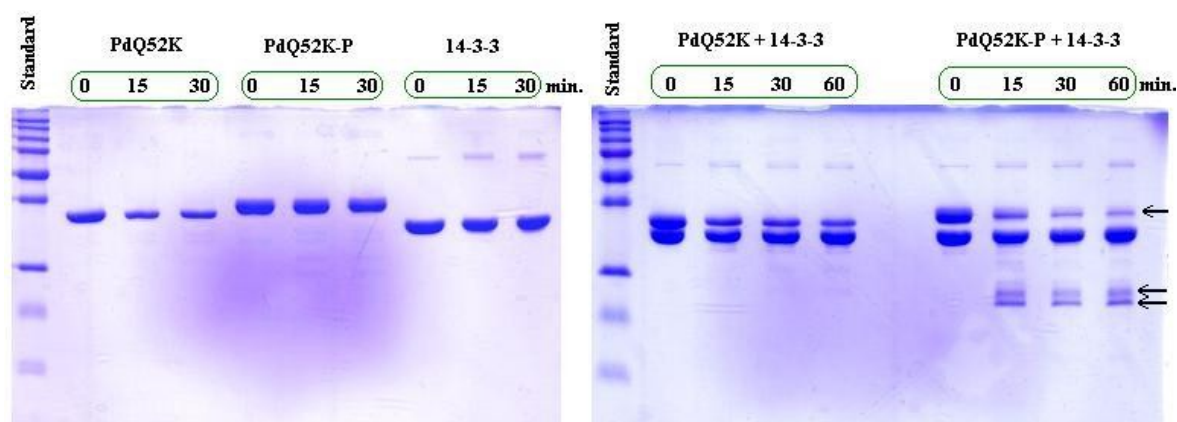
5.3 Limitovaná proteolýza

Limitovaná proteolýza byla použita k odhalení flexibilních oblastí fosducinu, které změni svoji konformaci a tím i citlivost vůči *proteasam* po vazbě Pd na protein 14-3-3. Zároveň nám tato metoda také umožňuje navrhnout konstrukt DNA kódující část fosducinu, která je schopna se 14-3-3 tvořit komplex. Tento komplex bez obsahu fosducinových flexibilních oblastí by mělo jít snáze krystalovat (viz. kapitola 4.15).

Pro tento účel byly použity enzymy *chymotrypsin A* a *trypsin*, jejichž koncentrace v roztoku dosahovala hodnoty $1,2 \cdot 10^{-8}$ M. Enzymy působily na jednotlivé proteiny, případně komplexy, konkrétně na PdQ52K, PdQ52K-P, 14-3-3, 14-3-3 + PdQ52K a 14-3-3 + PdQ52K-P, po různě dlouhou dobu (0, 15, 30 min. a navíc ještě 60 minut ve směsi obou proteinů). Koncentrace proteinů byla 10μM pro fosducin a 20μM pro 14-3-3. Aktivita enzymu byla zastavena ponořením směsi do lázně o 100 °C na dobu 3 minut. Směsi byly nanášeny na 15% SDS-PAGE gel (10 μl směsi + 2,5 μl SDS-barviva). Elektroforéza běžela při 190 V po dobu cca 40 minut. Gely byly předány k vyhodnocení obsahu jednotlivých zón metodou hmotnostní spektroskopie MALDI-TOF ve spolupráci s Doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. z MBÚ AV ČR, v.v.i.



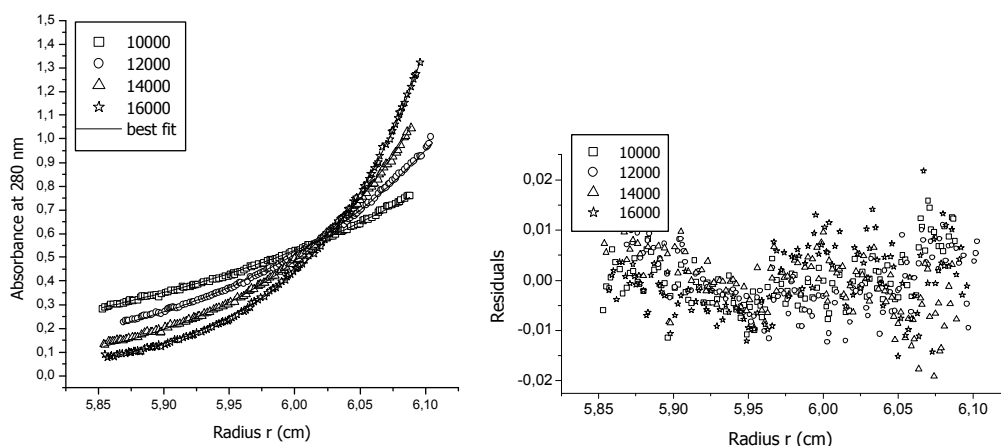
Obr. 31 15% SDS-PAGE gel zobrazující působení chymotrypsinu A na proteiny a proteinový komplex. Zóny, které budou vyhodnoceny metodou MALDI-TOF jsou označeny šipkami.



Obr. 32 15% SDS-PAGE gel zobrazující působení trypsinu na proteiny a proteinový komplex. Zóny, které budou vyhodnoceny metodou MALDI-TOF jsou označeny šipkami.

5.4 Analytická ultracentrifugace

Měření na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-1, Beckman Coulter (USA) a vyhodnocování naměřených dat v programech Sedphit a Sedphat bylo prováděno ve spolupráci s Mgr. Lenkou Řežábkovou z PřF UK (viz. kapitola 4.16). Z naměřených dat byla zjištěna stechiometrie komplexu 14-3-3/Pd s výsledkem $\underline{2:1}$, kde „2“ značí dva monomery 14-3-3 proteinu vázající jeden fosducin („1“). Dále byla zjištěna disociační konstanta komplexu, která je přibližně $\underline{5\mu M}$.

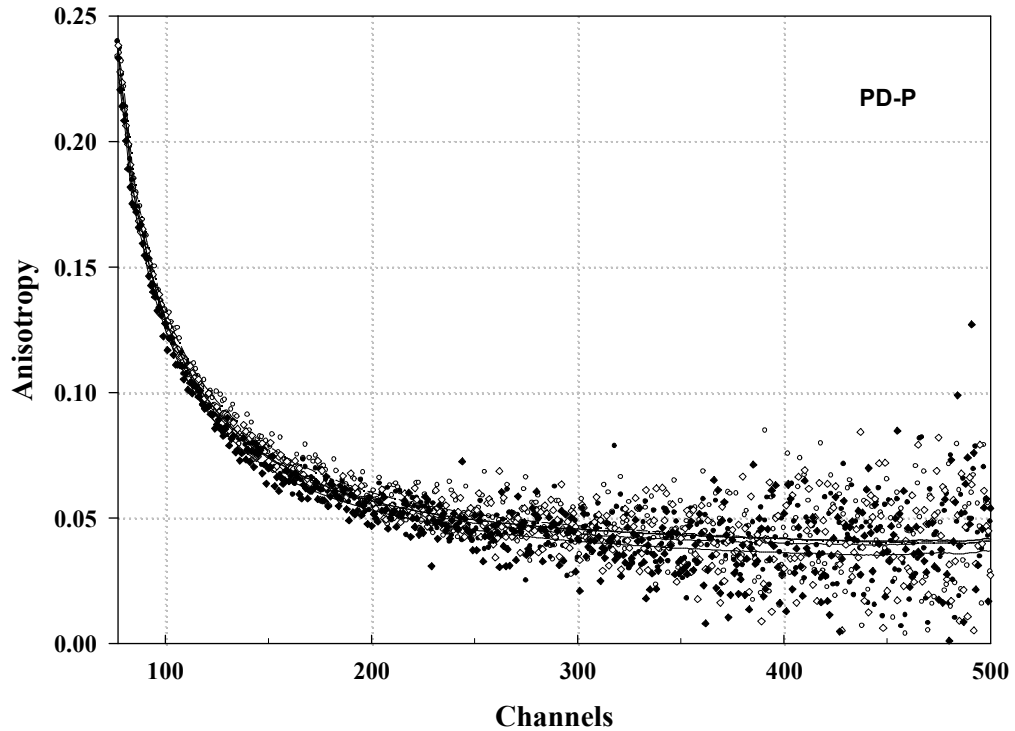


Obr. 33 Data získaná metodou sedimentačních rovnováh. Hodnoty (Residuals) experimentálních dat jsou náhodně distribuovány okolo fitu (hodnota 0,00), což vypovídá o vhodně zvoleném modelu monomer-dimer.

5.5 Časově-rozlišená fluorescenční měření Trp29

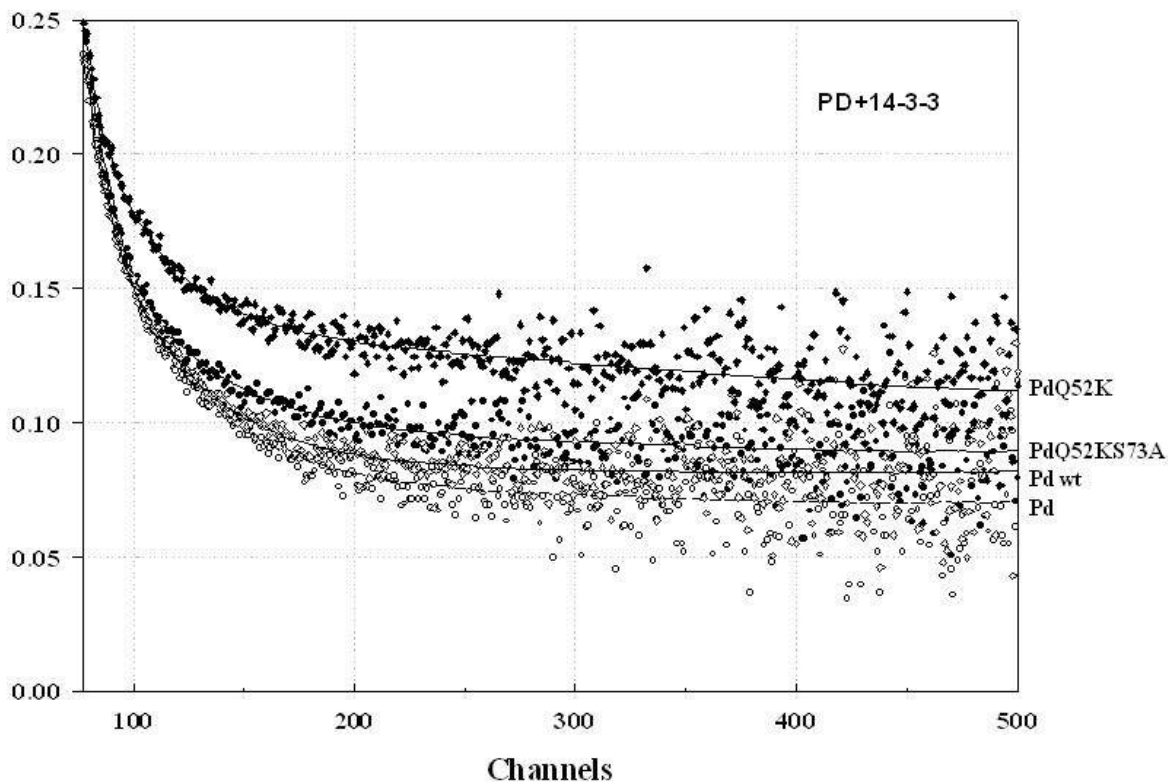
Měření časově-rozlišeného dohasínání intenzity tryptofanové fluorescence bylo použito k získání informace ohledně vlivu vazby 14-3-3 proteinu na strukturu různých forem fosforylovaného fosducinu, konkrétně PdQ52K, Pd wt a PdQ52KS73A a na nefosforylovaný PdQ52K (označený Pd). Také byl zkoumán vliv samotné fosforylace fosducinu na jeho strukturu. Dále bylo měřeno časově-rozlišené dohasínání anizotropie fluorescence, které umožňuje určení rotačních korelačních časů Φ proteinu, nebo proteinového komplexu a tím i studium změn flexibility (viz. kapitola 4.17.3).

Koncentrace fosducinů byla $30\mu\text{M}$, koncentrace 14-3-3 ζ noW $60\mu\text{M}$, aby byl zajištěn vznik komplexu se stechiometrií 2:1 (dva monomery 14-3-3 na jeden fosducin). Obr. 34 na str. 69 zobrazuje křivky dohasínání anizotropie fluorescence vzorků fosducinu před přidáním 14-3-3. Z obrázku můžeme usoudit, že fosforylace zásadním způsobem neovlivňuje pohyblivost Trp29 ve fosducinu (jediný Trp zbytek v molekule), jelikož se jednotlivé křivky příliš neliší. Mírná závislost na fosforylaci je vidět ve střední části dohasínání (100-200 ns), která odráží korelační časy související se segmentálními pohyby fosducinu. Dále je možné pozorovat, že křivka fosforylovaného fosducinu leží systematicky pod křivkou nefosforylovaného fosducinu, což může nasvědčovat změně vnitřní flexibility po fosforylaci. Ovšem změna polohy křivky je pozorována na hranici signifikantnosti. Zmíněný jev je patrný i v Tab. 4 na str. 71, konkrétně v poklesu amplitudy charakterizující pomalé pohyby β_s („s“ z angl. *slow*) o hodnotu 0,02, což indikuje vzrůst sumární amplitudy rychlých pohybů o stejnou hodnotu, jelikož $(\beta_s + \beta_m + \beta_f) = r_0 = \text{konst.}$



Obr. 34 Dohasínání anizotropie fluorescence fosducinu (PD) v nepřítomnosti 14-3-3. Nefosforylovaný Pd (prázdná kolečka), fosforylovaný PdQ52KS73A (plná kolečka), fosforylovaný Pd wt (prázdné kosočtverce), fosforylovaný PdQ52K (plné kosočtverce).

Na Obr. 35 na str. 70, je zobrazeno dohasínání anizotropie fluorescence Trp29 v přítomnosti 14-3-3. Z posuvu křivek k vyšším hodnotám v dlouhých časech po excitaci je vidět, že dochází k interakci fosforylovaných vzorků se 14-3-3. Síla interakce vzrůstá v pořadí Pd wt < PdQ52KS73A < PdQ52K, kde je maximální, což je ve shodě s výsledky analýzy dob života (viz. dále). Z Obr. 35 na str. 70, je také patrné, že dochází i k slabé nespecifické interakci 14-3-3 proteinu s nefosforylovaným fosducinem (prázdná kolečka) (ve srovnání s Obr. 34). Nutno podotknout, že pozorované změny v Obr. 35 na str. 70 nejsou způsobeny změnou velikosti komplexu, která by se projevila změnou směrnice křivek v „pozdních časech“. Vertikální posuvy křivek jsou pravděpodobně způsobeny mixováním anizotropií pocházejících od variabilních frakcí volného a navázaného fosducinu.



Obr. 35 Dohasínání anizotropie fluorescence fosducinu (PD) v přítomnosti 14-3-3. Nefosforylovaný Pd (prázdná kolečka), fosforylovaný Pd wt (plná kolečka), fosforylovaný PQ52KS73A (prázdné kosočtverce), fosforylovaný PdQ52K (plné kosočtverce).

Z Tab. 4, na str. 71 je možné vyčíst, že střední doba života ($SD=0.05$ ns) mírně (ale signifikantně) klesá s fosforylací fosducinu ($\tau_{Pd} > \tau_{Pd\ wt} > \tau_{PdQ52KS73A} > \tau_{PdQ52K}$). Po navázání 14-3-3 doba života naopak vždy vzroste. Postupný vzrůst hodnot ($\tau_{Pd+14-3-3} < \tau_{Pd\ wt+14-3-3} < \tau_{PQ52KS73A+14-3-3} < \tau_{PdQ52K+14-3-3}$) pravděpodobně odráží vzrůst afinity fosforylovaného Pd k 14-3-3 a tudíž za daných podmínek i vzrůstající frakci navázaného 14-3-3 vykazujícího delší dobu života fluorescence. U nefosforylované kontroly se po přidání 14-3-3 střední doba života neměnila.

Z tabulky je dále možné vyčíst:

- (i) Všechny parametry dohasínání anizotropie Pd wt jsou v mezích přesnosti stejné jako u nefosforylovaného fosducinu, tzn., že fosforylace u Pd wt neovlivňuje žádný z pohybů Trp29.
- (ii) Fosforylace PdQ52K a PdQ52KS73A ovlivňují rychlé a středně rychlé pohyby Trp29. Kromě změn amplitud dochází i ke vzrůstu hodnoty Φ_f z 0,6 na 0,8 a 0,9 u nefosforylovaného Pd (PD), PdQ52KS73A a PdQ52K. Φ_m vzrůstá z 2,8 ns (PD) na

3,4 ns a 3,7 ns u PdQ52KS73A a PdQ52K. Detailní interpretace prodloužení korelačních dob by byla velmi spekulativní.

- (iii) Dohasínání anizotropie PD + 14-3-3 a Pd wt + 14-3-3 se neliší. Malý rozdíl mezi křivkami patrný z *Obr. 35* na *str. 70*, který by mohl být interpretován jako slabá interakce Pd wt se 14-3-3, je způsoben pouze nulovou směrnicí křivky dohasínání PdQ52KS73A +14-3-3 v dlouhých časech. U PdQ52KS73A + 14-3-3 vyšlo Φ_s větší než 500 ns, ve srovnání s cca 100 ns u PD + 14-3-3. Taková hodnota se vzhledem ke krátké době života fluorescence nedá v tabulce uvést. Z *Obr. 35* na *str. 70* je to jasně vidět a svědčí to zřejmě o agregaci vzorku Pd wt + 14-3-3.

Lze tedy shrnout, že Pd wt se 14-3-3 pravděpodobně neinteraguje nebo interaguje pouze zanedbatelně. Tomu napovídá i v rámci chyby identická střední doba života fluorescence u PD + 14-3-3 a Pd wt + 14-3-3.

Tab. 4 Výsledky z měření dohasínání fluorescenční anizotropie

Vzorek	τ [ns]	β_f	Φ_f [ns]	β_m	Φ_m [ns]	β_s	Φ_s [ns]
PD	3,61	0,05	0,6	0,09	2,8	0,06	30-50
PD + 14-3-3	3,63	0,04	0,3	0,11	2,1	0,08	50-100
Pd wt	3,43	0,06	0,8	0,08	3,4	0,05	30-50
Pd wt + 14-3-3	3,74	0,07	0,3	0,08	2,2	0,10	50-100
PdQ52KS73A	3,52	0,05	0,6	0,10	2,6	0,05	30-50
PdQ52KS73A + 14-3-3	3,67	0,04	0,2	0,10	2,0	0,08	50-100
PdQ52K	3,35	0,06	0,9	0,10	3,7	0,04	30-50
PdQ52K + 14-3-3	3,95	-	-	0,08	1,6	0,14	50-100

Legenda k tabulce 4:

τ značí střední dobu života, β značí amplitudu pro rychlé (*f*, z angl. *fast*), střední (*m*, z angl. *medium*) a pomalé (*s*, z angl. *slow*) pohyby, Φ značí rotační korelační časy. PD značí nefosforylovaný PdQ52K, ostatní formy fosducinu jsou fosforylovány.

6 Diskuze

Tato diplomová práce se věnuje biofyzikální charakterizaci proteinového komplexu 14-3-3 ζ proteinu s proteinem fosducinem. Oba proteiny jsou důležitými komponentami v regulaci přenosu signálu v oku. Charakterizace a následné strukturní studie komplexu 14-3-3/Pd by mohly odhalit doposud neznámý způsob regulace fosducinu 14-3-3 proteinem.

V rámci této diplomové práce byly v bakteriálním systému *E. coli* BL21(DE3) exprimovány proteiny 14-3-3 ζ wt, 14-3-3 ζ noW, PdQ52K, Pd wt a PdQ52KS73A. Všechny výše zmíněné proteiny byly úspěšně purifikovány za použití několika chromatografických technik. Všechny isoformy fosducinu (Pd) byly úspěšně fosforylovány *in vitro* pomocí katalytické domény PKA.

K ověření vzniku komplexu byla použita nativní elektroforéza, kdy je protein nanášen na gel v tzv. nativním stavu, což znamená, že je možné pozorovat vznik komplexu, jelikož nedochází k denaturaci proteinu. Na *Obr. 26, str. 61* je zobrazen vznik komplexu fosforylovaného PdQ52K se 14-3-3 proteinem. *Obr. 27 na str. 62* pak potvrzuje nutnost fosforylace obou fosforylačních míst fosducinu (Ser54 a Ser73) ke tvorbě komplexu. Pro tyto účely byly už dříve vyrobeny mutantní formy fosducinu, kde u formy PdQ52K dochází k fosforylaci obou míst, u formy PdQ52KS73A dochází k fosforylaci Ser54 a přirozený fosducin Pd wt je PKA fosforylován v místě Ser73. Vznik komplexu byl dále potvrzen měřením stacionární tryptofanové fluorescence fosducinu při jeho vazbě se 14-3-3 ζ noW. Tato mutantní forma neobsahuje ve své primární struktuře tryptofany (konkrétně mutace W59F a W228F), které by bránily efektu nárůstu intenzity fluorescence u fosducinového tryptofanu 29.

Pro odhalení flexibilních fosducinových regionů nekrytých 14-3-3 proteinem v komplexu byla použita metoda limitované proteolýzy. K tomuto účelu byly použity dva proteolytické enzymy *trypsin* a *chymotrypsin A*, které působily na jednotlivé proteiny a proteinový komplex po různě dlouhou dobu. Výsledné směsi proteinů byly naneseny na gel SDS-PAGE. Vybrané zóny budou analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Na základě proteinových sekvencí lze navrhnout konstrukt fosducinu schopného interagovat se 14-3-3. Tento konstrukt by neměl obsahovat flexibilní oblasti, aby jej bylo možné využít ke tvorbě krystalu komplexu se 14-3-3.

Analytická ultracentrifugace byla použita pro určení stechiometrie komplexu a určení disociační konstanty. Metodou sedimentačních rovnováh byla zjištěna stechiometrie komplexu 14-3-3/Pd 2:1, kde dochází k interakci dvou monomerů 14-3-3 tvořících dimer, s jedním fosducinem. Touto metodou byla také odhadnuta disociační konstanta komplexu K_d s výsledkem 5 μ M.

Časově-rozlišené měření dohasínání fluorescence anizotropie potvrdilo vazbu 14-3-3 proteinu s dvakrát fosforylovaným fosducinem (PdQ52K). Vliv samotné fosforylace (v nepřítomnosti 14-3-3) na strukturu fosducinu byl zanedbatelný (viz. *Obr. 34, str. 69*). *Tab. 4 na str. 71* ukazuje nárůst pomalých pohybů v závislosti na vazbě fosforylovaného fosducinu (PdQ52K a PdQ52KS73A) se 14-3-3 proteinem (dáno amplitudami β_s). Naopak slabá vazba byla pozorována mezi 14-3-3 a fosforylovaným Pd wt a nefosforylovaným PdQ52K.

Tyto získané výsledky budou následně využity při designu strukturních studií komplexu 14-3-3/Pd pomocí technik NMR či rentgenostrukturní analýzy.

7 Závěr

Hlavní výsledky této práce jsou:

- Byly úspěšně exprimovány a purifikovány proteiny 14-3-3 ζ wt, 14-3-3 ζ noW, Pd wt, PdQ52K a PdQ52KS73A se ziskem miligramových množství.
- Všechny purifikované formy fosducinu byly fosforylovány pomocí PKA *in vitro*.
- Pomocí nativní elektroforézy byl prokázán vznik komplexu 14-3-3/Pd a dále byla ověřena nutnost fosforylace fosforylačních míst Ser54 a Ser73 na fosducinu pro vznik komplexu.
- Pomocí limitované proteolýzy bylo ukázáno, že vazba 14-3-3 mění konformaci molekuly Pd.
- Pomocí analytické ultracentrifugace byla zjištěna stechiometrie komplexu 14-3-3/Pd s výsledkem 2:1, kde „2“ značí dva monomery 14-3-3 proteinu interagujícího s jedním fosducinem. Dále byla odhadnuta disociační konstanta K_d komplexu 14-3-3/Pd s výsledkem 5 μ M.
- Pomocí časově-rozlišené tryptofanové fluorescence fosducinu byly popsány změny v proteinových pohybech fosducinu při jeho vazbě se 14-3-3. Dále bylo zjištěno, že samotná fosforylace fosducinu nemá vliv (nebo jen nepatrný) na jeho flexibilitu. Měření časově-rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence dále ukázalo, že 14-3-3 se váže s nejnižší afinitou k nefosforylovanému fosducinu a dále pak k fosforylovanému Pd wt. Nejsilnější vazebná interakce byla pozorována s fosforylovaným PdQ52K.

Seznam citované literatury

- [1] Ripps, H.: *FASEB Journal*, 24, 970-975 (2010).
- [2] Stryer, L.: *Annual Review of Neuroscience*, 9, 87-119 (1986).
- [3] Sokolov, M., Strissel, K. J., Leskov, I. B., Michaud, N. A., Govardovskii, V. I., Arshavsky, V. Y.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19149-19156 (2004).
- [4] Sokolov, M., Lyubarsky, A. L., Strissel, K. J., Savchenko, A. B., Govadorskii, V. I., Pugh, E. N. Jr., Arshavsky, V. Y.: *Neuron*, 34, 95-106 (2002).
- [5] Lobanova, E. S., Herrmann, R., Finkelstein, S., Reidel, B., Skiba, N. P., Deng, W. T., Jo, R., Weiss, E. R., Hauswirth, W. W., Arshavsky, V. Y.: *Journal of Neuroscience*, 30, 6815-6824 (2010).
- [6] Gaudet, R., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Willardson, B. M., Sigler, P. B.: *Molecular Cell*, 3, 649-660 (1999).
- [7] Nakano, K., Chen, J., Tarr, G. E., Yoshida, T., Flynn, J. M., Bitensky, M. W.: *Neurobiology*, 98, 4693-4698 (2001).
- [8] Thulin, C. D., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Truscott, S. M., Old, W. M., Ahn, N. G., Resing, K. A., Hamm, H. E., Bitensky, M. W., Willardson, B. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23805-23815 (2001).
- [9] Lee, B. Y., Thulin, C. D., Willardson, B. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 54008-54017 (2004).
- [10] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie*, překlad z anglického originálu *Essential Cell Biology*, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 1998.
- [11] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.: *Biochemistry (fifth edition)*, W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
- [12] Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Kreiger, Scott, Zipursky, Darnell: *Molecular Cell Biology (fifth edition)*, W. H. Freeman and Company, New York, 2003.
- [13] Nelson, D. L., Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry (fourth edition)*, W. H. Freeman and Company, New York, 2004.
- [14] Koolman, J., Roehm, K. H.: *Color Atlas of Biochemistry (second edition)*, Thieme Stuttgart, New York, 2005.
- [15] Lolley, R. N., Brown, B. M., Fafhrber, D. B.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 572-578 (1977).
- [16] Lee, R. H., Brown, B. M., Lolley, R. N.: *Biochemistry*, 23, 1972-1977 (1984).
- [17] Danner, S., Lohse, M. J.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 93, 10145-10150 (1996).
- [18] Lee, R. H., Whelan, J. P., Lolley, R. N., McGinnis, J. F.: *Experimental Eye Research*, 46, 829-840 (1988).
- [19] Schaad, N. C., Shinohara, T., Abe, T., Klein, D. C.: *Endocrinology*, 129, 3289-3298 (1991).

- [20] Kobayashi, Y., Hisatomi, O., Satoh, T., Tokunaha, F.: *FEBS Letters*, 502, 117-121 (2001).
- [21] Fabczak, H., Sobierajska, K., Fabczak, S.: *Protist*, 155, 181-192 (2004).
- [22] Sobierajska, K., Fabczak, H., Fabczak, S.: *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 79, 135-143 (2005).
- [23] Salamon, J. A., Acuna, R., Dawe, A. L.: *Molecular Microbiology*, 76, 848-860 (2010).
- [24] Flanary, P. L., DiBello, P. R., Estrada, P., Dohlman, H. G.: *Journal of Biological Chemistry*, 275, 18462-18469 (2000).
- [25] Beetz, N., Hein, L.: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 599-612 (2010).
- [26] Reiter, R. J.: *Am. Journal of Anatomy*, 162, 287-313 (1981).
- [27] Kuo, C. H., Taira, E., Takaha, N., Sohma, H., Akino, T., Fukada, Y., Sanada, K., Miki, N.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 191, 1097-1104 (1993).
- [28] Beetz, N., Harrison, M. D., Brede, M., Zong, X., Urbanski, M. J., Sietmann, A., Kaufling, J., Barrot, M., Seeliger, M. W., Vieira-Coelho, M. A., Hamet, P., Gaudet, D., Seda, O., Tremblay, J., Kotchen, T. A., Kaldunski, M., Nusig, R., Szabo, B., Jacob, H. J., Cowley, A. W., Biel, M., Stoll, M., Lohse, M. J., Broeckel, U., Hein, L.: *Journal of Clinical Investigation*, 119, 3597-3612 (2009).
- [29] Sunayashiki-Kusuzaki, K., Kikuchi, T., Wawrousek, E. F., Shinohara, T.: *Molecular Brain Research*, 52, 112-120 (1997).
- [30] Bauer, P. H., Muller, S., Puzicha, M., Pippig, S., Obermaier, B., Helmreich, E. J., Lohse, M. J.: *Nature*, 358, 73-76 (1992).
- [31] Kuo, C. H., Miki, N.: *Neuroscience Letters*, 103, 8-10 (1989).
- [32] Lee, R. H., Fowler, A., McGinnis, J. F., Lolley, R. N., Craft, C. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 265, 15867-15873 (1990).
- [33] Gaudet, R., Bohm, A., Sigler, P. B.: *Cell*, 87, 577-588 (1996).
- [34] Klouda, P.: *Základy biochemie*, Pavel Klouda, Ostrava
- [35] Lee, R. H., Brown, B. M., Lolley, R. N.: *Journal of Biological Chemistry*, 265, 15860-15866 (1990).
- [36] Xu, J., Wu, D., Slepak, V. Z., Simon, M. I.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 92, 2086-2090 (1995).
- [37] Pagh-Roehl, K., Lin, D., Su, L., Burnside, B.: *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6475-6488 (1995).
- [38] Ara-Iwata, F., Jacobson, S. G., Gass, J. D. M., Hotta, Y., Fujiki, K., Hayakawa, M., Ivana, G.: *Ophthalmic Genetics*, 17, 3-14 (1996).
- [39] Yoshida, T., Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Jensen, G. J., Thornton, B. J., Bitensky, M. W.: *Journal of Biological Chemistry*, 269, 24050-24057 (1994).
- [40] Schulz, K., Danner, S., Bauer, P., Schröder, S. and Lohse, M. J.: *Journal of Biological Chemistry*, 271, 22546-22551 (1996).
- [41] Mittal, R., Cerione, R. A., Erickson, J. W.: *Biochemistry*, 33, 10178-10184 (1994).
- [42] Wilkins, J. F., Bitensky, M. W., Willardson, B. M.: *Journal of Biological Chemistry*, 271, 19232-19237 (1996).
- [43] Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G., Soll, J.: *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 498-501 (1992).
- [44] Ferl, R. J., Manak, M. S., Reyes, M. F.: *Genome Biology*, 3, REVIEWS3010 (2002).

- [45] Gardino, A. K., Smerdon, S. J., Yaffe, M. B.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 173-182 (2006).
- [46] Tzivion, G., Gupta, V. S., Kaplun, L., Balan, V.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 203-213 (2006).
- [47] Porter, G. W., Khuri, F. R., Fu, H.: *Seminars in Cancer Biology*, 16, 193-202 (2006).
- [48] Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F., Smidt, M. P.: *Biochemical Journal*, 380, 297-309 (2004).
- [49] Wiltfang, J., Otto, M., Baxter, H. C., Bodemer, M., Steinacker, P., Bahn, E., Zerr, I., Kornhuber, J., Kretschmar, H. A., Poser, S., Rütther, E., Aitken, A.: *Journal of Neurochemistry*, 73, 2485-90 (1999).
- [50] Mackie, S., Aitken, A.: *FEBS Journal*, 272, 4202-10 (2005).
- [51] Baxter, H. C., Liu, W.G., Aitken, A., Fraser, J. R.: *Journal of Neuroscience*, 109, 6-15 (2002).
- [52] Layfield, R., Fergusson, J., Aitken, A., Lowe, J., Landon, M., Mayer, J.: *Neuroscience Letters*, 209, 57-60 (1996).
- [53] Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B.: *Journal of Neuroscience*, 19, 5782-91 (1999).
- [54] Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo J., Patel, Y.: *Journal of Biological Chemistry*, 270, 5706-5709 (1995).
- [55] Lottersberger, F., Panza, A., Lucchini, G., Piatti, S., Longhesei, M.P.: *Genetics*, 106, 661-675 (2006).
- [56] Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C., Sommarin, M.: *Plant Physiology*, 127, 142-149 (2001).
- [57] Obšilová, V., Šilhán, J., Bouřa, E., Teisinger, J., Obšil, T.: *Physiological Research*, 57, 11-21 (2008).
- [58] Tzivion, G., Luo, Z., Avruch, J.: *Nature*, 394, 88-92 (1998).
- [59] Tzivion, G., Luo, Z., Avruch, J.: *Journal of Biological Chemistry*, 275, 29772-29778 (2000).
- [60] Yaffe, M. B.: *FEBS Letters*, 513, 53-57 (2002).
- [61] Shen, Y. H., Godlewski, J., Bronisz, A., Zhu, J., Comb, M. J., Avruch, J., Tzivion, G.: *Molecular Biology of the Cell*, 14, 4721-4733 (2003).
- [62] Wilker, E. W., Grant, R. A., Artim, S. C., Yaffe, M. B.: *Journal of Biological Chemistry*, 280, 18891-18898 (2005).
- [63] Moore, B. W., McGregor, D.: *Journal of Biological Chemistry*, 240, 1647-1653 (1965).
- [64] Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., Shaw A. S.: *Cell*, 84, 889-897 (1996).
- [65] Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., Cantley, L. C.: *Cell*, 91, 961-971 (1997).
- [66] Chaudhri, M., Scarabel, M., Aitken, A.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300, 679-685 (2003).
- [67] Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., Klein, D. C.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 102, 1222-1227 (2005).
- [68] Wang, H., Zhang, L., Liddington, R., Fu, H.: *Journal of Biological Chemistry*, 273, 16297-16304 (1998).
- [69] Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., Liddington, R. C.: *Journal of Biological Chemistry*, 273, 16305-16310 (1998).
- [70] Henriksson, M. L., Francis, M. S., Peden, A., Aili, M., Stefansson, K., Palmer, R., Aitken, A., Hallberg, B.: *European Journal of Biochemistry*, 369, 4921-4929 (2002).
- [71] Rezabkova, L., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Journal of Structural Biology*, 170, 451-461 (2010).

- [72] Van Der Hoeven, P. C., Van Der Wal, J. C., Ruurs P., Van Blitterswijk, W. J.: *Biochemical Journal*, 347 Pt 3, 781-785 (2000).
- [73] Conklin, D. S., Galaktionov K, Beach, D.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 92, 7892-7896 (1995).
- [74] Benzing, T., Yaffe, M. B., Arnould, T., Sellin, L., Schermer, B., Schilling, B., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Leparc, G. G., Kim, E., Walz, G.: *Journal of Biological Chemistry*, 275, 28167-28172 (2000).
- [75] Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J. A., Klein, D. C.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 98, 8083-8088 (2001).
- [76] Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R. J., Fu, H., Liddington, R.: *Nature*, 376, 191-194 (1995).
- [77] Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S. J.: *Nature*, 376, 188-191 (1995).
- [78] Benzinger, A., Popowicz, G. M., Joy, J. K., Majumdar, S., Holak, T. A., Hermeking, H.: *Cell Research*, 15, 219-227 (2005).
- [79] Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., Yaffe, M. B.: *Molecular Cell*, 4, 153-166 (1999).
- [80] Obsil, T., Girlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S., Dyda, F.: *Cell*, 105, 257-267 (2001).
- [81] Liu, Y.-C., Elly, Ch., Yoshida, H., Bonnefoy-Berard, N., Altman, A.: *Journal of Biological Chemistry*, 271, 14591-14595 (1996).
- [82] Truong, A. B., Masters, S. C., Yang, H., Fu, H.: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 49, 321-325 (2002).
- [83] Dubois, T., Rommel, Ch., Howel, S., Steinhussen, U., Soneji, Y., Morice, N., Moelling, K., Aitken, A.: *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28882-28888 (1997).
- [84] Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 4531-4540 (2004).
- [85] Silhan, J., Obsilova, V., Vecera, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49113-49119 (2004).
- [86] Testernik, Ch., van Zeijl, M. J., Drumm, K., Palmgren, M. G., Colline, D. B., Kijne, J. W., Wang, M.: *Plant Molecular Biology*, 50, 535-542 (2002).
- [87] Clark, K. L., Oelke, A., Johnson, M. E., Eilert, K. D., Simpson, P. C., Todd, S. C.: *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19401-19406 (2004).
- [88] Würtele, M., Jelich-Ottmann, Ch., Wittinghofer, A., Oeckin, C.: *EMBO Journal*, 22, 987-884 (2003).
- [89] Bridges, D., Moorhead, G. B.: *Science STKE 2005*, re10 (2005).
- [90] Bachmann, M., Huber, J. L., Liao, P. C., Gage, D. A., Huber, S.C.: *FEBS Letters*, 387, 127-131 (1996).
- [91] Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E., Yaffe, M. B.: *Journal of Biological Chemistry*, 156, 817-828 (2002).

- [92] Van der Hoeven, P. C. J., van der Wal, J. C. M., Ruurs, P., van Dijk, M. C. M., van Blitterswijk, W.J.: *Biochemical Journal*, **345**, 297-306 (2000).
- [93] Athwall, G. S., Huber, J. L., Huber, S. C.: *Plant Physiology*, **118**, 1041-1048 (1998).
- [94] Bridges, D., Moorhead, G. B.: *Science STKE 2004*, **242**, re10 (2004).
- [95] Aitken, A.: *Seminars in Cancer Biology*, **16**, 162-172 (2006).
- [96] Mackintosh, C.: *Biochemical Journal*, **381** (pt2), 329-342 (2004).
- [97] Wilker, E., Yaffe, M. B.: *Journal of Molecular and Cellular Kardiology*, **37**, 633-642 (2004).
- [98] Powel, D. W., Rane, M. J., Joughin, B. A., Kalmukova, R., Hong, J.-H., Tidor, B., Dean, W. L., Pierce, W. M., Klein, J. B., Yaffe, M. B., McLeish, K. R.: *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 5376-5387 (2003).
- [99] Woodcock, J. M., Murphy, J., Stomski, F. C., Berndt, M. C., Polez, A. F.: *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36323-36327 (2003).
- [100] Aitken, A., Baxter, H., Dubois, T., Clokie, S., Mackie, S., Mitchell, K., Peden, A., Zemlickova, E.: *Biochemical Society Transactions*, **4**, 351-360 (2002).
- [101] Dumaz, N., Marais, R.: *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 29819-29823 (2003).
- [102] Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Seisuke, H., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y.: *EMBO Journal*, **23**, 1889-1899 (2004)
- [103] Káš, J.; Kodíček, M.; Valentová, O.: *Laboratorní cvičení z biochemie*, Olomouc, Olomouc, 2000.
- [104] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava, 2003.
- [105] Cantor, C. R., Schimmel, P. R.: *Biophysical Chemistry.*, W.H. Freeman and company, San Francisco, USA, 1980.
- [106] Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy (Third Edition)*, Springer, Singapore, 2006.
- [107] Fišar, Z.: *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*, 1. LF UK, publikováno na internetu (<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>), 2003.
- [108] Řežábková, L.: *Vliv vazby 14-3-3 proteinu na strukturu RGS domény proteinu RGS3*, Diplomová práce, str. 37 - 38, PřF UK, Praha, 2010.

