

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Biochemie a patobiochemie



**Mgr. Eva Macáková**

Úloha Bmh proteinů v regulaci kvasničného enzymu neutrální trehalasy Nth1

The Role of Bmh Proteins in the Regulation of Yeast Enzyme Neutral  
Trehalase Nth1

Disertační práce

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

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 17.9.2013

EVA MACÁKOVÁ

Podpis

**Identifikační záznam:**

MACÁKOVÁ, Eva. *Úloha Bmh proteinů v regulaci kvasničného enzymu neutrální trehalasy Nth1. [The Role of Bmh Proteins in the Regulation of Yeast Enzyme Nth1]*. Praha, 2013. 126, 2 přílohy. Disertační práce (Ph.D.) Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. Vedoucí práce Obšilová, Veronika.

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D., za vedení, trpělivost, cenné rady a pomoc poskytnutou ohledně mé práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Ráda bych také poděkovala RNDr. Petrovi Manovi, Ph.D., za spolupráci a pomoc.

Děkuji rodině a Petrovi za podporu a pochopení.

Tato práce vznikla na oddělení Proteinových struktur Fyziologický ústav, Akademie Věd České Republiky, v.v.i. Práce je založena na následujících článcích, jejichž přiložené kopie jsou přiložené v příloze:

VEISOVA, D., **MACAKOVA, E.**, REZABKOVA, L., SULC, M., VACHA, P., SYCHROVA, H., OBSIL, T., OBSILOVA, V. (2012) Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochem. J.* **443**(3), 663-670. (IF<sup>2012</sup> = 4.654)

**MACAKOVA, E.**, KOPECKA M, KUKACKA Z, VEISOVA D, NOVAK P, MAN P, OBSIL T, OBSILOVA V (2013) Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1830**(10):4491-4499. (IF<sup>2012</sup> = 3.848)

**Tato disertační práce byla realizována díky finanční podpoře:**

Grantové agentury České republiky GAČR P207/11/0455

Doktorskému grantu GAČR GD305/08/H037

Centru základního výzkumu MŠMT LC554

## Obsah

Seznam zkratek .....	1
1. Úvod.....	4
2. Literární přehled.....	5
2.1. Trehalosa .....	5
2.1.1. Trehalosa a její funkce v kvasinkách a dalších organismech.....	6
2.1.2 Syntéza trehalosy v bakteriích a houbách .....	10
2.1.3 Metabolismus trehalosy v kvasinkách .....	11
2.1.4 Enzymy hydrolyzující trehalosu .....	13
2.2 Charakterizace kvasničných trehalas .....	14
2.2.1 Lokalizace kyselých trehalas a neutrálních trehalas .....	14
2.2.2 Kyselá trehalasa .....	15
2.2.3 Neutrální trehalasa 1 .....	16
2.2.4 Neutrální trehalasa 2 .....	19
2.2.5 Fosforylace Nth1 a Nth2 .....	20
2.2.6 Trehalasy v dalších organismech .....	20
2.3 Trehalasy a jejich úloha ve stresových podmínkách.....	21
2.3.1 Trehalasy a jejich regulace v závislosti dostupnosti živin (katabolická represe).....	22
2.4 Biologická funkce trehalas.....	23
2.4.1 Úloha v hydrolýze trehalosy .....	24
2.4.2 Úloha v odpovědi na stres.....	24
2.5 Biotechnologické funkce trehalosy a trehalas.....	25
2.6 Způsob aktivace Nth1 a Nth2.....	26
2.6.1 Fosforylace.....	26
2.6.2 Nth1, Nth2 a proteiny 14-3-3.....	27
2.7 Proteiny 14-3-3 .....	29

2.7.1	Funkce proteinů 14-3-3.....	29
2.7.2	Regulace proteinů 14-3-3.....	33
2.7.3	Struktura proteinů 14-3-3.....	34
2.7.4	Isoformy proteinů 14-3-3.....	37
2.7.5	Proteiny 14-3-3 a jejich vliv na lidské zdraví.....	39
3.	Cíle práce.....	41
4.	Použitý materiál.....	42
4.1	Chemikálie.....	42
4.2	Materiál.....	43
4.3	Přístroje.....	44
5.	Metody.....	46
5.1	Klonování DNA.....	46
5.1.1	Klonování BMH1 a BMH2 do vektoru pET-15b.....	46
5.1.2	Klonování NTH1 do vektoru pET-32b.....	46
5.2	Cílená mutagenese Nth1.....	48
5.2.1	PCR.....	49
5.2.2	Odstranění templátové DNA.....	51
5.2.3	TBE agarosová elektroforesa.....	51
5.2.4	Transformace DNA do kompetentních buněk pomocí teplotního šoku.....	52
5.2.5	Izolace plasmidové DNA.....	53
5.2.6	Transformace DNA do expresních kmenů <i>Escherichia coli</i> .....	54
5.2.7	Pěstování buněk a glycerolový roztok bakteriální kultury.....	55
5.2.8	Exprese a purifikace rekombinantních proteinů Bmh1.....	55
5.2.9	Exprese a purifikace rekombinantního proteinu Nth1 WT a jeho mutantů.....	62
5.2.10	Fosforylace Nth1.....	65
5.2.11	Hmotnostně spektrometrická analýza Nth1.....	66

5.2.12	Analytická centrifugace (AUC) .....	66
5.2.13	Limitovaná proteolýza .....	67
5.2.14	Měření enzymové aktivity <i>in vitro</i> .....	67
5.2.15	Církulární dichroismus (CD spektroskopie).....	68
5.2.16	Modelování molekul .....	69
5.2.17	Vodíko-deuteriová (H/D) výměna spojená s hmotnostní spektrometrií 70	
5.2.18	Chemické zesíťování spojené s hmotnostní spektrometrií .....	73
6.	Výsledky .....	76
6.1	Expese a purifikace proteinu Bmh1 a Bmh2 WT .....	76
6.2	Expese a purifikace proteinu Nth1 WT a jeho mutantů .....	78
6.3	Fosforylace Nth1 a analýza fosforylačních míst pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	81
6.4	Význam fosforylace při aktivaci Nth1 proteiny 14-3-3 .....	83
6.5	Analytická ultracentrifugace (AUC) a 12 % TBE-PAGE .....	84
6.6	Bmh1 a Bmh2 zvyšují enzymatickou aktivitu pNth1 <i>in vitro</i> .....	88
6.7	Limitovaná proteolýza - proteiny 14-3-3 interagují s N-terminální oblastí pNth1 .....	91
6.8	Význam jednotlivých fosforylačních míst Nth1 při interakci s proteiny Bmh .....	93
6.9	Příprava a charakterizace komplexu Nth1:Bmh1 pro vodíko-deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií.....	95
6.10	Studium strukturních změn pNth1:Bmh1 vodíko-deuteriovou výměnou spojenou s hmotnostní spektrometrií.....	97
6.11	Strukturní změny na Nth1 .....	100
6.12	Strukturní změny na Bmh1 .....	105
6.13	Církulární dichroismus.....	109
7.	Diskuse.....	111



8. Závěr .....	115
9. Souhrn .....	116
10. Summary .....	118
11. Seznam citované literatury .....	120
12. Přílohy .....	126

*Příloha 1: Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1.*

*Příloha 2: Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1*

# Seznam zkratek

AANAT	serotonin N-acetyltransferasa (z angl. arylalkylamine N-acetyltransferase)
ASK1	kinasa (z angl. Apoptosis signal-regulating kinase 1)
Ath1	kyselá trehalasa 1
ATP	adenosin trifosfát
AUC	analytická ultracentrifugace
BAD	protein „Bcl-2-associated death promoter
Bcr	protein s kinasovou aktivitou (z angl. breakpoint cluster region)
Bmh1, Bmh2	kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 (z angl. Brain modulosignaling homologue)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CD	cirkulární dichroismus
Dcs1	kvasničná hydrolasa
DEAE	diethylaminoethyl
DMSO	dimethyl sulfoxid
DSG	disukcinimidyl glutarát
DSS	disukcinimidyl suberát
DTT	1,4-dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina (z angl. ethyldiamintetraacetic acid)
FOXO	forkhead transkripční faktor
H/D	vodíko-deuteriová výměna

HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
Irs-1	insulinový receptorový substrát
LB	Luria Bertani médium
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s použitím ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) a detektorem doby letu (TOF)
Nth1, Nth2	neutrální trehalasa 1, neutrální trehalasa 2
PBS	fosfátový pufr se solí
PCR	polymerázová řetězová reakce
pET-15b, pET-32b	označení vektorů
PKA	cAMP-dependentní protein kinasa A
PKB (Akt)	proteinkinasa B
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid (inhibitor serinových proteas)
pNth1	fosforylovaná neutrální trehalasa 1
R18	krátký peptid, který se váže k proteinům 14-3-3
Raf	homolog myšního virového onkogenu leukémie v-raf-1
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolution per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	vertikální akrylamidová elektroforesa v redukujícím prostředí dodecylsírane sodného
TATA box	sedminukleotidová sekvence v promotoru eukaryotických buněk
TBE	pufr obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TreA	neutrální trehalasa z <i>Escherichia coli</i>

Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TPS	trehalosa-6-fosfát synthasa
TPP	trehalosa-6-fosfát fosfatasa
UDP	uridin difosfát
WT	nativní forma rekombinantního proteinu (z angl. wild type)
YEp24	kvasničný plasmid

# 1. Úvod

Hlavním tématem této práce bylo objasnění aktivace enzymu neutrální trehalasy 1 (dále Nth1) kvasničnými isoformami proteinů 14-3-3, Bmh1 a Bmh2. Enzym Nth1 patří do třídy hydrolas (EC3), podtřídy glykosidas a v kvasinkách slouží ke štěpení disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Trehalosa je stresový metabolit a slouží také jako zásobárna uhlíku, takže Nth1 hraje mimo jiné roli ve vypořádání se s buněčným stresem.

Proteiny 14-3-3 jsou významné regulační proteiny, které se účastní celé řady buněčných dějů, jako je kontrola buněčného cyklu, buněčný metabolismus, transkripce či apoptosa. Mají velké množství vazebných partnerů, mezi které patří i enzymy. Pro aktivaci Nth1 je nezbytná fosforylace několika míst v rámci N-terminálního segmentu prostřednictvím PKA a následná aktivace pomocí Bmh1 a Bmh2. Právě tato interakce byla předmětem našeho výzkumu.

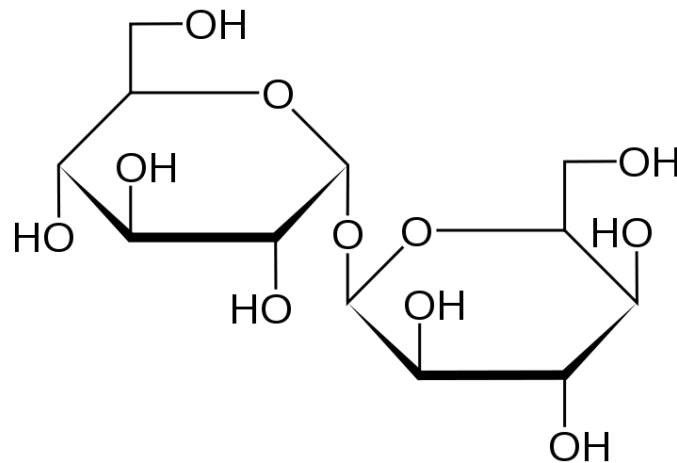
Metody mutagenese, analytické ultracentrifugace a měření enzymové kinetiky byly použity k určení konkrétních fosforylačních míst, zodpovědných za interakci mezi Nth1 a proteiny Bmh. Limitovaná proteolýza a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pak byly použity k upřesnění, která konkrétní část Nth1 se vazby účastní.

Biofyzikální metody CD spektroskopie, vodíko-deuteriová (H/D) výměna a chemické zesíťování spojené s hmotnostní spektrometrií byly použity na objasnění strukturního pozadí a konformačních změn proteinů při vytvoření komplexu. Na základě naměřených dat byly vytvořeny homologní modely proteinů s vyznačenými strukturními změnami, ke kterým při interakci Nth1:Bmh dochází.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Trehalosa

Trehalosa ( $\alpha$ -D-glukopyranosyl(1-1)- $\alpha$ -D-glukopyranosid) je neredukující disacharid tvořený dvěma molekulami glukosy (viz **obr. 2.1**), který byl poprvé objeven v námelu žita, v roce 1832 Wiggersem (*Wiggers, H.A.L., 1832*). Francouzský chemik Berthelot našel tento sacharid v trehale (pouštní mana z Malé Asie, produkována brouky z čeledi nosatcovitých *Larinus nidificans*) a pojmenoval ho trehalosa (*Berthelot, M., 1858*). V kvasničných buňkách byla přítomnost trehalosy poprvé prokázána Kochem a Kochem (*Koch, E.M., Koch, F.C., 1925*) a Tarnetem (*Tanret, M.G., 1932*). Trehalosa je v přírodě rozšířena ve velkém množství organismů, jako jsou například bakterie, houby, kvasinky, hmyz a další bezobratlí (*Elbein, A.D., 1974*). Konkrétní funkce trehalosy v těchto organismech stále není jasná. Předpokládá se, že slouží jako důležitý zásobní zdroj uhlíku u bakterií a hub, zatímco u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* má pravděpodobně také funkci stresového metabolitu, protože koncentrace trehalosy vzrůstá v případě vystavení organismu environmentálnímu nebo fyziologickému stresu (například tepelnému) (*Wiemken, A., 1990*) (*Van Laere, A., 1989*).



**Obr. 2.1:**  $\alpha,\alpha$ -Trehalosa - 1- $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranosid.

## 2.1.1. Trehalosa a její funkce v kvasinkách a dalších organismech

*Saccharomyces cerevisiae* jsou schopny syntetizovat a degradovat trehalosu v závislosti na podmínkách v okolním prostředí a stadiu životního cyklu. Buňka v suchém stavu může obsahovat méně než 1 % až více než 23 % trehalosy (Lillie, S.H., Pringle, J.R., 1980) (Küenzi, M.T., Fiechter, A., 1969) (Küenzi, M.T., Fiechter, A., 1972). Tato variabilita v množství a akumulaci naznačuje, že trehalosa hraje důležitou roli v životním cyklu kvasinek. Z dřívějších výzkumů vyplývá, že obsah trehalosy v buňkách koreluje s fyziologickou aktivitou a stupněm vývoje buněk a také, že tento disacharid plní funkci zásobárny uhlíku a energie v období hladovění (Chester, V.E., 1963) (Panek, A., 1962). Obsah trehalosy v buňkách ovlivňuje také období respirační adaptace (Panek, A.D., Matton, J.R., 1977), klíčení (Kane, S.M., Roth, R., 1974), přechod do vegetativního ze stacionárního stavu (Panek, A., 1963) a přecházení mitotického buněčného cyklu z důvodu nutričních nedostatků (Küenzi, M.T., Fiechter, A., 1972). Akumulace trehalosy je tedy obecnou reakcí kvasinek na období nedostatku, tedy chybí-li glukosa, dusík, síra, fosfor apod. (Lillie, S.H., Pringle, J.R., 1980), podobně, jako glykogen. Jak glykogen, tak trehalosa, jsou díky různým způsobům akumulace a následného využití důležité pro ekonomii buňky.

### 2.1.1.1 Akumulace trehalosy v buňkách

Kvasničné buňky, které rostou na médiu bohatém na zdroje uhlíku, tzn. na glukose, fruktose a galaktose, mají velice nízkou koncentraci trehalosy. Když tyto buňky vyčerpají zdroj uhlíku a postoupí do respirační fáze růstu, akumulace trehalosy začne vzrůstat, dokud nedosáhne stacionární fáze (kdy živiny dosáhnou limitní koncentrace) (Kienle, I., et al., 1993). Největší nárůst koncentrace trehalosy nastává po spotřebování veškeré glukosy. To může být způsobeno inhibicí enzymu trehalosa-6-fosfát synthasy glukosou, který se začne syntetizovat po spotřebování glukosy a je pravděpodobně odpovědný za nárůst koncentrace trehalosy po skončení exponenciálního růstu buněk a jejich přechodu do klidové fáze (Francois, J., et al., 1991).

Oproti tomu buňky, které rostou na médiích chudých na uhlík (glycerol, ethanol), vykazují vysoké hodnoty koncentrace trehalosy v období exponenciálního i stacionárního

růstu buněk (*Van Dijck, P., et al., 1995*) (*Elliott, B., Futcher, B., 1993*). Nutriční stres tedy podporuje akumulaci trehalosy v buňkách.

### 2.1.1.2 Funkce trehalosy

Jak již bylo řečeno dříve, trehalosa slouží buňkám jako zdroj energie a uhlíku. Obsah trehalosy v buňkách se liší v závislosti na stádiu vývoje, dostupnosti živin a podmínkách okolního prostředí. Hmyzu slouží trehalosa jako hlavní zdroj cukrů v hemolymfě a thoraxových svalech a spotřebovává se v průběhu letu (*Becker, A., et al., 1996*). Důležitou roli hraje trehalosa také v houbách, kde je její hydrolýza hlavním zdrojem energie v průběhu klíčení (*Thevelein, J.M., 1984*).

#### *Ochrana před dehydratací:*

Přestože je voda pro život nezbytná, některé organismy jsou schopny přežít téměř kompletní dehydrataci (například rostliny, kvasinky, spory hub, nematoda, rotifery ad.) Některé organismy mohou v tomto stavu, nazývaném anhydrobiosa, přežít až desítky let. Anhydrobiosa je stav, způsobený nedostatkem vody, kdy se buňka po vysušení dostane do vegetativního stavu, ve kterém může přežít desítky let, kdy nedochází k příjmu potravy, rozmnožování a opravám. Buňka se vrátí zpět do původního stavu po dodání vody. Trehalosa stabilizuje buněčnou membránu a pomáhá chránit buňky před vysušením (*Crowe, J.H., et al., 1984*). Tímto způsobem byly usušeny a skladovány na trehalose restriční enzymy, které dokonce ani po vystavení vysoké teplotě neztratily svou aktivitu. Trehalosa se také používá k uchovávání sušených potravin nebo protilátek na určování krevních skupin (*Colaco, C., et al., 1992*) (*Blakeley, D., et al., 1990*) (*Hottiger, T., et al., 1994*). Přesný molekulární mechanismus působení trehalosy při anhydrobiose není stále plně objasněn.

Anhydrobiotické organismy obecně obsahují velké množství trehalosy, někdy až 20 % sušiny a schopnost jejich přežití je závislá na schopnosti syntézy trehalosy. Jedná se pravděpodobně o velice dávnou adaptaci, neboť i u *Archaeobacterie* byla objevena schopnost akumulovat trehalosu jako odpověď na stres (*Nicolaus, B., et al., 1988*). Schopnost kvasinek přežít dehydrataci je nezávislá na fázi růstu, pouze na množství trehalosy v buňkách (*Hottiger, T., et al., 1987*).



### *Ochrana buněčné membrány:*

Dehydratace poškozuje lipidové dvojvrstvy membrán. Trehalosa a další cukry inhibují vysychání a fúzi váčků při procesu vysychání a dále trehalosa snižuje teplotu fázového přechodu lipidů, kdy lipidy za nepřítomnosti vody udržuje v tekuté krystalické formě. Tento ochranný efekt trehalosy je přisuzován její struktuře a stereochemii, které způsobují, že trehalosa dobře interaguje s polárními hlavičkami fosfolipidů (Crowe, J.H., et al., 1992).

### *Ochrana proteinů:*

Trehalosa také ochraňuje proteiny při procesu sušení, disacharidy obecně jsou schopny stabilizovat oligomerní struktury proteinů před disociací. Trehalosa, stejně jako v případě membrán, pravděpodobně interaguje přímo s proteiny vytvářením vodíkových můstků mezi hydroxylovými a polárními zbytky, což způsobí stabilizaci díky tomu, že je trehalosa neredukující disacharid. (Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1989).

### *Ochrana rostlin:*

U několika rostlinných i živočišných druhů byla při sušení také objevena zvýšená koncentrace intracelulární trehalosy. Byl vypěstován i transgenní tabák, do kterého byl vpraven gen *otsA* a *otsB* z *E. coli* na trehalosovou syntézu, což mělo efekt na morfologii rostliny a její růst v extrémně suchých podmínkách, kde měly transgenní rostliny výrazně zlepšený růst. To samé se ukázalo i u lidských fibroblastů, které jsou na sucho velmi citlivé, a po přidání genů *otsA* a *otsB* vydržely bez vody pět dní (Guo, N., et al., 2000).

### *Ochrana před stresem:*

Trehalosa funguje v kvasničných buňkách jako stresový metabolit, což bylo zjištěno *in vitro* a na základě závislosti obsahu trehalosy a stresové odpovědi i *in vivo* (Van Laere, A., 1989) (Wiemken, A., 1990). Vystavení buněk rostoucích na glukosovém médiu tepelnému stresu (39 °C) na 60 minut vyvolá rapidní nárůst koncentrace trehalosy z 0,1 mM až na 12 mM (Kienle, I., et al., 1993), podobný trend se prokázali i další autoři při vystavení jiným teplotám (37-45 °C) v různých časech (Nwaka, S., et al., 1994) (Hottiger, T., et al., 1987) (Attfield, P.V., 1987) (Winkler, K., et al., 1991). Na druhou stranu se také prokázalo, že teplotně závislý vzrůst koncentrace trehalosy je reverzibilní, takže pokud se

teplota sníží opět na 30 °C dojde do jedné hodiny k poklesu koncentrace trehalosy zpátky k velmi nízkým hodnotám.

V průběhu tepelného šoku se začnou syntetizovat podjednotky trehalosa-6-P synthasového komplexu. Trehalosa také redukuje teplem indukovanou tvorbu proteinových agregátů, v čemž je účinnější než jiné sloučeniny (*De Virgilio, C., et al., 1993*). Mnoho studií na toto téma ukázalo, že trehalosa hraje podstatnou roli v termotoleranci a že enzymy, syntetizující trehalosu, jsou indukovány působením tepelného stresu. Mimo jiné při vytvoření mutantů, neobsahujících geny TPS a TPP, nutné pro trehalosový metabolismus, nebyly tyto mutanty schopny akumulovat trehalosu ani při mírném tepelném šoku.

Trehalosa plní funkci protektantu při 37-45 °C, kdy pomáhá buňkám dočasně překonat stresový stav, dokud se nenasyntetizují „heat shock“ proteiny (*Winkler, K., et al., 1991*). „Heat shock“ proteiny a další faktory poté pomohou buňce překonat nebezpečný stav, pokud je vystavena kritické teplotě 50 °C. Kromě stresu vyvolaného změnou teploty reagují buňky zvýšením koncentrace trehalosy i na stres způsobený dehydratací, tlakem, chemikáliemi a dalšími (*Hottiger, T., et al., 1987*) (*Attfield, P.V., 1987*) (*Fujita, K., et al., 1995*), což vedlo k názoru, že hlavní funkcí trehalosy není uchovávání uhlíku, ale stresový protektant před nejrůznějšími vnějšími podmínkami (*Van Laere, A., 1989*) (*Wiemken, A., 1990*).

#### *Ochrana před poškozením kyslíkovými radikály:*

V případě zvýšení koncentrace trehalosy při tepelném či jiném šoku způsobí také zvýšení resistance vůči volným radikálům. Pokud se ovšem buňky vrátí zpět do stavu za normální teploty, obsah trehalosy a tedy i tato resistance se rapidně sníží. Vysoký obsah trehalosy v buňkách zabraňuje radikálům v poškozování aminokyselin v intracelulárních proteinech, v případě trehalosa-defektního mutantu bylo poškozeno mnohem více proteinů po krátkém vystavení radikálovému stresu než u wild typu. Trehalosa tedy slouží jako „vyčytávač“ kyslíkových radikálů, a to lépe než další sacharidy jako například mannitol nebo sacharosa (*Elbein, A.D., et al., 2003*).

#### *Ochrana před chladem:*

Trehalosa se také podílí na ochraně buněk před chladem. Protože mnoho proteinů denaturuje a precipituje v chladném prostředí, kde jsou hydrofobní síly relativně slabé,

intracelulární trehalosa pravděpodobně ochraňuje tyto proteiny podobně, jako v případě tepelného stresu. Exogenní trehalosa pak ochraňuje mnoho organismů před umrznutím, obzvláště pokud se vyskytuje na obou stranách buněčné membrány (Elbein, A.D., et al., 2003).

#### *Trehalosa jako regulátor růstu:*

Tabákové rostliny, do kterých byly transformovány geny pro syntézu trehalosy mají sice zvýšenou odolnost proti vysušení, ale exprese těchto mikrobiologických genů způsobuje také některé růstové poruchy, jako je nanismus nebo poškození vývoje kořenového systému. To vedlo k teorii, že trehalosa a její metabolismus fungují také jako regulátory růstu a vývoje rostlin. Defekty růstu byly pozorovány i u rýže s transformovanými geny, přestože tato rostlina neakumuluje velké množství trehalosy. Důvod stále ještě není zcela jasný, ale může to být způsobeno toxicitou trehalosy pro rostliny (i v minimálním množství), nebo může metabolismus trehalosy působit jako matoucí signál pro asimilaci cukrů (Vogel, G., et al., 1998).

#### *Součást buněčné membrány bakterií:*

Trehalosa se vyskytuje v buněčné membráně mnoha bakterií jako součást glykolipidů (Lederer, E., 1976), například v *M. tuberculosis* je přítomna jako trehalosadimykolát, ale vytváří i mnoho dalších glykolipidů.

## **2.1.2 Syntéza trehalosy v bakteriích a houbách**

Nejrozšířenějším způsobem syntézy trehalosy je TPS/TPP dráha v kvasinkách. V některých bakteriích se však vyskytují i další způsoby syntézy trehalosy. Jedná se například o trehalosa-synthasu z *Pimelobacter sp.*, která syntetizuje intramolekulární přeměnu maltosy z  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,4-glykosidické vazby tohoto disacharidu na trehalosu ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-glykosidickou vazbu). Další alternativní způsob syntézy trehalosy v některých bakteriích zahrnuje konverzi malto-oligosacharidů nebo škrobu na trehalosu. Maltooligosyltrehalosa synthasa (TreY) katalyzuje přeměnu maltodextrinu na maltooligosyltrehalosu, která je poté hydrolyzována na trehalosu pomocí maltooligosyltrehalosa trehalohydrolasy (TreZ) (Maruta, K., et al., 1996). Tento způsob byl pozorován u mnoha druhů bakterií. Zajímavé je, že *E. coli* dokáže růst na trehalose jako na jediném zdroji uhlíku. Při vystavení vysoké

osmolaritě buňky syntetizují velké množství trehalosy (jako osmoprotektant), a jak při vysoké, tak při nízké osmolaritě dokáží degradovat trehalosu jako jediný zdroj uhlíku.

V houbách byl objeven enzym trehalosová fosforylasa. Katalyzuje reverzní reakci, při které hydrolyzuje trehalosu za přítomnosti anorganického fosfátu, takže vzniká glukosa-1-fosfát a jedna volná glukosa (nebo reakci opačnou) (Wannet, W.J., et al., 1998). pH optimum tohoto enzymu je 6,0 až 7,0 a reverzibilní charakter této reakce naznačuje, že enzym závisí na koncentraci reaktantů a produktů, tedy podle potřeby syntézy buď trehalosy nebo volné glukosy a glukosa-1-fosfátu.

### **2.1.3 Metabolismus trehalosy v kvasinkách**

#### **2.1.3.1 Biosyntéza trehalosy**

Biosyntéza trehalosy je katalyzována trehalosa-6-fosfát synthasou a trehalosa-6-fosfát fosfatasou, které dohromady tvoří tzv. trehalosový synthasový komplex, který využívá UDP-glukosu a glukosa-6-fosfatasu jako substrát (TPS komplex) (viz **obr. 2.2**). Součástí tohoto komplexu jsou enzymy TPS1, TPS2 a TPS3, o velikosti 123, 102 a 56 kDa (Londesborough, J., Vuorio, O.E., 1991) (Londesborough, J., Vuorio, O.E., 1993). Delece genu TPS1 (také nazýván CIF1, GGS1 a TSS1), který kóduje 56 kDa polypeptid, vede k neschopnosti buněk syntetizovat trehalosu a zabraňuje růstu na glukosovém médiu, což naznačuje, že tento gen může sloužit jako senzor pro příjem glukosy buňkou. Delece genu TPS2, kódujícího 102 kDa polypeptid eliminuje aktivitu trehalosa-6-fosfatasy (De Virgilio, C. et al., 1993), zatímco gen TPS3 (TSL1), který kóduje 123 kDa polypeptid pravděpodobně reguluje aktivitu trehalosa-6-fosfát synthasy (Vuorio, O.E., et al., 1993).

#### **2.1.3.2 Hydrolýza trehalosy**

Hydrolýza trehalosy je katalyzována trehalasami (E.C.3.2.1.28). První trehalasa byla popsána v roce 1895 Fischerem (Fischer, E., 1895). V roce 1982 bylo demonstrováno Wiemkenem, že fosforylovatelná trehalasa se nachází v cytosolu, zatímco druhá, permanentně aktivní trehalasa byla objevena ve vakuolách (Keller, F., et al., 1982). Později byly určeny pH-optima pro tyto dva enzymy: fosforylovatelný enzym z cytosolu měl maximální aktivitu při pH 7 a byl tedy pojmenován „neutrální trehalasa“, zatímco

enzymu z vakuoly bylo naměřeno při maximální aktivitě pH 4,5 a byl pojmenován „kyselá trehalasa“. Dále se ukázalo, že neutrální trehalasa je aktivována také cAMP, ATP a  $Mg^{2+}$  (Londesborough, J., Varimo, K., 1984). Neutrální trehalasa byla izolována a zčásti charakterizována (App, H., Holzer, H., 1989) a její gen (NTH1 gen) byl naklonován a osekvenován (Kopp, M., et al., 1993) (Kopp, M., et al., 1994). Lokalizace fosforylovatelné trehalasy (Nth1) v cytosolu ukázala, že je trehalosa součástí cytoplasmy a toto zjištění poté vedlo k hypotézám ohledně trehalosy jako ochranného metabolitu (Wiemken, A., 1990) (Keller, F., et al., 1982). Kyselá trehalasa byla také izolována a částečně charakterizována (Mittenbühler, K., Holzer, H., 1988). Při pokusech naklonovat její gen (ATH1 gen) byl objeven gen YGP1, jehož produkt gp37 je vysoce glykosylovaný, ale neprojevuje trehalosu-hydrolyzující aktivitu (Destruelle, M., et al., 1994). Zároveň byl však izolován gen ATH1, jehož delece vede ke ztrátě trehalosové aktivity (Destruelle, M., et al., 1995).

Dále byl popsán také gen NTH2 (Wolfe, K.H., Lohan, A.J., 1994). Byl popsán jako trehalosový gen kvůli veliké homologii s genem NTH1 a homologii s dalšími trehalosovými sekvencemi z nejrůznějších prokaryot i eukaryot. Každopádně, role NTH2 v metabolismu trehalosy stále nebyla zcela objasněna.

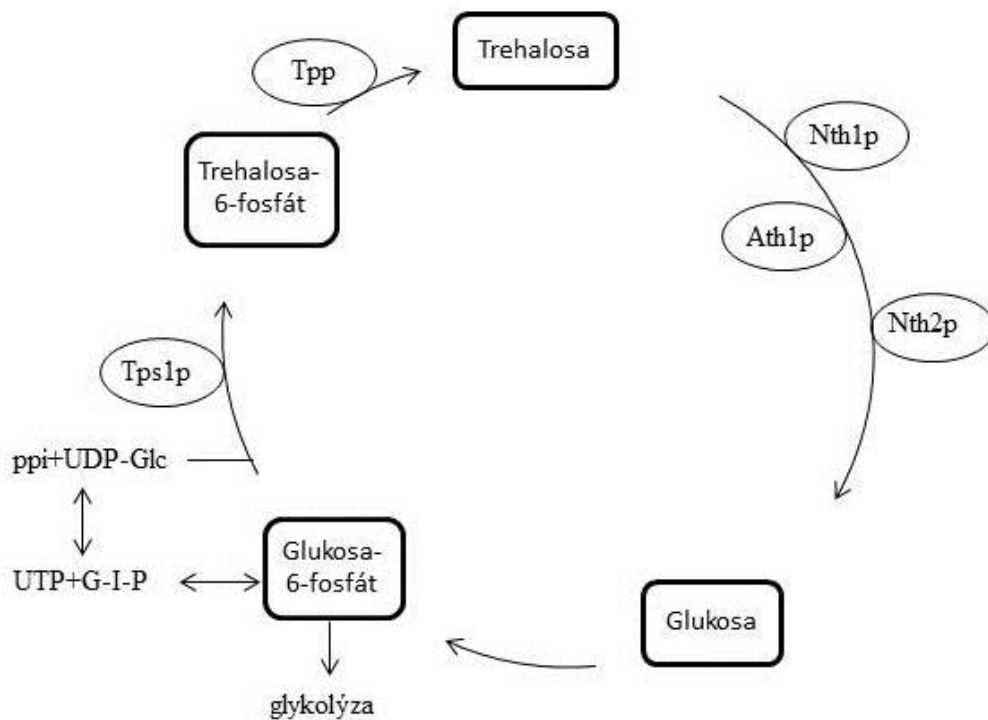
Jak již bylo uvedeno výše, hydrolyza trehalosy je důležitý faktor u mnoha buněčných procesů v houbách (Thevelein, J.M., 1984). U kvasinek *S. cerevisiae* se hydrolyza trehalosy zdá být podstatnou součástí při klíčení a růstu na ethanolu a dalších nefermentujících uhlíkových zdrojích (Souza, N.O., Panek, A.D., 1968)

### ***2.1.3.3 Metabolismus trehalosy a glykolýza***

Kvasinky na rozdíl od jiných organismů využívají k biosyntéze trehalosy enzymu trehalosa-6-fosfát synthasový (TPS). Důvod není zcela jasný, ale může se jednat jednak o regulaci funkce trehalosového metabolismu a/nebo interakci mezi trehalosovým metabolismem a glykolýzou a kvašením (Noubhani, A., et al., 2000). Byly formulovány tři následující hypotézy: 1. TPS syntetizuje fosforylovanou trehalosu, kromě toho však brání přístupu glukosy svou interakcí s transportem glukosy a aktivitou cukerných kinas (Thevelein, J.M., 1991). 2. Metabolismus trehalosy zabraňuje nadbytečné glykolýze pomocí vychytávání a využívání cukerných fosforylovaných zbytků v syntéze trehalosy a touto cestou vznikají anorganické fosfáty, které jsou potřeba pro glycerinaldehyd-3-fosfát

dehydrogenasovou aktivitu v glykolýze (Hohmann, S., et al., 1993). 3. Fosforylovaná trehalosa může zastavit přísun cukrů do procesu glykolýzy inhibicí hexokinase aktivity.

Mechanismus syntézy trehalosy je následující: UDP-glukosa se transformuje na glukosa-6-fosfát díky enzymu trehalosa-6-fosfát syntasa (TPS). Z glukosa-6-fosfátu vzniká trehalosa-6-fosfát, která je přeměněna na trehalosu trehalosa-6-fosfát fosfatasou (TPP), odtud označení této dráhy v kvasinkách TPS/TPP. Trehalosa je v případě potřeby hydrolyzována na glukosu pomocí trehalas (viz obr. 2.2).



**Obr. 2.2:** Schéma metabolismu trehalosy v *S. cerevisiae*. Pomocí enzymů *Tps* a *Tpp* vzniká z glukosy trehalosa. Ta je hydrolyzována na dvě molekuly glukosy trehalasami *Nth1p*, *Nth2p* a *Ath1p*. Schéma převzato z (Nwaka, S., Holzer, H., 1998).

### 2.1.4 Enzymy hydrolyzující trehalosu

První enzym hydrolyzující trehalosu byl objeven Bourquelotem (Bourquelot, M.E.M., 1893) v *Aspergillus niger* a poté v *Saccharomyces cerevisiae* Fisherem (Fischer,

E., 1895). Od té doby byla trehalasa ( $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose-1-D-glucohydrolase, E.C.3.2.1.28) objevena v mnoha dalších organismech v rostlinné i živočišné říši (Elbein, A.D., 1974).

U savců je konkrétní funkce trehalasy nejasná. U některých savců se trehalasa vyskytuje ve střevech, kde je pravděpodobně zodpovědná za hydrolýzu trehalosy přijaté potravou, neboť u pacientů s deficitem střevní trehalasy byla popsána přítomnost průjmů po pozření hub, obsahujících trehalosu (Ruf, J., et al., 1990) (Bergoz, R., 1971) (Madzarovova-Nohejlova, J., 1973).

V kvasinkách, konkrétně u *Saccharomyces cerevisiae*, byly popsány tři druhy trehalas, avšak konkrétní role těchto enzymů při hydrolýze trehalosy v buňkách, stejně jako jejich regulace, není stále plně prozkoumána. Každopádně, hydrolýza trehalosy je považována za důležitý biochemický proces v životních funkcích kvasinek, při klíčení hub a při regulaci růstu u odpočívajících buněk (Thevelein, J.M., 1984).

## **2. 2 Charakterizace kvasničných trehalas**

### **2.2.1 Lokalizace kyselé trehalasy a neutrálních trehalas**

Rozčlenění trehalas a jejich substrátu trehalosy v kvasničných buňkách bylo objasněno pomocí objevu, že v hladovějících buňkách, které obsahují velké množství trehalosy (viz kap. 2.1) se také vyskytuje vysoká trehalasová aktivita (Myrback, K., Ortenblad, B., 1937) (Avigad, G., et al., 1965). Po rozbití a centrifugaci protoplastů se ukázalo, že zatímco trehalasa se nachází v rozpustné frakci, trehalosa zůstává v sedimentu, tedy v protoplastech (Souza, N.O., Panek, A.D., 1968). Trehalosa je tedy oddělena od trehalas vazbou na specifická místa cytoplazmatické membrány. Trehalasová aktivita vzrůstá po iniciaci růstu buněčné kultury (Van der Plaat, J.B., 1974), což ovlivňuje aktivaci trehalasového zymogenu pomocí cAMP-dependentní protein kinasý (Van Solingen, P., Van der Plaat, J.B., 1975). Trehalasové zymogeny byly objeveny v cytosolu, zatímco ve vakuolách byl objeven aktivní enzym (Wiemken, A., Schellenberg, M., 1982), tyto dva různě aktivní enzymy byly izolovány a jejich různé katalytické schopnosti byly jednotlivě analyzovány (Londesborough, J., Varimo, K., 1984). Tím byla prokázána existence dvou různě aktivních trehalas v kvasinkách, jedna s optimální aktivitou při pH 4-

5 a nacházející se ve vakuolách, druhá pak s optimální aktivitou při pH 7, umístěná v cytosolu a přeměňovaná pomocí fosforylace-defosforylace (*Thevelein, J.M., 1984*).

### 2.2.2 Kyselá trehalasa

Kyselá trehalasa 1 (Ath1) byla poprvé vypurifikována spolu s enzymem *suc2* deficientní invertasou (*Mittenbühler, K., Holzer, H., 1988*). Na SDS-PAGE enzym doputoval mezi 165-265 kDa, což bylo později zpřesněno pomocí gelové permeační chromatografie na 218 kDa (*Londesborough, J., Varimo, K., 1984*). Široký zóna migrace, která se objevovala na SDS-PAGE, byla přisuzována vysokému podílu sacharidů u tohoto proteinu, podobně jako u invertasy (*Trimble, R.B., Maley, F., 1977*) (*Williams, R., et al., 1985*), a po inkubaci kyselé trehalasy s concanavalin-A-sepharosou byla veškerá aktivní trehalasa ze supernatantu odstraněna, což potvrdilo, že se jedná o glykoprotein. Nejvyšší účinnost extraktu Ath1 v závislosti na pH byla určena při pH 4,5 (*Mittenbühler, K., Holzer, H., 1988*).

Čistá kyselá trehalasa vykazuje vysokou specifitu pro trehalosu při pH 4,5. Pro ostatní disacharidy, jako je sacharosa, maltosa, laktosa, cellobiosa a mellibiosa, nevykazuje po inkubaci žádný vznik glukosy. Díky tomu byla vytvořena trehalosová enzymová analýza, specifická pro kyselou trehalasu (*Kienle, I., et al., 1993*), a  $K_m$  byla vypočtena okolo 4,7 mM při pH 4,5. Isoelektrický bod pro kyselou trehalasu je 4,7. Inkubace enzymu s klasickými inhibitory, jako je EDTA, NaCl, iodoacetát nebo fenylmethylsulfonyl chlorid nemá žádný významný efekt na enzymovou aktivitu, na rozdíl od  $HgCl_2$ , který enzym téměř úplně inhibuje. Žádný efekt na aktivitu nemá ani inkubace s  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  a  $ZnSO_4$  (*Londesborough, J., Varimo, K., 1984*). Z toho vyplývá, že aktivní místo enzymu neobsahuje sulfhydrylové skupiny ani hydroxylové skupiny serinu a threoninu, a že je trehalosová aktivita nezávislá na dvoumocných kovových iontech.

Jak bylo řečeno výše, vakuolární kyselá trehalasa byla určena jako glykoprotein (obsah sacharidů asi 86 %), a pomocí studia jejích mutantů *in vivo* se zjistilo, že se syntetizuje podobně jako invertasa (*Mittenbühler, K., Holzer, H., 1991*). Stále však není jasné, jak tento protein vstupuje do vakuol. Podobně jako invertasa může vstupovat pomocí systému heterogenní glykosylace, avšak tento typ glykosylace nebyl prokázán u žádné vakuolární hydrolasy. Ath1 se může lišit od jiných vakuolárních enzymů, které podstupují



limitovanou glykosylační modifikací (Klionsky, D.J., et al., 1988) (Klionsky, D.J., Emr, S.D., 1989) (Stevens, T., et al., 1982).

Ath1 je nezbytná při růstu na médiu, obsahujícím pouze trehalosu, při deleci ATH1 genu je tento růst nemožný a dochází k akumulaci trehalosy v médiu. Ath1 tedy slouží i jako transportér trehalosy, ne jen pro její hydrolýzu (Jules, M., et al., 2004). Ath1 váže extracelulární trehalosu, přenáší jí do vakuol a tam jí hydrolyzuje za vzniku volné glukosy. Také však štěpí trehalosu na povrchu buněk, odkud je hexosovými transportéry glukosa přenášena dovnitř. Bylo prokázáno, že mobilizace cytosolové trehalosy je závislá na Ath1 a pravděpodobně má velký vliv na cyklus trehalosy v buňkách a její extra- i intracelulární štěpení (Jules, M., et al., 2008).

### 2.2.3 Neutrální trehalasa 1

Neutrální trehalasa 1 (EC 3.2.1.28) je enzym vyskytující se v *Saccharomyces cerevisiae*, který štěpí trehalosu na dvě molekuly glukosy. Trehalosa slouží jako zásobárna uhlíku buněk, neboť její koncentrace je vysoká v období nutričního nedostatku a odpočinku. Také se předpokládá, že trehalosa plní funkci stresového metabolitu, protože její koncentrace vzrůstá v období zhoršených životních podmínek, jako je stres způsobený teplotním šokem nebo chemikáliemi. Působení trehalosy jako stresového metabolitu je však stále nejasné, stejně jako tolerance vůči různým stresovým situacím. Kromě toho plní trehalosa i další strukturní a transportní role.

Neutrální trehalasa 1 byla poprvé vypořifikována z ABYS1 mutantních buněk (deficientní ve vakuolárních proteinasach A a B a karboxypeptidasach Y a S), které Nth1 poskytují částečnou proteinasovou ochranu (Achstetter, T., et al., 1984) (App, H., Holzer, H., 1989). Při purifikaci na ABYS1 mutantu se začínalo 24 hodinovým stacionárním růstem na glukose, a v této fázi byla specifická aktivita neutrální trehalasy nejvyšší, bez ohledu na to, jestli byl enzym fosforylován nebo ne. Vypořifikovaná a fosforylovaná Nth1 měla na nativním gelu TBE-elektroforesy velikost asi 160 kDa a 80 kDa na SDS-PAGE elektroforese. Maximální aktivita enzymu byla změřena při pH 6,8-7; proto označení neutrální trehalasa. Dále bylo potvrzeno její umístění v cytosolu a  $K_m$  enzymu pro trehalosu bylo určeno na 34,5 mM a, stejně jako u kyselý trehalasy, je neutrální trehalasa specifická pouze pro trehalosu, žádné další disacharidy (maltosa, laktosa ad.). V dalších

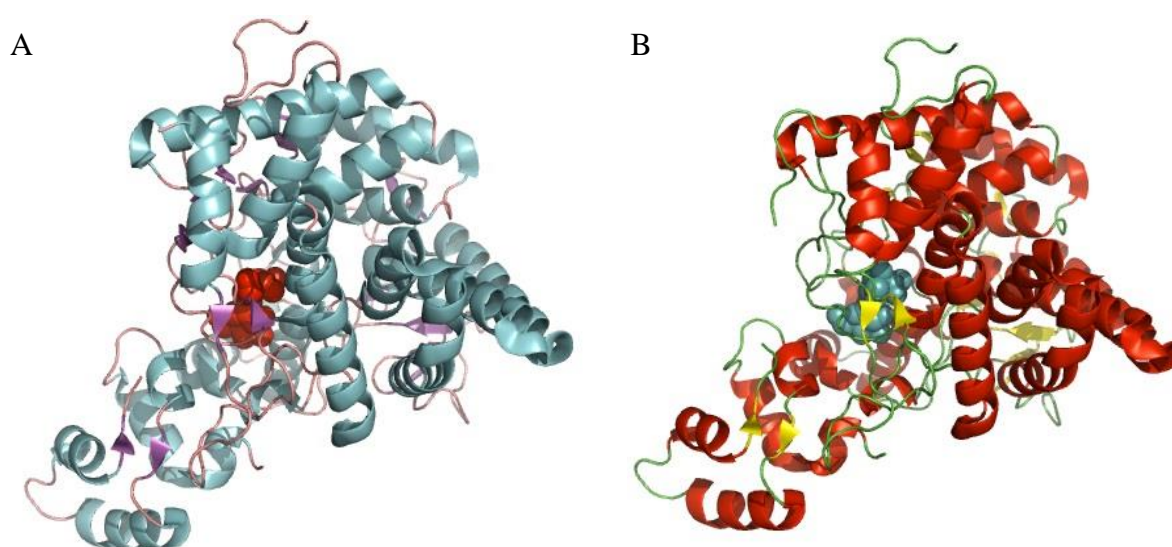
publikacích se objevila hodnota  $K_m$  v rozmezí od 5-30 mM, ale není zřejmé, zda byl enzym v těchto případech plně fosforylován (Van Assche, J.A., Carlier, A.R., 1975) (Londesborough, J., Varimo, K., 1984) (Avigad, G., et al., 1965) (Dellamora-Ortiz, G.M., et al., 1986). V obdobích hladovění je koncentrace trehalosy v kvasničných buňkách vysoká (až 23 % sušiny), což vysvětluje fyziologickou důležitost Nth1 i přes relativně vysokou  $K_m$ .

Ionty  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  v nízkých koncentracích (1,5 mM) nemají na aktivitu Nth1 žádný efekt, ale při koncentraci 3-5 mM  $Mn^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  se aktivita enzymu zvýšila. Přítomnost EDTY aktivitu Nth1 snižuje, při 1 mM koncentraci enzym úplně inhibuje (App, H., Holzer, H., 1989) (App, H., Holzer, H., 1985) (Londesborough, J., Varimo, K., 1984). V několika málo případech se však aktivity kyselá a neutrální trehalasy překrývají, při pH 4,5 má Nth1 aktivitu  $\leq 1$  % oproti aktivitě při pH 7, zatímco aktivita Ath1 při pH 7 je  $\leq 5$  % oproti aktivitě při pH 4,5. Na rozdíl od Ath1, Nth1 je citlivá na sulfhydrylová činidla (App, H., Holzer, H., 1989) (Mittenbühler, K., Holzer, H., 1988). Nth1 je také aktivována polykationty, což je výsledek inhibice Nth1 pomocí precipitace RNA a polyfosfátů, což může sloužit jako druhý aktivační mechanismus (odstranění inhibitoru kationty, spolu s fosforylací) (App, H., Holzer, H., 1985).

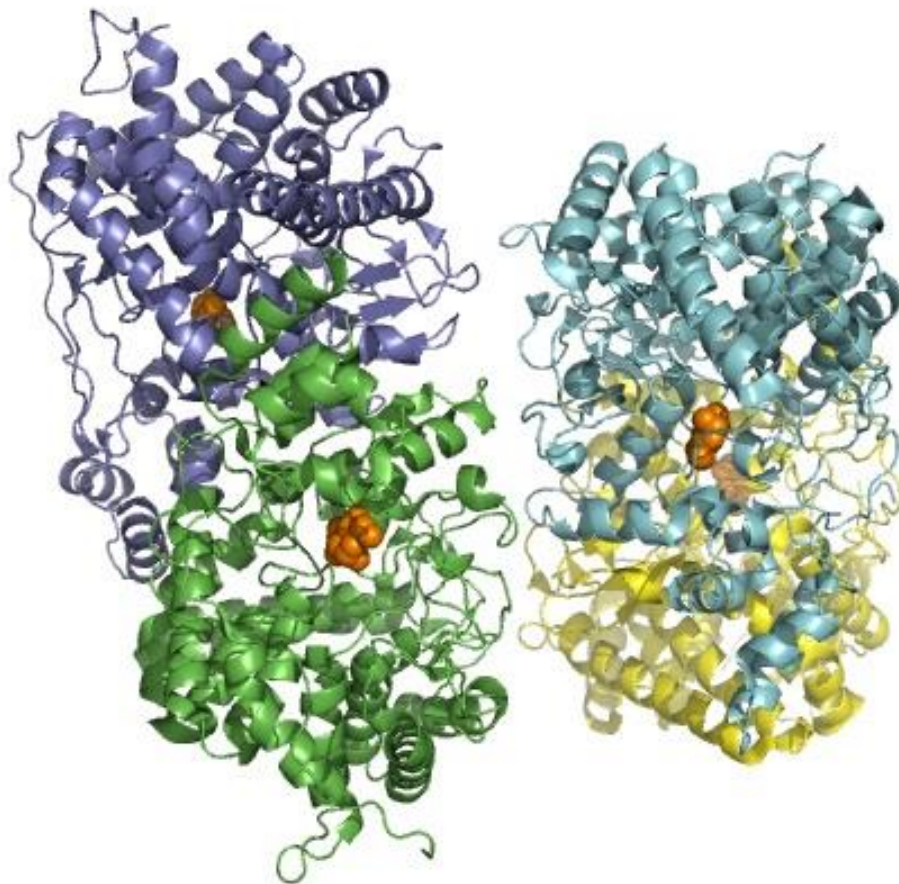
Pokud dojde k defosforylaci Nth1 pomocí alkalické fosfatasy, aktivita se sníží o 90 %, po zpětné fosforylaci katalytickou podjednotkou hovězí proteinkinasy, aktivita se vrátí opět do původního stavu, stejně jako po fosforylaci cAMP-dependentní proteinkinasy. Fosforylovaný zbytek aminokyseliny byl identifikován jako fosfoserin (App, H., Holzer, H., 1989). Protein bylo obtížné determinovat mikrosekvenací, protože byl na N-konci blokován, další studium regulace Nth1 bylo tedy prováděno ne na základě proteinové sekvence, ale použitím genu, jeho klonováním a doplněním chemických mutantů.

Na základě mnoha rozdílů mezi kyselou a neutrální trehalasou (různá vnitrobuněčná lokalizace, složení enzymů, aktivace fosforylací, různé imunitní odpovědi a závislost aktivity na různém pH) se usoudilo, že jsou kódovány různými geny a jejich regulace se může lišit. U Nth1 se soudí, že má dvě cAMP-dependentní fosforylační sekvence (Arg-Arg-X-Ser) (Rittenhouse, J., et al., 1986), jejichž fosforylace je zodpovědná za aktivaci Nth1. Gen NTH1 tedy kóduje kvasničnou neutrální trehalasu a, na rozdíl od Ath1, je zodpovědný za intracelulární hydrolýzu trehalosy (Kopp, M., et al., 1993) (Nwaka, S., et al., 1994) (Nwaka, S., et al., 1995).

*In vitro* enzymatické analýzy trehalasy jsou založeny na měření množství glukosy, vzniklé hydrolyzou trehalosy, a to použitím komerčně dostupných reagensů, obsahujících glukosa oxidasu a křenovou peroxidasu. Různá pH optima enzymů a vliv chemikálií, které inhibují Nth1, vyžadují použití různých pufrů, Nth1 se musí před analýzou optimálně nafosforylovat. Detaily publikovaných analýz jsou uvedeny v publikacích (App, H., Holzer, H., 1989) (Mittenbühler, K., Holzer, H., 1988) (Nwaka, S., et al., 1995) (Uno, I., et al., 1983). Známé krystalové struktury neutrální trehalasy z *E. coli* jsou zobrazeny na **obr. 2.3** a **2.4**.



**Obr. 2.3:** Krystalové struktury periplasmatické trehalasy *TreA* z *E. coli*. (A): *TreA* v komplexu s inhibítozem validoxylaminem (červené kuličky) (PDB kód 2JJ4). (B): *TreA* v komplexu s inhibítozem 1-thiatrehazolinem (modré kuličky) (PDB kód 2JG0). Převzato z (Gibson, R.P., et al., 2007).



**Obr. 2.4:** Krystalová struktura periplasmatické trehalasy *TreA* z *E. coli*. Dvě dimerní jednotky (jednotlivé řetězce v barvě zelené, fialové, světlemodré a žluté) v komplexu s inhibítoem casuarin-6-O-A-D-glukosidem (oranžové kuličky) (PDB kód 2WYN). Převzato z (Cardona, F., et al., 2009).

## 2.2.4 Neutrální trehalasa 2

Neutrální trehalasa 2, kódovaná genem *NTH2*, je z 77 % homolog *Nth1*. Dlouho nebyla pozorována žádná jeho aktivita a soudilo se, že jen doplňuje funkci *Nth1* (Nwaka, S., et al., 1995). Porovnáním aktivity mutantů, které měly nefunkční geny buď *NTH1* nebo *NTH2* se zjistilo, *Nth2* trehalosu hydrolyzuje, i když v mnohem menší míře než *Nth1* a že gen *NTH2* kóduje funkční trehalasu (Jules, M., et al., 2008). Stále není jasné, jestli je *Nth2* také regulována pomocí cAMP-dependentní proteinkinasy jako *Nth1* a její role v trehalosovém metabolismu a fyziologii kvasinek je stále předmětem výzkumu.

### 2.2.5 Fosforylace Nth1 a Nth2

Z výzkumu genů neutrální trehalasy vyplynulo, že N-terminální konce Nth1 a Nth2 obsahují v aminokyselinových sekvencích dvě cAMP-fosforylační místa. U Nth1 se jednalo o Arg<sup>17</sup>ArgLysSer<sup>20</sup> s fosforylovatelným serinem<sup>20</sup>, a Arg<sup>80</sup>ArgGlySer<sup>83</sup> s fosforylovatelným serinem<sup>83</sup>, zatímco Nth2 obsahuje Arg<sup>49</sup>ArgLysSer<sup>52</sup> a Arg<sup>109</sup>ArgGlySer<sup>112</sup> (Kopp, M., et al., 1993). Usuzuje se, že stejně jako Nth1 kódovaná NTH1 genem, i Nth2 může být regulována fosforylací. Fosforylace trehalas se účastní regulace koncentrace trehalosy v buňkách, tedy i kontroly stresové odpovědi a kvasničného buněčného cyklu (Thevelein, J.M., 1984).

### 2.2.6 Trehalasy v dalších organismech

Enzymy hydrolyzující trehalosu se vyskytují v mnoha organismech, od bakterií po savce. Čím příbuznější organismus, tím podobnější mají trehalasy sekvenci (např. Nth1 a Nth2 ze *Saccharomyces cerevisiae* a Nth1 z *Kluyveromyces lactis* mají navzájem vysoké procento homologie oproti trehalasám z jiných organismů.)

Neutrální trehalasy v kvasinkách mají oproti trehalasám z ostatních organismů výrazně delší N-konec (Nwaka, S., Holzer, H., 1998). N-konce kvasničných neutrálních trehalas obsahují cAMP-dependentní fosforylační rozpoznávací sekvence na dvou různých místech, které jsou nezbytné pro jejich regulaci.

ATH1 gen ze *Saccharomyces cerevisiae* naopak nevykazuje téměř žádnou homologii s neutrálními trehalasami z kvasinek i dalších organismů, což je jeden z důvodů, proč nebyl původně považován za strukturní gen Ath1 (Destruelle, M., et al., 1995). Důvodem však může být rozdílné umístění Ath1 (ve vakuole místo v cytosolu) a jiné pH optimum aktivity enzymu. Katalytický mechanismus i evoluční vztah kyselých a neutrálních trehalas je pravděpodobně značně rozdílný.

## 2.3 Trehalasy a jejich úloha ve stresových podmínkách

Buňky, které se ocitnou ve stresu způsobeném fyziologicky či okolním prostředím, reagují spuštěním exprese specifických genů, kódujících proteiny s ochrannou či adaptivní úlohou. V *Saccharomyces cerevisiae* stres indukuje expresi tzv. heat shock proteinů a dále faktorů důležitých pro degradaci, glykolýzu, membránovou funkci, antioxidantní obranu a homeostázi kovů. Také se indukuje exprese genů pro trehalosovou biosyntézu a trehalosovou hydrolýzu (Nwaka, S., Holzer, H., 1998) (Nwaka, S, et al., 1995). Na druhou stranu, exprese mnoha jiných proteinů ustane po tepelném (nebo jiném) šoku (Miller, M.J., et al., 1979). Buněčný systém regulace stresu vyžaduje koordinovanou aktivitu mnoha proteinů, které jsou součástí různých buněčných funkcí.

V buňkách vystavených tepelnému stresu vzrůstá koncentrace trehalosy, jak bylo zjištěno díky vzrůstající aktivitě enzymu trehalosa-6-fosfát synthasy a jejího substrátu glukosa-6-fosfátu a UDP-glukosy (Winkler, K., et al., 1991) (Neves, M.J., François, J., 1992). Zároveň se také zvyšuje množství mRNA genů NTH1 a NTH2 a enzymatická aktivita produktu NTH1 genu, což ukazuje, že jsou tyto geny regulovány teplotou na transkripční i translační úrovni. Jejich produkty, Nth1 a Nth2 proteiny tedy mohou být nazývány „heat shock“ proteiny, nebo lépe „stresové proteiny“, protože (jak bylo řečeno dříve) pomáhají buňkám vyrovnat se s výsledky tepelného stresu.

Vzrůstající aktivita NTH1 a NTH2 je způsobena jejich zvýšenou expresí, nikoli posttranslačními modifikacemi již existujících proteinů, v tomto případě fosforylací cAMP-dependentní kinasou 1. Regulace tepelného stresu není regulována cAMP regulační dráhou, obzvlášť v buňkách rostoucích na glukose. Naopak, po vrácení teploty do původního stavu se exprese trehalas v těchto buňkách zvyšuje, což je další důkaz, že Nth1 a Nth2 pomáhají buňkám vyrovnat se s tepelným stresem a jeho následky. Oproti tomu ATH1 gen se nezdá být podstatný v boji s tepelným stresem, protože Ath1 příliš nevzrůstá při vysokých teplotách u buněk rostoucích na glukose (Nwaka, S., et al., 1995).

Oxidativní stres a stres způsobený toxickými chemikáliemi vedou ke zvýšení aktivity neutrální trehalasy, tyto dva mechanismy jsou však rozdílné. Tepelný stres zvyšuje koncentraci jak trehalosy, tak trehalas, avšak u stresu způsobeného toxickými

chemikáliemi nedochází k akumulaci trehalosy. Z toho vyplývá, že trehalosový mechanismus ochrany před stresem by mohl být nezávislý na trehalose.

### **2.3.1 Trehalasy a jejich regulace v závislosti dostupnosti živin (katabolická represe)**

Buňky rostoucí na glukose exponenciální rychlostí vykazují nízkou koncentraci trehalosy a pouze basální aktivitu trehalosu syntetizujících a hydrolyzujících enzymů (Nwaka, S., et al., 1994) (Kienle, I., et al., 1993) (Panek, A., 1962) (Winkler, K., et al., 1991) (Neves, M.J., François, J., 1992). Když buňky přejdou do respirační fáze metabolismu, začnou akumulovat trehalosu dokud nedosáhnou stacionární fáze, kdy mají vysoký obsah trehalosy. To je pravděpodobně způsobeno inhibicí trehalosa-6-fosfát syntasy glukosou (trehalosa se začne syntetizovat až po vyčerpání glukosy) (François, J., et al., 1991). Stejně tak je aktivita trehalas nízká v rostoucích buňkách a významně se zvýší po vyčerpání glukosy a vstupu buněk do stacionární fáze. Závislost genové exprese na přítomnost glukosy v růstovém médiu je typická pro geny kontrolované tzv. katabolickou (glukosovou) represí (Monod, J., 1947) (Magasanik, B., 1961).

V kvasinkách jsou předmětem katabolické represe kromě enzymů glukoneogeneze i geny NTH1, YBR0106 (NTH2) a ATH1. Biologická funkce „tiché trehalasy“ Nth2 může spočívat v regulaci tvorby glukosy z trehalosy za speciálních podmínek. Mechanismus glukosové represe probíhá nejméně třemi různými způsoby: 1. Glukosa může inhibovat transport nebo tvorbu indukční molekuly, 2. Glukosa může inhibovat molekulu aktivátoru, nezbytnou pro start genové exprese, 3. Promotory genů potlačovaných glukosou mohou obsahovat operátorové sekvence, které slouží jako cíl pro represivní mechanismy, nezávislé na pozitivním aktivátorovém proteinu (Johnston, M., et al., 1994). Některé proteiny navíc mohou být utlumovány glukosou mechanismem tzv. katabolické inaktivace, která funguje jako proteolytická kaskáda (Holzer, H., 1989). O pozitivní regulaci trehalas pomocí katabolické inaktivace však nejsou žádné důkazy.

Nedostatek živin u *Saccharomyces cerevisiae* vede k mnoha fyziologickým změnám, které doprovázejí vstup buňky do stacionární fáze. Mimo jiné se jedná o zpevnění buněčné stěny a o akumulaci trehalosy (Thevelein, J.M., 1984). Když se buňka nachází ve stacionární fázi, u většiny genů se sníží transkripce a tím i syntéza proteinů

(*Boucherie, H., 1985*), ale některé geny se v této fázi začnou naopak exprimovat rychleji, jako odezva na nutriční limitaci (*Werner-Washburne, M., et al., 1989*) (*Teichert, U., et al., 1989*) a některé geny jsou důležité při stresu. Nedostatek živin v médiu je signálem pro expresi trehalas, což ukazuje na to, že trehalasy jsou regulovány jak katabolickou represí, tak nutriční limitací, tak i odpovědí na stres. Vysoká exprese trehalas ve stacionární fázi buněk, ve kterých je zároveň vysoká koncentrace trehalosy, pravděpodobně přispívá k vysoké toleranci těchto buněk vůči stresu.

Zásadní roli při reakci na hladovění hraje cAMP-dependentní proteinkinasa. Hodnoty cAMP jsou kontrolovány pomocí modulace aktivity adenylát cyklasy a cAMP fosfodiesterasy; pokud vzroste hladina intracelulárního cAMP, způsobí aktivaci cAMP-dependentní proteinkinasy odštěpením její neaktivní podjednotky. V případě hladovění v buňkách klesá hladina cAMP a tím i množství aktivní cAMP-dependentní proteinkinasy. Přídavek glukosy k buňkám ve stacionární fázi vede k rapidní hydrolýze trehalosy pomocí aktivace trehalasy skrze Ras/cAMP signální drahou (*Thevelein, J.M., 1984*) (*Nwaka, S., et al., 1994*). Tato aktivace trehalasy v závislosti na cAMP se ukázala být způsobena posttranslační modifikací již existujícího enzymu (*Thevelein, J.M., 1991*). Trehalasy jsou tedy substrátem pro cAMP-dependentní proteinkinasu (*Uno, I., et al. 1983*).

Tento posttranslační mechanismus potvrzuje také existence dvou cAMP fosforylačních sekvencí v produktech genů NTH1 a NTH2. Neutrální trehalasa z extraktu buněk, exponenciálně rostoucích na glukose, není fosforylovatelná směsí cAMP-ATP, na rozdíl od trehalasy z buněk ve stacionární fázi rostoucích na glukose či galaktose (*App, H., Holzer, H., 1989*) (*Kopp, M., et al., 1994*) (*Nwaka, S., et al., 1995*) (*Winkler, K., et al., 1991*). Je pravděpodobné, že bazální množství neutrální trehalasy, které se nachází v buňkách, exponenciálně rostoucích na glukose, je již přítomno ve fosforylované formě, díky vysokým koncentracím cAMP a ATP v těchto buňkách (*Gancedo, J.M., 1992*).

## 2.4 Biologická funkce trehalas

Biologickou funkcí trehalas je kontrola a regulace koncentrace trehalosy, a to pomocí degradace trehalosy na dvě molekuly glukosy. Nejdůležitější enzym při degradaci trehalosy je Nth1, což bylo ukázáno použitím mutantů Nth1 a jejich hydrolýzou trehalosy



*in vivo* (Kopp, M., et al., 1993) (Nwaka, S., et al., 1994) (Nwaka, S., et al., 1995). Kyselá trehalasa (Ath1) a její hydrolyzační aktivita *in vivo* není stále známa, ale *in vitro* rozpoznává trehalosu jako substrát. Na rozdíl od neutrálních trehalas však mutanty Ath1 nerostou na trehalose což vede k názoru, že Ath1 a její role ve využití trehalosy je oproti neutrálním trehalasám rozdílná, a navíc růstový defekt Ath1 mutantu na glycerolu ukazuje, že tento enzym ovlivňuje hydrolyzu trehalosy *in vivo* (Nwaka, S., et al., 1996).

### **2.4.1 Úloha v hydrolyze trehalosy**

Trehalasa je jakýkoli enzym, který specificky váže a hydrolyzuje trehalosu na dvě glukosové jednotky. Trehalasy v *S. cerevisiae* byly rozděleny podle lokalizace (cytosol a vakuola) a pH optima své aktivity na kyselou a neutrální trehalasy, kódované geny ATH1, NTH1 a NTH2. Bylo zjištěno, že NTH1a nejspíše i NTH2 gen je zodpovědný za intracelulární hydrolyzu trehalosy (Kopp, M., et al., 1993) (Wolfe, K.H., Lohan, A.J., 1994) (Nwaka, S., et al., 1995) (Van Dijck, P., et al., 1995), zatímco gen ATH1 hraje významnou roli v extracelulárním využití trehalosy a v endocytóze do vakuol (Nwaka, S., et al., 1996).

### **2.4.2 Úloha v odpovědi na stres**

Kromě hydrolyzy trehalosy hrají geny NTH1 i NTH2 roli i v odpovědi na buněčný stres v kvasinkách. Úloha trehalas v toleranci na teplo se však neděje cestou akumulace trehalosy (Nwaka, S., et al., 1995). Buňky ve stacionární fázi růstu jsou termo-tolerantní a zároveň mají vysokou koncentraci trehalosy a také vykazují vysokou trehalasovou aktivitu, avšak schopnost vzpamatovat se z teplotního šoku souvisí pouze s množstvím trehalas, nikoli trehalosy.

Kromě odpovědi na tepelný stres se trehalasy účastní i ochrany buněk před dalšími formami stresu jako je stres chemický nebo oxidativní, opět mechanismem nezávislým na akumulaci trehalosy. Produkty genů NTH1 a NTH2 jsou také tzv. stresovými proteiny, ale nedá se vyloučit, že jistá ochrana proti stresu, podporovaná trehalasami, může být svázána s trehalosovým metabolismem (tedy dostupností glukosy.) Tepelný šok může poškodit komponenty membránu a způsobit únik glukosy a dalších živin. To vysvětluje, proč buňky v této stresové situaci stejnou měrou zvyšují jak akumulaci trehalosy, tak expresi trehalas,

protože je potřeba glukosa na výrobu energie, což mimo jiné chrání buňky před postižením organel (Nwaka, S., et al., 1995).

## **2.5 Biotechnologické funkce trehalosy a trehalas**

Akumulace trehalosy má v mnoha případech i komerční využití. Velmi důležitý je obsah trehalosy v pekařském droždí, kvůli resistenci na stres a také kvůli výrobě „sušeného“ droždí. Optimální obsah trehalosy v pekařském droždí je 15-20 % (Gélinas, P., et al., 1989). Čím více trehalosy v buňkách, tím vyšší pravděpodobnost jejich přežití při vysušení nebo zmrazení a tím méně (a za nižší cenu) kvasinek je potřeba na výrobu sušených či mražených těst. Začátek kvašení smícháním ingrediencí nastartuje rychlou mobilizaci trehalosy a ztrátu resistance vůči zmrazení, čemuž se dá předejít přípravou těst při velmi nízkých teplotách a geneticky pomocí eliminace trehalas (Van Dijck, P., et al., 1995).

Další důležitou vlastností trehalas je jejich úloha v alkoholovém kvašení. Kvasinky si vytvářejí ethanol jako přirozenou obranu proti mikroorganismům, ale po překročení jisté hranice se pro ně stává toxickým. Některé Nth1 mutanty však vykazují vyšší toleranci k ethanolu než divoký typ a vytvářejí tak kmen vhodný pro alkoholové kvašení (Kim, J., et al., 1996).

Trehalosa se také používá na uchovávání a stabilizaci některých biologických molekul (enzymů, protilátek, léků) a jídel, zejména v rozvojových zemích, kde není dostupný elektrický proud či chlazení (Crowe, J.H., et al., 1984). Tato vlastnost trehalosy by mohla přinést řešení mnoha ekonomických, zemědělských i zdravotních problémů v těchto oblastech.

Protože se díky akumulaci trehalosy v buňkách zvyšuje resistance vůči mražení či sušení, existuje snaha zvýšit obsah trehalosy transformováním strukturních genů trehalasové syntézy z kvasinek do jiných organismů. Na podobném principu se také uvažuje o zlepšení resistance pomocí eliminace trehalasových genů.

Trehalosa a její hydrolýza je důležitá v životním cyklu hmyzu (Becker, A., et al., 1996), takže některé trehalasové inhibitory mohou být využity jako insekticidy. U obratlovců, včetně člověka, se trehalasy nacházejí v ledvinách v proximálních tubulech a mohou být využity jako diagnostické markery některých onemocnění ledvin, při kterých se enzym trehalasa vyskytuje v moči (d'Enfert, C., Fontaine, T., 1997).

## 2.6 Způsob aktivace Nth1 a Nth2

### 2.6.1 Fosforylace

Jak již bylo řečeno dříve, Nth1 musí být fosforylované, jinak je neaktivní. Dodání živin po období stresu či hladovění spouští aktivaci proteinkinasy A (PKA), která fosforyluje vznikající neutrální trehalasu, které dodá potřebnou energii pro štěpení trehalosy. Tato fosforylace byla potvrzena nejdříve *in vitro* (App, H., Holzer, H., 1989) a později i *in vivo* (Schepers, W., et al., 2012).

V publikaci Wera et al. (1999) bylo bioinformatickou analýzou zjištěno, že Nth1 obsahuje 17 teoretických míst, fosforylovatelných PKA. Osm z nich je konzervovaných v trehalasách; jedná se o Ser20, Ser21, Ser60, Ser83, Ser475, Thr58, Thr135 a Thr149 (Wera, S., et al., 1999) (viz **obr. 2.5**). Konkrétní místa zodpovědná za fosforylaci Nth1 však zatím nejsou známá, pouze při mutagenezi *in vitro* všech těchto míst došlo k totální ztrátě trehalasové aktivity bez ohledu na přítomnost PKA. Aktivita trehalasy *in vitro* je však vždy nižší, než aktivita *in vivo*, pravděpodobně z důvodu přítomnosti dalších regulačních mechanismů. Konkrétně se jedná o enzym Dcs1, který působí jako negativní regulátor trehalasové aktivity (Liu, H., et al., 2002) a dále kvasničné proteiny 14-3-3, Bmh1 a Bmh2, které jsou pro aktivaci trehalas nezbytné a vyžadují proto kompletní fosforylaci trehalas (Panni, S., et al., 2008).

Nalézt konkrétní fosforylační místa Nth1, zodpovědná za aktivaci tohoto enzymu, bylo jedním z cílů této disertační práce.

MSQVNTSQGP VAQGRQRRLS SLSEFNDFPFS NAEVYYGPPT DPRKQKQAKP AKINRTRTMS  
 70 80 90 100 110 120  
 VFDNVSPFKK TGFGKLQQTR RGS EDDTYSS SQGNRRFFIE DVDKTLNELL AAEDTDKNYQ  
 130 140 150 160 170 180  
 ITIEDTGPKV LKVG TANSYG YKHINIRG TY MLSNLLQELT IA KSFGRHQI FLDEARINEN  
 190 200 210 220 230 240  
 PVNRLSRLIN TQFWNSLTRR VDLNNVGEIA KDTKIDTPGA KNPRIYVPYD CPEQYEFYVQ  
 250 260 270 280 290 300  
 ASQMHP SLKL EVEYLPKKIT AEYVKS VNDT PGLLALAMEE HFN PSTGEKT LIGYPYAVPG  
 310 320 330 340 350 360  
 GRFNELYGWD SYMMALGLLE ANKTDVARGM VEHFIFEINH YGKILNANRS YYLCRSQPPF  
 370 380 390 400 410 420  
 LTEMALV VFK KLGGRSNPDA VD L LKRAFQA SIKEYKTVWT ASPRFD PETG LSRYHPNGLG  
 430 440 450 460 470 480  
 IPPETESDHF DTVLLPYASK HGVTLDEFKQ LYNDGKIKEP KLDEFFLHDR GVRES GHDTT  
 490 500 510 520 530 540  
 YRFE GVCAYL ATIDLNSLLY KYEIDIADFI KEFCDDKYED PLDHSIT T SA MWKEMAKIRQ  
 550 560 570 580 590 600  
 EKITKYMWDD ESGFFFDYNT KIKHR TSYES ATTFWALWAG LATKEQAQKM VEKALPKLEM  
 610 620 630 640 650 660  
 LGGLAACTER SRGPISISRP IRQWDY PFGW APHQILAWEG LRSYG YLTVT NRLAYRWLFM  
 670 680 690 700 710 720  
 MTKAFVDYNG IVVEKYDVTR GTDPHRVEAE YGNQGADFKG AATEGFGWVN ASYILGLKYM  
 730 740 750  
 NSHARRALGA CIPPISFFSS LRPQERNLYG L

**Obr. 2.5:** Aminokyselinová sekvence proteinu *Nth1* s vyznačenými teoretickými fosforylačními místy na serinech (žlutá) a threoninech (modrá). Vygenerováno na serveru [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

## 2.6.2 Nth1, Nth2 a proteiny 14-3-3

Kvasničné proteiny 14-3-3, Bmh1 a Bmh2, vytvářejí komplex s fosforylovanou neutrální trehalasou 1 (pNth1). (Více o proteinech 14-3-3 viz níže kapitola 2.7) Alespoň jedna z kvasničných isoform 14-3-3 proteinů je nezbytná pro aktivaci pNth1 po její fosforylaci PKA (*Panni, S., et al., 2008*).

Trehalasová aktivita měřená přímo v kvasničném extraktu byla poprvé popsána v roce 1999 (Wera, S., *et al.*, 1999). Inkubace extraktu s PKA vedla k mnohonásobnému zvýšení aktivity Nth1, ale žádné zvýšení nebylo prokázáno v případě mutantů, u kterých byly vyjmuty geny BMH1 a BMH2. Bmh je nutný pro aktivaci Nth1, ale Nth1 musí být nejdřív fosforylována. Protože fosforylovaná sekvence Nth1 odpovídá optimálním vazebným motivům proteinů 14-3-3 (Obsil, T., Obsilova, V., 2011), usoudilo se, že spolu vytvářejí komplex. Jako pravděpodobná místa zodpovědná za fosforylaci a tedy i vazbu na protein Bmh byly označeny Ser20, Ser21, Ser23 a Ser740, avšak pouze Ser21 a Ser23 byly nalezeny fosforylovány i při *in vivo* pokusech (Panni, S., *et al.*, 2008).

Které konkrétní seriny jsou pro vazbu proteinů 14-3-3 esenciální, bylo předmětem i této práce. Na N-terminálním konci Nth1 se nacházejí seriny uvažované pro vazbu na proteiny Bmh, což může být strukturně výhodné při tvorbě komplexu. Molekulární a strukturní mechanismus této interakce byl také předmětem této práce. Každopádně se ukázalo, že kromě svých mnoha dalších funkcí se proteiny 14-3-3 účastní také regulace metabolismu trehalosy a to jako fyziologické enzymové aktivátory v kvasinkách, podobně jako se účastní metabolismu i u mnoha vyšších organismů (Panni, S., *et al.*, 2008).

## 2.7 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 patří do rodiny kyselých regulačních proteinů, které se vyskytují ve všech eukaryotických organismech. Účastní se mnoha buněčných procesů, jako je regulace buněčného cyklu, kontrola metabolismu, kontrola genové transkripce a apoptosy a to pomocí modulace konformace svých vazebných partnerů (*Obsilova, V., et al., 2008*). Důležitost těchto molekul podtrhuje, že ovlivňují i řadu lidských onemocnění, jako je cukrovka, některé typy rakoviny či neurodegenerativní choroby.

Je známo více než čtyři sta proteinů, které interagují s proteiny 14-3-3, včetně různých proteinkinás (PKC, Raf, KSR, Bcr, ASK 1), receptorových proteinů (glukokortikoidový receptor, GABA receptor, insulin-like růstový faktor), enzymů (tyrosin a tryptofan hydroxylasy, nitrátoreduktasa, serotonin *N*-acetyl transferasa), molekul podporujících strukturu jiných proteinů (IRS-1, calmodulin), proteinů regulujících buněčný cyklus a kontrolující genovou expresi (TATA box vazebné proteiny) a proteinů, které kontrolují průběh apoptosy (BAD, A20) (*Yaffe, M.B., 2002*). Mnoho interakcí však stále zůstává neobjasněných.

Název proteinů 14-3-3 vznikl díky jejich migraci na dvou-dimenzionální DEAE-celulózové chromatografii (*Moore, B.W., Perez, V.J., 1967*). Jsou vysoce konzervované a mnoho organismů exprimuje více isoform. Klíčovou roli v jejich funkci regulačních proteinů hraje reverzibilní fosforylace (*Cohen, P., 2002*).

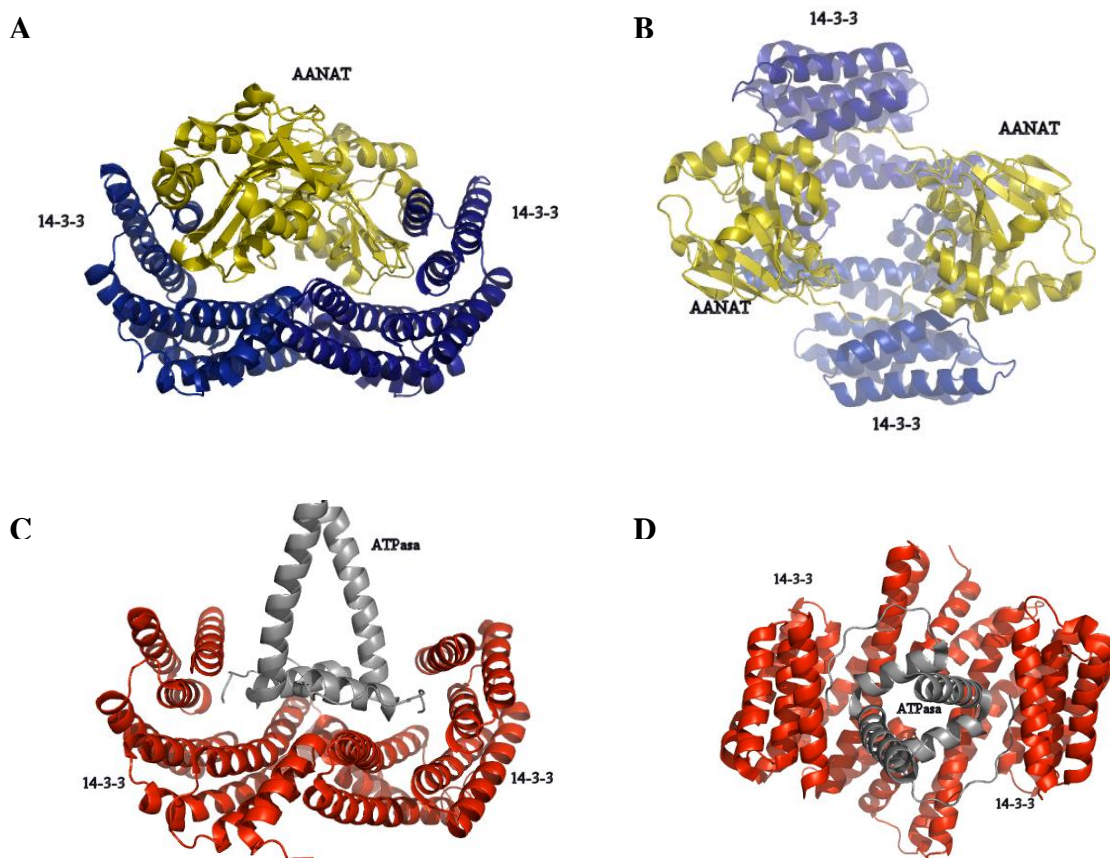
### 2.7.1 Funkce proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou už mnoho let důkladně zkoumány, čímž se postupně odhaluje jejich účast v mnoha biologických procesech. Jak bylo popsáno výše, pomocí regulace svých vazebných partnerů se účastní mnoha důležitých buněčných dějů. Jejich funkce je klasifikována podle způsobu interakce s vazebným partnerem následovně:

- a) změna konformace vazebného partnera (např. u některých enzymů)
- b) maskování či zakrývání specifické sekvence na povrchu vazebného partnera (slouží k vnitrobuněčné lokalizaci, ochraně před degradací proteinu atd.)

c) zprostředkování a regulace protein-protein interakcí (stabilizace proteinových komplexů) (Aitken, A., 2006).

Konkrétní mechanismus je však stále ve většině případů nejasný. Struktura komplexů proteinů 14-3-3 je prozkoumána jen s krátkými peptidy a, navzdory velkému množství jejich vazebných partnerů, existuje jen několik krystalových struktur s vazebným partnerem delším, než je fosforylovaný peptid. Jedná se například o komplex 14-3-3 s enzymem serotonin N-acetyltransferasou (AANAT) (Obsil, T., et al., 2001) (viz **obr. 2.6 A,B**) a 14-3-3 s C-terminálním koncem  $H^+$ -ATPasy (Ottmann, C., et al., 2007) (viz **obr. 2.6 C,D**). V roce 2011 byla vyřešena struktura ternárního florigen aktivačního komplexu proteinu 14-3-3 s florigenem z rýže (Taoka, K., et al., 2011).



**Obr. 2.6:** Krystalové struktury proteinů 14-3-3 ve stužkové reprezentaci. (A) 14-3-3 $\zeta$  v komplexu s AANAT, pohled zepředu. (B) 14-3-3 $\zeta$  v komplexu s AANAT, pohled shora. PDB kód 1IB1 (Obsil, T., et al., 2001). (C) 14-3-3 $\zeta$  v komplexu s  $H^+$ -ATPasou, pohled zepředu. (D) 14-3-3 $\zeta$  v komplexu s  $H^+$ -ATPasou, pohled shora. PDB kód 2O98 (Ottmann, C., et al., 2007).

### ***2.7.1.1 Vazba proteinů 14-3-3 s vazebným partnerem***

Proteiny 14-3-3 jsou molekuly velice rigidní (až na flexibilní C-konec), což je způsobeno zakonzervovanou vazebnou sekvencí a nevazebnými interakcemi mezi helixy (viz **obr. 2.8**). Dalším důležitým aspektem je výhradní tvorba dimerů, což je důležité pro afinitu k ligandům. Vazebné 14-3-3 motivy se vyskytují i v nestrukturovaných oblastech molekuly a podstatná je také přítomnost 14-3-3 vazebných motivů v ligandech.

#### ***2.7.1.1.1 Vazebné motivy proteinů 14-3-3***

Díky tvorbě dimerů obsahují proteiny 14-3-3 dva vazebné žlábků v antiparalelním uspořádání, což je velice důležité pro jejich funkci, protože mnoho ligandů obsahuje dva i více vazebných 14-3-3 motivů, které se mohou simultánně vázat a vytvářet tak pevnější komplex (*Obsil, T., Obsilova, V., 2011*). Konkrétní motivy, zodpovědné za vazbu k proteinům 14-3-3 jsou RSXpSXP (mode 1) a RX(Y/F)pSXP (mode 2), kde je X jakákoliv aminokyselina s výjimkou cysteinu (*Yaffe, M.B., et al., 1997*).

Peptidy se dvěma fosforylačními motivy vážou proteiny 14-3-3 mnohem lépe, než peptidy pouze s jedním. Na základě toho byl navržen model pro vazbu protein 14-3-3:ligand, kde jeden vazebný motiv ligandu slouží jako tzv. gatekeeper, který je nezbytný pro vytvoření vazby, zatímco druhý motiv váže slaběji, ale jeho přítomnost je nezbytná pro úplnou biologickou aktivitu (*Yaffe, M.B., 2002*).

Dimer 14-3-3 také může simultánně vázat dva motivy, které jsou od sebe vzdálené. Taková interakce pravděpodobně nezprostředkovává jen tvorbu komplexu, ale také mění strukturní konformaci ligandu, jak bylo ukázáno u FOXO transkripčních faktorů (*Obsil, T., et al., 2003*) nebo AANAT (*Obsil, T., et al., 2001*).

Vazebné motivy pro vazbu proteinů 14-3-3 se velice často vyskytují v nestrukturovaných částech molekuly, což má pozitivní vliv na funkci a schopnost vazby k vazebnému partnerovi (*Dyson, H.J., Wright, P.E., 2002*). Nestrukturovaný protein (nebo jeho nestrukturovaná část) pak má také více možností flexibilně vyhledávat a vázat se na vazebného partnera, se kterým utvoří pevný, strukturovaný komplex (*Shoemaker, B.A., et al., 2000*). To koresponduje s faktem, že primární interakce proteinu 14-3-3 a jeho ligandu je většinou zprostředkována vodíkovými vazbami a solnými můstky mezi fosforylovaným motivem a vazebným žlábkem (*Rittinger, K., et al., 1999*) (*Yaffe, M.B., et al., 1997*).



### 2.7.1.1.2 Změna konformace vazebného partnera

Vazbou ligandu na protein 14-3-3 může dojít k účelové změně jeho konformace. Tento mechanismus se uplatňuje například u některých enzymů, u kterých dojde po vazbě na 14-3-3 ke zlepšení či zhoršení jejich katalytických schopností. Příkladem je enzym serotonin-N-acetyl transferasa (AANAT), jejíž komplex s proteinem 14-3-3 byl vykrytalizován (Obsil, T., et al., 2001). AANAT se váže centrálního žlábkku dimeru 14-3-3 $\zeta$ , čímž dojde ke změně její konformace a zpřístupnění místa pro vazbu substrátu, takže vazbou na 14-3-3 se AANAT zvyšuje přístupnost pro substrát.

### 2.7.1.1.3 Maskování či zakrývání specifické sekvence na povrchu vazebného partnera

Proteiny 14-3-3 mohou interferovat s různými signálními sekvencemi a tím ovlivňovat transport proteinů z jádra do cytosolu či lokalizaci v jádře, konkrétně maskováním sekvencí regulovat kinetiku a dynamiku transportu jádro-cytosol nebo lokalizaci v endoplazmatickém retikulu (Bridges, D., Moorhead, G.B., 2004).

Příkladem této protein-proteinové interakce jsou transkripční faktory FOXO, které hrají důležitou úlohu v kontrole buněčného cyklu, buněčné diferenciaci, kontrole metabolismu, odpovědi na stres a apoptose (van der Horst, A., Burgering, B.M.T., 2007). FOXO proteiny, nafosforylované PKB (Akt kinasou), mají dva 14-3-3 vazebné motivy, jeden na N-konci a druhý na C-konci na DNA-vazebné doméně, kde se nachází i jaderná lokalizační sekvence. Navázání se na protein 14-3-3 vede k přesunutí tohoto komplexu z jádra do cytosolu, kde protein 14-3-3 zabraňuje vstupu FOXO zpět do jádra maskováním jeho jaderné lokalizační sekvence (Rena, G., et al., 2001) (Brunet, A., et al., 1999) (Obsilova, V., et al., 2005).

Proteiny 14-3-3 také mohou ovlivňovat interakce DNA-protein, příkladem jsou opět FOXO proteiny, jejichž afinitu vůči DNA ovlivňuje vytvoření komplexu s proteinem 14-3-3 (Brunet, A., et al., 1999). Další podobnou funkcí proteinů 14-3-3 je ochrana proteinů před defosforylací a protelolytickou degradací (Dobson, M., et al., 2011).

#### *2.7.1.1.4 Zprostředkování protein-proteinových interakcí*

Dimerní charakter proteinů 14-3-3 naznačuje také jejich schopnost navázat dvě molekuly do centrálního kanálu a zprostředkovat jejich interakci. Příkladem je H<sup>+</sup>-ATPasa, které protein 14-3-3 zprostředkuje tvorbu velkého, aktivního, hexamerního komplexu (Ottmann, C., et al., 2007), nebo tumor-supresor p53, který je funkční pouze jako tetramer a v této konformaci má vyšší afinitu k DNA i mnoha dalším proteinům. Protein 14-3-3 aktivuje jeho DNA vazebnou aktivitu a zvýší stabilitu p53 vazbou na jeho nestrukturovaný C-konec (Schumacher, B., et al., 2010). Proteiny 14-3-3 také zprostředkovávají vznik ternárních komplexů, kde „podrží“ dva různé ligandy u sebe aby mohlo dojít k jejich interakci. Tento tip interakce je navrhován například u proteinů β-catenin a Chibby, které spolu vytvoří komplex, což zprostředkuje transport β-cateninu do jádra (Li, F.Q., et al., 2008).

### **2.7.2 Regulace proteinů 14-3-3**

Proteiny 14-3-3 jsou exprimovány ve všech tkáních a vážou se k vazebným partnerům s podobnou afinitou. Jejich vazebné vlastnosti jsou regulovány post-translačními modifikacemi a vazbou kofaktorů (Bridges, D., Moorhead, G.B., 2004).

#### **2.7.2.1 Fosforylace**

Nejlépe prozkoumaný a nejdůležitější způsob regulace proteinů 14-3-3 je fosforylace. Fosforylační místa nejsou zakonzervovaná mezi isoformami, takže jednotlivé isoformy může regulovat specificky. K fosforylaci dochází na čtyřech místech (Aitken, A., 2006). Jedná se o Ser58 a Ser63 na povrchu dimeru, které ovlivňují tvorbu dimeru, a Ser184 a Ser/Thr232 v blízkosti vazebného žlábků, jejichž fosforylace vede ke snížení schopnosti vázat ligandy (číslováno podle 14-3-3ζ) (Obsilova, V., et al., 2004).

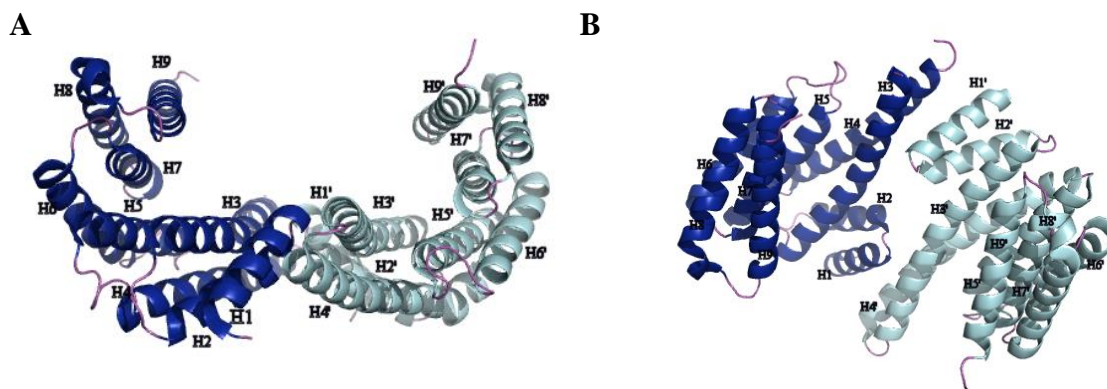
#### **2.7.2.2 Nefosforylované vazebné motivy**

Některé proteiny interagují s proteiny 14-3-3 i bez fosforylace. V oblastech bohatých na cysteinové zbytky se váže např. Raf kinasa nebo Bcr kinasa. Na fosforylaci je

také nezávislý peptid R18, který se váže přes sekvenci Asp-Ala-Leu-Asp-Leu a má vysokou afinitu k proteinům 14-3-3 (Wang, B., *et al.*, 1999).

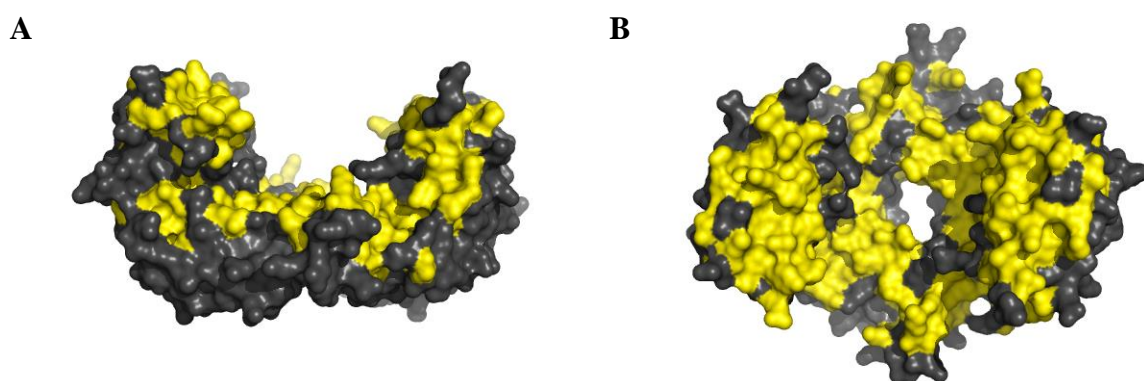
### 2.7.3 Struktura proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 mají velikost okolo 30 kDa a mají vysoce helikální strukturu. Monomery jsou tvořeny devíti antiparalelními  $\alpha$ -helixy (označují se H1-H9), propojenými různě dlouhými ohyby s různě dlouhým C- a N- koncem. Na povrchu molekuly je amfipatický vazebný žlábek tvořený helixy H3, H5, H7 a H9. Proteiny 14-3-3 tvoří dimery charakteristického tvaru „U“, se širokým centrálním kanálem velikým přibližně 35 Å (délka), 35 Å (šířka) a 20 Å (hloubka). Na vnitřní straně kanálu se nacházejí aminokyseliny zakonzervované mezi isoformami zatímco méně konzervované aminokyseliny jsou umístěné na vnějším povrchu (viz **obr. 2.7** a **2.8**). Isoformy proteinů 14-3-3 jsou vysoce zakonzervované v rámci sekvence, nejvariabilnější část isoform je jejich neuspořádaný C-konec.



**Obr. 2.7:** Krystalová struktura 14-3-3 $\zeta$  ve stužkové reprezentaci. Pohled zepředu (A) a shora (B) na dimerní strukturu, tvořenou helixy H1-H9 jedné monomerní jednotky a helixy H1'-H9' druhé monomerní jednotky. Vazebné místo pro ligand tvoří helixy H3, H5, H7 a H9 (H3', H5', H7' a H9'). Na tvorbě dimeru se podílejí helixy H1, H2 jedné monomerní jednotky s helixy H3', H4' druhé monomerní jednotky. PDB kód 1QJB.

Terciární a kvarterní struktury byly vyřešeny u všech lidských isoform proteinů 14-3-3 (Gardino, A.K., et al., 2006), z rostlinných isoform byla zatím vyřešena jen struktura proteinu z *Nicotiana tabacum*, podobnému proteinu 14-3-3 a několik isoform proteinů 14-3-3 bylo vykrytalizováno pouze s jejich vazebným partnerem nebo od něj odvozeným peptidem (Yang, X., et al., 2006) (Ottmann, C., et al., 2007) (Obsil, T., et al., 2001) (viz obr. 2.6).



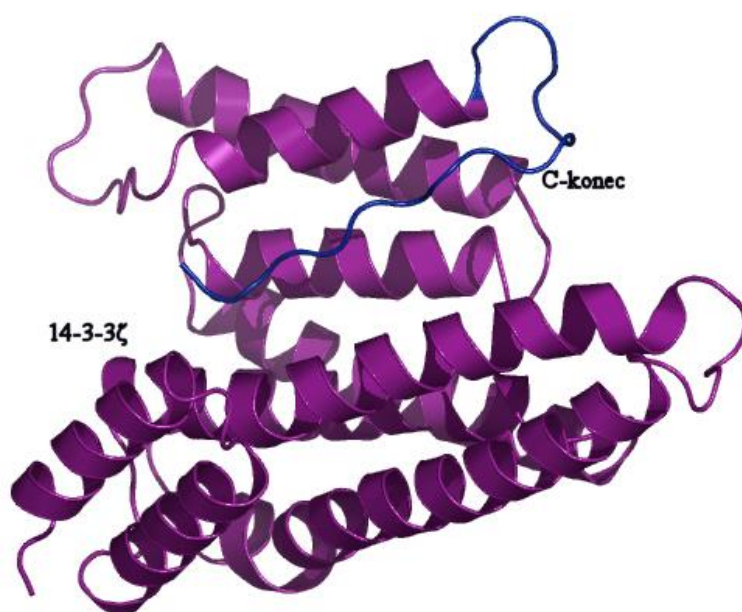
**Obr. 2.8:** Krystalová struktura 14-3-3 $\zeta$  v povrchové reprezentaci. Žlutě označené jsou aminokyseliny zakonzervované napříč isoformami 14-3-3. Pohled zepředu (A) a shora (B). PDB kód 1QJB.

### 2.7.3.1 Tvorba dimerů

Jednotlivé isoformy proteinů 14-3-3, přestože mají obecně silně zakonzervovanou strukturu, se liší ve tvorbě dimerů. Mohou vytvářet buď homo- nebo hetero-dimery, což závisí na nepatrných rozdílech v sekvenci proteinu. Některé isoformy, například lidská 14-3-3 $\epsilon$ , vytváří výlučně hetero-dimery, protože v tom případě se spojí s druhým monomerm třemi solnými můstky a dalšími slabými vazebnými interakcemi, zatímco při tvorbě homo-dimeru by byla vázána jen slabě jedním solným můstkem (Yang, X., et al., 2006). Tento typ vazby upřednostňuje více isoform, zatímco lidská 14-3-3 $\sigma$  tvoří výhradně homo-dimery, kde jsou monomery spojeny několika unikátními interakcemi a solnými můstky (Benzinger, A., et al., 2005).

### 2.7.3.2 C-konec

C-konec proteinů 14-3-3 vykazuje nejvyšší variabilitu mezi isoformami v oblasti přibližně 15-40 aminokyselin. Pravděpodobně může sloužit jako autoinhibitor a supresor nespecifických interakcí mezi 14-3-3 a nevhodnými ligandy. C-konec má neuspořádanou strukturu, která není rozpoznatelná na žádné doposud vyřešené krystalové struktuře, ale pomocí jiných biofyzikálních metod byla určena jeho lokalizace uvnitř vazebného žlábků za nepřítomnosti ligandu, odkud se přemístí po navázání fosfopeptidu (Obsilova, V., et al., 2004) (Silhan, J., et al., 2004). Tento výzkum byl prováděn s lidskou isoformou 14-3-3 $\zeta$  (viz obr. 2.9). Oproti této a dalším isoformám vyšších eukaryot se však zjistilo, že kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 mají C-konec podstatně delší a že obsahuje polyglutaminovou sekvenci dosud neznámé funkce. C-konec Bmh proteinů má díky tomu jinou konformaci, která mu zabraňuje uložení ve vazebném žlábků (Veisova, D., et al., 2010) a pravděpodobně v tomto případě neslouží jako autoinhibitor.

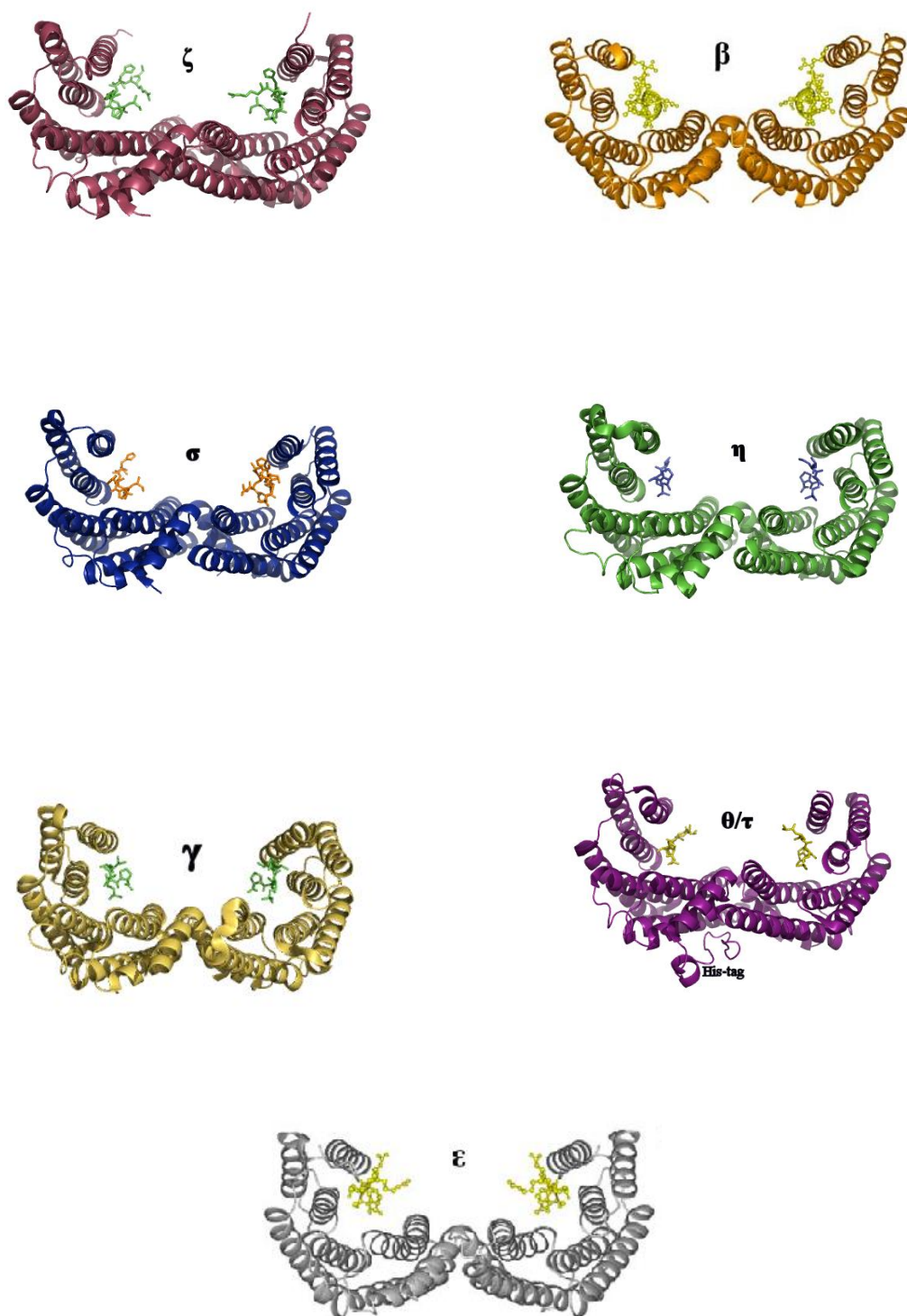


**Obr. 2.9:** Krystalová struktura monomeru 14-3-3 $\zeta$  ve stužkové reprezentaci. Modře je znázorněn nestrukturovaný C-konec, který pravděpodobně slouží jako autoinhibitor. PDB kód 1QJB. Převzato z (Veisova, D., et al., 2010).

## 2.7.4 Isoformy proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 se vyskytují ve všech eukaryotických organismech, zatímco v prokaryotických organismech nebyly nalezeny žádné. V konkrétním eukaryotickém organismu je většinou exprimováno více isoform. Isoformy jsou zakonzervované a tudíž velice podobné, přestože jsou kódovány různými geny (*Ferl, R.J., et al., 2002*). Konzervované sekvence se vyskytují ve vazebném místě, místech pro tvorbu dimeru a stabilizaci terciární struktury. Vůči svým ligandům jsou většinou vysoce specifické, a to díky rozdílům v aminokyselinové sekvenci a dále se na specifitě také podílí přednostní forma homo- či hetero-dimerů (*Benzinger, A., et al., 2005*). Další způsob ovlivňování specifity isoform jsou post-translační modifikace proteinů 14-3-3 (*Tsuruta, F., et al., 2004*).

Nejvíce isoform bylo zatím objeveno v rostlinné říši, například u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), kde bylo objeveno 13 isoform nebo u ječmene (*Hordeum vulgare*), ve kterém bylo objeveno 5 isoform (*Rosenquist, M., et al., 2001*). U člověka bylo popsáno sedm isoform, které se označují písmeny řecké abecedy  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\tau$ , a  $\sigma$  (jejich krystalové struktury viz **obr. 2.10**). Vyskytují se zejména v mozku, kde představují až 1 % všech rozpustných proteinů, ale vyskytují se i v jiných tkáních, např. 14-3-3 $\sigma$  je tkáňově specifická a vyskytuje se v epitheliálních buňkách, zatímco 14-3-3  $\tau$  se vyskytuje v T-buňkách imunitního systému (*Mhaweck, P., 2005*).



**Obr. 2.10:** Krystalové struktury lidských isoformů proteinů 14-3-3 ve stužkové reprezentaci.  $\zeta$ -vínová (PDB kód 1QJB).  $\beta$ -oranžová (PDB kód 2C23).  $\sigma$ -modrá (PDB kód 1YWT).  $\eta$ -zelená (PDB kód 2C74).  $\gamma$ -žlutá (PDB kód 2BO5).  $\theta/\tau$ -fialová s patrnou His-tag kotvou (PDB kód 2BTP).  $\epsilon$ -šedá (PDB kód 2BR9) Převzato z (Gardino, A.K., et al., 2006).

U kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytují dvě isoformy označované jako Bmh1 a Bmh2. Tyto isoformy se shodují v 93 % aminokyselinové sekvence (*van Heusden, G.P., et al., 1995*) a byly předmětem výzkumu této disertační práce.

## **2.7.5 Proteiny 14-3-3 a jejich vliv na lidské zdraví**

Jak bylo popsáno výše, proteiny 14-3-3 se účastní mnoha podstatných buněčných procesů. Jako takové tedy mají vliv i na lidské zdraví a, zejména pokud dojde k jejich defektu mutagenézí či jinému, hrají roli i při mnoha onemocněních.

### **2.7.5.1 Proteiny 14-3-3 a tumorigeneze**

Tumorigeneze začíná neregulovanou buněčnou proliferací. Aby se tomu zabránilo, je potřeba existence plně funkčních signálních drah, ve kterých často participují i proteiny 14-3-3. Jedná se například signální dráhu tyrosin kinasy, která ke své funkci potřebuje aktivované Raf proteiny, jejichž aktivace v cytosolu je pozitivně regulována právě proteiny 14-3-3 (*Freeman, A.K., Morrison, D.K., 2011*). Mutace v této signální dráze usnadňují vznik rakoviny.

Nejvíce zapojené v rakovinotvorných procesech se zdají být isoformy 14-3-3 $\sigma$  a 14-3-3 $\zeta$ . 14-3-3 $\sigma$  nejspíš funguje jako tumor-supresor a v případě vzniku rakoviny je její exprese značně snižena, pravděpodobně umlčováním genu hypermethylocí (jako je tomu i u dalších tumor-supresorových genů). 14-3-3 $\sigma$  reguluje pro-apoptotický protein Bax a regulační protein p53 (*Mhawech, P., 2005*). Důležitým aspektem u 14-3-3 $\sigma$  je, že jako jediná z lidských isoform tvoří homo-dimery.

Oproti tomu 14-3-3 $\zeta$  se zejména při iniciační fázi rakoviny zvýšeně exprimuje. Jak bylo popsáno u rakoviny prsu, při počáteční nadměrné expresi 14-3-3 $\zeta$  je mnohem větší pravděpodobnost vzniku metastáz a smrti. Pravděpodobně podporuje růst rakovinných buněk a znemožňuje apoptosu. Standardní chemoterapie u případů, kdy dochází k nadměrné expresi 14-3-3 $\zeta$ , nefunguje, začne účinkovat pouze po cíleném snížení exprese tohoto proteinu (*Neal, C.L., et al., 2009*).



### ***2.7.5.2 Proteiny 14-3-3 a neurodegenerativní onemocnění***

Největší koncentrace proteinů 14-3-3 je v mozku (až 1 % všech rozpustných proteinů). Vyskytují se v neuronech a účastní se neuronové diferenciaci, migrace, regulace iontových kanálů a dalších funkcí. Nejdůležitější pro centrální nervovou soustavu se zdá být isoforma 14-3-3 $\epsilon$ , která, pokud je defektní, způsobuje u myši rozdílný vývin mozku, slábnutí mozkové kůry, umírání neuronů ad. (Foote, M., Zhou, Y., 2002)

Proteiny 14-3-3 fungují jako biomarkery ve všech neurodegenerativních onemocněních, i když jejich konkrétní funkce není vždy úplně jasná. U Parkinsonovy choroby byly v tzv. Lewyho tělískách, která jsou tvořena agregovaným proteinem  $\alpha$ -synucleinem, nalezeny isoformy 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\sigma$  a  $\zeta$ , které pravděpodobně s  $\alpha$ -synucleinem v nativní formě interagují. Tyto isoformy byly objeveny také v neurofibrilárních změnách u Alzheimerovy choroby, které jsou tvořeny hyperfosforylovaným proteinem tau, jehož fosforylaci stimuluje právě proteiny 14-3-3. Jako biomarkery slouží i u dalších neurodegenerativních onemocnění, jako je Huntingtonova choroba či Creutzfeld-Jacobova nemoc (Foote, M., Zhou, Y., 2002).

Obecně lze říci, že proteiny 14-3-3 v CNS inhibují apoptotické procesy, snižují toxicitu neurotoxinů, pomáhají předcházet odumírání neuronů a také se účastní likvidace patologicky sbalených proteinů.

Proteiny 14-3-3 hrají roli i v dalších typech onemocnění, jako je diabetes, diabetická kardiomyopatie, roztroušená skleróza a různé záněty. Jejich modulace a stimulace (např. malými peptidy) by mohla u některých onemocnění fungovat jako cílená terapie (Zhao, J., et al., 2011).

### 3. Cíle práce

Cílem této práce bylo objasnění mechanismu aktivace kvasničného enzymu neutrální trehalasy 1 (Nth1) proteinem Bmh1. Práce se zabývá identifikací fosforylačních míst na enzymu Nth1, které jsou esenciální pro vazbu s proteinem. Dále byly zkoumány strukturální změny na proteinech Nth1 a Bmh1 po vytvoření komplexu. Jako hlavní nástroje použité ke studiu byly použity metody cílené mutagenese, měření enzymové kinetiky, limitované proteolýzy, analytické ultracentrifugace, CD spektroskopie, vodíko-deuteriové (H/D) výměny a chemického zesíťování spojených s hmotnostní spektrometrií.

Konkrétní cíle práce byly následovné:

1. Jaká jsou konkrétní fosforylační místa zodpovědná za aktivaci kvasničného enzymu Nth1 prostřednictvím proteinu Bmh1?
2. Jaká je stechiometrie a stabilita komplexu Bmh1/Nth1?
3. Pomocí limitované proteolýzy identifikovat oblasti proteinu účastnící se tvorby komplexu Bmh1/Nth1.
4. Význam jednotlivých fosforylačních míst Nth1 pro interakci s proteiny Bmh pomocí měření enzymatické aktivity jednotlivých mutantních forem Nth1 *in vitro*.
5. Objasnění strukturálních změn na Nth1 a Bmh1 pomocí H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.
6. Jaké nastávají změny v sekundární a terciární struktuře obou proteinů (Nth1 a Bmh1) po vytvoření komplexu?
7. Vytvoření homologního modelu katalytické domény Nth1 a modelu proteinu Bmh1.
8. Validace obou homologních modelů proteinů pomocí chemického zesíťování (činnidly DSS a DSG).

## 4. Použitý materiál

### 4.1 Chemikálie

$\beta$ -merkaptoethanol .....	Carl Roth GmbH (SRN)
agarosa .....	Carl Roth GmbH (SRN)
akrylamid .....	Carl Roth GmbH (SRN)
ampicilin .....	Biotika (Slovenská republika)
ATP .....	Sigma (USA)
boritá kyselina .....	Lachema (Česká republika)
bromfenolová modř .....	Sigma (USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250 .....	Carl Roth GmbH (SRN)
dihydrogenfosforečnan draselný .....	Lachema (Česká republika)
1,4-dithiothreitol (DTT) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
dodecylsulfát sodný (SDS) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného .....	Lachema (Česká republika)
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
ethanol .....	Lachema (Česká republika)
ethidium bromid .....	Sigma (USA)
glycerol .....	Penta (Česká republika)
glycin .....	Duchefa Biochemie (Nizozemsko)
heptahydrát síranu nikelnatého .....	Penta (Česká republika)
hydroxid sodný .....	Lachema (Česká republika)
chloramfenikol .....	Sigma (USA)
chlorid draselný .....	Lachema (Česká republika)

chlorid sodný.....	Penta (Česká republika)
chlorovodíková kyselina .....	Lachema (Česká republika)
imidazol .....	Carl Roth GmbH (SRN)
IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
isopropanol.....	Lachema (Česká republika)
LB Agar (Luria/Miller) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
LB Medium (Luria/Miller) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
lysozym.....	Serva (SRN)
methanol.....	Lachema (Česká republika)
N, N'-methylen-bis-akrylamid.....	Carl Roth GmbH (SRN)
octová kyselina .....	Lachema (Česká republika)
peroxodisíran amonný.....	Carl Roth GmbH (SRN)
síran nikelnatý.....	Penta (Česká republika)
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) .....	Carl Roth GmbH (SRN)
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) .....	Carl Roth GmbH (SRN)

## 4.2 Materiál

Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit.....	Invitrogen (USA)
dialyzační membrána (Molecular weight cut off) 14000.....	Carl Roth GmbH (Německo)
DNA primery .....	VBC-Genomics (Rakousko)
Dpn I .....	New England Biolabs (USA)
<i>E. coli</i> BL21 (Rosetta) .....	Stratagene (USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3).....	Stratagene (USA)
filtry 45 $\mu$ m Rotilabo-Spritzfilter (PVDF).....	Carl Roth GmbH (Německo)
Chelating Sepharose Fast Flow.....	Amersham Biosciences (Švédsko)
Jetquick Plastid Miniprep spin kit .....	Genomed (USA)

kolony pro HPLC.....	Amersham Biosciences (Švédsko)
koncentrátor Centrikon .....	Millipore (USA)
křemenné kyvety.....	Agilent (USA)
lysozym.....	New England BioLabs (USA)
náplně do kolon.....	Amersham Biosciences (Švédsko)
PKA .....	Promega (USA)
Precision Plus Protein Dual Color Standard .....	BioRad (USA)
Protease Inhibitor Coctail .....	Sigma (USA)
Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit.....	Stratagene (USA)
thrombin.....	Sigma (USA)
vektor pET-15b .....	Invitrogen (USA)
vektor pET-32b.....	Invitrogen (USA)

## 4.3 Přístroje

analytické váhy R160V.....	Sartorius (Německo)
centrifuga 5415D, rotor F45-24-11.....	Eppendorf(SRN)
centrifuga 5804R, rotor A-4-44 .....	Eppendorf (SRN)
centrifuga K80, rotor S6/6,6 .....	MLW (SRN)
horizontální agarosová elektroforéza.....	Omni-bio (Česká republika)
HPLC-AKTA.....	Amersham Biosciences (Švédsko)
iluminátor UVT 14-M.....	Herolab (SRN)
inkubátor .....	Melag (SRN)
MasterCycler Personal .....	Eppendorf (SRN)
peristaltická pumpa .....	Ismatec (Švýcarsko)
pH metr JenWay 3505 .....	Feldsted (Velká Británie)
sonikátor 3000 Misonix .....	Cole Parmer (USA)

třepačka Orbital incubator .....	Gallenkamp (Velká Británie)
UV-VIS absorpční spektrofotometr Agilent 8453.....	Agilent (USA)
vertikální polyakrylamidová elektroforéza .....	Bio-Rad (USA)
vodní lázeň.....	Memmert (Německo)
vortex Zx3.....	Velp Scientifica (Itálie)
zdroj pro horizontální elektroforézu .....	Omni-bio (Česká republika)
zdroj pro vertikální elektroforézu Consort EV243 .....	Sigma-Aldrich (USA)

## 5. Metody

### 5.1 Klonování DNA

DNA proteinů Bmh1 a Nth1 byla zaklonována do plasmidů jako fúzní proteiny s histidinovou kotvou RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D.

#### 5.1.1 Klonování BMH1 a BMH2 do vektoru pET-15b

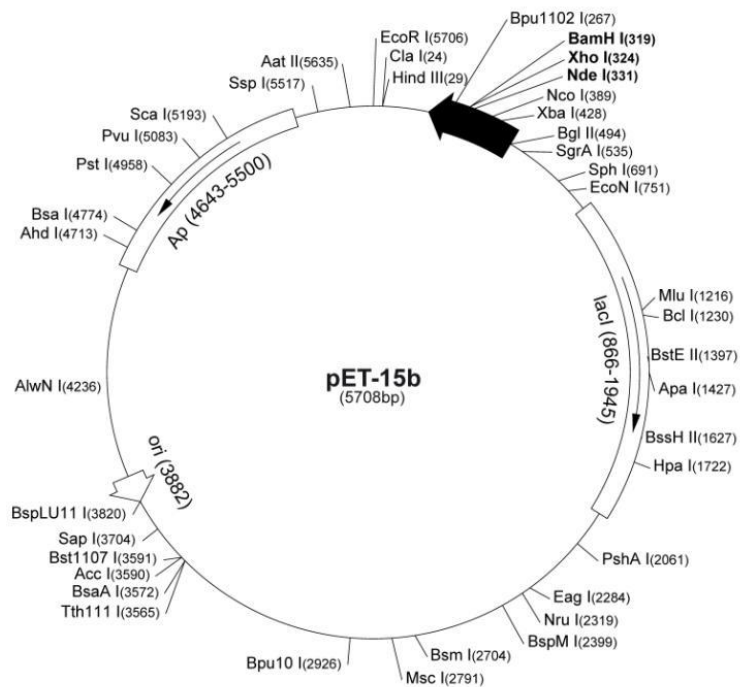
Expresní vektor je kruhová DNA schopná samostatné replikace, která u bakterií slouží k přenosu genů mezi buňkami. Vektory, používané pro expresi rekombinantních proteinů, obsahují tzv. selekční markery, tedy úseky pro resistenci vůči antibiotiku, cílové úseky pro restriční endonukleázy, promotor (sekvence pro zahájení transkripce), multi-klonovací místo ad. Vektor pET-15b, do kterého byl zaklonována cDNA BMH1 a BMH2, obsahuje sekvenci pro histidinovou kotvu, tvořenou šesti histidiny, která se využívá při purifikaci proteinů a v případě potřeby se dá odštěpit. Je rezistentní vůči antibiotiku ampicilin (mapa vektoru viz **obr. 5.1**).

#### 5.1.2 Klonování NTH1 do vektoru pET-32b

Neutrální trehalasa 1 byla zaklonována do vektoru pET-32b (Novagen). Tento vektor obsahuje delecí 81 bází po sekvenci kódující His-tag (6xH)SSGLVPRGS (5819 bází). cDNA NTH1 (aminokyselinová sekvence 1-751) byla zaklonována mezi místa pro restriční endonukleasy NcoI a BamHI (mapa vektoru viz **obr. 5.2**).

**pET-15b sequence landmarks**

T7 promoter	453-469
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



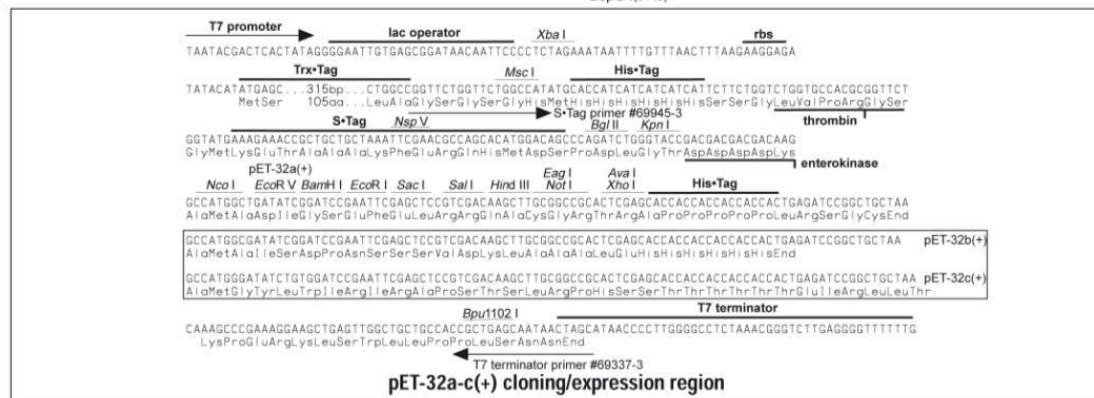
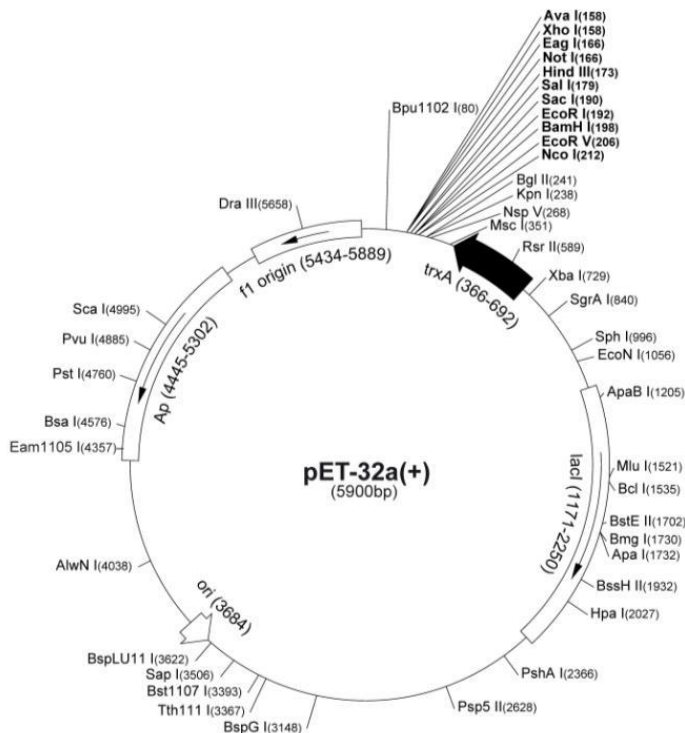
**Obr. 5.1:** Mapa vektoru pET-15b, do kterého byly zaklonovány *Bmh1* a *Bmh2*.



**pET-32a(+) sequence landmarks**

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites ( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



**Obr. 5.2:** Mapa vektoru pET-32b, který navíc obsahuje označenou sekvenci. Nth1 byla zaklonována mezi restriční místa NcoI a BamHI.

## 5.2 Cílená mutagenese Nth1

Pro konkrétní určení fosforylačních míst, zodpovědných za vazbu Nth1 na Bmh1 bylo zapotřebí vytvořit serinové mutanty Nth1. Jednalo se o serinové zbytky na neuspořádaném N-konci molekuly, konkrétně na aminokyselinových pozicích 20, 21, 60 a

83. Bylo připraveno šest mutantů, které obsahovaly dva serinové zbytky: Ser20+21, Ser20+83, Ser21+60, Ser21+83, Ser60+83; dále čtyři mutanty, které obsahovaly pouze jeden serinový zbytek na jedné ze čtyř výše uvedených pozicích: Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83. Pro kontrolu byl připraven mutant Nth1, který neobsahoval žádný serinový zbytek na těchto pozicích. Oligonukleotidy, navržené na mutagenesi, jsou uvedené v **Tabulce 1**.

**Tabulka 1: Oligonukleotidy použité pro cílenou bodovou mutagenesi Nth1.**

NTH1 S20A_up	5' cgt caa aga aga tta <b>gca</b> tca cta agt gaa ttc 3'
NTH1 S20A_down	5' gaa ttc act tag tga <b>tgc</b> taa tct tct ttg acg 3'
NTH1 S21A_up	5' caa aga aga tta tca <b>gca</b> cta agt gaa ttc 3'
NTH1 S21A_down	5' gaa ttc act tag <b>tgc</b> tga taa tct tct ttg 3'
NTH1 S60A_up	5' gt acg agg act atg <b>gcg</b> gtt ttc gat aat g 3'
NTH1 S60A_down	5' c att atc gaa aac <b>cgc</b> cat agt cct cgt ac 5'
NTH1 S83A_up	5' cag act aga cgt ggt <b>gct</b> gag gat gac acc 3'
NTH1 S83A_down	5' ggt gtc atc ctc <b>agc</b> acc acg tet agt ctg 3'
NTH1 S20A_S21A_up	5' caa aga aga tta <b>gca gca</b> cta agt gaa ttc 3'
NTH1 S20A_S21A_down	5' gaa ttc act tag <b>tgc tgc</b> taa tct tct ttg 3'

### 5.2.1 PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) slouží k amplifikaci určité sekvence DNA (v tomto případě úseku DNA s požadovanou mutací.) Dvě výchozí oligonukleotidové jednotky (viz tab. 1) hybridizují do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA čímž ohraničují žádanou sekvenci. Při PCR reakci dochází nejdříve k zahřátí na 95 °C, kdy dojde k denaturaci, tedy rozdělení dvoušroubovice templátové DNA. Poté dojde ke

zchlazení a tzv. annealingu, nasednutí oligonukleotidů. S pomocí DNA-polymerasy a dNTP potom dochází k syntéze nové DNA podle komplementárního řetězce templátu ve směru 5'-3'. Cyklus se mnohokrát opakuje. Na PCR se používají polymerasy z termofilních bakterií, které vydrží i vysoké teploty (např. Taq, Pfu). Složení PCR směsi uvedeno v **Tabulce 2**, program PCR viz **Tabulka 3**.

Pro mutagenezi byla použita souprava Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA).

**Tabulka 2: Složení PCR směsi pro mutagenesi.**

	<i>Množství</i>	<i>koncentrace v 50 µl PCR směsi</i>
10x pufr Pfu Ultra HF	5 µl	
Templátová DNA	1 µl	
dNTP	2,5 µl	
10 mM primer Nth1_up	2 µl	400 µM
10 mM primer Nth1_down	2 µl	400 µM
Sterilní H <sub>2</sub> O	36,5 µl	
Pfu Ultra polymerasa HF	1 µl	2,5 U/µl

**Tabulka 3: Program PCR v termocykleru:**

1. fáze	95 °C	1 min
2. fáze	95 °C	30 s
3. fáze	49 °C	1 min
4. fáze	68 °C	12 min
5. fáze	68 °C	12min
6. fáze	4 °C	Neomezeně dlouho

*Fáze 2-4 byly opakovány 20x.*

## 5.2.2 Odstranění templátové DNA

DNA v bakteriích je methylovaná, aby se dala rozeznat od cizorodé DNA, která je odstraňována tzv. restriktivně-modifikačním systémem. Po skončení PCR obsahují buňky nově nasyntetizovanou DNA s požadovanou mutací a původní, templátovou DNA bez mutace, která je methylovaná a je potřeba jí odstranit. K tomu slouží restriktivní endonukleasa DpnI, která methylovanou DNA specificky štěpí. Původní DNA byla odstraněna přidáním 30 U (1,5  $\mu$ l) enzymu DpnI (20000 U/ml) a inkubací této směsi po dobu 90 minut při teplotě 37 °C.

## 5.2.3 TBE agarosová elektroforesa

TBE agarosová elektroforesa byla použita ke kontrole DNA vzniklé PCR reakcí.

1 % agarosový gel byl vyroben z 0,8 g agarosy a 80 ml 1xTBE pufru. Agarosa byla rozpuštěna zahříváním v Erlenmeyerově baňce v mikrovlnné troubě a poté opatrně zchlazena pod tekoucí vodou. Stále tekutá směs byla nalita do stojanu na horizontální elektroforesu, do ní byl vložen hřeben na vytvoření jamek. Po ztuhnutí gelu byl gel vložen do elektroforetické vany a převrstven 1xTBE pufrům. Do jamek byl nanesen standard velikostí DNA a vzorky PCR produktů (15  $\mu$ l PCR produkt+5  $\mu$ l 6xLoading Dye Solution (Fermentas)+10  $\mu$ l sterilní H<sub>2</sub>O.)

Přístroj byl připojen ke zdroji stejnosměrného napětí okolo 70 V, elektroforesa probíhala kolem 120 minut. Vizualizace DNA byla provedena vložením na 20 minut do roztoku ethidumbromidu (0,01 % w/v), který se specificky váže mezi jednotlivé báze DNA a je viditelný v UV záření.

Složení pufru:

**1x TBE pufr:** 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA pH 8,0

## 5.2.4 Transformace DNA do kompetentních buněk pomocí teplotního šoku

Aby se dostala DNA dovnitř buněk *E.coli* kde dále dochází k její replikaci nebo expresi, musí se provést transformace pomocí teplotního šoku, kdy se rozruší buněčné stěny a plasmidová DNA se dostane dovnitř.

Po odstranění methylované DNA a kontrole na TBE elektroforese se smíchalo 3  $\mu$ l vzniklé DNA se 30  $\mu$ l směsí kompetentních buněk *E. coli* TOP 10. Směs byla inkubována 20 minut na ledu (0 °C), poté byla ponořena na 45 sekund do vodní lázně o teplotě 42 °C (tzv. heat shock), opět inkubována na 2 minuty na ledu a nakonec bylo přidáno 300  $\mu$ l LB média o teplotě 37 °C a směs byla inkubována za konstantního třepání při 37 °C 1 hodinu.

Poté byla směs buněk sterilně rozetřena na Petriho misku s LB agarem, vytemperovanou na 37 °C a buňky byly ponechány přes noc v inkubátoru ve 37 °C. Složení tekutého a pevného LB média je uvedeno v **Tabulce 4**.

Tabulka 4: Složení tekutého a pevného LB média

<u>složení tekutého LB média</u>		<u>složení pevných agarosových misek s ampicilinem</u>	
trypton	10 g	trypton	10 g
kvasničný extrakt	5 g	kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g	NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 l	agar	15 g
vysterilizovat		H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 l
		Vysterilizovat	
		po ochlazení přidat ampicilin do finální koncentrace 100 $\mu$ g/ml	

## 5.2.5 Izolace plasmidové DNA

Z kolonií, vyrostlých přes noc na Petriho miskách, byla odebrána vždy jedna kolonie sterilní kličkou a přenesena do 5 ml tekutého LB média s antibiotikem ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml. Tato směs byla inkubována za konstantního třepání při 37 °C po dobu asi 15 hodin.

Další den byla z narostlé buněčné kultury provedena izolace plasmidové DNA pomocí sady JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN) podle podrobného návodu a s použitím předem připravených roztoků G1-G4, TE (složení viz níže). Stručný popis postupu:

1. Resuspendace buněk roztokem G1, který obsahuje RNAsu (úplná degradace RNA)
2. Lyze buněk roztokem G2, který obsahuje NaOH a SDS
3. Neutralizace octanem sodným, který působí precipitaci chromatinové DNA a nežádoucích proteinů; jejich odstranění centrifugací
4. Supernatant s volnou DNA přenesen na kolonku, která byla 2x promytá ethanolem
5. Eluce plasmidové DNA z kolonky TE pufrem vytemperovaným na 65 °C

Následně byla DNA zaslána na sekvenaci a v případě úspěšného ověření mutace byla transformována do expresních kmenů *E. coli*.

### Složení používaných roztoků:

- **G1:** 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A
- **G2:** 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)
- **G3:** acetát a guanidin chlorid
- **G4:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl
- **TE:** pufr 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

## 5.2.6 Transformace DNA do expresních kmenů *Escherichia coli*

Pro expresi rekombinantních proteinů byl použit tzv. bakteriální expresní systém. Oproti jiným systémům (např. kvasinkovému, z hmyzích nebo savčích buněk) má výhodu rychlého buněčného růstu, minimálních požadavků na růstové médium a velkého množství exprimovaného proteinu. Na druhou stranu ovšem exprimuje proteiny bez post-translačních modifikací, které se v případě potřeby musí vytvářet dodatečně. V tomto případě byly použity geneticky modifikované bakterie *E. coli*, kmeny BL21(DE3) a Rosetta.

### 5.2.6.1 Kmeny BL21(DE3) a Rosetta<sup>TM</sup>

BMH1 a BMH2 byly transformovány do kmenu BL21(DE3). Gen DE3 v těchto buňkách spouští syntézu T7 polymerasy. Buňky dále obsahují gen *lacI*, který kóduje tzv. lac represor; ten v nepřítomnosti induktoru IPTG nasedá na tzv. lac promotor, což je protomor genu DE3. Lac promotor tedy zabraňuje syntéze T7 RNA polymerasy dokud se nepřidá induktor IPTG, který na sebe naváže lac represor a tím se spustí syntéza T7 RNA polymerasy a tím i transkripce rekombinantního proteinu.

NTH1 byla transformována do buněk Rosetta<sup>TM</sup>. Jedná se o kmen BL21, modifikovaný pro expresi eukaryotických proteinů v bakteriálních buňkách, který obsahuje navíc sedm tRNA kodonů, které se málokdy vyskytují v *E. coli*. Díky tomu tento kmen zprostředkovává „univerzální“ translaci v případech, kdy by byla translace limitována kodony vlastními *E. coli*. Tento kmen obsahuje resistenci na chloramfenikol. Kmen Rosetta byl pro Nth1 použit z toho důvodu, že její výtěžky v kmenu BL21(DE3) byly nízké a exprese neefektivní.

### 5.2.6.2 Transformace

Transformace BMH1, BMH2 a NTH1 do bakterií *E. coli* BL21(DE3) a Rosetta byla provedena metodou teplotního šoku, viz kap. 5.2.4.

## **5.2.7 Pěstování buněk a glycerolový roztok bakteriální kultury**

Z misek s narostlou bakteriální kulturou byly kolonie sterilně přeneseny do 5 ml tekutého LB média (37 °C), které obsahovalo v případě Bmh proteinů ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml, v případě Nth1 ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml a chloramfenikol o finální koncentraci 100 µg/ml. Směs byla inkubována za konstantního třepání 200 rpm při 37 °C po dobu asi 15 hodin.

Narostlé kultury byly buď použity na expresi proteinů (viz níže) nebo na výrobu glycerolových roztoků. Pro uchování neporušených buněk při dlouhodobém skladování buněčných kultur se k buňkám přidává sterilní glycerol do finální koncentrace 30 %. K 700 µl narostlé buněčné kultury se přidalo 300 µl sterilního glycerolu a po promíchání byla směs uložena do -80 °C.

## **5.2.8 Exprese a purifikace rekombinantních proteinů Bmh1**

### ***5.2.8.1 Heterologní exprese proteinů Bmh v E. coli***

Narostlá bakteriální kultura Bmh1 nebo Bmh2 ve vektoru pET-15b v buňkách BL21(DE3) byla přenesena do bání s 1 l tekutého LB média obsahující ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml a inkubována za konstantního třepání 200 rpm při teplotě 37 °C. Průběžně byla měřena absorbance při vlnové délce 600 nm a po dosažení absorbance 0,8 byla provedena indukce IPTG do finální koncentrace 0,5 mM. Exprese probíhala za konstantního třepání při 37 °C po dobu asi 20 hodin.

Poté byly buňky centrifugovány 20 min při teplotě 4 °C při otáčkách 3400 rpm (rotor S6/6,6). Pelety byly vortexem resuspendovány ve 2x lyzačním pufru a následně byly zamrazeny, aby došlo k rozrušení buněčných stěn před sonikací. Na peletu z 1 l bylo použito asi 30 ml lyzačního pufru.



#### Složení pufrů:

**2x lyzační pufr:** 1x PBS pH 7,4, 1 M NaCl, 2 mM imidazol, 4 mM  $\beta$ -merkapt ethanol

**1x PBS pufr:** 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH upravit na 7,4

### **5.2.8.2 Sonikace buněk**

Při sonikaci se pomocí ultrazvuku rozrušují buněčné stěny bakterií, aby mohl být rekombinantní protein uvolněn do roztoku. Suspenze buněk v 2x lyzačním pufru se nechala rozmrazit na ledu a poté se k ní přidal lysozym do finální koncentrace 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Lysozym je enzym, který se získává z vaječných bílků a má antibiotické účinky díky štěpení peptidoglykanů buněčné stěny bakterií. Suspenze s lysozymem byla inkubována za stálého míchání 20 min při 4 °C.

Samotná sonikace probíhala na sonikátoru Sonicator3000 Misonix (Cole-Palmer, USA) při teplotě 0 °C následovně:

Pulsy 10 s (výkon 57 W)

Pauzy 20 s

Cyklus probíhal do celkových 20 min sonikace.

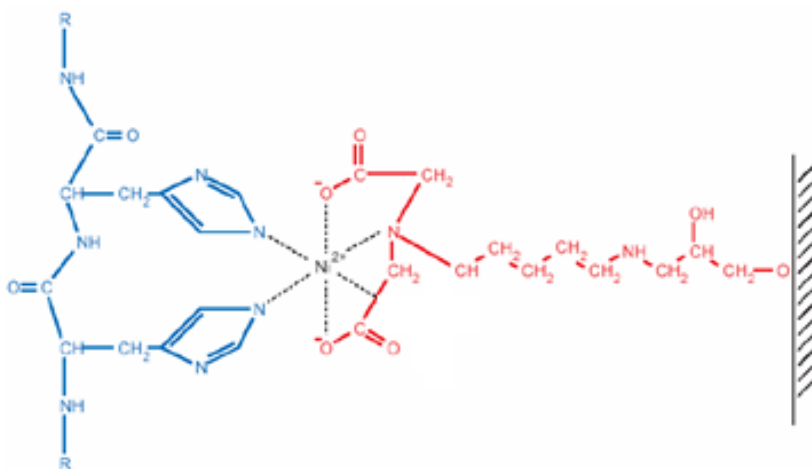
V průběhu byl proces sonikace několikrát přerušen a suspenze promíchána.

Po ukončení sonikace byl tzv. sonikát centrifugován po dobu 45 min při teplotě 4 °C a otáčkách 135000 rpm (rotor 3746). Supernatant, který obsahoval rekombinantní proteiny, byl použit pro afinitní chromatografii nebo skladován při -80 °C.

### **5.2.8.3 Niklová chelatační chromatografie**

Niklová chelatační chromatografie patří mezi afinitní chromatografie. Je to metoda, založená na interakci iontů přechodných kovů s ligandy. Jako stacionární fáze se používá chelataující sepharosa (iminodiacetát-sepharosa, Amersham Biosciences, Švédsko) a na ní navázané dvoumocné kationty niklu  $\text{Ni}^{2+}$  (viz **obr. 5.3**). Na ionty  $\text{Ni}^{2+}$ , které jsou

chelátovány iminodiacetátem, se váží rekombinantní proteiny, obsahující histidinovou kotvu (šest histidinů v řadě za sebou).



**Obr. 5.3:** Interakce mezi histidinem a niklovo-sepharosovou maticí

Kolonka naplněná chelatující sepharosou (5 ml) byla připojena k peristaltické pumpě a byla promývána rychlostí 3 ml/min a promyta vodou.

Postup promývání kolonky:

1. 15 ml H<sub>2</sub>O
2. 60 ml 0,1 M NiSO<sub>4</sub> – aktivace kolony a navázání Ni<sup>2+</sup> na sepharosu
3. 15 ml H<sub>2</sub>O
4. 15 ml pufru E
5. supernatant získaný centrifugací po sonikaci buněk – navázání proteinů s histidinovou kotvou
6. 60 ml pufru E
7. 60 ml 10 % pufru F v pufru E (0,06 M imidazol) – odstranění nespecificky vázaných proteinů
8. Eluce 100 % pufrum F (0,6 M imidazol)

Proteiny byly eluovány bez použití peristaltické pumpy. Eluát se jímá do zkumavek eppendorf po rysku, tedy 1,5 ml, celkem deset frakcí. Zkumavky byly umístěny v ledu (0 °C), kolonka byla chlazená navlhčenou buničinou.

Následně byla provedena SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9) pro kontrolu kvality a čistoty proteinů. Regenerace kolonky byla provedena promytím vodou a Stripp solution. Pro uchování byla sepharosa skladována ve 20 % roztoku ethanolu.

Složení pufrů a roztoků:

**Pufr E:** 1xPBS; 0,5 M NaCl; 1 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkapt ethanol; pH nesmí být nižší než 7,4

**Pufr F (pH 8):** 1xPBS; 0,5 M NaCl; 0,6 M imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkapt ethanol; 10 % (w/v) glycerol

**Stripp solution:** 0,5 M NaCl; 0,1 M EDTA

#### **5.2.8.4 Dialýza**

Dialýza je děj, při které přechází látky přes polopropustnou membránu z části o vyšší koncentraci do části o nižší koncentraci. Při purifikaci proteinů se dialýza používá jako metoda k odfiltrování nízkomolekulárních látek z roztoku proteinu (např. imidazolu).

Roztok proteinu byl umístěn do polopropustné membrány (cut-off 14000) a membrána byla vložena do 1 l pufru, umístěna do 4 °C a dialýza probíhá za stálého míchání po dobu asi 15 hod.

Složení pufru:

**Dialyzační pufr** (po niklové chelatační chromatografii): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -merkapt ethanol; 10 % (w/v) glycerol

#### **5.2.8.5 Thrombinové štěpení**

Histidinová kotva na N-konci Bmh proteinů byla odštěpena thrombinem. Thrombin je proteasa, která rozpoznává sekvenci Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser a specificky štěpí peptidovou vazbu mezi Arg a Gly, čehož využívá mnoho vektorových systémů. Do dialyzační membrány byly přidány 2 U thrombinu na 1 mg proteinu a dialýza probíhala 24 hod za stálého míchání při 4 °C.

Kontrola odštěpení histidinové kotvy byla provedena pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9). Thrombin byl z roztoku s proteinem odstraněn přes benzamidinovou kolonku.

Složení pufru:

**Dialyzační pufr** (pro thrombinové štěpení): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % (w/v) glycerol

### ***5.2.8.6 Aniontově výměnná chromatografie***

Iontově výměnná chromatografie využívá afinitu iontů (v tomto případě proteinů) k měniči. Proteiny 14-3-3 jsou kyselé, při pH 8,0, které se používá v aniontové chromatografii, mají tedy záporný náboj a vážou se na kvarterní amonium Mono-Q Sepharosy. Kolona o objemu 1 ml byla naplněna pevnou fází MonoQ Sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko) a připojena k přístroji HPLC AKTAprime™ (Amersham Biosciences). Ke zpracování výsledných dat byl použit program Unicorn 5.01.

Kolona se ekvilibrovala pufrém HQ-E pH 8,0 a poté na ní byl nanášen vzorek při průtokové rychlosti 1 ml/min. Následně byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl (od 0 M do 1 M NaCl) (pufr HQ-F) do šestinásobku délky kolony. Tlak v koloně byl 0,4 MPa, pufrы byly vychlazeny na 4 °C. Frakce byly jímány po 1,5 ml.

Následně byly frakce naneseny na gel SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9) kvůli kontrole čistoty. Roztok proteinů byl dále purifikován.

Složení pufrů:

**Pufr HQ-E:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM DTT

**Pufr HQ-F:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 M NaCl; 1 mM DTT

### ***5.2.8.7 Zakoncentrování proteinu***

Zakoncentrování vzorků bylo prováděno ultrafiltrací v koncentrátoru Centricon YM-10 (Millipore, USA), v Centrifuge 5804R s rotorem A-4-44 při 4 °C, 2500 rpm, po dobu přibližně 15 minut, dokud roztok proteinu nedosáhl 0,5 ml.

### **5.2.8.8 Gelová permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie slouží k dělení molekul podle velikosti, v tomto případě tedy k odstranění nečistot, zejména agregátů proteinů, které se nahromadily během předchozích purifikačních kroků. Z kolony jsou vymývány nejdříve velké molekuly, které nemohou pronikat do pórů gelu a teprve poté menší molekuly, které difundují do gelu.

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na přístroji AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC, na kterém byla připojena kolona Superdex 75 10/300 (Amersham Biosciences, Švédsko). Na vyhodnocování dat byl používán program Unicorn 5.01, který se dodává spolu s přístrojem.

Kolona byla nejdříve promyta vodou a následně ekvilibrována pufrem při průtokové rychlosti 0,5 ml/min, dokud se neustálila vodivost. Poté bylo na kolonu nanášeno 0,5 ml vzorku. Dělení vzorku probíhalo ve stejném pufru jako ekvilibrace kolony při rychlosti 0,5 ml/min. Pufř byl vychlazen na 4 °C, tlak v koloně byl 0,43 MPa. Frakce byly jímány po 0,5 ml.

Následně byly frakce nanášeny na gel SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9), kvůli kontrole čistoty a vybrané frakce se sloučily. Stanovení koncentrace proteinů se provádělo na spektrofotometru Agilent měřením absorbance roztoku při vlnové délce 280 nm. Extinkční koeficienty při vlnové délce  $\lambda = 280$  nm byly stanoveny pomocí programu ProtParam tool na serveru [www.expasy.org](http://www.expasy.org), molekulová hmotnost monomeru Bmh1 je 30 kDa (viz **Tabulka 5** na straně 65).

Dlouhodobě se proteiny uchovávají při -80 °C.

Složení pufru: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % (w/v) glycerol; 5 mM DTT

### **5.2.8.9 Vertikální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE (z anglického Sodium Dodecyl Sulfate Polyacril Amide Gel Electrophoresis) byla prováděna po každém purifikačním kroku z důvodu kontroly čistoty

proteinů a výběru vhodných frakcí. Jedná se o elektromigrační metodu, která separuje nabitě částice v elektrickém poli podle velikosti. Dodecyl síran sodný proteiny denaturuje a dodá všem záporný náboj, takže se v elektrickém poli pohybují všechny od katody k anodě. Velké molekuly se v polyakrylamidovém gelu pohybují pomaleji než malé molekuly.

Byla sestavena aparatura (Bio-Rad, USA) a poté byl připraven roztok 15 % separačního gelu, který se nalil mezi skla a převrstvil isopropanolem. Po zpolymerování gelu byl isopropanol vylit a převrstven roztokem zaostřovacího gelu, do kterého se vložil hřebínek na vytvoření jamek. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl hřebínek opatrně vyjmut.

Do žlábků po hřebínku byl nanesen standard molekulových hmotností (Bio-Rad, USA), který obsahuje fragmenty o molekulové hmotnosti 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa a vzorky. Ty byly nejdříve smíchány s 5x vzorkovým pufrům, který obsahuje  $\beta$ -merkapt ethanol, který rozrušuje terciární a kvarterní proteinové struktury a poté povařeny asi 1 min ve vodní lázni o teplotě 100 °C. Standard molekulových hmotností a vzorky po povaření byly na gel nanášeny Hamiltonovou pipetou.

Elektroforesa byla prováděna na přístroji Consort EV 243 (Sigma-Aldrich, USA) o použitém napětí 200 V po dobu asi 1 hod. Pro separaci Bmh1 proteinu byly použity 15 % gely. Po ukončení elektroforesy byla aparatura rozebrána, gel opatrně sundán a obarven v barvicím roztoku po dobu asi 1 hod a poté odbarven v odbarvovacím roztoku.

#### Složení gelů a roztoků:

**Separací gel (15 %):** 3,75 ml směsi akryl/bis-akrylamid; 2 ml pufru pro separační gel; 1,75 ml vody; 75  $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného; 8  $\mu$ l TEMED

**Zaváděcí gel (4 %):** 0,5 ml směsi akrylamid/bis-akrylamid; 1 ml pufru pro zaváděcí gel; 2,25 ml vody; 75  $\mu$ l 10 % peroxodisíranu amonného; 8  $\mu$ l TEMED

**Směs akrylamid/bis-akrylamid:** 29,2 g akrylamidu; 0,8 g bis-akrylamidu; doplnit vodou do 100 ml

**Pufr pro separační gel:** 75 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 4 ml 10 % SDS; 21 ml vody

**Pufr pro zaváděcí gel:** 50 ml Tris-HCl (pH 6,8); 4 ml 10 % SDS; 46 ml vody

**Vzorkový pufr (5x koncentrovaný):** 0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 5 ml 50 % glycerolu; 2 ml 10 % SDS; 0,5 ml  $\beta$ -merkapt ethanol; 1 ml 10 % bromfenolové modři; 0,9 ml vody

**Vodící pufr pro elektroforesu (1x):** 25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM glycin; 0,1 % SDS

**Barvicí roztok:** 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250; 450 ml methanolu; 100 ml ledové kyseliny octové; 450 ml vody

**Odbarvovací roztok:** 100 ml methanolu; 100 ml ledové kyseliny octové; 800 ml vody

## **5.2.9 Exprese a purifikace rekombinantního proteinu Nth1 WT a jeho mutantů**

Expresa a purifikace neutrální trehalasy 1 a jejích mutantů probíhaly stejným způsobem jako purifikace Bmh1, s rozdíly v postupu způsobenými rozdílnou velikostí, stabilitou a pI proteinu.

### ***5.2.9.1 Heterologní exprese proteinu Nth1 v E. coli***

Narostlá bakteriální kultura Nth1 ve vektoru pET-32b v buňkách Rosetta<sup>TM</sup> byla přenesena do bání s 1 l tekutého LB média obsahující ampicilin o finální koncentraci 100  $\mu$ g/ml a chloramfenikol o finální koncentraci 34  $\mu$ g/ml a inkubována za konstantního třepání 200 rpm při teplotě 37 °C. Průběžně byla měřena absorbance při vlnové délce 600 nm a po dosažení absorbance 0,6 byla provedena indukce IPTG do finální koncentrace 0,5 mM. Expresa probíhala za konstantního třepání při 25 °C po dobu asi 16 hodin.

Postup a složení pufrů viz kap. 5.2.8.1.

### **5.2.9.2 Sonikace buněk**

Suspenze buněk v 2x koncentrovaném lyzačním pufru se nechala rozmrazit na ledu a poté se k ní přidal lysozym do finální koncentrace 100 µg/ml. Suspenze s lysozymem byla inkubována za stálého míchání 20 min při 4 °C a poté do ní byl přidán 1 ml 0,1 M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluorid; inhibitor serinových proteas) a jedna rozpuštěná tableta Inhibitor proteas v 1 ml pufru E (viz kap. 5.2.8.2).

Samotná sonikace probíhala na sonikátoru Sonicator3000 Misonix (Cole-Palmer, USA) při teplotě 0 °C následovně:

Pulsy 3 s (výkon 57 W)

Pauzy 17 s

Cyklus probíhal do celkových 15 min sonikace.

V průběhu byl proces sonikace několikrát přerušen a suspenze promíchána.

Další postup viz kap. 5.2.8.2.

### **5.2.9.3 Niklová chelatační chromatografie**

Postup niklové chelatační chromatografie a složení pufrů viz kap. 5.2.8.3. Po navázání Nth1 na niklové ionty byla kolonka promyta 400 ml pufru E (krok č. 6).

### **5.2.9.4 Dialýza**

Frakce vybrané po SDS-PAGE byly dialyzovány přes noc proti pufru, viz kap. 5.2.8.4.

### **5.2.9.5 Thrombinové štěpení**

Z N-konce Nth1 bylo třeba odstranit histidinovou a thioredoxinovou kotvu lidským thrombinem. Bylo použito 5 U thrombinu na 1 mg proteinu. Thrombin se přidal do dialyzační membrány k proteinu a dialýza probíhala po dobu 8 hod za stálého míchání při 4 °C. Poté byla membrána přenesena do 1 l pufru E pro kationtovou výměnu, kde byla za



stálého míchání ve 4 °C inkubována po dobu asi 12 hod. Kontrola odštěpení kotvy byla provedena pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9) a thrombin byl odstraněn přes benzamidinovou kolonku.

Složení pufřů:

**Dialyzační pufr** (pro thrombinové štěpení): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % (w/v) glycerol

**Pufr E pro kationtovou výměnu (pH 6):** 50 mM kyselina citrónová; 1 mM EDTA; 2 mM DTT

### ***5.2.9.6 Kationtově výměnná chromatografie***

Iontově výměnná chromatografie využívá afinitu iontů (v tomto případě proteinů) k měniči. Nth1 s odstraněnou thioredoxinovou a thrombinovou kotvou má pI 7,69. Pokud je pH pufru < pI proteinu, má protein kladný náboj a lze ji separovat na katexu, v tomto případě na MonoS Sepharose. Kolona o objemu 1 ml byla naplněna pevnou fází MonoS Sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko) a připojena k přístroji HPLC AKTAprime™ (Amersham Biosciences), chromatografie probíhala v prostředí pH 6 (viz pufr E.) Ke zpracování výsledných dat byl použit program Unicorn 5.01.

Kolona se ekvilibrovala pufr E pH 6,0 a poté na ní byl nanášen vzorek při průtokové rychlosti 1 ml/min. Následně byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl (od 0 M do 1 M NaCl) (pufr F) do šestinásobku délky kolony. Tlak v koloně byl 0,4 MPa, pufrы byly vychlazeny na 4 °C. Frakce byly jímány po 1,5 ml.

Následně byly frakce naneseny na gel SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9) kvůli kontrole čistoty. Roztok proteinů byl dále purifikován.

Složení pufřů:

**Pufr E pro kationtovou výměnu (pH 6):** 50 mM kyselina citrónová; 1 mM EDTA; 2 mM DTT

**Pufr F pro kationtovou výměnu:** 50 mM kyselina citrónová; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 1 M NaCl

### 5.2.9.7 Zakoncentrování proteinu

Roztok proteinů byl před gelovou permeační chromatografií zakoncentrován viz kap. 5.2.8.7.

### 5.2.9.8 Gelová permeační chromatografie

Princip a postup metody viz kap. 5.2.8.8, byla použita kolona Superdex 200.

Koncentrace proteinu byla určena spektrofotometricky při 280 nm. Extinční koeficient byl stanoven pomocí serveru [www.expasy.org](http://www.expasy.org) a programu ProtParam. Extinční koeficienty a molekulová hmotnost proteinů viz **Tabulka 5**.

*Tabulka 5: Extinční koeficienty a relativní molekulová hmotnost proteinů Bmh1 a Nth1.*

<i>Protein</i>	<i>Extinční koeficient při <math>\lambda 280 \text{ nm}</math> [<math>\text{dm}^3 \text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}</math>]</i>	<i>Relativní molekulová hmotnost [Da]</i>
Bmh1 WT s odštěpenou histidinovou kotvou	0,960	30091
Bmh1 WT s histidinovou kotvou	0,907	31842
Bmh2 WT s odštěpenou histidinovou kotvou	0,930	31061
Bmh2 WT s histidinovou kotvou	0,868	33266
Nth1 WT s odštěpenou histidinovou a thioredoxinovou kotvou	1,487	86453
Nth1 WT s histidinovou a thioredoxinovou kotvou	1,422	100218

### 5.2.10 Fosforylace Nth1

Pro účely dalšího měření byla neutrální trehalasa 1 WT a její mutanty fosforylovány PKA. K roztoku proteinu se přidalo 0,75 M ATP, 20 mM  $\text{MgCl}_2$  a 80 U PKA (Promega) na 1 mg proteinu. Směs byla inkubována 2 hod ve vodní lázni o teplotě 30

°C a poté 15 hod při 4 °C. Fosforylace byla ověřena jak pomocí hmotnostní spektroskopie, tak pomocí nativní elektroforesy.

### **5.2.11 Hmotnostně spektrometrická analýza Nth1**

Hmotnostně spektrometrická (MS) analýza Nth1 byla prováděna pro kontrolu aminokyselinové sekvence proteinu a zejména kvůli určení fosforylačních míst. Tato analýza byla provedena doc RNDr. M. Šulcem, Ph.D., z Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze, katedra Biochemie.

Konkrétní protein byl nejdříve nanesen na 8 % gel SDS-PAGE (viz kap. 5.2.8.9.) Ze zón migrace se separovaly části odpovídající molekulové hmotnosti proteinu, které byly přímo na gelu štípány trypsinovou endoproteasou (Promega.) Cysteiny byly modifikovány iodoacetamidem, aby se nemohly vytvářet disulfidové vazby. Vzniklé směsi peptidů byly extrahovány 30 % acetonitrilem a 0,1 % trifluoroctovou kyselinou. Měření bylo prováděno na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru UltraFLEX III (Bruker-Daltonics, Německo) s dusíkovým laserem (337 nm). Spektra byla kalibrována na základě podobných monoisotopických iontů rekombinantních proteinů se známou sekvencí nebo monoisotopických iontů z PepMixII kalibrantu (Bruker-Daltonics, Německo).

### **5.2.12 Analytická centrifugace (AUC)**

Sedimentační analýza, prováděná na analytické ultracentrifuze, slouží k charakterizaci částic z hlediska jejich molekulové hmotnosti, sedimentačního koeficientu a hydrodynamických vlastností, což vede k určení velikosti, tvaru a distribuci částic a také k určení rovnovážných konstant. Pomáhá také při určení stechiometrie vazby a síly interakce mezi molekulami. V tomto případě sloužila AUC k objasnění charakteru a stechiometrie komplexu Bmh1:Nth1.

Experiment byl prováděn na přístroji ProteomLab XL-I (Beckman Coulter) RNDr. L. Řežábkovou, Ph.D., z Přírodovědecké fakulta University Karlovy v Praze, katedra Biofyzikální chemie. Vzorky byly dialyzovány proti pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl a 2 mM  $\beta$ -merkptoethanol těsně před analýzou. Samotné měření sedimentačních koeficientů proteinů Bmh1, Nth1 WT a Nth1 mutantů bylo prováděno při

koncentracích 0,5 – 10  $\mu\text{M}$ , ve 20 °C a rychlosti rotoru 42000 nebo 48000 rpm. Data byla naměřena při vlnové délce 280 nm a zpracována pomocí programů SEDFIT a SEDPHAT.

### 5.2.13 Limitovaná proteolýza

Další metodou, která objasňuje charakter interakce a stability proteinů, je limitovaná proteolýza. Konkrétně se jednalo o rozdíl v rychlosti a způsobu štěpení Nth1 samotné a v komplexu s Bmh1.

Vzorky proteinů obsahovaly 50  $\mu\text{g}$  Nth1 nebo pNth1 (fosforylovaná Nth1), nebo 30  $\mu\text{g}$  Bmh1 (molární objem mezi Nth1 a Bmh1 byl 1:2) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT a 10 % w/v glycerol. Byly inkubovány ve 25 °C s 50 ng trypsinu nebo chymotrypsinu v poměru w/w proteasa/protein přibližně 1:1000. V různých časových úsecích od 0 do 30 min byla reakce zastavena přidáním SDS-PAGE a varem. Polypeptidy byly separovány na 10 % SDS-PAGE gelu a obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (viz kap. 5.2.8.9). Polypeptidy Nth1 a pNth1 byly analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (viz kap. 5.2.11).

### 5.2.14 Měření enzymové aktivity *in vitro*

Enzymová aktivita neutrální trehalasy 1 byla měřena pro WT a všechny mutanty, k identifikaci serinů, zodpovědných za vazbu k Bmh a tím aktivaci enzymu. Byla použita enzymová stop-analýza, která měří produkci glukosy (kterou vytváří aktivní Nth1 z trehalosy) pomocí Amplex<sup>®</sup> Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit (Invitrogen).

Tento experiment je založen na spřažených enzymových reakcích. Kit obsahuje enzymy b-glukosidasu, glukosooxidasu a křenovou peroxidasu, substrátem je Amplex UltraRed. Glukosa je pomocí glukosa oxidasy přeměněna na D-glukonolakton a peroxid vodíku, který reaguje pomocí křenové peroxidasy s Amplex UltraRed za vzniku barevného resorufinu, který je detekovatelný při vlnové délce 571 nm. Množství glukosy je ekvimolární výslednému produktu resorufinu.

Proteiny byly v pufru 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 % (w/v) glycerol, s přidavkem trehalosy 0-30 mM, ve finální koncentraci 80 nM Nth1 a 12  $\mu\text{M}$

Bmh. Objem reakční směsi byl 50  $\mu$ l, ke 40  $\mu$ l roztoku proteinu (samotné Nth1 nebo směs Nth1+Bmh) bylo po inkubaci 5 min ve 30 °C přidáno 10  $\mu$ l roztoku trehalosy o určité koncentraci. Směs byla promíchána a inkubována při 30 °C po dobu 30 s. Reakce byla zastavena varem po dobu 3 min.

Ke každému vzorku bylo poté přidáno 50  $\mu$ l roztoku Amplexu, který detekuje uvolněnou glukosu, dle návodu výrobce. Směs byla inkubována 40 min při 37 °C a data byla naměřena při vlnové délce 571 nm. Výsledné hodnoty byly proloženy rovnicí Michaelise a Mentenové v programu Origin 8.0 (OriginLab Corp., USA).

### 5.2.15 Cirkulární dichroismus (CD spektroskopie)

Cirkulární dichroismus (dále CD) je důsledek optické aktivity roztoku biomolekul. Pomocí CD se měří rozdíl v absorbanci pro levotočivé a pravotočivé kruhově polarizované světlo, což je způsobeno chiralitou samotné molekuly či chiralitou prostředí. Proteiny obsahují mnoho chromoforů, které mohou zvýšit CD signál. Jedná se o aromatické kyseliny (fenylalanin, tyrosin, tryptofan), dihedrální úhel disulfidických vazeb, některé neproteinové části (hem, flavin, bakteriochlorofyl ad.) či navázané ligandy.

CD spektra se měří v oblasti tzv. vzdáleného UV (240-180 nm), což koresponduje s absorpcí způsobenou peptidovými vazbami. V této oblasti dá analýza CD spekter informace o sekundární struktuře proteinu –  $\alpha$ -helixech a  $\beta$ -skládaných listech. CD spektra se dále mohou měřit v oblasti tzv. blízkého UV (320-260 nm), kde absorbují zbytky aromatických aminokyselin a tím můžeme získat informace o terciární struktuře proteinu.

Díky relativní nenáročnosti měření CD spekter je tato metoda často využívána pro charakterizaci proteinů, jejich struktury, strukturních změn a interakcí protein-ligand. Dále se pomocí CD spekter určuje také stabilita proteinů, strukturní integrita membránových proteinů a dynamika proteinového sbalování (*Kelly, S.M., Price, N.C., 2000*). V této práci byla tato metoda použita na zpřesnění údajů o strukturních změnách na proteinech Nth1 a Bmh1 před a po vytvoření vazby.

CD spektra ve vzdálené oblasti UV byla měřena na přístroji J-810 spektropolarimetr (Jasco, Japonsko) Ing. Pavlínou Novotnou z Ústavu analytické chemie, VŠCHT. Vzorky v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -

merkapt ethanol a 10 % (w/v) glycerol, byly umístěny v křemenné kyvetě s optickou dráhou dlouhou 1 mm (Starna, USA). Koncentrace Bmh1 byla 0,089 mg/ml, koncentrace pNth1 a Nth1 byla 0,145 mg/ml. Měření probíhala při pokojové teplotě (23 °C).

Experiment probíhal za následujících podmínek: spektrální oblast 200-260 nm, skenovací rychlost 10 nm/min, čas reakce 8 s, rozlišení 1 nm, šířka pásma 1 nm a citlivost 100 mdeg (millidegree). Finální spektrum bylo získáno jako průměr pěti naměřených spekter. Spektra byla korigována na základní křivku odečtením spekter naměřených v roztoku neobsahujícím proteiny. Po korekci základní křivky byla finální spektra vyjádřena jako průměrná elipticita (stupeň odchylky elipsy od kruhu)  $Q_{MRW}$  ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) a byla vypočtena za pomoci Rovnice 1.

$$[Q]_{MRW} = \frac{\theta_{obs} \times 100 \times M_w}{c \times l \times N_R} \quad \text{Rovnice 1}$$

kde  $\theta_{obs}$  je pozorovaná elipticita v mdeg,  $c$  je koncentrace proteinu v mg/ml,  $l$  je délka optické dráhy v cm,  $M_w$  je molekulová hmotnost proteinu a  $N_R$  je počet aminokyselin v proteinu. Složení sekundární struktury proteinu bylo určeno pomocí nástrojů a programů z internetové stránky Dichroweb K2D.

CD spektra v blízké UV oblasti byla měřena v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm (Starna, USA) v oblasti vlnové délky 250-320 nm. Koncentrace Bmh1 byla 0,447 mg/ml, koncentrace pNth1 byla 0,69 mg/ml. Postup měření byl stejný jako při měření ve vzdálené UV oblasti.

## 5.2.16 Modelování molekul

Třidimenzionální model katalytické domény kvasničné neutrální trehalasy 1 (sekvence aminokyselin 295-721) byl vygenerován pomocí programu DeepView v4.0.4, a serveru SWISS-MODEL. Jako templát byla použita krystalová struktura trehalasy Tre37A z *E. coli* (PDB kód 2JF4, sekvence 145-533). Katalytická doména Nth1 a Tre37A jsou identické ve 27 % sekvence a podobné ve 42 % sekvence. Konečný model byl validován pomocí programu PROCHECK, nevhodné kontakty byly opraveny manuálně v programu Coot.

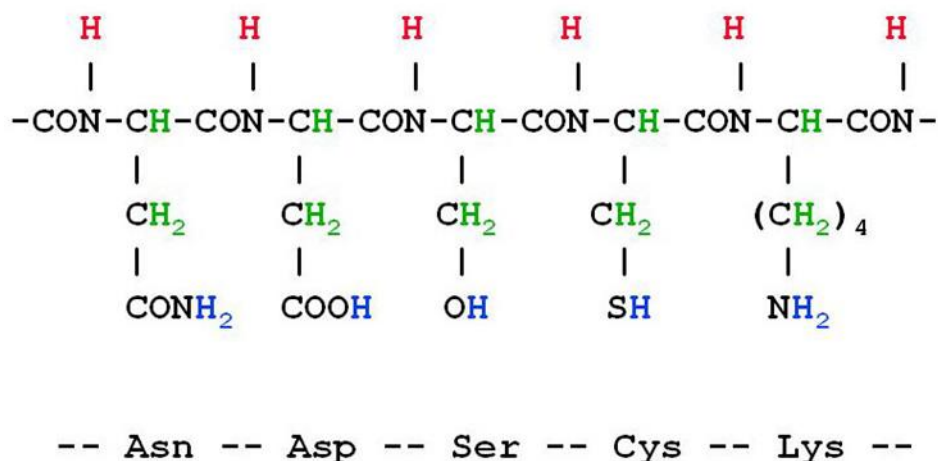
Třídídimenzionální model proteinu Bmh1 (sekvence 4-236) byl vygenerován za použití stejného postupu. Jako templáty byly použity známé krystalové struktury několika isoform proteinů 14-3-3 (PDB kódy: 1A4O, 1YZ5, 2B05, 2BTP, 2C63, 2BR9).

Oba modely byly dále experimentálně ověřeny pomocí chemického zesíťování, prováděného s homo-bifunkčními zesíťovacími činidly DSS a DSG, které spojují a kovalentně modifikují lysinové zbytky.

### **5.2.17 Vodíko-deuteriová (H/D) výměna spojená s hmotnostní spektrometrií**

Výměna vodíku za deuterium v proteinovém řetězci a následná analýza na hmotnostním spektrometru je stále se rozvíjející biofyzikální metodou zkoumání proteinů. Vodíko-deuteriová (dále H/D) výměna dává informace o struktuře proteinu, změnách struktury po navázání ligandu, sbalování proteinu i dynamice. Protože z těchto vlastností vychází funkce proteinu, pomáhá H/D výměna objasňovat i funkční vlastnosti proteinu.

Principem H/D výměny je schopnost vodíkových atomů výměny za atomy deuteria (v pufru obsahujícím deuterium.) Vodíkových atomů v proteinovém řetězci jsou tři různé druhy (viz **obr. 5.4**): 1. vodíkové atomy, navázané na uhlík, které téměř nejsou schopny výměny, 2. vodíkové atomy na postranních řetězcích aminokyselin, které se vyměňují tak rychle, že jejich detekce je nemožná a 3. vodíkové atomy, které jsou součástí peptidové vazby, a jejich výměna probíhá v měřitelném čase; jejich výměna za deuterium se v této metodě zkoumá.



**Obr. 5.4:** Vodíkové atomy označené zeleně se v zásadě nevyměňují, modře označené se mění pro detekci příliš rychle, měří se výměna červeně označených vodíkových atomů.

Rychlost a efektivita H/D výměny je výsledkem přístupu rozpouštědla k proteinovému řetězci. Pokud je určitá část proteinu rozpouštědлу vystavená, bude docházet k H/D výměně, pokud je naopak pohřbená uvnitř molekuly, k H/D výměně nedojde (nebo velice pomalu). Detekci H/D výměny se tedy zjišťuje uspořádání proteinu, způsob interakce s vazebným partnerem či sbalování proteinu v čase.

Na detekci H/D výměny se používá hmotnostní spektrometrie. Vzorek je přenesen do rozpouštědla s deuteriem čímž začne H/D výměna při neutrálním pH, a poté je v určitých časech zastavena snížením pH na 2,5 nebo snížením teploty na 0 °C. Vzorek je poté analyzován na kapalinovém chromatografu spojeném s hmotnostním spektrometrem. Analýzou dat se poté zjistí, jak moc jsou jednotlivé peptidy deuterovány v různých časech a tím dojde k objasnění strukturní konformace proteinu (Engen, J.R., 2009).

H/D výměna byla prováděna u proteinů Bmh1, pNth1 a pNth1 s Bmh1 v poměru 1:2. Vzorek byl 10x naředěn deuterovaným puforem, který obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH/pD 7,5), 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 200 mM NaCl a 10 % (w/v) glycerol. Finální koncentrace proteinu Bmh1 byla 3,16 μM, finální koncentrace pNth1 byla 1,6 μM. Alikvóty o objemu 80 μl byly odebírány v časech 30 s, 1 min, 10 min, 30 min, 1 hod, 3 hod a 5 hod H/D výměny. Reakce byla zastavena přidáním 20 μl 0,1 M HCl a okamžitým zmrazením v tekutém dusíku.



Analýza deuterovaných vzorků (HPLC-MS) byla prováděna na HPLC (1200 Agilent Technologies, Německo), připojeném na ESI-FT-ICR hmotnostní spektrometr (9.4T APEX-Ultra, Bruker Daltonics, USA) (viz **obr. 5.5**) ve spolupráci s RNDr. Petrem Manem, Ph.D. z MBÚ AV ČR. Nejdříve byl proveden rychlý nástřik vzorku na pepsinovou kolonu (66  $\mu$ l objem, průtoková rychlost 100  $\mu$ l/min), kde došlo k rozštípání proteinu na jednotlivé peptidy. Tyto peptidy byly poté odsoleny na koloně Peptide MicroTrap (MichromBioresources, USA) a separovány na koloně C18 s reverzní fází (0,5 x 50 mm, Jupiter, Phenomenex, USA). Na separaci byl použit lineární gradient 10-45 % rozpouštědla B za 20 min. Nástřikový ventil, pepsinová kolona, peptidová past a analytická kolona byly umístěny v ledu (0 °C), aby se minimalizovala zpětná výměna.

Identifikace peptidů a jejich mapování pomocí HPLC-MS/MS bylo provedeno stejným systémem, který je popsán výše. MS/MS spektra peptidů byla zadána do programu MASCOT a porovnána s databázemi, které obsahují sekvence Bmh1 a Nth1 (jediná povolená modifikace proteinů byla fosforylace na serinu). Spektra částečně deuterovaných peptidů byla exportována do textových souborů pomocí programu DataAnalysis v 4.0 (Bruker Daltonics, USA) a zpracována programem ExPro, vytvořeném v laboratoři Charakterizace molekulární struktury na Mikrobiologickém Ústavu AV ČR, v.v.i.

**Složení roztoků:**

**Roztok A:** 2 % acetonitril/ 0,4 % kyselina mravenčí ve vodě

**Roztok B:** 95 % acetonitril/ 5 % voda/ 0,4 % kyselina mravenčí



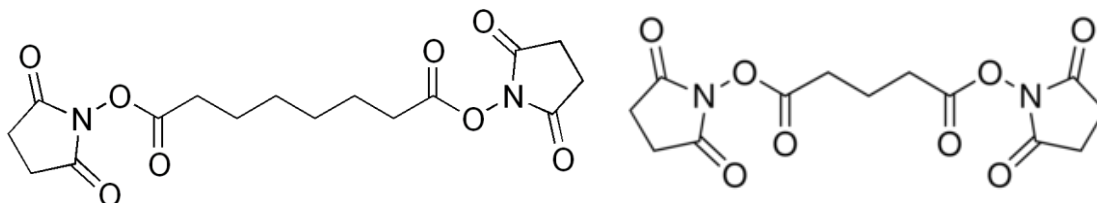
*Obr. 5.5: ESI-FT-ICR hmotnostní spektrometr (9.4T APEX-Ultra, Bruker Daltonics, USA), fotografie stažena z webových stránek <http://ms.biomed.cas.cz/equipment.php>.*

## **5.2.18 Chemické zesíťování spojené s hmotnostní spektrometrií**

Chemické zesíťování (anglicky cross-linking reactions) je další metodou, která pomáhá vytvořit strukturní model proteinu. Pomocí zesíťovacích činidel se v proteinových řetězcích spojují aminokyselinové zbytky (vždy určitá aminokyselina podle typu činidla), mezi kterými je konkrétní vzdálenost. Tím se zjišťuje konformace molekuly proteinu, detaily interakce protein-ligand a další parametry funkcí proteinů. Tyto pokusy byly prováděny ve spolupráci s RNDr. Petrem Novákem, Ph.D., MBÚ AV ČR.

Pro proteiny Bmh1 a Nth1 byly použity homobifunkční činidla DSS a DSG. DSS (disukcinimidyl suberát) reaguje s primárními aminy, se kterými při pH 7-9 vytváří peptidovou vazbu. V proteinovém řetězci se DSS váže na aminovou skupinu lysinu a spojuje dva lysiny, vzdálené od sebe asi 24 Å. Stejným principem se váže i DSG

(disukcinimidyl glutarát), který spojuje dva lysiny vzdálené od sebe asi 20 Å. (Strukturální vzorce DSS a DSG viz **obr. 5.6**).



**Obr. 5.6:** Strukturální vzorce disukcinimidyl suberátu (vlevo) a disukcinimidyl glutarátu (vpravo).

Detekce zesíťovaných proteinů probíhá pomocí hmotnostní spektrometrie, je tedy nutné zesíťovací činidla isotopicky označit, aby se peptidy snáze identifikovaly. Každé činidlo (DSS i DSG) bylo použito jako analog s vodíkem a analog obsahující místo vodíku deuterium. Činidla byla použita v poměru 1:1 nedeuterované/deuterované, což usnadňuje identifikaci zesíťovaných peptidů díky jejich rozdílné hmotnosti, zjištěné po enzymatickém štěpení proteinů na hmotnostním spektrometru.

Koncentrace použitých proteinů byla 0,2 mg/ml pro Bmh1 a 0,3 mg/ml pro pNth1, pro zesíťovací reakci byly proteiny převedeny do pufru 20 mM HEPES pH 7,5 a 150 mM NaCl. Jak bylo napsáno výše, k zesíťovacím reakcím byla použita činidla DSS a DSG, a to ve směsi 4 x deuterované/nedeuterované v poměru 1:1 (mol/mol) (d<sub>0</sub>/d<sub>4</sub>). Činidla byla čerstvě připravena rozpuštěním v DMSO (10 mg/ml) a přidána ke vzorkům ve dvacetinásobném přebytku vůči koncentraci pNth1. Tyto reakční směsi byly inkubovány 1 hod v pokojové teplotě.

Po proběhnutí reakce byly proteiny separovány na elektroforese v NuPAGE 4-12 % Bis-Tris gelu, při 200 V a 120 mA po dobu 50 min. Jako vodící pufr pro elektroforesu byl použit MES vodící pufr. Po skončení elektroforesy byly monomerní zesíťované proteiny vizualizovány a vyříznuty z gelu. Cysteiny v peptidech byly zredukovány přidáním 100 mM TCEP a inkubací v 90 °C po dobu 5 min. Volné cysteiny byly alkylovány přidáním 50 mM iodoacetamidu a inkubací ve tmě při pokojové teplotě po dobu 20 min. Poté byl přidán trypsin určený na štípání proteinů v poměru 1:20 (wt/wt) enzym/protein a inkubován přes noc při 37 °C.

Výsledná směs peptidů byla další den odsolena na koloně peptide MacroTrap column (Michrom Bioresources, USA), poté byla směs nanášena na kolonu s reverzními fázemi MAGIC C18 column (0,2 x 150 mm, Michrom Bioresources, USA) a separována na kapilárním systému HPLC (Agilent Technologies) při průtokové rychlosti 4 µl/min. Gradientové podmínky při separaci byly následující: 1-10 % B 1 min, 10-45 % B 19 min, 45-95 % B 5 min. Kolona byla připojena přímo na hmotnostní spektrometr Apex-ULTRA Qe FT-ICR (Bruker Daltonics, USA), který je vybavený 9,4 T supravodivým magnetem a elektrosprejem jako zdrojem iontů. Přístroj byl externě kalibrován pomocí skupin argininů o koncentraci nižší než 2 ppm.

K získání a zpracování dat byly použity programy ApexControl 3.0.0 a DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, USA), zesíťované peptidy byly identifikovány pomocí softwaru Links. Links algoritmus byl nastaven na možnost karbamidometylace cysteinů a možnost oxidace methioninů. Odchylka hmotností byla udržována pod 2 ppm a všechny označené fragmenty byly manuálně ověřeny.

**Složení roztoků:**

**Roztok A:** 2,5 % acetonitril/ 0,2 % kyselina mravenčí/ 2,5 % isopropanol ve vodě

**Roztok B:** 90 % acetonitril/ 5 % isopropanol/ 0,16 % kyselina mravenčí

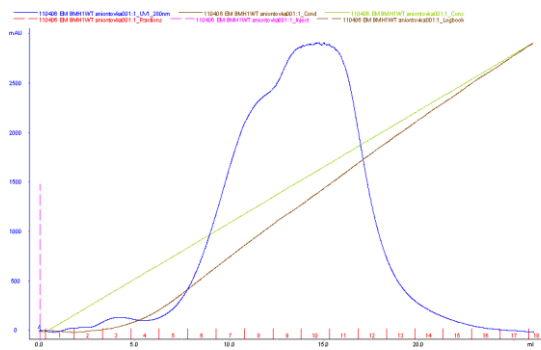
## 6. Výsledky

### 6.1 Exprese a purifikace proteinu Bmh1 a Bmh2 WT

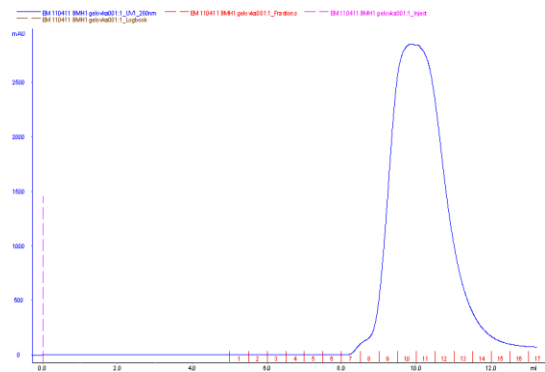
Protein Bmh1 zaklonovaný ve vektoru pET-15b, s histidinovou kotvou na N-konci, byl exprimován v buňkách *E. coli* BL21(DE3). Indukce exprese byla provedena IPTG o finální koncentraci 0,5 mM, exprese probíhala za konstantního třepání při 37 °C po dobu asi 20 hodin. Purifikační kroky byly provedeny podle kapitoly 5.2.8.

Po sonikaci byl roztok obsahující protein nanesen na kolonku obsahující chelatující sepharosu s navázaným Ni<sup>2+</sup>, na který se protein vázal díky histidinové kotvě. Ta byla v dalším kroku v případě potřeby odstraněna štěpením lidským thrombinem. Dalším purifikačním krokem byla aniontově výměnná chromatografie na přístroji HPLC AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko) pomocí kolony obsahující MonoQ-Sepharosu, ze které se protein eluoval lineárně vzrůstajícím gradientem soli. Před finálním purifikačním krokem – gelovou permeační chromatografií – byly vybrané frakce zakoncentrovány na Centrikonu YM-10. Gelová permeační chromatografie byla prováděna na přístroji HPLC s náplní kolony Superdex75.

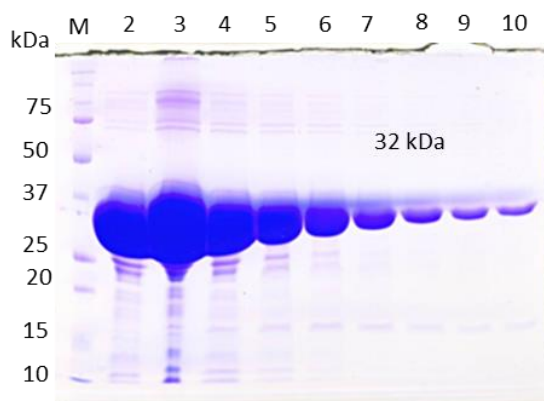
Eluční profily z aniontově výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie a gely SDS-PAGE z průběžných purifikačních kroků jsou ukázány na **obr. 6.1-6.6.**



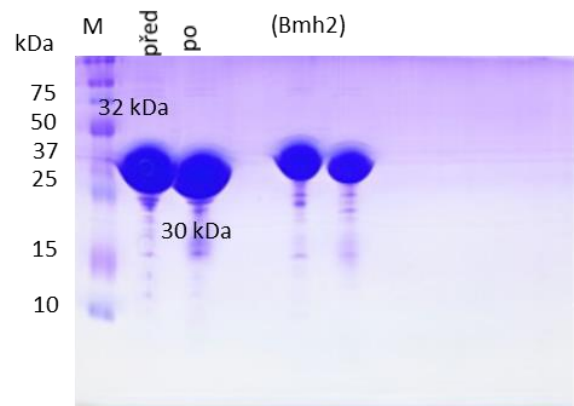
**Obr. 6.1:** Eluční profil *Bmh1* při aniontové výměnné chromatografii (modrá křivka-absorbance při  $\lambda=280$  nm, hnědá křivka-konduktivita, zelená křivka-koncentrace NaCl; červeně jsou označena čísla frakcí)



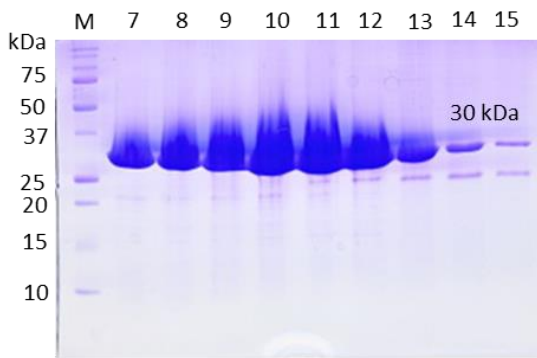
**Obr. 6.2:** Eluční profil *Bmh1* při gelové permeační chromatografii (modrá křivka-absorbance při  $\lambda=280$  nm; červeně jsou označena čísla frakcí)



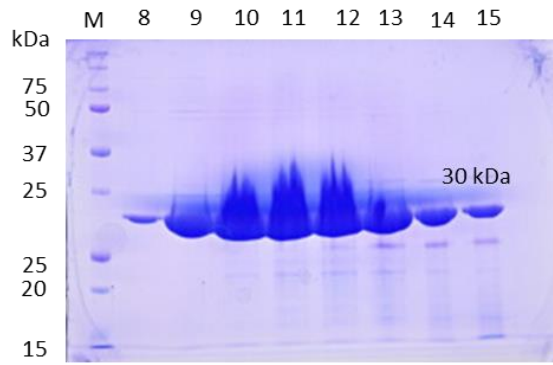
**Obr. 6.3:** 15 % gel SDS-PAGE proteinu *Bmh1* po niklové chelatační chromatografii (M-standard molekulových hmotností, dráhy 2-10-čísla frakcí)



**Obr. 6.4:** 15 % gel SDS-PAGE proteinu *Bmh1* před a po thrombinovém štěpení (M-standard molekulových hmotností)



**Obr. 6.5:** 15 % gel SDS-PAGE proteinu *Bmh1* po aniontové výměnné chromatografii (M-standard molekulových hmotností, dráhy 7-15-čísla frakcí)



**Obr. 6.6:** 15 % gel SDS-PAGE proteinu *Bmh1* po gelové permeační chromatografii (M-standard molekulových hmotností, dráhy 8-15-čísla frakcí)

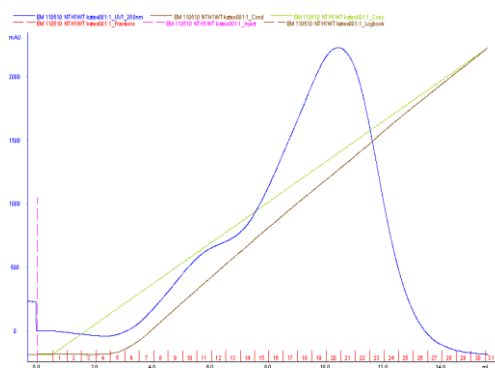
## 6.2 Exprese a purifikace proteinu Nth1 WT a jeho mutantů

Protein Nth1 zaklonovaný ve vektoru pET-32b pET32-b (Novagen) s delecí 81 bází po sekvenci kódující His-tag (6xH)SSGLVPRGS (5819 bází), s histidinovou a thioredoxinovou kotvou na N-konci, byl exprimován v buňkách *E. coli* Rosetta(DE3). Indukce exprese byla provedena IPTG o finální koncentraci 0,5 mM, exprese probíhala za konstantního třepání při 25 °C po dobu asi 18 hodin. Purifikační kroky byly provedeny podle kapitoly 5.2.9.

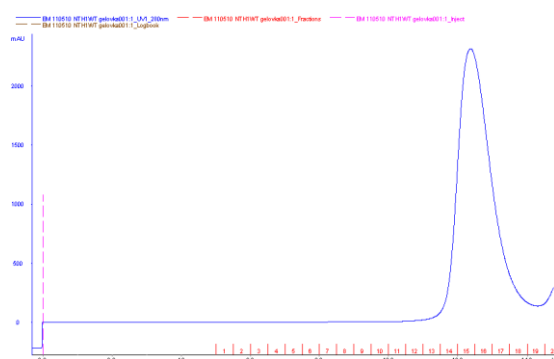
Po sonikaci byl roztok obsahující protein nanesen na kolonku obsahující chelatuující sepharosu s navázaným Ni<sup>2+</sup>, na který se protein vázal díky histidinové kotvě. Ta byla v dalším kroku v případě potřeby odstraněna štěpením lidským thrombinem. Dalším purifikačním krokem byla kationtově výměnná chromatografie na přístroji HPLC AKTAprime<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Švédsko) pomocí kolony obsahující MonoS-Sepharosu, ze které se protein eluoval lineárně vzrůstajícím gradientem soli. Před finálním purifikačním krokem – gelovou permeační chromatografií – byly vybrány frakce

zakoncentrovány na Centrikonu YM-10. Gelová permeační chromatografie byla prováděna na přístroji HPLC s náplní kolony Superdex200.

Purifikace Nth1 WT a jeho mutantů byla prováděna stejným způsobem. Eluční profily z kationtově výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie a gely SDS-PAGE z průběžných purifikačních kroků proteinu Nth1 WT jsou ukázány na **obr. 6.7-6.12**.

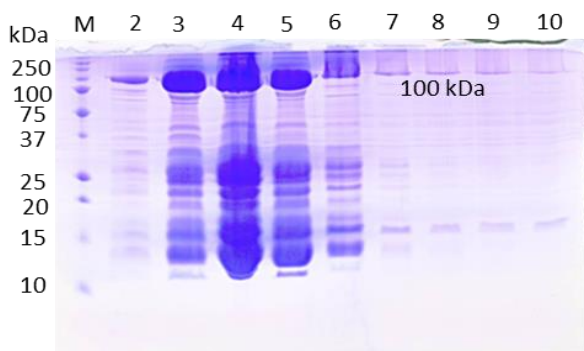


**Obr. 6.7:** Eluční profil Nth1 při kationtové výměnné chromatografii (modrá křivka-absorbance při  $\lambda=280$  nm, hnědá křivka-konduktivita, zelená křivka-koncentrace NaCl; červeně jsou označena čísla frakcí)

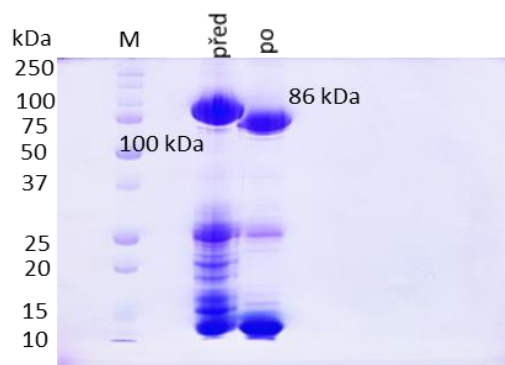


**Obr. 6.8:** Eluční profil Nth1 při gelové permeační chromatografii (modrá křivka-absorbance při  $\lambda=280$  nm; červeně jsou označena čísla frakcí)

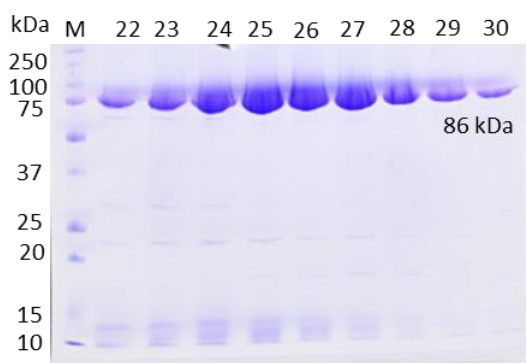




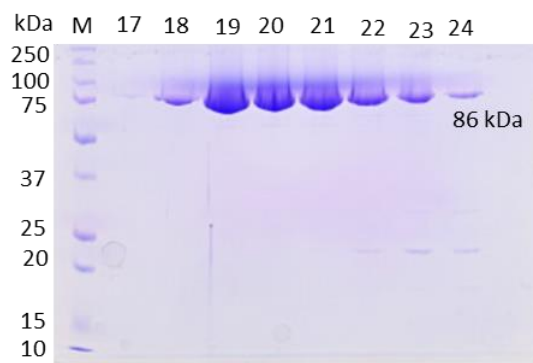
**Obr. 6.9:** 12 % gel SDS-PAGE proteinu *Nth1* WT po niklové chelatační chromatografii (M-standard molekulových hmotností, dráhy 2-10-čísla frakcí)



**Obr. 6.10:** 12 % gel SDS-PAGE proteinu *Nth1* WT před a po thrombinovém štěpení (M-standard molekulových hmotností)



**Obr. 6.11:** 12 % gel SDS-PAGE proteinu *Nth1* WT po kationtové výměnné chromatografii (M-standard molekulových hmotností, dráhy 22-30-čísla frakcí)



**Obr. 6.12:** 12 % gel SDS-PAGE proteinu *Nth1* WT po gelové permeační chromatografii (M-standard molekulových hmotností, dráhy 17-24-čísla frakcí)

## 6.3 Fosforylace Nth1 a analýza fosforylačních míst pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Na podrobnou analýzu interakce mezi Nth1 a Bmh1 byla připravena celá rekombinantní Nth1 (sekvence 1-751), která byla po purifikaci fosforylována kinasou PKA *in vitro*. S fosforylovanou Nth1 (pNth1) byla měřena pozitivní a negativní iontová MALDI-TOF hmotnostní spektra směsi tryptických peptidů, aby se potvrdila aminokyselinová sekvence a modifikace fosforylačních míst.

Hmotnostní spektrum pNth1 WT ukázalo signály čtyř stechiometricky fosforylovaných serinů, a to Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83 (viz **Tabulka 6**). Jako kontrolní experiment byl použit mutant Nth1, ve kterém byly všechny čtyři seriny (na pozici 20, 21, 60 a 83) nahrazeny alaninem. Při MALDI-TOF hmotnostní analýze tohoto mutantu (pNth1-noS), fosforylovaného stejně jako Nth1 WT nebyly nalezeny žádné další fosforylované zbytky.

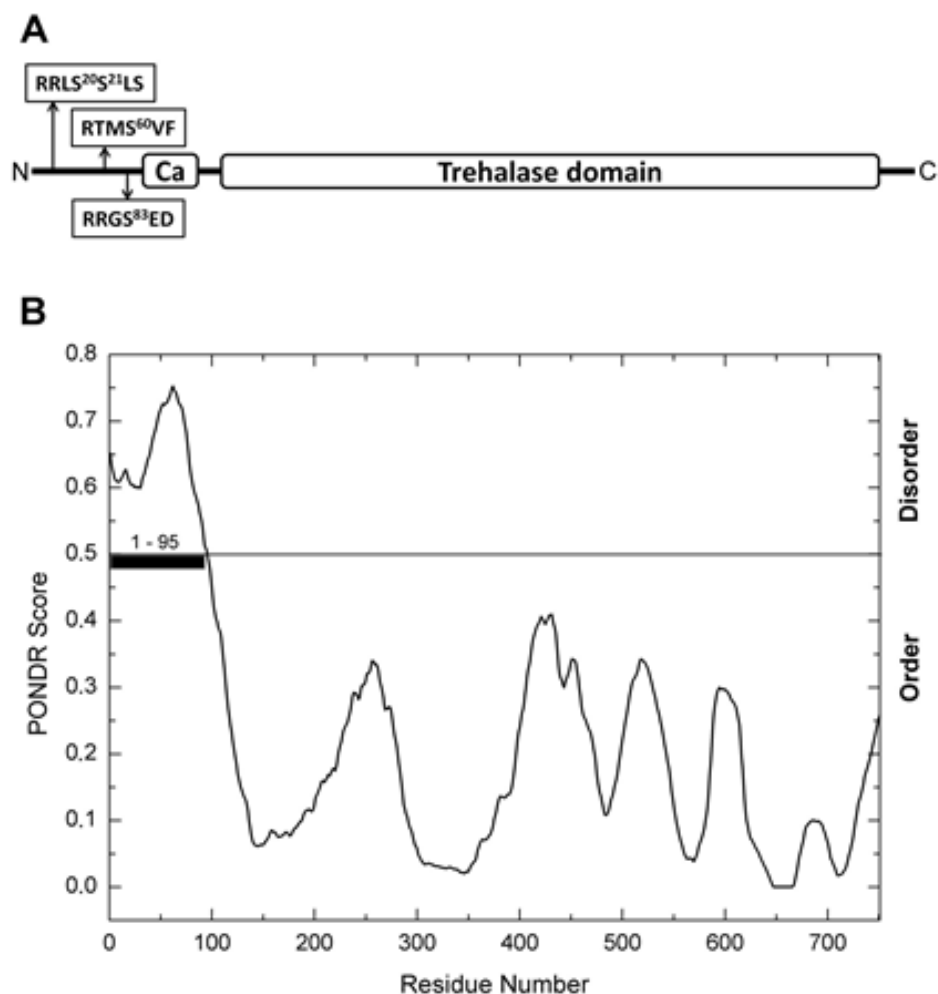
Analýza proteinových domén byla provedena pomocí programu SMART, který predikoval dvě konzervované domény: trehalasovou doménu (sekvence 163-721) a kalcium-vazebná doména (sekvence 114-125), podobná tzv. EF hand motivu (**obr 6.13 A**). N-terminální konec Nth1, kde se fosforylační místa nacházejí, je neuspořádaný, což bylo potvrzeno pomocí bioinformatické analýzy programem PONDR (**obr. 6.13 B**).

Tabulka 6: Analýza Nth1 fosforylované pomocí PKA.

Detekované m/z signály v negativní nebo pozitivní MALDI-TOF MS								
Odpovídající peptidová sekvence, zjištěná fosforylace nebo jednoduchá mutace Ser/Ala v peptidu								
Nth1 varianta	Peptidy obsahující Ser20 a Ser21				Peptidy obsahující Ser60		Peptidy obsahující Ser83	
WT	2802.30 [M+H] <sup>+</sup>		3010.37 [M+H] <sup>+</sup>		1371.62 [M+H] <sup>+</sup>	1499.72 [M+H] <sup>+</sup>	1658.67 [M+H] <sup>+</sup>	
	19-43		19-44		58-69	58-70	82-96	
pWT	3036.39 [M-H] <sup>-</sup>	3116.39 [M-H] <sup>-</sup>	3164.40 [M-H] <sup>-</sup>	3244.40 [M-H] <sup>-</sup>	1449.63 [M-H] <sup>-</sup>	1577.76 [M-H] <sup>-</sup>	1736.70 [M-H] <sup>-</sup>	1892.71 [M-H] <sup>-</sup>
	18-43, pS20	18-43, pS20, pS21	18-44, pS20	18-44, pS20, pS21	58-69, pS60	58-70, pS60	81-95, pS83	81-96, pS83
pS20	3020.41 [M-H] <sup>-</sup>		3148.43 [M-H] <sup>-</sup>		1483.79 [M+H] <sup>+</sup>	1499.78 [M+H] <sup>+</sup>	1642.61 [M+H] <sup>+</sup>	1798.63 [M+H] <sup>+</sup>
	18-43, pS20, mS21A		18-44, pS20, mS21A		58-71, mS60A	58-71Mox, mS60A	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS21	2864.27 [M-H] <sup>-</sup>				1483.78 [M+H] <sup>+</sup>	1499.77 [M+H] <sup>+</sup>	1642.60 [M+H] <sup>+</sup>	1798.61 [M+H] <sup>+</sup>
	19-43, pS21, mS20A				58-71, mS60A	58-71Mox, mS60A	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS60	2770.30 [M+H] <sup>+</sup>		2898.33 [M+H] <sup>+</sup>		1449.63 [M-H] <sup>-</sup>	1577.73 [M-H] <sup>-</sup>	1642.63 [M+H] <sup>+</sup>	1798.63 [M+H] <sup>+</sup>
	19-43, mS20A, mS21A		19-44, mS20A, mS21A		58-69, pS60	58-70, pS60	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS83	2770.30 [M+H] <sup>+</sup>		2898.33 [M+H] <sup>+</sup>		1483.78 [M+H] <sup>+</sup>	1499.77 [M+H] <sup>+</sup>	1736.73 [M-H] <sup>-</sup>	1892.76 [M-H] <sup>-</sup>
	19-43, mS20A, mS21A		19-44, mS20A, mS21A		58-71, mS60A	58-71Mox, mS60A	81-95, pS83	81-96, pS83
pNoS	2770.30 [M+H] <sup>+</sup>		2898.33 [M+H] <sup>+</sup>		1483.75 [M+H] <sup>+</sup>	1499.74 [M+H] <sup>+</sup>	1642.62 [M+H] <sup>+</sup>	1798.63 [M+H] <sup>+</sup>
	19-43, mS20A, mS21A		19-44, mS20A, mS21A		58-71, mS60A	58-71Mox, mS60A	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS20+21	3036.40 [M-H] <sup>-</sup>	3116.41 [M-H] <sup>-</sup>	3164.43 [M-H] <sup>-</sup>	3244.42 [M-H] <sup>-</sup>	1483.77 [M+H] <sup>+</sup>	1499.76 [M+H] <sup>+</sup>	1642.64 [M+H] <sup>+</sup>	1798.67 [M+H] <sup>+</sup>
	18-43, pS20	18-43, pS20, pS21	18-44, pS20	18-44, pS20, pS21	58-71, mS60A	58-71Mox, mS60A	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS20+60	3020.40 [M-H] <sup>-</sup>		3148.41 [M-H] <sup>-</sup>		1449.61 [M-H] <sup>-</sup>	1577.71 [M-H] <sup>-</sup>	1642.60 [M+H] <sup>+</sup>	1798.65 [M+H] <sup>+</sup>
	18-43, pS20, mS21A		18-44, pS20, mS21A		58-69, pS60	58-70, pS60	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS21+60	2864.24 [M-H] <sup>-</sup>				1449.60 [M-H] <sup>-</sup>	1577.69 [M-H] <sup>-</sup>	1642.60 [M+H] <sup>+</sup>	1798.64 [M+H] <sup>+</sup>
	19-43, pS21, mS20A				58-69, pS60	58-70, pS60	82-96, mS83A	81-96, mS83A
pS20+83	3020.34 [M-H] <sup>-</sup>		3148.34 [M-H] <sup>-</sup>		1355.68 [M+H] <sup>+</sup>	1483.77 [M+H] <sup>+</sup>	1892.77 [M-H] <sup>-</sup>	
	18-43, pS20, mS21A		18-44, pS20, mS21A		58-70, mS60A	58-71, mS60A	81-96, pS83	
pS21+83	2864.36 [M-H] <sup>-</sup>				1355.72 [M+H] <sup>+</sup>	1483.81 [M+H] <sup>+</sup>	1892.75 [M-H] <sup>-</sup>	
	19-43, pS21, mS20A				58-70, mS60A	58-71, mS60A	81-96, pS83	
pS60+83	2770.27 [M+H] <sup>+</sup>		2898.29 [M+H] <sup>+</sup>		1449.61 [M-H] <sup>-</sup>	1577.70 [M-H] <sup>-</sup>	1736.72 [M-H] <sup>-</sup>	1892.74 [M-H] <sup>-</sup>
	19-43, mS20A, mS21A		19-44, mS20A, mS21A		58-69, pS60	58-70, pS60	81-95, pS83	81-96, pS83

Detekované m/z signály z MALDI-TOF hmotnostních spekter fosforylovaných zbytků ([M-H]<sup>-</sup>), zobrazené tučně) a nefosforylovaných zbytků ([M+H]<sup>+</sup>). Nth1 konstrukt je po trypsinizaci. Jsou ukázány různé jednoduché i dvojité mutanty (Veisova, D., et al., 2012).

Nalezená fosforylační místa se nachází na N-terminálním konci Nth1. Seriny 20, 21 a 83 byly už dříve navrženy jako esenciální pro PKA-dependentní regulaci Nth1 (Panni, S., et al., 2008), ale nikoli serin na pozici 60.



**Obr. 6.13:** (A) Diagram primární struktury *Nth1* ze *S. cerevisiae* se zobrazenými pozicemi, které jsou fosforylovány PKA in vitro. Proteinové domény byly analyzovány pomocí programu SMART.

(B) Bioinformatická analýza programem PONDR (VL3 predictor). N-terminální konec *Nth1* (sekvence 1-95, označený zvýrazněnou čarou), kde se nacházejí fosforylační místa, je neuspořádaný (Veisova, D., et al., 2012).

## 6.4 Význam fosforylace při aktivaci *Nth1* proteiny 14-3-3

Analýza p*Nth1* na hmotnostním spektrometru odhalila, že PKA stechiometricky fosforyluje čtyři serinové zbytky na pozicích 20, 21, 60 a 83, které se nacházejí na N-

terminálním konci enzymu (viz **Tabulka 6**). Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 se vážou na fosforylovaný konec pNth1 s vysokou afinitou a zvyšují její enzymovou aktivitu. Aby bylo možno zjistit, která fosforylační místa jsou za tuto interakci zodpovědná, byly vytvořeny čtyři mutanty, obsahující jediné fosforylační místo (Nth1-S20, Nth1-S21, Nth1-S60, Nth1-S83), zatímco ostatní seriny byly nahrazeny alaninem. Dále bylo vytvořeno šest mutantů, obsahující dvě fosforylační místa (Nth1-S20+21, Nth1-S20+60, Nth1-S20+83, Nth1-S21+60, Nth1-S21+83, Nth1-S60+83) a jeden kontrolní mutant, který neobsahoval žádný serin (Nth1-noS).

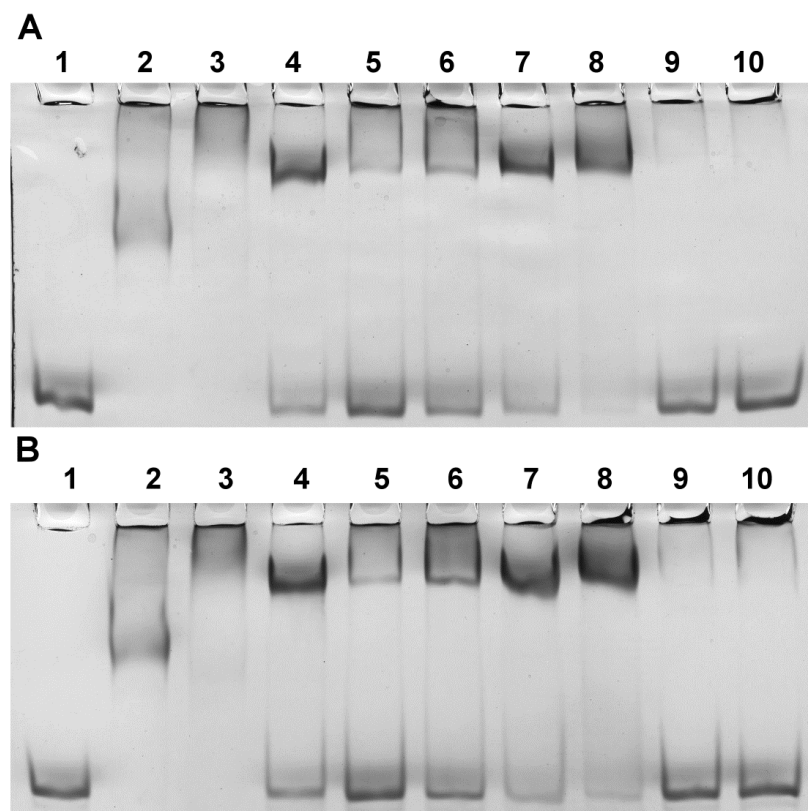
## 6.5 Analytická ultracentrifugace (AUC) a 12 % TBE-PAGE

Rozdíly v afinitě Nth1 WT a všech připravených jedno- a dvoj- mutantů k Bmh proteinům byly zjišťovány pomocí sedimentační analýzy na analytické ultracentrifuze a nedenaturující elektroforesy TBE-PAGE (viz **obr. 6.14**).

Vazebná afinita jednoduchých a dvojitých mutantů obsahujících Ser60 nebo Ser83 k proteinům Bmh ( $K_D$  v rozsahu od  $0.2 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-6}$  M) se ukázala být srovnatelná s vazebnou afinitou pNth1 WT (který se váže k Bmh1 a Bmh2 s  $K_D$   $0.15 \times 10^{-6}$  a  $0.25 \times 10^{-6}$  M) (viz **Tabulka 7**). Oproti tomu afinita mutantů, které obsahují pouze Ser20 nebo Ser21, je podstatně nižší ( $K_D$   $10 \times 10^{-6}$  M). Z toho vyplývá, že seriny nezbytné pro vazbu k proteinům Bmh a tím k aktivaci pNth1 jsou Ser60 a Ser83.

**Tabulka 7: Disociační konstanty komplexů pNth1:Bmh1, získané na základě sedimentačních experimentů (AUC) (Veisova, D., et al., 2012).**

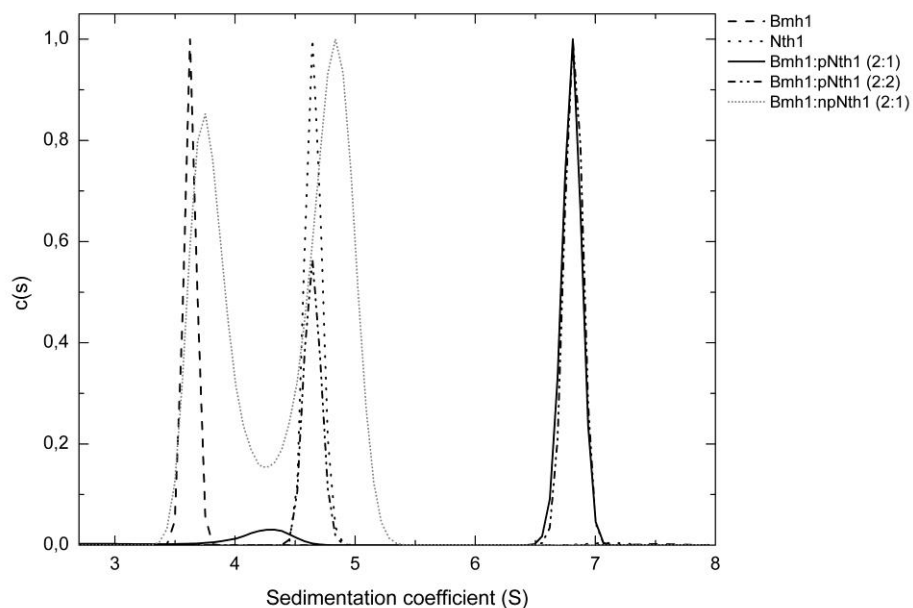
		$K_D (\times 10^{-6} \text{ M})^a$	
		Isoforma proteinu 14-3-3	
pNth1 varianta	Počet fosforylačních míst	Bmh1	Bmh2
WT	4	$0.15 \pm 0.1$	$0.25 \pm 0.1$
S20	1	$10 \pm 3$	$10 \pm 3$
S21		$10 \pm 4$	$10 \pm 3$
S60		$0.2 \pm 0.15$	$0.25 \pm 0.2$
S83		$0.2 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$
S20+21	2	$10 \pm 3$	$10 \pm 4$
S20+60		$0.25 \pm 0.1$	$0.25 \pm 0.15$
S20+83		$0.2 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$
S21+60		$0.3 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.2$
S21+83		$0.3 \pm 0.2$	$0.25 \pm 0.15$
S60+83		$0.3 \pm 0.15$	$0.25 \pm 0.15$



**Obr. 6.14:** (A) Interakce pNth1 s Bmh1. Dráhy: 1-Bmh1, 2-Nth1 WT, 3-pNth1 WT, 4-Bmh1+pNth1 WT, 5-Bmh1+pNth1-S20, 6-Bmh1+pNth1-S21, 7-Bmh1+pNth1-S60, 8-Bmh1+pNth1-S83, 9-Bmh1+pNth1-S20+21, 10-Bmh1+pNth1-noS.

(B) Interakce pNth1 s Bmh2. Dráhy: 1-Bmh2, 2-Nth1 WT, 3-pNth1 WT, 4-Bmh2+pNth1 WT, 5-Bmh2+pNth1-S20, 6-Bmh2+pNth1-S21, 7-Bmh2+pNth1-S60, 8-Bmh2+pNth1-S83, 9-Bmh2+pNth1-S20+21, 10-Bmh2+pNth1-noS (Veisova, D., et al., 2012).

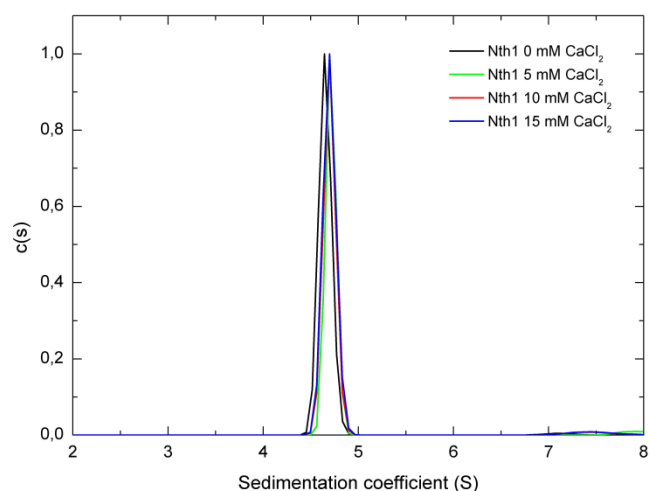
Sedimentační analýza na analytické ultracentrifuze dále ukázala, v jakém stechiometrickém poměru se Nth1 s Bmh váží. Molekulová hmotnost Nth1, která se v roztoku vyskytuje jako monomer, je 86 kDa, Bmh proteiny tvoří stabilní dimery o hmotnosti 60 kDa (Veisova, D., et al., 2010). Nefosforylovaná Nth1 se k Bmh1 neváže (stejně jako mutant Nth1-noS), zatímco pNth1 vytváří s Bmh1 pevný, stabilní komplex. Výsledný stechiometrický poměr komplexu pNth1:Bmh je 1:2, tedy jedna molekula Nth1 se váže k dimeru Bmh (viz **obr. 6.15**). Disociační konstanty komplexů pNth1:Bmh1 v **Tabulce 7**.



**Obr. 6.15:** Kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$ . *Bmh1* samotné (černě-čárkovaná křivka), *Nth1* samotné (černě-tečkovaná křivka), *Bmh1:pNth1* v poměru 2:1 (černá nepřerušovaná křivka), *Bmh1:pNth1* v poměru 2:2 (černá křivka tečky-čárky), *Bmh1:Nth1* v poměru 2:1 (šedá nepřerušovaná křivka) (Veisova, D., et al., 2012).

Pomocí analytické ultracentrifugace se také ověřoval efekt iontů  $\text{Ca}^{2+}$  na oligomerní stav *Nth1*. Vápník byl v roztocích přítomen jako 5, 10 a 15 mM, avšak ani v jednom případě se molekulová hmotnost *Nth1* (86 kDa) nezměnila (viz **obr 6.16**) a ani aktivace *Nth1* pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  nevede k oligomerním změnám molekuly *Nth1*.





**Obr. 6.16:** Sedimentační rychlostní analýza *Nth1* v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  enzymu *Nth1* v nepřítomnosti  $\text{CaCl}_2$  (černá), v přítomnosti 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (zelená), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (červená) a 15 mM  $\text{CaCl}_2$  (modrá) (Veisova, D., et al., 2012).

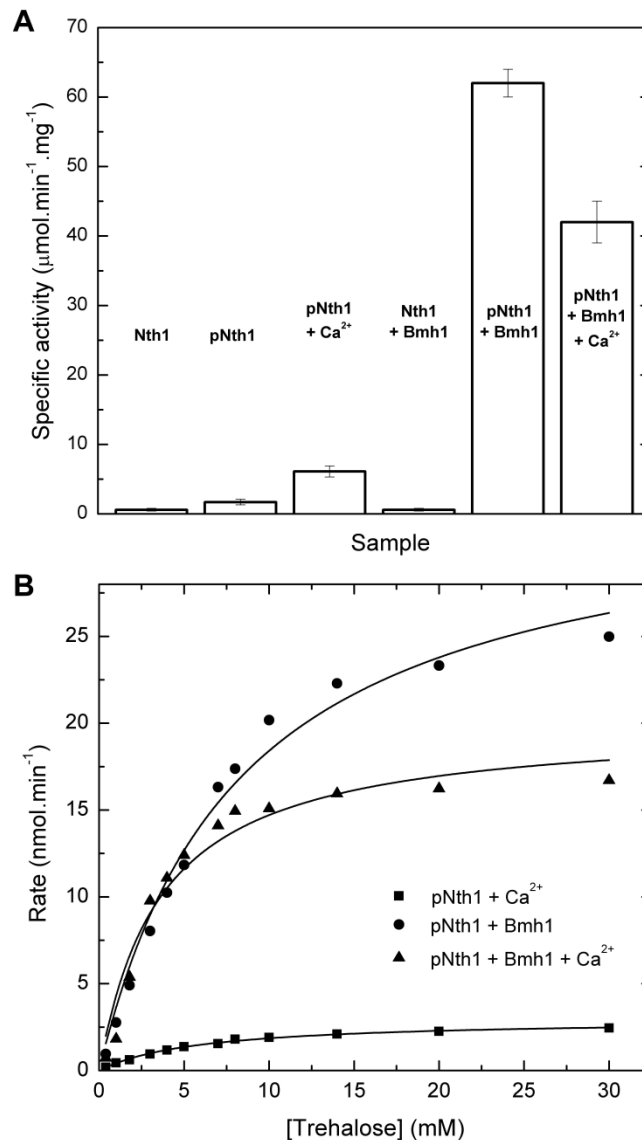
## 6.6 Bmh1 a Bmh2 zvyšují enzymatickou aktivitu pNth1 *in vitro*

Pro vazbu *Nth1* na *Bmh* a tedy její aktivaci je nutná fosforylace *Nth1*. Za účelem zjištění konkrétního způsobu fosforylace byla měřena trehalasová aktivita *Nth1* a pNth1 v přítomnosti a nepřítomnosti *Bmh* proteinů. Trehalasová aktivita se měřila detekcí glukosy, která vzniká hydrolýzou trehalosy.

*Nth1* i pNth1 vykazují v nepřítomnosti proteinů 14-3-3 velice nízkou aktivitu (Panni, S., et al., 2008) (viz **obr. 6.17 A**). Přítomnost *Bmh* významně zvýší aktivitu pNth1, zatímco u nefosforylované *Nth1* zůstává aktivita nezměněna. Obě kvasničné isoformy proteinů 14-3-3, *Bmh1* a *Bmh2*, aktivují pNth1 téměř bez rozdílu stejně. Dále se spekulovalo, že *Nth1* ze *S. pombe* změní oligomerní stav po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  (Franco, A., et al., 2003). Vápníková vazebná doména je mezi kvasničnými trehalasami konzervována, v *Nth1* ze *S. cerevisiae* se tato doména nachází mezi aminokyselinami 144 až 125

(sekvence D<sup>114</sup>TDKNYQITIED<sup>125</sup>). Tato sekvence je podobná vápníkové vazebné doméně, která se vyskytuje v „EF-hand“ motivu mnoha vápník-vázajících proteinů. Měření v přítomnosti vápníku (5 mM Ca<sup>2+</sup>) ukázalo zvýšení aktivity Nth1, ale proteiny 14-3-3 zvyšují aktivitu podstatně více. V přítomnosti Ca<sup>2+</sup> i Bmh je však aktivita nižší než v přítomnosti pouze Bmh.

Hodnoty Michealisovy konstanty  $K_M$ , rychlostní konstanty  $k_{cat}$  a poměru  $k_{cat}/K_M$  pro hydrolýzu trehalosy enzymem pNth1 v přítomnosti Bmh1 a/nebo 5 mM Ca<sup>2+</sup> jsou ukázány na **obr. 6.17 B** a v **Tabulce 8**. Měření probíhalo při pH 7,5 a ve 30 °C. Z naměřených dat vyplývá, že vazba na protein Bmh1 zvyšuje významněji (~11×) rychlostní konstantu pNth1 než aktivace pouze vazbou s vápníkem. Tato data nebylo možné porovnat kinetickými parametry samotné Nth1 a pNth1, protože v nepřítomnosti Bmh1 i vápníku jsou jejich enzymatické aktivity příliš nízké a nelze je tudíž analyzovat.



**Obr. 6.17:** (A) *Specifická trehalasová aktivita pNth1 a Nth1 v přítomnosti a nepřítomnosti Bmh1 a/nebo 5 mM Ca<sup>2+</sup>. Koncentrace trehalosy byla 30 mM, specifická aktivita trehalasy je vyjádřena jako  $\mu\text{mol}$  glukosy vzniklý za minutu na mg proteinu. Aktivita samotné Nth1 či pNth1 je nízká (sloupce 1 a 2), stejně jako Nth1 s Bmh1 (sloupec 4). Aktivita pNth1 vzroste po přidání vápníku (sloupec 3) a zejména po přidání Bmh1 (sloupec 5) a Bmh1 s Ca<sup>2+</sup> (sloupec 6).*

(B) *Kinetika Michaelise a Mentenové pro hydrolýzu trehalosy enzymem pNth1 v přítomnosti 5 mM vápníku (čtverce), Bmh1 (kolečka) a vápníku i Bmh1 (trojúhelníky). Trehalasová aktivita byla měřena detekcí glukosy vznikající hydrolýzou trehalosy, reakční rychlost byla vynesena proti koncentraci trehalosy (Veisova, D., et al., 2012).*

*Tabulka 8: Vliv vazby Bmh a Ca<sup>2+</sup> na kinetiku pNth1: hodnoty K<sub>m</sub> a k<sub>cat</sub> byly získány proložením získaných dat rovnicí Michaelise a Mentenové v programu Origin 8.0 (OriginLab, Corp., USA) (Veisova, D., et al., 2012).*

Vzorek	K <sub>M</sub> , mM	k <sub>cat</sub> , s <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> , s <sup>-1</sup> .mM <sup>-1</sup>
pNth1 + Ca <sup>2+</sup>	6 ± 0.4	6.2 ± 0.1	1.0
pNth1 + Bmh1	8 ± 1	71 ± 4	8.9
pNth1 + Bmh1 + Ca <sup>2+</sup>	3.6 ± 0.7	42 ± 2	11.7

*Aktivita pNth1 se po vazbě s Bmh1 zvýší až 11x oproti vazbě s Ca<sup>2+</sup>.*

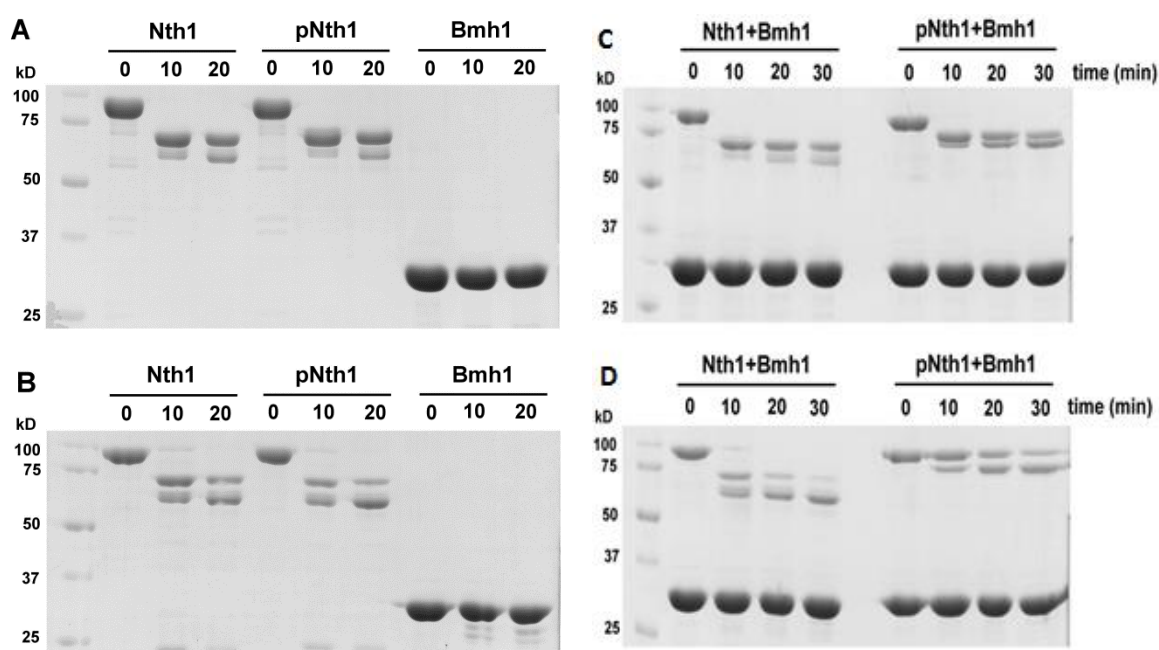
## 6.7 Limitovaná proteolýza - proteiny 14-3-3 interagují s N-terminální oblastí pNth1

Experimenty na analytické ultracentrifuze a nedenuroující elektroforéze TBE-PAGE ukázaly, že proteiny Bmh interagují s fosforylovaným pNth1 (viz kap 6.5). PKA fosforylační místa, zodpovědná za vazbu k Bmh, se nacházejí na N-terminálním konci Nth1, tudíž lze předpokládat, že Bmh interagují právě s touto oblastí pNth1. Na ověření této hypotézy byla použita limitovaná proteolýza, aby se zjistilo, zda vazba Bmh na pNth1 chrání N-terminální konec pNth1 před proteolytickou degradací.

Nth1, pNth1, Bmh1 a jejich směsi v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT a 10 % (w/v) glycerol, byly smíchány s trypsinem či chymotrypsinem (w/v poměr proteasa/protein byl 1:1000) a v určitých časech byla proteolýza zastavena přidáním SDS a povařením vzorků. Výsledné gely SDS-PAGE jsou ukázány na **obr. 6.18**. Hmotnostně spektrometrická analýza částečně rozštěpených proteinů byla provedena po 30 min trvající inkubaci Nth1 a pNth1 s Bmh1 nebo bez, s trypsinem nebo chymotrypsinem a ukázala, že vazba s proteinem Bmh1 chrání N-terminální sekvence pNth1. Nebyla prokázána proteolytická degradace C-terminálního konce Nth1 ani pNth1 samotných ani v komplexu s Bmh1. N-terminální konec pNth1 byl v přítomnosti Bmh1 chráněn před částečnou proteolýzou chymotrypsinem po dobu 30 min, což bylo potvrzeno díky určení pNth1 sekvence od Ala(-1) do Leu751. První byl detekován peptid, který měl signál m/z 1630.78, což odpovídá pNth1 N-terminálnímu

peptidu od Ala(-1) do Arg15, a jeho sekvence byla ověřena. Všechny fosforylované seriny na pozicích 20, 21, 60 a 83 byly detekovány v částech proteinu vyjmutých s SDS-PAGE gelu.

Po částečné proteolýze pNth1 trypsinem po dobu 30 min v přítomnosti Bmh1 pokrývaly peptidy sekvenci od Thr58 do Leu751 a první detekovaný peptid z N-terminálního konce měl signál  $m/z$  1579.70, což odpovídalo aminokyselinové sekvenci Thr58-Leu70 a fosforylace byla potvrzena na Ser60. Tato data potvrzují, že Bmh1 interaguje s N-terminálním koncem pNth1.



**Obr. 6.18:** 10 % SDS-PAGE gely proteinů po limitované proteolýze. (A) Proteiny Nth1, pNth1 a Bmh1 inkubované s trypsinem při 25 °C po dobu 10 a 20 min. (B) Proteiny Nth1, pNth1 a Bmh1 inkubované s chymotrypsinem při 25 °C po dobu 10 a 20 min. (C) Směs proteinů Nth1+Bmh1 a pNth1+Bmh1 inkubované při 25 °C po dobu 10, 20 a 30 min. (D) Směs proteinů Nth1+Bmh1 a pNth1+Bmh1 inkubované při 25 °C po dobu 10, 20 a 30 min. Samotný protein Bmh1 je v těchto časových úsecích vůči proteolýze resistantní. Z gelů C a D je zřejmé, že pNth1, které vytváří s Bmh1 komplex, je proti proteolýze touto vazbou podstatně lépe chráněné. Výsledné peptidy Nth1 a pNth1 byly analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Veisova, D., et al., 2012).

## 6.8 Význam jednotlivých fosforylačních míst Nth1 při interakci s proteiny Bmh

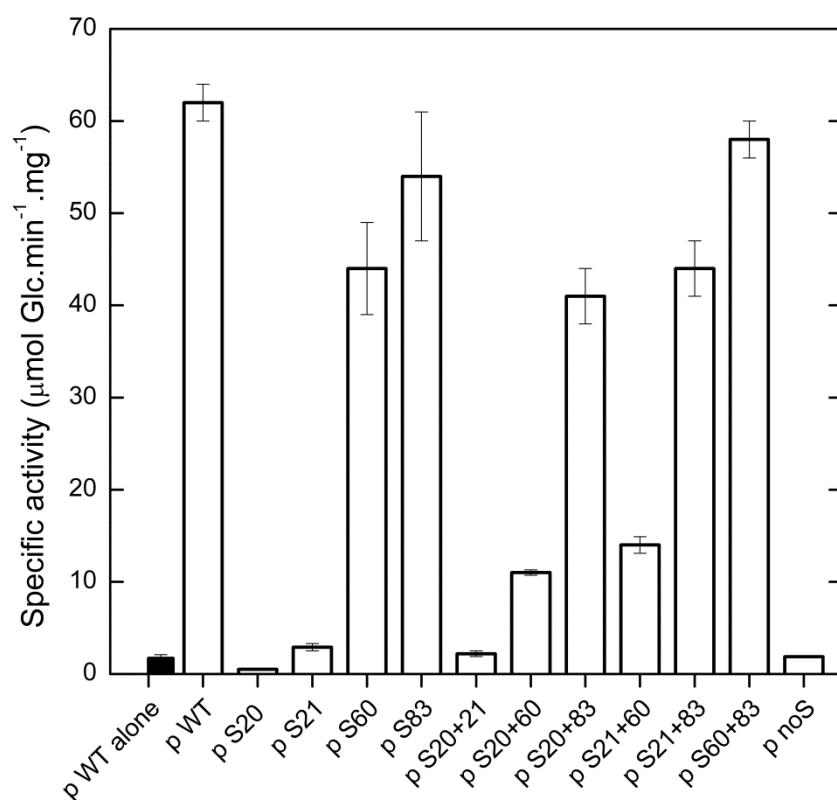
Jak bylo popsáno výše, pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že PKA stechiometricky fosforyluje čtyři serinové zbytky na pozicích 20, 21, 60 a 83 na N-terminální části enzymu (viz **Tabulka 6**). Proteiny 14-3-3 váží pNth1 s vysokou afinitou, interagují s N-terminálním koncem enzymu a významně zvyšují její enzymatickou aktivitu (viz kap. 6.6). Aby bylo možné identifikovat jednotlivá fosforylační místa, která jsou za tuto interakci zodpovědná, byly připraveny čtyři mutanty s jedním serinem (Nth1-S20, Nth1-S21, Nth1-S60 a Nth1-S83) a šest mutantů se dvěma seriny (Nth1-S20+21, Nth1-S20+60, Nth1-S20+83, Nth1-S21+60, Nth1-S21+83 a Nth1-S60+83) (viz kap. 6.4). Také byl připraven kontrolní mutant, který neobsahoval žádný serin (Nth1-noS).

Rozdíly ve vazebné afinitě mezi jednotlivými mutanty pNth1 byly experimentálně ověřovány pomocí sedimentační analýzy na analytické ultracentrifuze a nedenaturující elektroforesy TBE-PAGE (viz kap. 6.5) Vazebná afinita jedno- a dvoj- mutantů, které obsahují Ser60 a/nebo Ser83 k oběma isoformám proteinů Bmh ( $K_D$  v rozpětí od  $0.2 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-6}$  M) byla srovnatelná s vazebnou afinitou pNth1 WT ( $K_D$   $0.15 \times 10^{-6}$  a  $0.25 \times 10^{-6}$  M). Oproti tomu mutanty, které obsahují fosforylovaný Ser20 a/nebo Ser21 vykazovaly nízkou vazebnou afinitu ( $K_D$   $10 \times 10^{-6}$  M). Disociační konstanty jednotlivých mutantů jsou uvedeny v **Tabulce 7**. Z toho vyplývá, že fosforylační místa na Ser60 a Ser83 jsou nezbytná pro vazbu na Bmh.

Dále byla zkoumána schopnost obou isoform proteinů 14-3-3, Bmh1 a Bmh2, zvyšovat aktivitu pNth1 mutantů pomocí měření enzymové kinetiky (viz **obr. 6.19**). Trehalázová aktivita byla měřena v přítomnosti 14 mM nebo 30 mM trehalosy detekcí glukosy, která vzniká hydrolýzou trehalosy. Výsledky, stejně jako u vazebných experimentů na analytické ultracentrifuze, ukazují, že podstatné pro vazbu na Bmh jsou fosforylační místa Ser60 a Ser83, zatímco mutanty, které obsahují Ser20 a/nebo Ser21 mají oproti nim výrazně nižší aktivitu, srovnatelnou s Nth1 a Nth1-noS.

Mutanty pNth1-S60 a pNth1-S83 měly aktivitu vysokou, stejně jako mutanty pNth1-S60+83, pNth1-S20+83 a pNth1-S21+83. Nižší aktivitu potom kupodivu vykazovaly dvojité mutanty pNth1-S20+60 a pNth1-S21+60 oproti aktivitě pNth1 WT

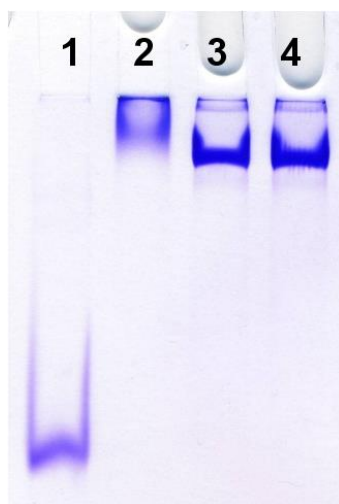
nebo pNth1-S60 (viz **Tabulka 7**). Je možné, že vazba na Bmh u těchto dvou mutantů ovlivňuje konformaci trehalasy jiným způsobem, což způsobí pokles aktivity oproti mutantům, které obsahují jen Ser60 a/nebo Ser83. Obě isoformy proteinů 14-3-3, Bmh1 i Bmh2, vykazovaly téměř stejné hodnoty aktivace pNth1, což odpovídá vazebným experimentům na analytické ultracentrifuze.



**Obr. 6.19:** *Specifická trehalasová aktivita pNth1 WT samotného (černý sloupec) a pNth1 WT a mutantů v přítomnosti Bmh1 (bílé sloupce), ve směsi obsahující 30 mM trehalosu. Zobrazená data jsou průměrem ze tří experimentů (Veisova, D., et al., 2012).*

## 6.9 Příprava a charakterizace komplexu Nth1:Bmh1 pro vodíko-deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií

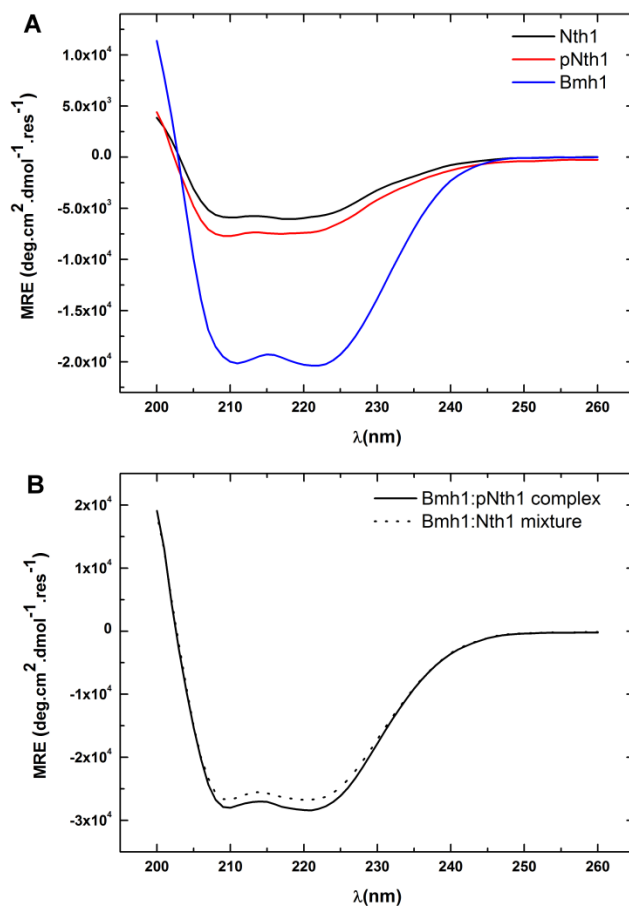
Strukturní změny proteinů při tvorbě komplexu Nth1:Bmh1 a tím aktivace enzymu Nth1 ze *S. cerevisiae* byly předmětem dalšího výzkumu. Po fosforylaci Nth1 pomocí PKA bylo pNth1 smícháno s Bmh1 v molárním poměru 1:2 a jejich interakce byla ověřena pomocí nativní TBE-PAGE (viz **obr. 6.20**). Specifická trehalasová aktivita pNth1 v přítomnosti Bmh1 je  $66 \pm 2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Nativní struktura proteinů Nth1, pNth1 a Bmh1 byla ověřena pomocí cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie.) Jak je ukázáno na **obr. 6.21**, Nth1 obsahuje ~26 %  $\alpha$ -helixů, ~24 %  $\beta$ -skládaných listů a ~50 % neuspořádaných regionů, zatímco pNth1 obsahuje ~31 %  $\alpha$ -helixů, ~17 %  $\beta$ -skládaných listů a ~52 % neuspořádaných regionů. Bmh1 obsahuje ~84 %  $\alpha$ -helixů a ~16 % neuspořádaných regionů, což se shoduje s teoretickou predikcí sekundární struktury.



**Obr. 6.20:** Nativní TBE-PAGE ve 12 % gelu. Dráha 1: protein Bmh1 (102 pmol), dráha 2: pNth1 (51 pmol), dráhy 3+4: komplex Bmh1:pNth1 v poměru 1:2 (102 pmol Bmh1: 51 pmol pNth1.)

V drahách 3 a 4 je vidět, že mezi Bmh1 a pNth1 dochází k interakci (Macakova, E., et al., 2013).





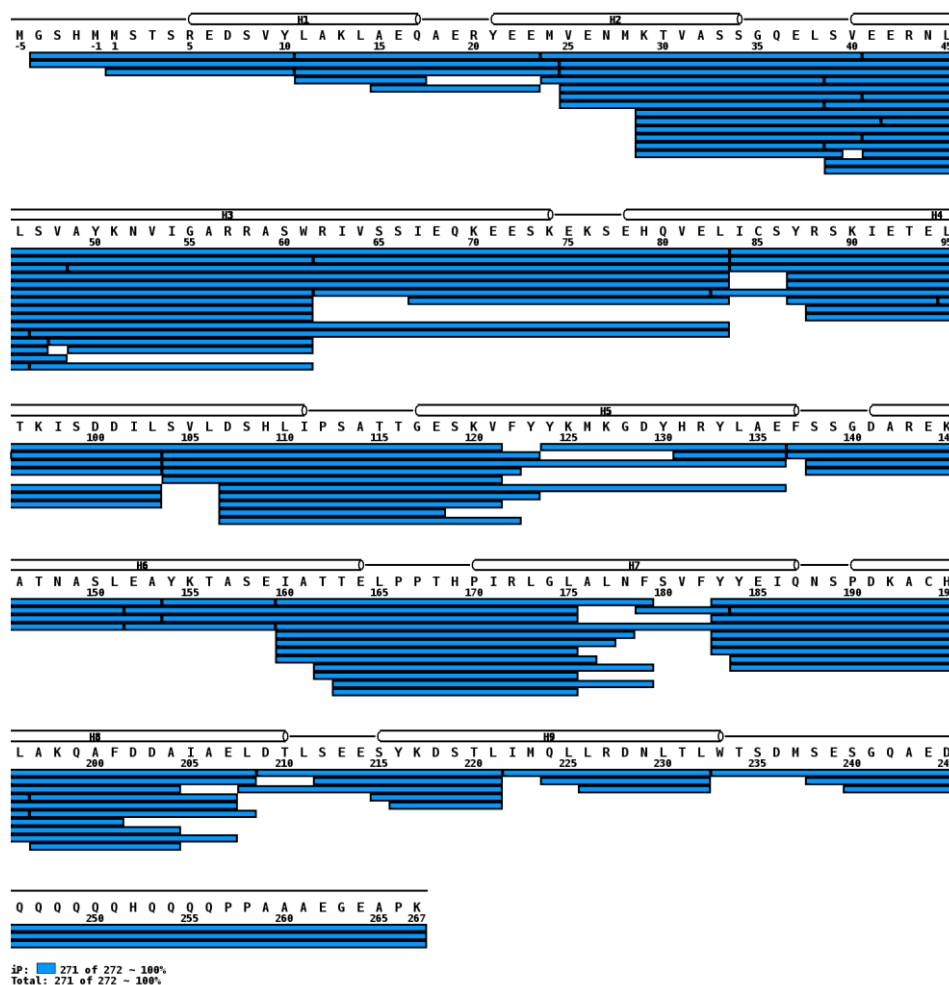
**Obr. 6.21:** (A) CD spektra ve vzdálené oblasti UV proteinů *Nth1*, *pNth1* a *Bmh1*. Spektrum *Nth1* (černá křivka), spektrum *pNth1* (červená křivka), spektrum *Bmh1* (modrá křivka).

(B) Porovnání CD spekter ve vzdálené UV oblasti proteinu *Bmh1* s *pNth1* (černá křivka), které spolu vytvářejí komplex a s *Nth1* (tečkovaná křivka), se kterým neinteraguje. Průměrná elipticita je vyjádřena jako funkce vlnové délky v deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>.res<sup>-1</sup> (Macakova, E., et al., 2013).

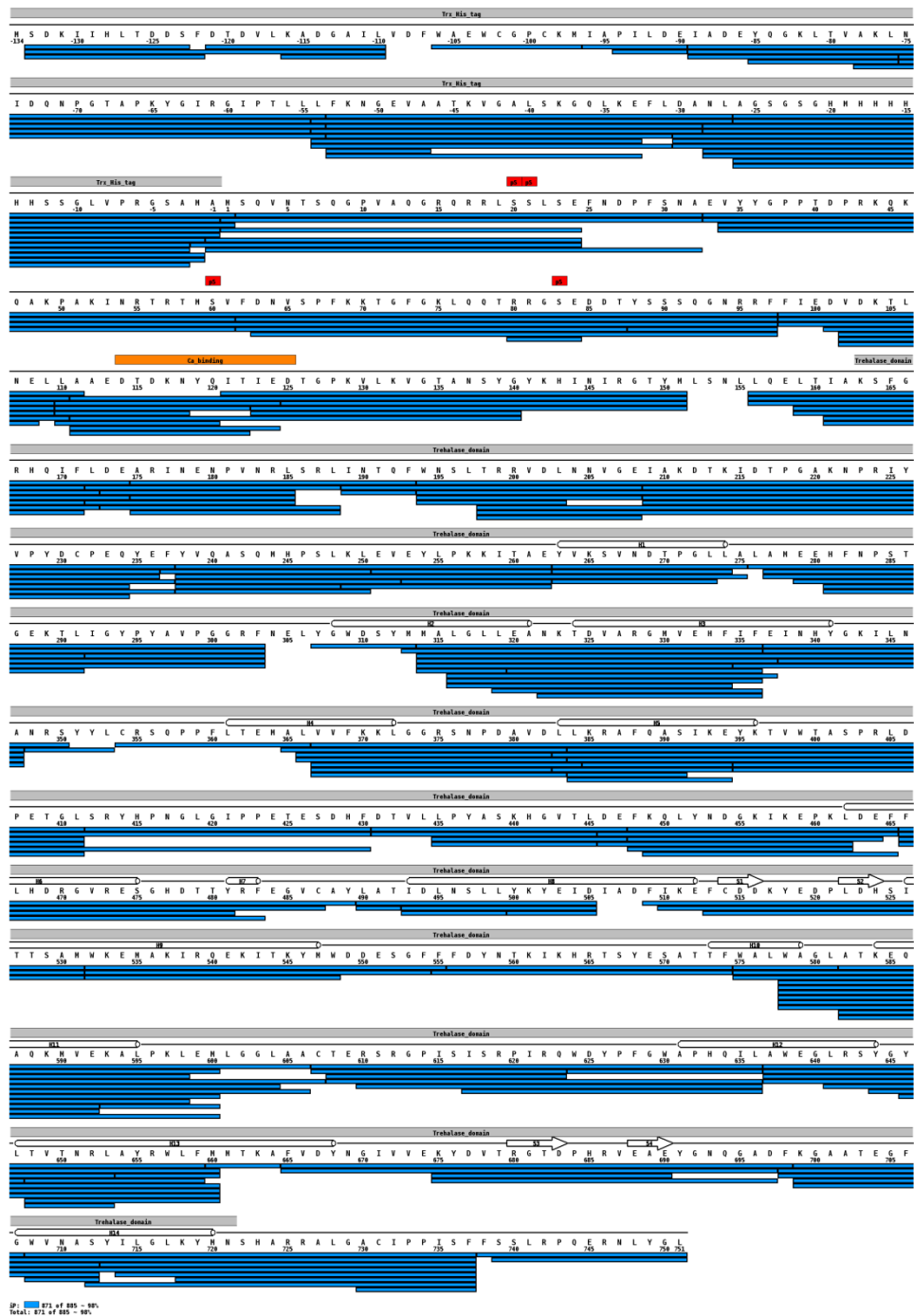
## 6.10 Studium strukturních změn pNth1:Bmh1 vodíko-deuteriovou výměnou spojenou s hmotnostní spektrometrií

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla měřena vodíko-deuteriová (H/D) výměna v čase podél celého peptidového řetězce, konkrétně výměna vodíků v peptidové vazbě (viz kap. 5.2.17). Kinetika vodíkové výměny závisí na přístupnosti rozpouštědla k proteinu. V oblastech, které jsou rozpouštědlu vystavené nebo jsou vysoce flexibilní, dochází k vodíkové výměně rychle, v oblastech „pohřbených“ uvnitř dochází k výměně velice pomalu. Vodíky, které se účastní vodíkových vazeb při tvorbě sekundární struktury proteinu, se vyměňují pomaleji, což odráží stabilitu proteinu a jeho flexibilitu. Byla studována H/D výměna u samotných pNth1, Bmh1 a u komplexu pNth1:Bmh1, aby mohly být identifikovány oblasti, ve kterých dochází po vytvoření komplexu ke strukturním změnám.

Kinetika výměny Bmh1 byla sledována na 61 peptidech, které pokrývaly 99 % sekvence Bmh1 (viz **obr. 6.22**), kinetika výměny pNth1 byla sledována na 255 peptidech, které pokrývaly 92 % sekvence Nth1 (viz **obr. 6.23**).



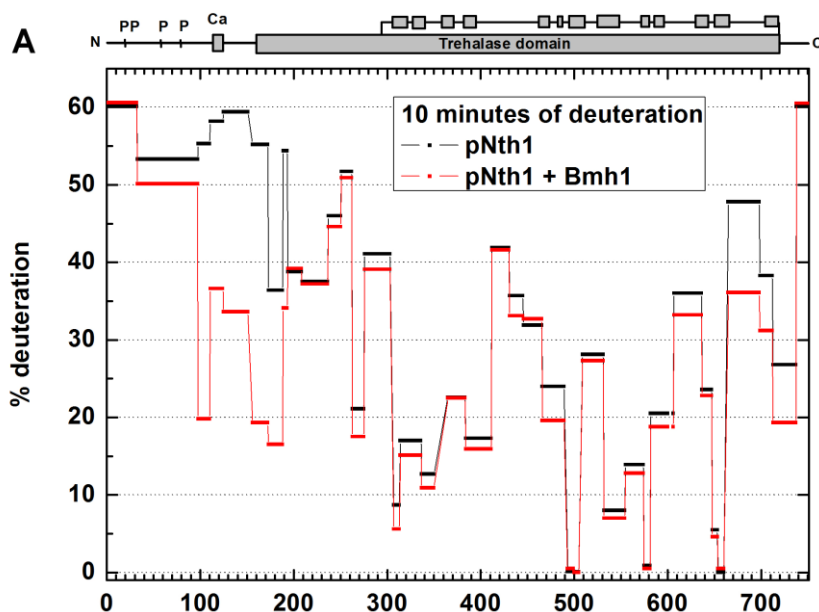
**Obr. 6.22:** Mapování peptidů Bmh1. Po štěpení proteinu imobilizovaným trypsinem byly peptidy identifikovány pomocí analýzy ESI-FT ICR-MS/MS (modré čáry). Helixy H1-H9 jsou vyznačeny nad sekvencí. Číslování je shodné s nativní sekvencí, 5 záporně číslovaných aminokyselin na N-terminálním konci je součástí kotvy. Mapa byla nakreslena pomocí programu Draw Map z MS Tools (Macakova, E., et al., 2013).



*Obr. 6.23: Mapování peptidů NthI. Po štěpení proteinu imobilizovaným trypsinem byly peptidy identifikovány pomocí analýzy ESI-FT ICR-MS/MS (modré čáry). Thioredoxinová kotva, fosforylační místa, Ca<sup>2+</sup> vazebná doména a trehalasová doména jsou vyznačeny nad sekvencí. Kotva je označena zápornými čísly. Mapa byla nakreslena pomocí Draw Map z MS Tools (Macakova, E., et al., 2013).*

## 6.11 Strukturní změny na Nth1

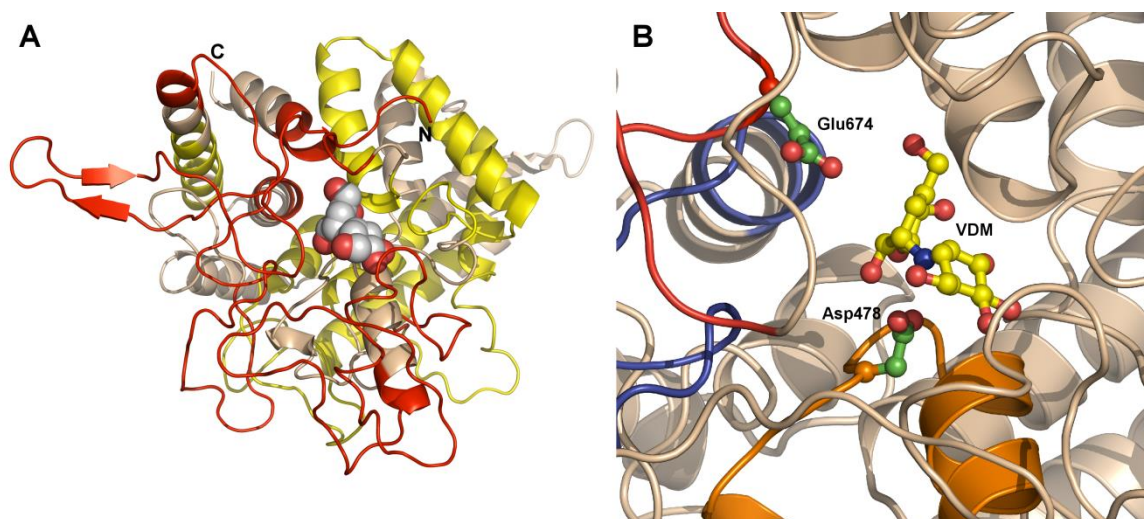
Ke znázornění kinetiky výměny vodíku za deuterium podél celé sekvence pNth1 byl vytvořen profil výměny, který ukazuje procento deuterace v čase 10 min, na vybraných nepřekrývajících se peptidech, které pokrývají celou proteinovou sekvenci (viz **obr. 6.24**). Samotné pNth1 vykazuje relativně rychlou deuteraci (rozsah deuterace vyšší než 30 %) v oblasti N-terminálního konce, který obsahuje všechny čtyři PKA fosforylační místa (sekvence 2-110), v oblasti vápníkové vazebné domény (sekvence 111-151) a v několika oblastech trehalasové katalytické domény (sekvence 156-262, 276-303, 412-465, 607-636, 665-712 a 738-751). Vysoké procento izotopové výměny v těchto oblastech ukazuje na jejich flexibilitu či přístupnost k rozpouštědлу.



**Obr. 6.24:** Procento deuterace pNth1 v přítomnosti a nepřítomnosti Bmh1 po 10 min deuterace. Fosforylační místa Nth1, trehalasová a vápníková doména jsou zobrazeny nad grafem (Macakova, E., et al., 2013).

Pro strukturní interpretaci dat, získaných pomocí hmotnostní spektrometrie, byl vytvořen homologní model katalytické domény Nth1 (sekvence 295-721) za použití krystalové struktury trehalasy Tre37A z *E. coli* jako templátu. Sekvenční identita Nth1 ze

*S. cerevisiae* a Tre37A z *E. coli* je 27 % a jejich podobnost činí 42 %. Strukturální model obsahuje „( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> barrel” podobný těm, nalezeným u ostatních  $\alpha$ -toroidálních glykosidas, kde je aktivní místo enzymu pohřbeno uvnitř struktury (viz **obr. 6.25**).



**Obr. 6.25:** (A) Homologní model katalytické trehalasové domény *Nth1* (sekvence 295-721). Oblasti, vykazující rychlou deuteraci, které obklopují aktivní oblast enzymu (sekvence 276-303, 412-465, 607-636, 665-712) jsou vybarveny červeně, oblasti vykazující pomalou výměnu (307-350, 384-411, 493-505, 532-581, 648-660) jsou vybarveny žlutě. Na aktivní oblast je navázán trehalasový inhibitor validoxylamin (zobrazen pomocí kuliček), což vychází z krystalové struktury templátu (trehalasa Tre37A, PDB kód 2JF4), který byl použit na vytvoření tohoto modelu.

(B) Detail aktivní oblasti *Nth1* s inhibitorem validoxylaminem. Asp478 pravděpodobně působí jako kyselina, Glu674 jako zásada v hydrolyzačním mechanismu. Pomalejší deuteraci po vazbě na *Bmh1* mají peptidy označené červeně (peptid 665-698), modře (607-636) a oranžově (466-489) (Macakova, E., et al., 2013).

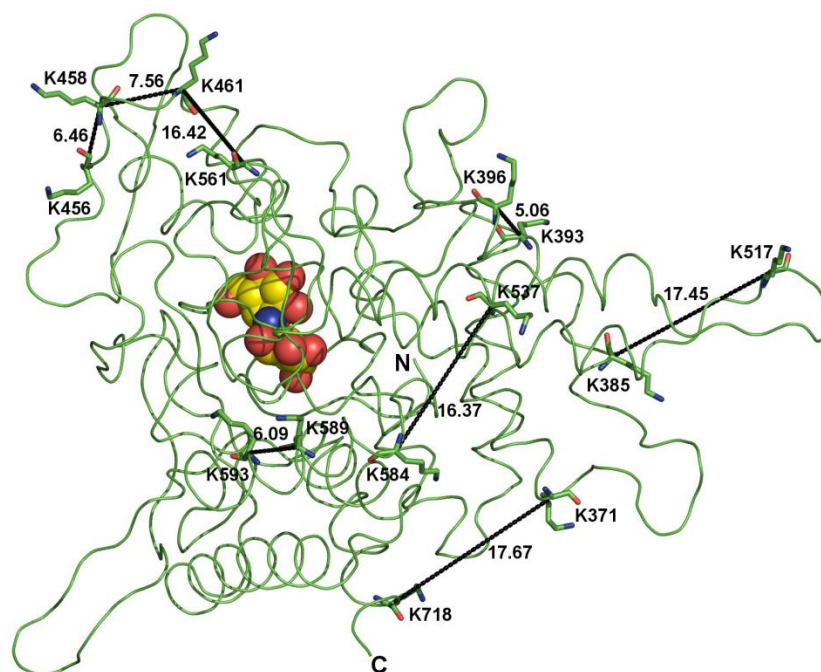
Homologní model *Nth1* byl dále experimentálně ověřen použitím vzdáleností odvozených z chemického zesíťování, při kterých byla použita homo-bifunkční činidla DSS a DSG (vazba aminokyselina-aminokyselina), které se kovalentně vážou na lysiny. Porovnání vzdáleností Ca-Ca inter-aminokyselinových sekvencí získaných chemickým zesíťováním a vytvořením homologního modelu *Nth1* je ukázáno v **Tabulce 9**.

Vzdálenosti mezi lysiny spojenými zesíťovacími činidly jsou: 20 Å pro  $\alpha$ -uhlíky lysinů spojených DSG a 24 Å pro  $\alpha$ -uhlíky lysinů spojených DSS. Vzdušenost mezi Ca-Ca lysinů získaná chemickými zesíťovacími reakcemi odpovídá vzdálenostem, odvozených z homologního modelu (viz **obr. 6.26**).

*Tabulka 9: Vzdušenosti mezi AK získané chemickým zesíťováním a vytvořením homologního modelu katalytické domény NthI (Macakova, E., et al., 2013).*

Zesíťovací činidlo	Zesíťované aminokyseliny <sup>a</sup>	Ca-Ca vzdálenost z homologního modelu Å	Ca-Ca vzdálenost získaná chemickými zesíťovacími reakcemi Å
DSS/DSSD4	K214-K675, inter	-	≤24
DSS/DSSD4	K214/K221-K563, inter	-	≤24
DSG/DSGD4	K258-K393, inter	-	≤20
DSS/DSSD4	K258-K343, inter	-	≤24
DSG/DSGD4	K393-K396, intra	5.1	≤20
DSS/DSSD4	K385-K517, inter	17.5	≤24
DSG/DSGD4	K385-K517, inter	17.5	≤20
DSS/DSSD4	K371-K718, inter	17.7	≤24
DSS/DSSD4	K537-K584, inter	16.4	≤24
DSG/DSGD4	K589-K593, intra	6.1	≤20
DSS/DSSD4	K589-K593, inter	6.1	≤24
DSG/DSGD4	K461-K561, inter	16.4	≤20
DSS/DSSD4	K461-K561, inter	16.4	≤24
DSS/DSSD4	K456-K458, inter	6.5	≤24
DSG/DSGD4	K456-K458, inter	6.5	≤20
DSS/DSSD4	K458-K461, inter	7.6	≤24
DSG/DSGD4	K458-K461, inter	7.6	≤20

<sup>a</sup> Intra značí AK spojené v rámci jednoho peptidu, inter značí spojení mezi AK ze dvou různých peptidů.



**Obr. 6.26:** Strukturální model Nth1 (aminokyseliny 295-722) ve stužkové reprezentaci. Černé spojnice zobrazují lysiny, jednoznačně spojené zesíťovacími činidly. V aktivní oblasti je navázán inhibitor validoxylamin (značen pomocí kuliček) (Macakova, E., et al., 2013).

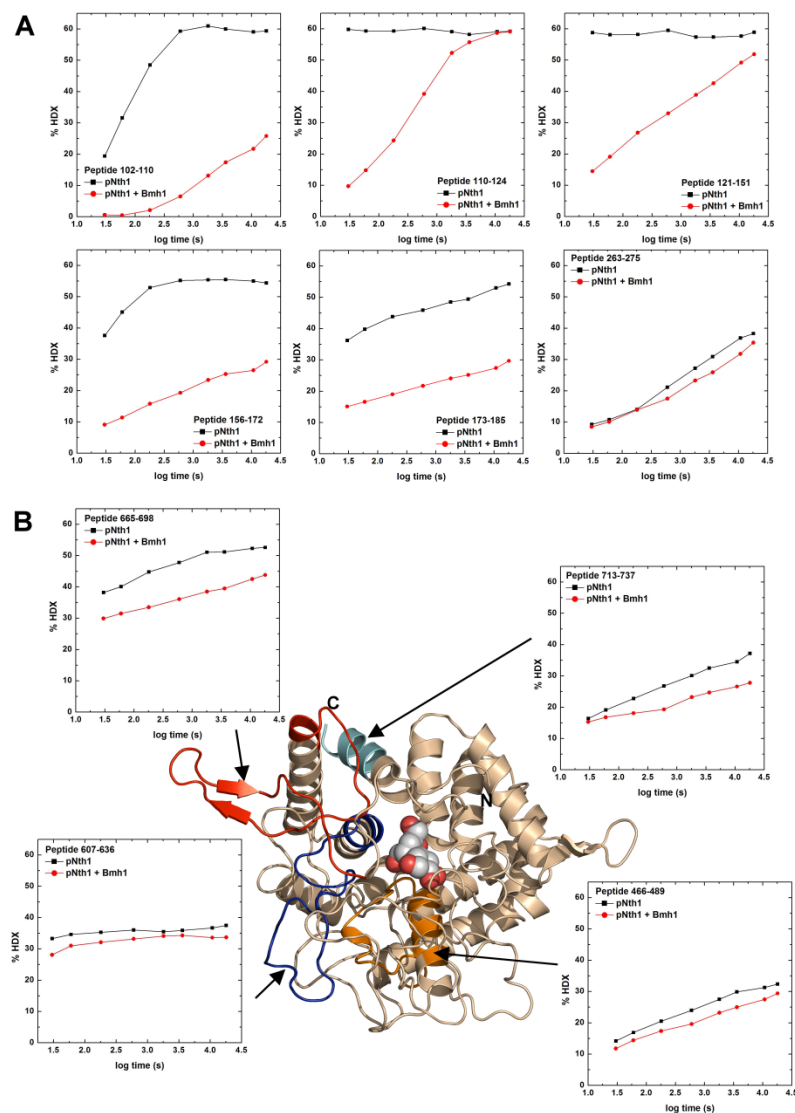
Strukturální model Nth1 katalytické domény koresponduje také s výsledky H/D výměny. V okolí aktivní oblasti dochází k rychlé deuteraci, k pomalejší deuteraci pak dochází v oblastech 307-350, 384-411, 493-505, 532-581, 648-660 (viz obr. 6.25 A), což odpovídá elementům sekundární struktury (viz obr. 6.24, zobrazené nahoře), nebo pohřbení dané sekvence v nitru proteinu. Z těchto výsledků vyplývá, že tento homologní model je věrným znázorněním struktury katalytické domény Nth1.

Vazba na Bmh1 způsobí pokles deuterace v mnoha regionech Nth1 (viz obr. 6.24). Nejvýznamnější pokles je zřejmý v oblasti 98-193, kde procento deuterace po 10 min klesne z 55-60 % na 20-35 % po navázání Bmh1 (viz obr. 6.24 a 6.27 A). Další oblasti, kde dojde k poklesu deuterace se nacházejí na N-terminálním konci (33-97) a v katalytické doméně (263-275, 307-313, 431-445, 466-489, 607-636 a 665-737). Pokles výměny vodíků za deuterium může být způsobeno nepřístupností oblasti k rozpouštědлу a/nebo změnou vodíkových vazeb po vytvoření komplexu (oblast přímo interaguje s Bmh1 a/nebo v ní dojde ke strukturálním změnám po navázání Bmh1). Homologní strukturální model Nth1 ovšem neobsahuje N-terminální konec ani vápníkovou vazebnou doménu, protože templát

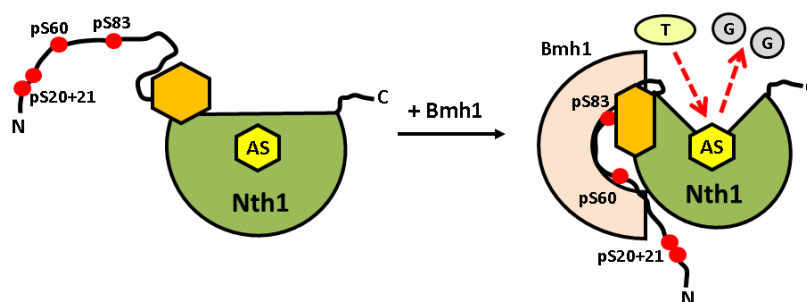


(Tre37A) tyto regiony neobsahuje. Ve strukturním modelu jsou tedy pouze peptidy z katalytické domény Nth1 (466-489, 607-636, 665-698, a 713-737).

Jak je ukázáno na **obr. 6.27 B**, podle strukturního modelu je aktivní oblast enzymu Nth1 pohřbena. Lze se tedy domnívat, že aktivace Nth1 vyžaduje konformační změnu, při které dojde ke zpřístupnění aktivní oblasti pro substrát (viz **obr. 6.28**). Po navázání Bmh1 dojde k poklesu deuterace v okolí aktivní oblasti Nth1 (466-489, 607-636, 665-698, a 713-737), což naznačuje, že vazba Bmh1 způsobuje strukturální změny v této oblasti.



**Obr. 6.27:** Vazebný povrch pNth1 zobrazený pomocí H/D výměny. Na grafech je ukázána H/D kinetika vybraných oblastí pNth1, ve kterých dojde k poklesu deuterace po vazbě k Bmh1. Na homologním strukturním modelu pNth1 jsou zvýrazněny oblasti v katalytické doméně (vybarveny červeně, modře, světlemodře a oranžově). H/D výměna je vyjádřena jako procenta oproti teoretické deuteraci pNth1 samotného (černé čtverce) a pNth1 v přítomnosti Bmh1 (červená kolečka). Čas je udáván v sekundách (Macakova, E., et al., 2013).



**Obr. 6.28:** Schéma znázorňující způsob aktivace Nth1 pomocí Bmh1. Nth1 se naváže pomocí fosforylačních míst na N-konci, čímž změní konformaci molekuly, aktivní oblast enzymu se odhalí substrátu a začne hydrolyza trehalosy na dvě molekuly glukosy (Macakova, E., et al., 2013).

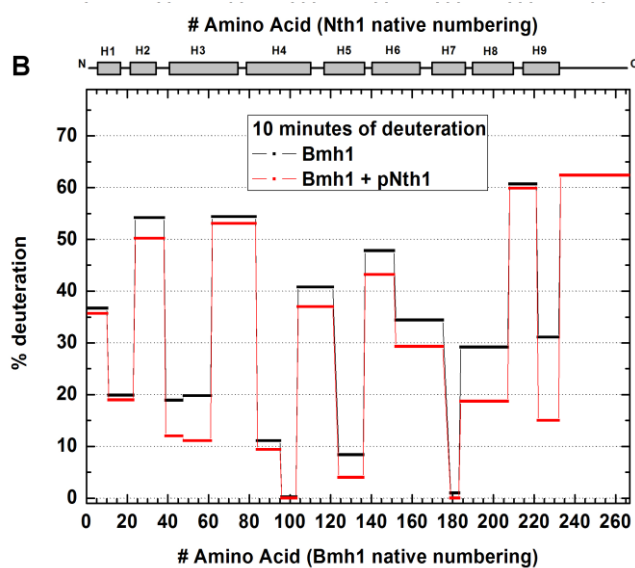
Vazba na Bmh1 ovlivňuje kinetiku deuterace pNth1 i v dalších oblastech, ne pouze okolo aktivní oblasti, ale také v okolí aminokyselin nezbytných pro katalýzu (viz **obr. 6.25 B**). Peptidy 466-489 (**obr. 6.27**, oranžová) a 665-698 (**obr. 6.27**, červená) obsahují aminokyseliny Asp478 a Glu674, které jsou ekvivalenty aminokyselinám Asp312 a Glu496 v trehalase Tre37A z *E. coli*, a o kterých se předpokládá, že fungují jako katalytická kyselina a zásada.

Další nepatrné snížení procenta deuterace (~4 % za 10 min) bylo pozorováno na N-terminálním konci pNth1 (33-97), který obsahuje obě fosforylační místa, zodpovědná za vazbu k Bmh1 (Ser60 a Ser83). Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny navázáním tohoto segmentu do vazebného žlábků proteinu Bmh1. Vysoké procento deuterace (~50-60 %) v této oblasti v nepřítomnosti Bmh1 pak odpovídá predikci, že je N-konec Nth1 neuspořádaný a velice flexibilní.

## 6.12 Strukturní změny na Bmh1

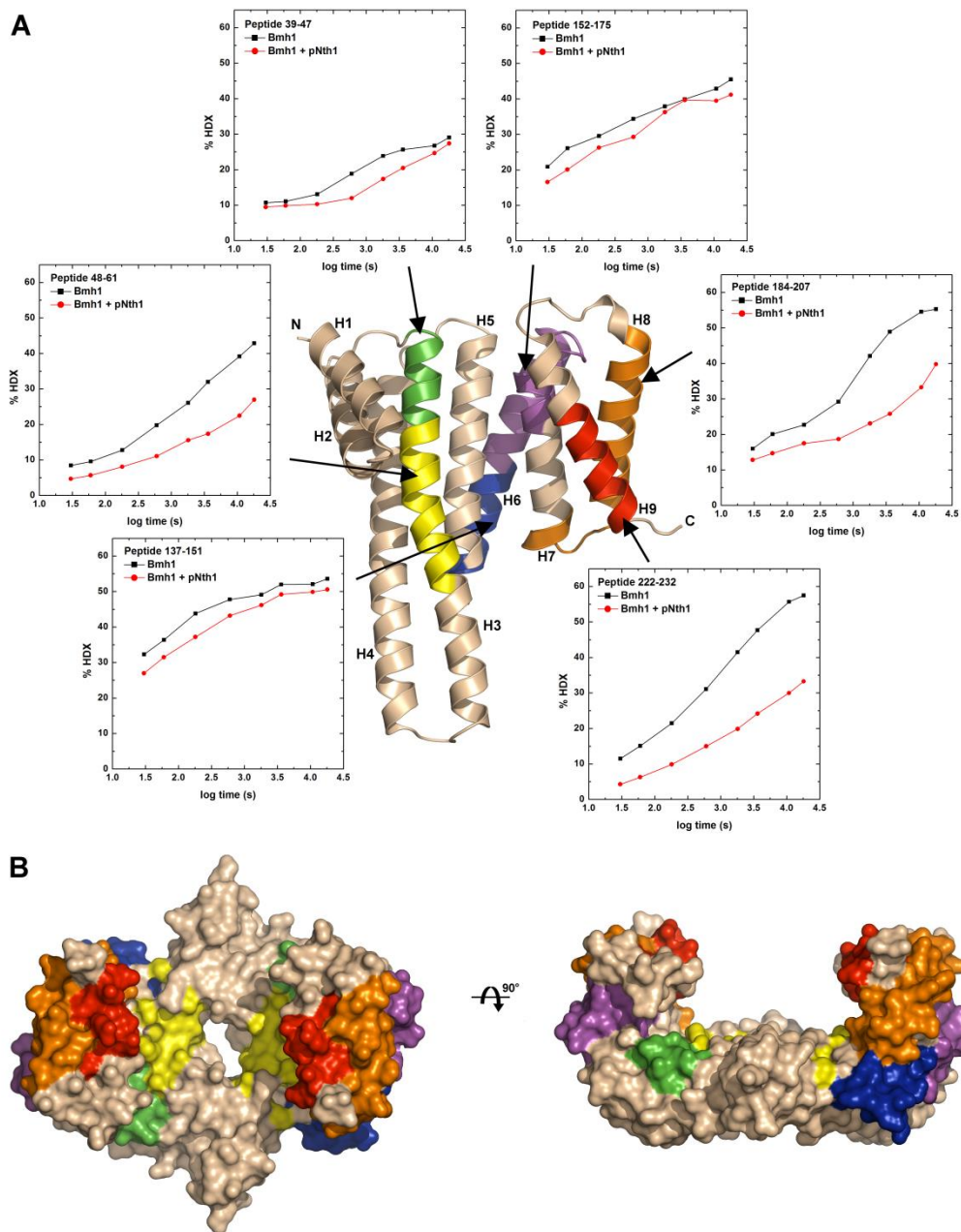
Strukturní změny při tvorbě komplexu s Nth1 na povrchu Bmh1 byly studovány stejným způsobem jako u Nth1 (kap. 6.11). Isotopové výměnné profily Bmh1 samotného a navázaného na Nth1 po 10 min deuterace jsou ukázány na **obr. 6.29**. Profil, pozorovaný

pro samotné Bmh1 obsahuje pravidelně se střídající oblasti s rychlou a pomalou výměnou, což dobře odpovídá již známým strukturám proteinů 14-3-3.



**Obr. 6.29:** Procento deuterace Bmh1 v přítomnosti a nepřítomnosti pNth1 po 10 min deuterace. Elementy sekundární struktury jsou zobrazeny nad grafem (Macakova, E., et al., 2013).

Pro interpretaci dat, získaných H/D výměnou, byl vytvořen homologní model Bmh1 (viz **obr. 6.30**). Tento model byl navíc experimentálně ověřen použitím vzdáleností mezi aminokyselinovými zbytky, získaných pomocí chemického zesíťování s homobifunkčními činidly DSS a DSG. Vzdálenost C $\alpha$ -C $\alpha$  mezi interními aminokyselinovými zbytky (viz **Tabulka 10**) odpovídá vytvořenému modelu (viz **obr. 6.31**) a potvrzuje tak dimerní charakter proteinu Bmh1.

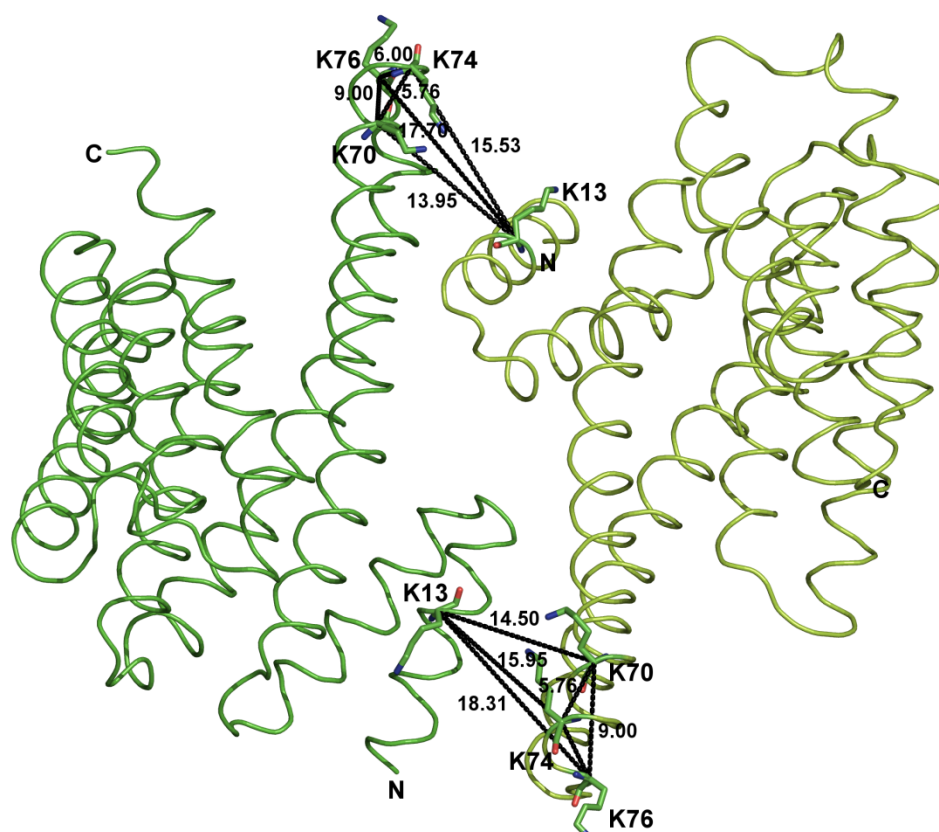


**Obr. 6.30:** *H/D* výměna na povrchu proteinu *Bmh1*. **(A)** Kinetika *H/D* výměny na *Bmh1*, která vykazuje pomalejší výměnu po navázání *pNth1*. Na strukturním modelu jsou tyto oblasti vybarveny červeně, zeleně, modře, žlutě, oranžově a fialově. Výměna za deuterium je vyjádřena jako procento k teoretické maximální deuteraci pro *Bmh1* samotné (černé čtverce) a v přítomnosti *pNth1* (červená kolečka). Je ukázán pouze jeden monomer *Bmh1*. Čas je vyjádřen v s. **(B)** Oblasti, které vykazují nižší *H/D* výměnu po vazbě s *pNth1*, vyznačené na povrchovém modelu *Bmh1* (Macakova, E., et al., 2013).

**Tabulka 10: Vzdálenosti mezi AK získané chemickým zesíťováním a vytvořením homologního modelu proteinu Bmh1** (Macakova, E., et al., 2013).

Zesíťovací činidlo	Zesíťované aminokyseliny <sup>a</sup>	Ca-Ca vzdálenost z homologního modelu	Ca-Ca vzdálenost získaná zesíťovacími reakcemi
		Å	Å
DSG/DSGD4	K13-K76, inter	17.7/18.3	≤20
DSS/DSSD4	K13-K76, inter	17.7/18.3	≤24
DSG/DSGD4	K13-K70, inter	14.0/14.5	≤20
DSS/DSSD4	K13-K70, inter	14.0/14.5	≤24
DSG/DSGD4	K70-K74, intra	5.8	≤20
DSS/DSSD4	K70-K74, intra	5.8	≤24
DSG/DSGD4	K70-/-K74/-K76, intra	5.8/6.0/9.0	≤20
DSS/DSSD4	K70-/-K74/-K76, intra	5.8/6.0/9.0	≤24
DSG/DSGD4	K13-K74, inter	15.5/16.0	≤20
DSS/DSSD4	K13-K74, inter	15.5/16.0	≤24
DSG/DSGD4	K74-K76, intra	6.0	≤20

<sup>a</sup> Intra značí AK spojené v rámci jednoho peptidu, inter značí spojení mezi AK ze dvou různých peptidů



**Obr. 6.31:** Homologní model Bmh1 (sekvence 4-236) ve stužkové reprezentaci. Černé spojnice zobrazují lysiny, jednoznačně spojené zesíťovacími činidly. Zesíťované aminokyseliny na povrchu molekuly mezi dvěma monomery odpovídají dimerní struktuře Bmh1 (Macakova, E., et al., 2013).

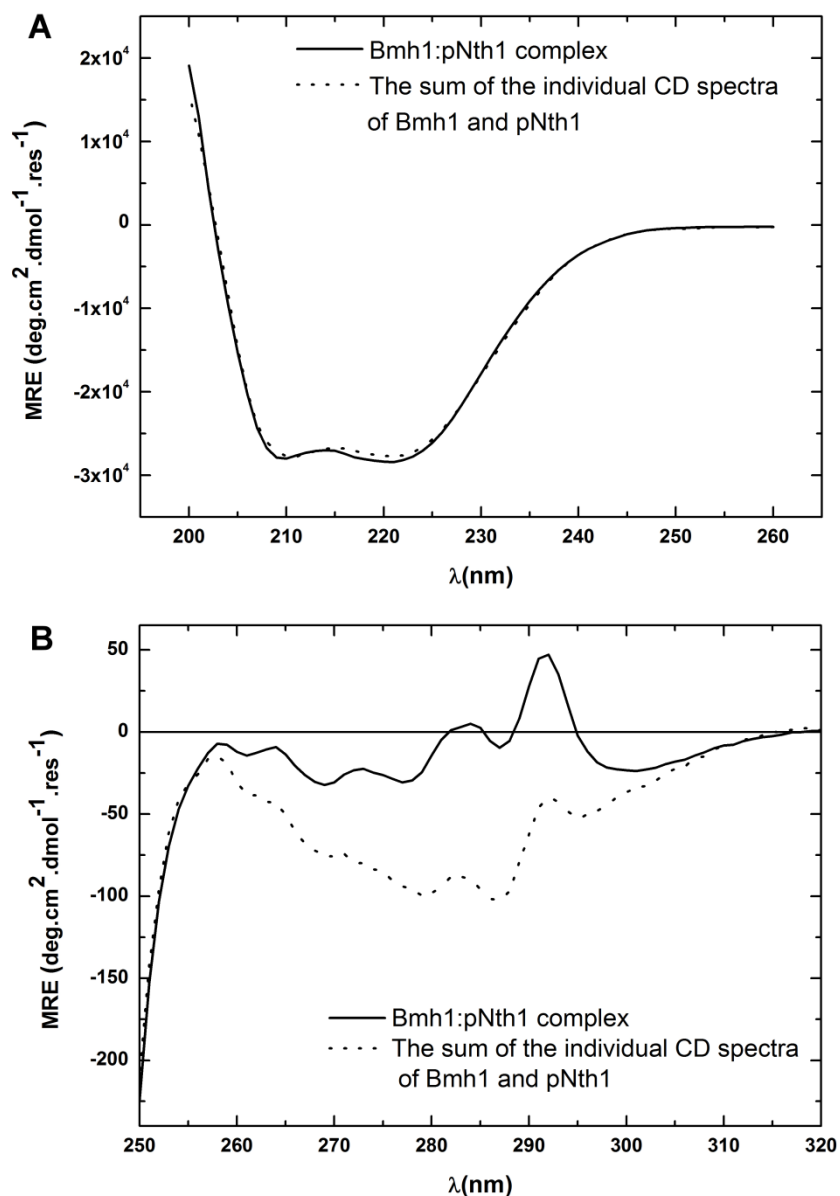
Nejvyšší procento deuterace bylo detekováno na helixu H6, ohybech mezi helixy H2-H3, H3-H4, H4-H5, H8-H9 a na C-terminálním konci. Nejnižší deuterace pak byla zaznamenána na peptidech z helixů H1, H3, H4, H5, H7 a H9. Po vytvoření komplexu s Nth1 došlo k nejvýznamnějšímu poklesu deuterace v peptidech 39-47 a 48-61 z helixu H3, 137-151 z helixu H6, 152-175 z helixů H6 a H7, 184-207 z helixů H7 a H8, 222-232 z C-terminálního konce (viz **obr. 6.30 A**).

Pomalejší výměna vodíku za deuterium může být způsobena sníženým přístupem rozpouštědla do dané oblasti po vytvoření komplexu, z čehož vyplývá, že tyto části tvoří oblast interakce s pNth1. Je zajímavým faktem, že interakce v tomto případě není tvořena pouze vazebným žlábkem Bmh1 (helixy H3, H5, H7 a H9, kam se váže fosforylovaný N-konec Nth1), ale také helixy H6 a H8, které se nacházejí vně centrálního žlábků dimeru Bmh1 (viz **obr. 6.29 B**).

## 6.13 Cirkulární dichroismus

CD spektroskopie v blízké a vzdálené oblasti UV byla použita na určení možných strukturálních změn proteinů Bmh1 a pNth1 po vytvoření komplexu. CD spektra ve vzdálené oblasti UV komplexu Bmh1:pNth1 (v poměru 2:1) v porovnání se spektry samotných proteinů Bmh1 a pNth1 nevykazují signifikantní změny v sekundární struktuře (viz **obr. 6.32 A**). Oproti tomu, spektra v blízké oblasti UV vykazují změny v oblasti 260-310 nm (viz **obr. 6.32 B**). CD spektra v tomto regionu odrážejí změny v pohyblivosti proteinu, vlivu prostředí a prostorového umístění aromatických aminokyselin. Změny v blízké oblasti UV ukazují, že tvorba komplexu Bmh1:pNth1 ovlivňuje terciární strukturu obou proteinů, což odpovídá datům získaným pomocí měření H/D výměny.

Zvýšení aktivity enzymu pNth1 po navázání na Bmh1, stejně jako snížení kinetiky deuterace mnoha oblastí v pNth1 a Bmh1, nevychází ze změn v sekundární struktuře, ale pravděpodobně odráží změny v terciární struktuře obou proteinů.



**Obr. 6.32:** (A) Porovnání CD spekter ve vzdálené oblasti UV komplexu *Bmh1:pNth1* (nepřerušovaná křivka), s úhrnem spekter samotných proteinů *Bmh1* a *pNth1* (tečkovaná křivka). (B) Porovnání CD spekter v blízké oblasti UV komplexu *Bmh1:pNth1* (nepřerušovaná křivka), s úhrnem spekter samotných proteinů *Bmh1* a *pNth1* (tečkovaná křivka). Proteiny byly smíchány v poměru 2:1. Průměrná elipticita (MRE) je vynesena jako funkce vlnové délky (Macakova, E., et al., 2013).



## 7. Diskuse

Hlavním cílem této práce bylo lépe prozkoumat zatím ne zcela jasný proces aktivace enzymu Nth1 vazbou na kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 (Bmh1 a Bmh2). Nejdříve byla identifikována čtyři fosforylační místa na N-terminálním konci Nth1, která jsou fosforylována PKA *in vitro* (Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83), z nichž ovšem pouze Ser60 a Ser83 jsou nezbytné pro aktivaci (viz **Tabulka 6, obr. 6.19**), jak bylo ověřeno pomocí vazebných experimentů na analytické ultracentrifuze a měření enzymové kinetiky *in vitro*. Díky limitované proteolýze a hmotnostní spektrometrii bylo potvrzeno, že proteiny Bmh interagují s N-terminálním koncem Nth1, kde se fosforylační místa nacházejí (viz **obr. 6.18**). Tyto experimenty vycházely z pokusů Panni et al. (Panni, S., et al., 2008), která ale jako esenciální fosforylační místa pro vazbu proteinů 14-3-3 označila Ser21 a Ser23 fosforylační místa Ser60 a Ser83 vůbec nedetekovala. Tento rozdíl může být způsoben použitím jiných metod. V této práci byly na studium interakce s Bmh používány jedno- či dvoj-mutanty celého rekombinantního proteinu pNth1, zatímco Panni et al. (Panni, S., et al., 2008) používala místo celého proteinu krátké syntetické polypeptidy.

Pro funkci proteinů 14-3-3 je důležitá jejich tendence vytvářet dimery se dvěma vazebnými žlábkami a antiparalelním uspořádáním, což umožňuje současné navázání dvou vazebných motivů. Mnoho vazebných partnerů proteinů 14-3-3 obsahuje dva a více vazebných motivů a neutrální trehalasa 1 je pravděpodobně jedním z nich. Bylo prokázáno, že mezi dvěma vazebnými motivy musí být sekvence obsahující alespoň 10 aminokyselinových zbytků (Kostecky, B., et al., 2009). Tomu by mohly odpovídat Ser60 a Ser83, které by přesně takový vazebný dvou-motiv mohly vytvářet. Oproti tomu Ser20 a Ser21, které se také fosforylují PKA *in vitro* (viz **Tabulka 6.**) vazebný motiv pro proteiny 14-3-3 nevytvářejí. To koresponduje s faktem, že nebylo dosud nikdy popsáno, aby proteiny 14-3-3 rozpoznaly jako vazebný motiv peptid s tak blízko umístěnými fosforylovanými aminokyselinami (Fu, H., et al., 2000). Experimenty prováděné s mutanty pNth1-S20, pNth1-S21 a pNth1-S20+21 prokázaly, že tyto mutanty vážou Bmh s mnohem nižší afinitou (viz **Tabulka 6**) a vykazují výrazně nižší enzymatickou aktivitu (viz **obr. 6.19**).



Proteiny 14-3-3 regulují aktivitu mnoha různých enzymů (např. serotonin N-acetyl transferasy (Obsil, T., et al., 2001) ad.). Mechanismus těchto regulací je ve většině případů stále nejasný. Může se jednat např. o změnu strukturní konformace vazebného partnera (tedy enzymu), jako je tomu u serotonin N-acetyl transferasy. U Nth1 jsou všechna PKA fosforylační místa, tedy vazebné motivy 14-3-3, umístěna na neuspořádaném N-terminálním konci molekuly, vně katalytické domény enzymu. Fosforylace PKA nezvyšuje aktivitu Nth1 jako takové, ale indukcí vazby na Bmh. Lze předpokládat, že navázání proteinu 14-3-3 na Nth1 způsobí strukturní změny v molekule Nth1, pravděpodobně v oblasti její katalytické domény, což zvýší její enzymatickou aktivitu.

Nth1 není aktivována pouze Bmh, ale v menší míře také vápníkem, jak bylo navrženo Francem et al. (Franco, A, et al., 2003). V našich experimentech bylo pozorováno zvýšení aktivity Nth1 v přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$ , avšak tento efekt byl výrazně slabší oproti zvýšení aktivity v přítomnosti Bmh (viz **obr. 6.17**, **Tabulka 8**). V přítomnosti jak  $\text{Ca}^{2+}$ , tak Bmh se výsledné hodnoty  $k_{cat}$  a  $K_M$  snížily oproti hodnotám v přítomnosti samotného Bmh1, katalytická účinnost ( $k_{cat}/K_M$ ) však zůstala relativně podobná. Tyto hodnoty naznačují, že mechanismus aktivace ionty  $\text{Ca}^{2+}$  je odlišný od mechanismu aktivace proteiny Bmh. Vápníková vazebná doména („EF hand“ motiv) se nachází mezi N-terminálním koncem a katalytickou doménou (viz **obr. 6.13**), z čehož vyplývá, že vazba vápníku může ovlivňovat interakci mezi pNth1 a Bmh a tím i enzymatickou aktivitu pNth1. Lze však říci, že aktivace proteiny 14-3-3 je podstatně účinnější než aktivace vápníkem.

Předmětem dalšího studia bylo objasnit strukturní pozadí aktivace Nth1 proteinem Bmh1. Jak bylo řečeno dříve, trehalasy katalyzují hydrolýzu glykosidické vazby v trehalose. Zatím jediná vyřešená krystalická struktura trehalasy (Tre37A z *E.coli*) ukazuje, že aktivní oblast enzymu je pohřbená uvnitř proteinu (Gibson, R.P., et al., 2007), pro aktivaci je tím pádem potřeba konformační změna, která odhalí aktivní oblast substrátu. Podobný mechanismus se díky podobnosti sekvencí dá očekávat i u kvasničné Nth1. Dalším důkazem, že aktivní oblast enzymu je pro substrát nepřístupná, je fakt, že samotný enzym je neaktivní a pro aktivaci je nezbytná vazba kvasničných proteinů 14-3-3. Tyto proteiny jsou známy tím, že jeden ze způsobů regulace jejich vazebných partnerů je změna konformace vazebného partnera (Veisova, D., et al., 2012).

Jak bylo popsáno výše, proteiny 14-3-3 regulují mimo jiné mnoho enzymů. Strukturní pozadí této aktivace však bylo dosud vyřešeno pouze pro AANAT (*Obsil, T., et al., 2001*), u které dojde po navázání proteinu 14-3-3 ke změně struktury oblasti nezbytné pro vazbu substrátu, a u H<sup>+</sup>-ATPasy, u které se po navázání proteinu 14-3-3 změni struktura a oligomerní stav (*Ottmann, C., et al., 2007*). Další proteiny, u kterých dochází ke konformačním změnám po navázání proteinu 14-3-3 jsou např. fosducin (*Rezabkova, L., et al., 2012*) nebo regulátor G-proteinové signalizace 3 (*Rezabkova, L., et al., 2010*). Zdá se logické, že aktivace Nth1 může probíhat obdobným mechanismem.

Pro výzkum konformačních změn Nth1 a Bmh1 byly použity metody vodíko-deuteriové (H/D) výměny a chemického zesíťování s hmotnostní spektrometrií a dále CD spektroskopie. Pomocí těchto metod bylo možné zmapovat interakci proteinů a jejich konformační změny. Z dat získaných H/D výměnou bylo zjištěno, že navázání Bmh1 snižuje izotopovou výměnu u Nth1 v oblastech N-terminálního konce (jehož součástí jsou fosforylační místa Ser60 a Ser83), vápníkové vazebné domény (102-185) a několika peptidů z katalytické domény, které obklopují aktivní oblast enzymu (viz **obr. 6.24** a **6.27**). Tyto oblasti se tedy buď přímo účastní vazby na Bmh1, nebo u nich dojde k podstatné změně struktury. Tyto změny ale nemají vliv na sekundární strukturu proteinu, spíše ovlivňují strukturu terciární, což odpovídá rigiditě struktury Bmh1, jak bylo zjištěno pomocí CD spekter (viz **obr. 6.32**).

Na základě těchto výsledků bylo vytvořeno schéma aktivace Nth1 proteinem Bmh1 (viz **obr. 6.28**). Pokud je Nth1 nefosforylována, aktivní oblast je skryta v katalytické doméně a enzym je neaktivní. Po fosforylaci PKA se na N-konci pNth1 vytvoří dvě vazebná místa, která jsou rozpoznávána jako vazebný motiv proteinů 14-3-3 a vznikne komplex pNth1:Bmh1 (stechiometrie 1:2) (*Veisova, D., et al., 2012*). Vazba Bmh1 ovlivní strukturní vlastnosti vápníkové i katalytické domény pNth1, což vede k aktivaci enzymové aktivity pNth1 zpřístupněním její aktivní oblasti a umožněním vstupu trehalosy a výstupu glukosy.

V dimeru Bmh1 ovlivňuje vytvoření komplexu s pNth1 nejen zakonzervovaný vazebný žlábek, ale i méně konzervované regiony helixů H6 a H8 vně vazebného žlábků (viz **obr. 6.30**). Podobný způsob interakce byl popsán u lidské isoformy 14-3-3ζ a jejího komplexu s regulátorem G-proteinové signalizace 3, pomocí metod H/D výměny a malouhlového rozptylu světla (*Rezabkova, L., et al., 2011*), stejně jako u nedávno vyřešené

krystalové struktury florigenu Hd3a s proteinem 14-3-3 (*Taoka, K., et al., 2011*). Oblasti mimo vazebný žlábek se často projevují jako místa interakce při vytváření komplexů a rozdíly v jejich sekvenci mohou být jedním z důvodů vazebné specifity různých isoform (*Obsil, T., Obsilova, V., 2011*) (*Gardino, A.K., et al., 2006*) (*Obsilova, V., et al., 2008*).

Cílem této práce bylo objasnit mechanismus aktivace enzymu Nth1 proteiny Bmh. Byla identifikována fosforylační místa na N-terminálním konci Nth1, klíčové pro vazbu Bmh a dále byly objasněny konformační změny, ke kterým v obou proteinech po vytvoření komplexu dochází a které části molekul obou proteinů se vazby účastní.

## 8. Závěr

Pomocí metod cílené mutagenese, analytické ultracentrifugace a měření enzymové kinetiky bylo zjištěno, že vazba proteinu Bmh je nezbytná pro aktivaci kvasničného enzymu pNth1. Bmh1:pNth1 se váží v poměru 2:1 a to pomocí fosforylačních míst Ser60 a Ser83, které musejí být nafosforylovány PKA. Pomocí limitované proteolýzy a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie se ukázalo, že monomerní pNth1 se váže k dimeru Bmh pomocí své N-terminální oblasti, na které se PKA fosforylační místa nacházejí.

Při tvorbě komplexu pNth1:Bmh1 dochází u obou proteinů ke konformačním změnám, jak bylo zjištěno pomocí CD spektroskopie, vodíko-deuteriové výměny a chemického zesíťování spojených s hmotnostní spektrometrií. U Bmh1 jsou kromě vazebného žlábků ovlivněny i helixy H6 a H8. U molekuly Nth1 je kromě nestrukturovaného N-terminálního konce ovlivněna nejvíce oblast kolem 100-200 ÅK, což pravděpodobně způsobuje odkrytí aktivní oblasti enzymu a tedy spuštění enzymové aktivity.

## 9. Souhrn

Neutrální trehalasa 1 je kvasničný enzym z rodiny hydrolas, který katalyzuje štěpení trehalosy na dvě molekuly glukosy. Trehalosa je neredukující disacharid, který slouží v buňkách kvasinek jako zdroj uhlíku a také jako stresový metabolit. Buňka v teplotním či chemickém stresu nahromadí trehalosu, které je v rámci zotavení se po ukončení stresových podmínek hydrolyzována trehalasou.

Předmětem našeho výzkumu byla Nth1 ze *S. cerevisiae*. Jak bylo publikováno dříve (Panni, S., et al., 2008), Nth1 musí být fosforylována PKA a v přítomnosti kvasničné isoformy proteinu 14-3-3, aby byla aktivní. Aktivita také v menší míře vzroste v přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$  (Franco, A., et al., 2003). Proteiny 14-3-3 jsou kyselé regulační proteiny, které se vyskytují ve všech eukaryotických organismech a účastní se řady buněčných dějů, jako je regulace buněčného cyklu, buněčný metabolismus, transkripce, apoptosa a další. Proteiny 14-3-3 mají přes 400 známých vazebných partnerů, mezi které patří transkripční faktory, signalizační molekuly, enzymy a další. Své vazebné partnery regulují skrze fosforylované vazebné motivy, a to změnou jejich konformace, odkrýváním či zakrýváním specifické sekvence či zprostředkováním protein-protein interakcí. Proteiny 14-3-3 se vyskytují v mnoha isoformách v různých organismech, v kvasinkách se nalézají dvě isoformy, Bmh1 a Bmh2 (Obsil, T., Obsilova, V., 2011).

Na detailní zkoumání aktivace Nth1 pomocí Bmh1 a Bmh2 bylo použito spektrum biochemických i biofyzikálních metod. Pomocí bodové mutagenese, měření sedimentační rychlosti na analytické ultracentrifuze a měření enzymové kinetiky bylo zjištěno, že Nth1 vytváří s Bmh stabilní komplex o stechiometrii 1:2, a dále byla určena fosforylační místa, zodpovědná za interakci s Bmh a tím i aktivaci enzymu. Jedná se o seriny Ser60 a Ser83, které se nacházejí na nestrukturovaném N-terminálním konci Nth1, což bylo potvrzeno limitovanou proteolýzou a analýzou peptidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Vodíko-deuteriová výměna s hmotnostní spektrometrií a CD spektroskopie byly použity na určení konformačních změn, ke kterým dochází při vytvoření komplexu ve struktuře obou proteinů pNth1 a Bmh1. Na základě naměřených dat byl vytvořen

homologní model Nth1 a Bmh1 a pro jeho upřesnění byly použity vzdálenosti, naměřené chemickým zesíťováním s hmotnostní spektrometrií. U Bmh1 je vazbou k Nth1 ovlivněna podstatná část molekuly (nejen vazebný žlábek). U Nth1 ovlivňuje interakce s Bmh1 nejvíce oblast mezi 100-200 AK, což pravděpodobně odráží konformační změnu, při které dojde k odhalení předtím pohřbené aktivní části enzymu a jejímu zpřístupnění substrátu.

Z těchto výsledků vyplývá, že za aktivaci enzymu Nth1 pomocí Bmh jsou zodpovědné seriny na pozicích 60 a 83. Navázáním k Bmh1 u Nth1 dojde ke konformačním změnám, které způsobí odhalení aktivní oblasti enzymu a tím jeho aktivaci.

## 10. Summary

Neutral trehalase 1 is a yeast enzyme from the family of hydrolases, which catalyzes hydrolysis of trehalose to two glucose molecules. Trehalose is a non-reducing disaccharide, which serves as a carbon source in a yeast cells as well as a stress metabolite. When a cell is under stress conditions it accumulate trehalose and through the recovery process the trehalose is hydrolyses by trehalases.

The main subject of our study was Nth1 from *S. cerevisiae*. It was published earlier (Panni, S., *et al.*, 2008), that Nth1 must be phosphorylated by PKA and in the presence of 14-3-3 protein to be active. The activity of Nth1 also slightly increases in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions (Franco, A., *et al.*, 2003). 14-3-3 proteins are family of acid regulatory proteins, which participates in variety of processes in the cells, like regulation of the cell-cycle, cell metabolism, transcription, apoptosis etc. They have more than 400 known binding partners, which include transcription factors, signalling molecules, enzymes and others. They control the regulation of their binding partners through phosphorylated motives in sequence by changing conformation of the binding partner, revealing or masking specific sequence or by mediation of protein-protein interactions. There are many isoforms of 14-3-3 proteins through all eukaryotic organisms; there are two isoforms in yeast, called Bmh1 and Bmh2 (Obsil, T., Obsilova, V., 2011).

To investigate details of activation of Nth1 by Bmh the whole spectrum of biochemical and biophysical methods was used. By site-directed mutagenesis, sedimentation analysis and enzyme activity assay was found, that Nth1 forms a stable complex with Bmh, with stoichiometry 1:2 and, that phosphorylation sites, responsible for interaction with 14-3-3 protein, are Ser60 and Ser83, located on the disordered N-terminus. That was confirmed by limited proteolysis and peptide analysis on the MALDI-TOF mass spectrometer.

To determine conformational changes of both proteins pNth1 and Bmh1 upon teh complex formation, the HDX coupled with mass spectrometry and CD spectroscopy was used. Then a homology model of Nth1 and Bmh1 was created, using the measured data, and distance constraints obtained by chemical cross-linking coupled with mass spectrometry were used to refine these models. Significant part of Bmh1 is affected after

complex formation (not only the binding groove). The interaction with Bmh1 affects mostly the sequence 100-200 AA in the Nth1 molecule. That probably reflects the conformational change of Nth1, which leads to revealing the activation site, which is normally buried inside the protein structure, and its better accessibility to the substrate.

As a conclusion, we suggest, that for 14-3-3 dependent activation of Nth1 are essential phosphorylation sites Ser60 and Ser83. Bmh1 binding to the pNth1 leads to the conformational changes on the Nth1 molecule, which consequently leads to the revealing of the active site and activation of the enzyme.



# 11. Seznam citované literatury

- Achstetter, T., Emter, O., Ehmann, C., Wolf, D.H. (1984) *J Biol Chem.* **259**(21), 13334-43
- Aitken, A. (2006) *Semin Cancer Biol.* **16**, 162-72
- App, H., Holzer, H. (1985) *Z Lebensm Unters Forsch.* **181**(4), 276-82
- App, H., Holzer, H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**(29), 17583-8
- Attfield, P.V. (1987) *FEBS Lett.* **225**(10), 259-63
- Avigad, G., Ziv, O., Neufeld, E. (1965) *Biochem. J.* **97**(3), 715-22
- Becker, A., Schlöder, P., Steele, J.E., Wegener, G. (1996) *Experientia.* **52**(5), 433-9
- Benzinger, A., Popowicz, G.M., Joy, J.K., Majumdar, S., Holak, T.A., Hermeking, H. (2005) *Cell Res.* **15**, 219-27
- Bergoz, R. (1971) *Gastroenterology.* **60**(5), 909-12
- Berthelot, M. (1858) *British Journal of Pharmacology.* 1276-1279
- Blakeley, D., Tolliday, B., Colaco, C., Roser B. (1990) *Lancet.* **336**(8719), 854-5
- Boucherie, H. (1985) *J. Bacteriol.* **161**(1), 385-92
- Bourquelot, M.E.M. (1893) *Microbiology of Starch and Sugars.* **826**
- Bridges, D., Moorhead, G.B. (2004) *Sci STKE.* **10**
- Brunet, A, Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S. (1999) *Cell.* **96**, 257-67
- Cardona, F., Parmeggiani, C., Faggi, E., Bonaccini, C., Gratteri, P., Sim, L., Gloster, T.M., Roberts, S., Davies, G.J., Rose, D.R., Goti, A. (2009) *Chemistry.* **15**(7), 1627-36
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H. (1989) *Biochemistry.* **28**(9), 3916-22
- Cohen, P. (2002) *Nat Cell Biol.* **4**(5), 127-30
- Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S., Roser, B. (1992) *Biotechnology (NY).* **10**(9), 1007-11
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D. (1984) *Science.* **223**(4637), 701-3
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. (1992) *Annu Rev Physiol.* **54**, 579-99
- De Virgilio, C., Burkert, N., Bell, W., Boller, T., Wiemken, A. (1993) *Eur J Biochem.* **212**(2), 315-23
- Dellamora-Ortiz, G.M., Ortiz, C.H., Maia, J.C., Panek, A.D. (1986) *Arch Biochem Biophys.* **251**(1), 205-14
- d'Enfert, C., Fontaine, T. (1997) *Mol Microbiol.* **24**(1), 203-16
- Destruelle, M., Holzer, H., Klionsky, D.J. (1994) *Mol Cell Biol.* **14**(4), 2740-54
- Destruelle, M., Holzer, H., Klionsky, D.J. (1995) *Yeast.* **11**(11), 1015-25
- Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., Tzivion, G. (2011) *Biochim Biophys Acta.* **1813**(8), 1453-64

- Dyson, H.J., Wright, P.E. (2002) *Curr Opin Struct Biol.* **12**(1), 54-60
- Elbein, A.D. (1974) *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* **30**, 227
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. (2003) *Glycobiology.* **13**(4), 17R-27R
- Elliott, B., Futcher, B. (1993) *Yeast.* **9**, 33-42
- Engen, J.R. (2009) *Anal. Chem.* **81**, 7870-7875
- Ferl, R.J., Manak, M.S., Reyes, M.F. (2002) *Genome Biol.* **3**, 3010
- Fischer, E. (1895) *Ber. d. Deut. Chem. Gessel.* **1429**
- Foote, M., Zhou, Y. (2002) *Int J Biochem Mol Biol.* **3**, 152-64
- Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Paredes, V., Madrid, M., Gacto, M., Cansado, J. (2003) *Biochem J.* **376**, 209-217
- Francois, J., Neves, M.J., Hers, H.G. (1991) *Yeast.* **7**, 575-87
- Freeman, A.K., Morrison, D.K. (2011) *Semin Cell Dev Biol.* **22**, 681-7
- Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C. (2000) *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**, 617-47
- Fujita, K., Iwahashi, H., Kodama, O., Y. Komatsu, Y. (1995) *Biochem Biophys Res Commun.* **216**, 1041-7
- Gancedo, J.M. (1992) *Eur J Biochem.* **206**(2), 297-313
- Gardino, A.K., Smerdon, S.J., Yaffe, M.B. (2006) *Semin Cancer Biol.* **16**, 173-82
- Gélinas, P., Fiset, G., Leduy, A., Goulet, J. (1989) *Appl Environ Microbiol.* **55**(10), 2453-9
- Gibson, R.P., Gloster, T.M., Roberts, S., Warren, R.A., Storch de Gracia, I., García, A., Chiara, J.L., Davies, G.J. (2007) *Angew Chem Int Ed Engl.* **46**(22), 4115-9
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J., Levine, F. (2000) *Nat Biotechnol.* **18**(2), 168-71
- Hohmann, S., Neves, M.J., de Koning, W., Alijo, R., Ramos, J., Thevelein, J.M. (1993) *Curr Genet* **23**(4), 281-9
- Holzer, H. (1989) *Revis Biol Celular.* **21**, 1305-19
- Hottiger, T., Boller, T., Wiemken, A. (1987) *FEBS Lett.* **10**(220), 113-15
- Hottiger, T., De Virgho, C., Hall, M.N., Boller, T., Wiemken, A. (1994) *Eur J Biochem.* **219**(1-2), 187-93
- Hottiger, T., Schmutz, P., Wiemken, A. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 5518-22
- Chester, V.E. (1963) *Biochem. J.* **86**, 153
- Johnston, M., Flick, J.S., Pexton, T. (1994) *Mol Cell Biol.* **14**(6), 3834-41
- Jules, M., Beltran, G., François, J., Parrou, J.L. (2008) *Appl Environ Microbiol.* **64**(3), 605-14
- Jules, M., Guillou, V., François, J., Parrou, J.L. (2004) *Appl Environ Microbiol.* **70**(5), 2771-8
- Kane, S.M., Roth, R. (1974) *J. Bacteriol.* **18**, 8-14
- Keller, F., Schellenberg, M., Wiemken, A. (1982) *Arch Microbiol.* **131**(4), 298-301
- Kelly, S.M., Price, N.C. (2000) *Current Protein and Peptide Science.* **1**, 349-384

- Kienle, I., Burgert, M., Holzer, H. (1993) *Yeast*. **9**, 607-11
- Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A., Klionsky, D.J. (1996) *Appl Environ Microbiol.* **62**(5), 1563-9
- Klionsky, D.J., Banta, L.M., Emr, S.D. (1988) *Mol Cell Biol.* **8**(5), 2105-16
- Klionsky, D.J., Emr, S.D. (1989) *EMBO J.* **8**(8), 2241-50
- Koch E. M., Koch F. C. (1925) *Science.* **61**, 510
- Kopp, M., Muller, H., Holzer, H. (1993) *J. Biol Chem.* **268**, 4766-74
- Kopp, M., Nwaka, S., Holzer, H. (1994) *Gene.* **150**(2), 403-4
- Kostelecky, B., Saurin, A.T., Purkiss, A., Parker, P.J., McDonald, N.Q. (2009) *EMBO Rep.* **10**(9), 983-9
- Küenzi, M.T., Fiechter, A. (1969) *Arch. Mikrobiol.* **64**, 154
- Küenzi, M.T., Fiechter, A. (1972) *Arch. Mikrobiol.* **84**, 254
- Lederer, E. (1976) *Chem Phys Lipids.* **16**(2), 91-106
- Li, F.Q., Mofunanya, A., Harris, K., Takemaru, K. (2008) *J Cell Biol.* **181**, 1141-54
- Lillie, S.H. , Pringle, J.R. (1980) *J. Bacteriol.* **143**, 1384-94
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., Kiledjian, M. (2002) *EMBO J.* **21**(17), 4699-708
- Londesborough, J., Varimo, K. (1984) *Biochem J.* **219**(2), 511-8
- Londesborough, J., Vuorio, O.E. (1993) *Eur J Biochem.* **216**(3), 841-8
- Londesborough, J., Vuorio, O.E. (1991) *J Gen Microbiol.* **137**(2), 323-30
- Macakova, E., Kopecka, M., Kukacka, Z., Veisova, D., Novak, P., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V. (2013) *Biochim Biophys Acta.* **1830**(30), 4491-9
- Madzarovova-Nohejlova, J. (1973) *Gastroenterology.* **65**(1), 130-3
- Magasanik, B. (1961) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **26**, 249-56
- Maruta, K., Mitsuzumi, H., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. (1996) *Biochem Biophys Acta.* **1291**(3), 177-81
- Mhaweck, P. (2005) *Cell Res.* **15**, 228-36
- Miller, M.J., Xuong, N.H., Geiduschek, E.P. (1979) *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**(10), 5222-5
- Mittenbühler, K., Holzer, H. (1991) *Arch Microbiol.* **155**(3), 217-20
- Mittenbühler, K., Holzer, H. (1988) *J Biol Chem.* **263**(17), 8537-43
- Monod, J. (1947) *Growth.* **223**, 11
- Moore, B.W., Perez, V.J. (1967) *Physiological and biochemical aspects of nervous integration, Woods Hole, MA: Prentice-Hall, Inc.*, 343-59
- Myrback, K., Ortenblad, B. (1937) *Biochem. Z.* **291**, 61
- Neal, C.L, Yao, J., Yang W. (2009) *Cancer Res.* **69**, 3425-32
- Neves, M.J., François, J. (1992) *Biochem. J.* **288**(3), 859-64

- Nicolaus, B., Gambacorta, A., Basso, A.L., Riccio, R., DeRosa, M., Grant, W.D. (1988) *Appl. Microbiol.* **10**, 215-217
- Noubhani, A., Bunoust, O., Rigoulet, M., Thevelein, J.M. (2000) *Eur J Biochem.* **267**(14), 4566-76
- Nwaka, S., Holzer, H. (1998) *Nucleic Acid Research.* **58**, 6579-6603
- Nwaka, S., Kopp, M., Burgert, M., Deuchler, I., Kienle, I., Holzer, H. (1994) *FEBS Letters.* **344**(2-3), 225-8
- Nwaka, S., Kopp, M., Holzer, H. (1995) *J Biol. Chem.* **270**(17), 10193-8
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., Holzer, H. (1995) *FEBS Lett.* **360**(3), 286-90
- Nwaka, S., Mechler, B., Holzer, H. (1996) *FEBS Lett.* **386**(2-3), 235-8
- Obsil, T., Obsilova, V. (2011) *Semin Cell Dev Biol.* **22**, 663-72
- Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D.E., Hickman, A.B., Dyda, F. (2003) *Biochemistry.* **42**(51), 15264-72
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F. (2001) *Cell.* **105**(2), 257-67
- Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004) *J Biol Chem.* **49**, 4531-40
- Obsilova, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., Obsil, T. (2008) *Physiol Res.* **57**, 11-21
- Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J. (2005) *Biochemistry.* **44**, 11608-17
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J.L., Oecking, C. (2007) *Mol Cell.* **25**(3), 427-40
- Panek, A. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 349
- Panek, A. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 422
- Panek, A.D., Matton, J.R. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **183**, 306
- Panni, S., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Cesareni, G. & Castagnoli, L. (2008) *FEMS Yeast Res.* **8**, 53-63
- Rena, G., Prescott, A.R., Guo, S., Cohen, P., Unterman, T.G. (2001) *Biochem J.* **354**, 605-12
- Rezabkova, L., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2010) *J Struct Biol.* **170**(3), 451-61
- Rezabkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T. (2012) *Biophys J.* **103**(9), 1960-9
- Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2011) *J Biol Chem.* **286**(50), 43527-36
- Rittenhouse, J., Harrsch, P.B., Kim, J.N., Mecke, D. (1986) *J Biol Chem.* **261**, 7607-7610
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B. (1999) *Mol Cell.* **4**(2), 153-66
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C., Sommarin, M. (2001) *Plant Physiol.* **127**, 142-9

- Ruf, J., Wacker, H., James, P., Maffia P., Seiler, P., Galand, G., Kiekebusch, A., Semenza G., Mantei, N. (1990) *J. Biol.Chem.* **265**(25), 15034-9
- Shoemaker, B.A., Portman, J.J., Wolynes, P.G. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(16), 8868-73
- Schepers, W., Van Zeebroeck, G., Pinkse, M., Verhaert, P., Thevelein, J.M. (2012) *J Biol Chem.* **287**(53), 44130-42
- Schumacher, B., Mondry, J., Thiel, P., Weyand, M., Ottmann, C. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 1443-8
- Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004) *J Biol Chem.* **279**, 49113-9
- Souza, N.O., Panek, A.D. (1968) *Arch Biochem Biophys.* **125**(1), 22-8
- Stevens, T., Esmon, B., Schekman, R. (1982) *Cell.* **30**(2), 439-48
- Tanret, M.G. (1932) *C. R. Acad. Sci.* **180**, 598
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C., Shimamoto, K. (2011) *Nature.* **476**(7360), 332-5
- Teichert, U., Mechler, B., Müller, H., Wolf, D.H. (1989) *J Biol Chem.* **262**(27), 16037-45
- Thevelein, J.M. (1991) *Mol Microbiol.* **5**(6), 1301-7
- Thevelein, J.M. (1984) *Microbiol. Rev.* **48**(1), 42-59
- Trimble, R.B., Maley, F. (1977) *J Biol Chem.* **252**(12), 4409-12
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2004) *EMBO J.* **23**, 1889-99
- Uno, I., Matsumoto, K., Adachi, K., Ishikawa, T. (1983) *J Biol Chem.* **258**(18), 10867-72
- Van Assche, J.A., Carlier, A.R. (1975) *Biochim Biophys Acta.* **391**(1), 154-61
- van der Horst, A., Burgering, B.M.T. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 440-450
- Van der Plaat, J.B. (1974) *Biochem Biophys Res Commun.* **56**(3), 580-7
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 109-15
- van Heusden, G.P., Griffiths, D.J., Ford, J.C., Chin-A-Woeng, T.F., Schrader, P.A., Carr, A.M., Steensma, H.Y. (1995) *Eur J Biochem.* **229**, 45-53
- Van Laere, A. (1989) *FEMS Microb. Letters.* **63**, 201-209
- Van Solingen, P., Van der Plaat, J.B. (1975) *Biochem Biophys Res Commun.* **62**(3), 553-60
- Veisova, D., Macakova, E., Rezabkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., Obsilova, V. (2012) *Biochem J.* **443**(3), 663-70
- Veisova, D., Rezabkova, L., Stepanek, M., Novotna, P., Herman, P., Vecer, J., Obsil, T., Obsilova, V. (2010) *Biochemistry.* **49**, 3853-61
- Vogel, G., Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T., Wiemken, A. (1998) *Plant J.* **13**(5), 673-83
- Vuorio, O.E., Kalkkinen, N., Londesborough, J. (1993) *Eur J Biochem.* **216**(3), 849-61

- Wang, B., Yang, H., Liu, Y.S., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E. (1999) *Biochemistry*. **38**, 12499-504
- Wannet, W.J., Op den Camp, H.J., Wisselink, H.W., van der Drift, C., Van Griensven, L.J., Vogels, G.D. (1998) *Biochem Biophys Acta*. **1425**(1), 177-88
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S., Thevelein, J.M. (1999) *Biochem J*. **343**, 621-6
- Werner-Washburne, M., Becker, J., Kusic-Smithers, J., Craig, E.A. (1989) *J. Bacteriol*. **171**(5), 2680-8
- Wiemken, A. (1990) *A. van Leewenhoek*. **58**, 209
- Wiemken, A., Schellenberg, M. (1982) *FEBS Lett*. **150**(2), 209
- Wiggers, H.A.L. (1832) *Annalen der Pharmacie*. 129-182
- Williams, R., Rimple, R.B., Maley, F.S., Trumbly, R.J., MacColl, R.T. (1985) *J Biol Chem*. **260**(24), 13334-41
- Winkler, K., Kienle, I., Burgert, M., Wagner, J.C., Holzer, H. (1991) *FEBS Lett*. **291**, 269-72
- Wolfe, K.H., Lohan, A.J. (1994) *Yeast. Suppl.* **A**, 41-6
- Yaffe, M.B. (2002) *FEBS Lett*. **513**(1), 53-7
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C. (1997) *Cell*. **91**(7), 961-71
- Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundström, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 17237-42
- Zhao, J., Meyerkord, C.L., Du, Y., Khuri, F.R., Fu, H. (2011) *Semin Cell Dev Biol*. **22**, 705-12

## 12. Přílohy

Příloha 1: *Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1.*

Příloha 2: *Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1*