

Univerzita Karlova v Praze

PŘÍRODOVĚCKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Studium interakce fosducinu s proteinem 14-3-3

Study of the interaction between fosducin and the 14-3-3 protein

Bakalářská práce

Klinická a toxikologická analýza

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

Praha 2014

Jiří Šimůnek

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Jiří Šimůnek

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá interakcí proteinu 14-3-3 a fosducinu, které se podílejí na regulaci přenosu signálu v oční sítnici obratlovců. Tento přenos a zároveň i zesílení signálu jsou zprostředkovány G-proteinovou signální dráhou. Přenos signálu v závislosti na intenzitě světla je regulován dalšími proteiny včetně fosducinu.

Fosducin je 33kDa protein, který je exprimován v mnoha tkáních, především ve fotoreceptorových buňkách oční sítnice. Jeho regulační funkce spočívá v inhibiční funkci G-proteinu (transducinu). Při přenosu signálu je nutný rozpad transducinu $G_i\alpha\beta\gamma$ na podjednotku α ($G_i\alpha$) a komplex $\beta\gamma$ ($G_i\beta\gamma$). Pro opětovnou funkci je nutná reasociace heterotrimeru $G_i\alpha\beta\gamma$, čemuž zabraňuje fosducin, a to vazbou na komplex $G_i\beta\gamma$. Nepřítomnost kompletního transducinu má za následek přerušení signální dráhy a snížení přenosu signálu. Při slabém osvětlení je nutné přenášený signál zesílit, a proto je v sítnici adaptované na tmu fosducin fosforylován, což rozruší jeho vazbu s $G_i\beta\gamma$ podjednotkou a obnoví funkci transducinu. Fosforylovaný fosducin je vázán proteinem 14-3-3. Úloha proteinu 14-3-3 v regulaci funkce fosducinu je však stále nejasná.

Protein 14-3-3 je 28 kDa protein, který je exprimován ve všech eukaryotických buňkách. Jedná se o protein s rigidní strukturou, který váže a reguluje funkce více než tři sta proteinů, čímž se účastní velké škály biochemických procesů. Ve fotoreceptorových buňkách dokáže vázat fosducin fosforylovaný na Ser-54 a Ser-73. Touto vazbou inhibuje jeho interakci s komplexem $G_i\beta\gamma$ a podílí se tak na regulaci přenosu signálu. Zároveň pravděpodobně chrání fosforylovaný fosducin od účinku fosfatas a proteas.

Během této bakalářské práce byly exprimovány mutantní proteiny fosducinu (PdQ52K) a proteinu 14-3-3 ζ (14-3-3 ζ noW) v bakteriálním systému *E. coli* BL21(DE3) a úspěšně purifikovány s výtěžky miligramových množství. Ke studiu interakce mezi N-terminální částí fosducinu a proteinem 14-3-3 bylo využito měření akrylamidem zhasené fluorescence Trp-29 proteinu PdQ52K v nepřítomnosti a přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ noW. Z měření byly vypočteny hodnoty Sternovy-Volmerovy konstanty, které naznačují, že vazba proteinu 14-3-3 ζ noW nemá signifikantní vliv na N-terminální oblast molekuly PdQ52K obsahující Trp-29.

Abstract

The main goal of this bachelor thesis is to study the interaction between phosducin and the 14-3-3 protein which are involved in the regulation of visual signal transduction in vertebrate retina. This process is mediated by G-protein signaling pathway and is regulated by several proteins including phosducin depending on light intensity.

Phosducin, a 33kDa protein, is expressed in many tissues mainly in photoreceptor cells of the retina. The visual signal transduction and its amplification are regulated through inhibition of the G-protein (transducin) function. The signal transduction involves a dissociation of heterotrimeric transducin ($G_t\alpha\beta\gamma$) to the α subunit ($G_t\alpha$) and the $\beta\gamma$ complex ($G_t\beta\gamma$). The signalling is terminated by their reassociation back to the $G_t\alpha\beta\gamma$ complex. The phosducin binds to $G_t\beta\gamma$ and thus prevents the formation of the $G_t\alpha\beta\gamma$ heterotrimer. This decreases the amount of functional $G_t\alpha\beta\gamma$ complexes and suppresses the signal transduction. If the signal transduction needs to be amplified (e.g. during the night) then phosducin is phosphorylated and this inhibits its interaction with $G_t\beta\gamma$. The phosphorylated phosducin is bound to the 14-3-3 protein. However, the role of the 14-3-3 protein in the regulation of phosducin is still unclear.

The 14-3-3 protein is a 28kDa protein which is expressed in all eukaryotic cells. It has a rigid structure and can bind more than three hundred proteins. Thereby, it participates in many biochemical processes. In photoreceptor cells it binds phosducin phosphorylated at Ser-54 and Ser-73. This binding interaction further inhibits phosducin binding to $G_t\beta\gamma$ complex and thus the 14-3-3 protein also participates in the regulation of signal transduction. In addition, the 14-3-3 protein has also been suggested to protect the phosphorylated phosducin against the activity of proteases and phosphatases.

During this bachelor work a mutant of phosducin (PdQ52K) and a mutant of the 14-3-3 ζ protein (14-3-3 ζ noW) were expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells and successfully purified. Next, the interaction between the N-terminal part of phosducin and the 14-3-3 protein was investigated using acrylamide quenching of tryptophan fluorescence. The obtained values of Stern-Volmer quenching constants for PdQ52K both in the absence and the presence of 14-3-3 ζ noW suggest that the complex formation has no significant effect on N-terminal part of PdQ52K molecule containing residue Trp-29.

Obsah

1. Seznam zkratk a symbolů	7
2. Úvod	8
3. Teoretická část	9
3.1. Přenos signálu	9
3.1.1. Receptory vázané na G-proteiny (GPCR)	9
3.1.2. G-proteiny	9
3.2. Proces vidění	10
3.3. Fosducin	11
3.3.1. Obecné informace	11
3.3.2. Struktura	12
3.3.3. Lokalizace	13
3.3.4. Regulace fosducinem	13
3.3.5. Fosforylace fosducinu	13
3.3.6. Rozdílná funkce N-terminální a C-terminální domény	14
3.3.7. Kardiovaskulární funkce fosducinu	15
3.4. Interakce proteinu 14-3-3 a fosducinu	16
3.5. Proteiny 14-3-3	17
3.5.1. Obecné informace	17
3.5.2. Struktura	17
3.5.3. Vazebný motiv	18
3.5.4. Funkce proteinu 14-3-3	18
4. Cíle práce	19
5. Metody a materiál	20
5.1. Použitý materiál	20
5.1.1. Chemikálie	20
5.1.2. Přístroje	21
5.1.3. Ostatní materiál	21
5.2. Plasmid	21
5.3. Transformace bakterií	22
5.4. Bakteriální expresní systém	22
5.5. Kultivace bakterií a indukce exprese proteinů	23
5.5.1. Příprava LB média	23
5.5.2. Příprava LB agarových misek	23
5.6. Skladování bakterií	23
5.7. Preparativní centrifugace	24
5.8. Sonikace	24
5.9. Dialýza	25
5.10. SDS-PAGE elektroforéza	25
5.11. Chromatografie	27
5.11.1. Niklová chelatační chromatografie	27
5.11.2. Iontově-výměnná chromatografie	28
5.11.3. Gelová permeační chromatografie	29
5.12. Koncentrování roztoků proteinů	30
5.13. Fosforylace fosducinu	30
5.14. Akrylamidem zhasená fluorescence	31
5.14.1. Fluorescence	31

5.14.2.	Fluorescence proteinů	32
5.14.3.	Zhášení fluorescence.....	32
5.14.4.	Pracovní postup.....	33
5.14.5.	Úprava naměřených hodnot	34
6.	Výsledky a diskuze.....	35
6.1.	Purifikace proteinů 14-3-3ζnoW a PdQ52K.....	35
6.1.1.	Expresa	35
6.1.2.	Niklová chelatační chromatografie.....	35
6.1.3.	Iontově výměnná chromatografie.....	36
6.1.4.	Gelová permeační chromatografie.....	39
6.2.	Měření akrylamidem zhašené fluorescence	41
7.	Závěr.....	44
8.	Citovaná literatura	45

1. Seznam zkratek a symbolů

14-3-3ζnoW	mutant isoformy proteinu 14-3-3ζ (mutace W59F a W228F)
ATP	adenosintrifosfát
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmmodulin-dependentní kinasa II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	cirkulární molekula DNA
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
Da	Dalton, hmotnostní jednotka
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F	u mutace značí aminokyselinu fenylalanin
FPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GDP	guanosindifosfát
GPCR	receptory vázané na G-proteiny (G-protein coupled receptor)
GTP	guanosintrifosfát
G _i αβγ	heterotrimerní G-protein transducin
G _i α, G _i β, G _i γ	α, β, γ podjednotky transducinu
His	aminokyselina histidin
6×His kotva	motiv šesti histidinů za sebou
IPTG	isopropyl-β-D-thio-galaktopyranosid
K	u mutace značí aminokyselinu lysin
K _{sv}	Sternova-Volmerova konstanta
Leu	aminokyselina leucin
MCO	molecular weight cut-off
NP40	nonyl-fenoxypolyethoxyethanol
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS
PBS	fosfátový pufr
PdQ52K	mutant fosducinu (mutace Q52K)
pET-15b	komerčně dostupný plasmid
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa A
Q	u mutace značí aminokyselinu glutamin
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	aminokyselina serin
SNP	mutace jediného nukleotidu (single nucleotide polymorphism)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Thr	aminokyselina threonin
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Tris-HCl	pufr o určité koncentraci Tris s upraveným pH pomocí HCl
Trp	aminokyselina tryptofan
u	unit, jednotka katalytické aktivity
W	u mutace značí aminokyselinu tryptofan

2. Úvod

Předkládaná bakalářská práce je součástí širšího projektu laboratoře doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. Cílem tohoto projektu je objasnění struktury komplexu proteinu 14-3-3 a fosducinu, vazebných interakcí a regulačních vlastností těchto proteinů.

Funkce fosducinu spočívá především v regulaci signálu přenášeného z oční sítnice k neuronům. Přenášený signál je totiž ve tmě zesílen G-proteinovou signální drahou, ovšem vzhledem k intenzitě denního světla je toto zesílení příliš účinné. V tmě je naopak zesílení tohoto signálu nutné, a proto je regulační funkce fosducinu potlačena prostřednictvím fosforylace následované interakcí s proteinem 14-3-3.

Cílem této bakalářské práce je prozkoumání interakce N-koncové části N-terminální domény fosducinu s proteinem 14-3-3 pomocí akrylamidem zhasené fluorescence Trp-29 v molekule fosducinu. Touto metodou lze určit, zda je v komplexu fosducinu s proteinem 14-3-3 Trp-29 přístupný okolnímu polárním prostředí, nebo ukrytý v hydrofobním nitru komplexu a tudíž zhasedlu nepřístupný. Z naměřených dat lze odhadnout, zda se oblast v okolí Trp-29 účastní vazby s proteinem 14-3-3 či nikoli.

3. Teoretická část

3.1. Přenos signálu

Jednou ze základních podmínek existence mnohobuněčného organismu je vzájemná komunikace buněk, která je zajištěna prostřednictvím signálních molekul [1].

Aktivitu buněk ovlivňují stovky signálů, které zahrnují signály chemické (hormony, neurotransmitery) i fyzikální jako např. světlo, elektrické vzruchy nebo mechanické podráždění.

Jelikož je většina signálních molekul polárních a nemůže tedy proniknout buněčnou membránou, musí ke komunikaci využít membránové receptory. Tyto receptorové proteiny jsou integrovány do plazmatické membrány buňky a po navázání signální molekuly aktivují signální dráhu, jíž se účastní různé intracelulární proteiny, které následně regulují aktivitu efektorových proteinů. Na rozdíl od hodiny trvající buněčné regulace genové exprese probíhají tyto metabolické změny, řízení pohybu či koncentrace iontů v řádu minut až vteřin.

Jedním z takovýchto receptorů je i receptor vázaný na G-protein.

3.1.1. Receptory vázané na G-proteiny (GPCR)

Jedná se o velkou skupinu receptorů, která působí prostřednictvím G-proteinů. Jejich α -helixy procházejí sedmkrát plazmatickou membránou. Po aktivaci ligandem váží a aktivují na vnitřní straně membrány G-proteiny, které poté vymění svůj GDP za GTP, čímž se uvedou do aktivního stavu.

3.1.2. G-proteiny

G-proteiny přenášejí signály z GPCR na membránové enzymy nebo iontové kanály. Jedná se o heterotrimery složené ze tří různých podjednotek (α , β , a γ), přičemž podjednotka α ($G\alpha$) je schopna vázat GDP nebo GTP (odtud označení G-protein) a chovat se jako *GTPasa*. V klidovém stavu nesou proteiny GDP. Jakmile dojde navázáním signální molekuly k podráždění, $G\alpha$ vymění navázané GDP za GTP. G-protein se poté z receptoru uvolní a rozpadne se na podjednotku $G\alpha$ a komplex $G\beta\gamma$.

Složky G-proteinu se váží na další membránové proteiny a mění jejich aktivitu: otvírají a zavírají iontové kanály, aktivují nebo inaktivují enzymy např. adenylátcyklasu, proteinkinasu či fosfolipasu. Jelikož má $G\alpha$ vnitřní GTPasovou aktivitu, pozvolna hydrolyzuje navázaný GTP na GDP, čímž dochází k následné reasociaci heterotrimeru.

Heterotrimerní G-proteiny jsou intracelulární přenašeči a zesilovači mnoha extracelulárních signálů [2]. Účastní se i signální dráhy procesu vidění.

3.2. Proces vidění

V sítnici se u člověka vyskytují dva druhy fotoreceptorových buněk [1]. Tyčinky, vnímavé pro slabé světlo a čípky, které jsou při vyšší světelné intenzitě odpovědné za barevné vidění.

Tyčinky lze rozdělit na dvě základní části, vnější a vnitřní. Ve vnější části se nacházejí disky oddělené membránami, do kterých je integrován receptor se 7 helixy rodopsin, což je světločivný chromoprotein, jehož bílkovinná část opsin obsahuje aldehyd retinal. Absorpce fotonu vyvolá v rodopsinu izomeraci retinalu formy 11-cis na formu *all-trans*. Tento fotochemický proces způsobí během několika milisekund konformační změnu rodopsinu. V této aktivní konformaci váže rodopsin* G-protein transducin ($G_t\alpha\beta\gamma$), čímž dojde k záměně GDP za GTP. Takto aktivovaný transducin je nestabilní a uvolňuje svoji $G_t\alpha$ podjednotku s navázaným GTP, jež díky tomu aktivuje membránovou cGMP-fosfodiesterasu [2]. Neosvětlené tyčinky obsahují relativně vysokou koncentraci ($70\mu\text{M}$) cGMP, který se váže na iontový kanál v membráně disku a udržuje ho tak otevřený. Enzym cGMP-fosfodiesterasa během milisekund sníží koncentraci volného cGMP, jelikož jej hydrolyzuje za vzniku 5'-GMP. Následkem je oddisociování cGMP vázaného na kationtové kanály a jejich uzavření, čímž je snížen membránový potenciál a dochází k hyperpolarizaci buňky. Tím je zastavena jinak nepřetržitá tvorba neurotransmiteru, což je neurony registrováno jako signál.

Následně se řada procesů vrací do výchozí situace. $G_t\alpha$ podjednotka se hydrolýzou GTP sama inaktivuje a znovu se spojí s $G_t\beta\gamma$ komplexem, což ukončí aktivitu cGMP-fosfodiesterasy [1]. Snížená koncentrace Ca^{2+} aktivuje guanylátcyklasu, která zvýší hladinu cGMP do té míry, že se kationtové kanály opět otevrou.

Tato signální dráha neslouží pouze k přenosu signálu, ale také k jeho amplifikaci [2]. V tyčince adaptované na tmu dokáže jeden foton aktivovat jednu molekulu rhodopsinu, což vede k degradaci více než 100 000 molekul cGMP a takového snížení koncentrace již dokáže způsobit neuronový vzruch.

Pro denní vidění je ovšem toto zesílení signálu příliš velké. Kvůli tomu jsou tyčinky adaptovány na větší intenzity slunečního záření. V této regulaci hraje důležitou roli fosducin, který zabraňuje vazbě $G_i\alpha\beta\gamma$ s aktivovaným rodopsinem*, a to zabráněním reasociace $G_i\beta\gamma$ komplexu s $G_i\alpha$ podjednotkou, neboť k vazbě je potřeba celého heterotrimeru [3].

3.3. Fosducin

3.3.1. Obecné informace

Název fosducin zohledňuje možnost tohoto proteinu být fosforylován (fos-), stejně jako jeho vazebného partnera transducin (-ducin) [4]. Jeho význam spočívá především ve schopnosti regulace světlem indukovaných procesů, a to svým navázáním na $G_i\beta\gamma$ komplex.

U savců je fosducin složen z 244 až 246 aminokyselin, v závislosti na druhu. Hmotnost hovězího fosducinu byla vypočtena na 28185 Da, nicméně při SDS-PAGE se pohybuje ve frakci odpovídající 33 kDa.

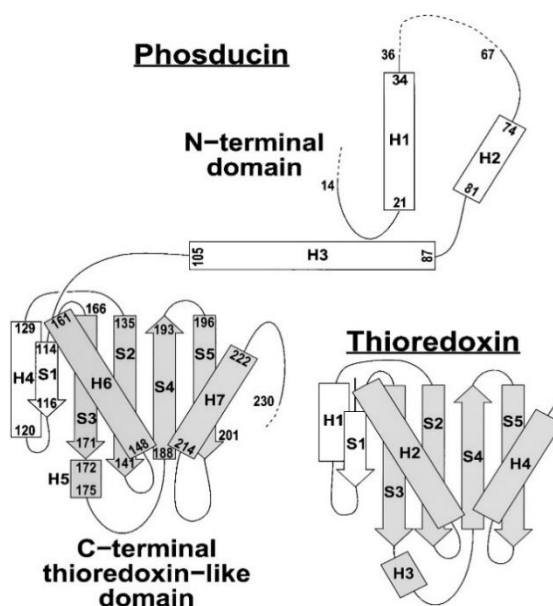
Fosducin si je velmi podobný napříč všemi druhy savců, přičemž existují jeho různé isoformy. S většími změnami byl fosducin nalezen i u kostnatých, nálevníků, hub a kvasinek. U těchto organismů byly také popsány podobné efekty způsobené osvětlením jako u savců.

Poprvé byl fosducin objeven ve fotoreceptorových buňkách oční sítnice, záhy však bylo prokázáno, že je zároveň exprimován v šišince, jež má obdobný embryonální původ. Pinealocyty však kvůli evoluci postupně přišli o svoji schopnost reagovat na světlo a získali svoji neuroendokrinní funkci, kdy v noci uvolňují neurohormon melatonin.

3.3.2. Struktura

Provedením rentgenové strukturní analýzy komplexu fosducinu s $G_i\beta\gamma$ komplexem byly identifikovány a pojmenovány dvě domény fosducinu, N a C terminální, které jsou spojeny peptidovým řetězcem.

N-terminální doména je velmi flexibilní a nepříliš strukturovaná. V komplexu s $G_i\beta\gamma$ komplexem je tvořena především třemi α -helixy (H1, H2, H3). C-terminální doména je velmi podobná thioredoxinu, antioxidačnímu proteinu s redukčními vlastnostmi. Skládá se z β -listů tvořených pěti peptidovými řetězci a α -helixů, které ji obklopují. Podobnost C-terminální domény s thioredoxinem je ovšem pouze strukturní, neboť fosducin na rozdíl od thioredoxinu nemá oba cysteiny. Kvůli chybějící thiolové skupině nemůže vytvořit disulfidický můstek, a tedy nemá redukující schopnosti.



Obr. 3.1 Obrázek znázorňuje uspořádání sekundární struktury fosducinu v komplexu s $G_i\beta\gamma$ komplexem. N-terminální doména je složená ze tří α -helixů (H1-3) a C-terminální doména z pěti β -listů (S1-4) a čtyř α -helixů (H4-7). Z obrázku je také patrná podobnost C-terminální domény s thioredoxinem [2].

Tyto dvě domény spolu v nefosforylovaném fosducinu nijak neinteragují, namísto toho obepínají $G_i\beta\gamma$ komplex [5], přičemž obě domény mají rozdílné funkce (kap. 3.3.6). Samotná fosforylace ovšem změnu struktury fosducinu způsobuje, a to jak N-terminální, tak i C-terminální domény [6]. Fosforylační místa se však nachází pouze na N-terminální doméně fosducinu, a proto by domény spolu mohly interagovat.

3.3.3. Lokalizace

Expres fosducinu probíhá v sympatickém nervovém systému, játrech, mozku, ledvinách a kosterních svalech, ale především v buňkách oční sítnice [4].

Zda se fosducin nachází pouze v tyčinkách, či zároveň v čípcích není jisté. Potvrzeno však bylo rozprostření fosducinu v tyčinkách.

Fosducin byl nalezen v obou, vnější i vnitřní části tyčinky adaptované na tmou, ovšem pouze ve vnitřní části tyčinky adaptované na světlo [3]. U $G_i\beta\gamma$ komplexu je to obráceně. V tyčince adaptované na tmou byl nalezen pouze ve vnitřní části, po adaptaci na světlo v obou. Osvětlení tedy způsobuje přesun jak fosducinu, tak $G_i\beta\gamma$ komplexu do cytosolu vnitřní části tyčinek s tím, že za přesun $G_i\beta\gamma$ komplexu je pravděpodobně zodpovědný fosducin [4].

3.3.4. Regulace fosducinem

Fosducin je v tyčinkách exprimován ve velkém množství, přičemž jeho množství je zde srovnatelné s množstvím transducinu [3]. I díky této koncentraci může nefosforylovaný fosducin (v tyčinkách adaptovaných na světlo) vázat $G_i\beta\gamma$ komplex s větší afinitou než $G_i\alpha$ podjednotka. Zároveň jej přemísťuje od membrány disku do cytosolu, čímž zabraňuje jeho opětovné asociaci s $G_i\alpha$ podjednotkou. Tímto dokáže fosducin dlouhodobě snižovat množství přenášeného signálu.

Ve fotoreceptorových buňkách je fosforylační stav fosducinu závislý na světle, přičemž maximálně fosforylovaný se nachází ve tmě. Po osvětlení je fosducin defosforylován a následně váže $G_i\beta\gamma$ komplex, čímž je snížen přenos signálu. Ve tmě má fosforylace fosducinu za následek jeho uvolnění od $G_i\beta\gamma$ komplexu, čímž umožňuje reasociaci transducinu a maximální přenos signálu.

3.3.5. Fosforylace fosducinu

V případě tyčinek přizpůsobených na tmou je fosducin fosforylován na Ser-73 a to cAMP-dependentní proteinkinásou A (PKA) [5], což je kinasa zprostředkovávající účinek druhého posla cAMP. Po její aktivaci čtyřmi molekulami cAMP dokáže PKA fosforylovat zbytky serinu a threoninu [1].

Tato fosforylace snižuje stabilitu komplexu fosducinu s $G_i\beta\gamma$ komplexem a způsobuje jeho následnou disociaci [2, 5]. Volný komplex $G_i\beta\gamma$ se může opět spojit s $G_i\alpha$ podjednotkou a tím maximalizovat zesílení přenášeného signálu.

PKA ovšem není jedinou kinasou, která fosducin fosforyluje. Analýza sekvence fosducinu odhalila shodu s fosforylačním místem pro Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kinasu II (CaMKII) [3]. Kalmodulin je relativně malý protein (17 kDa), který se nachází v živočišných buňkách [1]. Navázáním čtyř vápenatých iontů na molekulu kalmodulinu je následnou konformační změnou tato kinasa aktivována.

Vlivem CaMKII dochází k fosforylaci fosducinu na Ser-36, Ser-54, Ser-73 a Ser-106, což až stonásobně snižuje jeho vazbu s $G_i\beta\gamma$ komplexem oproti fosforylaci pomocí PKA [3]. C-terminální doména nefosforylovaného fosducinu je schopna inhibovat vazbu komplexu $G_i\beta\gamma$ s membránou. Zatímco fosforylace pomocí PKA měla za následek mírné snížení této inhibice, CaMKII tuto schopnost fosducinu inhibovala téměř úplně.

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

3.3.6.1. N-terminální doména

N-terminální doména fosducinu interaguje s $G_i\beta\gamma$ komplexem v části, která ve tmou adaptované sítnici váže $G_i\alpha$ podjednotku [2]. Právě vytvořením této vazby N-terminální doména strukturně brání opětovné reasociaci $G_i\beta\gamma$ komplexu s $G_i\alpha$ podjednotku.

Tato vazba je narušena fosforylací fosducinu, přičemž fosforylované zbytky aminokyselin se nachází na povrchu jeho N-terminální domény [3]. Dokonce se vyskytují i na povrchu komplexu fosducinu s $G_i\beta\gamma$ komplexem, a jsou tedy volně přístupné kinasám [2, 3]. Samotná fosforylace tedy stéricky nezpůsobí rozrušení tohoto komplexu. Namísto toho dochází ke konformační změně N-terminální domény. Fosforylace na Ser-73 způsobí ve fosducinu konformační změnu helixu 2, jejímž výsledkem je ztráta kontaktu s $G_i\beta\gamma$ komplexem právě v místě, které váže $G_i\alpha$ podjednotku. Vlivem této změny struktury se zvyšuje přístupnost $G_i\alpha$ podjednotky k vazebnému místu komplexu $G_i\beta\gamma$. K úplnému rozrušení komplexu je však potřeba fosforylace více zbytků aminokyselin.

Navázání samotné N-terminální domény dokázalo způsobit inhibici přenosu signálu a fosforylace samotné N-terminální domény naopak rozrušení jejího komplexu s komplexem $G_i\beta\gamma$, což indikuje nezávislost na C-terminální doméně [5].

Samotná N-terminální doména ovšem nedokázala způsobit odpuzení od membrány. Tato funkce náleží C-terminální doméně fosducinu [2].

3.3.6.2. C-terminální doména

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

3.3.7. Kardiovaskulární funkce fosducinu

Jelikož byl vliv na kardiovaskulární systém prokázán i u jiných regulátorů G-proteinů, fosducin by mohl mít obdobnou vlastnost [7].

Byly provedeny testy na myších s delecí genu pro fosducin, které u nich v noci prokázaly zvýšenou hladinu krevního tlaku, oproti myším s nepoškozeným genem [4]. Výraznější byl i vzrůst krevního tlaku při reakci na stres. Tento nárůst hladiny krevního tlaku byl způsoben zvýšením aktivity sympatického nervového systému, přesněji jeho elektrické aktivity a to vlivem většího otevření draslíkových kanálů. U lidí byl prokázán vliv SNP (single nucleotide polymorphysm) v genu pro fosducin na hladinu krevního tlaku [7]. U lidí, u kterých se objevila mutace v obou alelách, byla hladina krevního tlaku vyšší v průměru o 12 až 15 mm Hg. Fosducin tedy ovlivňuje nejen přenos signálu v oku, ale také primární hypertenzi [4].

Mechanismus, kterým fosducin ovlivňuje hladinu krevního tlaku, není přesně znám. Nabízí se několik možností. Fosducin by mohl vychytávat $\beta\gamma$ podjednotky G-proteinů, ovlivňovat kationtové kanály, nebo by také mohl napomáhat při skládání jiných proteinů.

3.4. Interakce proteinu 14-3-3 a fosducinu

Analýza proteinů spolu-purifikovaných s fosducinem z oční sítnice identifikovala protein 14-3-3 [3]. Tento protein by mohl vázat fosducin v závislosti na jeho fosforylačním stavu, jelikož analýza sekvence fosducinu odhalila shodu s fosforylačním místem pro CaMKII a stejná oblast je zároveň shodná s místem, které jsou schopny vázat proteiny 14-3-3.

Fosforylace pomocí CaMKII tedy dramaticky inhibuje interakci fosducinu s $G_i\beta\gamma$ komplexem a zároveň umožňuje vazbu s proteinem 14-3-3. Vazba proteinu 14-3-3 s fosforylovaným fosducinem ještě více snížila jeho schopnost inhibovat reasociaci $G_i(\alpha\beta\gamma)$ heterotrimeru, čímž by mohl protein 14-3-3 přispívat k regulativní funkci fosducinu. Tento inhibující efekt by mohl být vysvětlen tím, že protein 14-3-3 interaguje s fosducinem v místě, které je důležité pro vazbu fosducinu s komplexem $G_i\beta\gamma$ [6].

Pro vazbu fosforylovaného fosducinu s proteinem 14-3-3 je důležitá fosforylace obou serinových zbytků, Ser-54 a Ser-73, jelikož substituce pouze jednoho či druhého z nich znemožnila schopnost vazby proteinu 14-3-3 s fosducinem [3]. Tato vazba je uskutečněna ve stechiometrickém poměru 1:2 a v tomto komplexu se molekula fosducinu pravděpodobně nachází uvnitř centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3 [6]. Vazba zároveň znatelně ovlivnila strukturu N-terminální domény, kde se nachází obě fosforylační místa, ale také C-terminální domény, což naznačuje její přímý kontakt s proteinem 14-3-3.

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

3.5. Proteiny 14-3-3

3.5.1. Obecné informace

Proteiny 14-3-3 tvoří skupinu vysoce konzervovaných, 30kDa, kyselých proteinů, které jsou exprimovány ve všech eukaryotních buňkách, přičemž mnoho organismů vytváří různé isoformy [8]. U vyšších eukaryot se nachází až 15 isoform proteinu 14-3-3. U savců bylo identifikováno isoformem sedm (β , ϵ , η , γ , ζ , τ a σ) [9].

Jméno 14-3-3 bylo dáno rodině proteinů, které se hojně vyskytují v mozku savců, podle jejich pohybu na dvoudimensionální DEAE-celulosové chromatografii, kde byly nalezeny ve 14. frakci a elektroforéze provedené na škrobovém gelu, kde se nacházely ve frakci 3.3 [8].

Tento nesespecifický název je v podstatě účelný, neboť protein 14-3-3 plní mnoho funkcí. První popsanou funkcí byla aktivace tyrosinových a tryptofanových hydroxylas. Dále jeho různé isoformy interagují s mnoha proteinkinasami, např. inhibují proteinkinasu C, či jsou schopny regulovat iniciaci replikace DNA. Isoformy proteinu 14-3-3 také interagují s mnoha proteiny, včetně transkripčních faktorů, biosyntetických enzymů, cytoskeletálních proteinů, signálních molekul a tumor supresorů [10]. Zároveň jsou zapojeny do mnoha neurodegenerativních onemocnění, jako je Creutzfeld-Jacobova, Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba [8] a svůj vliv mají i při působení viru HIV [11]. Tím, že proteiny 14-3-3 vytváří komplexy s proteiny ovlivňující mnoho buněčných procesů, se také stávají regulátory buněčné autofagie a objevuje se zde i jejich souvislost se vznikem rakoviny [10].

3.5.2. Struktura

Jedná se o velmi helikální, dimerní proteiny. Každý monomer je tvořen devíti antiparalelními α -helixy (H1-H9), přičemž všechny isoformy mohou tvořit homo- a heterodimery, s výjimkou σ isoformy, která vytváří pouze homodimery [8, 9].

Dimerní molekula vytváří velký, záporně nabitý kanál. V tomto kanálu se nachází vždy stejné zbytky aminokyselin u všech isoformem. Různé zbytky aminokyselin se totiž nacházejí především na povrchu těchto dimerů. Dá se tedy předpokládat, že zatímco

tento kanál rozpoznává pouze určité znaky vazebných partnerů, povrch dimeru by mohl být zodpovědný za jejich velkou diversitu [8].

Struktura celého dimeru je velmi rigidní, dokonce ani po navázání ligandu se téměř nezmění [9].

3.5.3. Vazebný motiv

Proteiny 14-3-3 byly první molekuly u kterých bylo prokázáno, že specificky váží fosforylované aminokyseliny serin a threonin, čímž dokáží pozměnit funkce proteinů [8]. Tato vlastnost byla dále prozkoumána a byly nalezeny dva vazebné motivy, které jsou pro tuto vazbu nutné a jsou shodné ve všech isoformách proteinu 14-3-3. Jsou to $R[S/\phi][+]pSXP$ a $RX[\phi/S][+]pSXP$, kde pS označuje fosforylovaný serin, ϕ aromatickou aminokyselinu, + bazickou aminokyselinu a X jakoukoli jinou aminokyselinu kromě cysteinu [9]. Byť je tento motiv optimální a nachází se u většiny vazebných partnerů proteinu 14-3-3, pro vazbu nutný není. Mnoho dalších vazebných partnerů má totiž tento motiv pozměněn. Například serotonin-N-acetyltransferasa má namísto serinu fosforylovaný threonin a existují i proteiny, které protein 14-3-3 váže nefosforylované.

3.5.4. Funkce proteinu 14-3-3

Funkce proteinů 14-3-3 byly rozděleny do určitých kategorií. Tyto proteiny jsou schopny:

- 1) Způsobit konformační změnu vázaného proteinu.
- 2) Bránit interakci vazebného partnera s jinou molekulou.
- 3) Přiblížit dva proteiny k sobě a tím umožnit jejich interakci.

4. Cíle práce

Hlavní cíle práce jsou:

- Purifikace proteinu 14-3-3ζnoW.
- Purifikace a fosforylace proteinu PdQ52K.
- Měření akrylamidem zhasené fluorescence proteinu PdQ52K volného a v komplexu s proteinem 14-3-3ζnoW a porovnání přístupnosti Trp-29 v molekule proteinu PdQ52K v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3ζnoW.

5. Metody a materiál

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Chemikálie

- agarosa – Carl Roth GmbH, Německo
- akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo
- ampicilin – Sigma, USA
- ATP – Sigma, USA
- bis-akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo
- bromfenolová modř – Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 – Lachema a.s, ČR
- DTT (dithiotreitol) – Carl Roth GmbH, Německo
- EDTA – Sigma, USA
- glycin – Carl Roth GmbH, Německo
- chlorid sodný – Lach-ner, ČR
- imidazol – Carl Roth GmbH, Německo
- IPTG – Sigma, USA
- LB Agar High Salt – Ducheta Biochemie, Nizozemsko
- LB-Medium (Luria/Miller) – Carl Roth GmbH, Německo
- NP40 – Sigma, USA
- persulfát amonný – Sigma, USA
- SDS – Sigma, USA
- síran nikelnatý – Penta, ČR
- TEMED – Carl Roth GmbH, Německo
- TRIS – Carl Roth GmbH, Německo
- β -merkapt ethanol – Carl Roth GmbH, Německo

Všechny chemikálie byly nejméně čistoty p.a.

5.1.2. Přístroje

- centrifuga – (kap. 5.8) Eppendorf 5804R, rotor A-4-44, Hermle, Švýcarsko
- centrifuga – (kap. 5.5) Sigma 8K, rotor-12510-H, Sigma, Německo
- chromatografie – FPLC, Watrex, ČR
- sonikátor – Sonicator 3000, MSONIX, USA
- Spektrofluorimetr – PhotonCounting PC1 ISS, USA
- třepačka zkumavek – Shaking Incubator HandyLab®System, N-Biotek, Korea
- třepačka litrových LB médií – InforsHT Multitron, Inforsag, Švýcarsko
- UV-VIS absorpční spektrofotometr –Agilent 8453, USA

5.1.3. Ostatní materiál

- dialyzační membrána – MCO 14000, Carl Roth GmbH, Německo
- *E. coli* BL21(DE3) – Stratagene, USA
- lysozym – New EnglandBioLabs, USA
- náplně do kolon – Amersham Biosciences, Švédsko
- vektor pET-15b – Invitrogen, USA
- PKA – Promega, USA
- standard molekulových vah – Blue Protein Ladder, Central european Biosystems, ČR (3,5-245 kDa, Tris-Glycin 4-20%)

5.2. Plasmid

Pro pokusy byly využity vektory pET-15b, do kterých byly vneseny geny pro mutantní protein fosducinu PdQ52K a protein 14-3-3ζnoW. V molekule fosducinu byl zmutován Gln-52 za lysin, aby byla možná fosforylace Ser-54 i Ser-73 *in vitro* pomocí PKA a u proteinu 14-3-3ζ byly nahrazeny oba tryptofanové zbytky fenylalaninem (mutace W59F, W228F), aby se odstranila jeho tryptofanová fluorescence pro budoucí spektrofluorimetrické měření.

Vektor pET-15b nese geny rezistence vůči antibiotiku ampicilinu. Také umožňuje produkci žádaného proteinu jako fúzního proteinu s tzv. 6×His-kotvou, což je motiv šesti histidinových zbytků na N-konci proteinu, který umožňuje purifikaci tohoto

proteinu niklovou chelatační chromatografií. Zároveň obsahuje štěpné místo pro proteasu thrombin, která umožňuje odštěpení této afinitní kotvy.

Zaklonování všech proteinů i jejich mutagenese již byla dříve provedena jinými členy laboratoře.

5.3. Transformace bakterií

Při transformaci dochází k horizontálnímu přenosu genetické informace, plasmidové DNA, do kompetentních buněk. V laboratoři se tento proces provádí metodou teplotního šoku. Při této metodě jsou bakterie nejprve inkubovány na ledu, následně jsou na 45 vteřin vnořeny do vodní lázně o teplotě 42 °C a poté na 2 minuty vloženy do vody o teplotě 0 °C.

K 50 µl roztoku kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) bylo přidáno 0,7 µl plasmidové DNA (cDNA PdQ52K, vektor pET-15b). Roztok byl jemně promíchán a následně 20 minut inkubován v ledové lázni. Následovala metoda teplotního šoku a poté přidavek 400 µl LB media. Tento roztok byl inkubován 1 hodinu při 37 °C a 200 µl jej bylo sterilně nanášeno na Petriho misku s LB médiem o koncentraci ampicilinu 100 mg/ml. Miska byla umístěna do inkubátoru a bakterie byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Transformace byla provedena pouze s proteinem PdQ52K.

5.4. Bakteriální expresní systém

Pro expresi proteinů byli využity kompetentní buňky bakterií *E. coli* BL21(DE3). Tyto kmeny bakterií mohou být uchovávány dlouhou dobu při -80°C a jsou vhodné pro efektivní expresi proteinů. Jejich buňky obsahují gen pro λDE3 lysogen, který po indukci isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosidem (IPTG) exprimuje T7 RNA polymerasu. Ta aktivuje T7 promotor, který dále ve velké míře exprimuje proteiny z expresního vektoru, v mém případě pET-15b.

5.5. Kultivace bakterií a indukce exprese proteinů

Po transformaci byla jedna kolonie bakterií sterilně přenesena kličkou do 5 ml tekutého LB média s koncentrací ampicilinu 100 µg/ml a kultivována přes noc při 210 rpm a 37°C. V případě proteinu 14-3-3 ζ noW bylo do LB média pipetováno 10 µl roztoku bakterií z glycerolového stoku.

Tyto roztoky byly druhý den přelity do Erlenmayerových bání s obsahem 0,9 l LB média, ve kterých bakterie rostly až do hodnoty optické density 0,6.

Následovalo snížení teploty na 25°C a indukce exprese proteinů přidáním 0,9 ml 0,5M roztoku IPTG. Baňky byly ponechány při 25 °C a 210 rpm po dobu 18 hodin.

5.5.1. Příprava LB média

K přípravě bylo využito komerční LB médium. Výsledný roztok obsahuje 10 g/l tryptonu, 5 g/l kvasničného extraktu a 10 g/l NaCl. Po úpravě pH na hodnotu 7,4 byl roztok sterilizován v autoklávu. Následně bylo k 0,9 l roztoku přidáno 0,9 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml.

5.5.2. Příprava LB agarových misek

Použit byl komerční LB Agar High Salt, přičemž 20 g bylo rozpuštěno v 0,5 l destilované vody. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu. Po sterilizaci a ochlazení na 51 °C byl přidán 1 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Takto připravený roztok byl nalit do Petriho misek (přibližně 15 ml na 1 misku).

5.6. Skladování bakterií

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

5.7. Preparativní centrifugace

Centrifugace je metoda, která využívá rozdílné hustoty a viskozity jednotlivých částí roztoku k jejich oddělení, nejčastěji na dvě části, kapalnou (supernatant) a pevnou (peleta).

Preparativní centrifugace byla využita nejprve po kultivaci bakterií (kapitola 5.5) pro jejich separaci od kapalného podílu LB média. Prováděna byla 20 minut při 3400 rpm a 4°C. Pro získání roztoku proteinu po sonikaci (kapitola 5.8) byla provedena centrifugace při 13400 rpm, 4°C po dobu 40 minut, čímž došlo k jeho oddělení od zbytků bakterií.

5.8. Sonikace

Sonikace je metoda, která využívá ultrazvukových vln k rozrušení buněk. Ultrazvukové vlny v roztoku způsobují jev zvaný kavitace, tedy vznik dutin a jejich následnou implozi, která je provázena vznikem tlakové vlny. Tyto tlakové vlny mají destruktivní účinky.

Před sonikací byla peleta získaná z 0,9 l bakteriální kultury resuspendována ve 25 ml lyzovacího pufru a následně inkubována 15 minut s lysozymem o finální koncentraci 100 µg/ml, při 4°C a za konstantního míchání. Lysozym byl použit, jelikož se jedná o enzym štěpící peptidoglykan, který vytváří buněčnou stěnu bakterií. Způsobí tedy rozklad buněčné stěny bakterií, čímž usnadní rozrušení celých buněk.

Sonikace byla prováděna 20 minut po 3-sekundových intervalech s 17-sekundovými odmlkami, přičemž po 10 minutách byla přerušena 5-minutovým mícháním při 4 °C. Aby nedošlo k zahřátí roztoku, byla kádinka po celou dobu sonikace chlazená.

Rožtok byl poté odstředěn při 4 °C, 13500 rpm po dobu 40 minut, čímž byla oddělena kapalná část s obsahem proteinu od pevných zbytků bakteriální kultury.

Složení lyzovacího pufru:

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

Složení 10x PBS:

- 1,36M NaCl; 27mM KCl; 50mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄

5.9. Dialýza

Tato separační metoda využívá difúze nízkomolekulárních látek membránou, nepropustnou pro velké molekuly a částice, z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku s nižší koncentrací. Nejčastěji se využívají umělé dialyzační membrány s určitou velikostí pórů, kterou je nutné zvolit podle velikosti dialyzované látky. Tímto je umožněno oddělit proteiny od velkého množství nízkomolekulárních nečistot a zároveň je převést do vhodného prostředí.

Pro dialýzu byla použita umělá membrána s MCO (molecular weight cut-off) 14000. Tedy membrána nepropouštějící molekuly o relativní molekulové hmotnosti 14000 nebo větší.

Složení pufrů

- *Pufr po niklové chelatační chromatografii (kapitola 5.11.1)*
20mM NaCl; 50mM; Tris-HCl (pH 8); 2mM EDTA; 5mM DTT.
- *Pufr po gelové permeační chromatografii (kapitola 5.11.3)*
50mM Tris-HCl (pH8); 1mM EDTA; 5mM DTT; 150mM NaCl; 10% glycerol
- *Pufr po fosforylaci fosducinu (kapitola 5.13)*
20mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA; 5mM DTT; 150mM NaCl; 10% glycerol
- *Pufr pro fluorescenční měření (kapitola 5.14.4)*
20mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA; 200mM NaCl; 2mM β -merkaptoethanol

5.10. SDS-PAGE elektroforéza

Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) je elektromigrační metoda využívající pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. SDS je aniontový detergent, který se na proteiny váže v konstantním poměru a tím jim udává jednotný záporný náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu, čímž umožňuje rozdělení proteinů v elektrickém poli na základě rozdílnosti molekulových hmotností. Při použití standardu molekulových hmotností můžeme touto metodou potvrdit přítomnost a čistotu proteinů o určité molekulové hmotnosti v roztoku.

8 μ l roztoku proteinu z jednotlivých frakcí bylo pipetováno do označených mikrozkušavek a smícháno s 2 μ l pufru pro přípravu vzorků. Roztok byl promíchán a 3 minuty povařen při 100 °C. Následovalo nanesení takto připravených vzorků na 15% polyakrylamidový gel. Elektroforéza byla prováděna za konstantního napětí 198 V a po jejím ukončení byl gel vizualizován roztokem Coomassie Brilliant Blue R250. Velikost proteinů byla určena porovnáním se standardem molekulových vah Blue Protein Ladder, Central european Biosystems, ČR.

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

- *Separční gel (15%)*
1,8 ml destilovaná H₂O; 3,75 ml akrylamid/bis-akrylamid; 1,9 ml pufr pro separční gel; 45 μ l 10% persulfát amonný; 5 μ l TEMED
- *Zaváděcí gel (4%):*
2,25 ml destilovaná H₂O; 0,5 ml akrylamid/bis-akrylamid; 1 ml pufr pro zaváděcí gel; 45 μ l 10% persulfát amonný; 5 μ l TEMED
- *Akrylamid/bis-akrylamid:*
29,2 g akrylamid; 0,8 g bis-akrylamid, doplněno destilovanou vodou do 100 ml
- *Pufr pro separční gel:*
75 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml destilovaná voda
- *Pufr pro zaváděcí gel:*
50 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml destilovaná voda
- *Pufr pro přípravu vzorků (5x koncentrováný):*
0,6 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8); 5 ml 50% glycerol; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml β -merkaptoethanol; 1 ml 10% bromfenolová modř; 0,9 ml destilovaná H₂O
- *Pufr pro elektroforézu:*
50mM Tris-HCl (pH 8,3); 385mM glycin; 0,1% SDS
- *Barvicí roztok:*
1 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 450 ml methanol; 100 ml kyselina octová; 450 ml destilovaná voda
- *Odbarvovací roztok:*
100 ml methanol; 100 ml kyselina octová; 800 ml destilovaná voda

5.11. Chromatografie

Podstatou chromatografického procesu je rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární, na základě různé síly fyzikálně-chemických interakcí. Látky, které interagují se stacionární fází silněji, jsou zpomalovány a eluovány později než látky, jejichž interakce se stacionární fází jsou slabší.

Chromatografickou separaci lze využít, mimo jiné, k izolaci čistých složek (tzv. preparativní chromatografie).

5.11.1. Niklová chelatační chromatografie

Jedná se o formu afinitní chromatografie, tedy metody, která využívá specifických, reversibilních interakcí. Určitý ligand je imobilizován na povrchu inertního nosiče a při průtoku mobilní fáze je na něj adsorbována separovaná látka. V případě niklové chelatační chromatografie tvoří stacionární fází Ni^{2+} , které jsou zachyceny chelatující sepharosovou maticí. Ni^{2+} reagují s volnými elektronovými páry imidazolové skupiny histidinu, čímž mohou zadržovat proteiny s touto aminokyselinou. Vlivem této interakce může tato metoda separovat proteiny obsahující 6×His kotvu, tedy motiv šesti histidinů za sebou,

Pro afinitní chromatografii byla použita kolona obsahující chelatující sepharosovou matici (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla nejdříve promyta, přičemž došlo k navázání Ni^{2+} iontů. Tato matrice byla poté přenesena do roztoku proteinu, se kterým byla promíchávána 15 min při 4 °C, přičemž došlo k navázání proteinu. Vzniklá suspenze byla poté promývána promývacím pufrem, čímž byly vymyty nespecificky vázané proteiny. Roztok byl nejprve centrifugován, následně byl odlit supernatant, a peleta byla resuspendována promývacím pufrem. Tento proces byl opakován až do spotřeby 400 ml pufru. Poté byla suspenze sepharosy s navázaným proteinem aplikována na kolonu a protein byl eluován pomocí 20 ml elučního pufru. Celý proces byl prováděn za neustálého chlazení, aby se zamezilo degradaci proteinů.

Frakce byly jímány do připravených mikrozkušavek. Obsah proteinu v jednotlivých frakcích a jeho čistota byl zkontrolován pomocí SDS-PAGE.

Promytí kolony

- 1) 10 ml voda
- 2) 10 ml Stripp solution (50 mM EDTA; 0,5 M NaCl)
- 3) 15 ml voda
- 4) 50 ml 0,1 M NiSO₄
- 5) 10 ml voda
- 6) 10 ml vazebný pufr

Složení pufrů:

- *Vazebný pufr:*
1x PBS; 0,5M NaCl; 1mM imidazol; 2mM β-merkapt ethanol; 0,05% NP40
- *Eluční pufr:*
1x PBS; 0,5M NaCl; 0,6M imidazol; 2mM β-merkapt ethanol; 0,05% NP40
- *Promývací pufr:*
1x PBS; 0,5M NaCl; 0,06M imidazol; 2mM β-merkapt ethanol; 0,05% NP40

V případě proteinu 14-3-3 nebylo použito NP40.

5.11.2. Iontově-výměnná chromatografie

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

Pro purifikaci proteinů 14-3-3ζnoW a PdQ52K byla použita aniontově-výměnná chromatografie a je tedy potřeba, aby oba proteiny získaly záporný náboj, což je dosaženo jejich dialýzou do pufru o pH 8.

Kolona Tricorn 5/50 s náplní Q-sepharosy (kvarterní amoniová sůl) byla nejprve promývána filtrovanou destilovanou vodou a dále vazebným pufrům. Následně byl nastaven 50% gradient vazebného a elučního pufru. Tím došlo k velkému nárůstu iontové síly a následnému přečištění kolony od možných nečistot na ní zachycených. Po

10 minutách byl nastaven 2% gradient a po ustálení vodivosti roztoku byl protein nanášen na kolonu při průtokové rychlosti 1,5 ml/min. Tím došlo k zachycení proteinu na kolonu. Následně byl nastaven 10% gradient, čímž došlo k eluci molekul, které měly malou afinitu ke stacionární fázi. Eluce proteinů byla provedena lineárním vzrůstem iontové síly, přičemž k eluci fosducinu a proteinu 14-3-3 dochází přibližně u 50% gradientu elučního a vazebného pufru.

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

Složení pufrů

- *Vazebný pufr:*
50mM Tris-HCl (pH 8), 5mM DTT
- *Eluční pufr:*
50mM Tris-HCl (pH 8), 5mM DTT, 1M NaCl

5.11.3. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metoda, při které se molekuly dělí na základě své velikosti a tvaru. Jde o typ rozdělovací chromatografie, kde je stacionární fázi kapalina zakotvená v gelu. Stejná kapalina pak tvoří mobilní fázi. Částice gelu mají kulovitý tvar, obsahují póry známé velikosti a separační mechanismus je založen na schopnosti separovaných molekul těmito póry procházet. Malé molekuly pronikají do těchto pórů snadněji než velké, jsou tedy více zpožděny a později eluovány.

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

Kolona byla nejdříve promyta 20% roztokem ethanolu a následně elučním pufrém, v obou případech při průtokové rychlosti 3,5 ml/min a to po dobu nutnou k ustálení konduktivity. Poté byl roztok proteinu nanesen na kolonu. Objem dávkovací smyčky byl 2 ml, a proto byl vzorek na tento objem koncentrován.

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

Složení elučního pufru:

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

5.12. Koncentrování roztoků proteinů

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

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

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

5.13. Fosforylace fosducinu

Pro vytvoření komplexu proteinu 14-3-3 s fosducinem, je nutná fosforylace fosducinu. Při fosforylaci dochází k přenesení fosfátové skupiny, nejčastěji z molekuly ATP do struktury proteinu. Tuto reakci katalyzují enzymy kinasy.

Pro fosforylaci fosducinu *in vivo* jsou zapotřebí dvě kinasy, PKA a CaMKII. Při mých pokusech jsem ovšem používal mutant fosducinu PdQ52K a bylo tedy možné fosforylovat *in vitro* oba serinové zbytky pouze pomocí PKA.

Protein byl nejprve fosforylován 2 hodiny při 30 °C a to v přítomnosti 0,75mM ATP, 15mM MgCl₂ a PKA o aktivitě 200u na 1 µg PdQ52K. Následně bylo k roztoku proteinu o objemu 1,5 ml přidáno 10 µl 50mM roztoku ATP a protein byl takto fosforylován 12 hodin při 4 °C.

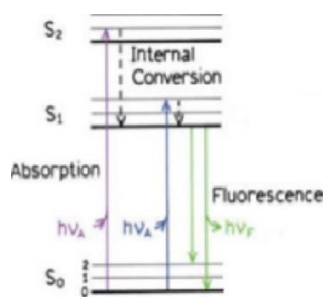
5.14. Akrylamidem zhášená fluorescence

5.14.1. Fluorescence

Fluorescence je proces vyzáření energie ve formě elektromagnetického záření, při přechodu elektronu z excitovaného singletového stavu do stavu základního [12]. Excitovaný elektron je, díky opačnému spinu, spárován s elektronem v základním stavu a tudíž návrat do základního stavu je spinově povolený, přičemž dochází k emisi fotonu. Rychlost emise se pohybuje okolo 10^{-8} s.

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

Pro porovnání absorpce a emise elektromagnetického záření se používá Jablonskiho diagram (obr. 5.1), který znázorňuje různé hladiny energie. Zobrazuje základní, první a druhou energetickou hladinu, přičemž každá z nich se skládá z více vibračních hladin.



Obr. 5.1 Jablonskiho diagram. S_0 zobrazuje základní energetickou hladinu, S_1 a S_2 zobrazují první a druhou energetickou hladinu. Na obrázku jsou také naznačeny vibrační hladiny, vnitřní konverze a fluorescence [12].

Po absorpci světelné energie dochází nejčastěji k excitaci do některé z vyšších vibračních hladin prvního, či druhého singletového stavu. Během 10^{-12} s dochází k vnitřní konverzi, přechodu do nejnižší vibrační hladiny S_1 . Následně dochází k přechodu do základního stavu, ovšem do některé z vyšších vibračních hladin.

Výsledkem těchto procesů je často snížení energie emise oproti absorpci a prodloužení vlnové délky záření. Tento fenomén se nazývá Stokesův posun.

5.14.2. Fluorescence proteinů

V proteinech je dominantním fluoroforem indolová skupina tryptofanu. Indol absorbuje záření o vlnové délce 280 nm a emituje záření o 340 nm. Pokud je ovšem indolová skupina ukryta v nepolárním prostředí proteinu, může docházet ke zkrácení vlnové délky emise, nebo naopak k prodloužení, je-li protein rozbalen a fluorofor je přístupný polárním prostředí.

5.14.3. Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je proces, při kterém dochází ke snížení intenzity fluorescence vzorku. K tomuto může docházet reakcemi excitovaného stavu, změnou struktury molekuly, přenosem energie, nebo kolizním či statickým zhášením.

Kolizní zhášení vyžaduje přímý kontakt fluoroforu a zhášedla. Při kontaktu přechází fluorofor do základního stavu bez vyzáření fotonu, zároveň však nedochází k trvalým změnám molekul. Při statickém zhášení dochází k vytvoření nefluoreskujícího komplexu mezi zhášedlem a fluoroforem.

Při obou typech zhášení však musí být zhášedlo a fluorofor v přímém kontaktu a z tohoto důvodu může měření fluorescenčního záření odhalit přístupnost fluoroforu k zhášedlu. Pro studium zhášení fluorescence tryptofanu je nejvhodnějším zhášedlem akrylamid, který zároveň nemá na proteiny nepříznivý vliv.

Úbytek intenzity fluorescence je závislý na koncentraci zhášedla (akrylamidu) a je popsán Sternovou-Volmerovou rovnicí.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \times [Q] \quad (5.1)$$

F_0 značí hodnotu fluorescence bez přítomnosti zhášedla. F je hodnota fluorescence při určité koncentraci akrylamidu $[Q]$. K_{SV} je Sternova-Volmerova konstanta.

K_{SV} je v proteinech závislá na přístupnosti zhášedla k fluoroforu [12]. Zhášedlo totiž nedokáže proniknout do hydrofobního nitra proteinu a nemůže zde tedy zhášet přítomné fluorofory. Ke snížení intenzity fluorescence může dojít pouze v případě, je-li fluorofor na povrchu proteinu. Pokud je fluorofor přístupný zhášedlu, je zhášení fluorescence možné a K_{SV} nabývá vysokých hodnot. V případě omezení přístupnosti akrylamidu k fluoroforu je zhášení fluorescence omezeno a K_{SV} se blíží jedné.

5.14.4. Pracovní postup

Proteiny byly nejprve dialyzovány do pufru, určeného pro fluorescenční měření. Následně byla podle Lambertova-Beerova zákona vypočítána koncentrace proteinů v roztocích. Pro výpočet byly použity hodnoty molárních absorpčních koeficientů $17420 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ pro protein PdQ52K, $16390 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ pro protein 14-3-3ζnoW a naměřené hodnoty absorpčních při vlnové délce 280 nm. Výsledné koncentrace proteinu PdQ52K v roztoku o objemu 1,5 ml byla 96 μmol/l a proteinu 14-3-3ζnoW 147 μmol/l v roztoku o objemu 4,5 ml.

Následně byl připraven roztok proteinu 14-3-3ζnoW o koncentraci 70 μmol/l, roztok fosforylovaného proteinu PdQ52K o koncentraci 35 μmol/l a jejich směs o stejných koncentracích jednotlivých proteinů. Fosforylovaný protein PdQ52K vytváří s proteinem 14-3-3ζnoW komplex. Všechny roztoky proteinů i pufr byly přefiltrovány.

Nejprve byla změřena absorpční a emisní spektra všech vzorků a samotného pufru. Dále bylo měřeno zhášení fluorescence při přidání akrylamidu.

Absorpční spektra byla proměřena v rozmezí vlnových délek 220-320 nm a excitační spektra v rozmezí 320-420 nm. Přitom byly použity štěrby, v pořadí průchodu paprsku o těchto šířkách: 2,0; 1,0; 1,0; 2,0 mm (šířka štěrby vynásobená 8 odpovídá vlnovému rozsahu v nm).

Při měření zhášení fluorescence byla excitační vlnová délka nastavena na hodnotu 297 nm a emisní vlnová délka byla nastavena na hodnotu 340 nm. Při tomto nastavení totiž měříme fluorescenci především tryptofanu, jelikož fluorescence tyrosinu je při této vlnové oproti fluorescenci tryptofanu délce zanedbatelná. Vzorek vždy obsahoval 400 μl roztoku proteinu a fluorescence byla měřena při objemu 3, 6, 9, 14, 19 a 24 μl přidaného 5M roztoku akrylamidu. Pro maximální intenzitu fluorescence byly použity štěrby o šířkách 2,0; 0,5; 2,0; 2,0 mm v tomto pořadí ve směru paprsku. Měření bylo provedeno 10 iteracemi, které byly zprůměrovány.

Pro korekci na vnitřní filtr byla proměřena absorbance pufru při 297 a 340 nm s přidávkou akrylamidu.

Složení pufru:

- 20mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA; 200mM NaCl; 2mM β-merkaptoethanol

5.14.5. Úprava naměřených hodnot

Naměřené hodnoty byly upraveny podle následujícího vztahu, který zohledňuje fluorescenci pufru, změnu objemu a absorbanci pufru (tzv. korekce na vnitřní filtr).

$$F = (F_{vz} - F_p) \times \left(\frac{V_{vz}}{V_0} \right) \times 10^{\frac{A_{298} + A_{340}}{2}} \quad (5.2)$$

F značí výslednou hodnotu fluorescence, F_{vz} fluorescenci vzorku, F_p fluorescenci pufru, V_0 počáteční objem vzorku a V_{vz} konečný objem vzorku po přidavku akrylamidu. A_{298} a A_{340} jsou absorbance pufru při vlnových délkách 298 a 340 nm.

Hodnoty fluorescence proteinu PdQ52K vázaného v komplexu s proteinem 14-3-3ζnoW byly získány odečtením průměru naměřených hodnot fluorescence proteinu 14-3-3ζnoW od celkové fluorescence komplexu.

Pro každý vzorek byly provedeny tři měření. Naměřené a upravené hodnoty byly v programu Microsoft Excel 2010 vyneseny do grafů a proloženy přímkou střední hodnoty (obr. 6.12, str.42). Z rovnic přímek byly určeny Sternovy-Volmerovy konstanty a pomocí programu Origin 6,0 byly vypočítány chyby měření (tab. 6.1, str. 43).

6. Výsledky a diskuze

6.1. Purifikace proteinů 14-3-3ζnoW a PdQ52K

6.1.1. Expres

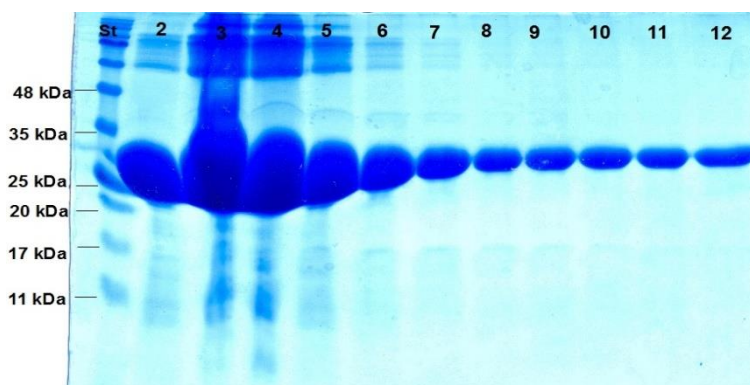
Byly exprimovány proteiny PdQ52K a 14-3-3ζnoW. Plasmidová DNA pro protein PdQ52K využita při transformaci bakterií (kapitola 5.3) a transformované buňky s plasmidem proteinu 14-3-3ζnoW mi byly poskytnuty Mgr. Miroslavou Kacířovou.

Oba proteiny byly inkubovány ve třech Erlenmayerových báních s obsahem 0,9 l LB média (kapitola 5.5). Roztoky buněčné kultury byly poté odstředěny (kapitola 5.7) a pelety resuspendovány lyzačním pufrem. Vzniklé roztoky byly inkubovány s lysozymem. Následovala sonikace a odstředění pro získání roztoku proteinu (kapitola 5.8).

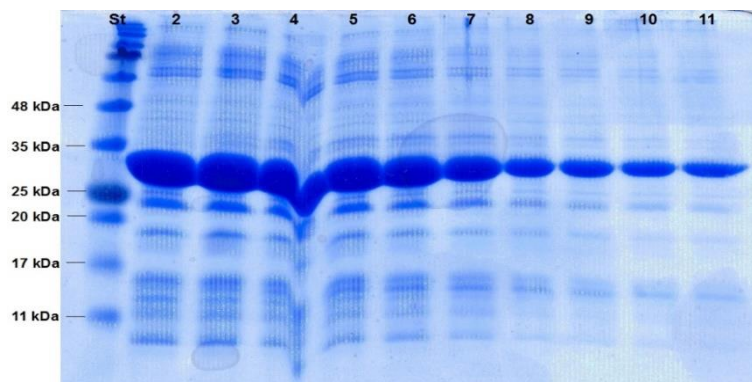
6.1.2. Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie byla umožněna přítomností 6×His kotvy v obou proteinech. Provedení je popsáno v kapitole 5.11.1.

Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla určena pomocí SDS-PAGE (kapitola 5.10).



Obr. 6.1 15% polyakrylamidový gel získaný SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu 14-3-3ζnoW, eluovaných při niklové chelatační chromatografii. Protein 14-3-3ζnoW (28 kDa) se pohybuje v oblasti mezi 35 kDa a 25 kDa, jak je patrné z frakcí 8-12, které neobsahují nadměrné množství tohoto proteinu.



Obr. 6.2 15% polyakrylamidový gel získaný SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu PdQ52K, eluovaných při niklové chelatační chromatografii. Protein PdQ52K (33kDa) se pohybuje v oblasti mezi 35 kDa a 25 kD.

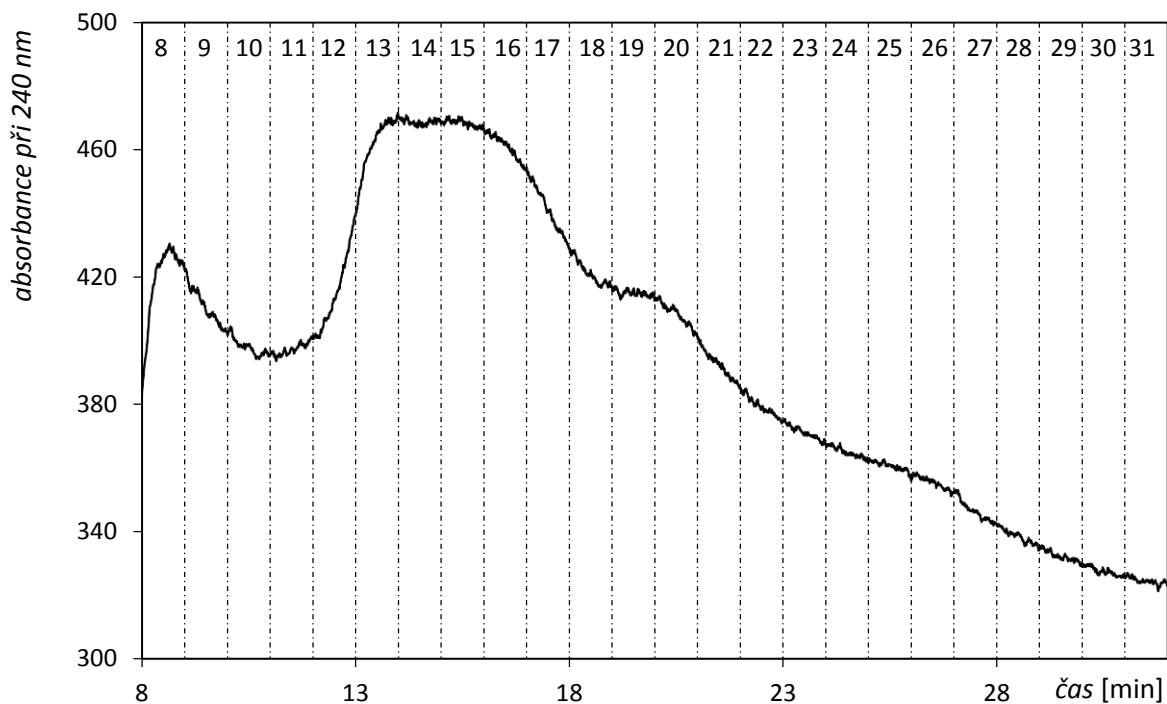
Na základě polyakrylamidových gelů po niklové chelatační chromatografii byla potvrzena přítomnost žádaného proteinu ve všech frakcích, které byly smíchány a dialyzovány (kapitola 5.9).

6.1.3. Ionově výměnná chromatografie

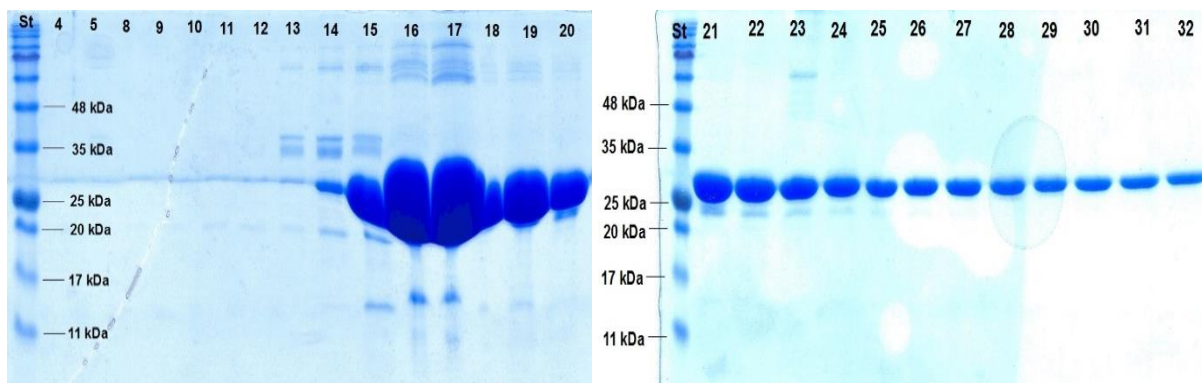
Po dialýze byl protein nanesen na kolonu s obsahem Q-sepharosy a následně eluován do mikrozkušavek o objemu 1 ml. Postup je popsán v kapitole 5.11.2.

Přítomnost a čistota proteinu byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (kapitola 5.10). Frakce proteinu PdQ52K do této elektroforézy byly vybrány na základě chromatogramu, ovšem v případě proteinu 14-3-3ζnoW byl detektor nastaven na hodnotu vlnové délky 240 nm namísto 280 nm a chromatogram tudíž přesně nezobrazuje přítomnost proteinu 14-3-3ζnoW. Proto byla provedena SDS-PAGE většího množství frakcí. Zároveň byl průtok nastaven na hodnotu 1 ml/min, což pravděpodobně přispělo k již tak velkému rozmytí píku, způsobeného několika nabitými stavy proteinu 14-3-3ζnoW.

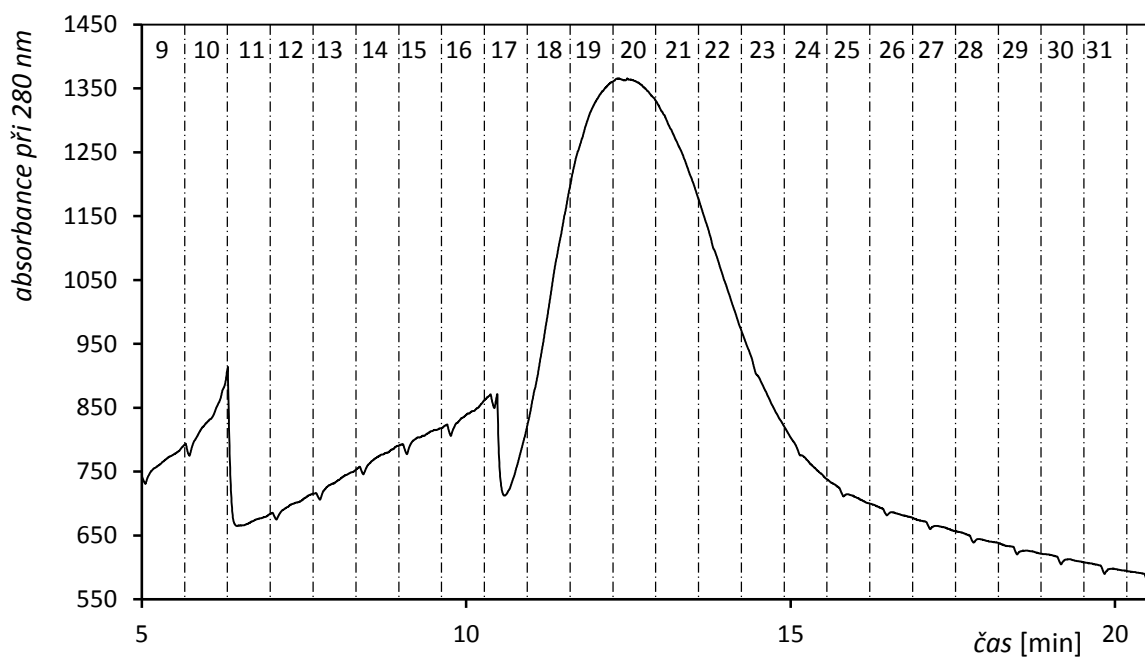
Na základě níže zobrazených chromatogramů (obr. 6.3 a 6.5) a gelů (obr. 6.4 a 6.6), byly vybrány určité frakce, aby bylo dosaženo co největší čistoty a výtěžku proteinů.



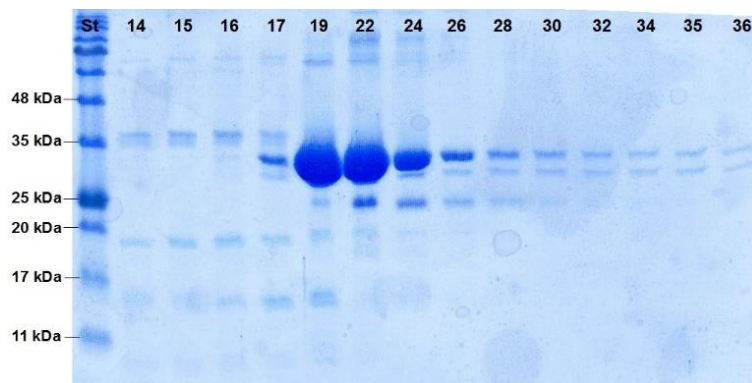
Obr. 6.3 Chromatogram iontově výměnné chromatografie roztoku proteinu 14-3-3ζnoW. Pík na obrázku příliš neodpovídá skutečné koncentraci proteinu 14-3-3ζnoW v jednotlivých frakcích, což je způsobeno měřením absorbance při 240 nm namísto 280 nm.



Obr. 6.4 15% polyakrylamidové gely získány SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu 14-3-3ζnoW, eluovaných při iontově výměnné chromatografii. Protein 14-3-3ζnoW (28 kDa) se pohybuje v oblasti mezi 35 kDa a 25 kDa. Velké množství proteinu 14-3-3ζnoW se nachází především v 16. a 17. frakci, kde by se tedy správně měl nacházet pík absorbance. Zároveň je patrné rozmytí píku.



Obr. 6.5 Chromatogram iontové výměnné chromatografie roztoku proteinu PdQ52K. Pík zobrazuje eluci proteinu PdQ52K do příslušných frakcí.



Obr. 6.6 15% polyakrylamidový gel získaný SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu PdQ52K, eluovaných při iontové výměnné chromatografii. Protein PdQ52K(33kDa) se pohybuje v oblasti mezi 35 kDa a 25 kDa. Z gelu je patrné, že nejvíce proteinu se nachází ve frakcích 19-24.

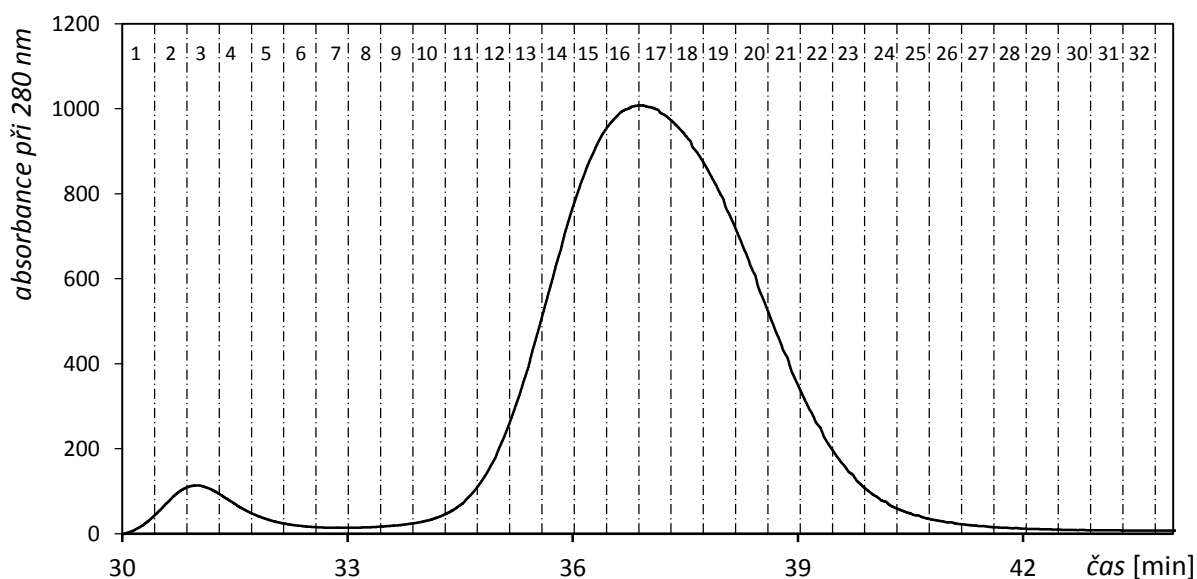
V případě proteinu 14-3-3 ζ noW byly vybrány frakce 15-27, které byly smíchány dohromady a koncentrovány na objem 1,5 ml.

U proteinu PdQ52K byly vybrány frakce 17-26, které byly také smíchány a koncentrovány na objem 1,5 ml.

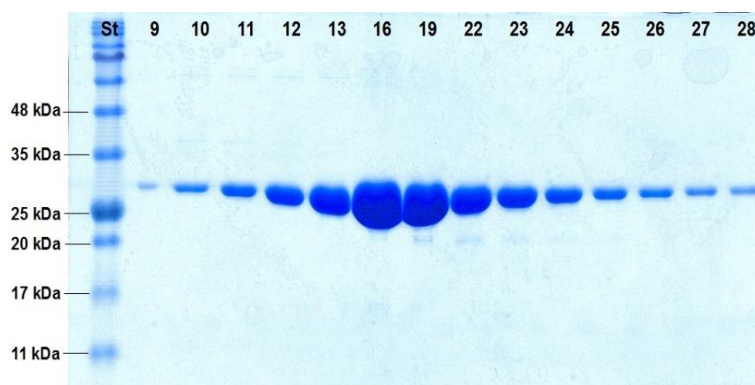
6.1.4. Gelová permeační chromatografie

Zakoncentrované roztoky proteinů byly purifikovány gelovou permeační chromatografií podle postupu popsaného v kapitole 5.11.3.

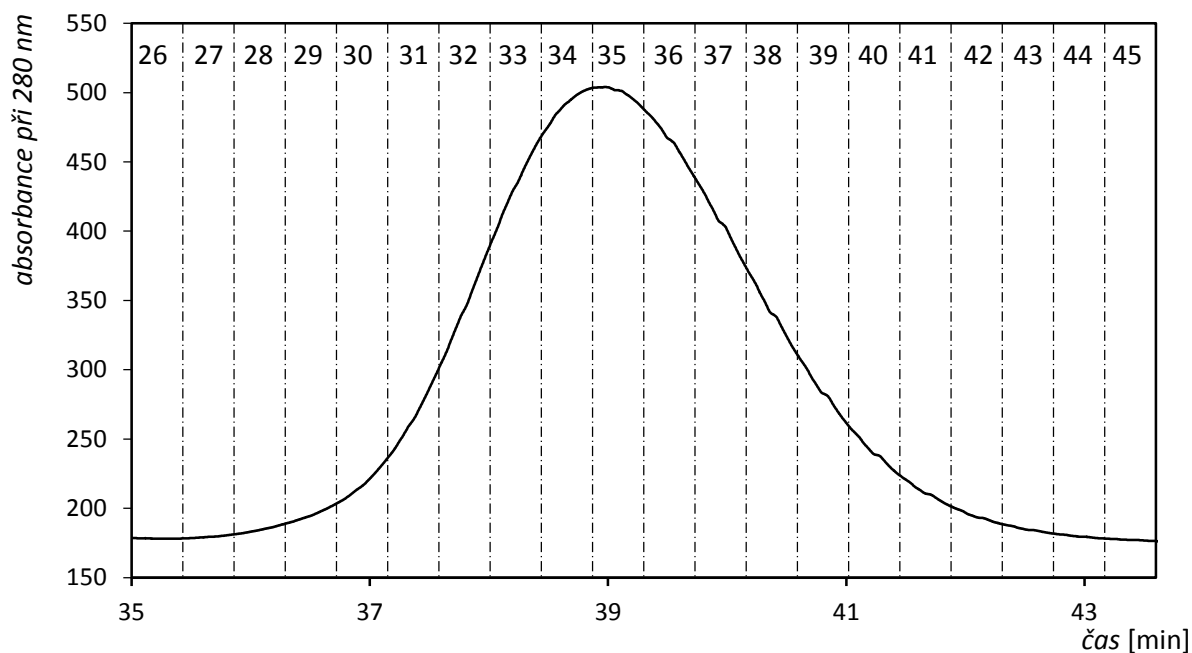
Ze získaných chromatogramů (obr. 6.7 a 6.9) byly určeny frakce, ve kterých byla přítomnost a čistota proteinu ověřena SDS-PAGE (kapitola 5.10). Na základě údajů získaných z chromatogramů a polyakrylamidových gelů (obr. 6.8 a 6.10) byly vybrány určité frakce s roztoky proteinů, aby bylo dosaženo co nejvyšší čistoty a výtěžku proteinů.



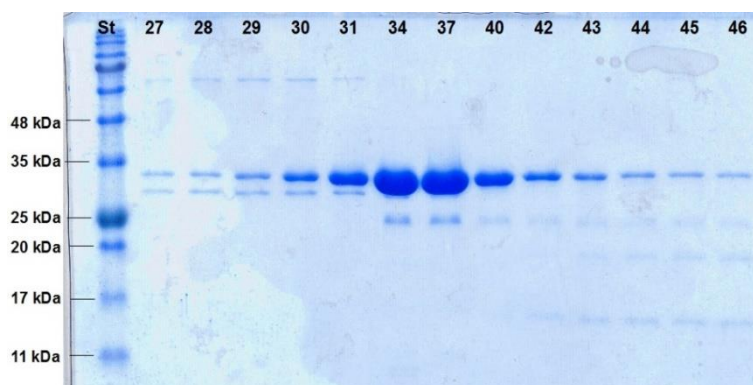
Obr. 6.7 Chromatogram gelové permeační chromatografie roztoku proteinu 14-3-3ζnoW. Velký pík náleží proteinu 14-3-3ζnoW a zobrazuje jeho rozdělení do jednotlivých frakcí.



Obr. 6.8 15% polyakrylamidový gel získaný SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu 14-3-3ζnoW, eluovaných při gelové permeační chromatografii. Z gelu je patrná vysoká čistota proteinu 14-3-3ζnoW.



Obr. 6.9 Chromatogram gelové permeační chromatografie roztoku proteinu PdQ52K. Pík náleží proteinu PdQ52K a zobrazuje jeho rozdělení do jednotlivých frakcí.



Obr. 6.10 15% polyakrylamidový gel získaný SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu PdQ52K, eluovaných při gelové permeační chromatografii. Protein PdQ52K (33kDa) se pohybuje v oblasti mezi 35 kDa a 25 kD. Nejvíce proteinu PdQ52K je obsaženo ve frakcích 34-37.

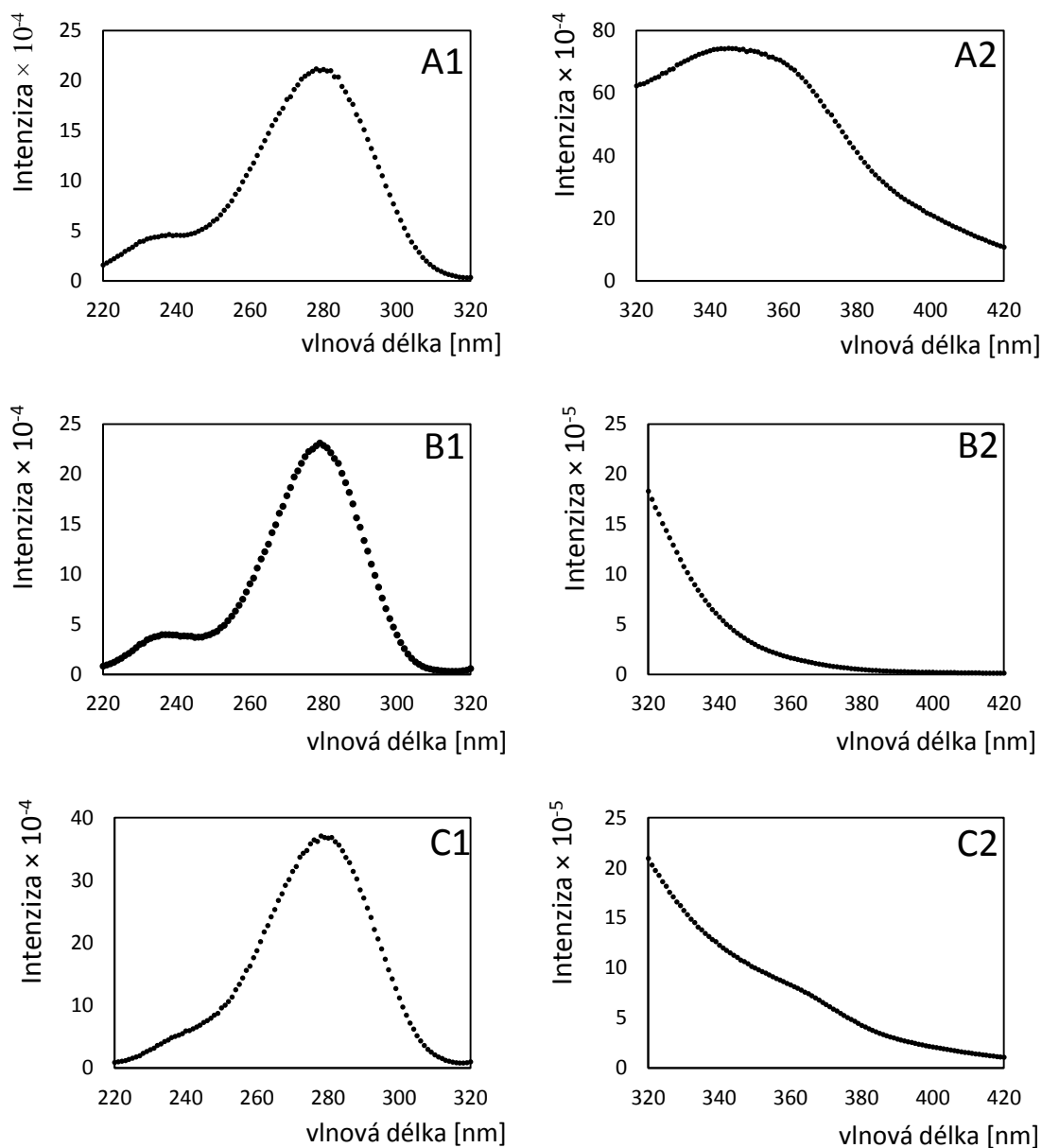
U proteinu 14-3-3 ζ noW byly vybrány frakce 12-22. Z polyakrylamidového gelu je patrné, že roztok proteinu je v těchto frakcích velmi čistý. Tyto frakce byly smíchány a koncentrovány na objem 4,5 ml.

SDS-PAGE frakcí roztoku proteinu PdQ52K ukazuje, že je roztok poměrně znečištěn proteiny o menší molekulové hmotnosti. Vybrány proto byly pouze frakce 34-38, které byly smíchány a koncentrovány na objem 1,5 ml.

6.2. Měření akrylamidem zhášené fluorescence

Nejprve byly proměřeny absorpční a emisní fluorescenční spektra všech vzorků. Pro každý vzorek byly provedeny tři měření a vybrány byly mediány výsledných hodnot, od kterých byly odečteny hodnoty fluorescence pufru.

Měření bylo provedeno podle postupu popsaného v kapitole 5.14.4.

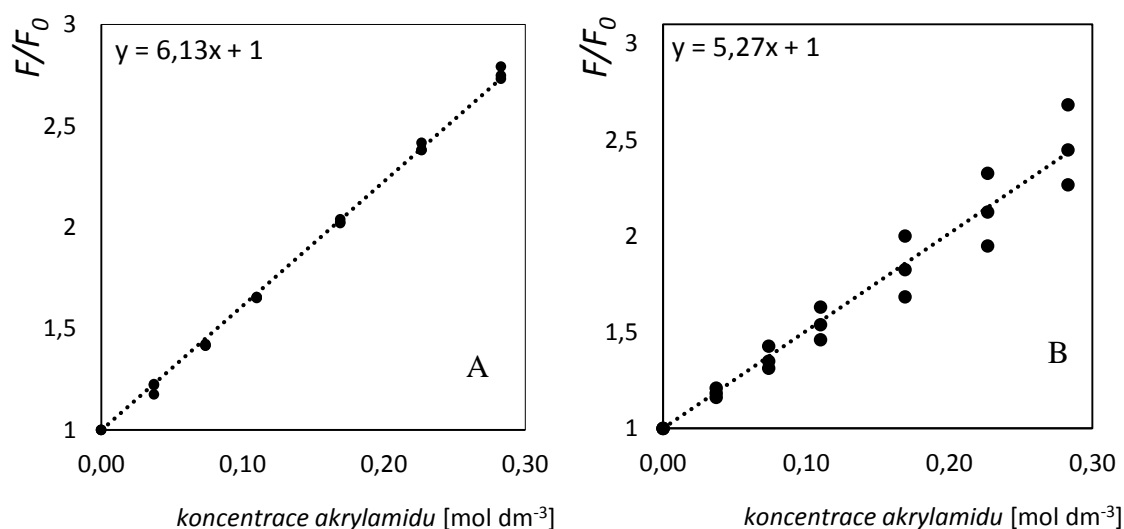


Obr. 6.11 Grafy znázorňují absorpční (-1) a emisní (-2) spektra proteinů PdQ52K (A), 14-3-3ζnoW (B) a jejich komplexu (C).

Dále bylo provedeno měření akrylamidem zhasené fluorescence, podle postupu popsaného v kapitole 5.14.4. Naměřené hodnoty byly upraveny podle vztahu 5.2 (str. 34).

Výsledné hodnoty odpovídají fluorescenci proteinů při určité koncentraci akrylamidu v roztoku. Úbytek intenzity fluorescence je závislý na koncentraci akrylamidu a je popsán Sternovou-Volmerovou rovnicí (vztah 5.1, str. 32).

Závislost F_0/F (F_0 značí fluorescenci Trp-29 při nulové a F při určité koncentraci akrylamidu) na koncentraci akrylamidu je lineární a po vynesení této závislosti do grafu (obr. 6.12) je možné určit směrnici přímky, která odpovídá Sternově-Volmerově konstantě (K_{SV}). Tato konstanta závisí na přístupnosti akrylamidu k Trp-29. Pokud je Trp-29 akrylamidu přístupný, bude jeho fluorescence zdatelně snížena, což se odrazí ve vysoké hodnotě K_{SV} . V případě ukrytí Trp-29 v hydrofobním nitru komplexu PdQ52K s proteinem 14-3-3 ζ noW bude zhasení fluorescence omezeno a hodnota K_{SV} výrazně poklesne.



Obr. 6.12 Měření akrylamidem zhasené fluorescence proteinu PdQ52K v nepřítomnosti (A) a přítomnosti proteinu 14-3-3W (B). F_0 značí hodnotu fluorescence vzorku bez přítomnosti akrylamidu, F je hodnota fluorescence při různých koncentracích akrylamidu. Hodnoty fluorescence byly nejprve upraveny podle vztahu 5.2 (str. 34). Pro každou hodnotu absorbance byly vyneseny tři hodnoty, které byly následně proloženy přímkou střední hodnoty s její rovnicí v programu Microsoft Excel 2010.

Tabulka 6.1 Tabulka zobrazuje získané hodnoty Sternových-Volmerových konstant (K_{SV}) pro protein PdQ52K volný a vázaný v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ noW. Chyby měření byly vypočítány v programu Origin 6.0.

Protein	K_{SV} [mol⁻¹ dm³]
PdQ52K volný	6,13 ± 0,05
PdQ52K+14-3-3 ζ noW	5,3 ± 0,4

Ze získaných hodnot K_{SV} můžeme určit přístupnost Trp-29 k okolnímu prostředí. K_{SV} Trp-29 ve volném proteinu PdQ52K je rovna $6,13 \pm 0,05 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ a odráží zhášení fluorescence tohoto fluoroforu. Pro protein PdQ52K v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ noW byla získána hodnota $K_{SV} = 5,3 \pm 0,4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Nižší hodnota K_{SV} znamená, že v komplexu PdQ52K:14-3-3 ζ noW je přístupnost Trp-29 vůči zhášení omezena. Tento rozdíl naznačuje, že vazba proteinu 14-3-3 ζ noW ovlivňuje N-terminální část molekuly PdQ52K a částečně omezuje její kontakt s polárním rozpouštědlem.

Na obr. 6.12 je v případě komplexu PdQ52K:14-3-3 ζ noW patrný rozptyl naměřených hodnot. To může být způsobeno nepřesným pipetováním, protože rozptyl naměřených hodnot se zvyšuje s rostoucí koncentrací zhášedla. Dalším faktorem může být fakt, že v případě komplexu je mnohem vyšší intenzita fluorescence pozadí, která v tomto případě zahrnuje i fluorescenci samotného proteinu 14-3-3 ζ noW (fluorescence Tyr zbytků, která je relativně vysoká i při excitaci fluorescence na vlnové délce 297 nm).

Analogické zhášecí experimenty byly provedeny i s jinými mutanty PdQ52K, které obsahovaly Trp zbytek v jiných částech molekuly. Tato měření byla provedena Mgr. Miroslavou Kacířovou, ovšem data zatím nebyla publikována. U těchto mutantů (např. mutanty s Trp-93 nebo Trp-107) bylo pozorováno výraznější snížení hodnoty K_{SV} po vazbě proteinu PdQ52K na protein 14-3-3 ζ noW (snížení o ~30%). Dá se tedy předpokládat, že vazba proteinu 14-3-3 ζ noW ovlivňuje přístupnost těchto oblastí molekuly PdQ52K více, než N-koncovém segmentu s Trp-29, kde jsme pozorovali méně výraznou změnu hodnoty K_{SV} (změna o ~14%).

7. Závěr

Úspěšně byly exprimovány a purifikovány proteiny PdQ52K a 14-3-3ζnoW, s miligramovými výtěžky. Protein PdQ52K byl fosforylován pomocí PKA a následně byl vytvořen komplex proteinu PdQ52K s proteinem 14-3-3ζnoW.

Měřením akrylamidem zhášené fluorescence byly získány hodnoty K_{SV} Trp-29 v molekule PdQ52K v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu 14-3-3ζnoW. Hodnota K_{SV} Trp-29 proteinu PdQ52K v komplexu s proteinem 14-3-3ζnoW je nižší, než hodnota získaná pro volný PdQ52K. Tuto změnu můžeme interpretovat jako snížení přístupnosti Trp-29 k polárním prostředí v důsledku interakce proteinu 14-3-3ζnoW s molekulou PdQ52K v oblasti obsahující Trp-29.

8. Citovaná literatura

- [1] Koolman, J; Röhm, K. H.:*Brevný atlas biochemie*. Překlad 4. vydání. Praha, Grada 2012.
- [2] Gaudet, R.; Bohm, A.; Sigler, P. B.:Crystal Structure at 2,4 Å resolution of the complex of Transducin and its regulator, Phosducin.*Cell*87:3, 577-588 (1996).
- [3] Thulin, C.D.; Savage, J.R.; McLaughlin, J.N.; Truscott, S.M.; Old, W.M.; Ahn, N.G.; Resing, K.A.; Hamm, H.E.; Bitensky, M.W.; Willardson, B. M.:Modulation of the G protein Regulator Phosducin by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Phosphorylation and 14-3-3 Protein Binding.*Journal of Biological Chemistry* 276:26 23805-23815 (2001).
- [4] Beetz, N.; Hein, L.: The physiological roles of phosducin: from retinal function to stress-dependent hypertension.*Cellular and Molecular Life Sciences* 68:4,599-612 (2011)
- [5] Gaudet, R.; Savage, J. R.; McLaughlin, J. N.; Willardson, B. M.; Sigler, P. B.: A Molecular Mechanism for the Phosphorylation-Dependent Regulation of Heterotrimeric G Proteins by Phosducin.*Molecular Cell*3:5, 649-660(1999).
- [6] Rezabkova, L.; Kacirova, M.; Sulc, M.; Herman, P.; Vecer, J.; Stepanek, M.; Obsilova, V.; Obsil, T.: Structural Modulation of Phosducin by Phosphorylation and 14-3-3 Protein Binding.*Biophysical Journal*103:9, 1930-1969 (2012).
- [7] Grassi, G.:Phosducin - a candidate gene for stress-dependent hypertension.*The Journal of Clinical Investigation* 119:12.3515-3518 (2009).
- [8] Aitken, A.: 14-3-3 proteins: A historic overview.*Seminars in Cancer Biology* 16:3, 162-167 (2007).
- [9] Obsil, T.; Obsilova, V.: Structural basis of 14-3-3 protein functions.*Seminars in Cell & Developmental Biology* 22:7, 663-672 (2011).
- [10] Freeman, A.K.; Morisson, D.K.: 14-3-3 Proteins: Diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22:7, 681-687 (2011).
- [11] Morales, D.; Skoulakis, E. C. M.; Acevedo, S. F.: 14-3-3sare potential biomarkers for HIV-related neurodegeneration. *Journal of NeuroViorology* 18:5, 341-353 (2012).
- [12] Lakowicz, J.R.:*Principles of Fluorescence Spectroscopy*.Third Edition. Singapur, Springer 2006.

Poděkování:

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali během vypracování mé bakalářské práce. Mé díky patří především Mgr. Miroslavě Kacířové za věnovaný čas a úsilí, cenné rady, korekturu mé práce a za nevídanou ochotu a trpělivost. Dále děkuji svému školiteli, doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. především za velmi užitečné rady, korekturu mé práce a možnost pracovat v příjemném prostředí.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině, za všestrannou podporu během mých studií.