

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Příprava a charakterizace katalytické domény lidské proteinkinasy

ASK1

Preparation and characterization of the catalytic domain of human protein kinase

ASK1

Olívia Petřvalská

Diplomová práce

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

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 18.5.2014

Olívia Petrvalská

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Daliborovi Koškovi, RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. a členům celé laboratoře za jejich vstřícnost a pomoc při řešení všech praktických problémů. Na závěr děkuji své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Proteinkinasa ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1) patří do rodiny mitogeny aktivovaných proteinkinás (tzv. MAP3K) a hraje důležitou roli v imunitních a stresových odpovědích. Vzhledem k souvislosti mezi její zvýšenou aktivitou a rozvojem nemocí jako např. rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, je tato bílkovina perspektivní cíl pro vývoj léčiv. Celý enzym se skládá z 1374 aminokyselinových zbytků (lidská ASK1), ale katalyticky aktivní je pouze Ser/Thr kinasová doména nacházející se přibližně uprostřed molekuly. Aktivita ASK1 je regulována prostřednictvím interakcí s různými proteiny včetně proteinu 14-3-3. Tento protein se váže na fosforylovaný serinový zbytek ASK1 v pozici 966 na C-konci katalytické domény. Tato vazebná interakce má za následek inhibici ASK1 prostřednictvím zatím neznámého mechanismu. Při stresovém signálu, nejčastěji při oxidativním stresu, se ASK1 na Ser966 defosforyluje a protein 14-3-3 disociuje. Rozpad komplexu ASK1:14-3-3 je jedním z dějů, které vedou k aktivaci ASK1.

Cílem této práce byla příprava komplexu katalytické domény ASK1 s proteinem 14-3-3 pro následné studium interakcí těchto dvou proteinů. Oba proteiny byly úspěšně exprimovány v buňkách *E. coli* a purifikovány. Dále byly připraveny i různé mutantní formy obou těchto bílkovin. U připravené katalytické domény ASK1 byla ověřena její proteinkinásová aktivita. Katalytická doména ASK1 byla následně fosforylována proteinkinásou A na Ser966 a výsledek fosforylace byl ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie. Poté byla studována interakce fosforylované katalytické domény ASK1 s proteinem 14-3-3 metodami nativní elektroforézy a analytické ultracentrifugace. Výsledky ukázaly, že fosforylovaná katalytická doména ASK1 tvoří s proteinem 14-3-3 stabilní komplex, který může být použit pro další strukturní studie.

Abstract

Protein kinase ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a member of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) family and plays a crucial role in immune and stress responses. Since the increased activity of ASK1 has been linked to the development of several diseases including cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, this enzyme is a promising target for therapeutical intervention in these pathologies. The molecule of ASK1 consists of 1374 amino acid residues, but catalytic activity possesses only a kinase domain located approximately in the middle of the molecule. The activity of ASK1 is regulated by interactions with various proteins including the 14-3-3 protein. This protein recognizes a phosphorylated motif around Ser966 at the C-terminus of the catalytic domain of ASK1. This binding interaction inhibits ASK1 through unknown mechanism. ASK1 under stress conditions, such as oxidative stress, is dephosphorylated at Ser966 and the 14-3-3 protein dissociates. This dissociation is then one of the factors that lead to the activation of ASK1.

The aim of this diploma thesis was to prepare a complex of the catalytic domain of ASK1 with the 14-3-3 ζ protein for subsequent structural studies. Both proteins were expressed in *E. coli* cells and successfully purified. In addition, several mutant forms of both proteins were prepared as well. The prepared kinase domain was shown to be catalytically active. The catalytic domain of ASK1 was then phosphorylated by protein kinase A at Ser966 and the result of the phosphorylation reaction was verified using mass spectrometry. The interaction between the phosphorylated catalytic domain of ASK1 and the 14-3-3 ζ protein was studied using native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. The results show that the phosphorylated catalytic domain of ASK1 forms a stable complex with the 14-3-3 ζ protein, which can be used for following structural studies.

(In Czech)

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratk	9
1. Přehled literatury.....	11
1.1. Proteinkinasy	11
1.1.1. Role proteinkinas v buňkách.....	11
1.1.2. MAPK kinasové signalizační kaskády.....	12
1.1.2.1. ERK.....	13
1.1.2.2. JNK a p38	14
1.1.2.3. MAP3K	14
1.2. Proteinkinasa ASK1	15
1.2.1. Struktura proteinkinasy ASK1	16
1.2.2. ASK1 v neaktivním stavu	17
1.2.3. ASK1 signalosom při aktivaci	18
1.2.4. ASK1 jako zprostředkovatel patogeneze některých onemocnění.....	20
1.3. Proteiny 14-3-3.....	22
1.3.1. Struktura proteinů 14-3-3.....	22
1.3.2. Biologický význam proteinů 14-3-3	24
2. Cíle práce	26
3. Materiál a metody	27
3.1. Materiál	27
3.1.1. Biologický materiál	27
3.1.2. Chemikálie.....	27
3.2. Přístroje a vybavení.....	28
3.3. Expres a purifikace proteinu 14-3-3ζ.....	30
3.3.1. Volba expresního vektoru.....	30
3.3.2. Příprava buněk pro expresi proteinu 14-3-3ζ	31
3.3.3. Kultivace bakterií	31
3.3.4. Sonikace	32

3.3.5. Niklová chelatační chromatografie.....	33
3.3.6. SDS-PAGE.....	35
3.3.7. Dialýza.....	38
3.3.8. Aniontově výměnná chromatografie	38
3.3.9. Gelová permeační chromatografie.....	39
3.3.10. Stanovení proteinové koncentrace.....	40
3.4. Exprese a purifikace proteinu ASK1-KD	41
3.4.1. Popis použitého vektoru	41
3.4.2. Příprava buněk pro expresi katalytické domény ASK1-KD	41
3.4.3. Kultivace bakterií	42
3.4.4. Sonikace	42
3.4.5. Niklová chelatační chromatografie.....	43
3.4.6. Dialýza a štěpení TEV proteasou	43
3.4.7. Gelová permeační chromatografie.....	44
3.4.8. Fosforylace katalytické domény ASK1 proteinkinasou A	45
3.5. Měření emisních spekter tryptofanových mutantů ASK1-KD.....	45
3.6. Stanovení kinasové aktivity proteinu ASK1-KD	46
3.6.1. Luminiscenční metoda za použití komerční sady ADP-Glo™	46
3.6.1.1. Příprava konverzní křivky	48
3.6.2. Spektroskopická metoda založena na změně koncentrace NADH.....	48
3.7. Studium interakcí mezi proteiny ASK1-KD a 14-3-3ζ.....	50
3.7.1. Ověření fosforylace – hmotnostní spektrometrie.....	50
3.7.2. Nativní elektroforéza	50
3.7.3. Analytická ultracentrifugace.....	51
4. Výsledky	53
4.1. Purifikace proteinu 14-3-3ζ	53
4.1.1. Niklová chelatační chromatografie.....	53
4.1.2. Aniontově výměnná chromatografie	54
4.1.3. Gelová permeační chromatografie.....	55
4.2. Purifikace katalytické domény lidské proteinkinasy ASK1 a jejích mutantů	57
4.2.1. Vývoj purifikačního protokolu ASK1-KD WT	57
4.2.1.1. Příprava ASK1-KD WT podle původního protokolu.....	57
4.2.1.2. Příprava ASK1-KD WT pomocí optimalizovaného protokolu.....	59

4.2.2. Purifikace cysteinových mutantů ASK1-KD.....	63
4.2.3. Purifikace tryptofanových mutantů ASK1-KD.....	64
4.3. Emisní spektra tryptofanových mutantů ASK1-KD	65
4.4. Stanovení kinasové aktivity ASK1-KD	66
4.4.1. Luminiscenční metoda za použití komerční sady ADP-Glo™	67
4.4.2. Spektroskopická metoda založena na změně koncentrace NADH.....	68
4.5. Studium interakcí mezi proteiny 14-3-3ζ a ASK1-KD	69
4.5.1. Ověření fosforylace pomocí hmotnostní spektrometrie	69
4.5.2. Nativní elektroforéza	71
4.5.3. Analytická ultracentrifugace.....	74
5. Diskuse.....	76
6. Závěr	79
Seznam citované literatury	80
Příloha	87

Seznam použitých zkratk

14-3-3 ζ Δ C	mutant proteinu 14-3-3 ζ , zkrácený na C-konci
14-3-3 ζ noW	mutant proteinu 14-3-3 ζ , kde jsou tryptofanové zbytky zaměněny za fenylalaniny
6 \times His-kotva	sekvence 6 histidinových zbytků
β ME	β -merkaptoethanol
ADP	adenosin-5'-difosfát
ASK1	z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1
ASK1-KD	katalytická doména lidské proteinkinasy ASK1
ASK1-KD pSer966	katalytická doména ASK1 fosforylovaná proteinkinase A na serinovém zbytku v pozici 966
ASK1-KD autoP	katalytická doména ASK1 fosforylovaná na všech autofosforylačních místech
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosin-5'-trifosfát
CCC	C-koncová coiled-coil doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4- dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina tetraethylenadiaminoctová
ER	endoplasmatické retikulum
ERK	z angl. extracellular signal-regulated kinase
FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
JNK	z angl. c-Jun N-terminal kinase
KD	katalytická doména
LB	Luria-Bertani
LPS	lipopolysacharid
MBP	myelinový bazický protein
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkinasa
MAP2K	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa

MAP3K	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
NADH	β -nikotinaminadenindinukleotid (redukovaný)
NCC	N-koncová coiled-coil doména
ot./min	otáčky za minutu
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PKA	proteinkinasa A
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RLU	relativní luminiscenční jednotka
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SDS	dodecylsírán sodný
TB	z angl. terrific broth
TEMED	N,N,N',N'-tetraethylendiamin
TEV	virus tabákové mozaiky (z angl. tobacco etch virus)
TNF- α	z angl. tumor necrosis factor α
TRAF	faktor asociovaný s TNF-receptorem
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trx	thioredoxin
WT	přirozený typ (z angl. wild type)

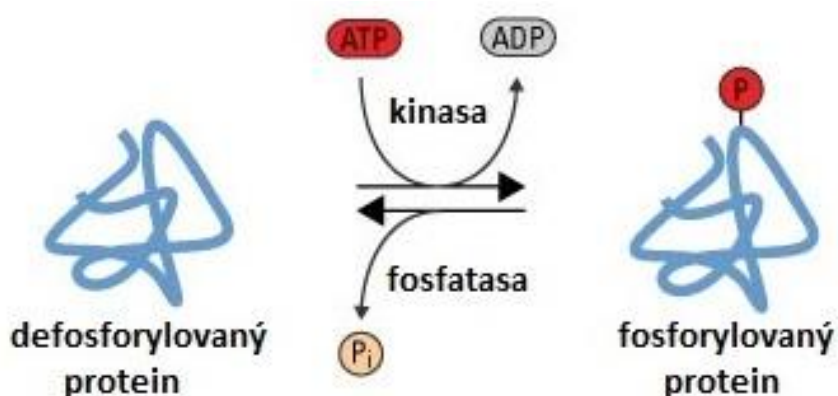
1. Přehled literatury

1.1. Proteinkinasy

Kinasy jsou enzymy třídy transferas. Přenášejí fosfátovou skupinu z makroergické sloučeniny, nejčastěji ATP, na molekulu substrátu, za vzniku fosforylovaného produktu v procesu zvaném fosforylace (Obr. 1.1).

Proteinkinasy patří do skupiny kinas fosforylujících proteiny. Fosforylace proteinu probíhá v místě, kde se vyskytuje hydroxylová skupina, tedy na bočních řetězcích aminokyselin serinu, treoninu nebo tyrosinu, za vzniku fosfoesterové vazby. Proteinkinasy dle typu fosforylované aminokyseliny v sekvenci proteinu rozdělujeme na serin/threonin kiny a tyrosinkinasy.

Obrácenou reakcí k fosforylaci je defosforylace, která je katalyzována skupinou enzymů nazývaných fosfatasy.



Obr. 1.1 Fosforylace a defosforylace proteinového substrátu. Fosforylace je katalyzována kinasami a vyžaduje donor fosfátové skupiny jako druhý substrát. Defosforylaci katalyzují fosfatasy, reakce je samovolná. ATP – adenosintrifosfát, ADP – adenosindifosfát, P – fosfátová skupina, P_i – anorganický fosfát. Upraveno dle [1].

1.1.1. Role proteinkinasy v buňkách

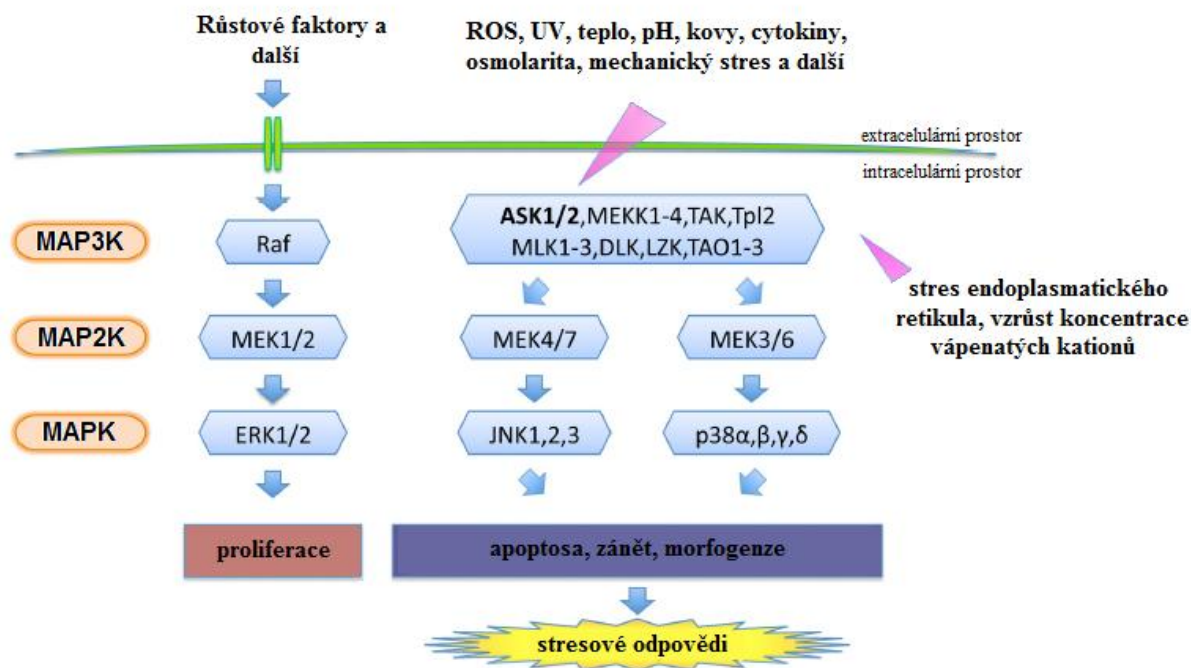
Uvnitř buněk je fosfátová skupina deprotonizovaná. Navázání této záporně nabitě a objemné skupiny na protein má často za následek změnu konformace proteinu a tím i jeho funkce. Změna fosforylačního stavu proteinů nezdědka slouží jako přepínač mezi aktivní a

neaktivní (či jinak aktivní) formou proteinu. Kinasy i fosfatasy se proto účastní mnoha signalizačních kaskád.

1.1.2. MAPK kinasové signalizační kaskády

Buňky jsou neustále vystavovány různým typům stresu vnějšího či vnitřního prostředí jako např. oxidativní stres, ozáření γ -paprsky, UV záření, stres endoplasmatického retikula (ER stres) a infekce. Adekvátní buněčná odpověď na tyto stresové podněty je důležitá pro udržení homeostasy. Aerobní organismy jsou vystavovány reaktivním formám kyslíku (ROS – z angl. reactive oxygen species) nepřetržitě. Nadměrná produkce ROS může způsobit poškození buňky, což později může mít za následek zvýšení rizika onemocnění nebo urychlené stárnutí [2]. Nedávné studie odhalily, že ROS mají také signalizační funkci jako druzí poslové, kteří modifikují další signalizační molekuly a účastní se tak signalizačních kaskád [3].

Mitogeny aktivované proteinkinasové (MAPK) signalizační kaskády jsou evolučně konzervované ve všech eukaryotických buňkách a regulují různé buněčné funkce jako např. proliferaci, diferenciaci a programovanou buněčnou smrt - apoptosu. Všechny eukaryotické buňky mají více MAPK kaskád. Jsou považovány za klíčové mezi hlavními signalizačními kaskádami, které regulují buněčné odpovědi na stres. Mechanismy, kterými buňky cítí stres a transformují tuto informaci do buněčných signálů, jsou zatím málo prostudované. Každá MAPK kaskáda se skládá ze třech tříd proteinkinas: mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa (MAP3K), mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa (MAP2K) a mitogeny aktivovaná proteinkinasa (MAPK). MAP3K aktivuje MAP2K prostřednictvím fosforylace, aktivovaná MAP2K poté fosforyluje a tím aktivuje MAPK (Obr. 1.2, str. 13) [4]. JNK (z angl. c-Jun N-terminal kinase), p38 a ERK (z angl. extracellular signal-regulated kinase) jsou dobře charakterizované podskupiny velké MAPK rodiny. Aktivují se při odpovědi na změnu vnitrobuněčného redoxního potenciálu a přispívají tak k volbě mezi buněčnou smrtí nebo přežitím [5].



Obr. 1.2 Savčí MAPK kinasové signalizační kaskády. Existuje alespoň 20 MAP3K kinas u obratlovců, které selektivně fosforylují a aktivují MAP2K kinas, což vede ke specifické aktivaci MAPK kinas. Jednotlivé kaskády odpovídají různým typům vnějších signálů. Rodina ASK aktivuje JNK a p38 signalizační kaskády, ale ne ERK kaskády. Upraveno dle [6].

1.1.2.1.ERK

ERK signalizační kaskáda je nejčastěji spojována s regulací buněčné proliferace. ERK1 a ERK2 jsou především aktivovány růstovými faktory a cytokiny prostřednictvím tyrosinkinasových receptorů [4].

ERK1 a ERK2 fosforylují, čímž také aktivují různé transkripční faktory a další proteinkinasy. Tímto způsobem ovlivňují velkou škálu buněčných procesů, jako jsou přežití, diferenciace a regulace buněčného cyklu. Oxidativní stres také může vést k následné aktivaci kinas ERK1/2 a receptory pro růstové faktory hrají v tomto procesu významnou roli. Aktivace kaskády receptory pro růstové faktory-ERK1/2 vyvolaná oxidativním stresem je ve shodě s pozorováním, že určitá nízká hodnota koncentrace ROS spouští mitosu [7]. ERK1/2 mohou obecně plnit funkci anti-apoptotických faktorů nebo faktorů zprostředkujících přežití po zranění způsobeném oxidativním stresem [8].

1.1.2.2. JNK a p38

JNK a p38, tzv. stresem aktivované MAPK kinasy, jsou regulovány stresem vnějšího prostředí a prozánětlivými cytokiny jako interleukin-1 β a TNF- α (z ang. tumor necrosis factor α). Proteinkinasa JNK je schopná aktivace při kontaktu s různými oxidačními činidly, jako jsou peroxid vodíku, arsenitany, chlorid kademnatý a UV-B záření [8-10]. Kaskáda zahrnující proteinkinasu p38 je také aktivována různými typy oxidativního stresu jako např. přítomnost oxidačních činidel aktivujících JNK nebo také dalšími stresy vnějšího prostředí jako osmotický šok, tepelný šok a přítomnost lipopolysacharidových molekul (LPS) [11,12]. Specifické inhibitory JNK a p38 kaskád nebo exprese neaktivních mutantů JNK a p38 jsou schopny potlačit apoptosu vyvolanou různými druhy stresu [13]. Nedávno získaná data nabízí možná vysvětlení, jakým způsobem mohou být spojeny stresem aktivované MAPK kinasy s ROS. Antioxidanty nebo zvýšená exprese antioxidantních enzymů jako glutathion S-transferasa Pi mohou zablokovat nebo zpozdit apoptosu. Glutathion S-transferasa Pi interaguje s JNK, a tím tlumí její aktivitu. Přítomnost ROS způsobuje disociaci JNK od glutathion S-transferasy Pi a tak je umožněna aktivace JNK [14]. Proteiny teplotního šoku (Hsp) jsou exprimovány při oxidativním poškození buňky a chrání poškozené proteiny před nesprávným sbalením do své nativní struktury nebo před jejich agregací. Protein Hsp70 inhibuje aktivitu JNK, a tudíž také apoptosu zprostředkovanou JNK [15]. I když mechanismy, kterými JNK a p38 kaskády regulují apoptosu vyvolanou oxidativním stresem, nebyly dosud jasně pochopeny, dlouhodobá aktivace JNK a p38 pravděpodobně hraje roli při spouštění apoptosy. Míra a trvání aktivace JNK a p38 pravděpodobně přispívá k rozhodnutí o osudu buňky [16]. Dosud je obecně přijímána myšlenka, že ERK a JNK/p38 mají vzájemně protichůdné funkce. Nedávné studie však také předpokládají, že aktiva JNK a p38 kinas také hraje roli při přežití buňky a diferenciaci. Celková rovnováha mezi intenzitou a trváním aktivace několika MAPK je faktorem rozhodujícím o dalším osudu buňky [17]. Modifikací MAPK signalizačních kaskád prostřednictvím ROS vzniká velké množství různých biologických odpovědí.

1.1.2.3. MAP3K

MAP3K kinasy jsou důležité molekuly, které cítí první signály v stresových signalizačních kaskádách. MAP3K jsou schopny aktivovat víc MAPK kaskád nebo jednu kaskádu trvající různé doby. MAP3K kinasy jsou schopny detekovat stupeň buněčného poškození vyvolaného stresem v té nejvyšší úrovni vnitrobuněčné signalizační kaskády a

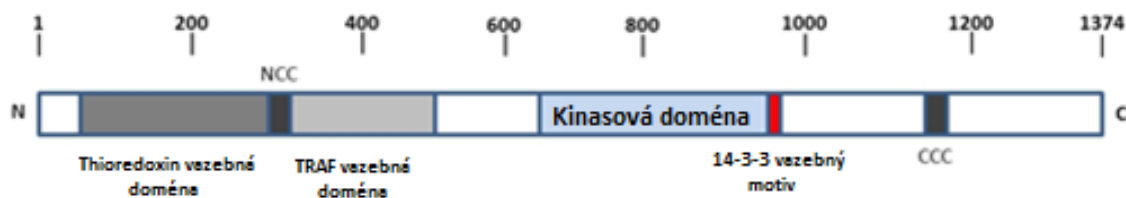
určují tak osud buňky regulací MAPK kaskád. Na konci těchto kaskád, MAPK kinasy mohou fosforylovat různé substráty - efekторы odpovědi indukovaných stresem [18].

1.2. Proteinkinasa ASK1

Proteinkinasa ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1), neboli MAP3K5 (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5) hraje důležitou roli v signalizaci uvnitř buněk za stresových podmínek nebo v případě imunitní odpovědi [19]. ASK1 je členem MAP3K rodiny schopná aktivovat signalizační kaskády MAPKK4 (MKK4)-JNK a MKK3/6-p38, ale ne MAP/ERK kaskády (Obr. 1.2, str. 13) [20].

Lidská proteinkinasa ASK1 je polypeptid o délce 1374 aminokyselin, skládající se z centrální serin/threoninové katalytické domény (KD) a coiled-coil domén na N- (NCC) a C-koncích (CCC) (Obr. 1.3) [21]. Ortologní sekvence savčích ASK1 byly nalezeny u bezobratlých živočichů *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*, označovány jako DASK1 a NSY-1, což znamená, že ASK1-MAPK signalizační kaskády jsou evolučně konzervované mezi druhy [22, 23, 24].

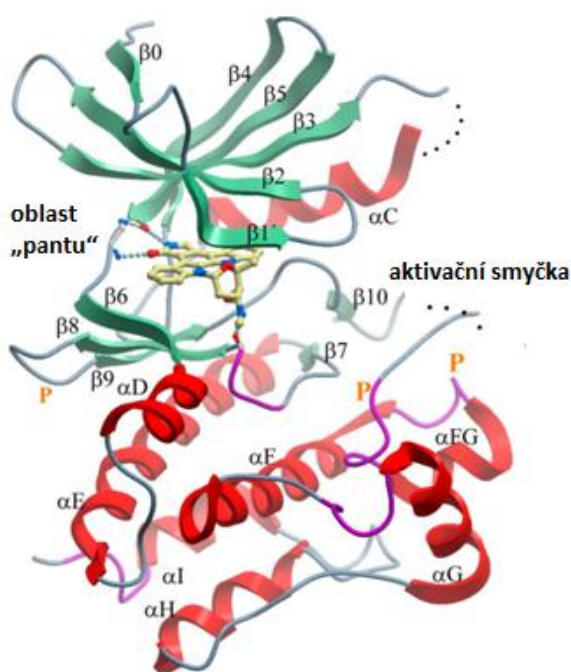
Proteinkinasa ASK1 může být aktivována různými podněty, jako například přítomností lipopolysacharidových molekul (LPS), oxidativním stresem, ER stresem, zvýšením koncentrace vápenatých kationtů [20], přítomností cytokinů (např. TNF- α), přítomností Fas ligandu [25] a přítomností agonistů GPCR (receptory spřažené s G proteiny) [26]. ASK1 funguje jako detektor pro ROS a hraje hlavní roli v signalizaci při udržení redoxní rovnováhy. Proto její přílišná aktivace, případně porucha v její regulační funkci je spojována s množstvím různých nemocí. Zvýšená exprese ASK1 může vyvolat apoptosu, ale podle buněčného kontextu může také podporovat diferenciaci nebo přežití [27].



Obr. 1.3 Doménová architektura lidské proteinkinasy ASK1. V horní části jsou vyznačena čísla odpovídající pořadovému číslu aminokyselin v sekvenci proteinu. N – N-konec proteinu, NCC- N-koncová coiled-coil doména, CCC- C-koncová coiled-coil doména, C – C-konec proteinu. Jednotlivé domény byly v proteinové sekvenci umístěny dle [21] a [28].

1.2.1. Struktura proteinkinasy ASK1

Doposud byla vykrystalizována pouze katalytická doména ASK1 (sekvence 670-940) v komplexu s univerzálním kinasovým inhibitorem – staurosporinem. (Obr. 1.4). Struktura této katalytické domény obsahuje dva laloky. Malý lalok je tvořen pěti vlákny ve struktuře β -skládaného listu a jedním α -helixem (α C). Velký lalok obsahuje vlákna převážně ve struktuře α -helixu. Oblast „pantu“ spojující tyto dvě domény lemují aktivní místo, kam se váže ATP. Aminokyseliny, které se vyskytují ve smyčkových oblastech na začátku helixu α C (Asp715-Ser719) a na aktivační smyčce (Gly831- Glu837), nejsou viditelné v mapě elektronové hustoty, jedná se o nestrukturované úseky. N-konec je tvořen krátkým vláknem β_0 , které je připojeno k vláknu β_1 neobyčejně velkou smyčkou (675-684). Tato velká smyčka může mít funkci při regulaci vazby ATP do aktivního místa, poněvadž určuje pozici smyčky, která váže fosfátový zbytek. N-koncové vlákno β_0 roztahuje síť antiparalelních vláken v menším laloku, čímž pravděpodobně dodává stabilitu této doméně [29].



Obr. 1.4 Krystalová struktura katalytické domény ASK1 (aminokyseliny 670-940) ve stuhové reprezentaci v komplexu se staurosporinem, univerzálním inhibitorem kinas (tyčinková reprezentace). Jednotlivé elementy sekundární struktury jsou odlišeny barevně: červená – α -helix, zelená – β -skládaný list, purpurová - 3_{10} helix, modrá – flexibilní smyčky. Nestrukturované úseky jsou vyznačeny tečkami a žlutými P jsou vyznačena autofosforylační místa. Upraveno dle [29].

Bylo zjištěno, že katalytická doména proteinkinasy ASK1 v roztoku tvoří dimer (Obr. 5.1, str. 78). Interakce mezi monomery je primárně založena na tvarové komplementaritě napříč celým interakčním povrchem rozprostírajícím se téměř po celé délce monomeru. Jednotlivé monomery jsou vzájemně asociovány v orientaci hlava-pata, kde N-koncová doména jednoho monomeru interaguje s C-koncovou doménou druhého monomeru a naopak. Dvě aktivní místa se nachází na stejné straně blízko ekvatoriální roviny dimeru a jsou vzdáleny od sebe přibližně 20 Å [29].

Monomer katalytické domény ASK1 obsahuje alespoň tři autofosforylační místa, které se samovolně fosforylují při inkubaci této domény s ATP a hořčičnými kationty. První autofosforylační místo, Thr813, je umístěno ve smyčce mezi vlákny $\beta 8$ a $\beta 9$. I když se tento zbytek nachází poměrně daleko od aktivního místa enzymu, může mít vliv na dynamiku laloků a tím nepřímo ovlivňovat katalýzu. Dalším autofosforylačním místem je Thr838, který je umístěn na aktivační smyčce. Bylo zjištěno, že toto místo hraje podstatnou roli při aktivaci ASK1 vyvolané oxidativním stresem [21]. Třetím autofosforylačním místem je Thr842 [29].

1.2.2. ASK1 signalosom v neaktivním stavu

Proteinkinasa ASK1 v neaktivním stavu tvoří komplex o vysoké molekulové hmotnosti (>1500 kDa), který je důležitý pro její aktivaci. Uvnitř tohoto komplexu je ASK1 homooligomerizovaná prostřednictvím CCC domény. Mutant zkrácen o C-koncovou část tvoří komplexy s nižší molekulovou hmotností (~ 500 kDa) s nedetekovatelnou aktivitou. Tento komplex byl označen jako ASK1 signalosom, vzhledem k tomu, že kromě samotných ASK1 molekul obsahuje také regulační proteiny [30].

Protein thioredoxin (Trx) je jedním z negativních regulátorů ASK1, který odpovídá na změnu redoxního potenciálu prostředí. Ve svém aktivním centru obsahuje dvě cysteinové skupiny a pouze jeho redukováná forma je asociována s regulační doménou ASK1. Aktivitu ASK1 inhibuje přímou vazbou na NCC doménu molekuly ASK1 tím, že brání homofilní interakci dvou molekul ASK1 prostřednictvím NCC domén [28]. Předpokládá se, že oxidativní stres vede k vytvoření disulfidického můstku v molekule Trx a k její disociaci od ASK1, což vyvolá konformační změnu v ASK1 dimeru. ASK1 se poté zdá být pevně oligomerizovaná prostřednictvím NCC domén, navíc k basální interakci CCC domén. To posléze vede k fosforylaci Thr838 na aktivačním segmentu ASK1 autofosforylací nebo transfosforylací doposud neidentifikovanou kinasou [21]. Komplex ASK1:Trx slouží jako redoxní senzor, který převádí redoxní stav uvnitř buňky v buněčnou signalizaci [31].

14-3-3 proteiny, další negativní regulační molekuly, se vážou na ASK1 prostřednictvím 14-3-3 vazebného motivu zahrnujícího Ser966 v molekule ASK1 za podmínky, že je tento serinový zbytek fosforylovaný. Tyto proteiny přispívají k potlačení katalytické aktivity ASK1 v nestresových podmínkách. Mutant ASK1 Ser966Ala, který není schopen vázat 14-3-3 proteiny, vykazuje vyšší katalytickou aktivitu než přirozený typ (WT) ASK1 a nadměrná exprese ASK1 Ser966Ala zvýšila počet buněčných smrtí, relativně v porovnání s nadměrnou expresí ASK1 WT bez jakékoliv stimulace v pěstovaných buňkách [25]. Defosforylace ASK1 na Ser966 je způsobena např. přítomností peroxidu vodíku a disociace proteinu 14-3-3 od proteinkinasy ASK1 koreluje s její defosforylací. Tato disociace vede k aktivaci ASK1 [32].

PP2A je fosfatasa pravděpodobně zodpovědná za defosforylaci ASK1 na Ser966, která je spuštěna stimulací cytosinem TNF- α v cévních endoteliálních buňkách. Za klidových podmínek, PP2A tvoří komplex s ASK1-interagujícím proteinem 1 (AIP1). Serin/threonin proteinkinasa receptor-interagující protein (RIP1) fosforyluje AIP 1 při stimulaci buněk TNF- α . AIP 1 se poté naváže na molekulu ASK1 společně s PP2A. ASK1 pSer966 je po tomto navázání defosforylována fosfatasou PP2A, což vede k disociaci proteinu 14-3-3 od ASK1, což má za následek aktivaci ASK1 [33].

1.2.3. ASK1 signalosom při aktivaci

Aktivace proteinkinasy ASK1 je přísně regulována fosforylací threoninového zbytku, který se vyskytuje na aktivační smyčce v katalytické doméně (Thr838 u lidské ASK1). Aktivita mutantu Thr838Ala je silně redukována působením peroxidu vodíku, což poukazuje na důležitost fosforylace tohoto místa pro aktivaci proteinkinasy ASK1 [21].

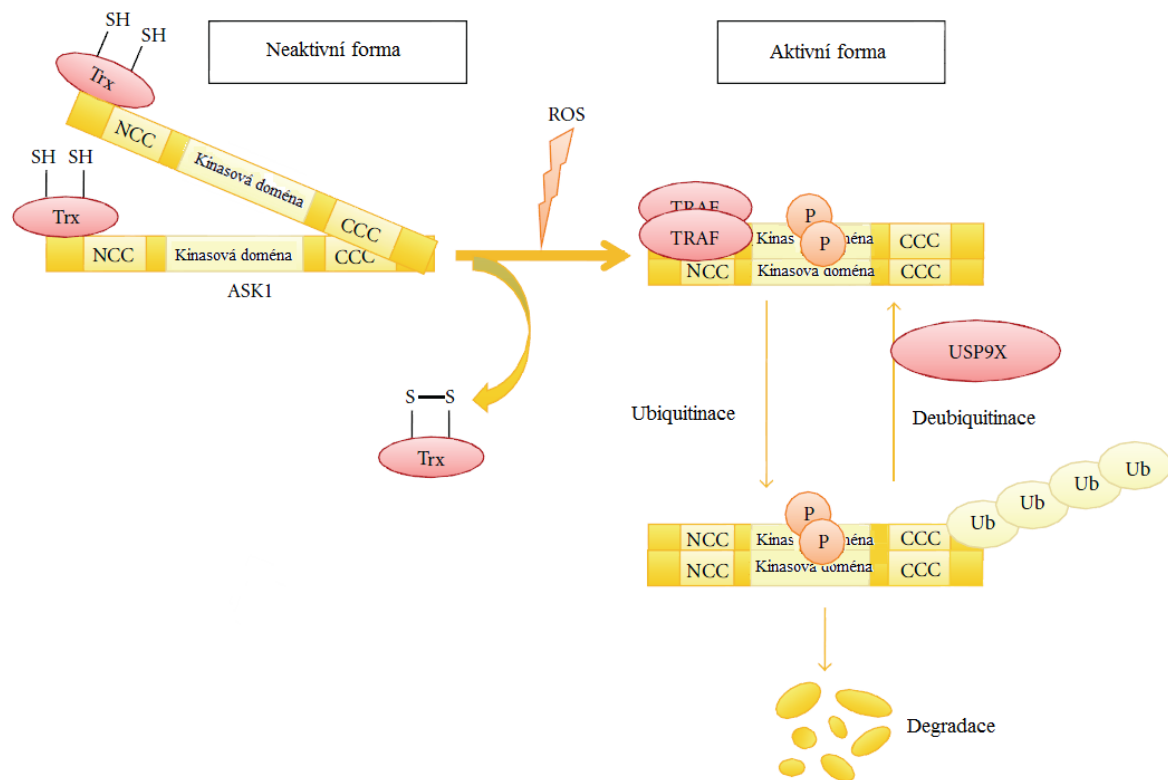
Po indukci reaktivními kyslíkovými intermediáty se tvoří komplex o vyšší molekulové hmotnosti (> 3000 kDa) jako ten klidový, i když Trx disociuje od molekuly ASK1, čímž ASK1 signalosom přichází o své členy [30]. Důvodem jsou další faktory, které jsou připojeny k signalosomu při aktivaci ASK1, jako např. faktor asociovaný s TNF-receptorem 2 (TRAF2), faktor asociovaný s TNF-receptorem 6 (TRAF6), protein serin/threoninová fosfatasa 5 (PP5) a deubiquitinační enzym USP9X (Obr. 1.5, str. 20) [30, 34, 35]. TRAF2 a TRAF6 jsou asociovány specificky s ASK1 signalosomem v případě přítomnosti ROS. TRAF2 a TRAF6 hrají důležitou roli v pozitivní regulaci aktivity ASK1 prostřednictvím různých podnětů jako např. TNF- α , ER stres a přítomnost LPS [36, 37, 38]. U TRAF2 a TRAF6-deficientních myších embryonálních fibroblastech byla aktivace ASK1 vyvolaná

tvorbou ROS silně potlačena, což nasvědčuje tomu, že TRAF2 a TRAF6 hrají klíčovou roli v aktivaci ASK1 vyvolané tvorbou ROS. Tato pozorování naznačují, že po disociaci Trx od ASK1 molekuly vyvolané ROS, proteiny TRAF2 a TRAF6 asociují s ASK1 a stabilizují homofilní interakci ASK1 molekul prostřednictvím NCC domén, což vede k plné aktivaci ASK1 signalosomu [28].

Proteinkinasa ASK2, nedávno charakterizovaný člen ASK rodiny je také vazebným partnerem ASK1 [39]. ASK2 je vysoce sekvenčně příbuzná s ASK1, hlavně v katalytické doméně a tvoří stabilní heteromerní komplex s ASK1. V nepřítomnosti ASK2, je aktivace JNK vyvolaná peroxidem vodíku evidentně snížena, což znamená, že ASK2 je nově objevenou složkou ASK1 signalosomu, a že ASK1:ASK2 komplex může hrát důležitou roli v regulaci signalizační kaskády odpovídající na oxidativní stres [39, 40]. ASK2 je exprimována pouze ve tkáních, které jsou vystaveny přímému vnějšímu prostředí jako např. kůže, plíce nebo gastrointestinální trakt [41].

Deubiquitinační enzym USP9X se taky váže na ASK1 signalosom při odpovědi na oxidativní stres. Aktivace proteinkinasy ASK1 vyvolaná přítomností ROS má za následek ubiquitinaci a poté degradaci ASK1 zprostředkované proteasomem. Takže USP9X pozitivně reguluje aktivitu ASK1, a tedy i buněčnou smrt vyvolanou dlouhodobou aktivací této proteinkinasy, prostřednictvím její deubiquitinace a stabilizace (Obr. 1.5, str. 20) Aktivita ASK1 je tedy regulována jak autofosforylací tak ubiquitinací v odpovědi na oxidativní stres [35].

Protein serin/threoninová fosfatasa 5 (PP5) je dalším negativním regulátorem proteinkinasy ASK1. PP5 defosforyluje ASK1 na aktivačním autofosforylačním místě způsobem závislým na přítomnosti ROS, čímž negativně reguluje aktivitu ASK1 [34]. Tímto mechanismem je umožněna negativní zpětná vazba.



Obr. 1.5 Mechanismus aktivace proteinkinasy ASK1 vyvolané ROS. Thioredoxin (Trx), negativní regulátor ASK1 disociuje od její N-koncové části jako odpověď na oxidativní stres. Následně se ke komplexu připojí proteiny TRAF2 a TRAF6, které ASK1 plně aktivují. Aktivace ASK1 vyvolaná ROS vyústí do ubiquitinace a proteinové degradace zprostředkované proteasomem. USP9X negativně reguluje degradaci ASK1 deubiquitinací, což vede k dlouhodobé aktivaci ASK1. CCC: C-koncová coiled-coil doména; NCC: N-koncová coiled-coil doména, Ub- ubiquitin, P- fosfátový zbytek. Upraveno dle [42].

1.2.4. ASK1 jako zprostředkovatel patogeneze některých onemocnění

Proteinkinasa ASK1 je důležitá pro přirozenou imunitu savců, protože odpovídá na biologické stresy jako bakteriální a virové infekce a způsobuje zánět. Bakteriální molekuly jako LPS jsou rozpoznány receptory TLR (z ang. toll-like receptor) a aktivují MAPK signalizační kaskády. ASK1-deficientní myši se ukázaly být odolné vůči septickému šoku vyvolanému LPS [36]. V buňkách sleziny a dendritických buňkách odvozených od ASK1-deficientních myši byla aktivace p38 snížena stejně jako produkce prozánětlivých cytokinů. Bylo zjištěno, že aktivace dráhy ASK1-p38 prostřednictvím TLR v gliových buňkách je

klíčová pro produkci chemokinů v astrocytech, čímž je způsoben zánět a neurotoxicita při roztroušené sklerose [43].

Akumulace ROS je podstatná pro iniciaci a promoci v karcinogenezi [44]. ASK1 může vzhledem k typu buňky a vzhledem k buněčnému kontextu fungovat jako faktor podporující promoci a také jako tumorový supresor prostřednictvím indukce různých odpovědí jako apoptosa, zánět nebo proliferace. ASK1 se účastní procesu, který spouští apoptosu, což je důležitým tumor supresorovým mechanismem, ale také se účastní signalizace při tvorbě prozánětlivých cytokinů [36], což má efekt opačný. Nedávno bylo zjištěno, že ASK1 hraje důležitou roli při rozvoji rakoviny kůže [41]. Aktivace ASK1-p38 kaskády prostřednictvím ROS vede k produkci prozánětlivých cytokinů jako TNF- α , IL-6, and IL-1 β v dendritických buňkách a makrofázích [36] a produkce prozánětlivých cytokinů za účasti ASK1 byla označena jako kritická pro rakovinné bujení v průběhu promoce. V tomto případě ASK1 vystupuje jako faktor podporující rozvoj rakoviny kůže. Pokud ASK1 účinkuje společně s ASK2 v průběhu iniciační fáze rakoviny kůže, ASK1 přispívá k indukci apoptosy vyvolané přítomností ROS v epidermálních keratinocytech. ASK2 aktivuje ASK1 přímou fosforylací. Protože komplex ASK1:ASK2 působí jako tumor supresor, míra exprese ASK2 v buňkách uděluje roli ASK1, a to jako faktor buď podporující karcinogenezi nebo faktor způsobující její potlačení. Ukázalo se, že v různých lidských gastrointestinálních tumorových buňkách a tkáních byla snížena exprese ASK2 v porovnání se zdravými buňkami [40]. Nepřítomnost ASK2 v keratinocytech podporuje rakovinu kůže vyvolanou chemicky prostřednictvím snížení míry apoptotické smrti buněk s poškozenou DNA v průběhu iniciační fáze.

Alzheimerova nemoc, jedno z neurodegenerativních onemocnění, je charakterizována dvěma patologickými nálezy: hromadění amyloidů β a vytvoření neurofibrilárních klubek. Bylo zjištěno, že amyloidy β narušují mitochondriální redoxní aktivitu, čímž se zvyšuje tvorba ROS, což vede k apoptose neuronů zprostředkované ASK1-JNK kaskádou [45]. U ASK1-deficientních myší byla pozorována snížená smrt neuronů způsobená přítomností amyloidu β . Nedávno bylo také zjištěno, že dopaminergická smrt neuronů zprostředkovaná ASK1 je hlavní příčinou Parkinsonovy nemoci [46].

V mnoha kardiovaskulárních nemocech jako hypertenze, infarkt myokardu nebo diabetická kardiomyopatie se jednotlivé kardiomyocyty zvětšují, aby vykompenzovaly srdeční funkce a poškozenou srdeční tkáň v jevu nazývaném srdeční hypertrofie. I když je srdeční hypertrofie adaptivní odpovědí na počáteční změny u kardiovaskulárních onemocnění, dlouhodobá hypertrofie může způsobit zánik srdeční tkáně. Hypertrofie levé srdeční komory

je charakterizována akumulací proteinů extracelulární matrix, která hraje klíčovou roli v komorové fibrozy tkáně. ASK1 je silně spjata s kardiovaskulárními nemocemi. Bylo zjištěno, že v levé srdeční komoře je ASK1 aktivována tvorbou ROS, která byla vyvolána angiotensinem-II (Ang II) prostřednictvím Ang II receptoru typu I (AT1), což mělo za následek srdeční hypertorfii a fibrosu tkáně [47].

1.3. Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou rodina kyselých proteinů s regulační funkcí, které jsou exprimovány ve všech eukaryotických buňkách. Proteiny 14-3-3 fungují jako molekulární lešení, mění konformaci jejich vazebných partnerů [48]. Kvůli schopnosti funkční modulace široké škály vazebných partnerů jsou proteiny 14-3-3 zapojeny do mnoha důležitých biologických procesů, zahrnujících regulaci buněčného cyklu, kontrolu metabolických dějů, apoptosu a kontrolu genové transkripce [49].

Jejich zvláštní pojmenování odráží jejich charakteristický migrační obraz na dvourozměrné DEAE-celulosové chromatografii a na škrobové elektroforéze [50].

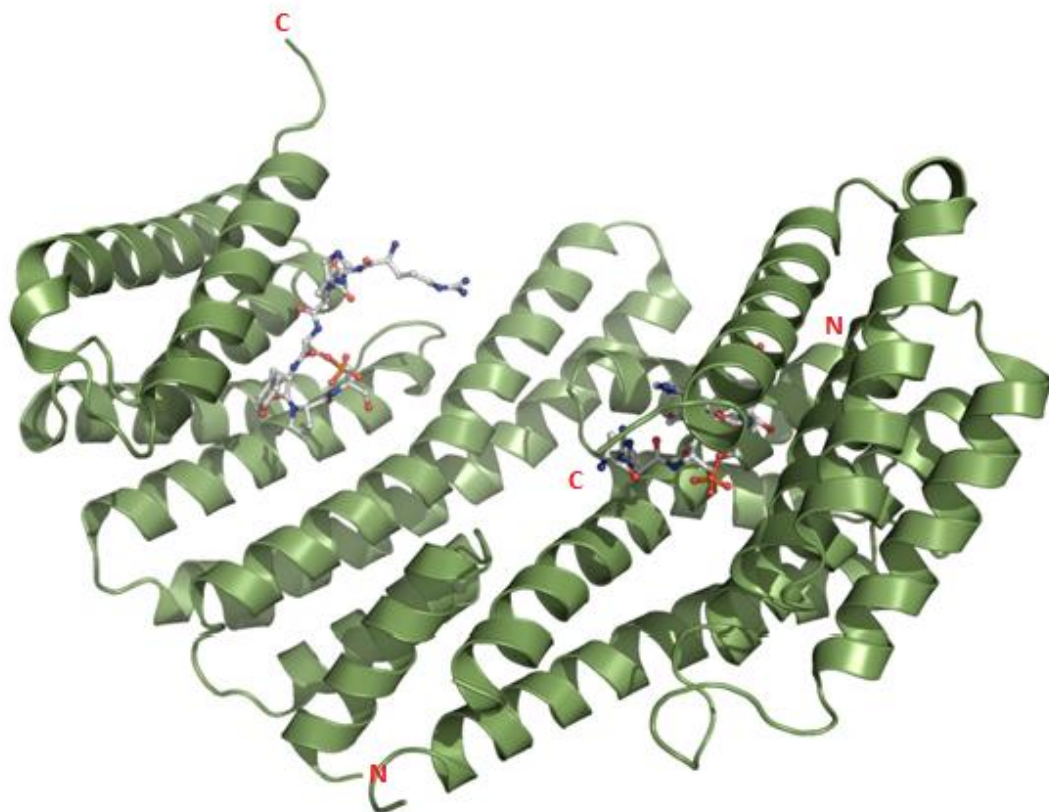
Proteiny 14-3-3 jsou evolučně vysoce konzervované v rámci obrovské palety eukaryotických organismů a mnoho z nich exprimuje více isoform. Nižší eukaryota, jako například kvasinky, obsahují ve svém genomu pouze dvě isoformy. Vyšší eukaryota mohou obsahovat až 15 genů proteinů 14-3-3 [51]. Savce mají ve svém genomu 7 isoform: β , ε , η , γ , τ , ζ a σ , které mají vysokou vzájemnou homologii [52]. S výjimkou savčí σ -isoformy, všechny 14-3-3 proteiny mohou tvořit jak homodimery tak heterodimery (σ -isoforma tvoří preferenčně homodimer) [53].

1.3.1. Struktura proteinů 14-3-3

První strukturální studie lidského proteinu 14-3-3 ζ [54] potvrdily dimerní povahu 14-3-3 proteinů a odhalily, že každý monomer se skládá z 9 antiparalelních α -helixů. Obrovský 35 Å dlouhý, 35 Å široký a 20 Å hluboký kanál, umístěn v centru 14-3-3 dimeru ve tvaru šálku, obsahuje dva amfipatické žlábkové vazby pro vazbu ligandů. Celá molekula dimeru 14-3-3 je silně rigidní, pravděpodobně v důsledku silných interakcí mezi helixy. Aminokyselinové zbytky, jež jsou neměnné, stejné mezi isoformami se vyskytují na rozhraní dimeru a také vystylají vnitřní povrch dimeru. Více variabilní aminokyselinové zbytky jsou umístěny na vnějším

povrchu. Nejflexibilnější oblast s maximální variabilitou mezi jednotlivými isoformami mezi proteiny 14-3-3 je C-koncový segment dlouhý přibližně 15-40 aminokyselinových zbytků. Je to nestrukturovaná oblast, neviditelná na mapě elektronové hustoty. Mutant 14-3-3 ζ zkrácený na C-konci (14-3-3 ζ Δ C) vykazuje zvýšenou vazebnou afinitu k některým testovaným ligandům [55]. Jedno z možných vysvětlení pro tento jev je, že nestrukturovaný C-konec potlačuje nescifické interakce mezi proteiny 14-3-3 a nevhodnými ligandy. V některých isoformách proteinu 14-3-3 tento C-konec tvoří desátý helix, který reguluje přístup vazebných partnerů do centrálního kanálu [56]. Detailní analýza interakcí mezi proteiny 14-3-3 a jejich partnery za použití orientovaného screeningu peptidové knihovny odhalila, že pro proteiny 14-3-3 jsou optimální následující vazebné motivy: Arg-Ser-Xaa-pSer-Xaa-Pro (mód I) a Arg-Xaa-Tyr/Phe-Xaa-pSer-Xaa-Pro (mód II) (Xaa značí jakoukoliv aminokyselinu kromě cysteinu) [57].

Krystalová struktura dimeru 14-3-3 v komplexu s fosfopeptidy ukazuje, že segmenty obsahující pSer/pThr jsou vázány uvnitř amfipatických žlábků na obou okrajích centrálního kanálu dimeru 14-3-3 a mají roztaženou konformaci hlavního řetězce (Obr. 1.6, str. 24). Fosfátová skupina fosfoserinu (resp. fosfothreoninu) je koordinovaná solnými můstky na vedlejší řetězce Arg56, Arg127, a Lys49 a vodíkovou vazbou na Tyr128. Prolinový zbytek ve fosfopeptidu zaujímá *cis*-konformaci, čímž vytváří ostrou změnu směru hlavního řetězce a tím umožňuje zbytku fosfopeptidu opustit vazebnou jámu [58].



Obr. 1.6 Krystalová struktura dimeru 14-3-3ζ ve stuhové reprezentaci s navázaným fosfopeptidem sekvence ARSHpSYPA (tyčinková reprezentace) ve vazebných žlábkách dimeru. C - C-konec monomeru 14-3-3ζ, N – N-konec monomeru 14-3-3ζ [58].

1.3.2. Biologický význam proteinů 14-3-3

Zjištění, že proteiny 14-3-3 specificky vážou fosfoserin nebo fosfothreonin obsahující motivy u proteinových molekul ne jenom značí jejich krajnou důležitost v regulaci signalizačních drah, ale také ukazuje na roli serinové/threoninové fosforylace při shlukování proteinu do komplexů.

Je jasné, že dimerní povaha proteinů 14-3-3 s jejich dvěma žlábkami pro vazbu ligandu umístěnými vzájemně antiparalelně je velice důležitá pro jejich funkci. Mnoho vazebných partnerů proteinů 14-3-3 obsahuje víc než jenom jeden vazebný motiv pro 14-3-3 a přítomnost dvou vazebných žlábků uvnitř dimeru 14-3-3 umožňuje současné navázání dvou fosforylovaných motivů, a tedy efektivnější vazbu ligandu [59]. Syntetický peptid obsahující dva vazebné motivy pro protein 14-3-3 se váže s několikanásobně vyšší afinitou než peptid obsahující pouze jeden fosforylovaný motiv [60]. To vedlo k hypotéze, že jeden z vazebných

motivů slouží jako dominantní vazba, tzv. „gatekeeper“, přítomnost kterého je absolutně nevyhnutná pro vazbu na 14-3-3 protein. Sekundární, nízkoafinitní místo, i když nepostačující k vytvoření stabilní asociace s 14-3-3 v nepřítomnosti „gatekeeper“ motivu, je potom vyžadováno pro plnou biologickou aktivitu [61].

Funkce proteinů 14-3-3 obecně mohou být rozděleny na základě třech módů působení:

- Přímá konformační změna cílové molekuly proteinu

Dimer proteinu 14-3-3 je velice rigidní molekula, takže může díky tomu sloužit jako kovadlina, na které je tvarován cílový protein. Pokud vazebným partnerem je enzym, tato konformační změna může ovlivnit jeho enzymatické vlastnosti. Příkladem tohoto módu je aktivace závislá na přítomnosti proteinu serotonin N-acetyltransferasy (AANAT). Tento enzym je ve své volné formě katalyticky neefektivní hlavně díky nízké afinitě pro jeho substrát. Po jeho fosforylaci se na něj váže protein 14-3-3 a stabilizuje se tím oblast AANAT molekuly zapojené do vazby substrátu. Stabilizace této struktury zvyšuje afinitu k substrátu desetkrát [62].

- Fyzická okupace sekvencně specifických nebo strukturálních rysů

Vazba proteinu 14-3-3 může také maskovat důležité rysy na povrchu cílového proteinu. Například několik dobře charakterizovaných partnerů (FOXO transkripční faktory [63], protein fosfatasy Cdc25C [64], histonové deacetylasy [65]) obsahuje jadernou lokalizační sekvenci v těsné blízkosti 14-3-3 vazebného motivu. Proto byla navržena hypotéza, že vazba 14-3-3 inhibuje interakci mezi jadernou lokalizační sekvencí a proteiny, které transportují tento protein do jádra, čímž je blokována jaderná lokalizace těchto proteinů.

- Protein 14-3-3 funguje jako nosič k ukotvení proteinů v jejich těsné blízkosti

Třetí možnou funkcí proteinů 14-3-3 je vystupovat jako nosič, který stimuluje protein-proteinové interakce. Jeden monomer dimeru 14-3-3 se váže na první protein, druhá podjednotka se váže na druhý protein. Příkladem tohoto módu působení jsou 14-3-3- zprostředkované interakce mezi Tau a glykogen synthasa kinasou 3 β [66].

2. Cíle práce

- Vývoj expresního a purifikačního protokolu pro přípravu katalytické domény lidské proteinkinasy ASK1 (ASK1-KD) WT a mutantu Ser966Ala.
- Příprava proteinů 14-3-3ζ WT, 14-3-3ζ ΔC a 14-3-3ζ noW.
- Test enzymové aktivity připravené ASK1-KD.
- Fosforylace připravené ASK1-KD na Ser966 pomocí proteinkinasy A a ověření interakce fosforylované ASK1-KD s proteinem 14-3-3ζ.
- Test exprese cysteinových a tryptofanových mutantů ASK1-KD.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

<i>Escherichia coli</i> , kmen BL21(DE3)	Stratagene, USA
<i>Escherichia coli</i> , kmen Rosetta(DE3)	Stratagene, USA
laktátdehydrogenasa z prasečího srdce	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
myelinový bazický protein (MBP)	Signalchem Inc., Kanada
plasmid pET-15b	Novagen, USA
plasmid pST39	dar od dr. Evžena Bouři, ÚOCHB, AV ČR v.v.i.
proteinkinasa A (PKA)	Promega, USA
pyruvátkinasa z králičího svalu	Sigma-Aldrich, USA
TEV proteasa	Připraveno v laboratoři biofyzikální chemie, Př.F. UK

3.1.2. Chemikálie

1,4- dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Německo
β -merkapt ethanol	Sigma-Aldrich, USA
β -nikotinaminadenin dinukleotid (redukováný)	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
adenosin-5'-trifosfát (ATP)	Sigma-Aldrich, USA
ADP-Glo™ Kinase Assay kit	Promega, USA
akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
bis-akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
Blue protein ladder	Central European Biosystems, Česká republika

Bradfordovo činidlo	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř	Carl Roth GmbH, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250	LKB Bromma, Švédsko
dihydrát ethylendiamintetraoctanu disodného	Lachema, s.r.o., Česká republika
dihydrogenfosforečnan draselný	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
dodecylsíran sodný (SDS)	Carl Roth GmbH, Německo
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
ethanol	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
fenylmethylsufonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH, Německo
fosfoenolpyruvát	Sigma-Aldrich, USA
glycerol	PENTA- Ing. Petr Švec, Česká republika
glycin	Carl Roth GmbH, Německo
hexahydrát síranu nikelnatého	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
hydroxid sodný	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
chloramfenikol	Sigma-Aldrich, USA
chlorid draselný	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
chlorid hořečnatý	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
chlorid sodný	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
imidazol	Carl Roth GmbH, Německo
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	EMD Biosciences, Inc., Německo
isopropylalkohol	Genomed, Německo
kyselina boritá	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
kyselina chlorovodíková	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
kyselina octová	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
Luria-Bertani agar	Carl Roth GmbH, Německo
Luria-Bertani médium	Carl Roth GmbH, Německo
lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
methanol	PENTA-Ing. Petr Švec, Česká republika
N,N,N',N'-tetraethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Německo
octan hořečnatý	Sigma-Aldrich, USA
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA

Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, USA
terrific broth (TB) médium	Carl Roth GmbH, Německo
tetraethylenadiamin	Carl Roth GmbH, Německo
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Německo

3.2. Přístroje a vybavení

3505 pH Meter	Nova Capital Ltd., Velká Británie
96-jamková mikrodestička	GE Healthcare, USA
automatické pipety	Eppendorf AG, Německo
centrifuga 5804R	Eppendorf, Německo
centrifuga Hermle Z323K	Hermle Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Sigma 8K	Sigma Laborzentrifugen, Německo
dialyzační membrána, typ 27/32 (cut off 14000)	Carl Roth GmbH, Německo
filtry Spartan 13/0,45 RC	GE Healthcare, USA
FPLC	Watrex Praha, s.r.o., Česká republika
FPLC-AKTA	Amersham Biosciences, Švédsko
inkubátor	MELAG Medizintechnik, Německo
kolona 10/50 s Q sepharosu	GE Healthcare, USA
kolona pro niklovou chelatační chromatografii	Bio-Rad Laboratories, USA
kolona Superdex 75 10/300	GE Healthcare, USA
kolona Superdex 75 Hiload 26/60	Amersham Biosciences, Švédsko
kolona Superdex 200 Hiload 26/60	Amersham Biosciences, Švédsko
koncentrátory Amicon Ultra (cut off 10000)	EMD Millipore, USA
křemenná kyveta	Agilent Technologies, Inc., USA
laboratorní váhy HF-200g	And, USA
mikrodestičková čtečka Infinite M200 PRO	Tecan, Švýcarsko
nanofotometr P-Class	Implen GmbH, Německo
nylonové membránové filtry 0,45 μm	GE Healthcare, USA
peristaltická pumpa	IDEX Health & Science SA, Švýcarsko
Photon Counting Spectrofluorimetr PC1	ISS, Inc. (USA)
ProteomLab™ XL-I analytická ultracentrifuga	Beckman Coulter, USA
Sonicator 3000	Misonix, Inc., USA

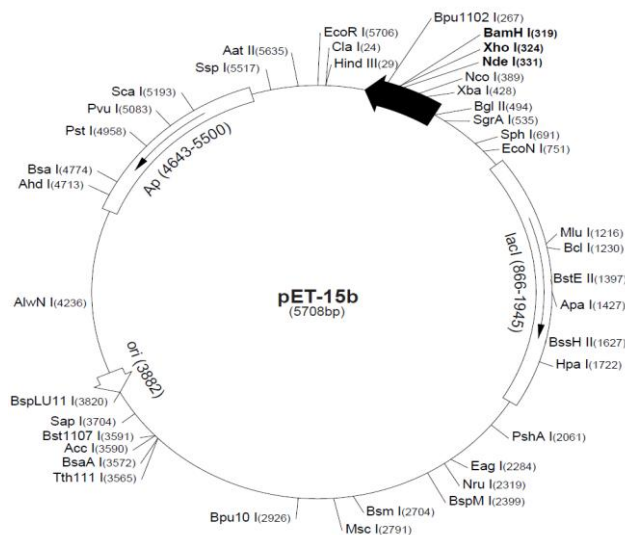
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies, Inc., USA
spektrofotometr Cecil 8000 series	Cecil instruments, Velká Británie
stříkačky	CHIRANA T. Injecta, a.s., Slovenská republika
termoblok	Grant, UK
třepačka Gallenkamp Orbital Incubator	Gemini BV, Holandsko
třepačka Multitron	Infors AG (Švýcarsko)
vertikální elektroforesa	Bio-Rad Laboratories, USA
vodní lázeň	Memmert GmbH, Německo
vortex ZX3	VELP Scientifica, Itálie
zdroj pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, USA

3.3. Expres a purifikace proteinu 14-3-3ζ

3.3.1. Volba expresního vektoru

Plasmid je kruhová molekula DNA schopná samostatné replikace. Bakterie mohou přijímat molekuly plasmidu a využívat genetickou informaci v nich obsaženou. Tato informace pro ně není životně nevyhnutná, ale může jim poskytovat výhodu, obvykle se jedná o rezistenci na antibiotika. V molekulární biologii se plasmid používá jako vektor pro vnesení expresních konstruktů do bakterií.

Pro expresi proteinu 14-3-3ζ byl zvolen plasmid pET-15b (Obr. 3.1, str. 31). Tento vektor umožňuje snadnou expresi a purifikaci zvoleného proteinu. Obsahuje tři restrikční místa, T7 promotor, N-koncovou tzv. 6×His-kotvu (sekvence šesti histidinových zbytků umožňující purifikaci proteinu pomocí niklové chelatační chromatografie), štěpné místo pro thrombin a gen zajišťující rezistenci transformovaných bakterií vůči ampicilinu. DNA sekvence proteinu se vkládá mezi restrikční místa za použití restrikčních endonukleas. Sekvence proteinu 14-3-3ζ byla do plasmidu pET-15b vložena mezi místa NdeI a BamHI. Tímto způsobem byl získán plasmid umožňující expresi fúzního proteinu 14-3-3ζ s N-koncovou 6×His-kotvou a thrombinovým štěpným místem. Expresní konstrukt byl připraven školitelem.



Obr. 3.1 Mapa plasmidu *pET-15b* (Novagen, Katalogové číslo 69661-3). Plasmid *pET-15b* obsahuje N-koncovou 6×His-kotvu (sekvence šesti histidinových zbytků), za ní je umístěno štěpné místo pro thrombin a tři klonovací místa (BamH I, Xho I a Nde I).

3.3.2. Příprava buněk pro expresi proteinu 14-3-3ζ

Pro expresi byl zvolen systém bakterie *E. coli*, kmen BL21(DE3). Kompetentní buňky (schopné přijímat ve zvýšené míře vektory) tohoto kmene byly transformovány plasmidem *pET-15b* nesoucím sekvenci fúzního proteinu 6×His-14-3-3ζ. Transformované bakterie byly uchovávány ve formě glycerolového zásobního roztoku, což je bakteriální suspenze v LB-médiu a 30% glycerolu.

3.3.3. Kultivace bakterií

K 5 ml LB-média s obsahem ampicilinu o koncentraci 100 µg/ml bylo pipetováno 5 µl glycerolového zásobního roztoku bakterií *E. coli*, kmen BL21(DE3) s transformovaným vektorem *pET-15b* nesoucím fúzní protein 6×His-14-3-3ζ. Takto připravená kultura byla inkubována přes noc při 37 °C v orbitálním inkubátoru za konstantního třepání 210 ot./min.

Druhý den byla kultura o objemu 5 ml přenesena do 1 l LB-média s přidaným ampicilinem o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Kultura byla inkubována v orbitálním inkubátoru Multitron při 37 °C za konstantního třepání 210 ot./min po dobu v rozmezí 2 – 3 hodin, dokud optická hustota média při 600 nm nedosáhla hodnoty 0,8 cm⁻¹ (jako blank bylo použito čisté LB-médium). Poté následovala indukce přidáním 1 ml roztoku IPTG o

koncentraci 0,5 mol/l a změna teploty inkubace na 30 °C. Inkubace pokračovala dál po dobu 12 – 18 hodin při snížené teplotě.

Po přidání IPTG začnou bakteriální buňky produkovat T7 RNA polymerasu, která je přítomna v genomu pod kontrolou tzv. lac promotoru. Po indukci se IPTG naváže na lac represor, jenž poté disociuje od lac promotoru, a tak je zahájena transkripce T7 RNA polymerasy. T7 RNA polymerasa se posléze váže na T7 promotor přítomný v sekvenci plasmidu pET-15b, a tak se spustí transkripce a translace fúzního proteinu.

3.3.4. Sonikace

Bakterie po dokončení inkubace byly centrifugovány na centrifuze Sigma 8K po dobu 15 minut při 4 °C a 3000 ot./min. Pelety byly poté resuspendovány ve vychlazeném lyzačním pufru (Tab 3.1) v poměru 40 ml lyzačního pufru na peletu buněk z 1 l LB-média. Resuspendované buňky byly zmrazeny na -80 °C.

Po rozmražení byl k bakteriální suspenzi přidán lysozym o výsledné koncentraci 0,1 µg/ml a následovala inkubace po dobu 20 minut při 4 °C.

Buňky byly poté sonikovány na ledu programem 20 minut čistého času sonikace se střídáním intervalů 10 s zapnuto a 20 s vypnuto. Vzniklá suspenze byla následně centrifugována na centrifuze Hermle Z323K po dobu 45 minut při 4 °C a 13500 ot./min.

Lysozym je enzym schopný rozrušit strukturu buněčné stěny bakterií. Ultrazvuk vytváří v roztoku podélnou vlnou s pulzujícím tlakem. Tyto mechanismy pomáhají k lyzi buněk, vylití vnitrobuněčného obsahu do roztoku. Po centrifugaci se v peletě nachází fragmenty buněk, případně nerozbité buňky a v supernatantu (cytosolární frakce) komplexní proteinová směs vyprodukovaná bakteriemi.

Tab. 3.1 Složení lyzačního pufru

látko (zásobní roztok)	výsledná koncentrace
10×PBS pufr (Tab 3.2, str. 33)	1×
NaCl	1 mol.dm ⁻³
βME	4 mmol.dm ⁻³
imidazol	2 mmol.dm ⁻³

Tab. 3.2 Příprava 10×PBS pufru (pH upraveno na 7,4; doplněno destilovanou vodou na 1 l)

látka	hmotnost [g]
NaCl	80
KCl	2
KH ₂ PO ₄	2,4
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	14,4

3.3.5. Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie je typ afinitní chromatografie separující proteiny na základě jejich schopnosti koordinovat se na nikelnaté ionty, které jsou navázány na matici kolony. Tuto metodu lze použít v případě, že protein, který se snažíme purifikovat je ve formě fúzního proteinu s navázanou 6×His-kotvou na N- nebo na C-konci. 6×His-kotva není přirozenou součástí proteinu, přidává se k jeho sekvenci. Histidin obsahuje imidazolový kruh, který se váže na nikelnaté kationty koordinačně-kovalentní vazbou, a tedy platí, čím víc histidinů v sekvenci za sebou, tím vyšší afinita proteinu k matici kolony. Eluce proteinu pak následně probíhá promytím kolony roztokem s velkým nadbytkem imidazolu, který se rovněž koordinačně-kovalentně váže na nikelnaté ionty.

Kolona určená k provádění niklové chelatační chromatografie obsahovala 5 ml matrice Chelating Sepharose Fast Flow a byla před použitím promyta 20 ml destilované vody, potom 60 ml roztoku hexahydrátu síranu nikelnatého o koncentraci 0,1 mol/l , poté 20 ml destilované vody a nakonec 20 ml vazebného pufru (Tab. 3.3, str. 34). Matrice kolony byla poté inkubována po dobu 20 minut ve 4 °C s cytosolární frakcí, získanou po sonikaci (viz 3.3.4, str. 32), která obsahuje fúzní protein. V průběhu této doby se fúzní protein váže na nikelnaté ionty matrice kolony. Po inkubaci byla suspenze přenesena do dvou 50ml kónických plastových tub a promývána vsádkovou metodou – opakovaná centrifugace suspenze při 4°C a 1600 ot./min (centrifuga Eppendorf 5804R) po dobu 2 minut a opatrná dekantace supernatantu až do spotřebování 300 ml promývacího pufru - 10% eluční pufr (Tab. 3.4, str. 34) ve vazebném pufru. Promývání kolony promývacím pufrem zvyšuje čistotu purifikovaného proteinu vymytím nečistot s nižší afinitou k matici ve srovnání s fúzním proteinem 6×His-14-3-3ζ. Matrice byla poté opět nanášena na kolonu. Protein byl eluován elučním pufrem do mikrozkuvek. Čistota a množství proteinu ve frakcích o velikosti 1,5

ml byla ověřena metodou SDS-PAGE (3.3.6., str. 35). Regenerace matrice kolony pro další použití bylo dosaženo promytím kolony 20 ml regeneračního roztoku (Tab. 3.5), 20 ml destilované vody a 20 ml 20% ethanolu ve vodě. Urychlení průtoku látek kolonou (kromě eluce) bylo dosaženo použitím peristaltické pumpy.

Tab. 3.3 Složení vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii

látka (zásobní roztok)	výsledná koncentrace
10×PBS pufr (Tab. 3.2, str. 33)	1×
NaCl	0,5 mol.dm ⁻³
βME	2 mmol.dm ⁻³
imidazol	1 mmol.dm ⁻³

Tab. 3.4 Složení elučního pufru niklovou chelatační chromatografii (pH upraveno na 8,0)

látka (zásobní roztok)	výsledná koncentrace
10×PBS pufr (Tab. 3.2, str. 33)	1×
NaCl	0,5 mol.dm ⁻³
βME	2 mmol.dm ⁻³
imidazol	0,6 mol.dm ⁻³

Tab. 3.5 Složení regeneračního roztoku

látka	výsledná koncentrace
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	50 mmol.dm ⁻³
NaCl	0,5 mol.dm ⁻³

3.3.6. SDS-PAGE

Elektroforéza je separační elektromigrační metoda, při které se jednotlivé složky od sebe vzájemně dělí vlivem působení elektrického pole. Nabitá částice je v elektrickém poli urychlována k opačnému pólu silou, jejíž velikost je přímo úměrná velikosti náboje částice a intenzitě elektrického pole. V protisměru této síly působí síla třecí, jež je přímo úměrná velikosti částice a viskozitě prostředí. V rovnovážném stavu se účinky těchto sil ruší a částice se pohybuje konstantní rychlostí, která je přímo úměrná náboji částice, intenzitě elektrického pole a nepřímo úměrná velikosti částice a viskozitě prostředí. Částice s různými velikostmi a s různou velikostí nábojů se pohybují různě velkými rychlostmi a vzájemně se tak od sebe separují.

SDS-PAGE je typ elektroforézy prováděné v polyakrylamidovém gelu (PAGE) a v denaturujícím prostředí dodecylsírany sodného (SDS). V tomto prostředí se proteiny solvují tímto silným tenzidem tak, že mají stejnou hustotu záporného náboje, a tudíž pod vlivem elektrického pole se pohybují směrem k anodě a jejich rychlost je závislá pouze na velikosti molekuly. Mezi relativní molekulovou hmotností a pohyblivostí molekul existuje logaritmická závislost, proto lze tuto metodu použít pro přibližné stanovení molekulové hmotnosti neznámého proteinu tak, že se provede kalibrace podle standardních bílkovin.

Tato metoda byla použita po každém chromatografickém kroku pro zjištění přítomnosti (na základě molekulové hmotnosti proteinu) a čistoty proteinu v jednotlivých frakcích po eluci. Nejčistší frakce obsahující daný protein byly poté sloučeny a použity dál.

Z devíti vybraných frakcí po eluci byly do mikrozkušavky odebrány 4 μ l vzorku obsahujícího protein, ke kterému byl přidán 1 μ l 5 \times vzorkového pufru (Tab. 3.6, str. 36). Takto připravené vzorky byly inkubovány v termobloku po dobu 3 minut při teplotě 100 °C.

Do první jamky bylo pokaždé naneseno 5 μ l standardu molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Color Standard™ nebo Blue protein ladder obsahujícího směs fragmentů o známých relativních molekulových hmotnostech, do dalších 9 jamek byly naneseny vzorky. Samotná SDS-PAGE byla prováděna za konstantního napětí 180 V po dobu 1 hodiny nebo 200 V po dobu 45 minut. Byl použit 15% separační (Tab. 3.9, str. 36) a 5% zaváděcí polyakrylamidový gel (Tab. 3.11, str. 37) v prostředí elektrodového pufru (Tab. 3.12, str. 37).

Po dokončení separace proteinů bylo nutné tyto proteiny vizualizovat. K tomu bylo použito barvivo Coomassie Brilliant Blue R 250. Před samotným barvením byl vždy

odstraněn zaváděcí gel. Gel byl poté krátce povařen a ponechán po dobu cca 10 minut v barvicím roztoku (Tab. 3.13, str. 37), čímž došlo k navázání barviva na proteiny. Pro odbarvení gelu byl gel posléze krátce povařen a ponechán v odbarvovacím roztoku (Tab. 3.14, str. 37), díky čemu se vymylo nadbytečné barvivo. Po odbarvení zůstávají nabarveny pouze místa gelu, kde se vyskytuje protein.

Tab. 3.6 Příprava 5 × vzorkového pufru (10 ml)

látko (zásobní roztok)	objem [ml]
Tris-HCl (1 mol.dm ⁻³ ; pH 6,8)	0,6
glycerol (50% vodný roztok)	5
SDS (10% vodný roztok)	2
βME	0,5
bromfenolová modř (1% vodný roztok)	1
destilovaná voda	0,9

Tab. 3.7 Příprava směsi akrylamid/bis-akrylamid (30 g)

látko	hmotnost [g]
akrylamid	29,2
bis-akrylamid	0,8

Tab. 3.8 Příprava pufru pro separační gel (doplněno destilovanou vodou na 100 ml)

zásobní roztok	objem [ml]
Tris-HCl (1,5 mol.dm ⁻³ ; pH 8,8)	75
SDS (10% vodný roztok)	4

Tab. 3.9 Příprava 15% separačního gelu

látko (zásobní roztok)	objem [ml]
akrylamid/bis-akrylamid (Tab. 3.7)	6,000
pufr pro separační gel (Tab. 3.8)	3,000
destilovaná voda	2,880
APS (10% vodný roztok)	0,100
TEMED	0,012

Tab. 3.10 Příprava pufru pro zaváděcí gel (doplněno destilovanou vodou na 100 ml)

zásobní roztok	objem [ml]
Tris-HCl (1 mol.dm ⁻³ ; pH 6,8)	50
SDS (10% vodný roztok)	4

Tab. 3.11 Příprava 5% zaváděcího gelu

látka (zásobní roztok)	objem [ml]
akrylamid/bis-akrylamid (Tab. 3.7, str. 36)	0,500
pufr pro zaváděcí gel (Tab. 3.10)	1,000
destilovaná voda	2,250
APS (10% vodný roztok)	0,045
TEMED	0,005

Tab. 3.12 Příprava 10× elektroforetického pufru (doplněno destilovanou vodou na 1 l)

látka	hmotnost [g]
Tris	30
glycin	144
SDS	10

Tab. 3.13 Příprava barvicího roztoku (doplněno destilovanou vodou na 1 l)

látka	odměřené množství
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml

Tab. 3.14 Příprava odbarvovacího roztoku (doplněno destilovanou vodou na 1 l)

látka	objem [ml]
methanol	100
kyselina octová	100

3.3.7. Dialýza

Po niklové chelatační chromatografii následuje při purifikaci proteinu 14-3-3ζ dialyzační krok, aby byl protein zbaven imidazolu z elučního pufru a případných zbytků nikelnatých iontů nebo jiných malých nečistot. Protein je umístěn do polopropustné dialyzační membrány, která je umístěna do dialyzačního pufru. Velikost pórů této membrány určuje, pro které látky je membrána propustná a pro které nikoliv. Volí se tak, aby protein zůstal přítomen v prostoru ohraničeném membránou, zatímco nízkomolekulárním látkám je umožněn volný pohyb membránou do pufru ve směru koncentračního gradientu.

Nejprve byla dialyzační membrána (cut-off 14 000) důkladně navlhčena dialyzačním puftrem (Tab. 3.15). Poté byly do této membrány pipetovány frakce po niklové chelatační chromatografii a protein byl dialyzován přes noc.

Tab. 3.15 Složení dialyzačního pufru (pH 7,5)

látká	výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol.dm ⁻³
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	2 mmol.dm ⁻³
DTT	1 mmol.dm ⁻³
glycerol	10 %

3.3.8. Aniontově výměnná chromatografie

Aniontově výměnná chromatografie separuje anionty na základě velikosti jejich náboje. Provádí se na koloně. Stacionární fází je tzv. anex, chemicky inertní nosič schopný vyměňovat anionty. V případě purifikace 14-3-3ζ se jako anex používají kvartérní amoniové kationty.

Náboj proteinů závisí na pH prostředí. V kyselém prostředí jsou proteiny spíše kladně nabitě v důsledku protonizace aminoskupin a jiných protonizovatelných skupin bočných řetězců. V bazickém prostředí, naopak, proteiny mají tendenci nabýt záporného náboje díky deprotonizaci karboxylových a dalších skupin ve vedlejších řetězcích proteinu. Při přechodu mezi těmito dvěma stavy se protein vyskytne v tzv. izoelektrickém bodě pI, což je hodnota pH prostředí, ve kterém se molekula proteinu nachází v elektricky neutrálním stavu. Izoelektrický bod je jednou z charakteristik každého proteinu a je nutné ho znát, pokud chceme použít

k jeho purifikaci iontově výměnnou chromatografií. pH pufru musí být nastaveno na hodnotu vyšší než je pI proteinu.

Teoretická hodnota pI fúzního proteinu 6×His-14-3-3ζ byla vypočítaná na základě primární struktury pomocí nástroje ProtParam [67], a má hodnotu 5,16. Pro získání proteinu ve své záporně nabitě formě, aby mohla proběhnout aniontová výměna, bylo zvoleno pH 8,0 vazebného a elučního pufru (Tab. 3.16, Tab. 3.17). Aparatura pro provedení aniontové výměny byla složena z kolony 10/50 s Q sepharosou připojené k FPLC. Oba dva pufrы byly přefiltrovány přes nylonové filtry o velikosti pórů 0,45 μm. Kolona byla nejprve promyta elučním, poté vazebným pufrem. Roztok proteinu byl přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm a poté nastříknut na kolonu při průtoku 1 ml/min. Po nástřiku vzorku byla průtoková rychlost kolonou změněna na 1,5 ml/min. Eluce proteinu byla provedena gradientem koncentrace chloridu sodného, a to v rozmezí od 20 do 1000 mmol/l. Frakce byly sbírány do mikrozkušavek po 0,5 ml.

Tab. 3.16 Složení vazebného pufru pro aniontově výměnnou chromatografií (pH 8,0)

látka	výsledná koncentrace
Tris-HCl	50 mmol.dm ⁻³
DTT	1 mmol.dm ⁻³

Tab. 3.17 Složení elučního pufru pro aniontově výměnnou chromatografií (pH 8,0)

látka	výsledná koncentrace
Tris-HCl	50 mmol.dm ⁻³
NaCl	1 mol.dm ⁻³
DTT	1 mmol.dm ⁻³

3.3.9. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metodou separace látek na základě velikosti hydrodynamických objemů jejich molekul. Je založena na difuzi molekul rozpuštěné látky do vnitřních pórů zrnitého porézního gelu, kombinované s tokem mobilní fáze kolonou vyplněnou tímto gelem. Roztok protéká nejrychleji oblastmi mimo zrna gelu, přičemž jeho průtok póry gelu je pomalý. Molekuly rozpuštěné v roztoku difundují v průběhu průchodu

kolonou do pórů gelu. Ty nejmenší z nich jsou schopné proniknout i do těch nejmenších pórů a tudíž jsou kolonou nejvíce zdržovány, zatímco pro větší molekuly jsou přístupné pouze větší póry, a proto setrvávají v koloně kratší dobu. Závislost hydrodynamického objemu molekul na jejich elučním objemu je logaritmická.

Aparatura pro provedení gelové permeační chromatografie byla složena z kolony Superdex 75 10/300 připojené k FPLC. Kolona byla nejprve promyta pufrém pro gelovou permeační chromatografii (Tab. 3.18), který byl před použitím přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm . Roztok proteinu byl před nástřikem na kolonu zakoncentrován koncentrátorem Amicon Ultra (cut-off 10 000) na objem 2 ml a přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm . Po nástřiku vzorku proteinu byla spuštěna metoda eluce, kde byla průtoková rychlost nastavena na 0,5 ml/min a frakce byly sbírány do mikrozkušavek po 0,5 ml. Po provedení gelové permeační chromatografie, jako posledního purifikačního kroku, byly nejčistší frakce sloučeny, dle potřeby zakoncentrovány, byla změřena koncentrace proteinu (viz 3.3.10) a protein byl poté skladován při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo hned použit pro experimenty.

Tab. 3.18 Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii (pH 7,5)

látka	výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol.dm ⁻³
NaCl	150 mmol.dm ⁻³
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	1 mmol.dm ⁻³
DTT	5 mmol.dm ⁻³
glycerol	10 %

3.3.10. Stanovení proteinové koncentrace

Proteiny absorbují při vlnové délce 280 nm. Této vlastnosti bylo využito ke stanovení koncentrace c fúzních proteinů. Jako blank byl použit čistý pufr, ve kterém byly proteiny rozpuštěny, obvykle pufr pro gelovou permeační chromatografii nebo pufr po dialýze. Koncentrace proteinů byla vypočítána dle Lambertova-Beerova zákona:

$$A = c l \varepsilon$$

kde A je absorbance, l je délka optické dráhy a ϵ je molární absorpční koeficient, který byl pro fúzní protein 6×His-14-3-3 ζ určen na základě jeho primární struktury pomocí nástroje ProtParam [67]. Pro měření absorbance proteinů byly používány křemenné kyvety, které neabsorbují záření v UV oblasti. Dle množství a koncentrace vzorku byl použit buď spektrofotometr Cecil 8000 series nebo nanofotometr P-Class.

3.4. Expres a purifikace proteinu ASK1-KD

Tato kapitola popisuje finální purifikační protokol pro katalytickou doménu proteinu lidské ASK1 (ASK1-KD). Optimalizace tohoto protokolu je popsána v kapitole 4.2.1.2 na str. 59.

3.4.1. Popis použitého vektoru

Pro expresi proteinu ASK1-KD a jeho mutantů byl zvolen plasmid pST39 [68]. Tento plasmid umožňuje tzv. „leakage“ expresi bez nutnosti indukce. Sekvence katalytické domény ASK1 (659-973) byla do vektoru pST39 vnesena pomocí restričních míst XbaI a BamHI a na její C-konec byla přidána sekvence 6×His-kotvy se štěpným místem pro TEV proteasu. Katalytická doména ASK1 tedy byla exprimována jako fúzní protein s C-koncovou histidinovou kotvou a štěpným místem pro TEV proteasu, které umožňuje odštěpení 6×His-kotvy. Expresní konstrukt byl připraven Mgr. Daliborem Koškem.

3.4.2. Příprava buněk pro expresi katalytické domény ASK1

Pro expresi ASK1-KD byl zvolen expresní systém bakterie *E. coli*, kmen Rosetta (DE3). Kompetentní buňky tohoto kmene byly transformovány plasmidem pST39 nesoucím fúzní protein ASK1-KD-6×His. Bakterie obsahující tento vektor jsou rezistentní vůči ampicilinu a chloramfenikolu. K 50 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 0,5 μ l plasmidové DNA. Takto připravená směs byla inkubována při 4 °C po dobu 30 minut. Poté následovala inkubace po dobu 45 s při 42 °C, tzv. tepelný šok. Buňky byly poté ponechány na ledu po dobu jedné minuty a následně byly inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C v 0,5 ml LB-média.

3.4.3. Kultivace bakterií

K 5 ml LB-média s obsahem ampicilinu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a s obsahem chloramfenikolu o koncentraci 34 $\mu\text{g/ml}$ bylo pipetováno 50 μl transformovaných kompetentních buněk (viz odst. 3.3.2, str. 31). Takto připravená kultura byla inkubována přes noc při 37 °C v orbitálním inkubátoru za konstantního třepání 210 ot./min.

Druhý den byla kultura o objemu 5 ml přenesena do 1 l TB-média s přidaným ampicilinem o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a chloramfenikolem o výsledné koncentraci 34 $\mu\text{g/ml}$. Kultura byla inkubována v orbitálním inkubátoru Multitron při 25 °C a 210 ot./min po dobu v rozmezí 20-24 hodin.

3.4.4. Sonikace

Bakterie, po dokončení inkubace, byly centrifugovány na centrifuze Sigma 8K po dobu 15 minut při 4 °C a 3000 ot./min. Pelety byly poté resuspendovány ve vychlazeném lyzačním puftru (Tab. 3.1, str. 32) v poměru 80 ml lyzačního puftru na peletu buněk z 1 l TB-média. Resuspendované buňky byly zmrazeny na teplotu -80 °C.

Po rozmražení byl k bakteriální suspenzi přidán lysozym o výsledné koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 500 μl roztoku fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) v ethanolu o koncentraci 0,1 mol/l (inhibitor serinových proteas). Následovala inkubace po dobu 20 minut při 4 °C.

Buňky byly poté sonikovány na ledu programem 8 minut čistého času sonikace se střídáním intervalů 5 s zapnuto a 15 s vypnuto. Vzniklá suspenze byla následně centrifugována na centrifuze Hermle Z323K po dobu 45 minut při 4 °C a 13500 ot./min.

3.4.5. Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie byla prováděna prakticky stejným způsobem jako v případě proteinu 14-3-3 ζ (3.3.5, str. 33). Složení pufrů (Tab. 3.19, Tab. 3.20) bylo odlišné:

Tab. 3.19 Složení vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii

látka (zásobní roztok)	výsledná koncentrace
10×PBS pufr (Tab. 3.2, str. 33)	1×
NaCl	1 mol.dm ⁻³
β ME	2 mmol.dm ⁻³
Imidazol	1 mmol.dm ⁻³

Tab. 3.20 Složení elučního pufru niklovou chelatační chromatografii (pH upraveno na 8,0)

látka (zásobní roztok)	výsledná koncentrace
10×PBS pufr (Tab. 3.2, str. 33)	1×
NaCl	1 mol.dm ⁻³
β ME	2 mmol.dm ⁻³
imidazol	0,6 mol.dm ⁻³
glycerol	10 %

Protein při eluci byl okamžitě zředěn do 25 ml dialyzačního pufru (Tab. 3.21, str.44). Bradfordovo činidlo bylo použito k přibližnému odhadu proteinové koncentrace. K 10 μ l Bradfordova činidla byl pipetován 1 μ l vzorku proteinu.

3.4.6. Dialýza a štěpení TEV proteasou

Při purifikaci proteinu ASK1-KD také následuje dialýza po niklové chelatační chromatografii, především proto, aby byl protein zbaven imidazolu z elučního pufru. Aby v dalších experimentech histidinová kotva, která je pořád součástí fúzního proteinu neinterferovala, je v tomto kroku odstraněna TEV proteasou (proteasa z viru tabákové mozaiky). Před přidáním samotné TEV proteasy bylo odebráno 10 μ l vzorku na SDS-PAGE. TEV proteasa (1 mg/ml, specifická aktivita 250 U/mg proteinu) byla přidávána k fúznímu proteinu v poměru 0,5 ml TEV proteasy na množství fúzního proteinu získaného z 2 l TB-

média. Poté byla dialyzační membrána (cut off 14 000) důkladně navlhčena dialyzačním pufrem (Tab. 3.21) a byl do ní umístěn protein s TEV proteasou. Dialýza probíhala přes noc při 4 °C.

Tab. 3.21 Složení dialyzačního pufru (pH 8,0)

látká	výsledná koncentrace
Tris-HCl	50 mmol.dm ⁻³
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	5 mmol.dm ⁻³
DTT	2 mmol.dm ⁻³
glycerol	10 %

3.4.7. Gelová permeační chromatografie

Druhý den po dialýze bylo 10 µl vzorku neštěpeného proteinu a 10 µl vzorku proteinu po štěpení TEV proteasou smícháno s 2 µl 5x vzorkového pufru (Tab. 3.6, str. 36) a byla provedena SDS-PAGE (3.3.6, str. 35) pro ověření úspěšného dokončení štěpení proteinu TEV proteasou. Poté byla provedena gelová permeační chromatografie způsobem podobným jako tomu bylo u proteinu 14-3-3ζ (3.3.9, str. 39). Pufr pro gelovou permeační chromatografii měl jiné složení (Tab. 3.22). Aparatura byla složena z kolony Superdex 200 Hiload 26/60 připojené k přístroji FPLC-AKTA. Po eluci následovalo sloučení nejčistších frakcí, zakonzentrování, změření koncentrace proteinu (3.3.10, str. 40) a zmražení na -80 °C nebo okamžité použití pro experimenty.

Tab. 3.22 Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii (pH 8,0)

látká	výsledná koncentrace
Tris-HCl	50 mmol.dm ⁻³
NaCl	200 mmol.dm ⁻³
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	2 mmol.dm ⁻³
DTT	2 mmol.dm ⁻³
glycerol	10 %

3.4.8. Fosforylace katalytické domény ASK1 proteinkinase A

Pro některé typy experimentů bylo nutné protein ASK1-KD nafsosforylovat. Kinasová doména ASK1 má tři autofosforylační místa a také fosforylační místa pro jiné proteinkinasy [29]. Po purifikaci její stav autofosforylace není přesně definovaný, částečná fosforylace mohla proběhnout již v buňkách. Pokud byly studovány jevy související se změnou chování ASK1 ve fosforylovaném a nefosforylovaném stavu, protein byl po purifikaci rozdělen na dvě poloviny. Obě poloviny byly inkubovány s hořečnatými kationty a ATP, čímž byla zajištěna totální fosforylace na všech autofosforylačních místech. K jedné polovině byla navíc přidána proteinkinasa A (PKA), která protein mimo autofosforylačních míst fosforylovala také na Ser966.

K oběma polovinám obsahujícím protein o koncentraci 1 mg/ml bylo přidáno ATP (výsledná koncentrace 750 $\mu\text{mol/l}$), chlorid hořečnatý, případně octan hořečnatý o výsledné koncentraci 12 mmol/l. K jedné polovině byla ještě přidána PKA (127,6 U/ μl) v poměru 1 μl na 1 mg proteinu. Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 2 hodin při teplotě 30 °C, poté vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C a druhý den byla fosforylace zopakována za identických podmínek. V případě, že v následujících experimentech by zbytkové ATP mohlo interferovat, byla pro jeho odstranění použita gelová permeační chromatografie (3.4.7, str. 44). Pokud zbytky ATP neměly zásadní vliv v následných experimentech, protein byl pouze dialyzován proti pufru pro gelovou permeační chromatografii (Tab. 3.22, str. 44).

3.5. Měření emisních spekter tryptofanových mutantů ASK1-KD

Pro tryptofanové mutanty ASK1-KD Trp865Phe (tryptofanový zbytek v pozici 865 zaměněn za fenylalaninový zbytek) a ASK1-KD Trp770Phe (tryptofanový zbytek v pozici 865 zaměněn za fenylalaninový zbytek) byla měřena emisní spektra na fluorimetru Photon Counting Spectrofluorimetr PC1. Poloha emisního pásu nám může něco říct o charakteru okolí tryptofanu v proteinu (musí být jediný vyskytující se v sekvenci proteinu), který může být buď umístěn v hydrofobním jádru proteinu (poloha emisního pásu posunuta ke kratším

vlnovým délkám), nebo přístupný polárnímu rozpouštědlu (poloha emisního pásu je pak posunuta k delším vlnovým délkám).

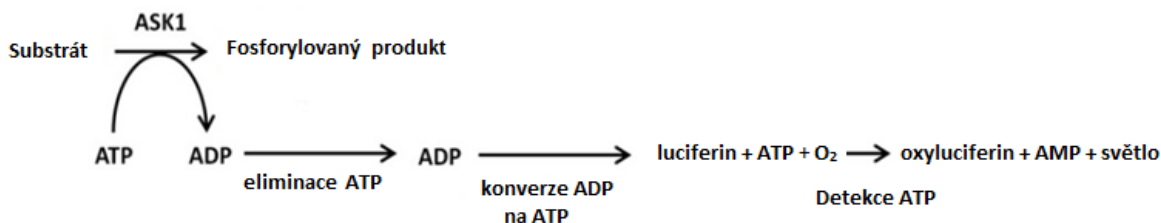
K měření bylo použito 600 μ l roztoku proteinu v křemenné kyvetě, jako blank byl použit pufr po gelové permeační chromatografii (Tab. 3.22, str. 44). Koncentrace proteinu ASK1-KD Trp865Phe byla 0,31 mg/ml a koncentrace proteinu ASK1-KD Trp770Phe byla 0,54 mg/ml. Emisní spektra byla měřena v rozmezí emisních vlnových délek 315 – 420 nm při konstantní vlnové délce excitace 297 nm. Výsledné emisní spektrum vzniklo odečtením naměřených hodnot intenzit pro pufr od naměřených hodnot pro protein.

3.6. Stanovení kinasové aktivity proteinu ASK1-KD

Pro stanovení kinasové aktivity ASK1-KD WT byly použity dvě spektrofotometrické metody. V případě obou metod se stanovení provádí na základě množství spotřebovaného ATP v průběhu kinasové reakce. Myelinový bazický protein (MBP) byl zvolen jako substrát, který je během reakce fosforylován (je tedy akceptorem fosfátové skupiny v obou metodách).

3.6.1. Luminiscenční metoda za použití komerční sady ADP-Glo™

Jak již bylo zmíněno, princip metody [69] je založen na kvantifikaci konverze ATP na ADP, ke které dochází během kinasové reakce. Stanovení spotřebovaného ATP se provádí ve dvou krocích (Obr. 3.2, str. 47). Po inkubaci je kinasová reakce ukončena přidáním prvního, tzv. kinasového činidla, které zároveň také odbourává zbytkové ATP v reakční směsi. Po druhé inkubaci, v dalším kroku, je do reakce přidáno druhé, tzv. kinasové detekční činidlo, jež má za úkol veškeré ADP vzniklé v průběhu kinasové reakce proměnit v ATP a toto nově vzniklé ATP je poté využito k reakci s luciferinem za vzniku oxyluciferinu a chemiluminiscenčního signálu, který je detekován luminiscenční čtečkou a je úměrný spotřebovanému ATP v reakci.



Obr. 3.2 Schéma luminiscenční metody za použití komerční sady ADP-Glo™ pro stanovení kinasové aktivity. Kinasová reakce je ukončena přidavkem kinasového činidla, které zároveň způsobuje v reakční směsi eliminaci nezreagovaného ATP. V dalším kroku, přidavkem kinasového detekčního činidla, je veškeré ADP vzniklé v průběhu kinasové reakce proměněno v ATP, které je kvantifikováno prostřednictvím reakce s luciferinem za vzniku oxyluciferinu a chemiluminiscenčního signálu. Tento signál je úměrný spotřebovanému ATP v reakci.

Intenzita luminiscenčního signálu byla měřena v 96-jamkové mikrodestičce pomocí luminiscenční čtečky Infinite M200 PRO schopné počítat emitované fotony, které jsou poté převedeny na relativní luminiscenční jednotky RLU. Pro odhad spotřeby ATP je nutné zkonstruovat křivku konverze ATP na ADP, díky které může být luminiscenční signál přepočítán na spotřebu ATP.

Pro stanovení kinasové aktivity ASK1-KD byly připraveny reakční roztoky o objemu 25 μl (Tab. 3.23). Každá reakce byla měřena třikrát pro statistické vyhodnocení. K 25 μl těchto reakcí inkubovaných po dobu 1 hodiny (reakce byla odstartována přidavkem ATP) při pokojové teplotě bylo přidáno 25 μl kinasového činidla (součást komerční sady ADP-Glo™). Směs byla inkubována po dobu 40 minut při pokojové teplotě a poté bylo přidáno 50 μl kinasového detekčního činidla (součást komerční sady ADP-Glo™). Tato směs byla inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě a poté byl měřen luminiscenční signál.

Tab. 3.23 Obsah kinasové reakce (25 μl ; pH 7,5)

látka	koncentrace v reakci	koncentrace v blanku
ASK1-KD WT	5 $\mu\text{g.cm}^{-3}$	5 $\mu\text{g.cm}^{-3}$
MBP	0,1 mg.cm^{-3}	0 mg.cm^{-3}
ATP	100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$
Tris-HCl	40 mmol.dm^{-3}	40 mmol.dm^{-3}
MgCl ₂	20 mmol.dm^{-3}	20 mmol.dm^{-3}
DTT	50 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	50 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$

3.6.1.1. Příprava konverzní křivky

Dvakrát byly pipetovány směsi dle Tab. 3.24:

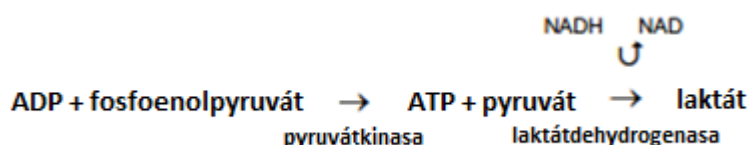
Tab. 3.24 Směsi představující různé konverze ATP na ADP

Jamka č.	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
ADP ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) [μl]	10	5	4	3	2	1	0
ATP ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) [μl]	90	95	96	97	98	99	100

Z těchto směsí poté bylo odebráno $25 \mu\text{l}$. Posléze bylo přidáno $25 \mu\text{l}$ kinasového činidla a $50 \mu\text{l}$ kinasového detekčního činidla s inkubačními časy identickými, jako u kinasové reakce. Byl měřen luminiscenční signál jednotlivých směsí a z těch potom sestrojena konverzní křivka.

3.6.2. Spektroskopická metoda založena na změně koncentrace NADH

Princip metody je načrtnut na Obr. 3.3 [70]. ADP vzniklé v průběhu kinasové reakce je reakcí s fosfoenolpyruvátem za katalýzy pyruvátkinasou proměněno v pyruvát a ATP. Pyruvát je poté laktátdehydrogenasou redukován na laktát za současné oxidace NADH na NAD^+ . Konverzi NADH v NAD^+ je možné sledovat spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm , kde absorbuje NADH, nikoliv NAD^+ . Množství ATP spotřebované v kinasové reakci je tedy úměrné úbytku absorbance při 340 nm .



Obr. 3.3 Princip spektroskopické metody založené na změně koncentrace NADH pro stanovení kinasové aktivity. ADP je reakcí s fosfoenolpyruvátem proměněno v pyruvát a ATP za katalýzy pyruvátkinasou. Takhle vzniklý pyruvát je okamžitě laktátdehydrogenasou redukován na laktát za současné oxidace NADH v NAD^+ . Konverze NADH v NAD^+ je úměrná úbytku absorbance při 340 nm .

Reakční směs (Tab. 3.26, Tab. 3.27) v reakčním pufru (Tab. 3.25) byla pipetována do mikrozkušavky, poté byla přenesena do křemenné kyvety. Reakce byla odstartována přidávkem roztoku ASK1-KD přímo do kyvety. Úbytek absorbance NADH byl měřen na spektrofotometru Cecil 8000 series, hodnoty absorbancí byly odečítány ve dvouminutových intervalech po dobu 14 minut.

Tab. 3.25 Složení reakčního pufru (pH 7,5)

látká	výsledná koncentrace [mmol.dm⁻³]
Tris-HCl	50
NaCl	200
(CH ₃ COO ⁻) ₂ Mg	20

Tab. 3.26 Příprava reakční směsi (300 µl)

zásobní roztok	pipetované množství	
	v reakci [µl]	v blanku [µl]
enzymová směs (Tab. 3.27)	100	100
MBP (1 mg.cm ⁻³)	30	0
ATP (50 mmol.dm ⁻³)	1,5	1,5
reakční pufr (Tab. 3.25)	148,5	178,5
3 µM ASK1-KD	20	20

Tab. 3.27 Příprava enzymové směsi (100 µl)

zásobní roztok	pipetované množství [µl]
pyruvátkinasa (1 U/µl)	4,5
laktátdehydrogenasa (1,3 U/µl)	10
fosfoenolpyruvát (50 mmol.dm ⁻³)	6
NADH (10 mmol.dm ⁻³)	4
reakční pufr (Tab. 3.25)	75,5

3.7. Studium interakcí mezi proteiny ASK1-KD a 14-3-3ζ

3.7.1. Ověření fosforylace – hmotnostní spektrometrie

K ověření, zda fosforylace proteinu ASK1-KD proteinkinasou A na Ser966 proběhla úspěšně, byla použita metoda hmotnostní spektrometrie. Protein ASK1-KD WT byl nejprve štěpen pepsinem při 4 °C v prostředí o hodnotě pH 2,5. Takto vzniklé peptidy byly poté analyzovány pomocí chromatografie na reverzní fázi (C18). Eluce probíhala gradientem acetonitrilu od 0 do 40 %. Eluáty byly v čtyřsekundových intervalech analyzovány dvojnásobnou hmotnostně spektrometrickou analýzou na přístroji ESI-FTICR, Bruker (ionizace elektrosprejem, následovaná iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací). Ionizace probíhala v tzv. pozitivním módu (vznikaly pouze kladně nabitě peptidy), což bylo zabezpečeno přítomností 0,1% kyseliny trifluoroctové v rozpouštědle. Měření byla provedena v laboratoři RNDr. Petra Mana, Ph.D. (MBÚ AV ČR v.v.i.).

3.7.2. Nativní elektroforéza

Nativní elektroforéza je elektromigrační metoda, která separuje látky na základě jejich elektroforetické mobility, která je přímo úměrná velikosti jejich náboje a nepřímo úměrná velikosti jejich částic. Protein při nativní elektroforéze migruje, na rozdíl od SDS-PAGE, ve svém nativním stavu díky nedenedurujícímu prostředí. Proto je možné sledovat chování proteinů ve své nativní formě, zejména tvorbu komplexů s jinými proteiny.

Vzorky byly připraveny smícháním 10 μ l proteinu nebo směsi proteinů (v případě směsi byla provedena 30 minutová inkubace, aby byl vytvořen komplex) s 2 μ l vzorkového pufru pro nativní elektroforézu (Tab. 3.30, str. 51). Hotové vzorky byly nanášeny do jamek 15% polyakrylamidového gelu (Tab. 3.29, str. 51). Elektroforéza probíhala v pufru 1 \times TBE (Tab. 3.28) při konstantním napětí 140 V po dobu tří hodin a nádoba byla chlazená ledem.

Tab. 3.28 Příprava 10 \times TBE pufru (doplněno destilovanou vodou na 1 l)

látka	hmotnost [g]
Tris	107,8
H ₃ BO ₃	55,0
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	7,4

Tab. 3.29 Příprava 15% polyakrylamidového gelu pro nativní elektroforézu

látká (zásobní roztok)	objem
akrylamid/bis-akrylamid (Tab.3.7, str. 36)	4 ml
10 × TBE pufr (Tab. 3.28, str. 50)	1 ml
destilovaná voda	5 ml
APS (10% vodný roztok)	75 μ l
TEMED	8 μ l

Tab. 3.30 Příprava vzorkového pufru pro nativní elektroforézu (doplňeno destilovanou vodou na 10 ml)

látká (zásobní roztok)	odměřené množství
10× TBE pufr (Tab. 3.28, str. 50)	1 ml
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml

3.7.3. Analytická ultracentrifugace

Analytická ultracentrifugace umožňuje studium hydrodynamických nebo termodynamických vlastností biomakromolekul, které se pohybují v silných odstředivých polích. Distribuce molekul rozpuštěné látky je během experimentu monitorována optickým systémem (absorbance nebo interferenční optika) podél průměru komůrky kyvety.

V případě studia hydrodynamických vlastností molekul se používá metoda sedimentačních rychlostí, kde rotace s vysokou úhlovou rychlostí způsobí rychlou sedimentaci molekul. Vytvoří se tak ostré rozhraní mezi oblastí bez proteinu a oblastí s konstantní koncentrací proteinu. Rychlost, s jakou se pohybuje sedimentační rozhraní, je charakterizována tzv. sedimentačním koeficientem S . Závisí na molekulové hmotnosti a také na tvaru molekul. Při analýze se obvykle zjišťuje, kolik složek sedimentuje s různými sedimentačními koeficienty. Naměřená data jsou transformována do formy distribuce sedimentačního koeficientu $c(S)$. Touto metodou lze určit tvar molekul o známé molekulové hmotnosti, molekulovou hmotnost globulárních proteinů, přítomnost různých molekul, s různými hodnotami sedimentačních koeficientů S a zdánlivou konstantu asociace komplexu.

Metoda sedimentační rovnováhy je termodynamickou technikou, při které je vzorek centrifugován při rychlosti (z pravidla nižší než u metody sedimentačních rychlostí), která

umožní vyrovnání sedimentačního toku s tokem difúzním. V rovnovážném stavu distribuce koncentrace makromolekul v rámci kyvety monotónně vzrůstá. Tato technika umožňuje získat relativní molekulové hmotnosti, oligomerní stav molekul a rovnovážné konstanty tvorby komplexu.

Pro analýzu vazebných interakcí mezi proteiny 14-3-3 ζ a ASK1-KD byla zvolena metoda sedimentačních rychlostí. K měření byl použit přístroj ProteomLabTM XL-I analytická centrifuga (Beckman Coulter, USA).

Před samotným měřením byly vzorky dialyzovány proti pufru (Tab. 3.31). Hustota, viskozita pufru a parciální specifické objemy proteinů byly vypočítány s pomocí programu SEDNTERP [71]. Samotná analýza probíhala při 42 000 ot./min a detekce sedimentačních profilů probíhala měřením absorbance při 280 nm podél kyvety v průběhu analýzy. Distribuce sedimentačních koeficientů $c(S)$ byly vypočítány použitím softwaru SEDFIT [72]. Data byla proložena modelem $A + B \rightleftharpoons AB$ implementovaným v softwaru SEDPHAT [73] se známými hodnotami sedimentačních koeficientů jednotlivých složek, sloužícími jako vstupní parametry. Výstupní parametry byly ověřeny a koncentrace byly korigovány metodou modelování Lammových rovnic také implementovanou v softwaru SEDPHAT. Veškeré experimenty a zpracování dat byly provedeny s asistencí Mgr. Dalibora Koška.

Tab. 3.31 Složení dialyzačního pufru pro analytickou ultracentrifugaci (pH 7,5)

látka	výsledná koncentrace
Tris-HCl	20 mmol.dm ⁻³
NaCl	200 mmol.dm ⁻³
β ME	2 mmol.dm ⁻³

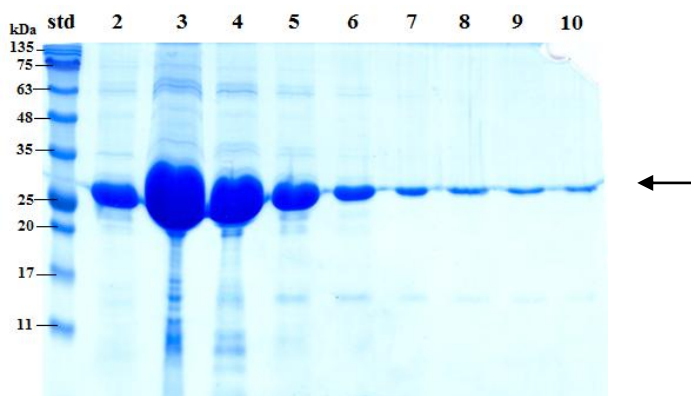
4. Výsledky

4.1. Purifikace proteinu 14-3-3 ζ

Celkově byly připraveny tři verze tohoto proteinu – přirozený typ (WT), Δ C (zkrácený na C-konci, obsahuje sekvenci 1-230) a noW (konstrukt, kde jsou oba tryptofanové zbytky zaměněny za fenylalaniny). Tyto konstrukty byly připravovány jinými členy laboratoře. Všechny verze byly purifikovány stejným způsobem, v této kapitole je demonstrována příprava proteinu 14-3-3 ζ noW.

4.1.1. Niklová chelatační chromatografie

Protein 14-3-3 ζ noW byl exprimován jako fúzní protein s N-koncovou 6 \times His-kotvou (sekvence šesti histidinů, která umožňuje purifikaci pomocí chelatační chromatografie). Niklová chelatační chromatografie proteinu 14-3-3 ζ noW byla provedena podle protokolu popsaného v kapitole 3.4.5 na str. 43. Během eluce bylo jímáno celkem devět frakcí po 1,5 ml do mikrozkuvek, které byly následně analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE (Obr. 4.1). Protein 14-3-3 ζ noW se exprimoval velmi dobře a ze dvou litrů bakteriální kultury bylo získáno 25 mg fúzního proteinu (to stejné platilo pro všechny připravované verze proteinu 14-3-3 ζ).

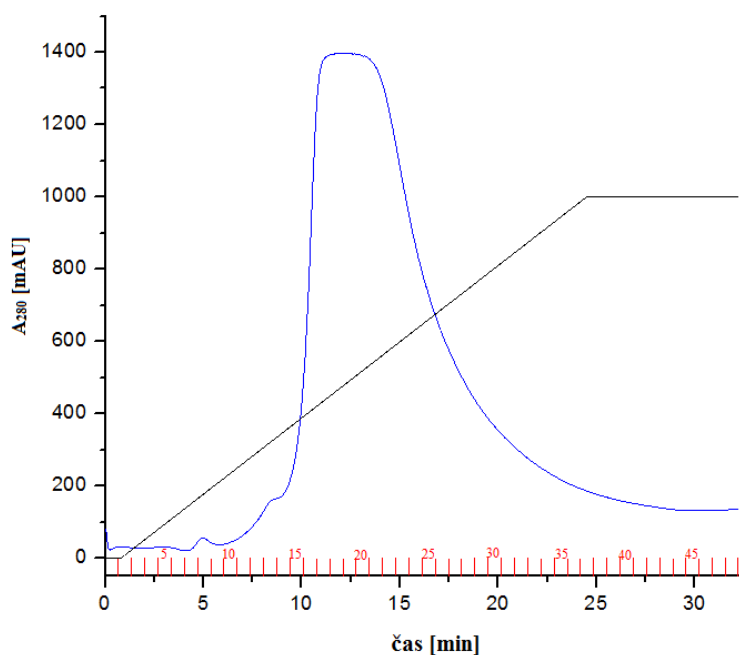


Obr. 4.1 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými při niklové chelatační chromatografii proteinu 14-3-3 ζ noW. Do první jamky zleva bylo naneseno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z eluovaných frakcí 2 – 10. Vzorky byly připraveny smícháním 4 μ l roztoku proteinu

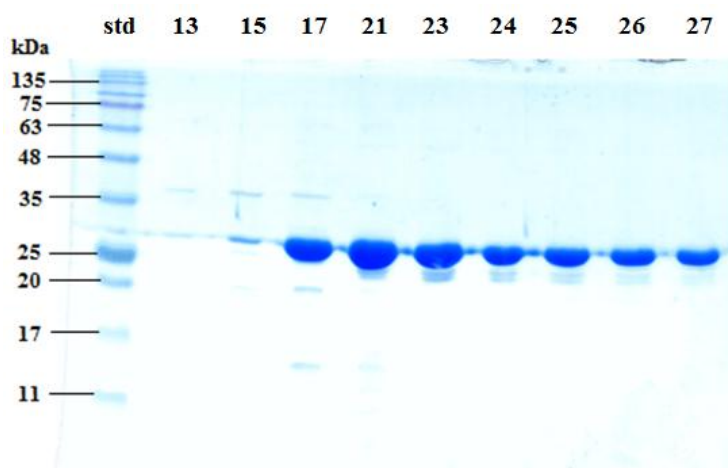
odebraných z frakcí po niklové chelatační chromatografii a 1 μ l 5 \times vzorkového pufru. Šipkou je označen pás odpovídající proteinu 14-3-3 ζ noW o relativní molekulové váze 29 830, vypočítané na základě primární struktury pomocí nástroje ProtParam [67].

4.1.2. Aniontově výměnná chromatografie

Po niklové chelatační chromatografii byly frakce 2 – 10 sloučeny a dialyzovány. Následně byl protein 14-3-3 ζ noW purifikován pomocí aniontově výměnné chromatografie (viz 3.3.8, str. 38). K purifikaci byla použita kolona 10/50 s Q sepharosou. Protein byl eluován gradientem iontové síly (Obr. 4.2) a byly jímány frakce o objemu 1 ml. Na chromatogramu je vidět jedno dominantní absorpční maximum odpovídající proteinu 14-3-3 ζ noW. Z frakcí 13, 15, 17, 21, 23, 24, 25, 26 a 27 byly odebrány vzorky pro analýzu na SDS-PAGE (Obr. 4.3, str. 55). Frakce 18-27 byly posléze sloučeny a podrobeny dalšímu purifikačnímu kroku (viz 4.1.3, str. 55).



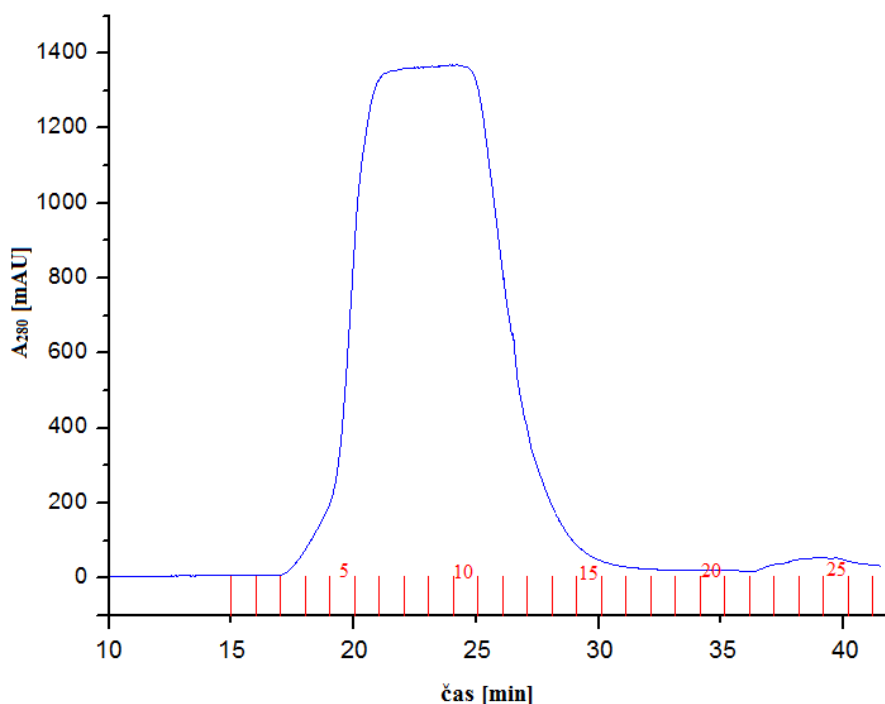
Obr. 4.2 Chromatogram po aniontově výměnné chromatografii (kolona 10/50 s Q sepharosou). Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na čase. Černou křivkou je znázorněn gradient iontové síly. Červenou barvou jsou vyznačeny pozice eluovaných frakcí.



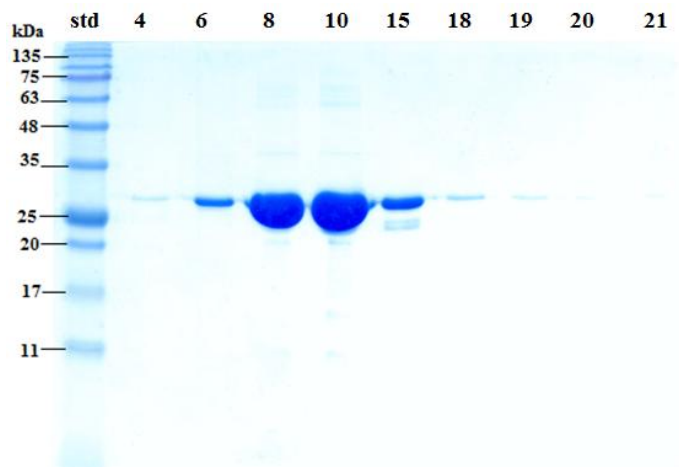
Obr. 4.3 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými při aniontové výměnné chromatografii proteinu 14-3-3ζ noW. Do první jamky zleva bylo naneseno 5 μl standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z frakcí 13, 15, 17, 21, 23, 24, 25, 26 a 27. Vzorky nanášené na gel vznikly smícháním 4 μl roztoku proteinu odebraného z dané frakce a 1 μl 5× vzorkového pufru.

4.1.3. Gelová permeační chromatografie

Po aniontové výměnné chromatografii byl objem sloučených frakcí zredukován na 2 ml a poté byl proveden poslední purifikační krok - gelová permeační chromatografie (Obr. 4.4, str. 56). Použita byla kolona Superdex 75 10/300. Podobně, jako v případě aniontové výměnné chromatografie, je na chromatogramu vidět jedno lokální maximum odpovídající proteinu 14-3-3ζ noW. Byly jímány frakce o objemu 0,5 ml. Z frakcí 4, 6, 8, 10, 15, 18, 19, 20 a 21 byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE (Obr. 4.5, str. 56). Analýza na SDS-PAGE ukázala, že konečná čistota připraveného proteinu 14-3-3ζ noW je dostatečná pro další experimenty. Frakce 6-15 byly poté sloučeny, zakoncentrovány, byla změřena proteinová koncentrace a protein byl uchován pro další experimenty při teplotě -80 °C. Celkový výtěžek purifikace byl 20 mg proteinu 14-3-3ζ noW ze dvou litrů LB-média.



Obr. 4.4 Chromatogram po gelové permeační chromatografii (kolona Superdex 75 10/300). Modrá křivka představuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na čase. Červenou barvou jsou vyznačeny pozice eluovaných frakcí.



Obr. 4.5 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomasie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými po gelové permeační chromatografii proteinu 14-3-3ζ noW. Do první jamky zleva bylo nanášeno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly nanášeny vzorky z frakcí 4, 6, 8, 10, 15, 18, 19, 20 a 21. Vzorky nanášené na gel vznikly smícháním 4 μ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce a 1 μ l 5 \times vzorkového pufru.

4.2. Purifikace katalytické domény lidské proteinkinasy ASK1 a jejích mutantů

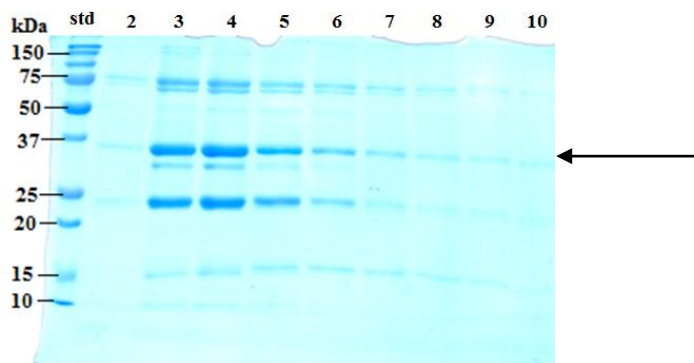
Celkově bylo připraveno osm konstruktů tohoto proteinu – přirozený typ (WT), mutant Ser966Ala (serin v pozici 966 byl zaměněn za alanin), čtyři cysteinové mutanty (mají ponechán pouze jeden cystein na určité pozici, ostatní cysteiny jsou zaměněny za seriny) a dva tryptofanové mutanty (mají ponechán pouze jeden tryptofan ve své sekvenci na konkrétním místě, ostatní tryptofany jsou zaměněny za fenylalaniny). Tyto konstrukty byly připravovány Mgr. Daliborem Koškem. Všechny verze byly purifikovány stejným způsobem.

4.2.1. Vývoj purifikačního protokolu ASK1-KD WT

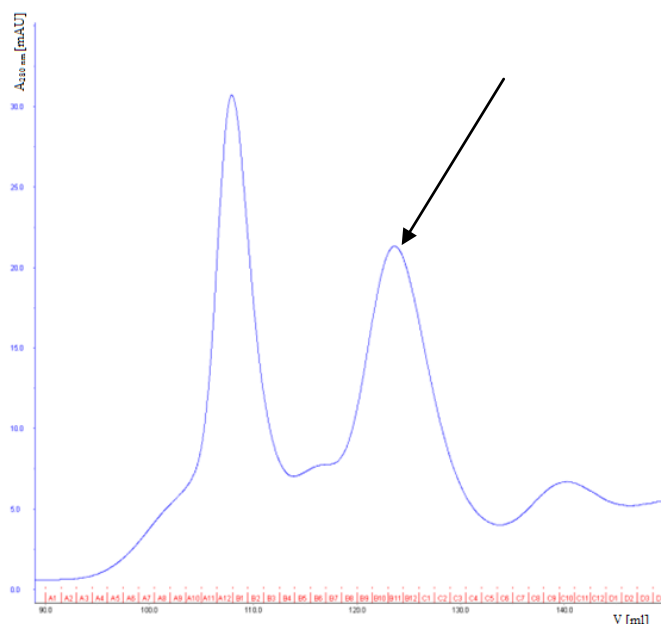
4.2.1.1. Příprava ASK1-KD WT podle původního protokolu

První protokol pro purifikaci katalytické domény ASK1 (ASK1-KD) WT byl částečně odvozen od protokolu uvedeného v publikaci [29]. Pro přípravu byl použit konstrukt, který umožňoval tzv. „leakage“ expresi ASK1-KD jako fúzního proteinu s C-koncovou 6×His kotvou (tento konstrukt neobsahoval štěpné místo mezi sekvencí ASK1 a histidinovou kotvou). K expresi byly použity buňky *E. coli* BL21(DE3) a LB-médium k jejich kultivaci. Prvním purifikačním krokem byla niklová chelatační chromatografie. Eluce byla provedena pomocí pufru obsahujícího imidazol o koncentraci 0,6 mol/l a byly jímány frakce o objemu 1,5 ml. Získané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 4.6, str. 58). V porovnání s proteinem 14-3-3ζ je patrné, že exprese je nižší a je zde přítomna významná kontaminace jinými proteiny, které jsou viditelné na gelu. Ze tří litrů bakteriální kultury bylo získáno 0,7 mg fúzního proteinu.

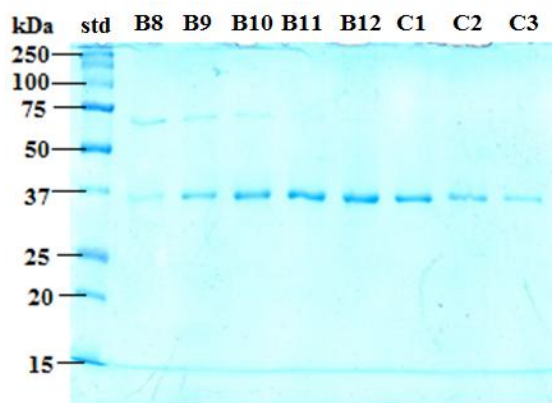
Následně byly eluované frakce 3-7 sloučeny, dialyzovány, koncentrovány na 2 ml a byla provedena gelová permeační chromatografie s použitím kolony Superdex 75 Hiload 26/60 (Obr. 4.7, str. 58). Na obrázku je vidět více absorpčních maxim, příslouchajících více proteinům- kontaminantům. První dominantní maximum pravděpodobně odpovídá agregované formě proteinu ASK1-KD. Druhé maximum, označené šipkou odpovídá proteinu ASK1-KD. Frakce byly jímány o objemu 1 ml. Z frakcí B8-C3 byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE (Obr. 4.8, str. 59).



Obr. 4.6 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými po niklové chelatační chromatografii proteinu ASK1-KD. Do první jamky zleva bylo nanášeno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly nanášeny vzorky z eluovaných frakcí 2 – 10. Vzorky byly připraveny smícháním 10 μ l roztoku proteinu odebraných z frakcí po niklové chelatační chromatografii a 2 μ l 5 \times vzorkového pufru. Šipkou je označen pás odpovídající proteinu ASK1-KD WT o relativní molekulové váze 36 500, vypočítané na základě primární struktury pomocí nástroje ProtParam [67].



Obr. 4.7 Chromatogram po gelové permeační chromatografii proteinu ASK1-KD na koloně Superdex 75 Hiload 26/60. Modrá křivka představuje závislost absorpance při vlnové délce 280 nm eluátu na elučním objemu. Červenou barvou jsou vyznačeny pozice jímáných frakcí. Šipkou je vyznačeno lokální maximum odpovídající eluovanému proteinu ASK1-KD.



Obr. 4.8 Polyakrylamidový gel (15%), obarven *Coomassie brilliant blue R 250*, po SDS-PAGE s frakcemi získanými po gelové permeační chromatografii proteinu ASK1-KD. Do první jamky zleva bylo naneseno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z frakcí B8 – C3 . Vzorky nanášené na gel vznikly smícháním 10 μ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce a 2 μ l 5 \times vzorkového pufru.

Frakce B10 – C3 byly posléze sloučeny, zakoncentrovány, byla změřena proteinová koncentrace a protein byl uchován pro další experimenty při teplotě -80 °C. Konečný výtěžek takto purifikované ASK1-KD WT byl 0,5 mg proteinu ze tří litrů LB-média. Tento výtěžek byl nedostatečný a dále připravený protein neumožňoval odstranění C-koncové 6 \times His-kotvy.

4.2.1.2. Příprava ASK1-KD WT pomocí optimalizovaného protokolu

Protokol popsany v odst. 4.2.1.1, str. 57 v našich podmínkách neposkytoval dostatečně vysoké výtěžky, navíc připravený konstrukt ASK1-KD neumožňoval odstranění C-koncové histidinové kotvy. Proto bylo nutné vytvořit nový konstrukt obsahující štěpné místo pro TEV proteasu mezi sekvencí ASK1-KD a histidinovou kotvou a zároveň byla provedena optimalizace expresního a purifikačního protokolu pro dosažení vyššího výtěžku a lepší čistoty.

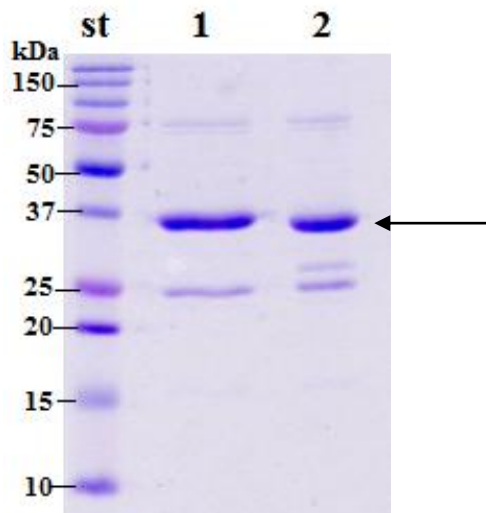
V rámci této optimalizace byl změněn expresní kmen buněk *E. coli*. Namísto kmene BL21(DE3) byly k expresi použity buňky Rosetta. Genetický kód je degenerovaný, to znamená, že existuje víc kodonů, které kódují stejné aminokyseliny. Bakterie *E. coli* jsou prokaryotické organismy. Od eukaryotických organismů se liší jiným „codon usage“, to znamená, že jejich aminokyseliny jsou preferenčně kódovány jinými kodony, než kodony eukaryotických organismů. Pokud je do bakterie zanesen gen původem z eukaryotického

organismu, jako je tomu v případě genu pro lidskou ASK1-KD, jeho aminokyseliny jsou kódovány kodony typickými pro eukaryotický organismus a exprese tím může být značně omezena, protože v bakterii mohou chybět příslušné tRNA. Bakterie *E. coli* kmene Rosetta mají tzv. „different codon usage“. To znamená, že jsou přizpůsobeny k expresi proteinů z eukaryotických organismů.

Dále ke kultivaci bakterií bylo použito TB-médium, které obsahuje víc živin, než LB-médium. To umožňuje růst buněk do vyšší optické hustoty a tím i zvýšení expresního výtěžku proteinu.

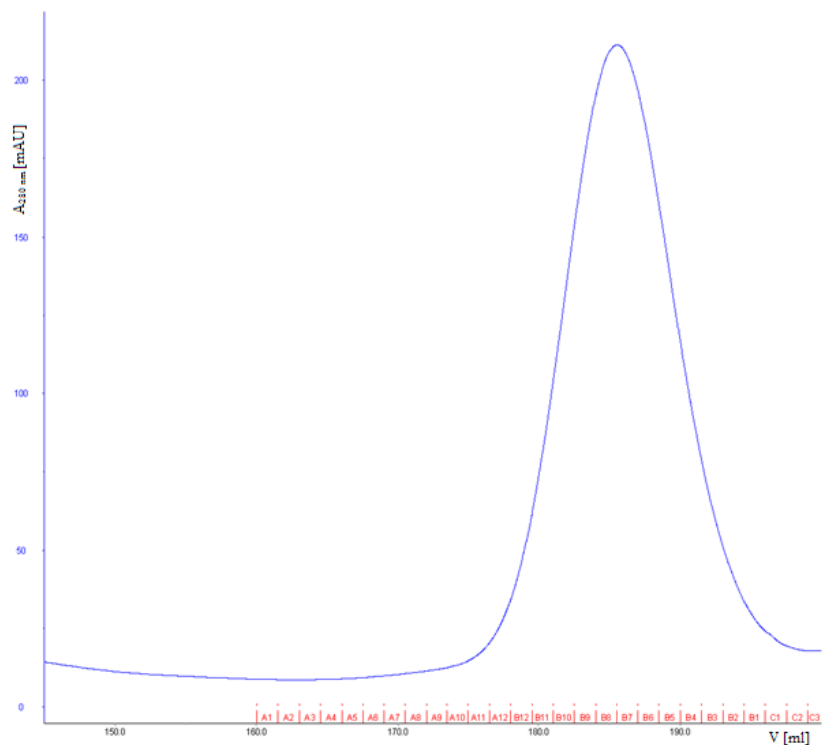
Změněn byl také způsob eluce po niklové chelatační chromatografii, protože bylo zjištěno, že protein ASK1-KD má tendenci agregovat v roztoku o vysoké koncentraci imidazolu (tzn. v elučním pufru po niklové chelatační chromatografii). Proto namísto sbírání proteinů do frakcí, při kterém zůstával protein ASK1-KD relativně dlouho v prostředí o vysoké koncentraci imidazolu, byl protein eluován do stejného objemu dialyzačního pufru. Tím se koncentrace imidazolu okamžitě snížila na jednu polovinu, což zamezilo agregaci eluovaného proteinu.

Změna nastala také při dialýze. Do dialyzační membrány byla přidána TEV proteasa, aby byla z proteinu odstraněna histidinová kotva. Pro ověření úspěšného proběhnutí štěpení fúzního proteinu TEV proteasou byl vždy odebrán vzorek neštěpeného proteinu z eluce po niklové chelatační chromatografii těsně před přidáním TEV proteasy do dialyzační membrány. Protein byl dialyzován přes noc v přítomnosti TEV proteasy. Po dokončené dialýze a štěpení TEV proteasou byl odebrán druhý vzorek proteinu a vzorky štěpeného a neštěpeného proteinu byly poté rozděleny na SDS-PAGE (Obr. 4.9, str. 61). Odštěpení histidinové kotvy je na obrázku vidět v posunu pásu odpovídajícímu proteinu ASK1-KD směrem k nižší molekulové váze. Expresní výtěžek takto purifikovaného proteinu byl 14 mg fúzního proteinu ze 4 l TB-média. Všechny metodické detaily optimalizovaného purifikačního protokolu jsou uvedeny v kapitole 3.4, str. 41.

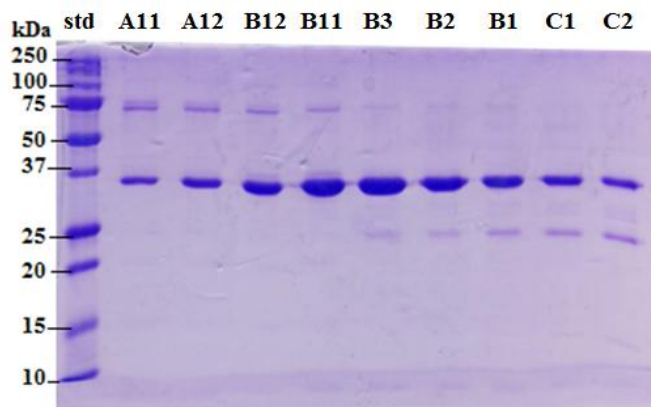


Obr. 4.9 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE se vzorkami proteinu ASK1-KD po niklové chelatační chromatografii. Do první jamky zleva bylo nanášeno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do jamky 1 byl nanášen vzorek proteinu po eluci před přidáním TEV proteasy. Do jamky 2 byl nanášen vzorek proteinu po dialýze a inkubaci s TEV proteasou. Vzorky byly připraveny smícháním 10 μ l roztoku proteinu po niklové chelatační chromatografii a 2 μ l 5 \times vzorkového pufru. Šipkou je znázorněn pás odpovídající ASK1-KD o relativní molekulové váze 36 184 (bez histidinové kotvy), vypočítané na základě primární struktury pomocí nástroje ProtParam [67].

Po ověření štěpení histidinové kotvy od proteinu ASK1-KD proběhla gelová permeační chromatografie dle protokolu uvedeného v odst. 3.4.7, str. 44 (Obr. 4.10, str. 62). V porovnání s původním protokolem (4.2.1.1, str. 57) zde nastala změna v použití kolony Superdex 200 Hiload 26/60, namísto kolony Superdex 75 Hiload 26/60. Tato kolona je schopna lépe separovat proteiny o vyšší relativní molekulové váze, což se ukázalo být výhodné v případě purifikace ASK1-KD. Na obrázku je vidět pouze část chromatogramu, kde je vidět pouze jedno absorpční maximum příslušující proteinu ASK1-KD. Množství proteinových agregátů (jejich eluce na chromatogramu zobrazena není) bylo značně zredukováno oproti původnímu protokolu. Frakce byly jímány o objemu 1 ml. Z frakcí A11, A12, B12, B11, B3, B2, B1, C1 a C2 byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE (Obr. 4.11, str. 62).



Obr. 4.10 Část chromatogramu z gelové permeační chromatografie proteinu ASK1-KD na koloně Superdex 200 HiLoad 26/60. Modrá křivka představuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm eluátu na elučním objemu. Červenou barvou jsou vyznačeny pozice jímáných frakcí.



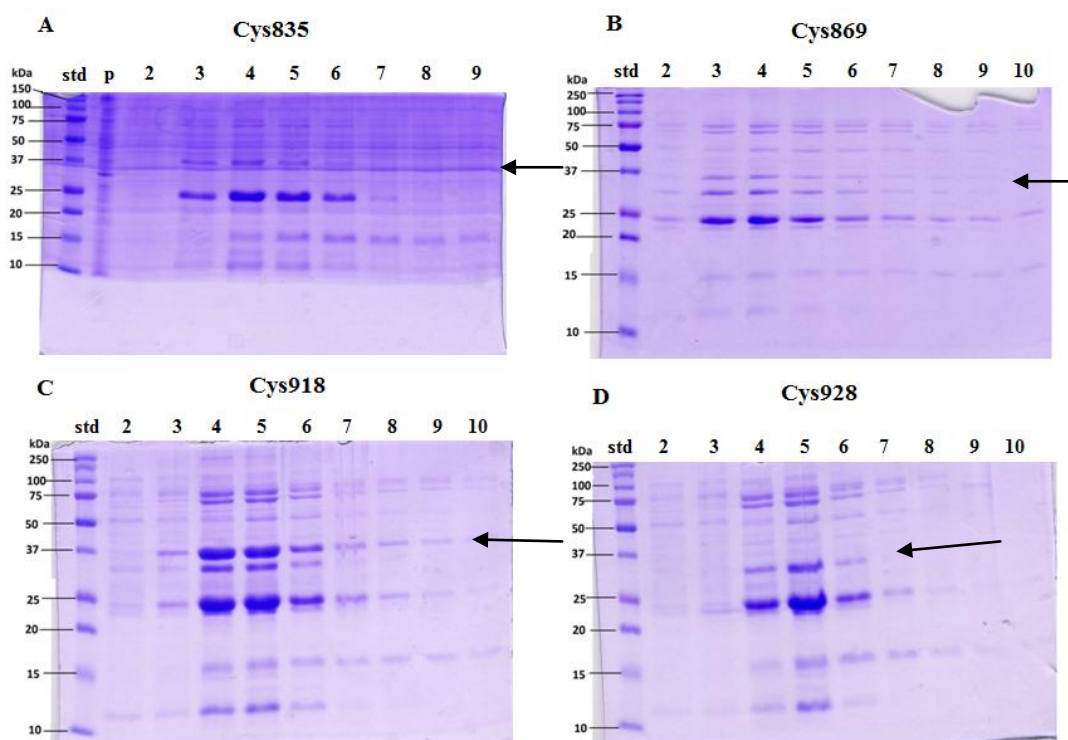
Obr. 4.11 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými po gelové permeační chromatografii s proteinem ASK1-KD. Do první jamky zleva bylo naneseno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z frakcí A11, A12, B12, B11, B3, B2, B1, C1 a C2. Vzorky nanášené na gel vznikly smícháním 10 μ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce a 2 μ l 5 \times vzorkového pufru.

Frakce B11 – B2 byly sloučeny, zakoncentrovány, byla změřena proteinová koncentrace a protein byl zamražen. Výtěžek takto purifikovaného proteinu byl 10 mg čistého proteinu ze čtyř litrů TB-média. Tento výtěžek je několikanásobně vyšší jako tomu bylo u původního purifikačního protokolu, proto lze říct, že se ho optimalizace proběhla úspěšně.

4.2.2. Purifikace cysteinových mutantů ASK1-KD

Pro biofyzikální charakterizaci proteinu je velmi užitečným nástrojem SH-reaktivní fluorescenční sonda. Tato sonda se kovalentně váže k cysteinovému postrannímu řetězci proteinu, a poté je možné sledovat interakce mezi různými částmi povrchu dvou interagujících proteinů. Aby měření měla smysl, je nutné, aby sonda byla navázána na jednom konkrétním místě. Toho lze dosáhnout pouze v případě, že v sekvenci proteinu se vyskytuje pouze jeden cysteinový zbytek na přesně definovaném místě.

K tomuto účelu byly připraveny konstrukty cysteinových mutantů ASK1-KD (mají ponechán pouze jeden cysteinový zbytek na určité pozici, ostatní cysteinové zbytky jsou zaměněny za serinové). Mým úkolem bylo otestovat jejich expresi. Na Obr. 4.12, str. 64 jsou zobrazeny 15% polyakrylamidové gely po SDS-PAGE z frakcí po niklové chelatační chromatografii všech připravených konstruktů cysteinových mutantů: Cys835, Cys869, Cys918 a Cys928 (číslo odpovídá pozici cysteinového zbytku, jenž byl zachován, ostatní cysteinové zbytky v sekvenci byly zaměněny za serinové). Jediný Cys918 měl viditelný výtěžek exprese, přibližně 0,7 mg ze dvou litrů TB-média. Purifikace tohoto proteinu byla dokončena (provedena dle protokolu z odst. 3.4, str. 41). Výtěžek byl 0,5 mg ze dvou litrů TB-média, což je několikanásobně nižší, jak tomu bylo u ASK1-KD WT. Experimenty s tímto mutantem provedeny zatím nebyly, pozice tohoto cysteinu není pro nás zajímavá vzhledem k jeho umístění na C-konci katalytické domény.

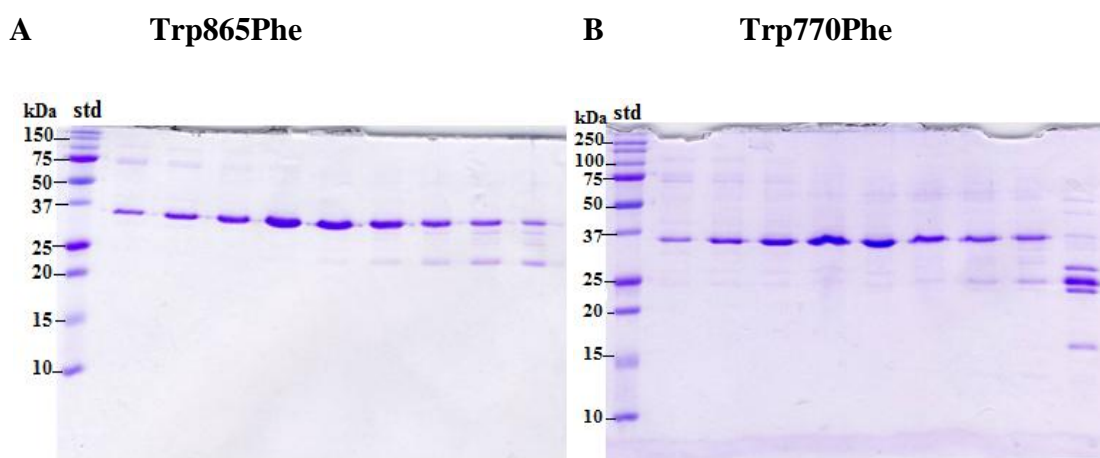


Obr. 4.12 Polyakrylamidové gely (15%), obarveny Coomassie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými po niklové chelatační chromatografii jednotlivých cysteinových mutantů. Do první jamky zleva bylo v každém gelu naneseno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. V případě Cys835 (A) byla do druhé jamky nanesena peleta resuspendovaná v 10 μ l destilované vody (p) a poté byly naneseny frakce 2-9. Pro ostatní mutanty Cys869 (B), Cys918 (C) a Cys928 (D) byly do ostatních jamek naneseny vzorky z frakcí 2-10. Vzorky nanášené na gel vznikly smícháním 10 μ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce a 2 μ l 5 \times vzorkového pufru. Šipkou jsou vyznačeny teoretické pásy odpovídající cysteinovému mutantu ASK1-KD.

4.2.3. Purifikace tryptofanových mutantů ASK1-KD

Pro účely studia proteinů pomocí stacionární tryptofanové fluorescence nebo pomocí časově rozlišené tryptofanové fluorescence byly vytvořeny tryptofanové konstrukty Trp865Phe (tryptofan v pozici 865 zaměněn za fenylalanin) a Trp770Phe (tryptofan v pozici 770 zaměněn za fenylalanin). Konstrukty byly připraveny Mgr. Daliborem Koškem. Proteiny byly purifikovány dle purifikačního protokolu uvedeného v odst. 3.4, str. 41. Na rozdíl od cysteinových mutantů měly tryptofanové mutanty detekovatelný expresní výtěžek (ze čtyř litrů TB-média 2,5 mg fúzního proteinu u mutantu Trp865Phe a 1,9 mg u mutantu

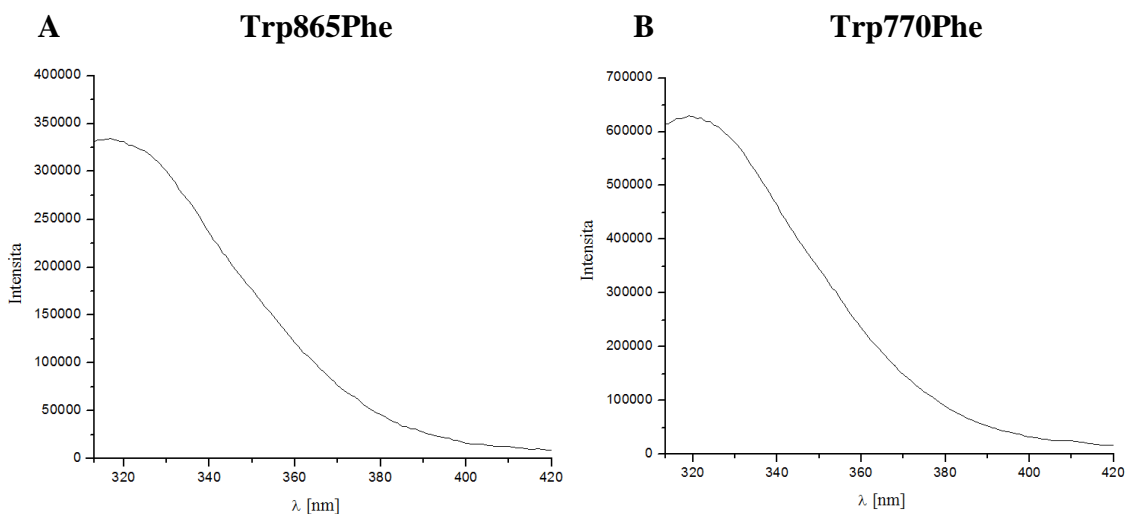
Trp770Phe). Na Obr. 4.13 jsou zobrazeny 15% polyakrylamidové gely po gelové permeační chromatografii. Výtěžek v případě Trp865Phe byl 2 mg čistého proteinu ze čtyř litrů TB-média a v případě mutanta Trp770Phe byl 1,5 mg čistého proteinu ze čtyř litrů TB-média.



Obr. 4.13 Polyakrylamidové gely (15%), obarveny Coomassie brilliant blue R 250, po SDS-PAGE s frakcemi získanými po gelové permeační chromatografii jednotlivých tryptofanových mutantů Trp865Phe (A) a Trp770Phe (B). Do prvních jamek v obou případech bylo nanášeno 5 μ l standardu molekulových hmotností (std), relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa. Do ostatních jamek byly nanášeny vzorky z frakcí po eluci z gelové permeační chromatografie. Vzorky nanášené na gel vznikly smícháním 10 μ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce a 2 μ l 5 \times vzorkového pufru.

4.3. Emisní spektra tryptofanových mutantů ASK1-KD

Po purifikaci tryptofanových mutantů Trp865Phe a Trp770Phe byla změřena jejich emisní spektra v rozmezí emisních vlnových délek 315 – 420 nm při konstantní vlnové délce excitace 297 nm (Obr. 4.14, str. 66). Z obrázku je zřejmé, že spektra jsou si vzájemně podobná, maximum emise se nachází v okolí vlnové délky 320 nm. Tato emisní vlnová délka dobře odpovídá pozici obou tryptofanových zbytků ve struktuře katalytické domény, kde jsou oba tyto zbytky umístěny v hydrofobním prostředí s malou přístupností k polárnímu rozpouštědлу (viz Obr. 5.1, str.78) [74].



Obr. 4.14 Emisní spektra tryptofanových mutantů *ASK1-KD*, *Trp865Phe* (A) a *Trp770Phe* (B). Spektra byla měřena v rozmezí emisních vlnových délek 315 – 420 nm při konstantní vlnové délce excitace 297 nm.

4.4. Stanovení kinasové aktivity *ASK1-KD*

Po purifikaci proteinu *ASK1-KD* WT byla měřena jeho kinasová aktivita za podmínek saturace substrátem - v tomto případě byl zvolen univerzální substrát pro kinasy tzv. myelinový bazický protein (MBP). Standardní metoda pro stanovení kinasové aktivity je založena na měření radioaktivity nuklidu ^{32}P vneseného do molekul fosforylovaného produktu. Vzhledem k tomu, že naše laboratoř není vybavena pro práci s radioaktivitou, rozhodli jsme se pro stanovení kinasové aktivity *ASK1-KD* otestovat dvě spektrofotometrické metody: luminiscenční metodu za použití komerční sady ADP-GloTM [69] a spektroskopickou metodu založenou na změně koncentrace NADH [70].

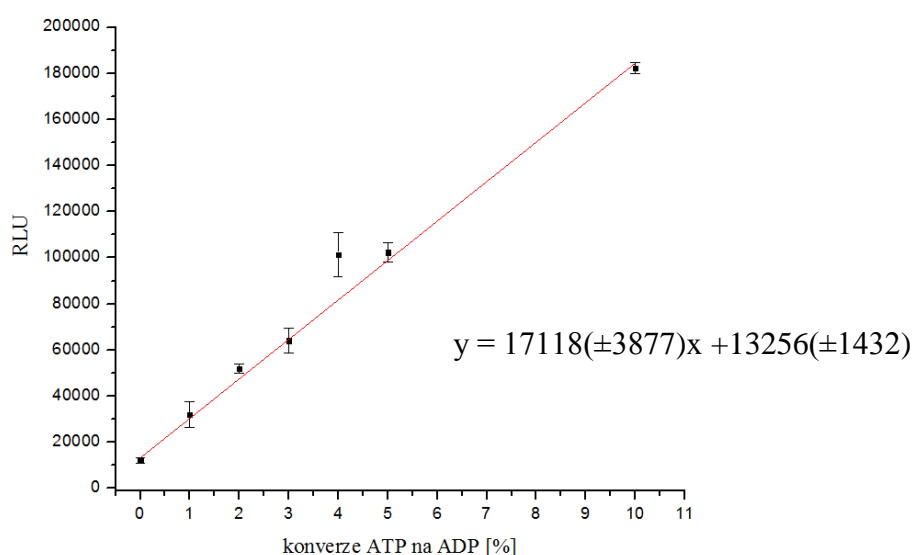
Principem obou metod je kvantifikace konverze ATP na ADP, nikoliv fosforylovaného produktu, jak je tomu u radioaktivní metody. Obě dvě metody se ukázaly jako nevhodné pro stanovení aktivity *ASK1-KD*, zejména vzhledem k její nízké aktivitě. Výsledky nicméně ukázaly, že připravený protein je katalyticky aktivní. Pro detailní kinetickou charakterizaci proteinu *ASK1-KD* je však nutné využít mnohem citlivější radioaktivní metodu, která je založena na kvantifikaci fosforylovaného produktu a které se nyní věnuje jiný člen naší laboratoře.

4.4.1. Luminiscenční metoda za použití komerční sady ADP-Glo™

U této metody se stanovení spotřebovaného ATP v průběhu kinasové reakce provádí ve dvou krocích. Po inkubaci je kinasová reakce ukončena přidáním prvního činidla, které zároveň také odbourává zbytkové ATP v reakční směsi. Po inkubaci je do reakce přidáno druhé činidlo, které má za úkol veškeré ADP v reakční směsi proměnit v ATP a toto nově vzniklé ATP je poté kvantifikováno na základě luminiscenčního signálu vzniklého při reakci ATP s luciferinem za katalýzy luciferasou.

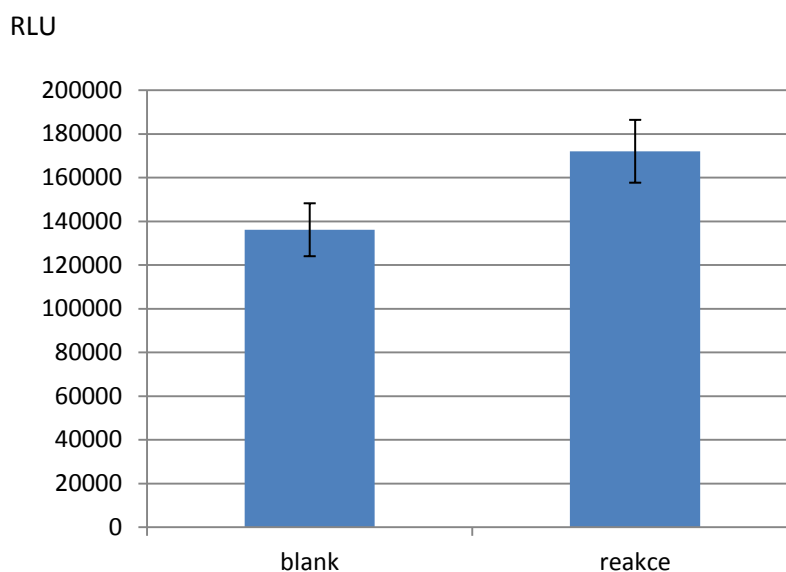
Intenzita luminiscenčního signálu byla měřena v 96-jamkové mikroděstičce pomocí luminiscenční čtečky Infinite M200 PRO schopné počítat emitované fotony, ty jsou poté přepočítány na relativní luminiscenční jednotky RLU. Pro odhad spotřeby ATP byla zkonstruována křivka konverze ATP na ADP (Obr. 4.15), díky které může být luminiscenční signál převeden na spotřebu ATP.

Každá reakce byla měřena třikrát (Obr. 4.16, str. 68). Pro objem a složení reakčních směsí viz Tab. 3.23, str. 47. Blank má identické složení jako kinasová reakce, chybí pouze substrát MBP. Je zřejmé, že pozadí blanku je významné ve srovnání s kinasovou reakcí. Na základě naměřených hodnot RLU s použitím konverzní křivky byla vypočtena orientační hodnota $k_{\text{cat}} = 0,33 \pm 0,30 \text{ min}^{-1}$ (průměr \pm standardní odchylka ze tří měření).



Obr. 4.15 Křivka konverze ATP na ADP stanovena luminiscenční metodou za použití komerční sady ADP-Glo™. Na ose x je vynesena konverze ATP na ADP simulovaná přípravou směsí ATP s ADP v daném poměru dle Tab. 3.24 na str 48. Na ose y je vynesena luminiscenční signál vygenerovaný každou směsí po přidání činidel a dodržení inkubačních

dob v jednotkách RLU. Každá směs byla měřena dvakrát pro statistické vyhodnocení, které je znázorněno chybovými úsečkami.



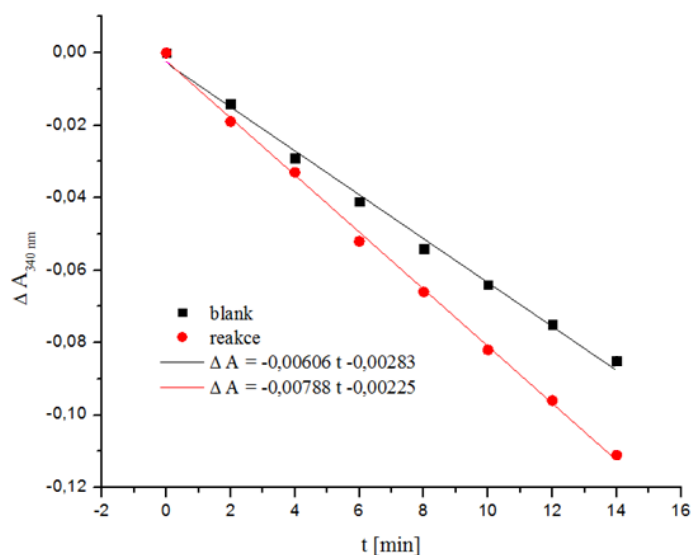
Obr. 4.16 Stanovení kinasové aktivity ASK1-KD luminiscenční metodou za použití komerční sady ADP-Glo™. Na ose x jsou dvě reakční směsi: blank a kinasová reakce. Směsi jsou identické, v blanku pouze chybí substrát MBP. Na ose y je vynesena luminiscenční signál v jednotkách RLU. Kinasová reakce probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Každá reakční směs byla měřena třikrát pro statistické vyhodnocení, které je znázorněno chybovými úsečkami.

4.4.2. Spektroskopická metoda založená na změně koncentrace NADH

V případě této metody, kvantifikace vzniklého ADP v průběhu kinasové reakce je zprostředkována reakcí tohoto ADP s fosfoenolpyruvátem za katalýzy pyruvátkinasou a za vzniku ATP a pyruvátu. Pyruvát je poté laktátdehydrogenasou redukován na laktát za současné oxidace NADH v NAD⁺. Úbytek NADH je sledován spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm.

Reakční směs (Tab. 3.26, str. 49) byla umístěna do křemenné kyvety. Reakce byla odstartována přidávkem ASK1-KD přímo do kyvety. Úbytek absorbance NADH byl měřen na spektrofotometru Cecil 8000 series. Hodnoty absorbancí byly odečítány ve dvouminutových intervalech po dobu 14 minut.

Na Obr. 4.17 je uvedeno jedno reprezentativní měření využitím této metody. Blank má totožné složení s reakční směsí kinasové reakce, chybí v ní pouze substrát MBP. Z obrázku je patrné, že pozadí blanku způsobené nespecifickou hydrolýzou ATP je i v případě této metody vysoké. Ze znalosti molárního absorpčního koeficientu NADH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) byla touto metodou stanovena hodnota k_{cat} na $0,78 \pm 0,32 \text{ min}^{-1}$ (průměr \pm standardní odchylka ze čtyř měření).



Obr. 4.17 Příklad stanovení kinasové aktivity spektroskopickou metodou založenou na úbytku NADH. Na ose x je vynesena čas v minutách. Na ose y je vynesena úbytek absorbance při 340 nm. Kinasová reakce probíhala v kyvetě po dobu 14 minut při 30 °C. Ve dvouminutových intervalech byly odečítány úbytky absorbance při vlnové délce 340 nm. Reakční směs blank má totožné složení s reakční směsí kinasové reakce, chybí v ní pouze substrát MBP.

4.5. Studium interakcí mezi proteiny 14-3-3ζ a ASK1-KD

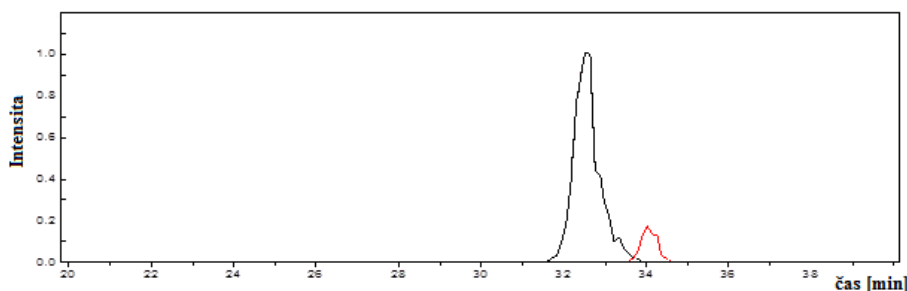
Po purifikaci proteinů ASK1-KD a 14-3-3ζ a jejich mutantů následovala série biofyzikálních měření zabývajících se interakcemi mezi těmito proteiny.

4.5.1. Ověření fosforylace pomocí hmotnostní spektrometrie

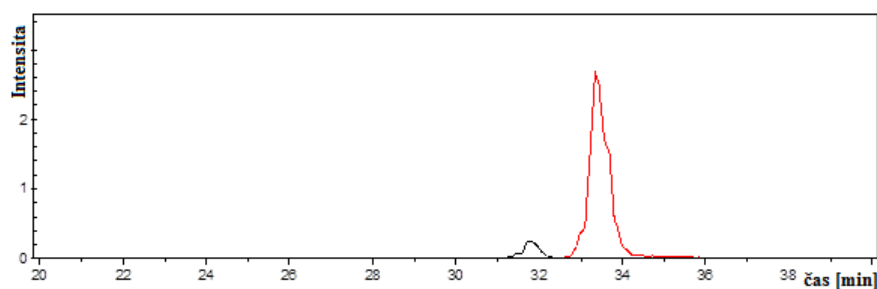
Protein ASK1-KD interaguje s proteinem 14-3-3ζ pouze za podmínky, že je fosforylován na Ser966. ASK1-KD byla proto fosforylována proteinkinasou A (PKA) a výsledek

fosforylace byl poté ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie (Obr. 4.18) v laboratoři RNDr. Petra Mana, Ph.D. (MBÚ AV ČR v.v.i.). Podmínky experimentu jsou uvedeny v odst. 3.7.1, str. 50. Ve štěpící směsi ASK1-KD WT po inkubaci s pepsinem byly dominantně přítomny tři peptidy obsahující vazebný motiv pro protein 14-3-3 ζ . Analýza všech těchto peptidů ukázala, že ASK1-KD WT je po inkubaci s PKA fosforylovaná na Ser966 z více jak 90 %. Na Obr. 4.18 je demonstrována analýza pouze jednoho z těchto peptidů.

A ASK1-KD autoP WT



B ASK1-KD pSer966 WT

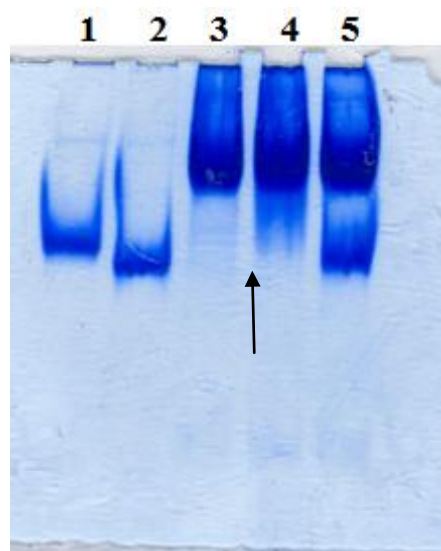


Obr. 4.18 Chromatogramy z LC/MS/MS experimentu (kapalinová chromatografie na reverzní fázi C18 následovaná dvojnásobnou hmotnostně spektrometrickou analýzou) na přístroji ESI-FTICR, Bruker (ionizace elektrosprejem následovaná iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací). Na ose y je vyznačena intenzita signálu m/z (poměr hmotnosti a náboje). Uvedené hodnoty jsou vyděleny faktorem 10^9 . Chromatogramy ukazují pouze signály peptidů LRRISLPVPVL (2+), $m/z = 631,919$ (černá křivka) a LRRIpSLPVPV(2+), $m/z = 671,902$ (červená křivka). V případě ASK1-KD autoP WT (A) je vidět dominantní maximum nefosforylovaného peptidu. Analýza ASK1-KD pSer966 WT (B) ukázala, že fosforylace proběhla minimálně na 90 %.

4.5.2. Nativní elektroforéza

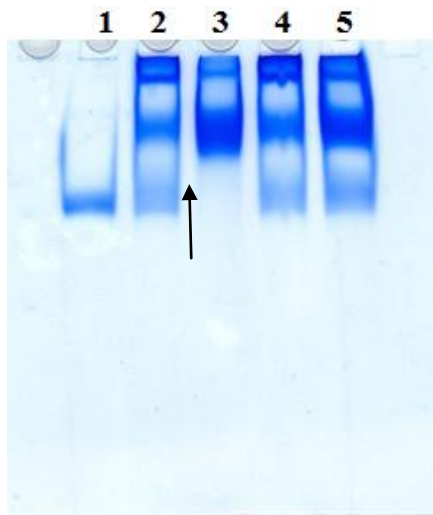
Při nativní elektroforéze proteiny putují gelem ve své nativní formě, proto byla tato metoda zvolena pro sledování tvorby komplexů mezi proteiny ASK1-KD:14-3-3 ζ . V případě interakce je vidět na gelu po nativní elektroforéze společnou migraci proteinů, která se projevuje splnutím dvou pásů odpovídajících jednotlivým proteinům v jeden pás.

Polyakrylamidový gel po nativní elektroforéze na Obr. 4.19 srovnává vazebnou afinitu proteinu ASK1-KD, jenž byl fosforylován na Ser966 (pSer966) k proteinu 14-3-3 ζ WT a k proteinu 14-3-3 ζ Δ C. Je zřejmé, že 14-3-3 ζ Δ C se váže k ASK1-KD pSer966 WT s vyšší vazebnou afinitou jako 14-3-3 ζ WT. Z tohoto důvodu byla pro další studium vazebných interakcí mezi proteiny 14-3-3 ζ a ASK1-KD používána varianta 14-3-3 ζ Δ C.



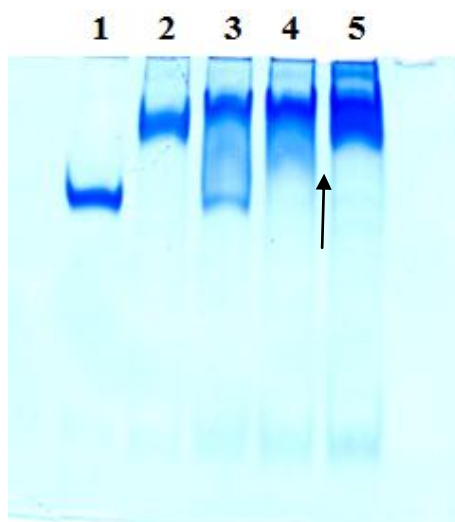
Obr. 4.19 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po nativní elektroforéze srovnávající vazebnou afinitu ASK1-KD pSer966 WT k proteinu 14-3-3 ζ WT a k proteinu 14-3-3 ζ Δ C. Do první jamky bylo naneseno samotné 14-3-3 ζ Δ C, do jamky 2 samotné 14-3-3 ζ WT, do jamky 3 samotná ASK1-KD pSer966 WT, do jamky 4 komplex ASK1-KD pSer966 WT s 14-3-3 ζ Δ C a do jamky 5 komplex ASK1-KD pSer966 WT s 14-3-3 ζ WT. Všechny proteiny měly ve vzorcích 20 μ M koncentraci. Šipkou je vyznačena společná migrace nejlépe interagujících proteinů 14-3-3 ζ Δ C s ASK1-KD pSer966 WT.

Pro ověření hypotézy, že protein 14-3-3 ζ se váže pouze na protein ASK1-KD pSer966, byl připraven experiment srovnávající vazebnou afinitu 14-3-3 ζ Δ C k různým variantám ASK1-KD (Obr. 4.20). Tento experiment jednoznačně ukázal, že nejvyšší vazebnou afinitu k 14-3-3 ζ Δ C má ASK1-KD pSer966 WT.

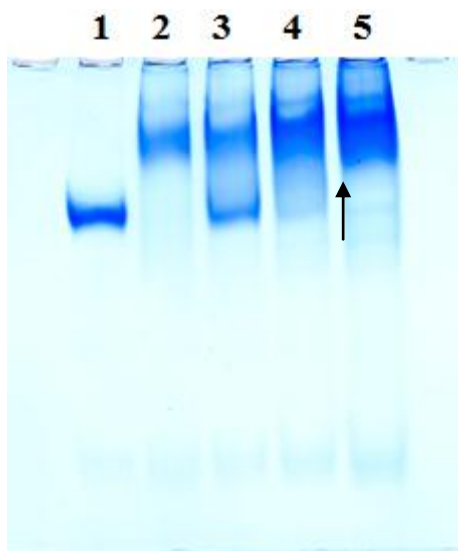


Obr. 4.20 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po nativní elektroforéze. V jamce 1 bylo naneseno samotné 14-3-3 ζ Δ C, v jamce 2 byla nanesena směs ASK1-KD WT autofosforylovaná (autoP) se 14-3-3 ζ Δ C, v jamce 3 směs ASK1-KD pSer966 WT se 14-3-3 ζ Δ C, v jamce 4 směs ASK1-KD autoP Ser966Ala se 14-3-3 ζ Δ C a v jamce 5 směs ASK1-KD autoP Ser966Ala se 14-3-3 ζ Δ C. V každé jamce byl protein 14-3-3 ζ Δ C 8 μ M a všechny varianty ASK1-KD byly 40 μ M. Šipkou je znázorněna společná migrace interagujících proteinů 14-3-3 ζ Δ C s ASK1-KD WT P.

Z důvodu plánovaných experimentů studia interakce mezi proteiny ASK1-KD a 14-3-3 ζ metodou tryptofanové fluorescence bylo nutné ověřit metodou nativní elektroforézy, zda spolu interagují mutant 14-3-3 ζ noW s tryptofanovými mutanty proteinu ASK1-KD pSer966 Trp865Phe (Obr. 4.21, str. 73) a Trp770Phe (Obr. 4.22, str. 73). Do jednotlivých jamek byly naneseny proteiny samotné a komplexy 14-3-3 ζ noW s daným tryptofanovým mutantem ASK1-KD pSer966 v molárních poměrech 1:1, 1:2 a 1:4. V obou případech ve směsi s molárním poměrem 1:4 mizí pás odpovídající migraci samotného 14-3-3 ζ noW, což naznačuje, že v tomto molárním poměru je všechno 14-3-3 ζ noW vázáno v komplexu, které migruje společně s tryptofanovým mutantem ASK1-KD.



Obr. 4.21 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po nativní elektroforéze testující vazebnou afinitu 14-3-3ζ noW k ASK1-KD pSer966 Trp865Phe. Do první jamky bylo nanášeno samotné 14-3-3ζ noW, do druhé jamky samotná ASK1-KD pSer966 Trp865Phe. Do jamek 3,4 a 5 byly aplikovány komplexy 14-3-3ζ noW : ASK1-KD pSer966 Trp865Phe v molárních poměrech 1:1, 1:2 a 1:4. 14-3-3ζ noW bylo v každé jamce 13μM (kromě jamky 2) a ASK1-KD pSer966 Trp865Phe bylo v jamkách 2 a 3 také 13μM, v jamce 4: 26μM a v jamce 5: 52μM. Šipkou je vyznačena společná migrace interagujících proteinů 14-3-3ζ noW s ASK1-KD pSer966 Trp865Phe a vymizení pásu odpovídajícímu migraci samotného 14-3-3ζ noW.



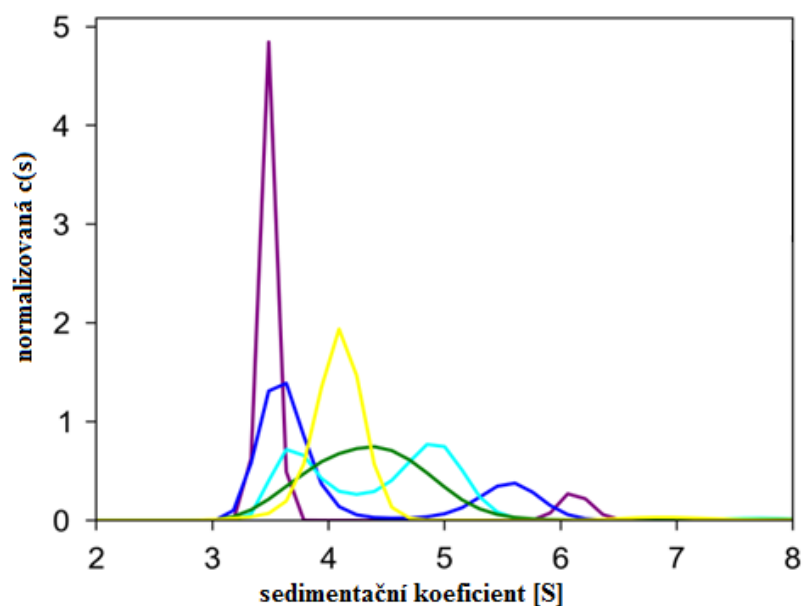
Obr. 4.22 Polyakrylamidový gel (15%), obarven Coomassie brilliant blue R 250, po nativní elektroforéze testující vazebnou afinitu 14-3-3ζ noW k ASK1-KD pSer966 Trp770Phe. Do první jamky bylo nanášeno samotné 14-3-3ζ noW, do druhé jamky samotná ASK1-KD

pSer966 Trp770Phe. Do jamek 3,4 a 5 byly aplikovány komplexy 14-3-3 ζ noW : ASK1-KD pSer966 Trp770Phe v molárních poměrech 1:1, 1:2 a 1:4. 14-3-3 ζ noW bylo v každé jamce 14 μ M (kromě jamky 2) a ASK1-KD pSer966 Trp770Phe bylo v jamkách 2 a 3 také 14 μ M, v jamce 4: 28 μ M a v jamce 5: 56 μ M. Šipkou je vyznačena společná migrace interagujících proteinů 14-3-3 ζ noW s ASK1-KD pSer966 Trp770Phe a vymizení pásu odpovídajícímu migraci samotného 14-3-3 ζ noW.

4.5.3. Analytická ultracentrifugace

Pro detailnější analýzu vazebných interakcí mezi proteiny 14-3-3 ζ a ASK1-KD byla zvolena analytická ultracentrifugace – metoda sedimentačních rychlostí. K měření byl použit přístroj ProteomLabTM XL-I analytická centrifuga (Beckman Coulter, USA).

Vzhledem k tomu, že nativní elektroforéza ukázala (Obr. 4.19, str. 71), že 14-3-3 ζ Δ C se váže k ASK1-KD pSer966 WT s vyšší vazebnou afinitou jako 14-3-3 ζ WT, experimenty byly provedeny se směsí proteinů ASK1-KD pSer966 WT:14-3-3 ζ Δ C (Obr. 4.23, str. 75) při fixní koncentraci proteinu ASK1-KD pSer966 WT a různých koncentracích proteinu 14-3-3 ζ Δ C. Na obrázku je vynesena distribuce sedimentačních koeficientů $c(S)$ normalizovaná na plochu pod křivkou. Z obrázku je vidět posun sedimentačních koeficientů komplexu při různých koncentracích jednotlivých složek, což naznačuje, že rychlost vzniku a zániku komplexu je rychlá v rámci časové škály experimentu, tedy se jedná o transientní interakci. Při molárním poměru 1:10 (kompletní tvorba komplexu) je vidět lokální maximum v oblasti 6,2 S. Analýza dále ukázala, že protein ASK1-KD pSer966 WT s proteinem 14-3-3 ζ interaguje v poměru 2:2 (dimer:dimer). Pro komplex ASK1-KD pSer966 WT:14-3-3 ζ Δ C byla zjištěna zdánlivá disociační konstanta $K_D = (4 \pm 2) \cdot 10^{-6}$. Veškeré experimenty a zpracování dat byly provedeny s asistencí Mgr. Dalibora Koška.



Obr. 4.23 Závislost normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(S)$ na sedimentačním koeficientu S získaná z analytické ultracentrifugace. Fialová křivka představuje směs $18\mu\text{M}$ ASK1-KD pSer966 WT a $180\mu\text{M}$ 14-3-3 ζ ΔC , tmavě modrá křivka představuje směs $18\mu\text{M}$ ASK1-KD pSer966 WT a $54\mu\text{M}$ 14-3-3 ζ ΔC , tyrkysová křivka představuje směs $18\mu\text{M}$ ASK1-KD pSer966 WT a $18\mu\text{M}$ 14-3-3 ζ ΔC , zelená křivka představuje směs $18\mu\text{M}$ ASK1-KD pSer966 WT a $6\mu\text{M}$ 14-3-3 ζ ΔC a žlutá křivka představuje směs $18\mu\text{M}$ ASK1-KD pSer966 WT a $1,8\mu\text{M}$ 14-3-3 ζ ΔC .

5. Diskuse

Protein ASK1 je kinasou rodiny MAP3K účastnící se přenosu signálu v buňce, zejména pokud jde o stresové podněty, jako je tvorba reaktivních kyslíkových intermediátů nebo vazba TNF- α na receptor vně buňky. Trvání její aktivace rozhoduje o dalším osudu buňky, což může být programovaná buněčná smrt – apoptosa, ale také proliferace či diferenciace. Její aktivita je vysoce regulována mnohými různými interakčními partnery, které společně s ní tvoří komplex o vysoké molekulové hmotnosti – tzv. ASK1 signalosom. Protein 14-3-3 je jedním z negativních regulátorů aktivity ASK1, jenž je v klidovém stavu navázán na fosforylovaný Ser966. V přítomnosti stresového signálu je ASK1 na tomto místě defosforylována a dochází k disociaci komplexu ASK1:14-3-3, což je jeden z procesů, které následně vedou k aktivaci ASK1.

Pro hlubší porozumění mechanismu regulace aktivity ASK1 je nutné detailně charakterizovat interakce mezi ASK1 a jejími vazebnými partnery. Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu komplexu katalytické domény ASK1 s proteinem 14-3-3 pro následnou biofyzikální a strukturní charakterizaci. Protokol pro přípravu proteinu 14-3-3 je v naší laboratoři plně optimalizován a umožňuje jeho purifikaci s vysokým výtěžkem a dostatečnou čistotou. Purifikační protokol pro ASK1-KD byl převzat z literatury a jednalo se o protokol, který byl použit pro přípravu proteinu v rámci krystalografické studie [29]. Tento protokol však v našich podmínkách neposkytoval dostatečně vysoké výtěžky a proto bylo nutné jej optimalizovat. V rámci této optimalizace byl jednak změněn expresní kmen buněk *E. coli*, jenž měl optimalizovaný tzv. „codon usage“, a dále bylo použito jiné kultivační médium, které umožňovalo růst buněk do vyšší optické hustoty. Dále bylo zjištěno, že protein ASK1-KD má tendenci agregovat v roztoku o vysoké koncentraci imidazolu (tzn. v pufru, který se používá na eluci při niklové chelatační chromatografii). Proto bylo nutné změnit způsob eluce při niklové chelatační chromatografii. Protein již nebyl sbírán do frakcí, ale byl eluován do stejného objemu dialyzačního pufru. Tím se koncentrace imidazolu okamžitě snížila na jednu polovinu, což zamezilo agregaci eluovaného proteinu. Výsledný purifikační protokol pro protein ASK1-KD tak umožňuje připravit protein s dostatečným výtěžkem (typicky 2,5 mg na 1 l bakteriální kultury) a čistotou dostatečnou pro další experimenty.

Po přípravě ASK1-KD byla testována její aktivita. Standardní metoda pro stanovení kinasové aktivity je založena na měření radioaktivity nuklidu ^{32}P vneseného do molekul fosforylovaného produktu. Vzhledem k tomu, že ^{32}P je silný beta zářič a naše laboratoř není

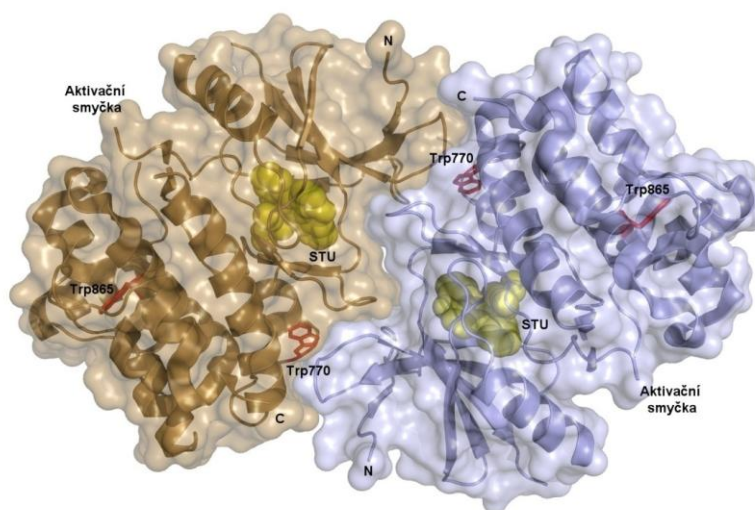
vybavena pro práci s radioaktivitou, rozhodli jsme se pro stanovení kinasové aktivity ASK1-KD otestovat dvě spektrofotometrické metody: luminiscenční metodu za použití komerční sady ADP-Glo™ [69] a spektroskopickou metodu založenou na změně koncentrace NADH [70].

Principem obou metod je kvantifikace konverze ATP na ADP, nikoliv fosforylovaného substrátu, jak je tomu u radioaktivní metody. Nicméně provedené experimenty ukázaly, že ani jedna z testovaných metod není optimální pro stanovení kinasové aktivity ASK1, a to ze dvou hlavních důvodů. Prvním z nich je nízká aktivita proteinu ASK1-KD, což je přirozenou vlastností MAP3K kinas vzhledem k jejich signalizační funkci [4]. Druhým faktorem je nespecifická hydrolýza ATP proteinem ASK1-KD v nepřítomnosti substrátu MBP, která byla pozorována v reakčním prostředí. Tato nespecifická hydrolýza ATP byla vždy vyšší než spotřeba ATP v důsledku kinasové reakce. Tento malý poměr mezi signálem a pozadím neumožnil přesné stanovení kinetických parametrů. Nicméně, obě dvě metody ukázaly, že připravený protein je aktivní. Pro kinetickou charakterizaci proteinu ASK1-KD je nutné využít mnohem citlivější radioaktivní metodu, která je založena na kvantifikaci fosforylovaného produktu a které se nyní věnuje jiný člen naší laboratoře. V odborné literatuře se nám podařilo nalézt pouze jedinou práci, která uvádí konkrétní hodnoty kinetických parametrů této proteinkinasy (získány byly radioaktivní metodou s imunoprecipitovaným kompletním proteinem) a určila k_{cat} na hodnotu $0,018 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ [75]. Komerčně dostupná rekombinantní ASK1 (sekvence 649-946, exprimovaná jako fúzní protein s glutathion S-transferasou v Sf9 buňkách) má deklarovanou aktivitu s $k_{cat} \sim 5-6 \text{ min}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, katalogové číslo A1858). Spektroskopické metody nám pro námi připravený protein (sekvence 659-973, exprimovaný v buňkách *E. coli* jako fúzní protein s 6×His-kotvou na C-konci, která je během purifikace odštěpována) poskytly hodnoty výrazně nižší $\sim 0,30-0,78 \text{ min}^{-1}$ (viz odst. 4.4, str. 66). Nesoulad těchto hodnot může být způsoben tím, že se jedná o různé konstrukty ASK1 a jiný expresní systém (eukaryotický v prvním případě, prokaryotický v druhém). V rámci této práce bylo dále zjištěno, že způsob purifikace, fosforylace a skladovací podmínky mají vliv na aktivitu připraveného enzymu. Tyto pozorované výkyvy mohou souviset s neúplnou autofosforylací ASK1 na Thr838 (viz Obr. 1.4, str. 16), která je nezbytná pro aktivitu katalytické jednotky. Úroveň této autofosforylace na Thr838 je obtížně kontrolovatelná.

Cysteinové mutanty ASK1 byly připravovány s cílem získat proteiny, které by měly pouze jeden cysteinový zbytek na konkrétním místě. Takové proteiny by umožnily vnesení

SH-reaktivní fluorescenční sondy, čímž by bylo umožněno studium interakce mezi různými částmi povrchů ASK1-KD a proteinu 14-3-3 ζ . Ukázalo se, že tyto mutanty mají extrémně nízkou expresi. Je pravděpodobné, že záměna cysteinových zbytků za serinové má zásadní vliv na strukturu proteinu ASK1-KD. Protein se tak mohl stát nerozpustným, což znemožnilo jeho purifikaci.

Tryptofanové mutanty byly připravovány pro následné studium interakce s proteinem 14-3-3 ζ metodou časově rozlišené tryptofanové fluorescence. Oproti cysteinovým mutantům jejich výtěžek byl dostatečný, jak je vidět z Obr. 4.13, str. 65 po gelové permeační chromatografii. Nicméně, v porovnání s ASK1-KD WT, kterou lze bez problémů zakonzentrovat na koncentraci 9 mg/ml, jsou málo rozpustné, lze je zakonzertovat maximálně na 1 mg/ml. Jejich emisní spektra ukazují absorpční maximum okolo 320 nm, což indikuje, že jsou lokalizovány v nepolárním prostředí [74]. Na Obr. 5.1 je znázorněna krystalová struktura dimeru katalytické domény ASK1 s vyznačenými tryptofany v pozicích 770 a 865 v její sekvenci. Z této struktury je vidět, že skutečně, Trp770 a Trp865 jsou umístěny v hydrofobním jádru dimeru a jejich přístupnost k polárnímu rozpouštědлу bude nízká.



Obr. 5.1: Krystalová struktura dimeru ASK1-KD WT ve stuhové reprezentaci s vyznačeným interakčním povrchem. Červeně, tyčinkovou reprezentací jsou vyznačeny tryptofany v pozicích 770 (Trp770) a 865 (Trp865). Žlutou barvou, v kuličkové reprezentaci je vyznačena pozice inhibitoru staurosporinu (STU) v aktivním místě enzymu. C – C-konec polypeptidového řetězce monomeru ASK1-KD, N – N-konec polypeptidového řetězce monomeru ASK1-KD. Dále ve struktuře je vyznačena pozice nestrukturované aktivační smyčky. Vytvořeno v programu PyMOL.

6. Závěr

- Byl vyvinut expresní a purifikační protokol pro přípravu miligramových množství ASK1-KD WT a mutantu Ser966Ala.
- Byly připraveny miligramová množství proteinů 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ Δ C, 14-3-3 ζ noW.
- Enzymová aktivita připravené ASK1-KD WT byla otestována pomocí dvou různých metod. Připravený protein je aktivní.
- ASK1-KD byla úspěšně fosforylována na Ser966 pomocí proteinkinasy A, fosforylace byla ověřena pomocí hmotností spektrometrie.
- Pomocí nativní elektroforézy a analytické ultracentrifugace byla ověřena interakce fosforylované ASK1-KD s proteinem 14-3-3 ζ .
- Byla otestována exprese čtyř cysteinových a dvou tryptofanových mutantů ASK1-KD. Tryptofanové mutanty byly purifikovány a byly změřeny jejich emisní fluorescenční spektra.

Seznam citované literatury

- [1] <http://www.piercenet.com/method/phosphorylation>, 26. 4. 2014
- [2] M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, P.G. Pelicci, Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 (2007) 722–8.
- [3] A. Matsuzawa, H. Ichijo, Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling, *Antioxid. Redox Signal.*, 7 (2005) 472–81.
- [4] J.M. Kyriakis, J. Avruch, Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol. Rev.*, 81 (2001) 807–69.
- [5] Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, M.E. Greenberg, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*, 270 (1995) 1326–31.
- [6] K. Hattori, I. Naguro, C. Runchel, H. Ichijo, The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases, *Cell Commun. Signal.*, 7 (2009) 9.
- [7] R.H. Burdon, Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation, *Free Radic. Biol. Med.*, 18 (1995) 775–94.
- [8] K.Z. Guyton, Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu, N.J. Holbrook, Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂ Role in cell survival following oxidant injury, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 4138–42.
- [9] M.S. Iordanov, B.E. Magun, Different mechanisms of c-Jun NH(2)-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 25801–6.
- [10] M. Verheij, R. Bose, X.H. Lin, B. Yao, W.D. Jarvis, S. Grant, M.J. Birrer, E. Szabo, L.I. Zon, J.M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, R.N. Kolesnick, Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, *Nature*, 380 (1996) 75–9.
- [11] A. Galán, M.L. García-Bermejo, A. Troyano, N.E. Vilaboa, E. de Blas, M.G. Kazanietz, P. Aller, Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 11418–24.
- [12] A. Cheng, S.L. Chan, O. Milhavet, S. Wang, M.P. Mattson, p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 43320–7.

- [13] T. Borsello, P.G.H. Clarke, L. Hirt, A. Vercelli, M. Repici, D.F. Schorderet, J. Bogousslavsky, C. Bonny, A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia, *Nat. Med.*, 9 (2003) 1180–6.
- [14] V. Adler, Z. Yin, S.Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K.D. Tew, M.R. Pincus, M. Sardana, C.J. Henderson, C.R. Wolf, R.J. Davis, Z. Ronai, Regulation of JNK signaling by GSTp, *EMBO J.*, 18 (1999) 1321–34.
- [15] H.S. Park, J.S. Lee, S.H. Huh, J.S. Seo, E.J. Choi, Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase, *EMBO J.*, 20 (2001) 446–56.
- [16] A. Matsuzawa, H. Nishitoh, K. Tobiume, K. Takeda, H. Ichijo, Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice, *Antioxid. Redox Signal.*, 4 (2002) 415–25.
- [17] A. Matsuzawa, H. Ichijo, Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1, *J. Biochem.*, 130 (2001) 1–8.
- [18] B.D. Cuevas, A.N. Abell, G.L. Johnson, Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration, *Oncogene*, 26 (2007) 3159–71.
- [19] J. Matsukawa, A. Matsuzawa, K. Takeda, H. Ichijo, The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response, *J. Biochem.*, 136 (2004) 261–5.
- [20] H. Ichijo, Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways, *Science (80-.)*, 275 (1997) 90–94.
- [21] K. Tobiume, M. Saitoh, H. Ichijo, Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer, *J. Cell. Physiol.*, 191 (2002) 95–104.
- [22] E. Kuranaga, H. Kanuka, T. Igaki, K. Sawamoto, H. Ichijo, H. Okano, M. Miura, Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*, *Nat. Cell Biol.*, 4 (2002) 705–10.
- [23] A. Sagasti, N. Hisamoto, J. Hyodo, M. Tanaka-Hino, K. Matsumoto, C.I. Bargmann, The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates, *Cell*, 105 (2001) 221–32.
- [24] D.H. Kim, R. Feinbaum, G. Alloing, F.E. Emerson, D.A. Garsin, H. Inoue, M. Tanaka-Hino, N. Hisamoto, K. Matsumoto, M.-W. Tan, F.M. Ausubel, A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity, *Science*, 297 (2002) 623–6.
- [25] L. Zhang, J. Chen, H. Fu, Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 (1999) 8511–5.

- [26] P.H. McDonald, C.W. Chow, W.E. Miller, S.A. Laporte, M.E. Field, F.T. Lin, R.J. Davis, R.J. Lefkowitz, Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3, *Science*, 290 (2000) 1574–7.
- [27] T. Takizawa, C. Tatematsu, Y. Nakanishi, Double-stranded RNA-activated protein kinase interacts with apoptosis signal-regulating kinase 1, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 6126–6132.
- [28] G. Fujino, T. Noguchi, A. Matsuzawa, S. Yamauchi, M. Saitoh, K. Takeda, H. Ichijo, Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1, *Mol. Cell. Biol.*, 27 (2007) 8152–63.
- [29] G. Bunkoczi, E. Salah, P. Filippakopoulos, O. Fedorov, S. Müller, F. Sobott, S.A. Parker, H. Zhang, W. Min, B.E. Turk, S. Knapp, Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1, *Structure*, 15 (2007) 1215–26.
- [30] T. Noguchi, K. Takeda, A. Matsuzawa, K. Saegusa, H. Nakano, J. Gohda, J.-I. Inoue, H. Ichijo, Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 37033–40.
- [31] M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono, H. Ichijo, Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1, *EMBO J.*, 17 (1998) 2596–606.
- [32] E.H. Goldman, L. Chen, H. Fu, Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 10442–9.
- [33] W. Min, Y. Lin, S. Tang, L. Yu, H. Zhang, T. Wan, T. Luhn, H. Fu, H. Chen, AIP1 recruits phosphatase PP2A to ASK1 in tumor necrosis factor-induced ASK1-JNK activation, *Circ. Res.*, 102 (2008) 840–8.
- [34] K. Morita, M. Saitoh, K. Tobiume, H. Matsuura, S. Enomoto, H. Nishitoh, H. Ichijo, Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress, *EMBO J.*, 20 (2001) 6028–36.
- [35] H. Nagai, T. Noguchi, K. Homma, K. Katagiri, K. Takeda, A. Matsuzawa, H. Ichijo, Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death, *Mol. Cell*, 36 (2009) 805–18.
- [36] A. Matsuzawa, K. Saegusa, T. Noguchi, C. Sadamitsu, H. Nishitoh, S. Nagai, S. Koyasu, K. Matsumoto, K. Takeda, H. Ichijo, ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity, *Nat. Immunol.*, 6 (2005) 587–92.

- [37] H. Nishitoh, A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka, H. Ichijo, ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats, *Genes Dev.*, 16 (2002) 1345–55.
- [38] H. Nishitoh, M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, H. Ichijo, ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2, *Mol. Cell*, 2 (1998) 389–95.
- [39] X.S. Wang, K. Diener, T.H. Tan, Z. Yao, MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253 (1998) 33–7.
- [40] K. Takeda, R. Shimosono, T. Noguchi, T. Umeda, Y. Morimoto, I. Naguro, K. Tobiume, M. Saitoh, A. Matsuzawa, H. Ichijo, Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in a heteromeric complex with ASK1, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 7522–31.
- [41] T. Iriyama, K. Takeda, H. Nakamura, Y. Morimoto, T. Kuroiwa, J. Mizukami, T. Umeda, T. Noguchi, I. Naguro, H. Nishitoh, K. Saegusa, K. Tobiume, T. Homma, Y. Shimada, H. Tsuda, S. Aiko, I. Imoto, J. Inazawa, K. Chida, Y. Kamei, et al., ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis, *EMBO J.*, 28 (2009) 843–53.
- [42] M. Soga, A. Matsuzawa, H. Ichijo, Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway, *Int. J. Cell Biol.*, 2012 (2012) 439587.
- [43] X. Guo, C. Harada, K. Namekata, A. Matsuzawa, M. Camps, H. Ji, D. Swinnen, C. Jorand-Lebrun, M. Muzerelle, P.-A. Vitte, T. Rückle, A. Kimura, K. Kohyama, Y. Matsumoto, H. Ichijo, T. Harada, Regulation of the severity of neuroinflammation and demyelination by TLR-ASK1-p38 pathway, *EMBO Mol. Med.*, 2 (2010) 504–15.
- [44] M. Benhar, D. Engelberg, A. Levitzki, ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer, *EMBO Rep.*, 3 (2002) 420–5.
- [45] H. Kadowaki, H. Nishitoh, F. Urano, C. Sadamitsu, A. Matsuzawa, K. Takeda, H. Masutani, J. Yodoi, Y. Urano, T. Nagano, H. Ichijo, Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation, *Cell Death Differ.*, 12 (2005) 19–24.
- [46] X. Hu, Z. Weng, C.T. Chu, L. Zhang, G. Cao, Y. Gao, A. Signore, J. Zhu, T. Hastings, J.T. Greenamyre, J. Chen, Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade, *J. Neurosci.*, 31 (2011) 247–61.
- [47] Y. Izumiya, S. Kim, Y. Izumi, K. Yoshida, M. Yoshiyama, A. Matsuzawa, H. Ichijo, H. Iwao, Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling, *Circ. Res.*, 93 (2003) 874–83.

- [48] H. Fu, R.R. Subramanian, S.C. Masters, 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40 (2000) 617–47.
- [49] A. Aitken, 14-3-3 proteins: a historic overview, *Semin. Cancer Biol.*, 16 (2006) 162–72.
- [50] V. Obsilová, J. Silhan, E. Boura, J. Teisinger, T. Obsil, 14-3-3 Proteins: a Family of Versatile Molecular Regulators, *Physiol. Res.*, 57 Suppl 3 (2008) S11–21.
- [51] E.W. Wilker, R.A. Grant, S.C. Artim, M.B. Yaffe, A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 18891–8.
- [52] A. Aitken, Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation Chromosome location of mammalian isoforms and variants, *Plant Mol. Biol.*, 50 (2002) 993–1010.
- [53] M. Chaudhri, M. Scarabel, A. Aitken, Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300 (2003) 679–85.
- [54] D. Liu, J. Bienkowska, C. Petosa, R.J. Collier, H. Fu, R. Liddington, Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein, *Nature*, 376 (1995) 191–4.
- [55] A.B. Truong, S.C. Masters, H. Yang, H. Fu, Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction, *Proteins*, 49 (2002) 321–5.
- [56] W. Shen, A.C. Clark, S.C. Huber, The C-terminal tail of Arabidopsis 14-3-3omega functions as an autoinhibitor and may contain a tenth alpha-helix, *Plant J.*, 34 (2003) 473–84.
- [57] M.B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P.R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, L.C. Cantley, The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity, *Cell*, 91 (1997) 961–71.
- [58] K. Rittinger, J. Budman, J. Xu, S. Volinia, L.C. Cantley, S.J. Smerdon, S.J. Gamblin, M.B. Yaffe, Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding, *Mol. Cell*, 4 (1999) 153–66.
- [59] C. Johnson, S. Crowther, M.J. Stafford, D.G. Campbell, R. Toth, C. MacKintosh, Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites, *Biochem. J.*, 427 (2010) 69–78.
- [60] B. Kostecky, A.T. Saurin, A. Purkiss, P.J. Parker, N.Q. McDonald, Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon, *EMBO Rep.*, 10 (2009) 983–9.
- [61] M.B. Yaffe, How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis, *FEBS Lett.*, 513 (2002) 53–7.

- [62] S. Ganguly, J.A. Gastel, J.L. Weller, C. Schwartz, H. Jaffe, M.A. Namboodiri, S.L. Coon, A.B. Hickman, M. Rollag, T. Obsil, P. Beauverger, G. Ferry, J.A. Boutin, D.C. Klein, Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (2001) 8083–8.
- [63] A. Brunet, A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, M.E. Greenberg, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell*, 96 (1999) 857–68.
- [64] N. Davezac, V. Baldin, B. Gabrielli, A. Forrest, N. Theis-Febvre, M. Yashida, B. Ducommun, Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization, *Oncogene*, 19 (2000) 2179–85.
- [65] C.M. Grozinger, S.L. Schreiber, Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (2000) 7835–40.
- [66] A. Agarwal-Mawal, H.Y. Qureshi, P.W. Cafferty, Z. Yuan, D. Han, R. Lin, H.K. Paudel, 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 12722–8.
- [67] <http://www.expasy.org>, 6.5. 2014
- [68] S. Tan, A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, 21 (2001) 224–34.
- [69] H. Zegzouti, M. Zdanovskaia, K. Hsiao, S. a Goueli, ADP-Glo: A Bioluminescent and homogeneous ADP monitoring assay for kinases, *Assay Drug Dev. Technol.*, 7 (2009) 560–72.
- [70] <http://med.upenn.edu/ostaplab/documents/NADHLinkedAssayforATPaseMeasurements.pdf>, 1.5. 2014
- [71] <http://sednterp.unh.edu/>, 2.5. 2014
- [72] A.G. Salvay, M. Santamaria, M. le Maire, C. Ebel, Analytical ultracentrifugation sedimentation velocity for the characterization of detergent-solubilized membrane proteins Ca⁺⁺-ATPase and ExbB, *J. Biol. Phys.*, 33 (2007) 399–419.
- [73] J.C.D. Houtman, P.H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L.E. Samelson, P. Schuck, Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling, *Protein Sci.*, 16 (2007) 30–42.
- [74] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition, Springer, New York, 2006.

- [75] E. Sturchler, D. Feurstein, P. McDonald, D. Duckett, Mechanism of oxidative stress-induced ASK1-catalyzed MKK6 phosphorylation, *Biochemistry*, 49 (2010) 4094–102.
- [76] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>No Title, 28.4. 2014

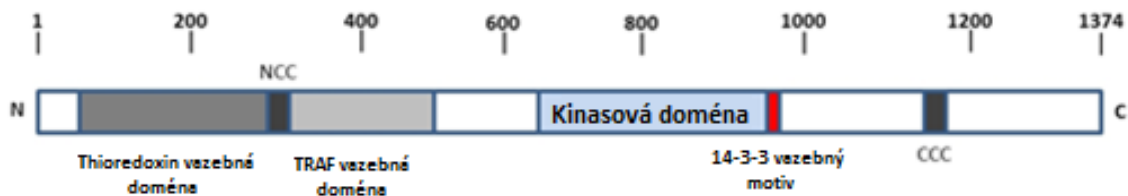
Příloha

Sekvence aminokyselin proteinu ASK1 WT [76]

	10	20	30	40	50	60
MSTEAD	EGIT	FSVPPFAPSG	FCTIPEGGIC	RRGGAAAVGE	GEEHQ	LPPPP PGSFWNVESA
	70	80	90	100	110	120
AAPGIGCPAA	TSSSSATRGR	GSSVGGGSRR	TTVAYVINEA	SQGQLVVAES	EALQSLREAC	
	130	140	150	160	170	180
ETVGATLETL	HFGKLDLDFGET	TVLDRFYND	IAVVEMSDAF	RQPSLFYHLG	VRESFSMANN	
	190	200	210	220	230	240
IILYC	DTNSD	SLQSLKEIIC	QKNTMCTGNY	TFVPYMITPH	NKVYCCDSSF	MKGLTELMQP
	250	260	270	280	290	300
NFELL	LGPI	LPLVDRFIQL	LKVAQASSSQ	YFRESILNDI	RKARNLYTGG	ELAAELARIR
	310	320	330	340	350	360
QRVDNIEVLT	ADIVINLLLS	YRDIQDYDSI	VKLVETLEKL	PTFDLASHHH	VKFHYAFALN	
	370	380	390	400	410	420
RRNLPGDRAK	ALDIMIPMVQ	SEGQVASDMY	CLVGRIYKDM	FLDSNFTDTE	SRDHGASWFK	
	430	440	450	460	470	480
KAFESEPTLQ	SGINYAVLLL	AAGHQFESSF	ELRKVGKLS	SLLGKKGNLE	KLQSYWEVGF	
	490	500	510	520	530	540
FLGASV	LAND	HMRVIQASEK	LFKLKTPAWY	LKSIVETILI	YKHFVKLTTE	QPVAKQELVD
	550	560	570	580	590	600
FWMD	FLVEAT	KTDVTVVRFP	VLILEPTKIY	QPSYLSINNE	VEEKTISIWH	VLPDDKKGIIH
	610	620	630	640	650	660
EWN	F	SASSVR	GVSISKFEER	CCFLYVLHNS	DDFQIYFCTE	LHCKKFFEMV
	670	680	690	700	710	720
TEEGDCESDL	LEYDYEYDEN	GDRVVLGKGT	YGIVYAGRDL	SNQVRIAIKE	IPERDSRYSQ	
	730	740	750	760	770	780
PLHEEIALHK	HLKHK	NIVQY	LGSFSENGFI	KIFMEQVPGG	SLSALLRSKW	GPLKDNEQTI
	790	800	810	820	830	840
GFYTKQILEG	LKYLHDNQIV	HRDIKGDNVL	INTYSGVLKI	SDFGTSKRLA	GINPCTETFT	
	850	860	870	880	890	900
GT	LQYMAPEI	IDKGPRGYGK	AADIWSLGC	IIEMATGKPP	FYELGEPQAA	MFKVGMFKVH
	910	920	930	940	950	960
PEIPESMSAE	AKAFILKCFE	PDPDKRACAN	DLLVDEFLKV	SSK	KKKTQPK	LSALSAGSNE
	970	980	990	1000	1010	1020
YLR	SI	SLPVP	VLVEDTSSSS	EYGSVSPDTE	LKVDPFSFKT	RAKSCGERDV
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
PDENFEDHSA	PPSPEEKDSG	FFMLRKDSER	RATLHRILTE	DQDKIVRNLM	ESLAQGAEFP	
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
KLKWEHITTL	IASLREFVRS	TDRKIIATTL	SKLLELDFD	SHGISQVQVV	LFGFQDAVNK	
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
VLRNHNIKPH	WMFALDSIIR	KAVQTAITIL	VP	ELRPHFSL	ASESDTADQE	DLDVEDDHEE
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
QPSNQTVRRP	QAVIEDAVAT	SGVSTLSSTV	SHDSQSAHRS	LN	VQLGRMKI	ETNRLLEELV
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
RKEKELQALL	HRAIEEKDQE	IKHLKLSQP	IEIPELPVFH	LNSSGTNTED	SELTDWLRVN	
	1330	1340	1350	1360	1370	
GAEDTISR	LAEDYTL	LDV	LYYVTRDDLK	CLRLRGGMLC	TLWKAIDFR	NKQT

Počet aminokyselin: 1374

Rozdělení na úseky [21], [28]:



Proteinový úsek	Umístění v sekvenci
Vazebné místo pro thioredoxin	46-277
N-koncová coiled-coil doména	297-324
Vazebné místo pro TRAF	384-655
Katalytická doména	658-940
Aktivační smyčka	831-838
Vazebné místo pro 14-3-3	941-973
C-koncová coiled-coil doména	1171-1233

- **S** - Ser966, fosforylační místo pro 14-3-3
- **T** - autofosforylační místa
- **W** - tryptofanové zbytky mutované u tryptofanových mutantů
- **C** - cysteinové zbytky mutované u cysteinových mutantů

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka