

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
Klinická a toxikologická analýza



**Příprava a charakterizace
N-terminálně zkrácené verze
enzymu serotonin
N-acetyltransferázy**

Diplomová práce

Praha 2006

Vypracovala: Bc. Veronika Klatovská
Školitel: RNDr. Tomáš Obšil, PhD.

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Obšilovi PhD. za všestrannou pomoc a cenné připomínky při vypracování diplomové práce.

Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Děkuji svému příteli za psychickou podporu, toleranci a technickou výpomoc.

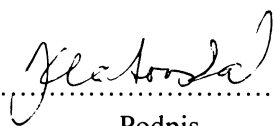
Děkuji svým rodičům za celoživotní podporu, přízeň a ochotu.

Prohlášení

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

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

V Praze dne 5. 5. 2006


.....
Podpis

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
1. Úvod	6
2. Literární přehled	7
2.1 Cirkadiánní hodiny	7
2.1.1 Poruchy biologických rytmů	7
2.2 Serotonin N-acetyltransferáza (AANAT)	8
2.2.1 Lokalizace AANAT	9
2.2.2 Regulace aktivity enzymu	9
2.2.3 Struktura AANAT a vazba na 14-3-3 protein	11
2.2.3.1 14-3-3 proteiny	12
2.2.4 Důvody studia zkrácených verzí AANAT	12
3. Cíle diplomové práce	14
4. Materiál	15
4.1 Použité chemikálie	15
4.2 Přístroje	16
4.3 Ostatní materiál	17
5. Experimentální část	18
5.1 Transformace plazmidové DNA do bakterií <i>Escherichia coli</i>	18
5.2 Exprese proteinu AANAT	19
5.3 Elektroforéza SDS-PAGE	20
5.4 Purifikace AANAT	22
5.4.1 Příprava bakteriálního lyzátu	22
5.4.2 Afinitní chromatografie	23
5.4.3 Dialýza	24
5.4.4 Měření koncentrace	25
5.4.5 Thrombinové štěpení	25
5.4.6 Zkoncentrování roztoků proteinu	25
5.4.7 Gelová filtrace	26
5.5 Vazebné studie	28
5.5.1 Fosforylace AANAT	28
5.5.2 Nativní elektroforéza	29
5.5.3 Test interakce pomocí gelové filtrace	32

5.6 Stanovení aktivity AANAT pomocí DTNB	
6. Výsledky	35
6.1 Exprese AANAT ₃₂₋₂₀₇	35
6.1.1 Sekvence cDNA a transformace do buněk <i>E.coli</i> BL21(DE3)	35
6.2 Purifikace bílkoviny	35
6.2.1 GST afinitní chromatografie	35
6.2.2 Štěpení fúzní bílkoviny a měření její koncentrace	36
6.2.3 Gelová chromatografie	38
6.3 Stanovení enzymové aktivity	39
6.4 Fosforylace a test interakce se 14-3-3 proteinem	41
6.4.1 Ověření interakce pomocí nativní elektroforézy	42
6.4.2 Nepřímý test interakce pAANAT se 14-3-3ζ proteinem pomocí gelové filtrace	43
7. Diskuze	47
8. Závěr	49
Literatura	50
Přílohy	52

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AANAT	Serotonin N-acetyltransferáza, (EC 2.3.1.87)
pAANAT	fosforylovaná forma AANAT
AcCoA	acetyl koenzym A
Amp	antibiotikum ampicilin
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenozin trifosfát
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
c	molární koncentrace [mol dm ⁻³]
Da (Dalton)	jednotky hmotnosti používané v biomedicínských vědách. Jeden Da představuje molární hmotnost atomu vodíku, tj. 1g.mol ⁻¹ . Používají se i předpony ze soustavy jednotek SI, jako např. kDa = 1000 Da.
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5-dithio-bis(2-nitrobenzenová kyselina) = činidlo dle Ellmanové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELFO	elektroforéza
<i>E. coli</i>	bakterie <i>Escherichia coli</i>
ϵ_λ	molární absorpční koeficient při vlnové délce λ [mol ⁻¹ m ²]
GST	glutation S-transferáza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	název média dle Lurii a Bertaniho
l	tloušťka květy [cm]
m	hmotnost [kg]
Mw	relativní molekulová hmotnost
MCO (Molecularweight cut off)	molekul. hmotnost, při které už molekuly neprojdou póry membrány
n	molární množství [mol]
PKA	proteinkináza A
mRNA	ribonukleová kyselina
rpm (revolution per minute)	otáčky za minutu
RT (room temperature)	pokožová teplota (23 °C)
SCN	suprachiasmatické jádro
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
Ser	serin
Thr	threonin

1 Úvod

Všechny formy života na zemi podléhají cyklům, které mají přibližně 24 hodinový rytmus [1]. Významnou roli při řízení denních rytmů, tzv. cirkadiánních rytmů (*circa diem* = přibližně den) hraje hormon melatonin. Epifýza (šišinka) prostřednictvím melatoninu vyvolává cyklické změny většiny biologických funkcí v závislosti na střídání světla a tmy. Zvláště zřetelný je cyklus bdění a spánku nebo tělesné teploty. Cyklické změny jsou pozorovány v produkci hormonů, v příjmu potravy, v pohybové aktivitě, nebo u dechové a srdeční frekvence [2].

Hladina melatoninu roste vždy v noci a klesá ve dne. Zvýšenou produkci melatoninu má na svědomí zvýšená aktivita enzymu serotonin N-acetyltransferázy (AANAT) [1]. Tento protein patří do široké rodiny acetyl-transferázových enzymů. Je přítomen u zvířat, bakterií a kvasinek, u ostatních živých organismů se nevyskytuje. AANAT katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na serotonin. Produkt této reakce je poté methylován hydroxyindol-O-methyltransferázou (HIOMT) za vzniku melatoninu (viz obr. 2.1, str. 8). Zatímco aktivita HIOMT zůstává během 24 hodin téměř konstantní, aktivita AANAT se cyklicky mění, čímž přímo ovlivňuje denní rytmus syntézy melatoninu [3-6].

2 Literární přehled

2.1 Cirkadiánní hodiny

Významným znakem biologických systémů je schopnost vytvářet vnitřní cirkadiánní rytmus, který je sladěn s 24 hodinovým světelným cyklem. Klíčovým výstupním signálem cirkadiánního cyklu obratlovců je melatonin. Hladina melatoninu začíná prudce stoupat, je-li organismus delší dobu vystaven tmě, s maximem hodnot kolem tzv. subjektivní půlnoci (cca kolem 2.- 3. hodiny). Koncentrace melatoninu v krvi vzrůstá v noci v průměru asi desetkrát. Melatonin je považován za zdroj hlavního, ale i zpětnovazebného signálu pro biologické hodiny [7]. Tento hormon poskytuje organizmu nejen informace o čase, ale má řadu dalších funkcí – zlepšuje kvalitu spánku, podporuje imunitní systém, působí jako antioxydant, zpomaluje stárnutí [8].

Mozek dostává informace o změnách světla a tmy z gangliových buněk umístěných v sítnici oka, které obsahují melanopsin sloužící k detekci světla. Tyto buňky zaznamenávají celkovou úroveň a trvání osvětlení, ale nereagují na jeho náhlé změny. Informace o stavu osvětlení předávají řídicímu orgánu v mozku zvanému suprachiasmatické jádro (SCN). Odtud jsou signály vedeny k částem mozku a orgánům, které kontrolují cirkadiánní procesy.

SCN řídí produkci melatoninu vedením vzruchů k paraventriculárnímu jádru a přes ně až k epifýze, která tento hormon vyrábí. Na základě informace o setmění dostane epifýza signál, aby začala produkovat melatonin a připravila tak celý organizmus ke spánku. Ráno opět po informaci o stoupající úrovni denního světla přijde opačný signál k zastavení produkce tohoto hormonu [9-11].

2.1.1 Poruchy biologických rytmů

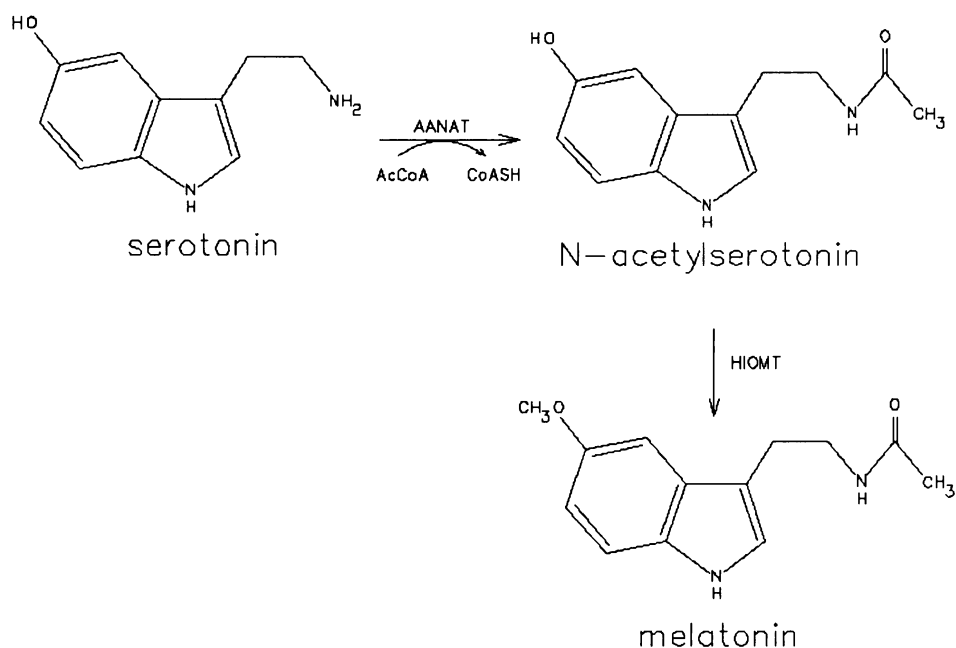
Nesoulad mezi průběhem střídání světla a tmy a denním režimem může vyvolávat lehčí nebo i velmi závažné poruchy. Je dobře známo, že takové poruchy a nutnost vyrovnávat narušení cirkadiánního rytmu vyvolává náhlé přemístění do jiného časového pásma. Velmi nepříznivě se mohou na člověku projevit rozdíly v synchronizaci biologických rytmů zejména v případech, kdy vznikají časové posuny jednotlivých

činností proti dennímu rytmu, jako tomu je u pracovníků s posunem směn, při práci v noci (například i studium), kdy se sice aktivity posunují do noční doby, ale není možné přitom ovlivňovat produkci hormonů (např. melatoninu nebo kortizolu), tělesnou teplotu atd. U takových osob se časem zvyšuje výskyt srdečních chorob, potíží se zažívacím traktem, poruch spánku i jiných obtíží [9-11].

2.2 Serotonin N-acetyltransferáza (AANAT)

AANAT patří do velmi široké rodiny enzymů, které jsou v přírodě všeobecně rozšířeny a které používají AcCoA k acylaci svých substrátů [12].

Tento enzym má na starosti regulaci syntézy melatoninu. Katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A (AcCoA) na primární amin serotoninu. Produkt této reakce, N-acetylserotonin, je poté methylován hydroxyindol-O-methyltransferázou (HIOMT) za vzniku melatoninu (viz obr. 2.1).



Obr.2.1 Biochemická dráha syntézy melatoninu ze serotoninu.

Serotonin (5-hydroxytryptamin) je přeměněn na melatonin pomocí dvou enzymů, serotonin N-acetyltransferázy (AANAT) a hydroxyindol-O-metyltransferázy (HIOMT).

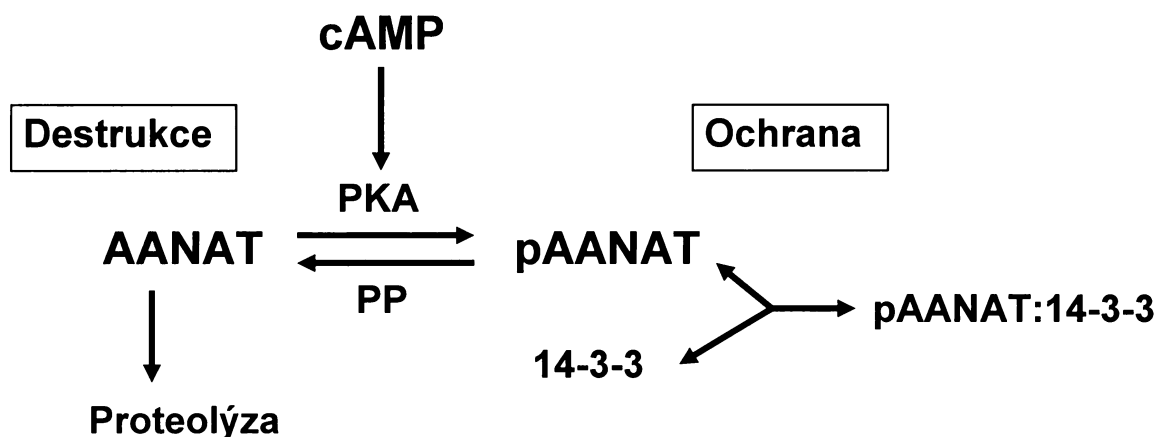
2.2.1 Lokalizace AANAT

Pro lepší porozumění regulaci melatoninu u člověka byla AANAT v roce 2002 studována u makaka (*Macaca mulatta*). Bylo zjištěno, že mRNA AANAT se hojně vyskytuje v epifýze a na sítnici oka. V epifýze je stejnoměrně distribuována, zatímco v sítnici je umístěna na fotoreceptorech. Hladiny mRNA v epifýze a sítnici jsou ve dne i v noci téměř stejné. Naproti tomu aktivita a množství AANAT v noci vzrůstá více než čtyřikrát v obou tkáních. Z tohoto poznatku lze usoudit, že posttranskripční kontrola tohoto enzymu hraje v regulaci syntézy melatoninu hlavní roli [13].

2.2.2 Regulace aktivity enzymu

Stabilní a aktivní stav AANAT je regulován pomocí cAMP. Stabilní stav enzymu je u některých živočišných druhů ovlivněn cAMP přes aktivaci transkripce, u všech druhů přes inhibici proteolýzy (viz obr. 2.2) [6].

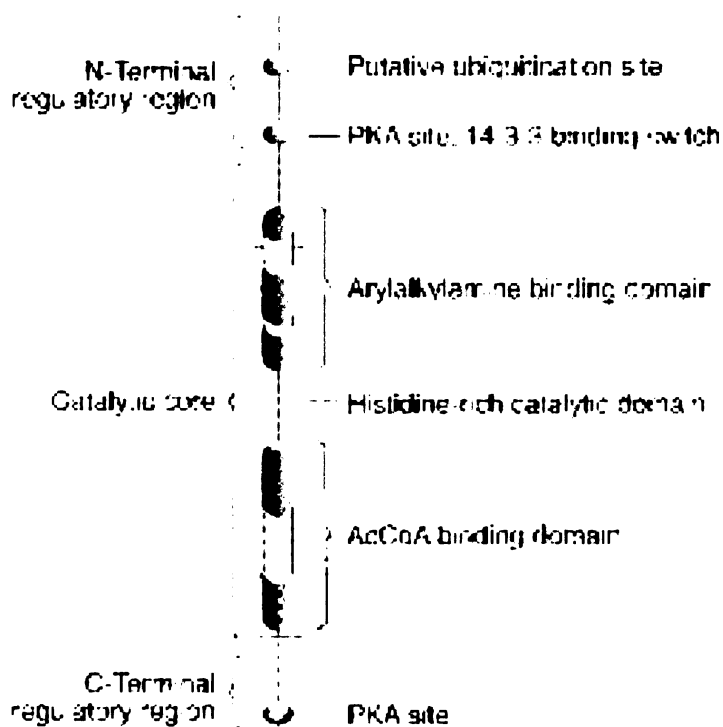
cAMP řídí aktivitu AANAT řadou mechanismů, jejichž důležitost se liší druh od druhu [14]. Např. u hlodavců cAMP řídí velké zvýšení mRNA AANAT, což vede ke zvýšení její aktivity [5]. Ukázalo se, že tento mechanismus je klíčový i u dalších druhů jako je např. ovce, kde je hladina mRNA prakticky neměnná [15].



Obr. 2.2 Řízení aktivity serotonin *N*-acetyltransferázy cyklickým AMP.

Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) aktivuje fosfokinázu A (PKA), která fosforyluje AANAT. Fosforylovaný enzym tvoří komplex s regulačním proteinem 14-3-3, čímž je aktivován a chráněn před proteolýzou.

Předpokládalo se, že cAMP částečně reguluje AANAT pomocí dvou evolučně konzervovaných fosforylačních míst pro proteinkinázu A umístěných na obou koncích molekuly proteinu (viz obr. 2.3). Tato hypotéza byla rozvinuta a dnes již existuje důkaz o tom, že fosforylace zprostředkovaná cAMP aktivuje vazbu AANAT na regulační proteiny 14-3-3 (rodina vysoce konzervovaných izoform, viz kapitola 2.2.3.1) [16].



Obr. 2.3: Schéma serotonin *N*-acetyltransferázy obratlovců.

Centrální katalytické jádro je obklopeno regulačními oblastmi, z nichž každá obsahuje PKA vazebné místo. N terminální PKA místo se nachází uvnitř vysoce afinitního 14-3-3 vazebného motivu.

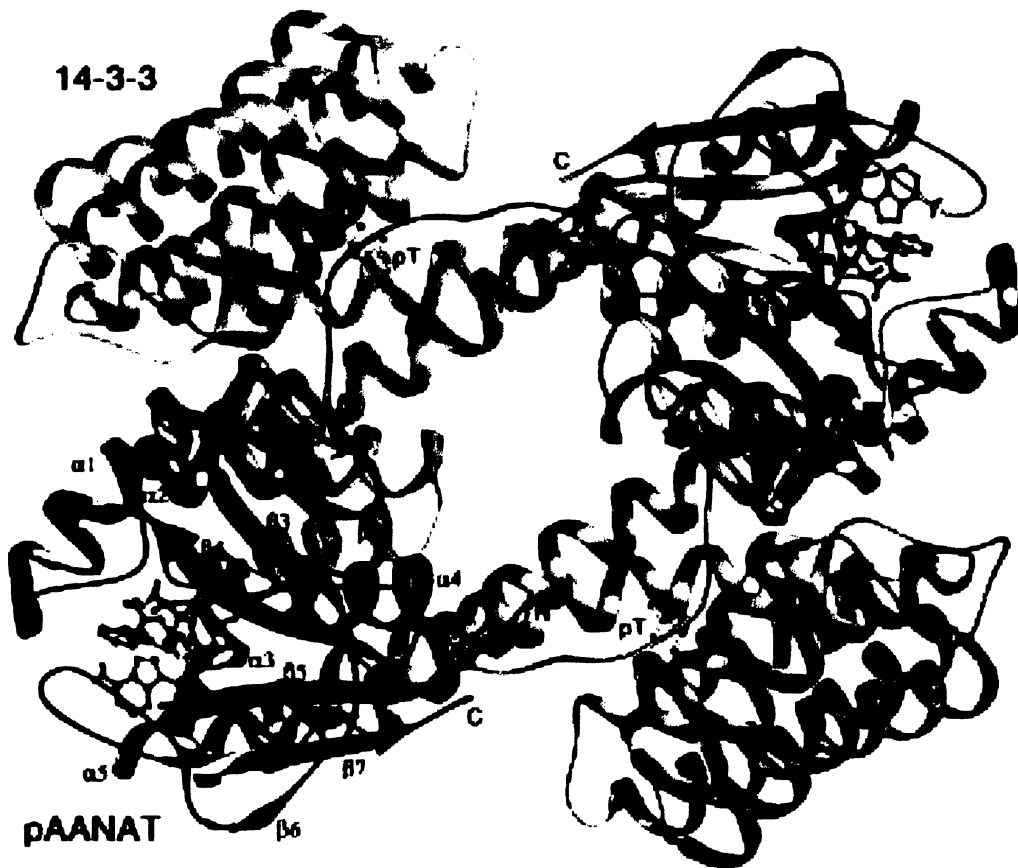
Velké změny v aktivitě AANAT jsou spojovány s fosforylací threoninu 31 (Thr 31) proteinkinázou A. Fosforylace Thr 31 podporuje vazbu AANAT na 14-3-3 protein, který aktivuje enzym zvýšením jeho afinity.

V roce 2004 byla provedena studie druhého PKA fosforylačního místa serinu 205 (Ser 205). Zjistilo se, že Ser 205 je v noci fosforylován z 55%, zatímco Thr 31 ze 40%. To dokazuje, že je AANAT fosforylována dvakrát. Vazba 14-3-3 proteinu přes Thr 31 je silnější než prostřednictvím Ser 205, protože Thr 31 se nachází uvnitř vazebného motivu s vysokou afinitou pro 14-3-3 protein.

2.2.3 Struktura AANAT a vazba na 14-3-3 protein

Serotonin N-acetyl transferáza je globulární protein skládající se z osmi vláken β listů, které jsou obklopeny pěti α helixy. Všechna vlákna jsou antiparalelní, pouze $\beta 5$ a $\beta 6$ jsou paralelní (viz obr. 2.4). Konzervovaný motiv uprostřed centrálního β listu tvoří vazebné místo pro kofaktor [1].

Když byla AANAT izolována z tkáně, byla získána s dvěma isoformami ϵ a ζ 14-3-3 proteinu. Funkční spojení mezi těmito proteiny bylo prvně pozorováno, když byly oba proteiny společně purifikovány pomocí mnoha chromatografických kroků. V roce 2001 se podařilo krystalizovat komplex 14-3-3 ζ se zkrácenou verzí AANAT₁₋₂₀₁. AANAT je vázána v centrálním tunelu dimeru 14-3-3 ζ a je ukotvena silnou interakcí jak s kanálem vázajícím fosfopeptid, tak i s dalšími částmi centrálního kanálu [17].



Obr. 2.4: *Struktura komplexu 14-3-3 ζ : pAANAT₁₋₂₀₁.*

Pohled do centrálního tunelu 14-3-3 ζ . Fosforylovaný enzym AANAT₁₋₂₀₁(pAANAT) je znázorněn hnědou barvou, fosforylovaný threonin 31 (pT) žlutou, bisubstrátový analog (inhibitor) modrou a 14-3-3 ζ homodimer zelenou.

14-3-3 protein v komplexu s AANAT vystupuje jako velmi rigidní molekula, která u svého vazebného partnera vyvolává strukturní změnu. 14-3-3 protein stabilizuje enzym AANAT v konformaci přechodného stavu (komplexu enzym-substrát), který v případě samotného AANAT vzniká velmi neochotně. Následkem usnadnění vzniku přechodového stavu dochází ke zvýšení aktivity enzymu přibližně stokrát. 14-3-3 navíc chrání AANAT před degradací, a to tím, že se váže na N-terminální konec v místě, které je rozpoznáváno thrombinem. Předpokládá se, že způsob, jakým 14-3-3 proteiny modulují vlastnosti ostatních ligandů, je založen na stejném principu [17-19].

2.2.3.1 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny tvoří rodinu vysoce konzervovaných homo- a heterodimerních proteinů. Sedm vysoce homologních izoform bylo identifikováno u savců a několik dalších izoform bylo nalezeno u rostlin, kvasinek a hub. Tyto proteiny jsou exprimovány v celém organismu v hojném množství. Tvoří např. 1% z celkového množství rozpustných proteinů v mozku.

Ačkoli funkce 14-3-3 proteinů není zatím zcela jasná, jejich důležitou obecnou vlastností je schopnost vázat ostatní proteiny, jsou-li fosforylovány. Existuje přes 50 takových příkladů. Zdá se, že fungují jako molekulární regulátory. Doposud bylo zjištěno, že 14-3-3 proteiny hrají významnou roli v signálním přenosu, kontrole buněčného cyklu a regulaci buněčných dějů. Mohou sloužit také jako alosterické kofaktory měnící katalytickou aktivitu svých vazebných partnerů.

Krystalová struktura ζ a τ izoform 14-3-3 proteinu byla určena v roce 1995. Monomery se skládají z 9 antiparalelních α helixů. Tvoří dimery s velkým tunelem uprostřed. Stěny tunelu obsahují kanály, které jsou 30 Å dlouhé. Sem se váží 14-3-3 vazebné proteiny [17].

2.2.4 Důvody studia zkrácených verzí AANAT

V této diplomové práci byla studována N-terminálně zkrácená verze ovčí AANAT 32-207 (sekvence aminokyselin od 32. do 207.). Celkově má ovčí AANAT 207

aminokyselin (DNA kódující tento enzym byla získána z ovčího mozku a po zkrácení zaklonována do vektoru pGEX 4T-1).

Pro pochopení funkce enzymu a mechanismu, kterým je regulována syntéza melatoninu bylo zapotřebí znát 3D strukturu AANAT. Po počátečních neúspěšných pokusech purifikovat a krystalizovat kompletní enzym z různých živočišných druhů (člověk, potkan, ovce) následovalo úsilí vykrytalizovat zkrácenou formu ovčí AANAT a to v délce 28-201 [1,6]. Tuto zkrácenou verzi AANAT (zkrácenou na obou koncích) se podařilo vykrytalizovat a vyřešit její 3D strukturu. Toto katalytické jádro AANAT obsahuje vysoce konzervované elementy. Odstraněna byla pouze relativně málo konzervovaná N-terminální sekvence, která je během exprese obzvláště citlivá k proteolytické degradaci. AANAT₂₈₋₂₀₁ byla také v porovnání s kompletním enzymem daleko více rozpustná, a to díky 6 chybějícím C-terminálním aminokyselinovým zbytkům. Objasnění 3D struktury zkrácené verze AANAT sice pomohlo vyřešit katalytický mechanismus enzymu, ale nepřineslo žádné informace o mechanismu cirkadiánní regulace syntézy melatoninu. Proto začal být intenzivně studován komplex fosforylované formy AANAT se 14-3-3 proteinem.

V roce 2001 byla objasněna struktura komplexu C-terminálně zkrácené verze AANAT (v délce 1-201) se 14-3-3 proteinem [17]. Tato struktura již poskytla řadu cenných informací o regulaci enzymové aktivity AANAT a o úloze N-terminálního PKA fosforylačního místa. Protože tato struktura neobsahuje kompletní verzi AANAT a funkce C-terminálního fosforylačního místa je stále nejasná, rozhodli jsme se studovat verzi AANAT s chybějícím N-terminálním PKA místem, ale obsahující celý C-terminální konec (AANAT 32-207). Exprese a charakterizace enzymu AANAT₃₂₋₂₀₇ byla cílem této diplomové práce.

3 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- Expres N-terminálně zkráceného enzymu serotonin N-acetyltransferázy (AANAT) 32-207 pomocí prokaryotního expresního systému.
- Vytvořit purifikační protokol pro AANAT 32-207.
- Ověřit enzymovou aktivitu purifikovaného proteinu.
- Provést fosforylaci enzymu a otestovat jeho interakci se 14-3-3 proteinem.

4 Materiál

4.1 Použité chemikálie

AcCoA (acetylkoenzym A)	Sigma, USA
akrylamid	Sigma, USA
ampicilin	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
bacto trypton (pepton)	Carl Roth GmbH, Německo
bacto yeast extract (kvasničný extrakt)	Carl Roth GmbH, Německo
bisakrylamid	Sigma, USA
bromfenolová modř	Sigma, USA
Coomassie modř R250	Lachema a.s., Neratovice
Deoxyribonukleáza (DNAza)	Sigma, USA
n-dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, USA
DTNB (5,5-dithio-bis(2-nitrobenzenová kys.)	Sigma, USA
DTT (dithiotreitol)	Carl Roth GmbH, Německo
EDTA	Lachema a.s., Neratovice
ethanol	Lachema a.s., Neratovice
glycerol	Lachema a.s., Neratovice
glycin	Carl Roth GmbH, Německo
GST (redukovaný L-glutathion)	Sigma, USA
guanidin hydrochlorid	P-Lab s.r.o.
imidazol	Carl Roth GmbH, Německo
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma, USA
isopropylalkohol	Sigma, USA
KCl	Lachema a.s., Neratovice
KH ₂ PO ₄	Lachema a.s., Neratovice
kyselina boritá	Carl Roth GmbH, Německo
kyselina citronová	Carl Roth GmbH, Německo
kyselina chlorovodíková	Lachema a.s., Neratovice
kyselina octová	Lachema a.s., Neratovice
lysozym	Sigma, USA

β-merkptoethanol	Carl Roth GmbH, Německo
methanol	Lachema a.s., Neratovice
MgCl ₂	Lachema a.s., Neratovice
NaCl	Penta, Chrudim
NaOH	Lachema a.s., Neratovice
Na ₂ PO ₄ ·7 H ₂ O	Lachema a.s., Neratovice
peroxidisíran amonný	Sigma, USA
PKA	Promega, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH, Německo
thrombin	Sigma, USA
Tris (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH, Německo
Tryptamin hydrochlorid	Fluka, USA

Všechny použité soli, pufrý, aminokyseliny a rozpouštědla měly čistotu p.a. Chemikálie pro molekulárně-biologické experimenty měly nejvyšší dostupnou čistotu.

4.2 Přístroje

Chlazená centrifuga: Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech, USA

Chlazená centrifuga: pro rotor GSA a SS34 – Sorval RC-5B, DuPont Instruments, USA

Elektroforéza pro SDS: BioRad, Itálie

Elektronické váhy: Kern, Německo

Chromatografie: FPLC-AKTA, Amersham Biosciences, USA

Ohříváč vzorků na SDS-ELFO: ETA 2107, ČR

Peristaltická pumpa: Stavebnicové čerpadlo SC4, Vývojové dílny ČSAV, ČR

pH metr: JenWay 3505, Felsted, Velká Británie

Přístroj pro PCR: Hybaid – PCR Express, USA

Sonikátor: Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA

Třepačka: Orbital Icubator, Gallenkap, USA

UV-Vis absorpční spektrofotometr: Cecil 2040, ČR

Vodní lázeň: Memmert, Německo

Vortex: Zx3, Velp Scientifica, USA

Zdroj pro elektroforesu: Consort E143, Belgie

4.3 Ostatní materiál

centrikony	Millipore, USA
dialyzační membrána (Mw cut off 14000)	Carl Roth GmbH, Německo
filtry 0,45 µm	Whatmann Internation Ltd, Anglie
injekční stříkačky pro nános a filtraci roztoků proteinu	Chirana T. Injecta a.s., SR
laboratorní sklo	Simax, ČR
mikrozkumavky	Axygen Scientific Inc., USA
náplně do kolon a kolony	Amersham Biosciences, USA
Petriho misky	Gama Group a.s., Trhové Sviny, ČR
pipeta 25 µl pro nanášení vzorků na elektroforézu	Hamilton Co, USA
pipety	Eppendorf, USA
protein marker – ukazatel molekulových hmotností proteinů	vlastní výroba
rukavice	Beromed GmbH Hospital Products, Německo
špičky pro pipety	INSET, Praha

5 Experimentální část

5.1 Transformace plazmidové DNA do bakterií *Escherichia coli*

Transformací se nazývá přenos genetické informace do hostitelské buňky pomocí DNA uvolněné z buněk donorového kmene. Plazmid pro expresi AANAT32-207 byl dar od Davida C. Kleina PhD. z National Institute of Health, USA. Tento plazmid obsahoval DNA kódující protein AANAT32-207 zabudovanou do expresního vektoru pGEX 4T-1 (Pharmacia Biotech).

Vektor pGEX 4T-1 je komerčně dodávaný plazmid, který lze vpravit do hostitelských buněk. Buňky však nejsou normálně schopné přijímat DNA z vnějšího prostředí. Aby mohlo k transformaci dojít, je nutné učinit buněčné stěny bakteriálních hostitelů prostupné pro DNA [20]. K tomu lze použít metodu teplotního šoku.

Postup

Připravila jsem si Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (Amp). Amp slouží jako selekční antibiotikum. Plazmid pGEX 4T-1 obsahuje oblast kódující rezistenci vůči ampicilinu. V přítomnosti antibiotika se dělí jen ty bakterie, které obsahují plazmidovou DNA.

Nechala jsem vysterilizovat 200 ml suspenze LB agaru (komerční servis, MBÚ AV ČR). Po vychladnutí suspenze asi na 40 °C jsem přidala 200 µl roztoku Amp (o koncentraci 100 mg/ml). Roztok jsem nalila do Petriho misek a nechala ztuhnout.

Pro transformaci jsem použila bakteriální buňky *E. Coli* (expresní kmen BI21(DE3), Invitrogen, USA). Buňky jsem opatrně rozmrazila v ledové lázni a odebrala 30 µl suspenze pro každou transformaci. Buňky v zásobní suspenzi jsem opět zmrazila.

Transformace *E. coli* plazmidovou DNA pomocí teplotního šoku:

1. 30 µl kompetentních buněk + 1 µl DNA
2. inkubace 20 min v ledu
3. inkubace 45 s v lázni o teplotě 42 °C, následně 2 min v ledu

-
4. přidat 400 µl LB media (37 °C)
 5. inkubace 1 h při 37 °C za konstantního třepání 190 rpm

Po hodině inkubace jsem bakterie rovnoměrně nanasla na Petriho misku s tuhým LB médiem a nechala inkubovat 15 hodin při 37 °C.

Roztoky

LB medium: 10 g Bacto tryptone

5 g Bacto yeast extrakt (kvasničný extrakt)

10 g NaCl

- doplnit destilovanou vodou do 1 l, pH upravit pomocí NaOH na 7,4

LB agar: stejné složení jako LB medium, před doplněním vodou se přidá 15 – 20 g agaru

5.2 Expese proteinu AANAT

Expese probíhá v buňkách bakterie *E. Coli* kmen B121(DE3) (Invitrogen, USA), které obsahují gen T7 polymerázy. Expese bílkovin je indukována pomocí induktoru IPTG. IPTG uvolňuje *lac*-repressor z *lac*-operátoru a spouští syntézu T7 RNA-polymerázy, která rozpoznává T7 promotor v plazmidu pGEX 4T-1 a tím zahajuje expresi rekombinantního proteinu [22].

Postup

Nejprve jsem nanasla bakteriální buňky obsahující plazmid s DNA fúzního proteinu GST-AANAT₃₂₋₂₀₇, na Petriho misky s pevným ampicilinovým médiem. Inkubovala jsem je 15 hodin při teplotě 37 °C. Poté jsem čtyři kolonie sterilně přenesla do zkumavek obsahujících 5 ml LB media s Amp (100 µg/ml) a kultury jsem nechala inkubovat 15 hodin při teplotě 37 °C za konstantního třepání (190 rpm). Narostlé bakteriální kultury jsem přenesla do čtyř větších baněk obsahujících po 1 l LB media.

Během konstantního třepání při teplotě 37 °C jsem z baněk průběžně odebírala vzorky bakteriální kultury a měřila jsem její absorbanci při 600 nm. Jako referenční vzorek jsem použila samotné LB medium. Po dosažení optické denzity 0,7 jsem do LB

media přidala induktor IPTG (finální $c = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Induktor je látka, která spustí expresi rekombinantního proteinu. Po 12 h inkubace při 30 °C a 190 rpm jsem expresi ukončila.

5.3 Elektroforéza SDS-PAGE

Tuto metodu lze použít k analýze složení vzorku proteinů.

Jedná se o vertikální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v denaturujících podmínkách. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru pomocí volných radikálů poskytovaných peroxidisíranem amonným (APS), který způsobuje homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných proteinů od 3,5% až po 20% gely [23].

Polyakrylamidový gel obsahuje ve své struktuře póry, jejichž velikost je srovnatelná s velikostí proteinů, molekuly proteinů jsou tudíž separovány na principu „molekulového síta“ v závislosti na své velikosti neboli molekulové hmotnosti.

Tab. 5.1 *Separací schopnost gelu v závislosti na jeho koncentraci.*

Gel	Schopnost gelu separovat proteiny o velikosti (kDa):
15,0%	15 – 45
12,5%	15 – 60
10,0%	18 – 75
7,5%	30 – 120
5,0%	60 – 212

Příprava vzorků: z každé frakce získané po jednotlivých purifikačních krocích bylo odebráno 10 µl vzorku, ke kterému bylo přidáno 5 µl vzorkovacího pufru. Směs jsem 1 min povařila. Účinkem zvýšené teploty, SDS a β-merkapt ethanolu, který redukuje disulfidické můstky ve struktuře proteinů, dochází k denaturaci proteinu.

Pro vytvoření ostrých zón jsem použila separační gel v kombinaci se zaváděcím gelem. Do vzorkovacích jamek v zaváděcím gelu jsem aplikovala po 15 µl vzorků a standardu molekulových hmotností.

Elektroforéza probíhala přibližně 50 min při 200 V. Po skončení ELFO jsem proteiny obarvila pomocí barvicího roztoku (30 min) a poté odbarvila odbarvovacím roztokem (1 h).

Roztoky

Vzorkovací pufr:	0,9 ml destilované vody
(uchováváme	0,6 ml 1 mol dm ⁻³ Tris-HCl pH 6,8
při 4 °C)	5 ml 50% glycerolu
	2 ml 10% SDS
	0,5 ml β-merkaptoethanolu
	1 ml 1% bromfenolové modři
Pufr pro sep. gel:	1,5 mol dm ⁻³ Tris-HCl, pH 8,8 + 20% SDS
Pufr pro zaváděcí gel:	0,5 mol dm ⁻³ Tris-HCl, pH 6,8 + 20% SDS
Použitý standard:	MIX 4 (obsahuje proteiny o velikostech: 97 KDa; 67 KDa; 45 KDa; 29 KDa)
Elektrodový pufr:	1 x pufr pro ELFO (příprava ředěním zásobního roztoku 10 x pufr pro ELFO: 50 g Tris-HCl, 144 g glycinu, 10 g SDS, doplnit dH ₂ O do 1 l)
Barvicí roztok:	1 g Coomassie Blue R-250, 450 ml methanolu, 450 ml vody,
(1 l)	100 ml koncentrované kyseliny octové
Odbarvovací roztok:	100 ml methanolu
(1 l)	100 ml koncentrované kyseliny octové
	800 ml vody

Tab. 5.2 Složení zaváděcího gelu.

Činidlo	V
Akrylamid/bisakrylamid (30%/0,8% w/v)	0,50 ml
Pufr pro zaváděcí gel obsahující SDS	1,00 ml
Destilovaná voda	2,25 ml
10% peroxidisíran amonný	75,00 μl
TEMED	8,00 μl
Celkový objem	3,80 ml

Tab. 5.3 Složení 12% a 15% separačního gelu.

Činidlo	V (12%)	V (15%)
Akrylamid/bisakrylamid (30%/0,8% w/v)	3,00 ml	3,75 ml
Pufř pro separační gel obsahující SDS	2,00 ml	2,00 ml
Destilovaná voda	2,60 ml	1,75 ml
10 % peroxidisíran amonný (přidává se až nakonec)	75,00 μ l	60,00 μ l
TEMED	8,00 μ l	7,00 μ l
Celkový objem	7,60 ml	7,50 ml

5.4 Purifikace AANAT

5.4.1 Příprava bakteriálního lyzátu

- Napěstovanou bakteriální kulturu jsem centrifugovala při 3500 rpm, při teplotě 4 °C, 45 min. Peletu jsem resuspendovala vychlazeným lyzačním pufřem.
- Resuspendovanou peletu jsem zmrazila na teplotu – 80 °C.
- Zmraženou suspenzi bakteriálních buňek jsem rozmrazila ve studené vodní lázni. K buněčné suspenzi jsem přidala enzym lysozym (0,1 mg/ml), který narušuje bakteriální stěny a DNAzu (0,05 mg/ml) pro rozštěpení DNA. Následovala inkubace 40 min při teplotě 4 °C.
- Kádinku s bakteriální suspenzí jsem umístila do ledu a sonikovala 30 min (1min sonikace, 2 min pauza).
- Sonikát jsem centrifugovala při 13 500 rpm, při teplotě 5 °C, 30 min. Supernatant jsem uchovala pro další purifikaci při teplotě – 20 °C, peletu jsem odstranila.

Roztoky

Lyzační pufr (0,2 l): 40 ml 10 x koncentrovaného PBS (3 g Tris base, 14,4 g glycinu, 1 g SDS, doplnit do 1 l destilovanou vodou, pH 8,3)
400 μ l 0,5 mol dm^{-3} EDTA
- doplnit destilovanou vodou do objemu 200 ml, nechat vychladit za konstantního míchání při 4 °C
0,3 g DTT (přidat až do vychlazeného pufru)

5.4.2 Afinitní chromatografie

Pro afinitní chromatografii byla použita Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Švédsko).

Glutathion Sepharose je medium používané pro jednokrokovou purifikaci GST proteinu, produkovaného pomocí pGEX série expresních vektorů, a dalších glutathion S-transferáz a glutathion vázajících proteinů.

GST fúzní proteiny mohou být přímo purifikovány z bakteriálního lyzátu použitím glutathion sefarozy.

Vlastnosti gelu

Ligand glutathion je navázán pomocí deseti-uhlíkatého řetězce na vysoce zesíťovanou 4% agarózu. Množství navázaných ligandů je optimalizováno tak, aby byla co nejvyšší vazebná kapacita pro GST fúzní proteiny a ostatní glutathion vázající proteiny.

Celková vazebná kapacita je 10 mg rekombinantního GST na 1 ml gelu. Skutečná vazebná kapacita se mění v závislosti na rychlosti průtoku a na vzorku. Eluce se provádí pomocí volného glutathionu.

Postup

Suspenzi glutathion sefarózy (8 ml) jsem přidala k buněčnému lyzátu a směs inkubovala 20 min při teplotě 4 °C za konstantního míchání. Po inkubaci jsem směs nalila do kolony a nechala sedimentovat. Sefarózu jsem promývala vazebným pufrům (~ 200 ml).

Po promytí jsem sefarózu smíchala s 25 ml elučního pufru a inkubovala 15 min při teplotě 0 °C, dokud se nevytvořila sedlina. Kapalínu jsem odsála a ještě jednou přefiltrovala pomocí kolony. Získané frakce, které obsahovaly především fúzní protein GST-AANAT₃₂₋₂₀₇, jsem analyzovala pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

Roztoky

Vazebný pufr: 0,02 mol dm⁻³ Tris-HCl pH 7,5

(0,5 l, uchovávat 0,5 mol dm⁻³ NaCl

při 4 °C) 1.10⁻³ mol dm⁻³ EDTA

10% glycerol

0,01 mol dm⁻³ DTT (přidat až do vychlazeného pufru)

Eluční pufr: k vazebného pufru se přidá redukovaný glutathion (3,1 g/l). Přídavkem NaOH jsem upravila pH na 8.

5.4.3 Dialýza

Dialýza je separační metoda, která se používá k odstranění nízkomolekulárních látek z roztoků proteinů, nebo též ke změně složení roztoku, ve kterém je protein rozpuštěn. Dialyzační membrána obsahuje póry, jejichž rozměry jsou menší než rozměr makromolekul. Tyto malé póry umožňují malým molekulám (rozpuštědlo, anorganické nízkomolekulární látky atd.) difundovat přes membránu a zároveň zabraňují průchodu větších molekul [24].

Proteinové frakce se po jednotlivých purifikačních krocích dialyzují z toho důvodu, že pro další purifikační krok nebo pro další experimenty je nezbytná změna složení pufru, ve kterém je protein rozpuštěn.

Eluované vzorky jsem dialyzovala 16 hodin při 4 °C za konstantního míchání.

5.4.4 Měření koncentrace

Koncentraci zkoumaného roztoku proteinu jsem vypočítala pomocí molárního extinkčního koeficientu a naměřené absorbance roztoku při vlnové délce 280 nm.

Pomocí nástroje „*ProtParam tool*“ volně přístupného na www.expasy.org, jsem vypočítala molární extinkční koeficient fúzního proteinu GST-AANAT₃₂₋₂₀₇ při 280 nm.

Výpočet

$$A = \epsilon^{(280)} c l \Rightarrow c = A / \epsilon^{(280)} l$$

A.....absorbance

$\epsilon^{(280)}$ molární extinkční koeficient při 280 nm (cm ml mg⁻¹)

c.....koncentrace (mg ml⁻¹)

l.....tloušťka květy (cm)

5.4.5 Thrombinové štěpení

Spojení mezi GST a fúzním partnerem je zprostředkováno peptidem, který obsahuje štěpné místo pro enzym thrombin. Rozštěpení tohoto peptidu umožňuje separaci GST a fúzního partnera (v mém případě AANAT).

Thrombin jsem přidala do roztoku proteinu v množství 10 jednotek na mg fúzního proteinu a nechala štěpit 16 h při 4 °C.

5.4.6 Zkoncentrování roztoků proteinu

Při každém purifikačním kroku dochází k naředění roztoku proteinu, a to jak během samotné purifikace, tak i během následné dialýzy. Aby byla purifikace co nejúčinnější, je zapotřebí protein mezi purifikačními kroky zkoncentrovat. Také po ukončení purifikace je nezbytné zvýšit koncentraci proteinu, neboť vyšší proteinová koncentrace je výhodná pro další experimenty.

Pro zkoncentrování jsem použila centrikony (Millipore, USA) skládající se ze dvou hlavních částí. Horní část je zkumavka o objemu 4 ml, na jejímž dně je umístěná celulózová ultracentrifugační membrána propustná pro molekuly o určité velikosti.

Dolní část, o objemu 3 ml, je sběrná zkumavka, do které se jímá roztok, který během centrifugace proteče přes membránu.

Postup

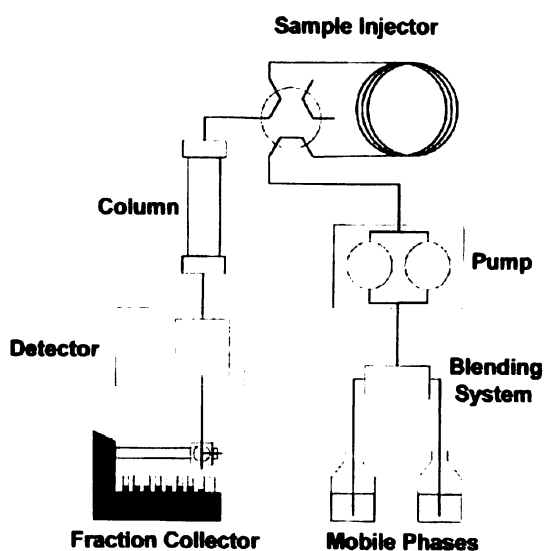
Roztok proteinu jsem nanesla na centrikon - MCO 10 000 (membrána propouští molekuly s $M_w < 10$ kDa). Poté jsem centrikony centrifugovala při 3 000 rpm a teplotě 4 °C. Postup jsem opakovala do té doby, než bylo dosaženo požadované koncentrace proteinu.

5.4.7 Gelová filtrace

Jedná se o chromatografickou metodu. Patří mezi nejčastěji používané techniky v molekulární biologii. Slouží k oddělování látek s velmi rozdílnými molekulovými hmotnostmi, např. k odsolování bílkovin [25].

Molekuly se dělí na základě své velikosti a tvaru. Stacionární fáze je tvořena kuličkami hydratované porézní látky. Velikost pórů v jednotlivých gelech odpovídá poměrně úzkému rozmezí velikosti molekul, takže při průchodu vodného roztoku, obsahujícího různě velké molekuly, sloupcem tohoto tzv. molekulového síta dochází k rozdělení molekul. Velké molekuly neprojdou póry, nedostanou se do kapaliny uvnitř gelových kuliček, a tak procházejí sloupcem rychleji.

Molekulová hmotnost nejmenší molekuly, která již neprojde póry gelu, se nazývá vylučovací limit gelu. Molekuly látek s menší hmotností než je vylučovací limit gelu se eluují v pořadí určeném zmenšující se velikostí jejich molekul, větší molekuly budou předcházet molekuly menší. To je dáno tím, že velikost pórů není zcela jednotná, takže pro větší molekuly je přístupný menší vnitřní objem gelu než pro molekuly menší [24].



Obr. 5.1 *Chromatografická instrumentace.*

Pro gelovou filtraci byla použita kolona „SuperdexTM75 HR 10/30“ o objemu 24 ml (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla připojena k přístroji „ÄKTAprimeTM“ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a data byla analyzována pomocí programu „Unicorn 4.11“ dodaným spolu s přístrojem.

Metoda

Teplota	4 °C
Průtoková rychlost	0,5 ml min ⁻¹
Maximální tlak v koloně	0,6 MPa

- Frakce byly jímány v objemu 0,5 ml do 1,5 ml zkumavek.
- Absorbance eluovaného vzorku byla měřena při 280 nm.

Postup

- Nejprve jsem promyla přístroj elučním pufrem po dobu 10 min.
- Připojila jsem kolonu k přístroji na HPLC a ekvilibrovala ji elučním pufrem až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku.
- Na kolonu jsem nanášela max. 2 ml roztoku proteinu v jednom cyklu.
- Eluci jsem ukončila poté, co došlo k vyloučení proteinu z kolony.
- Kolonu jsem regenerovala promýváním elučním pufrem až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku.
- Složení proteinových frakcí jsem ověřila pomocí SDS-PAGE.

Roztoky

Eluční pufr: $2 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} Tris-HCl pH 7,5

$5 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3} NaCl

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

$1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} DTT (přidává se do vychlazeného pufru)

5.5 Vazebné studie

5.5.1 Fosforylace AANAT

Enzym AANAT tvoří komplexy s vazebným partnerem 14-3-3 proteinem pouze tehdy, je-li fosforylována.

Fosforylace je obecně proces, při kterém je do organické molekuly zaváděn zbytek kyseliny fosforečné (PO_4^{3-}). V našem případě dochází k navázání fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu aminokyseliny Ser 205 AANAT₃₂₋₂₀₇. *In vivo* jsou zdrojem fosfátových skupin molekuly ATP a fosforylace je katalyzována specifickými enzymy – kinázami.

Postup

Vzorek (složení je uvedeno v tabulce 6.1, str. 42) jsem inkubovala při teplotě 30 °C. Po 30 minutách jsem přidala stejný objem ATP a PKA jako byl na počátku použit pro přípravu vzorku. Následovala další inkubace 30 min při 30 °C. Vzorek jsem dialyzovala 16 hodin při 4 °C proti dialyzačnímu pufru.

Roztoky

Pro přípravu fosforylované bílkoviny:

0,86 mg/ml ($43 \cdot 10^{-6}$ mol. dm^{-3}) AANAT

$50 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} ATP

1 mol dm^{-3} MgCl_2

PKA, aktivita 80 jednotek/ μl

Poznámka: 1 jednotka odpovídá takovému množství enzymu, který je zapotřebí pro navázání 1 pmol fosfátu na protein za 1 minutu.

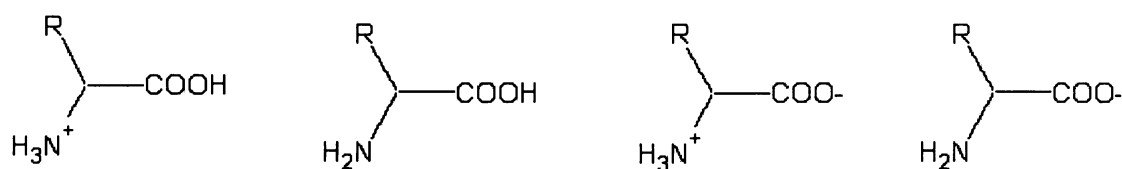
Dialyzační pufr: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 7,5
 $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl
 $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA
10% glycerol
 $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ DTT

5.5.2 Nativní elektroforéza

Pomocí nativní ELFO jsem ověřovala, zda pAANAT interaguje se svým vazebným partnerem 14-3-3 proteinem. Tvorba komplexu vede ke změně migrace v gelu.

Nativní elektroforéza probíhá v nedenurovaném prostředí pro proteiny. Proteiny si zachovávají své přirozené vlastnosti (např. enzymatickou aktivitu, sérologické vlastnosti) a jsou děleny podle svého tvaru/velikosti a náboje. Používá se pro stanovení izoenzymových spekter nebo separaci biologicky aktivních molekul.

Při elektroforéze dochází k pohybu iontů v elektrickém poli. Nositeli elektrického náboje jsou mimo jiné amfolyty (aminokyseliny). Ty získávají náboj v důsledku jejich vnitřní disociace. Náboj aminokyselin ovlivňuje hodnota pH. Při vysokém pH dochází k ionizaci kyselých skupin a částice mají záporný náboj, při nízkém pH ionizují naopak zásadité skupiny a náboj molekuly je pak kladný:



Obr.5.2 *Různé protonační stavy aminokyselin závislé na pH roztoku.*

V určité oblasti pH dochází u těchto látek k disociaci stejného počtu jak kyselých tak i zásaditých skupin a celkový náboj molekuly je pak nulový. Tato hodnota pH se nazývá izoelektrický bod pI a je charakteristickou konstantou pro každý amfolyt [26].

Pro pohyb proteinů je tedy nejdůležitější pH pufru, ve kterém ELFO probíhá. K anodě putují jen ty makromolekuly, jejichž náboj je převážně záporný. V tomto případě byla použita nativní ELFO v pufru TBE o pH 8,3 ve 12% polyakrylamidovém gelu.

Příprava vzorků:

K 20 μl roztoku proteinů ($21 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} AANAT a $40 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} 14-3-3 protein) jsem přidala 5 μl vzorkovacího pufru. Poté jsem vzorky aplikovala do vzorkovacích jamek separačního gelu.

Elektroforéza probíhala 60 minut při konstantním proudu 10 mA. Po skončení elektroforézy jsem proteiny obarvila pomocí barvicího roztoku (30 min) a poté odbarvila odbarvovacím roztokem (1 h).

Roztoky

Vzorkovací pufr:	0,9 ml destilované vody
(uchováváme	0,6 ml 1 mol dm^{-3} Tris-HCl (pH 6,8)
při 4 °C)	5 ml 50% glycerolu
	1 ml 1% bromfenolové modři
Pufr pro separ. gel:	10 x koncentrovaný TBE (108 g Tris, 55 g kys. borité, 9,3 g Na_4EDTA , doplnit do 1 l destilovanou vodou, pH 8,3)
Elektrodový pufr:	1 x koncentrovaný TBE
Barvicí roztok:	1 g Coomassie Blue R-250
(1 l)	450 ml methanolu
	450 ml vody
	100 ml koncentrované kyseliny octové
Odbarvovací roztok:	100 ml methanolu
(1 l)	100 ml koncentrované kyseliny octové
	800 ml vody

Tab. 5.4 Složení 12% separačního gelu.

Činidlo	V
Akrylamid/bisakrylamid	3,00 ml
(30%/0,8% w/v)	
10 x TBE	0,75 ml
Destilovaná voda	3,75 ml
10% peroxidisíran amonný	60,00 μl
TEMED	8,00 μl
Celkový objem	7,57 ml

5.5.3 Test interakce pomocí gelové filtrace

Interakci mezi fosforylovanou AANAT₃₂₋₂₀₇ a 14-3-3 ζ proteinem jsem testovala také pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Pro gelovou filtraci byla použita kolona „SuperdexTM75 HR 10/30“ o objemu 24 ml (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla připojena k přístroji „ÄKTAprimeTM“ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a data byla analyzována pomocí programu „Unicorn 4.11“ dodaným spolu s přístrojem.

Metoda

Teplota	4 °C
Průtoková rychlost	0,5 ml min ⁻¹
Maximální tlak v koloně	0,6 MPa

- Frakce byly jímány v objemu 0,5 ml do 1,5 ml zkumavek.
- Absorbance eluovaného vzorku byla měřena při 280 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu proteinů.

Postup

- o Nejprve jsem promyla přístroj elučním pufrem po dobu 10 min.
- o Připojila jsem kolonu k přístroji na HPLC a ekvilibrovala ji elučním pufrem až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku.
- o Na kolonu jsem postupně nanášela následující vzorky:
 - c(AANAT) = 0,86 mg/ml
 - c(pAANAT) = 0,86 mg/ml
 - c(14-3-3 ζ) = 6,1 mg/ml
 - 150 μ l nefosforylované AANAT
 - 20 μ l 14-3-3 ζ + 80 μ l pufru pro gelovou filtraci
 - 20 μ l 14-3-3 ζ + 150 μ l nefosforylované AANAT
 - 20 μ l 14-3-3 ζ + 150 μ l pAANAT
- o Eluci jsem ukončila poté, co došlo k vyloučení proteinu z kolony.
- o Kolonu jsem regenerovala promýváním elučním pufrem až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku.

Roztoky

Eluční pufr: $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 7,5

$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl

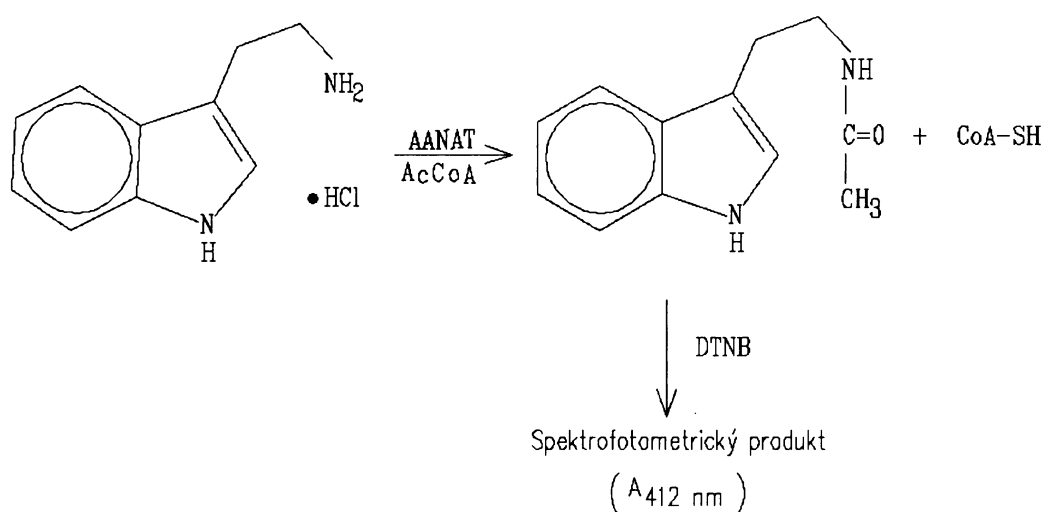
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA

$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ DTT (přidává se do vychlazeného pufru)

5.6 Stanovení aktivity AANAT pomocí DTNB

DTNB je thiol-reaktivní činidlo (dle Ellmanové), které lze použít v kinetickém testu pro ověření enzymové aktivity. DTNB reaguje s produktem enzymové reakce za vzniku spektrofotometrického produktu s absorpčním maximem při 412 nm (viz obr.5.3).

Použitými substráty enzymové reakce byly acetylkoenzym A (AcCoA) a tryptamin hydrochlorid.

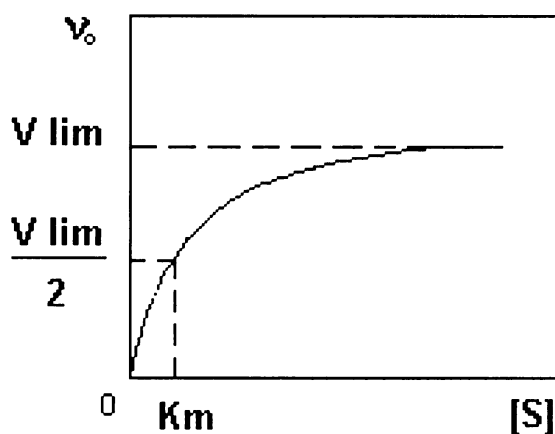


Obr. 5.3 *Reakce tryptaminu a AcCoA katalyzovaná AANAT.*

Základním vztahem enzymové kinetiky je rovnice Michaelise a Mentenové, popisující závislost počáteční reakční rychlosti enzymové reakce v_0 na koncentraci substrátu $[S]$:

$$v_0 = \frac{V_{\text{lm.}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde konstanta V_{lim} je tzv. limitní rychlost (někdy též méně správně maximální rychlost V_{max}) a K_m Michaelisova konstanta. Grafem závislosti v_0 na $[S]$ je rovnoosá hyperbola s posunutým počátkem (viz obr. 5.4), která pro vysoké koncentrace substrátu limituje k hodnotě V_{lim} . Limitní rychlost, stejně jako počáteční reakční rychlost pro každou koncentraci substrátu, je přímo úměrná koncentraci aktivního enzymu v roztoku. Michaelisova konstanta odpovídá takové koncentraci substrátu, při níž je dosaženo počáteční reakční rychlosti, rovnající se polovině rychlosti limitní; tento parametr nezávisí na koncentraci enzymu [27,28].



Obr. 5.4 Závislost počáteční reakční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu.

Postup

Nejprve jsem napipetovala do deseti 1 ml zkumavek předepsané množství roztoku tryptaminu (Tabulka 5.5) a pufru A a nechala 10 min inkubovat ve vodní lázni o teplotě 30 °C. Do první zkumavky jsem napipetovala pouze roztok AcCoA a roztok enzymu AANAT (naředěný na koncentraci $5,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Přesně po 3 minutách inkubace ve vodní lázni jsem přidala 600 μl pufru B, čímž došlo k denuraci enzymu a zastavení enzymové reakce. Tento první vzorek jsem použila jako referenční (neobsahoval tryptamin hydrochlorid).

Stejným způsobem jsem postupovala i u ostatních vzorků. Po skončení kinetického testu jsem přidala do všech zkumavek 100 μl DTNB pufru. Nechala jsem je inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. Absorbanci barevného produktu reakce jsem změřila na spektrofotometru při vlnové délce 412 nm.

Měření jsem opakovala 3x.

Tab. 5.5 Složení vzorků pro kinetický test. Objemy jsou uvedeny v μl .

č.vzorku	tryptamin	c (tryptamin) $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	pufr A	AcCoA	AANAT
1	0	0	292,0	5	3
2	1,5	0,05	290,5	5	3
3	3,0	0,10	289,0	5	3
4	4,5	0,15	287,5	5	3
5	6,0	0,20	286,0	5	3
6	7,5	0,25	284,5	5	3
7	9,0	0,30	283,0	5	3
8	10,5	0,35	281,5	5	3
9	12,0	0,40	280,0	5	3
10	13,5	0,50	278,5	5	3

Roztoky

Pro přípravu vzorků: $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ AcCoA

$10 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ tryptamin hydrochlorid

pufr A: $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ kys. citronová pH 6,8

$0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl

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

- před použitím ohřát na teplotu $30 \text{ }^\circ\text{C}$

pufr B: $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kys. citronová pH 6,8

$3,2 \text{ mol dm}^{-3}$ guanidin hydrochlorid

DTNB pufr: $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ DTNB v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kys. citronové pH 6,8

$0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA

- roztoky byly přefiltrovány přes filtr s velikostí ok $0,45 \mu\text{m}$

6 Výsledky

6.1 Exprese AANAT₃₂₋₂₀₇

Vektor pGEX 4T-1 obsahující DNA kódující protein AANAT₃₂₋₂₀₇ jsem obdržela od RNDr. Tomáše Obšila PhD. (dar od D.C. Kleina PhD.). Tento vektor jsem transformovala do buněk *E. coli* BI21(DE3). Mapa vektoru je uvedena v příloze B.

6.1.1 Sekvence cDNA a transformace do buněk *E. coli* BI21(DE3)

Před transformací byla DNA zanesena do laboratoře ÚDMP VFN k osekvenování (sekvenční chromatogram viz příloha A). Analýza sekvenčního chromatogramu ukázala, že plazmidová DNA neobsahuje žádné nežádoucí mutace. Sekvence kompletní AANAT je uvedena v příloze C. Takto zkontrolovanou DNA jsem transformovala do expresního kmene bakterií *E. coli* BI21(DE3) a provedla expresi a purifikaci enzymu.

6.2 Purifikace bílkoviny

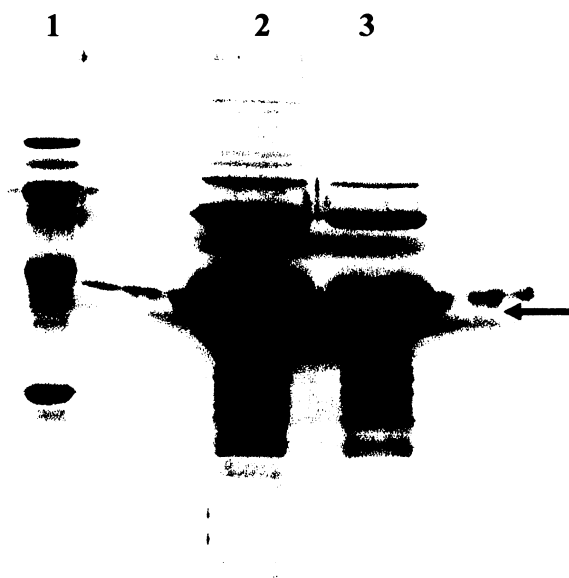
Buňky byly centrifugovány, supernatant oddělen od pelety. Peletu jsem resuspendovala a poté sonikovala. Po sonikaci byly buňky opět centrifugovány. Supernatant obsahoval cílený fúzní protein, který byl následně purifikován GST afinitní chromatografií.

6.2.1 GST afinitní chromatografie

Gen pro AANAT₃₂₋₂₀₇ protein byl zaklonován do vektoru pGEX 4T-1. Ten propůjčuje proteinu GST kotvu. Tato kotva umožňuje vazbu fúzního proteinu GST-AANAT₃₂₋₂₀₇ na glutation vázaný na agarózu, přičemž ostatní proteiny se většinou na koloně nezachytí. GST fúzní proteiny mohou být purifikovány přímo z bakteriálního

lyzátu použitím Glutathion Sepharose 4 Fast Flow. Eluce probíhá za mírných nedenaturujících podmínek, což chrání proteinovou antigenicitu a funkci.

Postup purifikace pomocí afinitní chromatografie je uveden v kapitole 5.4.2. Eluci získané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz obr. 6.1). Výsledný gel sloužil k ověření čistoty proteinu a k získání informace o přibližném množství proteinu.



Obr. 6.1 12% SDS-PAGE po afinitní chromatografii.

1 - Standard molekulových hmotností (97 kDa, 67 kDa, 45 kDa, 29 kDa), 2, 3 – Roztok proteinů získaný po afinitní chromatografii. Exprimovaný fúzní protein (46 kDa) je označen šipkou.

Elektroforéza ukázala, že bakterie *E. coli* vyprodukovaly značné množství fúzního proteinu. Roztok fúzního proteinu stále ještě obsahuje velké množství nečistot. Proto je třeba provést další purifikační kroky. Eluovaný roztok GST-AANAT₃₂₋₂₀₇ byl dialyzován proti pufru s nízkou iontovou silou. Po dialýze jsem změřila koncentraci.

6.2.2 Štěpení fúzní bílkoviny a měření její koncentrace

Fúzní spojení GST-AANAT₃₂₋₂₀₇ je zprostředkováno řetězcem, který obsahuje štěpné místo pro thrombin, což umožňuje rozštěpení fúzního proteinu. Abych věděla, jaké množství thrombinu mám použít, musela jsem nejprve změřit koncentraci roztoku

fúzního proteinu. Jako referenční vzorek jsem použila dialyzační pufr. Výsledky měření koncentrace jsou uvedeny níže. Hodnota koncentrace po afinitní chromatografii je pouze orientační, jelikož molární absorpční koeficient, jenž slouží k výpočtu, je použitelný pouze pro velmi čistý protein.

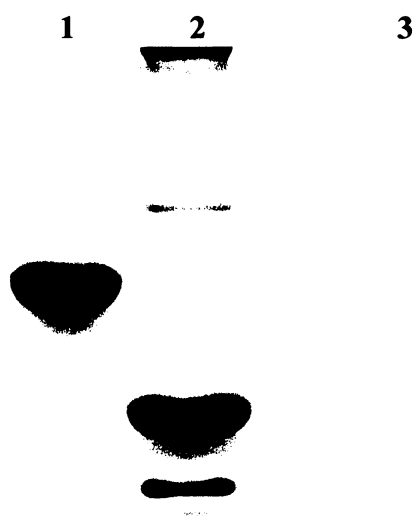
$$M(\text{GST-AANAT}_{32-207}) = 46 \text{ kDa}$$

$$\epsilon(280) = 1,312 \text{ mol}^{-1} \text{m}^2$$

$$A = 0,165$$

$c = A/\epsilon \cdot l \cdot 20$ (ředění) = **2,5 mg/ml**, objem $V = 10 \text{ ml}$, celkové množství fúzního proteinu 25 mg.

Thrombin jsem přidala do roztoku fúzního proteinu v koncentraci 10 jednotek na mg proteinu a nechala štěpit 16 h při 4 °C. Výsledek odštěpení GST jsem si ověřila pomocí SDS-PAGE. Elektroforéza ukázala, že po 16 hodinách již došlo k úplnému rozštěpení fúzního proteinu na GST a AANAT₃₂₋₂₀₇ (viz obr. 6.2). Volnou GST jsem odstranila pomocí afinitní chromatografie na Glutathion Sepharose 4 Fast Flow stejným postupem jako na počátku purifikace.



Obr. 6.2 12% SDS-PAGE po inkubaci s thrombinem.

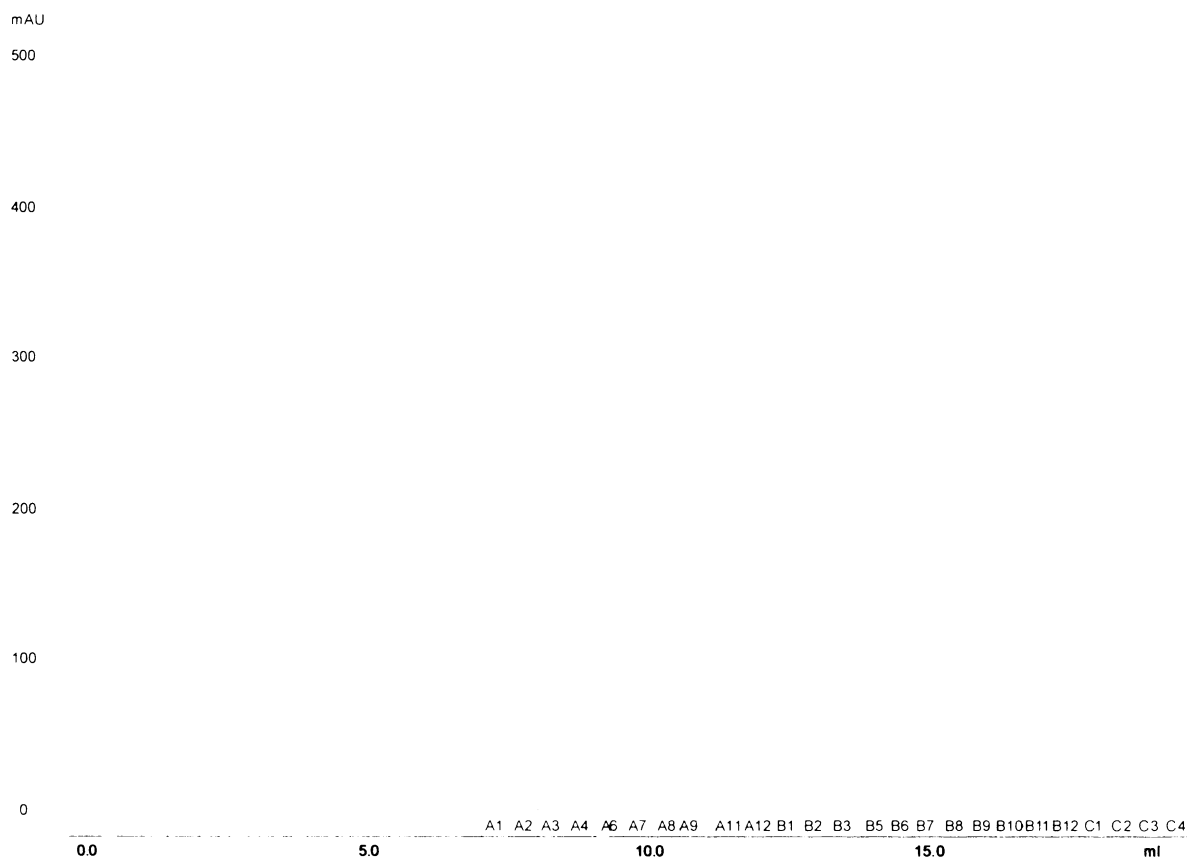
1 - Vzorek fúzního proteinu před štěpením thrombinem, 2 - Vzorek proteinu po 16 h štěpení, 3 - Standard molekulových hmotností (97 kDa, 67 kDa, 45 kDa, 29 kDa).

6.2.3 Gelová chromatografie

Závěrečným krokem purifikace byla gelová filtrace. Tato metoda umožňuje oddělit purifikovaný protein od balastních proteinů, které se nepodařilo odstranit afinitní chromatografií.

Před gelovou chromatografií byl vzorek zkoncentrován na objem 2,6 ml. Na kolonu jsem roztok proteinu nanášela po menších množstvích (2 x 1,3 ml), protože kolona umožňuje při nánosu nižších objemů lepší rozlišení.

Průběh chromatografie je zachycen na grafu 6.3. Frakce byly jímány v průběhu celé gelové filtrace. Na 15% polyakrylamidový gel jsem nanesla frakci A7 a B1, které odpovídají maximu prvních dvou píků (balastní proteiny), a frakce B6 až B12, které s největší pravděpodobností odpovídají píku AANAT (viz obr. 6.4). Sloučeny byly frakce o maximální čistotě proteinu (B8 až C1).



Obr.6.3 Průběh gelové chromatografie je zobrazen jako závislost absorbance eluovaného roztoku při 280 nm na objemu eluátu. AANAT odpovídá třetí píku zleva.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Obr. 6.4 15% SDS-PAGE frakcí po gelové filtraci.

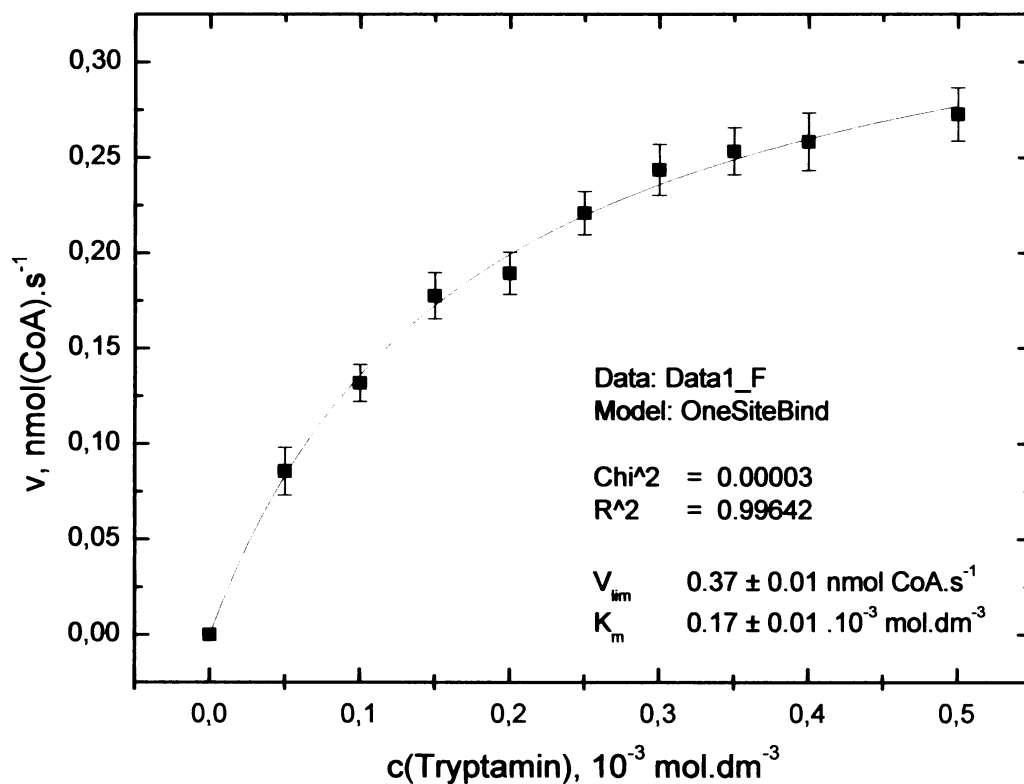
1 - Standard molekulových hmotností (29 kDa, 21 kDa, 12,5 kDa, 6,5 kDa),
2 – Frakce A7, 3 – Frakce B1, 4–10 – Frakce B6 až B12 odpovídají píku AANAT₃₂₋₂₀₇ (19,8 kDa).

Po sloučení frakcí jsem opět určila koncentraci proteinu. Výsledkem purifikace bylo 6 ml roztoku AANAT o koncentraci 0,51 mg/ml.

6.3 Stanovení enzymové aktivity

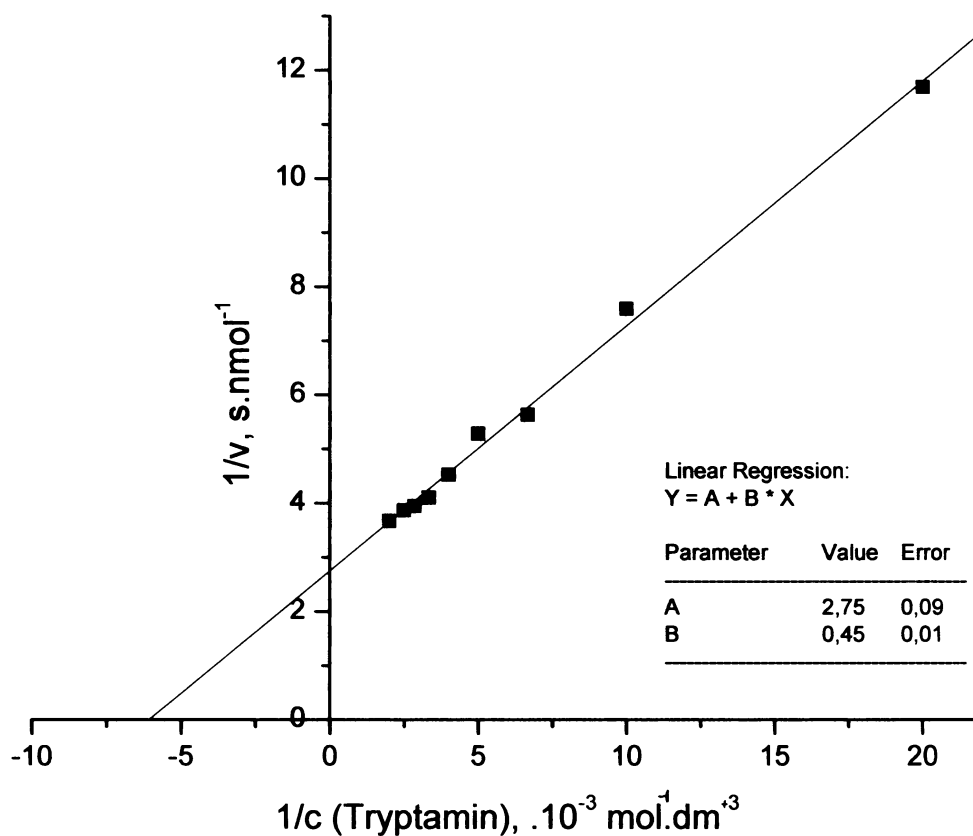
K ověření enzymové aktivity AANAT₃₂₋₂₀₇ jsem použila kinetický test s thiol-reaktivním činidlem DTNB. DTNB reaguje s produktem enzymové reakce za vzniku spektrofotometrického produktu s absorpčním maximem při 412 nm.

Hodnoty absorbance barevného produktu jsem přepočítala na reakční rychlost (látkové množství CoA vzniklého během reakce za 1 s). Pro výpočet látkového množství barevného produktu jsem použila $\epsilon = 13700 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Získané hodnoty jsem vynesla v závislosti na koncentraci tryptaminu do grafu (viz obr. 6.5). Pomocí nelineární regrese jsem vypočítala hodnoty V_{lim} a K_m . Vynesením reciprokových hodnot ($1/v$ v závislosti na $1/c(\text{tryptamin})$) jsem získala přesnější výsledky (viz obr. 6.6).



Obr.6.5 Závislost rychlosti (odpovídá látkovému množství CoA vzniklého za 1 s) na koncentraci tryptaminu. Každý bod je aritmetický průměr ze tří měření.

Nelineární regresí jsem vypočetla hodnotu $K_m = 0,17 \pm 0,01 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Limitní rychlosti $V_{lim} = 0,37 \pm 0,01 \text{ nmol s}^{-1}$ odpovídá, vzhledem k použitému látkovému množství enzymu, číslo přeměny $k_{cat} = 22,8 \text{ s}^{-1}$.



Obr. 6.6 Výnos závislosti reciproké hodnoty rychlosti (odpovídá látkovému množství CoA vzniklého za 1 s) na reciproké hodnotě koncentrace tryptaminu. Experimentální body byly proloženy přímkou.

Lineární regresí jsem vypočetla hodnotu $K_m = 0,16 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Limitní rychlosti $V_{lim} = 0,36 \text{ nmol s}^{-1}$ odpovídá, vzhledem k použitému látkovému množství enzymu, číslo přeměny $k_{cat} = 22,3 \text{ s}^{-1}$.

6.4 Fosforylace a test interakce se 14-3-3 proteinem

AANAT interaguje se 14-3-3 proteinem, je-li fosforylována.

Pro fosforylaci bylo použito 1,9 ml roztoku proteinu AANAT o koncentraci $0,86 \text{ mg ml}^{-1}$.

$$M_w(\text{AANAT}) = 19800$$

$$m = 1,63 \text{ mg}$$

$$n = 0,00163/19800 = 82,5 \text{ nmol}$$

1 jednotka PKA postačí na fosforylaci 0,7 nmol fosforylačních míst.

$$82,5/0,7 = 118 \text{ jednotek PKA (aktivita 80 jednotek/}\mu\text{l)}$$

$$118/80 = 1,5 \mu\text{l PKA}$$

Tab. 6.1 Složení fosforylační směsi.

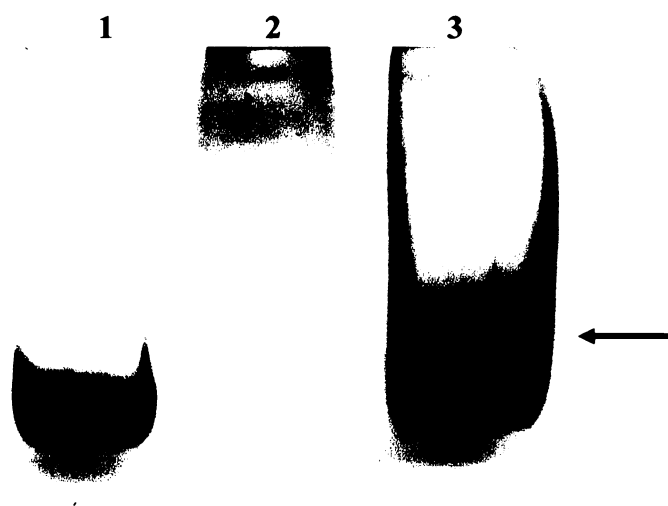
složka	V (μl)	finální koncentrace
ATP	28,5	$0,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
MgCl ₂	28,5	$15 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
PKA	1,5	118 jednotek

Interakci AANAT se 14-3-3 proteinem jsem ověřovala pomocí nativní elektroforézy.

6.4.1 Ověření interakce pomocí nativní elektroforézy

Do první dráhy 12% nativního TBE gelu jsem nanesla 20 μl roztoku 14-3-3 proteinu o koncentraci $40 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (vzorek 14-3-3 proteinu jsem získala od RNDr. J. Šilhána), do druhé dráhy 20 μl roztoku pAANAT o koncentraci $21 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a do třetí dráhy 20 μl směsi 14-3-3 ($40 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) + pAANAT ($21 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Obrázek 6.4 ukazuje výsledek nativní elektroforézy. Z porovnání jednotlivých drah je patrné, že v dráze, kde migroval vzorek směsi je přítomna nová zóna odpovídající komplexu 14-3-3/AANAT.



Obr. 6.4 12% nativní elektroforéza.

1 – Do první dráhy byl aplikován samotný 14-3-3 protein, 2 – do druhé pAANAT, 3 – směs obou proteinů. Šipkou je označena zóna, která odpovídá vytvořenému komplexu.

6.4.2 Nepřímý test interakce pAANAT se 14-3-3ζ proteinem pomocí gelové filtrace

V tomto experimentu jsem se pokusila sledovat tvorbu komplexu mezi 14-3-3 proteinem a pAANAT pomocí gelové filtrace.

Na kolonu jsem postupně aplikovala vzorky obsahující:

- AANAT
- 14-3-3ζ protein
- ekvimolární směs AANAT a 14-3-3ζ
- ekvimolární směs pAANAT a 14-3-3ζ

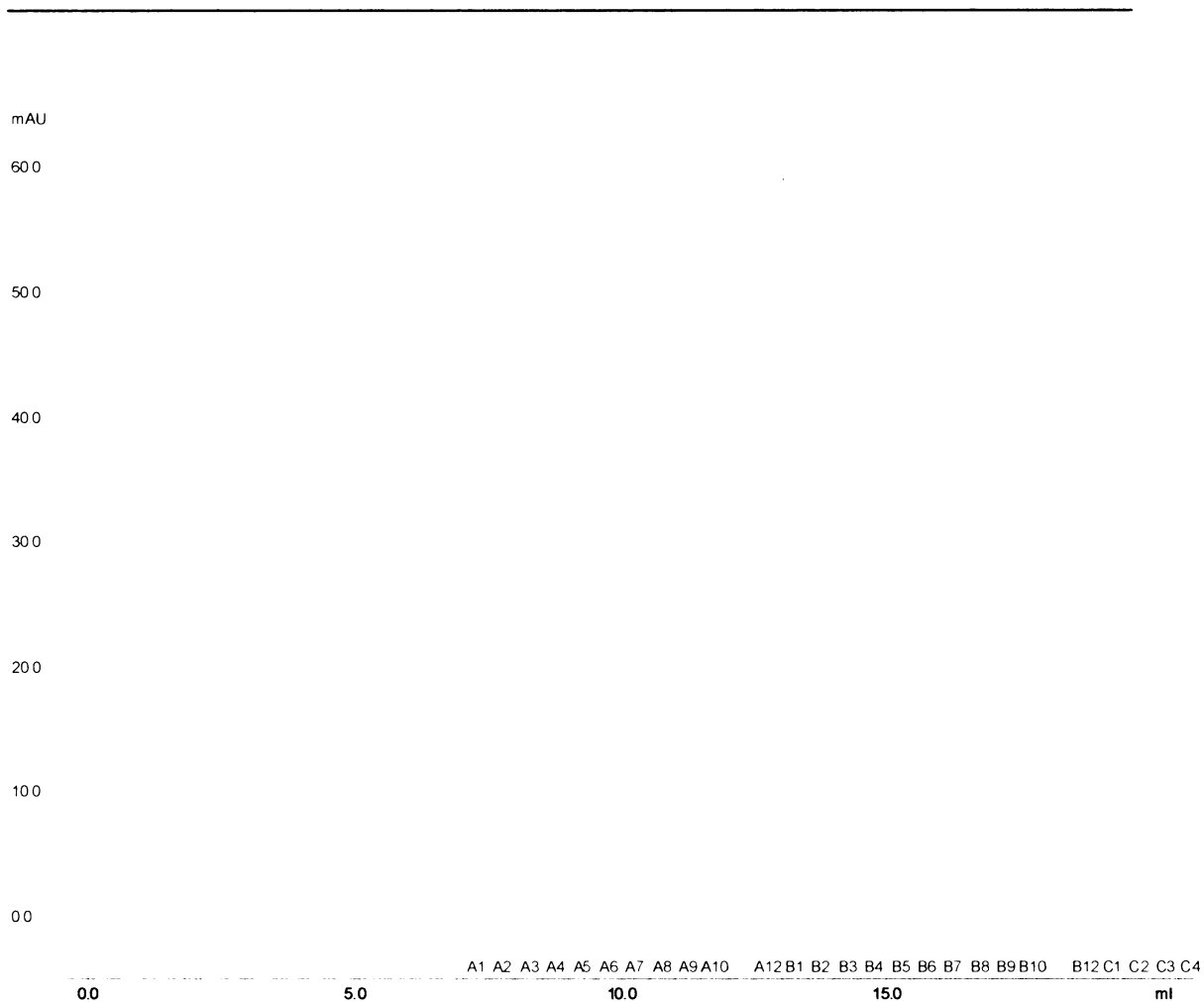
Průběh jednotlivých analýz je zobrazen níže jako závislost absorbance eluovaného roztoku při 280 nm na objemu eluátu. (viz obr. 6.8, 6.9, 6.10 a 6.11). Vzorky AANAT a pAANAT byly před analýzou 30 min inkubovány se 14-3-3ζ při 4°C. Porovnáme-li grafy 6.10 a 6.11, je zřejmé, že k interakci 14-3-3ζ s pAANAT dochází. Pík pAANAT je oproti píku AANAT snížen, zatímco pík 14-3-3ζ se po interakci s pAANAT zvyšuje, protože samotný 14-3-3 migruje s vytvořeným komplexem.



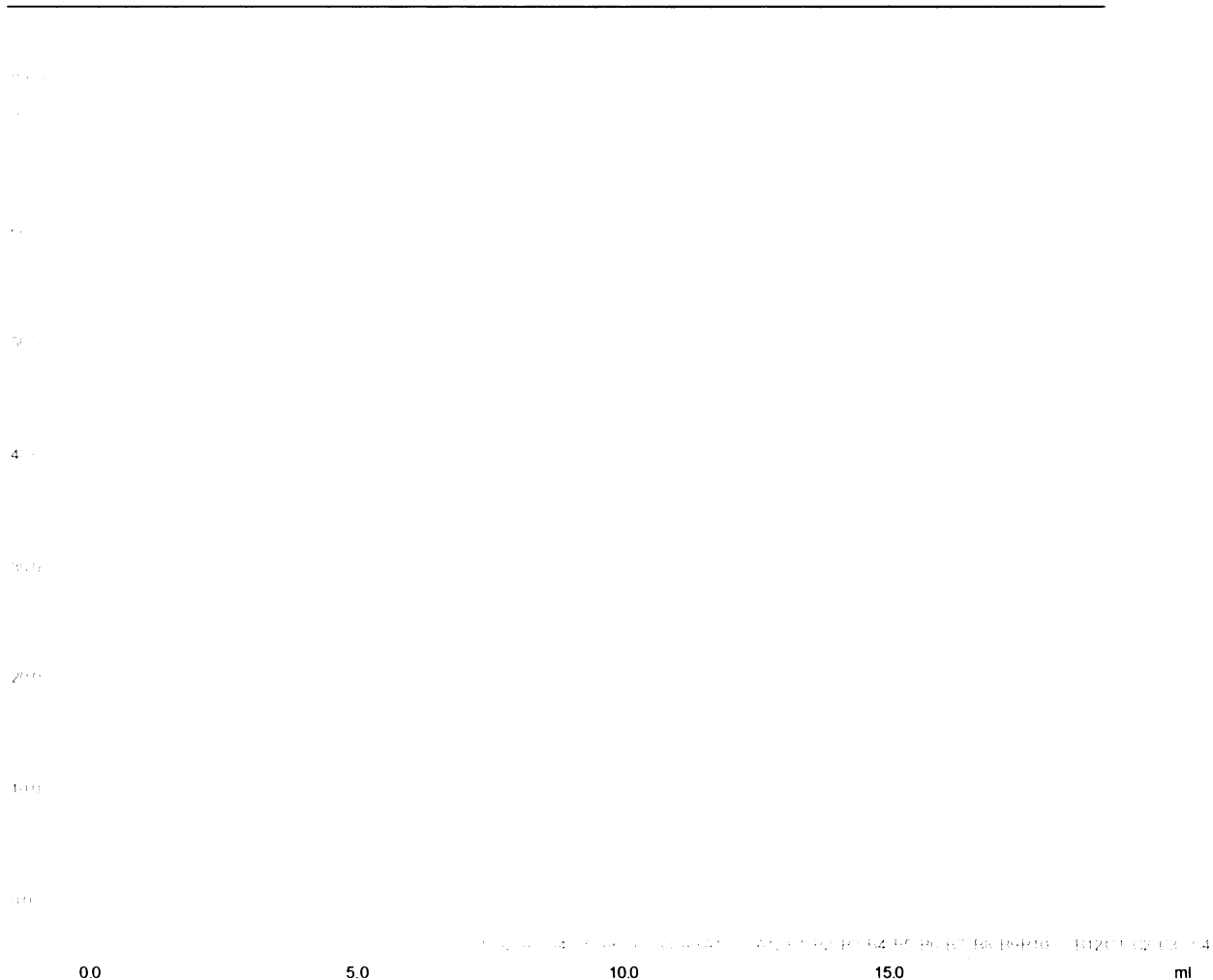
Obr. 6.8 Eluční profil 14-3-3ζ proteinu.



Obr. 6.9 Eluční profil AANAT₃₂₋₂₀₇.



Obr. 6.10 Eluční profil ekvimolární směsi 14-3-3 ζ monomeru a AANAT₃₂₋₂₀₇. Píky jsou zcela odděleny a nemění se jejich tvar a velikost, k interakci nedochází.



Obr. 6.11 Eluční profil ekvimolární směsi 14-3-3 ζ monomeru a pAANAT₃₂₋₂₀₇. Pík pAANAT se snížil a pík 14-3-3 proteinu se zvýšil, protože migruje s vytvořeným komplexem. Z toho jsem usoudila, že dochází k tvorbě komplexu.

7 Diskuze

Serotonin N-acetyltransferáza hraje klíčovou roli v regulaci biosyntézy neurohormonu melatoninu. Tento enzym katalyzuje přenos acetylové skupiny z AcCoA na serotonin za vzniku N-acetylserotoninu [1,4,7]. Znalost regulace aktivity serotonin N-acetyltransferázy je proto důležitá nejen z hlediska chronobiologie, ale i z hlediska medicíny, protože účinný inhibitor tohoto enzymu by mohl zvyšovat koncentraci serotoninu v mozku a tak působit např. jako lék proti depresím. Mnoho informací o katalytickém mechanismu serotonin N-acetyltransferázy přinesly krystalové struktury katalytického jádra enzymu a jeho komplexu s bisubstrátovým inhibitorem [1,6].

Aktivita serotonin N-acetyltransferázy je regulována prostřednictvím fosforylace a interakce s regulačním 14-3-3 proteinem [17,18]. AANAT obsahuje dvě fosforylační místa pro PKA, která jsou zároveň i vazebnými místy pro 14-3-3 protein. Fosforylace AANAT indukuje vazbu 14-3-3 proteinu a ten strukturně moduluje aktivní centrum enzymu [17,18]. Význam N-terminálního PKA místa (Thr 31) je již relativně dobře prostudován [17]. Fosforylace Thr 31 je zcela dostačující pro vazbu 14-3-3 proteinu a částečnou aktivaci enzymu. Nicméně pro plnou aktivaci AANAT je nutná fosforylace obou PKA míst (Thr 31 a Ser 205) a pravděpodobně vazba 14-3-3 proteinu na obě fosforylovaná místa. Vzhledem k tomu, že se zatím podařilo získat pouze strukturu komplexu 14-3-3 proteinu s navázanou C-terminálně zkrácenou verzí AANAT, je funkce C-terminálního PKA místa zatím nejasná.

Jedním z důvodů proč ještě nebyla vyřešena struktura komplexu 14-3-3 proteinu s navázaným kompletním enzymem (sekvence 1-207) je malá rozpustnost tohoto proteinu a citlivost vůči proteolytické degradaci. Proto bylo nejdříve studováno katalytické jádro AANAT (sekvence 28-201, byly odstraněny flexibilní N- a C- konce) [1,6]. Tyto konce však obsahují PKA místa nutná pro interakci se 14-3-3 proteinem. Pro studium role N-terminálního PKA místa byla použita C-terminálně zkrácená AANAT (sekvence 1-201), protože odstranění C-konce (6 aminokyselin) výrazně zvýšilo rozpustnost proteinu [17]. Podobný postup byl proto navržen i pro studium funkce C-terminálního PKA místa a jeho významu v regulaci aktivity AANAT.

Tato diplomová práce je věnována expresi a purifikaci N-terminálně zkrácené verze enzymu AANAT (sekvence 32-207), která obsahuje pouze C-terminální PKA místo Ser 205 (Thr 31 byl odstraněn). AANAT₃₂₋₂₀₇ jsem připravila pomocí prokaryotního

expresního systému a exprimovala ji jako fúzní protein s GST. Enzym jsem proto nejdříve purifikovala pomocí afinitní chromatografie, která využívá GST kotvy. Při tomto purifikačním kroku jsem získala relativně koncentrovaný a nepříliš znečištěný roztok fúzního proteinu GST-AANAT₃₂₋₂₀₇. Ze 4 l bakteriální suspenze jsem získala přibližně 25 mg fúzního proteinu. Následovalo odštěpení GST kotvy pomocí thrombinu. Fúzní protein byl po 16 hodinách inkubace s thrombinem zcela rozštěpen a nedošlo k viditelné degradaci samotné AANAT. Volnou GST jsem z velké části odstranila další afinitní chromatografií. Zbytek GST i ostatní balastní proteiny jsem odstranila použitím gelové filtrace. Výsledkem byly frakce obsahující velmi čistý enzym, které jsem sloučila a použila pro kinetický test a test interakce enzymu se 14-3-3 proteinem. Celkově jsem získala přibližně 3 mg čistého enzymu.

Pomocí kinetického testu s DTNB jsem změřila enzymovou aktivitu purifikovaného enzymu. Vypočítané hodnoty K_m a čísla přeměny k_{cat} (pro tryptamin při saturační koncentraci AcCoA) odpovídají hodnotám publikovaným pro kompletní enzym [29]. Z toho lze usoudit, že odstranění N-terminálního konce nemělo žádný vliv na katalytické vlastnosti enzymu.

Roztok AANAT jsem fosforylovala a pomocí nativní elektroforézy otestovala interakci se 14-3-3 ζ . AANAT má při pH TBE pufru kladný náboj, do gelu tedy nemigruje. Záporně nabitý 14-3-3 protein naopak do gelu migruje bez problému. V dráze obsahující směs 14-3-3 ζ a pAANAT se objevily dvě zóny, což svědčí o interakci mezi proteiny a vzniku komplexu. Zóna odpovídající komplexu byla poměrně slabá. Jedná se pouze o orientační test interakce pAANAT₃₂₋₂₀₇ a 14-3-3 proteinu. Pro lepší charakterizaci této interakce bude zapotřebí použít jinou metodu umožňující přesné stanovení disociační konstanty.

Tato diplomová práce ukazuje, že enzym AANAT₃₂₋₂₀₇ lze pomocí prokaryotního expresního systému připravit v relativně velkém množství a purifikovaný enzym je plně aktivní a stabilní. V porovnání s AANAT₁₋₂₀₁ a AANAT₂₈₋₂₀₁ je expresní výtěžek AANAT₃₂₋₂₀₇ podstatně nižší a rozpustnost proteinu menší [1,6,17], ale stále dostačující pro případné strukturní studie.

8. Závěr

- Provedla jsem expresi N-terminálně zkráceného enzymu AANAT (sekvence 32-207) v bakteriích *E. coli* Bl21(DE3).
- Exprimovaný enzym jsem vypurifikovala pomocí afinitní chromatografie a gelové filtrace. Afinitní kotvu GST jsem odstranila pomocí thrombinového štěpení.
- Ověřila jsem enzymovou aktivitu vypurifikovaného enzymu. Naměřená enzymová aktivita odpovídá publikovaným hodnotám pro kompletní enzym.
- Provedla jsem fosforylaci AANAT pomocí PKA kinázy.
- Pomocí nativní elektroforézy jsem ověřila interakci fosforylované AANAT s regulačním 14-3-3ζ proteinem.

Literatura

1. Hickman, A.B., Klein, D.C., Dyda, F.: *Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism*. Mol. Cell 3, 23-32 (1999).
2. Rosypal, S. a kol.: *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia 2003.
3. Medicínský slovník. <<http://www.medterms.com>> [on-line, cit. 15.4.2006].
4. Klein D.C., Weller, J.L.: *Rapid light induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity*. Science 177, 532-533 (1972).
5. Gastel, J.A. Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L., Klein, D.C.: *Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation*. Science 279, 1358-1360 (1998).
6. Hickman, A.B., Namboodiri, M.A.A., Klein, D.C., Dyda, F.: *The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog*. Cell 97, 361-369 (1999).
7. Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M.: *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock*. Oxford University Press, New York 1991.
8. Časopis Zdraví 21: *Denní péče*. <<http://www.zdravi21.cz>> [on-line, cit. 15.4.2006].
9. Matoušek, J.: *Vliv světla a osvětlení na člověka*. Elektroinstalátér 5/2003.
10. Palmer J. D.: *The living clock*. Oxford university Press, New York 2000.
11. Smolensky M., Lamberg L.: *The body clock guide to better health*. Henry Holt and Co (2000).
12. Vetting, M.W., De Carvalho, L.P.S., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L., Blanchard, J.S.: *Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases*. Arch Biochem Biophys. 433(1), 212-26 (2005).
13. Coon, S.L., Del Olmo, E., Young, W.S. 3rd, Klein, D.C.: *Melatonin synthesis enzymes in Macaca mulatta: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87)*. J Clin Endocrinol Metab. 87(10), 4699-706 (2002).
14. Klein, D.C., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Luvone, P.M., Begay, V., Falcon, J., et al.: *The molecular basis of the pineal melatonin rhythm: Regulation of serotonin N-acetylation*. In Handbook of Behavioral State Control. pp. 45-59 (1998).

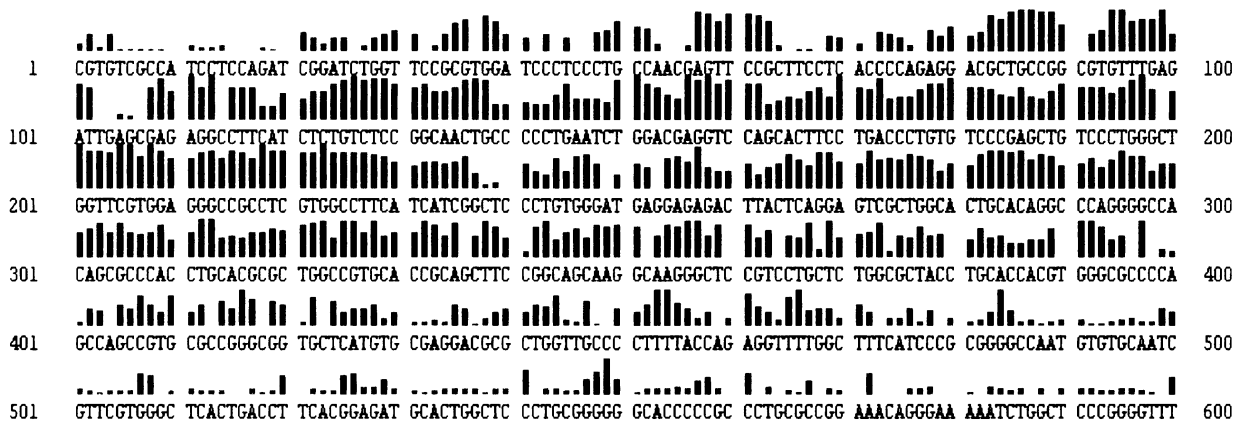
-
15. Namboodiri, M.A.A., Sugden, D., Klein, D.C., Tamarkin, L., Mefford, I.N.: *Serum melatonin and pineal indoleamine metabolism in a species with a small day/night N-acetyltransferase rhythm*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 731-736 (1985).
 16. Aitken, A.: *14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways*. *Trends Cell Biol.* 6, 341-347 (1996).
 17. Obsil, T., Girlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F.: *Crystal structure of the 14-3-3 ζ :serotonin N-acetyltransferase komplex: A role for scaffolding in enzyme regulation*. *Cell* 105, 257-267 (2001).
 18. Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwarz, C., Jaffe, H., Namgoodiri, M.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, R., et al.: *Role of pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8083-8088 (2001).
 19. Ganguly, S., Weller, J.L., Ho, A., Chemineau, P., Malpaux, B., Klein, D.C.: *Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(4), 1222-7 (2005).
 20. Vodrážka, Z.: *Biotechnologie*. Praha, Academia 1992.
 21. Škoda, J.; Škodová, H.: *Molekulární genetika pro potravinářské chemiky a biotechnologie*. Praha, SNTL 1984.
 22. Voet, D., Voetová, J.G.: *Biochemie*. Praha, Victoria Publishing 1995.
 23. Průša, R.: *Základy analytických metod v molekulární biologii*. Praha, 2.LF UK a Lambda Bio-Med 1997.
 24. Univerzita Palackého v Olomouci. Navrátil, M.: *Izolace imunoglobulinové frakce krevního séra*. <<http://genetika.upol.cz/doc/cv2igf.doc>> [cit. 20.1.2006].
 25. Encyklopedie Wikipedie: *Gelová chromatografie*. <<http://cs.wikipedia.org>> [on-line, cit. 7.3.2006].
 26. Univerzita Palackého v Olomouci: *Elektroforéza*. <http://chemie.upol.cz/skripta/zfcm/elva/elva_teorie.htm> [cit. 20.1.2006].
 27. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: *Enzymová kinetika*. <http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/enzymy.html> [cit. 10.12.2006].
 28. Macholán, L., Barthová, J., Kučera, I.: *Enzymologie*. MU Brno 1994.
 29. De Angelis, J., Gastel, J., Klein, D.C., Cole, P.A.: *Kinetic analysis of the catalytic mechanism of serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87)*. *J. Biol. Chem.* 273(5), 3045-50 (1998).

Přílohy

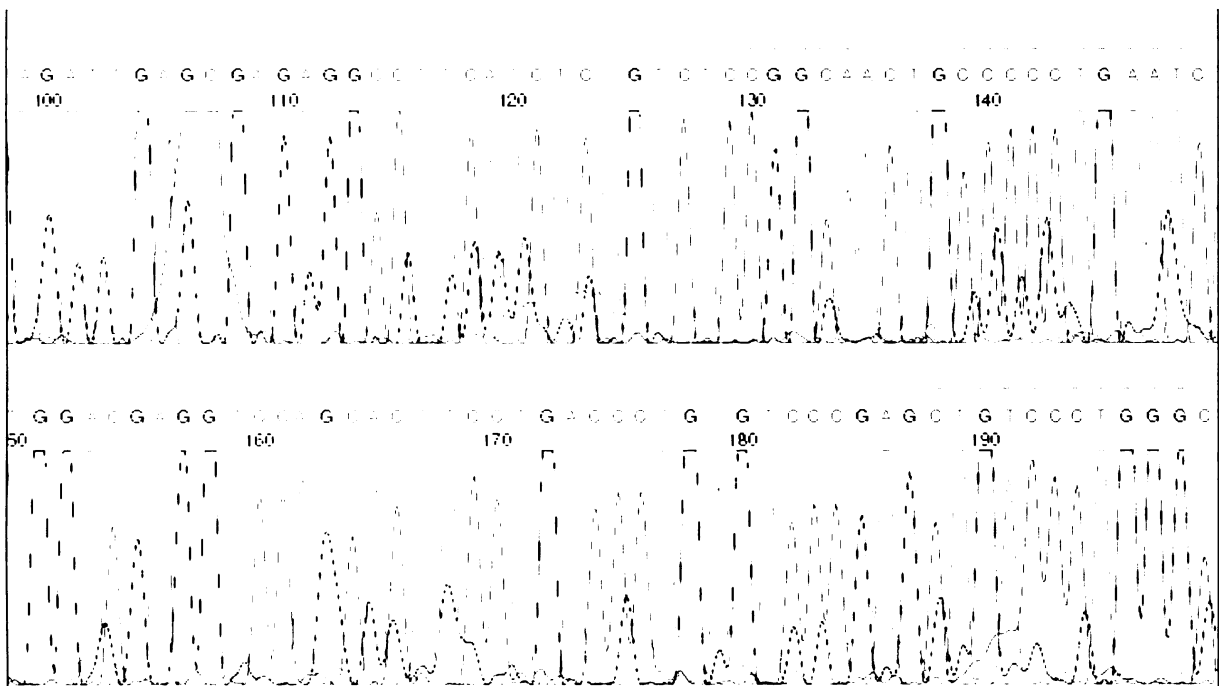
A

Sekvenční chromatogram mRNA AANAT₃₂₋₂₀₇.

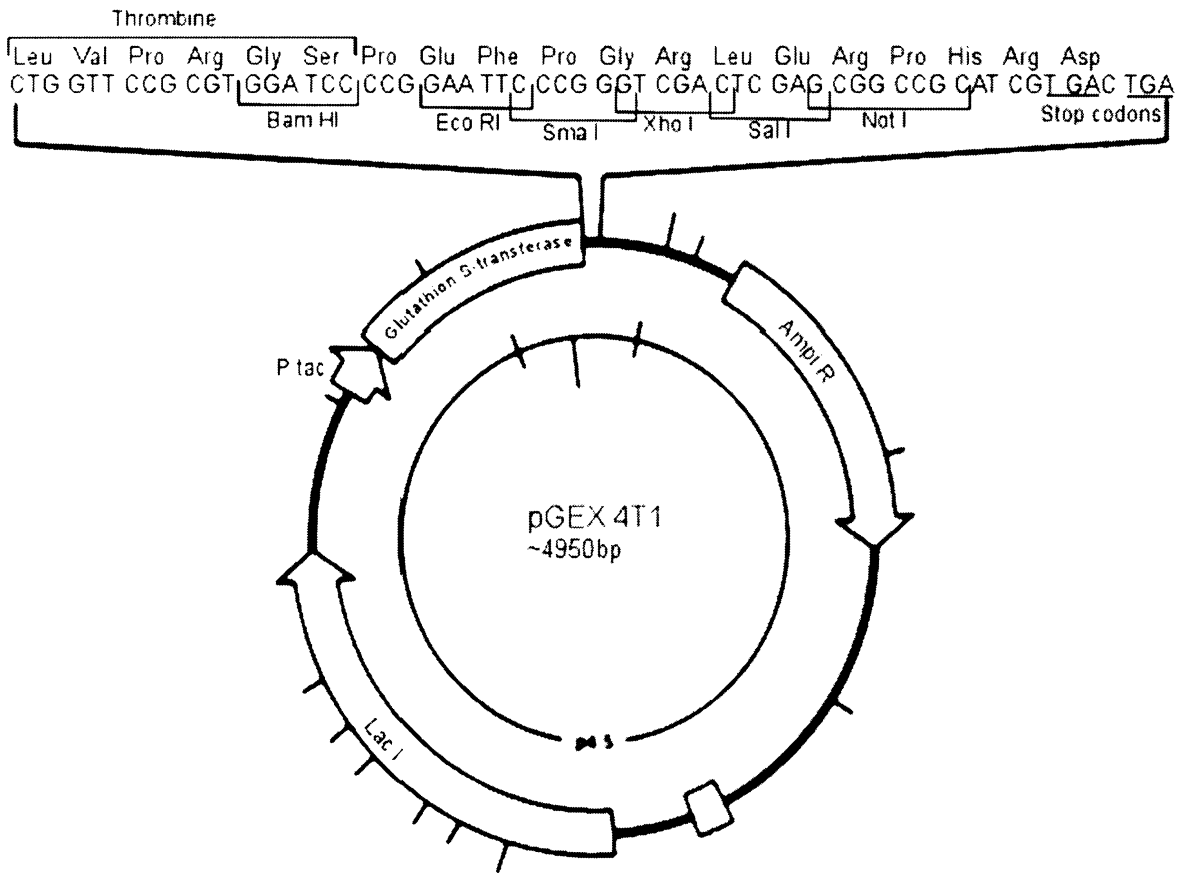
Zjednodušený záznam sekvenace je uveden pro celou sekvenci bazí zkrácené verze enzymu, kompletní chromatogram pro sekvenci bazí 292 – 392.



Ukázka kompletního chromatogramu sekvence bazí AANAT 292 – 392.



B
 Mapa vektoru pGEX 4T-1.



C**Ovčí AANAT mRNA.**

LOCUS OAU29663 960 bp mRNA linear MAM 11-DEC-1996
DEFINITION *Ovis aries* pineal arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA,
komplete cds.
ACCESSION U29663
VERSION U29663.1 GI:1122943
SOURCE *Ovis aries* (sheep)
ORGANISM *Ovis aries*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla;
Ruminantia;
Pecora; Bovidae; Caprinae; *Ovis*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 960)
AUTHORS Coon,S.L., Roseboom,P.H., Baler,R., Weller,J.L.,
Namboodiri,M.A.,Koonin,E.V. and Klein,D.C.
TITLE Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and
molecular analysis
JOURNAL Science 270 (5242), 1681-1683 (1995)
PUBMED 7502081
REFERENCE 2 (bases 1 to 960)
AUTHORS Roseboom,P.H., Coon,S.L., Baler,R., McCune,S.K., Weller,J.L.
and Klein,D.C.
TITLE Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold
nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic
acid in the rat pineal gland
JOURNAL Endocrinology 137 (7), 3033-3045 (1996)
PUBMED 8770929
REFERENCE 3 (bases 1 to 960)
AUTHORS Coon,S.L., Roseboom,P.H., Baler,R., Weller,J.L.,
Namboodiri,M.A.A., Koonin,E.V. and Klein,D.C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-JUN-1995) Patrick Roseboom, Section on
Neuroendocrinology, National Institutes of Health, 49 Convent
Drive, MSC 4480, Bethesda, MD 20892, USA
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..960
organism="Ovis aries"
mol_type="mRNA"
strain="Dorsett X Rambouillet"
db_xref="taxon:9940"
clone="87A"
CDS 144..767
EC_number="2.3.1.87"
note="AA-NAT; serotonin N-acetyltransferase"
codon_start=1
product="arylalkylamine N-acetyltransferase"
protein_id="AAC48690.1"
db_xref="GI:1122944"

translation="MSTPSVHCLKPKSPHLHPGIPGSPGRQRRHTLPANFRCLTPED
AAGVFEIEREAFISVSGNCPNLNDEVQHFLTLCPELSLGWVVEGRLVAFIIGSLWDEE
RLTQESLALHRPRGHS AHLHALAVHRSFRQQGKGSVLLWRYLHHVGAQPAVRRVLMC
EDALVPFYQRFGFHPAGPCAIVVGS�TFTEMHC SLRGHAALRRNSDR"

Označená sekvence bází odpovídá zkrácené verzi enzymu AANAT 32 – 207.

ORIGIN

```
1 ctgtggacag ctccccgagt ggtggctctg tggggggaac attagagctc ctgtaacaca
61 ggagtctctg tgtggagggg ccttccttgt cacataggcc ctttctgaag ctggcgaccc
121 cctgggtggc agccgcaccc aggatgtcca cgccgagcgt ccaactgcctg aaacctctgc
181 ctttgacact gccctctggg atcccagggt ccccaggccg ccagcggcgc cacacgctcc
241 ctgccaacga gttccgctgc ctcaccccag aggacgctgc cggcgtgttt gagattgagc
301 gagaggcctt catctctgtc tccggcaact gccccctgaa tctggacgag gtccagcact
361 tcctgaccct gtgtcccag ctgtccctgg gctggttcgt ggagggccgc ctctgtggcct
421 tcatcatcgg ctcccctgtg gatgaggaga gacttactca ggagtcgctg gcactgcaca
481 ggcccagggg ccacagcgcc cacctgcacg cgtggccgt gcaccgcagc ttccggcagc
541 aaggcaaggg ctccgtcctg ctctggcgct acctgcacca cgtgggcgcc cagccagccg
601 tgcgcccggc ggtgctcatg tgcgaggacg cgtgggtgcc cttttaccag aggtttggct
661 tccatcccgc gggcccatgt gccatcgtcg tgggtcact gaccttcacg gagatgcact
721 gctccctgcg gggccacgcc gccctgcgcc ggaacagtga ccgctgactc cccagggagc
781 ccatggtcgg gggctcctac tcaaccccca gtcgggtccc cttctctgcc ctgctgtccc
841 cctgctctgc ttggtctgaa gggaaacggt gattcccagg ggatgggtgga acggggagaa
901 tgagtgaat aaagagaagg tggggaggct gctcccagcc caggtgccct cctggggcgc
```