

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Fyzikální a makromolekulární chemie**

**Studijní program Klinická a toxikologická analýza**

---



**Diplomová práce**

**PŘÍPRAVA KOMPLEXŮ 14-3-3 PROTEINU A  
TRYPTOFANOVÝCH MUTANTŮ REGULAČNÍ DOMÉNY  
TYROZIN HYDROXYLÁZY**

**Bc. Eliška Nedbálková**

Školitel: RNDr. Tomáš Obšil, PhD.

## **Poděkování:**

Ráda bych vyjádřila své poděkování všem, kteří mi při zpracování diplomové práce pomáhali. Poděkování patří především mému školiteli RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. za odborné vedení, trpělivost, čas a cenné rady, které mi během mojí práce poskytl. Také děkuji RNDr. Veronice Obšilové, PhD. za pomoc s osvojením molekulárně biologických metod.

Mé poděkování rovněž patří celému kolektivu katedry Fyzikální a makromolekulární chemie za neobyčejně příjemné pracovní prostředí.

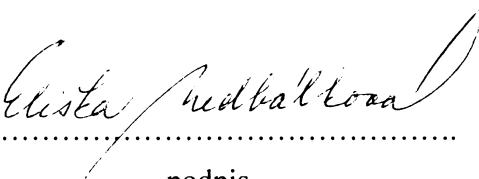
Nemohu opomenout poděkovat svým rodičům za jejich neocenitelnou podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

## 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 20. dubna 2006



.....  
podpis

## Seznam zkratek

Amp	antibiotikum ampicilin
Arg	arginin
AV ČR	Akademie věd České republiky
C - konec	COOH – konec proteinu
cDNA	cytoplazmatická DNA, vzniklá reverzní transkripcí buněčné RNA
Da, kDa	dalton, kilodalton
dATP	deoxyadenozid trifosfát
dCTP	deoxycytozid trifosfát
dGTP	deoxyguanozid trifosfát
DNA	deoxiribonukleová kyselina
dNTP (směs dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	směs nukleotid trifosfátů
dTTP	deoxythyminozid trifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission
EDTA	ethylenediaminetetraoctová kyselina
Gly	glycin
His-Tag	histidinová kotva
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D- thiogalaktopyranozid
kap	kapitola
kb	kilobáze
lac promotor	laktózový promotor
LB médium	médium podle Lurii a Bertaniho
Leu	leucin
MAPKAP kináza 1, 2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-1, 2
MCO	molekulová váha
ME	merkpto ethanol
min	minuta
N - konec	NH <sub>2</sub> - konec proteinu
obr	obrázek
°C	stupeň celsia
oligo	oligonukleotid

pb	počet párů bazí
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Phe	fenylalanin
Phe14Trp	mutace Phe na Trp v pozici 14
Phe34Trp	mutace Phe na Trp v pozici 34
Phe73Trp	mutace Phe na Trp v pozici 73
Phe103Trp	mutace Phe na Trp v pozici 103
Phe131Trp	mutace Phe na Trp v pozici 131
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
Pro	prolin
rpm	počet otáček za 1 min
s	sekunda
SDS	dodecylsírán sodný
Ser	serin
TBE	pufr obsahující Tris, kyselinu boritou, EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
TH	tyrozin hydroxyláza
TH1R	regulační doména tyrozin hydroxylázy
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	tryptofan
u	unit, tj. jednotka katalytické aktivity
Val	valin
WT	wild type, divoký typ
μl	mikrolitr

# Obsah

1 Úvod.....	8
2 Teoretický úvod.....	9
2.1 Tyrozin hydroxyláza.....	9
2.1.1 Tyrozin hydroxyláza v souvislostech.....	9
2.1.2 Obecné vlastnosti tyrozin hydroxylázy .....	12
2.1.3 Disfunkce tyrozin hydroxylázy.....	13
2.2 14-3-3 proteiny.....	15
2.2.1 Obecné vlastnosti 14-3-3 proteinů .....	15
2.2.2 Vliv vazby 14-3-3 proteinu na vlastnosti tyrozin hydroxylázy.....	16
2.3 Fluorescence.....	16
2.3.1 Fluorescence bílkovin.....	17
2.3.2 Použití fluorescenční spektroskopie.....	18
3 Cíl práce.....	19
4 Experimentální část.....	20
4.1 Molekulárně biologické metody.....	20
4.1.1 Cílená bodová mutagenese.....	20
4.1.1.1 Amplifikace DNA .....	20
4.1.2 Restrikční štěpení .....	22
4.1.3 Ověření předpokládané délky mutantních DNA.....	22
4.2 Biochemické metody.....	23
4.2.1 Analýza mutované cDNA TH1R.....	23
4.2.1.1 Transformace mutované plazmidové cDNA do expresního kmene bakterií Escherichia coli BL21 (DE3) .....	24
4.2.1.2 Test exprese proteinu TH1R.....	24
4.2.2 Purifikace regulační domény tyrozin hydroxylázy.....	26
4.2.2.1 Příprava TH1R na purifikaci.....	27
4.2.2.2 Niklová afinitní chromatografie TH1R.....	28
4.2.2.3 Ověření čistoty TH1R pomocí SDS-PAGE.....	29
4.2.2.4 Kationtově výměnná chromatografie TH1R .....	29
4.2.2.5 Fosforylace.....	30
4.2.3 Purifikace 14-3-3 proteinu – monomerní a dimerní varianta .....	31
4.2.3.1 Příprava 14-3-3 proteinu na purifikaci.....	31

4.2.3.2	Niklová afinitní chromatografie 14-3-3 proteinu.....	32
4.2.3.3	Dialýza.....	32
4.2.3.4	Thrombinové štěpení.....	32
4.2.3.5	Aniontově výměnná chromatografie 14-3-3 proteinu.....	33
4.2.4	Určení koncentrace vzorků.....	33
4.2.5	Vazebné pokusy TH1R a 14-3-3 proteinu.....	34
5	Výsledky.....	35
5.1	Cílená mutagenese regulační domény tyrozin hydroxylázy.....	35
5.1.1	Ověření délky PCR produktu pomocí agarózové elektroforézy.....	35
5.1.2	Sekvenační chromatogramy .....	36
5.2	Expresa a purifikace regulační domény tyrozin hydroxylázy.....	38
5.2.1	Ověření exprese proteinu v bakteriích E. coli.....	38
5.2.2	Niklová afinitní chromatografie regulační domény TH.....	39
5.2.2.1	SDS-PAGE frakcí z niklové afinitní chromatografie TH1R.....	41
5.2.3	Kationtově výměnná chromatografie TH1R.....	44
5.2.3.1	SDS-PAGE frakcí z kationtově výměnné chromatografie TH1R.....	45
5.3	Expresa a purifikace 14-3-3 proteinu.....	47
5.3.1	Purifikace 14-3-3 proteinu – monomerní a dimerní varianta .....	47
5.3.1.1	Niklová afinitní chromatografie 14-3-3 proteinů.....	47
5.3.1.1.1	SDS-PAGE po niklové afinitní chromatografii 14-3-3 proteinu. .	49
5.3.1.2	Thrombinové štěpení.....	51
5.3.1.3	Aniontově výměnná chromatografie 14-3-3 proteinu.....	52
5.3.1.3.1	SDS-PAGE frakcí po aniontově výměnné chromatografii 14-3-3 proteinu.....	53
5.4	Určení koncentrace vzorků.....	55
5.5	Test interakce TH1R a 14-3-3 proteinu.....	56
6	Diskuze.....	59
7	Závěr.....	62
8	Seznam citované literatury.....	63
9	Přílohy.....	67

# 1 Úvod

Hlavní téma této diplomové práce je příprava komplexů 14-3-3 proteinu s mutantními verzemi regulační domény enzymu tyrozin hydroxylázy.

Tyrozin hydroxyláza je enzym, který hraje centrální roli v procesu biosyntézy neuropřenašečů dopaminu, norepinefrinu a epinefrinu. Disfunkce tyrozin hydroxylázy může vést k řadě neurologických stavů. Například se může podílet na vzniku depresí [Nestler a kol., 1990] nebo Parkinsonovy choroby [Haavik a Toska, 1998]. Aktivace tohoto enzymu probíhá v několika úrovních, z nichž klíčovou je jeho fosforylace na dvou serinových zbytcích (19 a 40) a následná interakce s regulačním 14-3-3 proteinem.

14-3-3 proteiny patří k rodině důležitých regulačních bílkovin vyskytujících se ve všech eukaryotních buňkách. Jsou to bílkoviny, které se účastní řady významných biologických dějů, jako je například programovaná buněčná smrt, regulace syntézy neurohormonů nebo kontrola buněčného cyklu [Fu a kol., 2000; van Hemert a kol., 2001]. Základní vlastností 14-3-3 proteinů je jejich schopnost vázat fosforylované proteiny a peptidy a prostřednictvím těchto vazebných interakcí regulovat funkci svých vazebných partnerů. 14-3-3 protein tedy hraje významnou roli v regulaci struktury a funkce tyrozin hydroxylázy. Jak ale přesně 14-3-3 protein tyrozin hydroxylázu ovlivňuje, není doposud známo.

Objasnění role 14-3-3 proteinu v regulaci aktivity tyrozin hydroxylázy je, z hlediska vývoje léčby výše zmíněných onemocnění, důležité pro mnoho biomedicínských oborů. Tato diplomová práce je součástí projektu, který má za cíl studium vlivu vazby 14-3-3 proteinu na strukturu a funkci tyrozin hydroxylázy.



## 2 Teoretický úvod

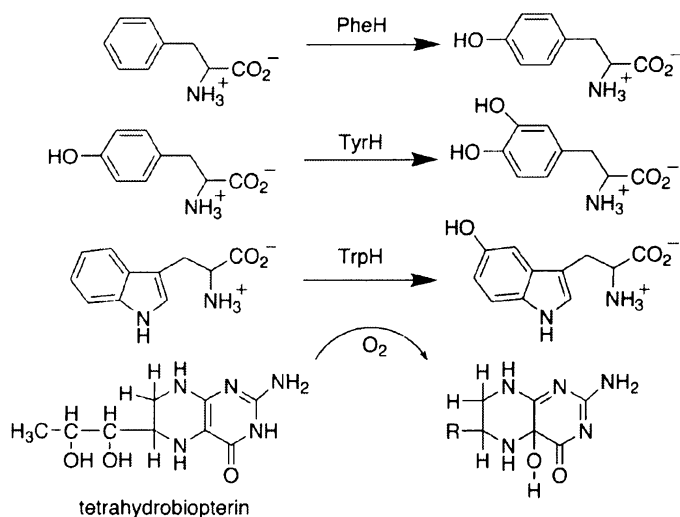
Tato diplomová práce je součástí výzkumného projektu, týkajícího se studia vlivu vazby 14-3-3 proteinu na funkci a strukturu enzymu tyrozin hydroxylázy, který je řešen na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, katedře Fyzikální a makromolekulární chemie, pod vedením RNDr. Tomáše Obšila, PhD.

Laboratoř Dr. Obšila se zabývá expresemi a purifikacemi regulační domény tyrozin hydroxylázy, studiem vlivu fosforylace Ser-19 a Ser-40 na strukturu regulační domény tyrozin hydroxylázy pomocí fluorescenční spektroskopie a také studiem vlivu vazby 14-3-3 proteinu na konformaci regulační domény tyrozin hydroxylázy.

### 2.1 Tyrozin hydroxyláza

#### 2.1.1 Tyrozin hydroxyláza v souvislostech

Tyrozin hydroxyláza tvoří spolu s fenylalanin a tryptofan hydroxylázou důležitou rodinu enzymů ze třídy oxidoreduktáz, podskupiny oxygenáz, které katalyzují zavedení hydroxylu (skupiny  $-OH$ ) do molekuly substrátu. Obrázek 2.1 znázorňuje obecné reakce těchto enzymů, které katalyzují hydroxylaci postranního řetězce aromatických aminokyselin. Jako kofaktor využívají substrát tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ), coby zdroj dvou elektronů, které jsou třeba k převedení atomu kyslíku na vodu [Fitzpatrick, 2003]. Z toho důvodu je uvedená skupina enzymů také nazývána tetrahydrobiopterin-dependentní hydrolázy.



**Obr. 2.1** Obecné (hydroxylační) reakce enzymů fenylalanin hydroxylázy (*PheH*), tyrozin hydroxylázy (*TyrH*) a tryptofan hydroxylázy (*TrpH*) [Fitzpatrick, 2003].

Eukaryotní formy těchto enzymů jsou studovány z důvodů jejich fyziologické důležitosti.

**Fenylalanin hydroxyláza** (EC 1.14.16.1) je jaterní enzym účastnící se regulace fenylalaninu v organismu. Nedostatek tohoto enzymu z velké části přispívá k onemocnění fenylketonúrii [Eisensmith a Woo, 1991], což je dědičná porucha látkové přeměny bílkovin. Systém látkové přeměny člověka s fenylketonúrií je poškozován přítomností vyššího množství fenylalaninu, který se v jeho těle nerozkládá. Ukládá se především v mozku, čímž dochází k rychlému poškození centrální nervové soustavy s mnoha důsledky (mentální postižení, křeče, světlé vlasy a oči pro nedostatek melaninu aj.) [Daubner a kol., 1997a].

**Tryptofan hydroxyláza** (EC 1.14.16.4) je enzym, který katalyzuje první krok biosyntézy serotoninu, hydroxylaci tryptofanu na 5-hydroxytryptofan. Celý serotonin – energetický systém je znám jako důležitý modulátor nálady, emocí, spánku a chuti a uplatňuje se také v ovlivnění mnoha vlastností týkajících se chování [Schloss a Williams, 1998]. V poslední době jsou změny genu tryptofan hydroxylázy spojovány s projevy agresivity [Rujescu a kol., 2002]. Stejně tak se v poslední době diskutuje o takzvaném akutním poklesu tryptofanu v organismu, který u pacientů trpících depresemi způsobuje zvýšení příznaků ztísněnosti [Spillmann a kol., 2001]. Existence tohoto enzymu byla také prokázána v 17 odlišných bakteriálních genomech [Fitzpatrick, 2003].

**Tyrozín hydroxyláza** (EC 1.14.16.2), enzym, jehož se tato práce týká, se vyskytuje v buňkách nervového systému a nadledvinek. Jeho hlavním úkolem je katalyzovat přeměnu tyrozínu na L-3,4-dyhydroxyfenylalanin (L-DOPAMIN), což je první, rychlost řídicí krok biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů dopaminu, norepinefrinu a epinefrinu [Fitzpatrick, 2003; Fitzpatrick a kol., 1989]. Tyrozín hydroxyláza je také předmětem krátkodobých a dlouhodobých regulačních systémů na úrovni transkripce, translace i postranlační modifikace bílkovin.

I přes funkční odlišnost jednotlivých enzymů, jsou jejich primární struktury velice podobné. Na obrázku 2.2 vidíme srovnání primárních sekvencí lidské tryptofan hydroxylázy (hTrpOH), lidské fenylalanin hydroxylázy (hPheOH) a potkaní tyrozín hydroxylázy (rTyrOH). V oblasti valinu 164 u rTyrOH, 117 u hPheOH a valinu 105 u hTrpOH je patrná neobyčejná shodnost. Srovnání aminokyselinových sekvencí těchto tří enzymů ukazuje, že jsou ze dvou třetin identické, nejvíce se shodují v oblasti C-konce. Neshodují se pouze v oblasti N-terminálního konce [Daubner a kol., 1993; Maass a kol., 2003; Wang a kol., 2002; Daubner a kol., 1997b].

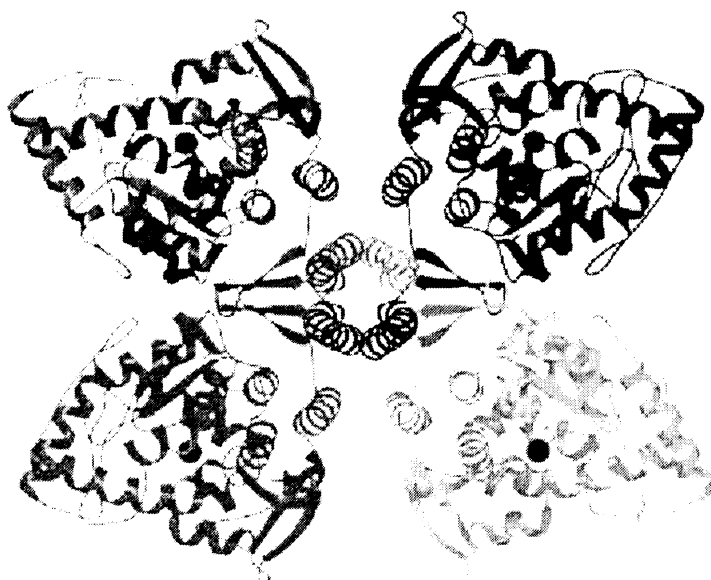


Obr. 2.2 Porovnání aminokyselinových sekvencí lidské tryptofan hydroxylázy

(*hTrpOH*), lidské fenylalanin hydroxylázy (*hPheOH*) a potkaní tyrozin hydroxylázy (*rTyrOH*) [Wang a kol., 2002].

### 2.1.2 Obecné vlastnosti tyrozin hydroxylázy

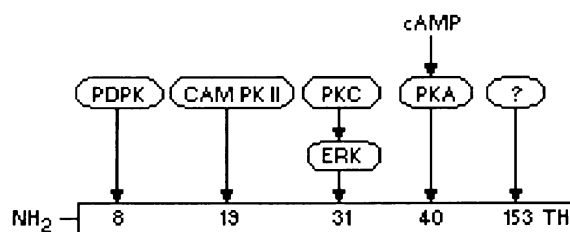
Molekula tyrozin hydroxylázy obsahuje 498 aminokyselinových zbytků a skládá se ze tří domén: regulační domény, katalytické domény a tetramerizační domény [Goodwill a kol., 1997]. V roztoku tvoří tyrozin hydroxyláza tetramery a každý monomer obsahuje v aktivním centru jeden atom železa (obr. 2.3) [Goodwill a kol., 1998].



**Obr. 2.3** Obrázek tetrameru tyrozin hydroxylázy, přičemž každý monomer obsahuje ve svém aktivním centru jeden atom železa (ten je znázorněn bodem ve středu každého monomeru) [Goodwill a kol., 1998].

Jak již bylo zmíněno, tyrozin hydroxyláza hraje centrální roli v biosyntéze neuropřenašečů. Z důvodu tak důležité funkce je její aktivita řízena v několika úrovních. Klíčovou roli zde hraje zejména fosforylace regulační domény na aminokyselinách Ser-19 a Ser-40. Ser-19 je fosforylován  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependentní kinázou nebo MAPKAP kinázou 2 [Vulliet a kol., 1984; Sutherland a kol., 1993]. Ser-40 je fosforylován řadou proteinových kináz, např. cAMP-dependentní

protein kinázou A, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependentní kinázou nebo MAPKAP kinázou 1 [Kumer a Vrana, 1996] (**obr. 2.4**). Efekt fosforylace Ser-40 je poměrně dobře prostudován. Tato fosforylace aktivitu tyrozin hydroxylázy značně zvyšuje [Sura a kol., 2004]. Vliv fosforylace Ser-19 na aktivitu tyrozin hydroxylázy je stále nejasný. Tato fosforylace s největší pravděpodobností indukuje vazbu tyrozin hydroxylázy s regulačním 14-3-3 proteinem [Ichimura a kol., 1987].



**Obr. 2.4** Fosforylační místa regulační domény tyrozin hydroxylázy a jejich aktivace prostřednictvím kináz. PDPK: Prolin-řídící protein kináza; CAMPK II: Kalmodulin-dependentní proteinkináza II; PKC: Protein kináza C; ERK: Extracelulární signál-regulující kináza; cAMP-PKA: cAMP-dependentní protein kináza A.

Oblast těchto fosforylačních míst je z medicínského hlediska velice zajímavá. Objasnění mechanismu regulace tyrozin hydroxylázy by významně přispělo k rozvoji výzkumu nových léčiv potlačujících onemocnění způsobených právě disfunkcí tyrozin hydroxylázy (viz níže).

### 2.1.3 Disfunkce tyrozin hydroxylázy

Disfunkce tyrozin hydroxylázy může vést k řadě neurologických stavů, například se může podílet na vzniku deprese a v nemalé míře také na vzniku Parkinsonovy choroby [Haavik a Toska, 1998; Nestler a kol., 1990].

**Parkinsonova choroba** je chronické onemocnění, postihující centrální nervovou soustavu, které náleží ke skupině onemocnění motorického systému. Parkinsonova choroba je přímým důsledkem úbytku nervových buněk v části mozku nazývané černá substance (*substantia nigra*). Tyto nervové buňky produkují dopamin, neurotransmiter (přenašeč), který zajišťuje přenos signálů mezi nervovými buňkami a jehož biosyntéza

je katalyzována právě tyrozin hydroxylázou [Choi a kol., 2006]. Dopaminergní systém se podílí na modulaci celkového chování organismu, zejména v souvislosti s motivací a emocemi. Reguluje funkci motorických neuronů v bazálních gangliích a účastní se regulace systému hypothalamu a hypofýzy. Nedostatek dopaminu ovlivňuje chování nervových buněk takovým způsobem, že pacient postupně přestává být schopen ovládat nebo kontrolovat svůj pohyb. Příznaky Parkinsonovy choroby často přicházejí postupně s rostoucí závažností. Patří mezi ně třes nebo chvění končetin, obtíže s udržováním rovnováhy při chůzi, ztuhlost nebo strnulost celého těla a obecně zpomalení pohyblivosti (označované jako *bradykinéze*). V poslední fázi tyto příznaky vedou k depresím, psychickým stavům a demenci [Miyasaki a kol., 2006]. Parkinsonova choroba se může projevit i za mnoho let po prodělaném virovém zánětu mozku, po otravách manganem, oxidem uhelnatým, methylnalkoholem, po dlouhodobé aplikaci antidepresiv či narkotik. Jsou popisovány i poúrazové případy, v souvislosti s rozvojem aterosklerózy. Diskutuje se i o souvislosti s nedostatečnou činností jater a pohlavních žláz [Borges, 2005].

Parkinsonovu chorobu nelze vyléčit. Byly vyvinuty léky, které pomáhají pacientům překonat většinu příznaků, avšak žádné léky nejsou schopny její další vývoj zastavit. Proto je také studium vlastností a funkce tyrozin hydroxylázy v posledních letech předmětem práce mnoha vědců. Většina odborníků se shoduje, že nejvhodnější doba k nasazení léčby je v okamžiku, kdy pacient pocítí určité "funkční postižení", které mu brání vykonávat činnosti důležité pro kvalitu jeho života. Klasická léčba spočívá v podávání celé řady léků, které obsahují dopamin, dále antihistaminika, anticholinergika. Někdy se přistupuje k operaci mozku a transplantaci tkáně dřeně nadledvinek [<http://www.michaeljfox.org/parkinsons/index.php>].

## 2.2 14-3-3 proteiny

### 2.2.1 Obecné vlastnosti 14-3-3 proteinů

14-3-3 proteiny jsou rodina vysoce konzervovaných bílkovin, vyskytujících se v eukaryotních buňkách, přičemž k jejich expresi dochází v buňkách nervového systému. Třídímenzionální struktura 14-3-3 proteinu byla zatím objasněna u dvou lidských izoform tau a zeta [Liu a kol., 1995; Ferl a kol., 2002]. 14-3-3 protein je dimer, přičemž každý monomer se skládá z devíti antiparalelních  $\alpha$ -helixů, uspořádaných do dvou strukturálních domén (**obr. 2.5**). Spojení mezi monomery je z velké části způsobeno hydrofobními interakcemi [Yaffe a kol., 1997; Xiao a kol., 1995].



**Obr. 2.5** Schéma struktury 14-3-3 proteinu (dimerní struktura) [Benzinger a kol., 2005].

14-3-3 proteiny hrají významnou roli v řadě důležitých biologických dějů, jakými jsou například regulace signální transdukce, programovaná buněčná smrt (apoptóza), kontrola buněčného cyklu či regulace syntézy neurohormonů [Fu a kol., 2000; Stavridi a kol., 2001]. Velmi důležitou vlastností 14-3-3 proteinů je jejich schopnost specificky vázat fosforylované peptidy a proteiny, které obsahují motiv s fosforylovným serinovým či threoninovým zbytkem [Hermeking, 2003]. Doposud bylo v literatuře publikováno více než sto různých bílkovin, které jsou schopny se 14-3-3 proteiny vytvářet komplexy. Mezi klasické vazebné partnery těchto bílkovin patří například protein kináza Raf-1,

protein kináza C či enzymy, které se podílejí na syntéze neuropřenašečů, např. tryptofan hydroxyláza, tyrozin hydroxyláza nebo serotonin N-acetyltransferáza [Obsil a kol., 2001; Petosa a kol., 1998]. Prostřednictvím těchto vazebných interakcí působí 14-3-3 proteiny jako regulátory ovlivňující strukturu svých vazebných partnerů, a tím regulují jejich enzymovou aktivitu či buněčnou lokalizaci [Yaffe, 2002].

## 2.2.2 Vliv vazby 14-3-3 proteinu na vlastnosti tyrozin hydroxylázy

Samotná fosforylace na Ser-19 nemá na aktivitu tyrozin hydroxylázy žádný vliv, avšak vazba 14-3-3 proteinu, která je touto fosforylací indukována, má za následek výrazné zvýšení aktivity tyrozin hydroxylázy [Ichimura a kol., 1987; Itagaki a kol., 1999; Kleppe a kol., 2001]. O funkci vazby 14-3-3 proteinu na fosforylovanou regulační doménu tyrozin hydroxylázy se stále spekuluje. Jednou z možných eventualit je snaha 14-3-3 proteinu chránit fosforylovaný Ser-40 před defosforylací, čímž by udržel enzym v aktivní formě. Další možností je, že vazba 14-3-3 proteinu stabilizuje konformaci tyrozin hydroxylázy [Kleppe a kol., 2001]. Dále je také možné, že 14-3-3 protein má za úkol chránit oblast dvaceti aminokyselin okolo Ser-40, která je velice citlivá na proteolytickou degradaci, a která se fosforylací stává ještě náchylnější k proteolýze [Fitzpatrick, 1999].

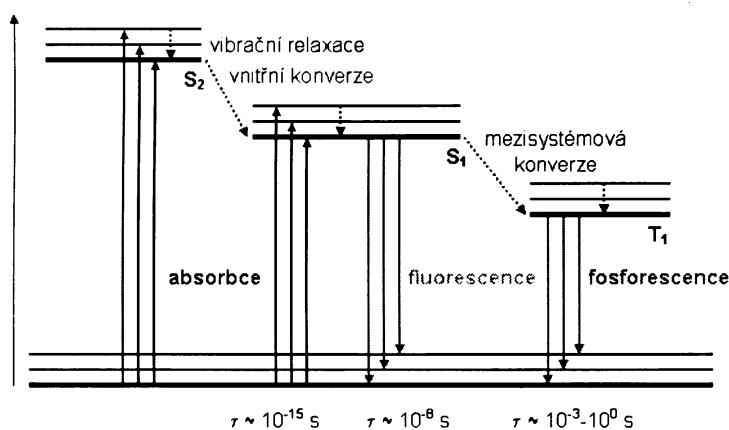
## 2.3 Fluorescence

Fluorescence je jev, při kterém je energie, absorbovaná přechodem elektronů mezi atomovými nebo molekulovými energetickými hladinami, opět emitována jako světelné záření. Excitace fluoreskujících molekul se dosahuje viditelným nebo ultrafialovým zářením.

Fluorescenci pozorujeme pouze během buzení, po jeho skončení prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově  $10^{-9}$ s). Na obrázku 2.6 je schematicky znázorněna situace při absorpci, fluorescenci a fosforescenci záření složité molekuly. Absorpce energie způsobí excitaci molekuly z nejnižší vibrační hladiny základního elektronového stavu  $S_0$  na vibrační hladinu  $S_2$  excitovaného stavu. Během doby života



excitovaného stavu přejde molekula vlivem tzv. vnitřní konverze na nejnižší vibrační hladinu  $S_1$ . Emitované fluorescenční záření vznikne tak, že ze stavu  $S_1$  přejde molekula do polohy základního elektronového stavu  $S_0$ . Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ .



**Obr. 2.6** Schéma přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly. K deexcitaci molekuly dochází buď **zářivými** přechody (luminiscence, tzn. fluorescence či fosforescence) nebo **nezářivými** přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz tečkované šipky). Doba trvání  $t$  jednotlivých procesů je pro absorpci řádově  $10^{-15}$  s, pro fluorescenci  $10^{-9}$  s, pro fosforescenci je mnohem delší než  $10^{-8}$  s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci  $10^{-12}$ - $10^{-13}$  s, pro vnitřní konverzi  $10^{-6}$ - $10^{-12}$  s, pro mezisystémovou konverzi  $10^{-4}$ - $10^{-12}$  s [<http://www1.lfl.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/principy.htm>].

### 2.3.1 Fluorescence bílkovin

Studium fluorescenčního záření se stalo vysoce užitečnou metodou při řešení řady problémů souvisejících se strukturou bílkovin a jejich interakcemi. Jako fluorescenční chromofory slouží v bílkovinách buď aromatické postranní řetězce aminokyselin tyrozinu, tryptofanu nebo fenylalaninu, nebo přirozeně vázané chromofory jako je například flavinadenindinukleotid (FAD). Jejich absorpční pás leží mezi 240 a 300 nm, emise je rovněž v ultrafialové oblasti [Kalous a Pavlíček, 1980]. Dominantním

fluoroforem je tryptofan, resp. jeho indolová skupina, neboť má mnohem širší emisní spektrum a větší kvantový výtěžek než tyrozin, jehož fluorescenci umožňuje jeho fenolový kruh. Fenylalanin se na celkové fluorescenci bílkovin prakticky nepodílí. Fluorescence tryptofanu je velmi citlivá na vlastnosti jeho okolí a lze ji proto použít pro sledování konformačních změn proteinů, např. při vazbě ligandů nebo při interakcích protein-protein [<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>].

### **2.3.2 Použití fluorescenční spektroskopie**

Hlavním cílem projektu, jehož součástí je tato diplomová práce, je studium interakce a vlivu vazby 14-3-3 proteinu na konformaci regulační domény tyrozin hydroxylázy. Konkrétně jde o studium vlivu fosforylace a vazby 14-3-3 proteinu na strukturu regulační domény tyrozin hydroxylázy. Jedním z hlavních nástrojů k řešení tohoto problému jsou metody stacionární a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Regulační doména tyrozin hydroxylázy neobsahuje žádné tryptofanové zbytky, což umožňuje, s použitím molekulárně biologických metod, vložit tryptofanový zbytek do míst, kde chceme studovat případné strukturní změny. Připravené mutanty regulační domény tyrozin hydroxylázy, obsahující pouze jeden tryptofanový zbytek, mohou být také použity v experimentech využívajících Försterův rezonanční přenos energie (FRET).

### 3 Cíl práce

1. Pomocí bodové mutagenese připravit sérii mutantů regulační domény enzymu tyrozin hydroxylázy obsahující pouze jeden tryptofanový zbytek na předem vybraných místech.
2. Provést expresi a purifikaci původní nemutované verze regulační domény tyrozin hydroxylázy.
3. Provést expresi a purifikaci dvou mutantních verzí regulační domény tyrozin hydroxylázy.
4. Provést expresi a purifikaci dvou variant 14-3-3 proteinu, a to jeho monomerní a dimerní formy.
5. Otestovat vazebné interakce mezi 14-3-3 proteinem a regulační doménou tyrozin hydroxylázy.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Molekulárně biologické metody

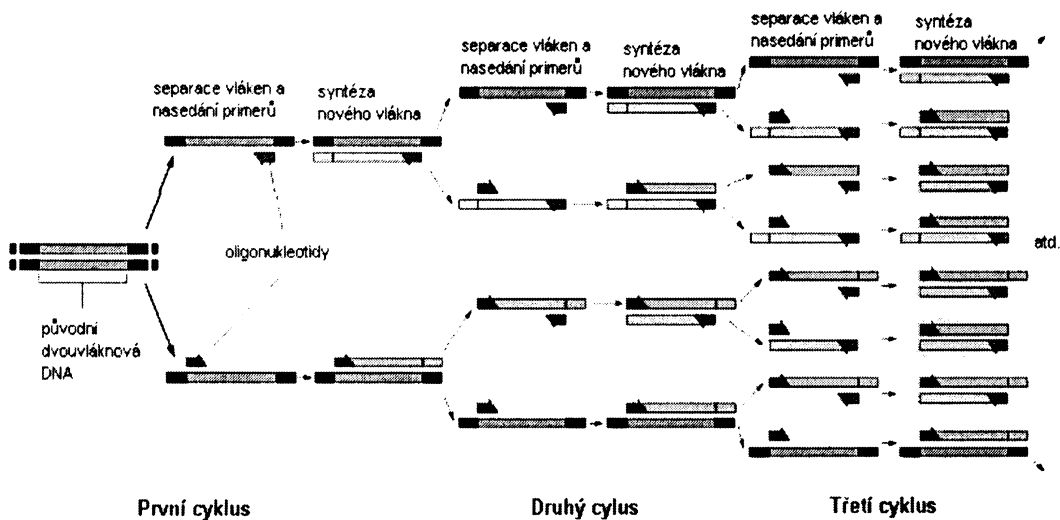
V této práci byla jako mateřská DNA pro mutagenezi použita cDNA regulační doména lidské tyrozin hydroxylázy (TH1R), (izoforma I), vnesená do vektoru pET-15b (mapa plazmidu viz **kap. 9, příloha A**) obsahující štěpné místo pro TEV proteázu.

Ve všech případech došlo k mutaci fenylalaninu na tryptofan. Regulační doména tyrozin hydroxylázy byla mutována v pozicích 14, 34, 73, 103 a 131.

#### 4.1.1 Cílená bodová mutagenese

##### 4.1.1.1 Amplifikace DNA

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. Reakce využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny DNA a od jejich 3'-konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou. Opakování cyklů, které zahrnují denuraci DNA templátů (denaturation), hybridizaci primerů (annealing) a syntézu komplementárních vláken DNA (extension), má za výsledek exponenciální nárůst počtu specifických DNA fragmentů (**obr. 4.1**).



**Obr. 4.1** Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Dle aminokyselinové sekvence TH1R byly pro polymerázovou řetězovou reakci navrženy a použity oligonukleotidy uvedené v tabulce 4.1. Ve všech pěti případech byla provedena mutace fenylalaninu (Phe) na tryptofan (Trp).

Phe	oligo Up	CCA CAG GCC AAG GGC <b>TGG</b> CGC AGG CGC GTG TCT
14	oligo Down	AGA CAC GCG CCT GCG <b>CCA</b> GCC CTT GGC CTG TGG
Phe	oligo Up	ATC ATG TCC CCG CGG <b>TGG</b> ATT GGG CGC AGG CAG
34	oligo Down	CTG CCT GCG CCC AAT <b>CCA</b> CCG CGG GGA CAT GAT
Phe	oligo Up	CTG GAG GCT GTG GCC <b>TGG</b> GAG GAG AAG GAG GGG
73	oligo Down	CCC CTC CTT CTC CTC <b>CCA</b> GGC CAC AGC CTC CAG
Phe	oligo Up	CGA GCT GTG AAG GTG <b>TGG</b> GAG ACG TTT GAA GCC
103	oligo Down	GGC TTC AAA CGT CTC <b>CCA</b> CAC CTT CAC AGC TCG
Phe	oligo Up	CCC CAC CTG GAG TAC <b>TGG</b> GTG CGA CTC GAG GTG
131	oligo Down	CAC CTC GAG TCG CAC <b>CCA</b> GTA CTC CAG GTG GGG

**Tab. 4.1** V tabulce jsou zaznamenány nukleotidové sekvence primerů, které byly použity pro PCR. Tučně jsou vyznačeny triplety bází, které kódují tryptofan.

Vzorky pro polymerázovou řetězovou reakci byly připraveny následovně:

5 $\mu\text{l}$	10x pufr pro DNA polymerázu
1 $\mu\text{l}$	původní cDNA
1 $\mu\text{l}$	$10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dNTP (směs dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
2,5 $\mu\text{l}$	oligonukleotid Up
2,5 $\mu\text{l}$	oligonukleotid Down
35 $\mu\text{l}$	destilovaná voda
1 $\mu\text{l}$	polymeráza Pfu turbo ( <i>Stratagene, USA</i> ) - aktivita $2,5 \text{ u} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

Amplifikace cDNA pomocí PCR byla provedena v přístroji pro polymerázovou řetězovou reakci (*Hybaid – PCR Express, USA*) dle následujícího programu, přičemž amplifikace probíhala ve 25 opakováních, tzn. první tři kroky proběhly 25x. Celkově tento program trval 6 hodin 8 minut:

95 °C ... 30 s  
51 °C ... 1 min  
68 °C ... 12 min  
68 °C ... 12 min  
4 °C ... hold

#### 4.1.2 Restrikční štěpení

Směs po PCR reakci obsahovala původní, nemutovanou cDNA a velké množství nové, zmutované cDNA. K odstranění nemutované cDNA byl do směsi přidán 1 µl restrikčního enzymu Dpn I (*New England Biolabs, Kanada*), který specificky rozštěpil původní, nemutovanou methylovanou DNA bakteriálního původu. Inkubace probíhala 2 hodiny při teplotě 37 °C.

#### 4.1.3 Ověření předpokládané délky mutantních DNA

Pro ověření, že směs po polymerázové řetězové reakci obsahovala cDNA o délce předpokládaného počtu bazí, byla po inkubaci s restrikčním enzymem Dpn I provedena agarózová elektroforéza. Díky negativnímu náboji se DNA pohybuje v agarózovém gelu směrem k anodě, a tak dochází k rozdělení fragmentů DNA dle velikosti. Čím jsou DNA fragmenty kratší, tím rychleji migrují.

K separaci fragmentů po mutagenezní PCR byl použit 1% agarózový gel: 0,35 g agarózy (*Carl Roth GmbH, Německo*) bylo rozpuštěno ve 35 ml TBE pufru (6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu (*Carl Roth GmbH, Německo*); 3 g kyseliny borité (*Carl Roth GmbH, Německo*); 0,4 g EDTA (*Duchefa biochemie, Haarlem*); pH 8). Vzorčky plazmidu obsahujícího vždy jednu z mutovaných verzí regulační domény tyrozin hydroxylázy byly připraveny následujícím způsobem: 10 µl amplifikované DNA

a 2  $\mu$ l vzorkovacího pufru (roztok 50% glycerolu (*Lachema a. s., Neratovice*); 0,5% bromfenolové modře (*Sigma, USA*); 0,5% xylen cyanolu (*Sigma, USA*)). Elektroforéza probíhala v prostředí TBE pufru. Po ukončení elektroforézy, byl gel inkubován s roztokem ethidium bromidu o koncentraci 10  $\mu$ g  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Molekuly ethidium bromidu se váží do prostoru mezi bazemi DNA (dochází k tzv. *interkalaci*) a v důsledku hydrofobních interakcí dochází k velkému zvýšení fluorescence ethidium bromidu. Po 15 minutách inkubace byl gel přenesen do destilované vody a po 10 minutách inkubace byl ozářen UV světlem (viz **kap. 5.1.1**).

## 4.2 Biochemické metody

### 4.2.1 Analýza mutované cDNA TH1R

Výsledek bodové mutagenese bylo zapotřebí ověřit pomocí sekvenace. Syntetizovaná (PCR reakcí) mutovaná cDNA TH1R byla transformována do bakterií *E. coli* (kmen DH5 $\alpha$ ).

Transformace je proces, při kterém je přenášena cizorodá genetická informace do hostitelské buňky. Pět mutantních PCR produktů, kódujících mutantní proteiny, bylo zabudováno ve vektoru pET-15b. Aby mohly hostitelské buňky přijmout cizorodý plazmid z vnějšího prostředí, musí být pozměněny vlastnosti jejich buněčné stěny. K tomu lze použít metodu zvanou **teplotní šok**. Ten byl proveden dle následujícího postupu. Ke 40  $\mu$ l kompetentních buněk bakterií byl přidán 1  $\mu$ l cDNA. Směs se inkubovala 20 min při teplotě 0 °C. Směs byla poté ponořena na 45 vteřin do lázně o teplotě 42 °C, a potom okamžitě 2 min inkubována při teplotě 0 °C. Ke směsi bylo poté přidáno 400  $\mu$ l LB média (10 g Bacto trypton (*Carl Roth GmbH, Německo*); 5 g Bacto-yeast extract (*Carl Roth GmbH, Německo*); 10 g NaCl (*Lachema a. s., Neratovice*); doplnění vodou do 1 litru) ohřátého na teplotu 37 °C. Dále byly vzorky inkubovány při teplotě 37 °C s konstantním třepáním 190 rpm. Směs byla následně nanesena na Petriho misky s živným LB agarem (10 g Bacto trypton; 5 g Bacto-yeast extract; 10 g NaCl; 20 g agar (*Carl Roth GmbH, Německo*); doplnění vodou do 1 l; sterilní; antibiotikum ampicilin (*Sigma, USA*) o koncentraci 100  $\mu$ g  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>, které byly 12 hodin inkubovány při teplotě 37 °C.

Pouze bakterie, které během transformace přijaly plazmidovou DNA, získaly schopnost rezistence vůči antibiotiku. Na Petriho misce tudíž vyrostly pouze kolonie bakterií odolných vůči ampicilinu, tedy pouze těch, které přijaly plazmid obsahující mutovanou formu genu regulační domény tyrozin hydroxylázy. Na každé z misek vyrostlo přibližně 250 kolonií bakterií.

Následně byly z každé misky odebrány tři kolonie bakterií a sterilně přeneseny do 5 ml LB média obsahujícího ampicilin (o koncentraci  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Bakterie byly kultivovány 16 hodin při teplotě  $37^\circ\text{C}$  za konstantního třepání 190 rpm. Plazmidová DNA byla vyizolována z bakteriálních kultur pomocí metody Jetquick (*Genomed, Německo*). Takto připravené vzorky plazmidové DNA byly zaslány na sekvenaci, která byla provedena v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, viz sekvenační chromatogramy (**obr. 5.2-5.6**).

#### **4.2.1.1 Transformace mutované plazmidové cDNA do expresního kmene bakterií *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Mutované varianty cDNA TH1R byly tentokrát transformovány do expresního kmene bakterií *E. Coli* BL21 (DE3). Dále bylo postupováno dle stejného protokolu jako u transformace do bakteriálního kmene *E. coli* (kmen DH5 $\alpha$ ), viz výše (**kap. 4.2.1**) Na každé z misek vyrostlo přibližně 200 kolonií bakterií.

Transformace mutovaných variant regulační domény tyrozin hydroxylázy do expresního kmene bakterií posloužila k přípravě transformovaných bakterií schopných produkovat velké množství rekombinantního proteinu.

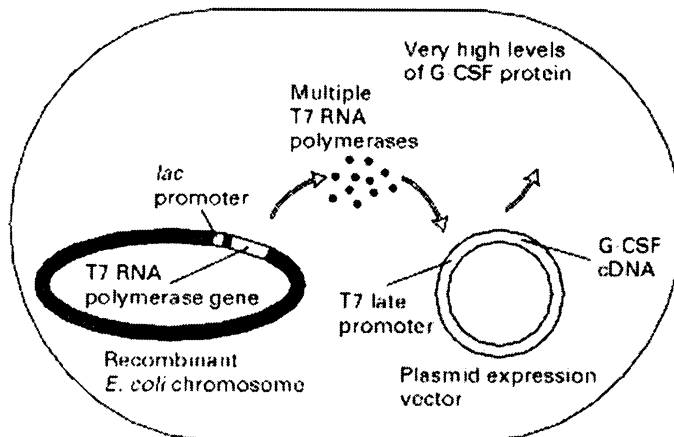
#### **4.2.1.2 Test exprese proteinu TH1R**

Expese mutovaného genu je kontrolována velice silným promotorem T7 izolovaným z bakteriofága T7, který řídí expresi genu  $\phi 10$ . Enzym T7 RNA polymeráza tento promotor specificky rozpoznává. Pro expresi je nutno dodat do hostitelských buněk T7 RNA polymerázu, a to buď infekcí bakteriofágem, nebo její indukovanou expresí. V našem případě byla exprese T7 RNA polymerázy indukována *lacZ* promotorem pomocí induktoru IPTG (*Sigma, USA*). Pro expresi byl použit bakteriální kmen *E. Coli* BL21 (DE3), který ve svém genomu nese T7 RNA polymerázový gen řízený *lacZ* promotorem. Přirozený lac represor brání expresi bez přítomnosti induktoru



IPTG.

Expresní kmen bakterií *E. Coli* BL21 (DE3) je tedy schopen produkovat bílkovinu teprve po aktivaci induktorem IPTG (obr. 4.2). Tého vlastnosti bylo využito k ověření produkce proteinu bakteriemi.



**Obr. 4.2** Aktivace T7 promotoru induktorem IPTG [http://www.ncbi.nlm.nih.gov].

Bakteriální kultura (5 ml,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ampicilin), obsahující plazmid pET-15b s mutovanou regulační doménou tyrozin hydroxylázy, byla 16 hodin inkubována při teplotě  $37^\circ\text{C}$  s konstantním třepáním 190 rpm. Poté byla naředěna tak, aby absorbance roztoku při vlnové délce 600 nm byla 0,8. Dále byl přidán roztok induktoru IPTG (finální koncentrace  $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a kultura byla inkubována při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a konstantním třepání 190 rpm. V časových intervalech 1 a 2 hodin po indukci byly odebrány vzorky (100  $\mu\text{l}$ ) pro následující SDS-PAGE elektroforézu.

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoreses) je elektroforetická metoda používaná především k separaci a k určování molekulových vah proteinů. SDS je látka používaná zvláště v chromatografii jako tenzid (iontový detergent). Tenzid dodecylsírán sodný rozbaluje proteiny a vytváří s nimi komplexy s konstantním poměrem váhy a náboje. Molekuly se tedy v polyakrylamidovém gelu dělí na základě velikosti. Záporně nabitě komplexy proteinů s SDS putují k anodě při konstantním napětí od 150 V do 200 V. Neznámé vzorky se srovnávají se standardy molekulových vah. Nejběžněji se používají 12% a 15% polyakrylamidové gely (složení viz **tab. 4.2**).

	<i>12% gel</i>	<i>15% gel</i>
Akrylamid/Bis-akrylamid ( <i>Carl Roth GmbH, Německo</i> )	3 ml	3,75 ml
Tris-HCl pufr ( <i>Carl Roth GmbH, Německo</i> )	1,87 ml	1,87 ml
10% SDS ( <i>Sigma, USA</i> )	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l
destilovaná voda	2,6 ml	1,75 ml
10% peroxidisíran amonný ( <i>Sigma, USA</i> )	45 $\mu$ l	45 $\mu$ l
90% TEMED ( <i>Carl Roth GmbH, Německo</i> )	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l

**Tab. 4.2** Složení používaných 12% a 15% polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.

Po nanesení vzorků na připravený polyakrylamidový gel byla spuštěna vertikální elektroforéza při konstantním napětí 150 V. Gel byl poté 60 min inkubován s roztokem Coomassie modři R-250 (*Lachema a.s., Neratovice*) rozpuštěné ve směsi methanol : kyselina octová : voda v poměru 4,5 : 1 : 4,5. Následně byl gel inkubován po dobu 90 minut v roztoku methanol : kyselina octová : voda v poměru 1 : 8 : 1. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující proteiny o známých molekulových váhách. Byl použit standard molekulových hmotností, který obsahoval směs proteinů o relativních molekulových hmotnostech 97 000, 67 000, 45 000 a 29 000 (viz **kap. 5.2.1**).

#### **4.2.2 Purifikace regulační domény tyrozin hydroxylázy**

V této kapitole bude popsána purifikace tří verzí regulační domény tyrozin hydroxylázy. Jednak byla purifikována původní nemutovaná verze regulační části tohoto enzymu (WT) a jednak dvě formy mutované regulační domény tyrozin hydroxylázy, jejichž mutagenese je popsána v **kap. 4.1.1**. Z pěti mutantních bílkovin byly vybrány dvě, připravené mutacemi původní regulační domény TH v pozicích 34 a 73 (Phe34Trp, Phe73Trp).

Pro všechny tyto tři varianty tyrozin hydroxylázy byl použit téměř stejný purifikační protokol. Liší se pouze v tom, že z důvodu nestability původní regulační domény TH nebyla u této formy enzymu prováděna kationtově výměnná chromatografie jako poslední purifikační krok, ale purifikace byla ukončena již po niklové afinitní chromatografii.

#### 4.2.2.1 Příprava TH1R na purifikaci

Expres bakteriální kultury obsahující daný protein byla prováděna ve třech litrech LB média. Do šesti zkumavek obsahujících po 5 ml LB média byl přidán ampicilin, (výsledná koncentrace ve zkumavce byla  $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), a 5  $\mu\text{l}$  glycerolového roztoku bakteriální kultury buněk *E. coli* BL21 (DE3) obsahujících vektor pro expresi příslušné verze TH1R. Takto připravené vzorky byly inkubovány 12 hodin při teplotě  $37^\circ\text{C}$  za konstantního třepání 200 rpm. Po 12 hodinách byl do třech Erlenmayerových baněk obsahujících po 1 l LB média přidán ampicilin o stejné výsledné koncentraci a do každé bylo přidáno 10 ml připravené bakteriální kultury buněk *E. coli* BL21 (DE3). Inkubace probíhala přibližně tři hodiny, konkrétně do optické denzity vzorku 0,8 (při vlnové délce 600 nm). V tuto chvíli bylo ke každému litru kultury přidáno 2,5 ml roztoku induktoru IPTG o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který spustil produkci bílkoviny. Expres probíhala 12 hodin při teplotě  $37^\circ\text{C}$  za konstantního třepání 200 rpm.

Takto připravená bakteriální kultura byla centrifugována při teplotě  $4^\circ\text{C}$  a 3000 rpm (*centrifuga Sorval RC-5B, DuPont Instruments, rotor SS34*) po dobu 45 minut. Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve 120 ml pufru, který obsahoval PBS;  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\beta\text{ME}$  (*Carl Roth GmbH, Německo*);  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  imidazol (*Carl Roth GmbH, Německo*).

K resuspendovaným bakteriím byl přidán lysozym (finální konc.  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), jehož úkolem bylo rozštěpit polysacharidy buněčné stěny a tím narušit její strukturu, a deoxyribonukleáza o finální koncentraci  $3 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , jejímž cílem bylo rozštěpit deoxyribonukleovou kyselinu. Směs byla po dobu jedné hodiny inkubována za konstantního míchání při teplotě  $4^\circ\text{C}$ . Takto nízká teplota byla zvolena z toho důvodu, aby se zabránilo proteolytické degradaci proteinů.

Následně byla provedena sonikace lyzovaných bakterií při teplotě  $4^\circ\text{C}$  (*Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA*). V pětiminutových intervalech byla směs vystavena pěti

jednominutovým pulzům ultrazvuku. Sonikát byl poté hodinu centrifugován při 13500 rpm při teplotě 4 °C.

Tyrozín hydroxyláza je enzym velice citlivý na změny teplot, proto bylo velmi důležité udržovat jej neustále při teplotě 4 °C.

#### 4.2.2.2 Niklová afinitní chromatografie TH1R

Principiálně niklová afinitní chromatografie využívá vysoké afinity aminokyseliny histidinu na nikelnaté kationty. Všechny tři mutantní proteiny TH1R byly exprimovány jako fúzní proteiny obsahující na svém N-konci řetězec šesti histidinů (tzv. His-Tag či histidinovou kotvu). Chromatografická kolona, naplněná chelatační sepharosovou maticí (*Amersham Biosciences, Švédsko*) s navázanou nitriltriocetovou kyselinou, na sebe po promytí roztokem NiSO<sub>4</sub> (*Lachema a.s., Neratovice*) naváže nikelnaté kationty. Aminokyselina histidin tvoří stabilní komplex s nikelnatým kationtem, a proto jsou fúzní proteiny, obsahující ve své sekvenci řetězec šesti histidinů, schopny specificky se vázat na niklovou sepharosu s vysokou afinitou. Nespecificky navázané proteiny, obsahující histidinové zbytky ve svém řetězci, jsou eluovány pomocí roztoku o malé koncentraci imidazolu ( $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Specificky navázané fúzní proteiny, obsahující histidinovou kotvu, jsou eluovány roztokem imidazolu o koncentraci  $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Kolona o objemu 5 ml (HiTrap™) obsahující sepharosu (*Amersham Biosciences, Švédsko*) byla promývána následovně:

- 15 ml roztoku EDTA ( $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a NaCl ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
- 15 ml destilované vody
- 50 ml NiSO<sub>4</sub> ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
- 15 ml destilované vody
- 15 ml pufr E (viz níže)
- přefiltrovaný sonikát (*filtr Ratilabo - Spritzenfilter, nylon 0,45 μm, Německo*)

**Pufr E:** PBS;  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  βME;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  imidazol; pH 8

**Pufr F:** PBS;  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  βME;  $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  imidazol; 10% glycerol; pH 8

Kolona s navázaným sonikátem byla poté připojena k systému pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (*Amersham Biosciences, Švédsko*). Vzorek byl promýván gradientem pufrů E a F (složení viz výše) rychlostí  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (viz **obr. 5.8 - 5.10**).

#### 4.2.2.3 Ověření čistoty TH1R pomocí SDS-PAGE

Vzorky, které měly obsahovat mutantní proteiny a zároveň co nejmenší množství nespecificky navázaných bílkovin, byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel a byla provedena proteinová elektroforéza SDS-PAGE. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách (viz **obr. 5.11 - 5.13**).

#### 4.2.2.4 Kationtově výměnná chromatografie TH1R

Protože protein nebyl po niklové afinitní chromatografii ještě dostatečně čistý, musel být proveden další purifikační krok, kationtově výměnná chromatografie.

Kationtově výměnná chromatografie je metoda, která se používá k separaci částic nesoucí kladný náboj. Chromatografická kolona obsahuje negativně nabitou matici, která elektrostaticky interaguje s pozitivně nabitými molekulami bílkoviny. Nejprve se na kolonu nanáší separovaný vzorek. Vzorek se při průchodu kolonou na matici naváže. Poté se chromatografická kolona ekvilibruje pufrům o nízké iontové síle, čímž dochází k vymytí slabě navázaných proteinů, a pak již následuje eluce navázaných proteinů postupně vzrůstajícím gradientem iontové síly elučního pufru.

Pro tuto chromatografii byla použita kolona o objemu 5 ml s SP sepharosou (*Amersham Biosciences, Švédsko*). Kolona byla připojena k přístroji „ÄKTAprime™“ (*Amersham Biosciences, Švédsko*) pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Přefiltrovaný vzorek (*filtr Ratilabo-Spritzenfilter, nylon 0,45 $\mu\text{m}$ , Německo*) bílkoviny byl nanesen na kolonu. Byla spuštěna nastavená metoda, která zajistila změnu koncentračního gradientu od 0% do 100 % směsí pufrů E a F (viz níže), přičemž 0 % byl pouze pufr E a 100 % pouze pufr F. Vzorek byl z kolony vymýván rychlostí  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Detektor snímal absorpci eluovaných proteinů při vlnové délce 280 nm (viz **obr. 5.14 a 5.15**).

**Pufř E:**  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kyselina citronov;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA; 10 % glycerol;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT (*Carl Roth GmbH, Německo*);  $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  PMSF (*Carl Roth GmbH, Německo*); pH 6,3

**Pufř F:**  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kyselina citronov;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $1 \cdot \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT;  $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  PMSF; pH 6,3

#### 4.2.2.5 Fosforylace

Fosforylace je obecn reakce, při které je fosftov skupina ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) připojena k organick molekule. Jednou z předních vlastností 14-3-3 proteinu je jeho schopnost specificky vázat fosforylovan peptidy a proteiny. Abychom mohli připravit komplexy 14-3-3 proteinu s TH1R, bylo nejprve nezbytn všechny tři varianty regulační domény tyrozin hydroxylázy nafosforylovat.

Pro fosforylaci byly připraveny tři vzorky obsahující c-AMP-dependentní protein kinázu A (*Promega, USA*); ATP (finální koncentrace  $0,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ );  $\text{MgCl}_2$  (finální koncentrace  $15 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), a 0,5 mg jednotlivých variant regulační domény tyrozin hydroxylázy. V ppd původní varianty TH1R WT byla finální koncentrace  $0,27 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , u varianty TH1R Phe34Trp byla koncentrace proteinu  $0,50 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a u TH1R Phe73Trp  $1,60 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Vzorky byly připraveny následovně:

	<i>WT</i>	<i>Phe34Trp</i>	<i>Phe73Trp</i>
<i>0,5 mg proteinu</i>	1,85 ml	1 ml	0,31 ml
<i><math>50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}</math> ATP</i>	28 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$	4,7 $\mu\text{l}$
<i><math>1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}</math> <math>\text{MgCl}_2</math></i>	28 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$	4,7 $\mu\text{l}$
<i>95 u<sup></sup> PKA</i>	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$

**Tab. 4.3** Složen vzorků jednotlivých variant TH1R pro fosforylaci.

Takto připraven vzorky byly dvě hodiny inkubovány ve vodn lázni při teplotě 30 °C. Po jedné hodině byl přidání stejn objem roztoku ATP jako na pottku. Vzorky byly dal hodinu inkubovány při teplotě 30 °C. Poté byly roztoky přeneseny do dialyzačních membrán a 12 h dialyzovány při teplotě 4 °C proti pufřu, který obsahoval  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl (*Carl Roth GmbH, Německo*) pH 7,5;  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT; 10% glycerol.

☞ **u** = **unit** (jednotka aktivity); 1 unit je množství enzymu cAMP PKA, které je třeba k začlenění 1 pmol fosfátu do proteinu kaseinu za 1 minutu při teplotě 30 °C.

### 4.2.3 Purifikace 14-3-3 proteinu – monomerní a dimerní varianta

V případě monomerní varianty byl purifikován lidský protein 14-3-3 $\zeta$ , ze kterého byly předem odstraněny oba tryptofany, respektive byly pomocí cílené bodové mutagenese přeměněny na fenylalanin, a to jak na pozici aminokyseliny 59, tak na pozici 228. Zároveň byl tento protein opatřen mutací na pozici 58, kde byl serin přeměněn na kyselinu asparagovou, což blokuje tvorbu dimerního proteinu za vzniku monomeru. Tento protein byl exprimován v expresním kmeni bakterií *Escherichia coli* BL21 (DE3).

V případě dimeru byl použit stejný protein 14-3-3 $\zeta$ , ale opatřený pouze mutacemi tryptofanů na fenylalaniny (pozice 59 a 228). Protein byl taktéž exprimován v bakteriích *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Pro purifikace obou těchto proteinů 14-3-3 $\zeta$  (Trp59Phe, Trp228Phe, Ser58Asp) a 14-3-3 $\zeta$  (Trp59Phe, Trp228Phe) byl použit stejný purifikační protokol.

#### 4.2.3.1 Příprava 14-3-3 proteinu na purifikaci

Příprava 14-3-3 proteinu na purifikaci probíhala obdobně jako příprava regulační domény tyrozin hydroxylázy (viz **kap. 4.2.2.1**). Nejprve byly připraveny tři litry bakteriální kultury, které byly inkubovány s induktorem IPTG (finální koncentrace  $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Exprese probíhala 12 hodin při teplotě 37 °C. Dále byla provedena centrifugace a pelet byl resuspendován ve 120 ml resuspendačního pufru. K resuspendovaným bakteriím byl přidán lysozym a deoxyribonukleáza. Směs byla po dobu jedné hodiny inkubována při teplotě 4 °C. Následně byla provedena sonikace lyzovaných bakterií při teplotě 4 °C. Sonikát byl hodinu centrifugován při 13500 rpm. Supernatant byl uchován při teplotě -80 °C a následně použit na niklovou afinitní chromatografii.

#### 4.2.3.2 Niklová afinitní chromatografie 14-3-3 proteinu

Stejně jako při purifikaci TH1R byla jako první purifikační krok použita niklová afinitní chromatografie, jejíž princip je podrobněji popsán v kapitole 4.2.2.2.

Byla použita stejná kolona i matrice. Kolona o objemu 5 ml obsahující sepharosu byla promývána roztokem EDTA ( $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a NaCl ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), destilovanou vodou, roztokem NiSO<sub>4</sub> ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), opět destilovanou vodou, pufrům E (kap. 4.2.2.2) a přefiltrovaným sonikátem. Kolona byla poté připojena k systému pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Vzorek byl vymýván gradientem pufrů E a F (kap. 4.2.2.2) rychlostí  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (obr. 5.18 a 5.19). Podle chromatogramů byly vybrány frakce, které byly následně nanесeny na polyakrylamidový gel pro ověření čistoty jednotlivých frakcí.

#### 4.2.3.3 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. Pro dialýzu se užívá dialyzačních membrán s vhodnou velikostí pórů. Tyto membrány jsou nepropustné pro vysokomolekulární látky a současně propustné pro nízkomolekulární látky. Nízkomolekulární látky se pohybují přes membránu ve směru koncentračního gradientu.

Podle gelu SDS-PAGE byly vybrány frakce, které obsahovaly co nejméně nespecificky navázaných proteinů. Tyto frakce byly kvantitativně převedeny do dialyzačních membrán (*Carl Roth GmbH, Německo, MCO 14 000*) a byla provedena dialýza pufrům ( $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 7,5;  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  βME) obsahujícím 1,4-dithiothreitol, redukční činidlo, zabraňující vzniku disulfidických můstků. Dialýza probíhala za konstantního míchání po dobu 12 hodin při teplotě 4 °C.



#### 4.2.3.4 Thrombinové štěpení

V této fázi purifikace bylo provedeno thrombinové štěpení, které mělo za úkol odstranit histidinovou kotvu obou mutantních 14-3-3 proteinů, již bylo využito v afinitní chromatografii.

Thrombin je proteolytický enzym (serinová proteáza), který v procesu srážení krve působí přeměnu cirkulujícího fibrinogenu na fibrin, z něhož vznikají fibrinová vlákna vytvářející základní strukturu krevní sraženiny. Pro nás bylo ale důležité, že je to enzym, který rozpoznává aminokyselinovou sekvenci Leu – Val – Pro – Arg – Gly – Ser, kterou je schopen mezi argininem a glycinem rozštěpit. Vektor pET-15b kóduje právě proteázové štěpné místo thrombinu, které se nachází v těsné blízkosti za oblastí genu kódující histidinovou kotvu (**kap. 9, příloha B**). Proto bylo možné k odstranění histidinů použít právě thrombin.

Byly připraveny vzorky obsahující směs dané varianty proteinu a thrombinu (o koncentraci  $3 \mu\text{g}$  fúzního proteinu), které byly inkubovány jednu hodinu ve vodní lázni při teplotě  $33\text{ }^\circ\text{C}$ . Následně byla provedena elektroforéza SDS-PAGE ve 12% gelu (**obr. 5.22**).

#### 4.2.3.5 Aniontově výměnná chromatografie 14-3-3 proteinu

Pro tuto chromatografii byla použita kolona o objemu 5 ml s Q sepharosou (*Amersham Biosciences, Švédsko*). Kolona byla připojena k přístroji pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Přefiltrovaný vzorek 14-3-3 proteinu (monomeru event. dimeru) byl nanesen na kolonu. Byla spuštěna nastavená metoda, která zajistila změnu koncentračního gradientu od 0 % do 100 % směsí pufrů E a F (složení viz níže), přičemž 0 % byl samotný pufr E a 100 % pufr F. Vzorek byl z kolony vymýván rychlostí  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Detektor snímal absorpci eluovaných látek při 280 nm (**obr. 5.23 a 5.24**).

**Pufr E:**  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT,  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA; pH 7,5

**Pufr F:**  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT,  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl; pH 7,5

#### 4.2.4 Určení koncentrace vzorků

Pro určení koncentrace všech vypurifikovaných vzorků byla použita metoda zvaná *Bradfordova esej*. Je to poměrná metoda, která využívá kalibrační křivky. Ke vzorkům bílkoviny byl přidán Bradfordův roztok, což je roztok kyseliny fosforečné a barviva Coomassie blue. Coomassie blue se ve vzorku adsorbuje na protein, a tím se změní její spektrální vlastnosti. Nakonec byla změřena absorbance vzorků při vlnové délce 595nm. Jako srovnávací (slepý) vzorek byla použita destilovaná voda. Kalibrační křivka byla připravena pomocí roztoků BSA (hovězí sérový albumin).

#### 4.2.5 Vazebné pokusy TH1R a 14-3-3 proteinu

Na závěr byly provedeny vazebné pokusy TH1R a 14-3-3 proteinu. Při těchto experimentech bylo nutné postupovat velmi rychle, aby nedošlo k degradaci značně citlivých vzorků TH1R. Pro ověření vazby 14-3-3 proteinu a TH1R byla provedena nativní elektroforéza.

Nativní elektroforéza je metoda založená na dělení molekul v elektrickém poli na základě velikosti jejich nábojů. 14-3-3 protein určuje záporný náboj všem komplexům, které potom putují v nativním gelu směrem ke kladné elektrodě. Samotná tyrozin hydroxyláza má kladný náboj, tudíž do gelu nemigruje.

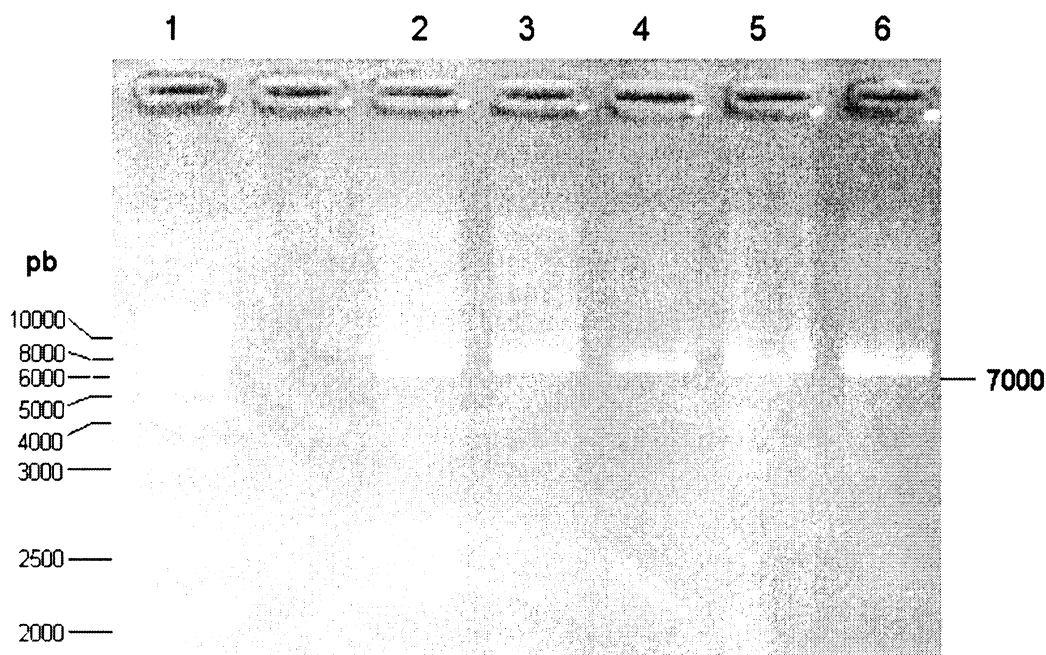
K přípravě 15% nativního gelu byla použita směs 3  $\mu\text{l}$  akrylamidu, 0,75 ml TBE pufr ( $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Trisborát;  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA) (*Carl Roth GmbH, Německo*), 3,75 ml destilované vody, 60  $\mu\text{l}$  10% peroxidisíranu amonného a 8  $\mu\text{l}$  TEMEDu. Následně byly na gel nanесeny vzorky a spuštěna vertikální elektroforéza při konstantním napětí 150 V.

## 5 Výsledky

### 5.1 Cílená mutageneze regulační domény tyrozin hydroxylázy

#### 5.1.1 Ověření délky PCR produktu pomocí agarózové elektroforézy

Dle aminokyselinové sekvence TH1R byly navrženy oligonukleotidy (tab. 4.1), které byly použity k amplifikaci mutovaných forem DNA regulační domény lidské tyrozin hydroxylázy prostřednictvím polymerázové řetězové reakce. Mutace byla provedena na pozicích 14, 34, 73, 103 a 131. U všech variant byla zmutována aminokyselina fenylalanin na tryptofan. Dále byly produkty polymerázové řetězové reakce inkubovány s restričním enzymem Dpn I, který odstranil původní nemutovanou DNA. Pro ověření, zda byly amplifikovány plazmidy, obsahující jednotlivé mutované verze regulační domény tyrozin hydroxylázy o předpokládaném počtu nukleotidových bází, byla provedena agarózová elektroforéza v 1% gelu agarózy (obr. 5.1).



**Obr. 5.1** Ověření délky PCR produktu. V dráze 1: srovnávací vzorek „DNA Ladder High Range“ obsahující fragmenty známých molekulových vah, v drahách 2-6: PCR produkty plazmidů pET-15b obsahujících jednotlivé mutované verze cDNA regulační domény tyrozin hydroxylázy pipetované v pořadí Phe14Trp, Phe34Trp, Phe73Trp,

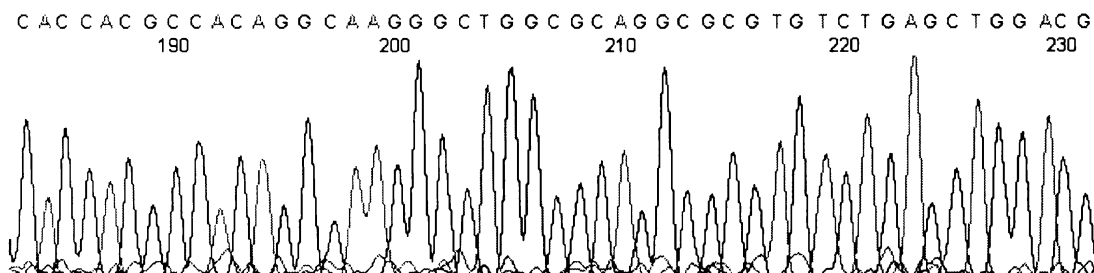
*Phe103Trp* a *Phe131Trp*. Předpokládaná délka PCR produktů byla 7136 bází. Horizontální agarózová elektroforéza (1% gel agarózy, 75 V).

Z fotografie gelu je patrné, že ve všech pěti případech PCR reakce proběhla v pořádku a že byly syntetizovány nové DNA o předpokládané velikosti 7000 bází.

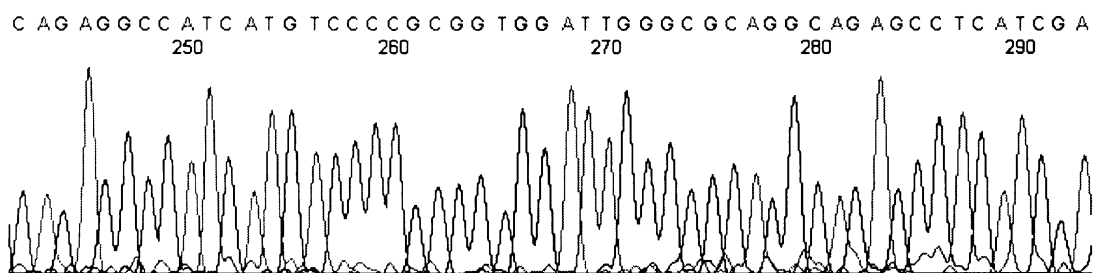
### 5.1.2 Sekvenační chromatogramy

Mutované varianty cDNA TH1R byly transformovány do bakterií *E. coli* (kmen DH5 $\alpha$ ). Z jednotlivých bakteriálních kultur vypěstovaných vždy z jedné kolonie bakterií byla, pomocí metody Jetquick (*Genomed, Německo*), vyizolována plazmidová DNA, která byla následně zaslána k osekvenování do Mikrobiologického ústavu AV ČR.

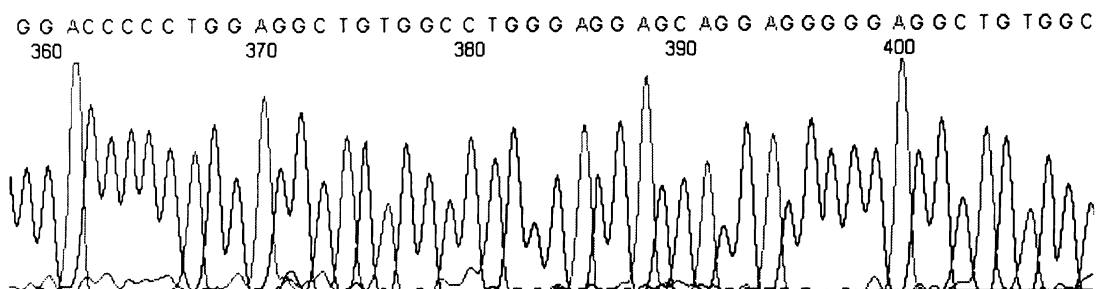
Regulační doména tyrozin hydroxylázy byla mutována na pozicích 14, 34, 73, 103 a 131. Na obrázcích 5.2 - 5.6 jsou znázorněny sekvenační chromatogramy jednotlivých mutací regulační domény tyrozin hydroxylázy. Vyznačené oblasti odpovídají tripletu nukleotidových bází, které kódují aminokyselinu tryptofan.



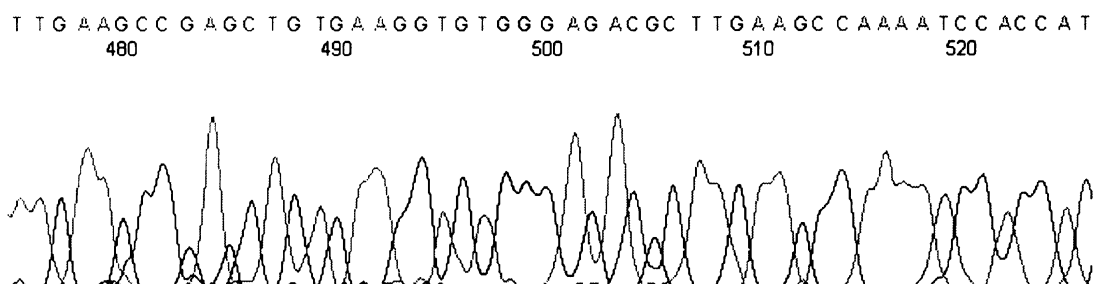
**Obr. 5.2** Výřez sekvenačního chromatogramu cDNA TH1R. Mutace na pozici 14.



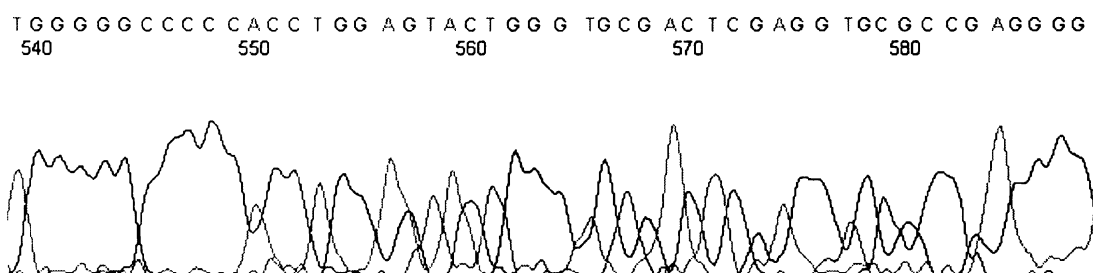
**Obr. 5.3** Výřez sekvenačního chromatogramu cDNA TH1R. Mutace na pozici 34.



**Obr. 5.4** Výřez sekvenčního chromatogramu cDNA TH1R. Mutace na pozici 73.



**Obr. 5.5** Výřez sekvenčního chromatogramu cDNA TH1R. Mutace na pozici 103.



**Obr. 5.6** Výřez sekvenčního chromatogramu cDNA TH1R. Mutace na pozici 131.

Z jednotlivých chromatogramů je patrné, že mutagenese proběhla úspěšně. Ve všech pěti případech se podařilo provést mutaci fenylalaninu na tryptofan, jehož nukleotidová sekvence, kterou můžeme na obrázcích 5.2 - 5.6 pozorovat ve vyznačených oblastech, je thymin-guanin-guanin.

## 5.2 Exprese a purifikace regulační domény tyrozin hydroxylázy

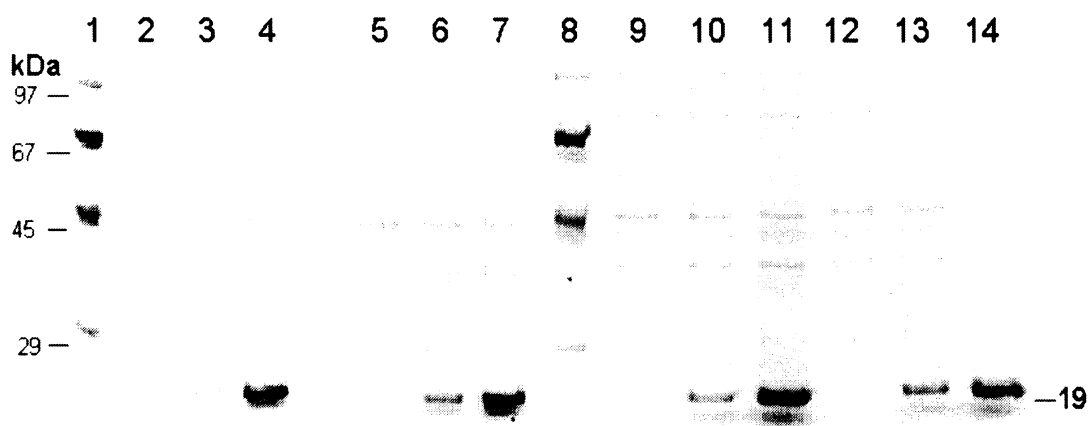
Regulační doména tyrozin hydroxylázy byla připravena expresí v bakteriálním expresním systému. Po expresi bylo nutné rekombinantní proteiny vypurifikovat.

Byly vybrány dvě varianty TH1R, a to Phe34Trp a Phe73Trp a u obou mutantních forem byla provedena purifikace dle stejného purifikačního protokolu. Dále byla purifikována původní cDNA TH1R neobsahující žádnou mutaci (WT).

### 5.2.1 Ověření exprese proteinu v bakteriích *E. coli*

Mutované varianty cDNA TH1R byly transformovány do expresního kmene bakterií *E. Coli* BL21 (DE3), které ve svém genomu nesou T7 RNA polymerázový gen. Ten je specificky rozeznáván T7 RNA polymerázou, jejíž exprese je indukována *lacZ* promotorem pomocí induktoru IPTG. Těto vlastnosti bylo využito k ověření produkce proteinu bakteriemi. Bakteriální kultura byla inkubována s induktorem IPTG, čímž došlo k aktivaci exprese proteinu a v intervalech 1 a 2 hodin byly odebrány vzorky kultury.

Po expresi bílkoviny byla provedena elektroforéza SDS-PAGE (viz obr. 5.7), prostřednictvím které bylo ověřeno, že bakterie *E. coli* skutečně produkují bílkovinu.



**Obr. 5.7** Ověření produkce proteinu bakteriemi, předpokládané molekulové váhy regulační domény tyrozin hydroxylázy s mutací na pozici 34, 73, 104 a 131 a závislosti exprese proteinu na čase. Vzorky byly pipetovány v tomto pořadí (zleva): vzorek

standardu, neindukovaný vzorek obsahující plazmid pET-15b s regulační doménou tyrozin hydroxylázy mutovanou v pozici 34 (dále jen „vzorek 34“), vzorek 34 indukovaný 1 h, dále vzorek 34 indukovaný 2 h, neindukovaný vzorek 73, vzorek 73 indukovaný 1 h, vzorek 73 indukovaný 2 h, neindukovaný vzorek 103, vzorek 103 indukovaný 1 h, vzorek 103 indukovaný 2 h, neindukovaný vzorek 131, vzorek 131 indukovaný 1 h, vzorek 131 indukovaný 2 h. Vertikální SDS-PAGE, 15% polyakrylamidový gel, 150 V.

Pomocí internetového serveru Swiss-Prot [<http://www.expasy.org/sprot>] byla vypočítána předpokládaná molekulová váha regulační domény tyrozin hydroxylázy 19300 Da.

SDS-PAGE ukázala, že bakterie produkují nový protein s molekulovou hmotností přibližně odpovídající očekávané molekulové váze. Především také znázorňuje závislost exprese proteinu v bakteriích *E. coli* BL21 (DE3) na čase. Již po jedné hodině inkubace od přidání induktoru je patrné, že se protein exprimoval (*obr. 5.7 dráha 3, 6, 10 a 13*) a množství vyrobeného proteinu se s časem zvětšovalo (*obr. 5.7 dráha 4, 7, 11 a 14*).

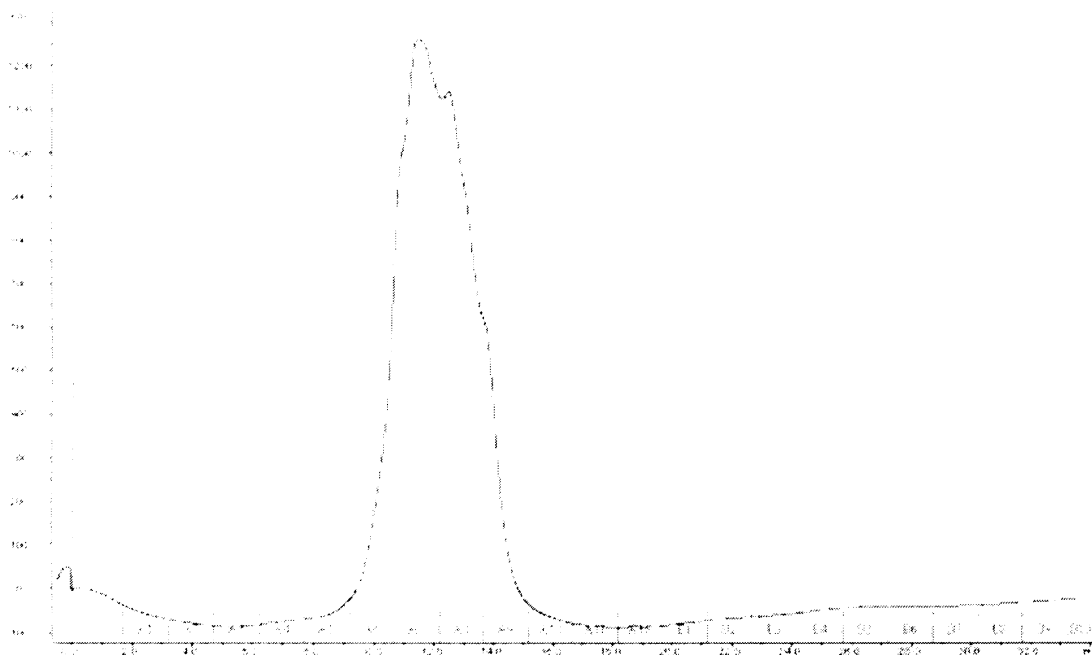
Vzhledem k tomu, že expresní testy ukázaly dobrou produkci rekombinantních proteinů, bylo přistoupeno ke kultivaci bakterií ve větším množství média a přípravě miligramových množství proteinů. Jednak byla purifikována původní nemutovaná verze regulační části tohoto enzymu (tzv. wild-type, WT) a jednak dvě formy mutované regulační domény tyrozin hydroxylázy obsahující Trp v pozicích 34 a 73 (proces mutagenese je popsán v kapitole 4.1.1).

Pro všechny tyto tři varianty tyrozin hydroxylázy byl použit téměř stejný purifikační protokol. Liší se pouze v tom, že z důvodu nestability původní regulační domény TH nebyla u této formy enzymu prováděna kationtově výměnná chromatografie jako poslední purifikační krok, ale purifikace byla skončena již po niklové chromatografii.

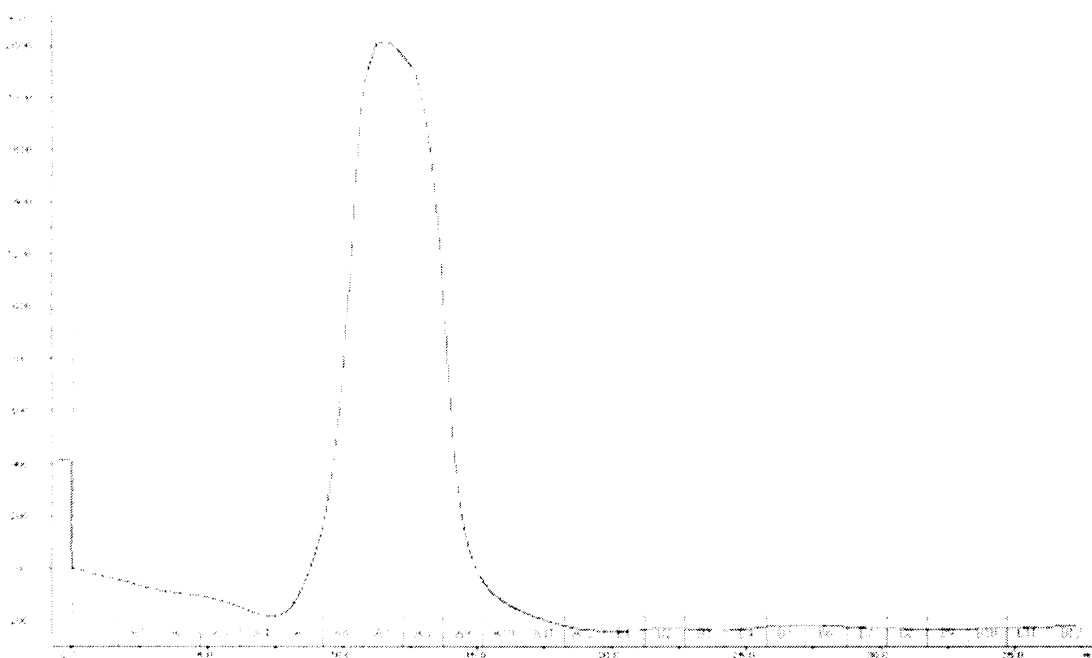
### 5.2.2 Niklová afinitní chromatografie regulační domény TH

Obě mutantní verze TH1R i původní nemutovaná regulační doména tyrozin hydroxylázy byly exprimovány jako fúzní proteiny obsahující na svém N-konci histidinovou kotvu, prostřednictvím které byla bílkovina navázána na sepharosovou matici obsahující nikelnaté ionty. Promýváním kolony roztokem imidazolu o zvyšující

se koncentrací došlo nejprve k odstranění nespecificky navázaných proteinů a následně k uvolnění vzorku bílkoviny.



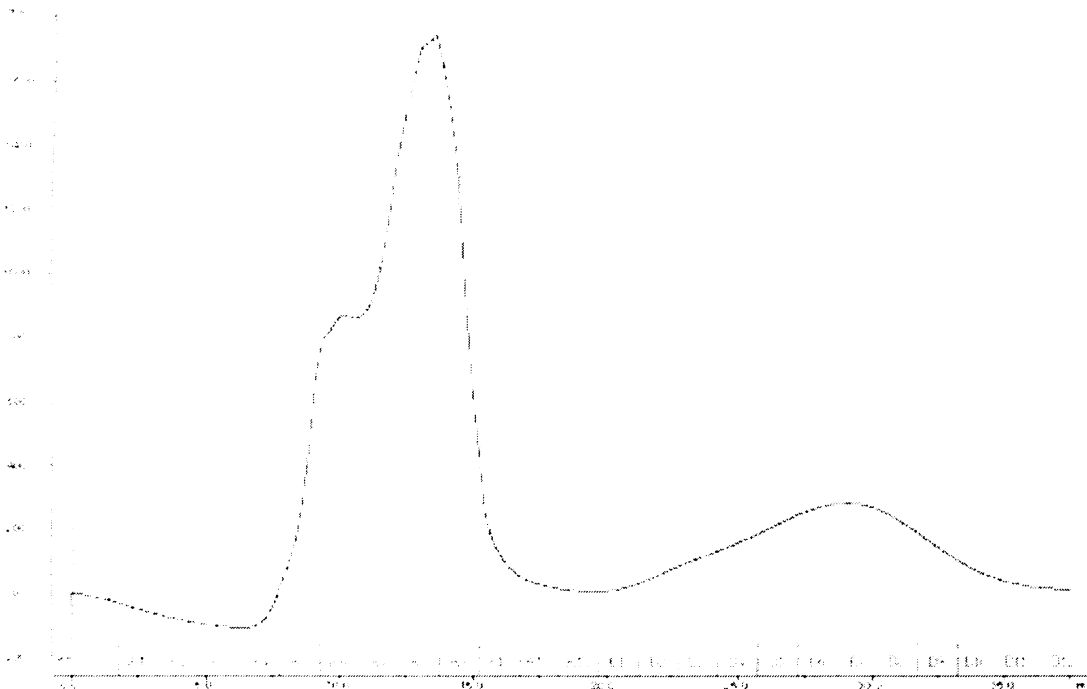
**Obr. 5.8** Chromatogram znázorňující eluci při niklové afinitní chromatografii původní nemutované regulační domény tyrozin hydroxylázy. Průtoková rychlost  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 5.9** Chromatogram znázorňující eluci při niklové afinitní chromatografii



*mutované regulační domény tyrozin hydroxylázy, varianta F34W. Průtoková rychlost 1,5 ml · min<sup>-1</sup>.*

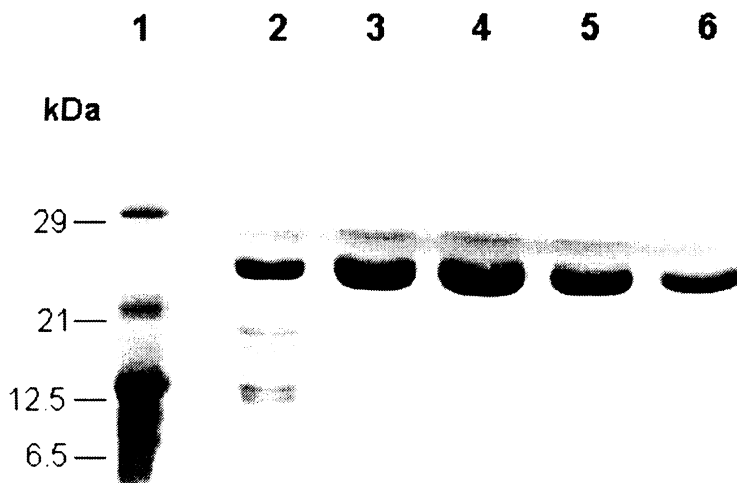


**Obr. 5.10** Chromatogram znázorňující eluci při niklové afinitní chromatografii mutované regulační domény tyrozin hydroxylázy, varianta F73W. Průtoková rychlost 1,5 ml · min<sup>-1</sup>.

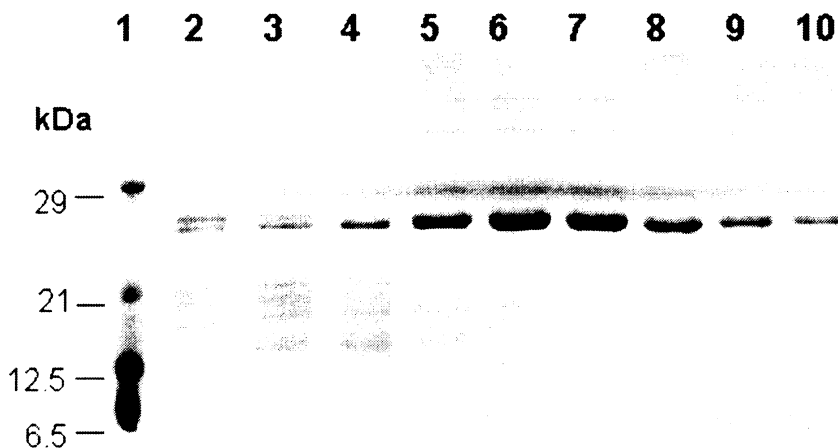
Z chromatogramů (**obr. 5.8 - 5.10**) je patrné, že nejprve byly vymyty nespecificky navázané proteiny, v podobě vysokých elučních píků, které neobsahovaly histidinovou kotvu (tzv. his-tag, tedy šest histidinů vedle sebe na N-konci proteinu), tudíž interagovaly s kolonou slabě a byly eluovány už při nízké koncentraci imidazolu. Vysoká koncentrace imidazolu protein obsahující his-tag vytěsnila. V případě WT je to oblast frakcí B3-B7, u Phe34Trp jsou to frakce B1-B9 a konečně u verze Phe73Trp je to oblast frakcí B2-B10.

#### **5.2.2.1 SDS-PAGE frakcí z niklové afinitní chromatografie TH1R**

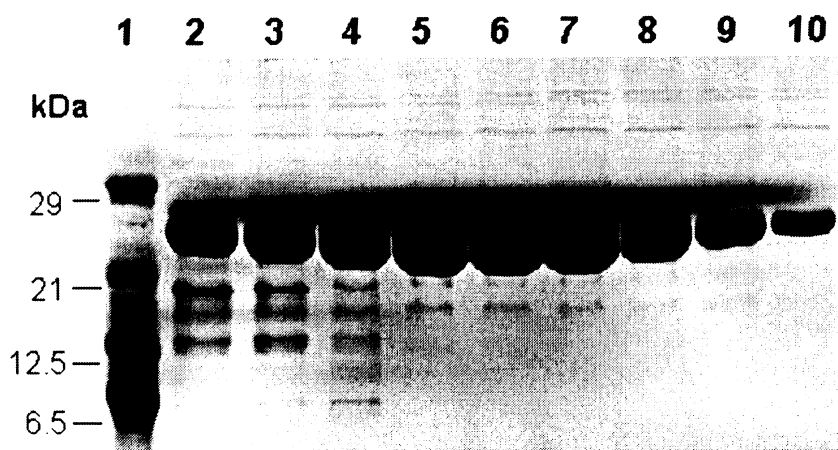
Pro ověření čistoty purifikovaných bílkovin byla opět u všech variant provedena SDS-PAGE. V případě nemutované verze TH1R byly na gel naneseny vzorky frakcí B3-B7, v případě mutace Phe34Trp TH1R to byly vzorky B1-B9 a u mutace Phe73Trp vzorky B2-B10.



**Obr. 5.11** Obrázek gelu SDS-PAGE s frakcemi po niklové afinitní chromatografii tyrozin hydroxylázy WT. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách. Vzorky byly pipetovány v tomto pořadí (zleva) vzorek standardu v dráze 1, v drahách 2-6 frakce po niklové afinitní chromatografii B3-B7 (12% gel, 200 V).



**Obr. 5.12** Obrázek gelu SDS-PAGE s frakcemi po niklové chromatografii tyrozin hydroxylázy Phe34Trp. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách. Vzorky byly pipetovány v tomto pořadí (zleva) vzorek standardu v dráze 1, v drahách 2-10 frakce po niklové afinitní chromatografii B1-B9 (12% gel, 200V).



**Obr. 5.13** Obrázek gelu SDS-PAGE s frakcemi po niklové chromatografii tyrozin hydroxylázy *Phe73Trp*. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách. Vzorky byly pipetovány v tomto pořadí (zleva) vzorek standardu v dráze 1, v drahách 2-10 frakce po niklové afinitní chromatografii B2-B10 (12% gel, 200V).

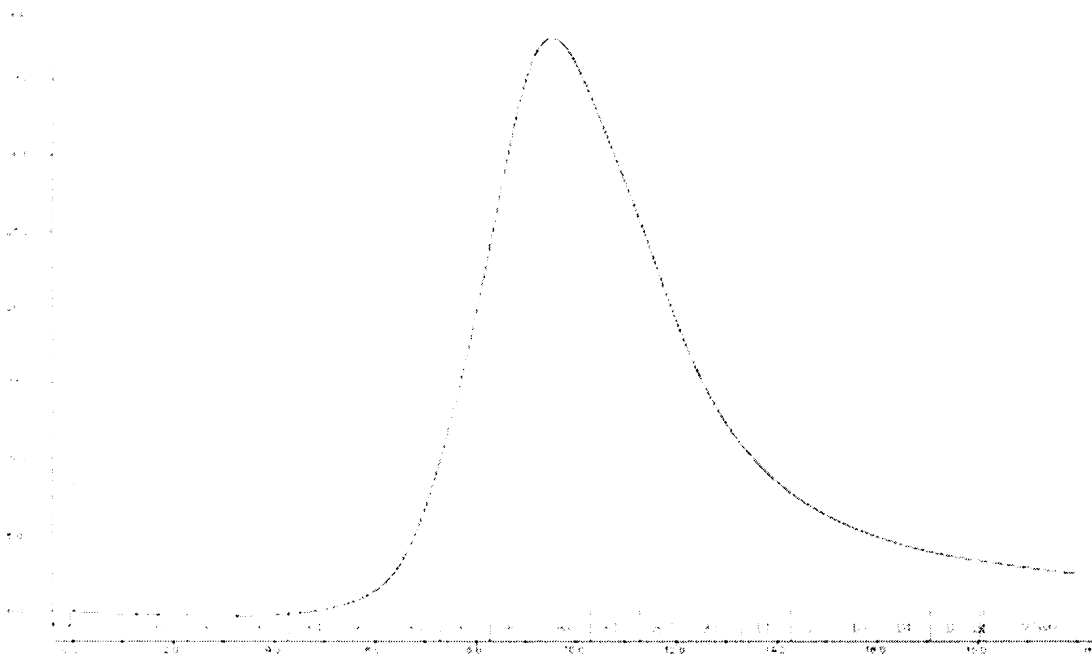
Pomocí obrázků gelů SDS-PAGE (5.11-5.13) po niklové afinitní chromatografii byly vybrány frakce, které se následně převedly do dialyzačních membrán pro další krok purifikace.

V případě původní regulační domény tyrozin hydroxylázy byla v tomto kroku purifikace ukončena. Tyrozin hydroxyláza je velice citlivý enzym a bylo zjištěno, že další experimenty způsobují jeho degradaci. Z obrázku gelu 5.11 je patrné, že čistota frakcí v posledních třech drahách byla velice dobrá, proto nebylo podstoupeno riziko dalšího purifikačního kroku. Na vazebné pokusy byly použity frakce po niklové afinitní chromatografii B5-B7 dialyzované v tomto pufru:  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 7,5;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA; 10% glycerol.

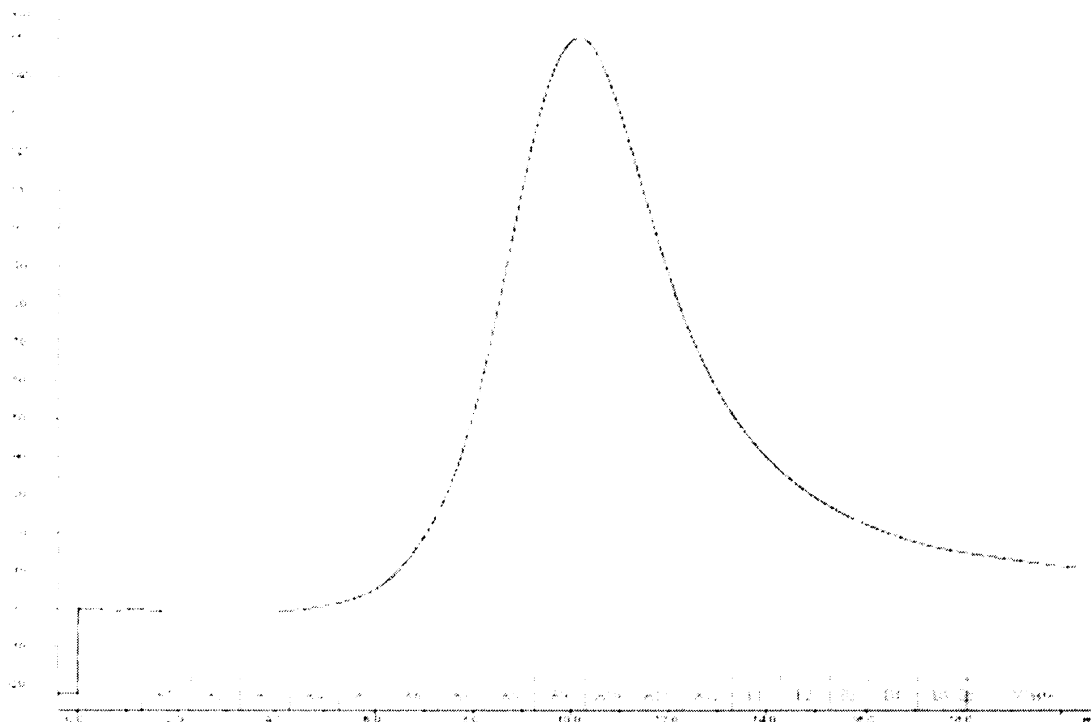
V případě vzorků *Phe34Trp* a *Phe73Trp* (obr. 5.12-5.13) nebyla čistota bílkoviny dostatečná, proto byl po dialýze ( $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kys. citronová;  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA; pH pufru 6,3;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT) vybraných frakcí po niklové afinitní chromatografii (pro *Phe34Trp* frakce B4-B9 a pro *Phe73Trp* frakce B5-B10) proveden další purifikační krok.

### 5.2.3 Kationtově výměnná chromatografie TH1R

Po niklové afinitní chromatografii následoval další krok purifikačního protokolu, iontově výměnná chromatografie. Chromatografická kolona obsahovala negativně nabitou matici, která elektrostaticky interagovala s pozitivně nabitými molekulami bílkoviny. Z kolony byly nejprve vymyty nespecificky navázané proteiny (proteiny s nízkým pozitivním nábojem) pufrům o nízké iontové síle a zvýšením gradientu iontové síly elučního pufru byla z kolony uvolněna TH1R (obr. 5.14 a 5.15).



**Obr. 5.14** Chromatogram eluce kationtově výměnné chromatografie mutované regulační domény tyrozin hydroxylázy v pozici 34. Průtoková rychlost  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

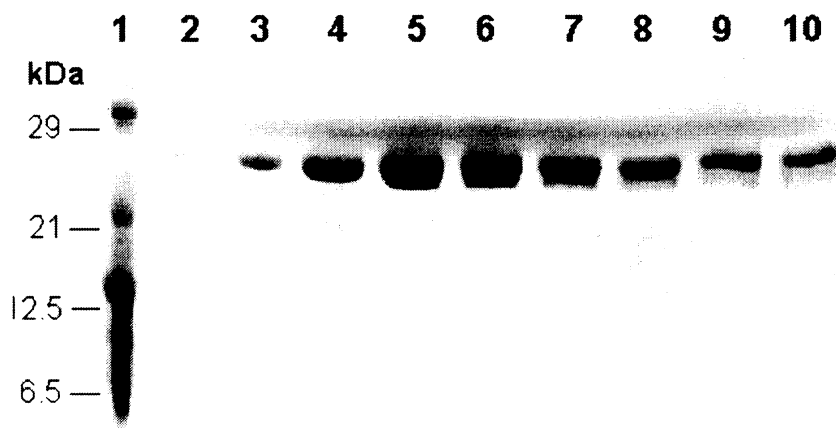


**Obr. 5.15** Chromatogram eluce kationtově výměnné chromatografie mutované regulační domény tyrozin hydroxylázy v pozici 73. Průtoková rychlost  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

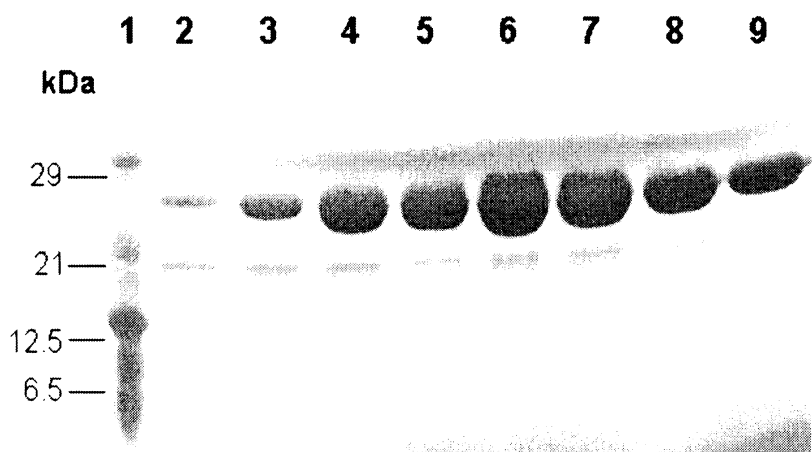
V případě varianty Phe34Trp proběhla eluce proteinu v oblasti frakcí A6-B2 (obr. 5.14). Stejně tomu bylo u vzorku Phe73Trp (obr 5.15).

### 5.2.3.1 SDS-PAGE frakcí z kationtově výměnné chromatografie TH1R

Pro kontrolu čistoty frakcí po kationtově výměnné chromatografii byla provedena další SDS-PAGE. Na polyakrylamidový gel byly naneseny tyto frakce: pro Phe34Trp frakce A6-B2; pro Phe73Trp to byly frakce A6-B1.



**Obr. 5.16** Obrázek gelu SDS-PAGE frakcí po kationtové výměnné chromatografii TH1R Phe34Trp. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách. Vzorky byly pipetovány v tomto pořadí (zleva) vzorek standardu v dráze 1, v drahách 2-10 frakce po kationtové výměnné chromatografii A6-B2 (12% gel, 200V).



**Obr. 5.17** Obrázek gelu SDS-PAGE frakcí po kationtové výměnné chromatografii TH1R Phe73Trp. Jako srovnávací vzorek byl na gel nanesen roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách. Vzorky byly pipetovány v tomto pořadí (zleva) vzorek standardu v dráze 1, v drahách 2-9 frakce po kationtové výměnné chromatografii A6-B1 (12% gel, 200V).

V této fázi byla purifikace ukončena i u zbylých dvou variant TH1R. Na obou gelech SDS-PAGE vidíme, že pomalu začalo docházet k degradaci proteinu a další purifikační postup by mohl být riskantní. Tato čistota byla postačující na vazebné pokusy se 14-3-3

proteinem. Byla provedena dialýza při teplotě 4 °C po dobu 12 h ( $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 7,5;  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT; 10% glycerol), vzorky byly zamrazeny v teplotě -80 °C.

Následně byly všechny tři vzorky TH1R fosforylovány a připraveny tak na vazebné pokusy.

## **5.3 Exprese a purifikace 14-3-3 proteinu**

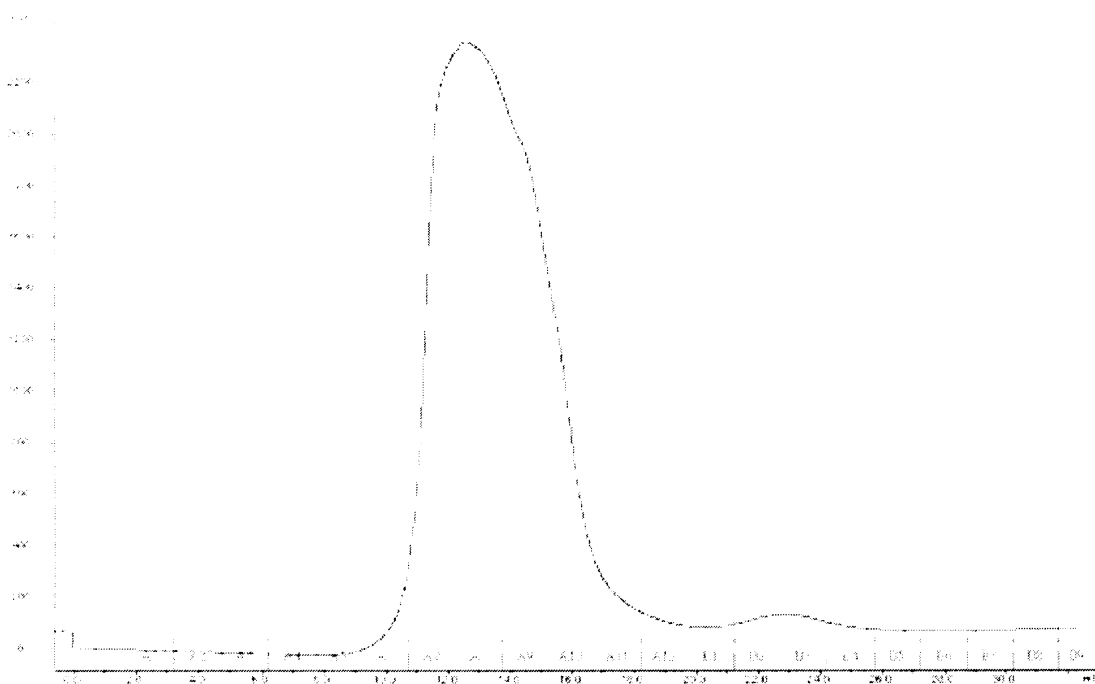
### **5.3.1 Purifikace 14-3-3 proteinu – monomerní a dimerní varianta**

Pro purifikace obou proteinů 14-3-3 $\zeta$  (Trp59Phe, Trp228Phe, Ser58Asp) a 14-3-3 $\xi$  (Trp59Phe, Trp228Phe) byl použit stejný purifikační protokol.

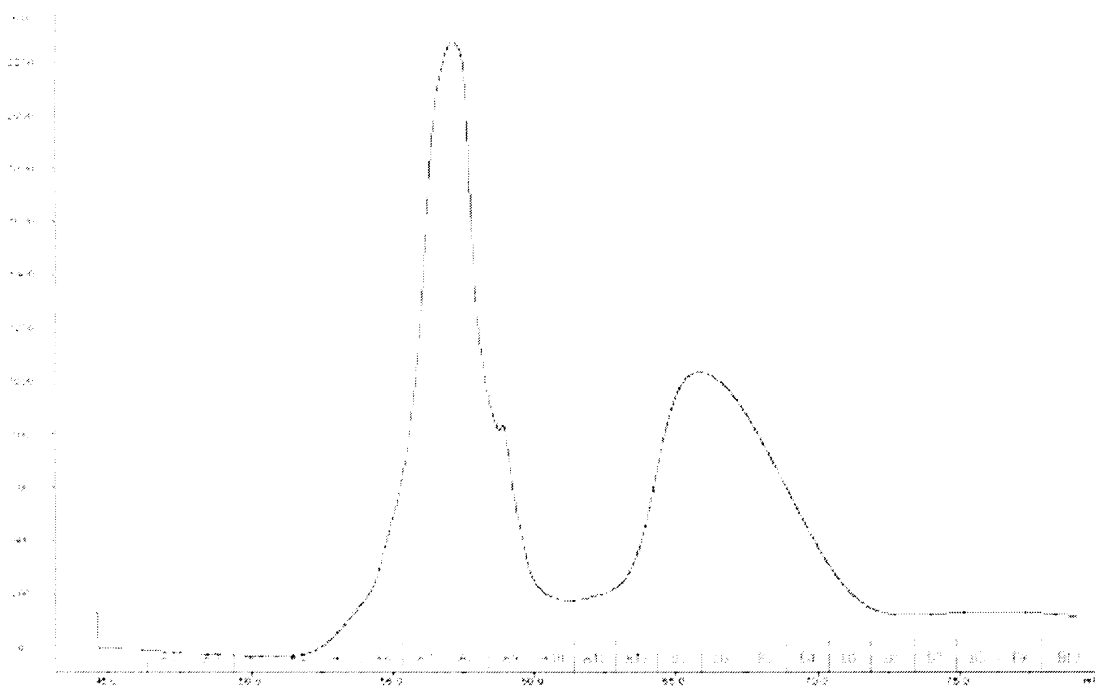
Expresa bakteriální kultury obsahující daný protein (monomer či dimer) byla prováděna ze tří litrů LB média. Bakteriální kultura byla inkubována s induktorem IPTG a následně centrifugována. Pelet byl resuspendován a následně inkubován s lysozymem. Lyzované bakterie byly sonikovány a opět odstředeny za vysokých otáček. Takto připravený roztok (sonikát) byl použit k prvnímu purifikačnímu kroku – niklové afinitní chromatografii.

#### **5.3.1.1 Niklová afinitní chromatografie 14-3-3 proteinů**

Oba mutantní 14-3-3 proteiny byly exprimovány jako fúzní proteiny obsahující na svém N-konci řetězec šesti histidinů, prostřednictvím kterého se bílkovina navázala na sepharosovou matici obsahující nikelnaté ionty. Promýváním kolony roztokem imidazolu o zvyšující se koncentraci, došlo nejprve k odstranění nespecificky navázaných bílkovin a až vyšší koncentrace imidazolu uvolnila z kolony vzorek 14-3-3 proteinu (**obr. 5.18 a 5.19**).



**Obr. 5.18** Chromatogram eluce niklové afinitní chromatografie monomerní varianty 14-3-3 $\zeta$  proteinu. Průtoková rychlost 0,5 ml · min<sup>-1</sup>.



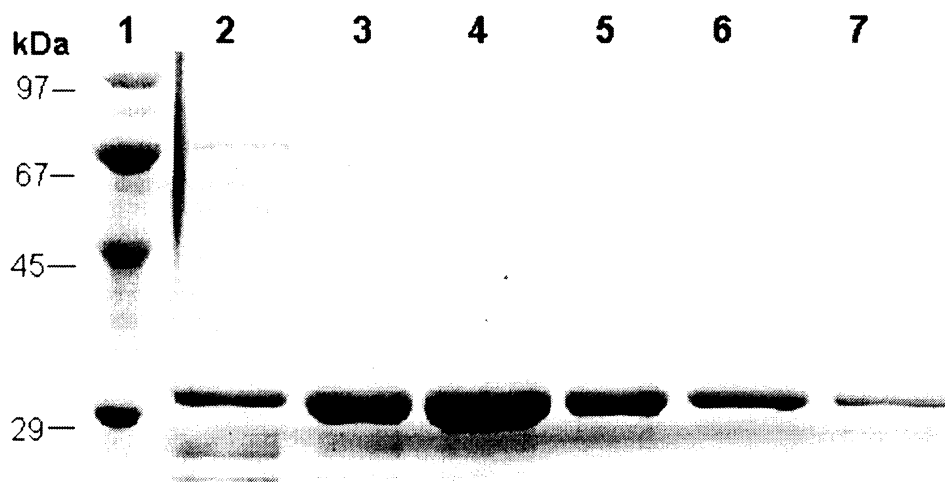
**Obr. 5.19** Chromatogram eluce niklové afinitní chromatografie dimerní varianty 14-3-3 $\zeta$  proteinu. Průtoková rychlost 0,5 ml · min<sup>-1</sup>.



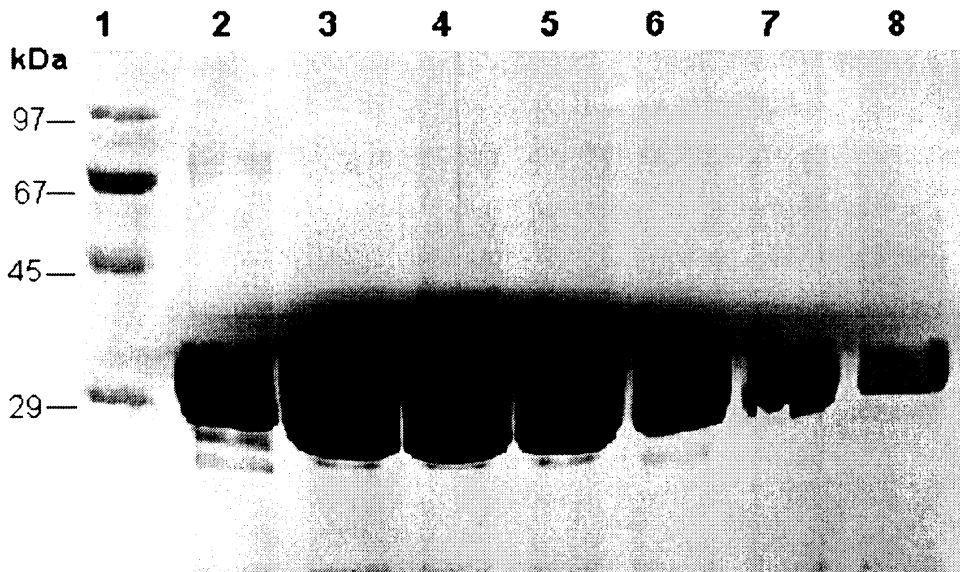
Na obrázcích 5.18 a 5.19 je patrné, že po promytí kolony puforem s nízkou koncentrací imidazolu ( $60 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) došlo k uvolnění nespecificky navázaných proteinů obsahujících histidinové zbytky. Tyto nečistoty jsou na obr. 5.18 patrné v oblasti frakcí A6-A11 a na obr. 5.19 v oblasti frakcí A5-A9. Po promytí kolony puforem s vyšší koncentrací imidazolu ( $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) došlo k uvolnění specificky navázaných bílkovin obsahujících histidinovou kotvu. V případě monomerní varianty proteinu se jedná o oblast frakcí B1-B6, u dimerní varianty je to oblast frakcí A12-B6.

#### 5.3.1.1.1 SDS-PAGE po niklové afinitní chromatografii 14-3-3 proteinu

Vzorky z frakcí niklové afinitní chromatografie B1-B6 eventuálně A12-B6, které měly obsahovat rekombinantní proteiny, byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel a byla provedena proteinová elektroforéza SDS-PAGE.



**Obr. 5.20** Obrázek monomerní varianty 14-3-3 $\zeta$  proteinu po prvním purifikačním kroku, niklové afinitní chromatografii. Vzorky byly pipetovány zleva, nejprve vzorek standardu obsahující fragmenty o známých molekulových vahách a v drahách 2-7 frakce B1-B6 (viz obr. 5.18). Vertikální SDS-PAGE, 12% polyakrylamidový gel, 150 V.



**Obr. 5.21** Obrázek dimerní varianty 14-3-3 $\zeta$  proteinu po prvním purifikačním kroku, niklové afinitní chromatografii. Vzorky byly pipetovány zleva, nejprve vzorek standardu a v drahách 2-8 frakce A12-B6 (viz obr. 5.19). Vertikální SDS-PAGE, 12% polyakrylamidový gel, 150 V

Z obrázků gelů je patrné, že největší množství proteinu s nejmenším množstvím nespecificky navázaných bílkovin obsahovaly frakce B2-B4 pro monomer a B1-B6 pro dimer.

Předpokládaná molekulová váha 14-3-3 proteinu byla 28040 Da, což srovnáním se standardem molekulové váhy v obou případech odpovídá.

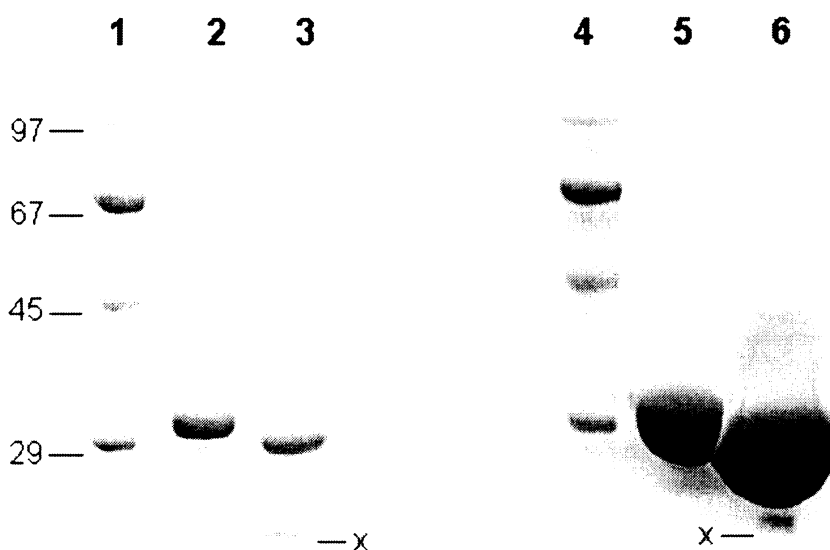
Koncentrace proteinu byla v případě monomeru velice malá. Při rozštěpení dimerní varianty proteinu na monomer došlo k výraznému zásahu do struktury bílkoviny, a patrně proto se monomer také podstatně hůře exprimoval než dimer.

Po niklové afinitní chromatografii byla provedena dialýza pro úpravu složení pufru. Do dialyzační membrány byly v případě monomeru přeneseny frakce po niklové afinitní chromatografii B2-B6, v případě dimeru byly vybrány frakce B1-B6. Dialýza probíhala po dobu 12 hodin při teplotě 4 °C v pufru:  $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT; 10% glycerol.

### 5.3.1.2 Thrombinové štěpení

V této fázi purifikace bylo třeba provést thrombinové štěpení, které mělo za úkol odstranit histidinovou kotvu obou mutantních 14-3-3 proteinů. Ta byla využita v prvním purifikačním kroku, ale v dalších purifikačních postupech by byla na překážku.

Thrombin je enzym, který rozpoznává aminokyselinovou sekvenci Leu – Val – Pro – Arg – Gly – Ser, kterou je schopen mezi argininem a glycinem rozštěpit. Vektor pET-15b kóduje toto štěpné místo, které se nachází v těsné blízkosti oblasti kódující histidinovou kotvu. Proto bylo možné k odstranění histidinů použít právě thrombin.



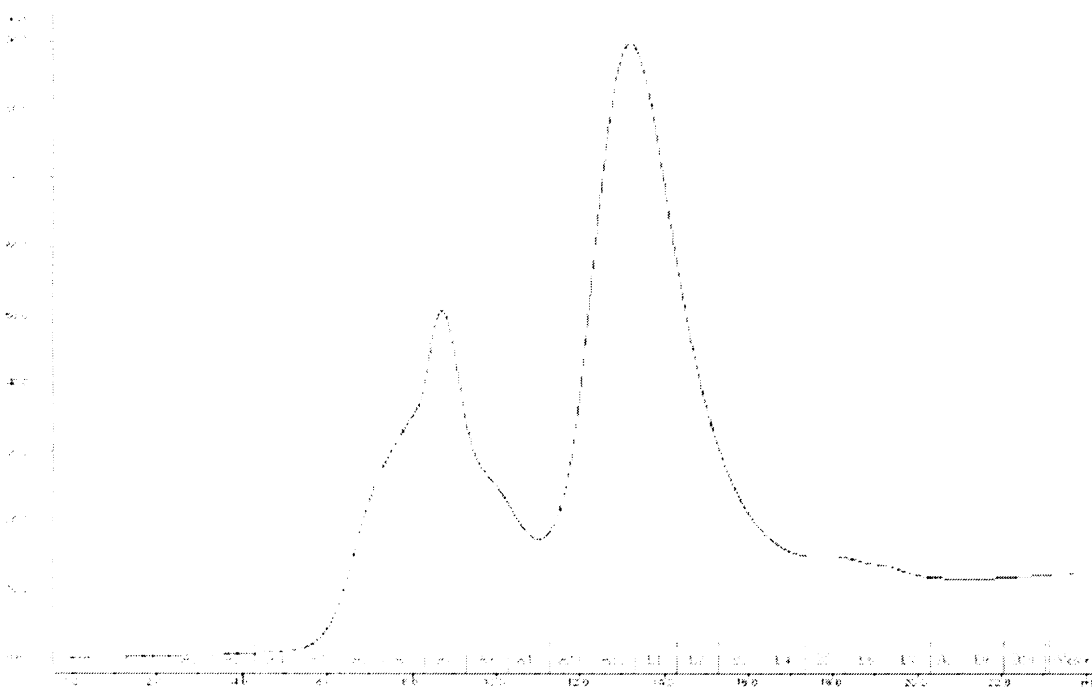
**Obr. 5.22** Srovnání monomerní a dimerní varianty 14-3-3 proteinu před a po inkubaci s thrombinem. Vzorky byly nanášeny takto (zleva): v drahách 1 a 4 roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách, ve 2. dráze vzorek monomerní varianty proteinu před štěpením thrombinem, ve 3. dráze tento vzorek po inkubaci s thrombinem, v dráze 5 vzorek dimerní varianty před inkubací s thrombinem a v poslední dráze tento protein po inkubaci s thrombinem. Vertikální SDS-PAGE, 12% polyakrylamidový gel, 150 V.

Bílkovina obsahující histidinovou kotvu je o dvacet aminokyselin delší, tudíž má větší molekulovou váhu než bílkovina, která byla pomocí thrombinu zkrácena. Na gelu je patrné, že thrombin skutečně histidinovou kotvu odštěpil, a to jak v případě monomerní, tak i dimerní varianty proteinu. V drahách 3 a 6 vidíme proužek

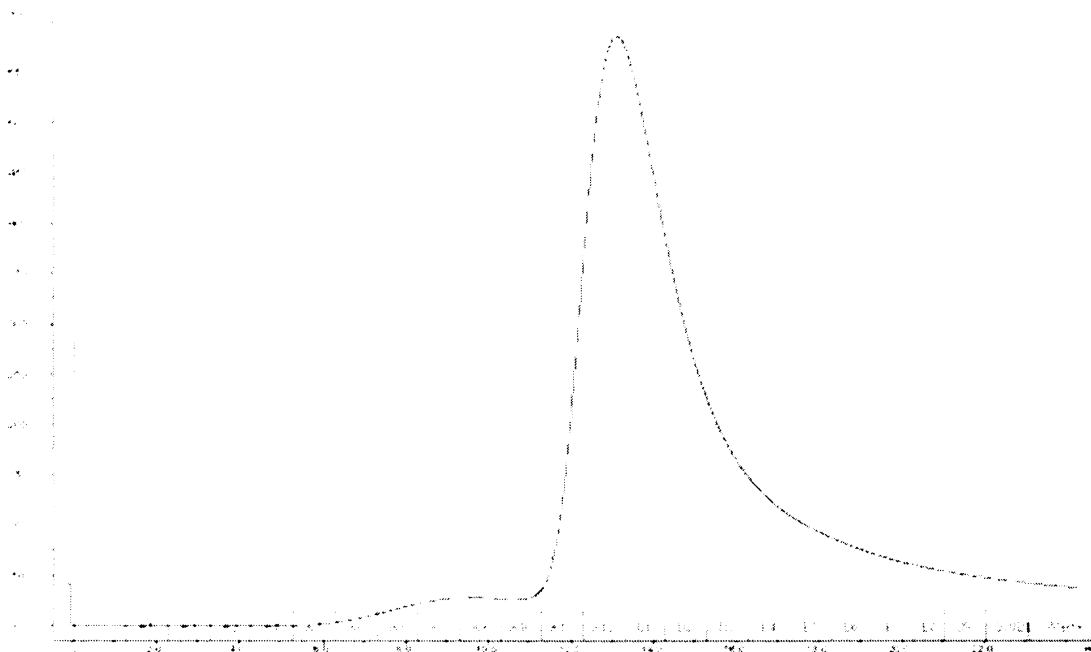
odpovídající odštěpené histidinové kotvě (označený písmenem „x“).

### 5.3.1.3 Aniontově výměnná chromatografie 14-3-3 proteinu

Po niklové afinitní chromatografii nebyly purifikované proteiny ještě dostatečně čisté. Proto po thrombinovém odštěpení histidinové kotvy následoval další purifikační krok, konkrétně aniontově výměnná chromatografie. Chromatografická kolona obsahovala pozitivně nabitou matici, která elektrostaticky interagovala s negativně nabitými molekulami 14-3-3 proteinu. Byla použita chromatografická kolona obsahující Q sepharosu. Kolona byla ekvilibrována pufrům o nízké iontové síle, čímž došlo k vymytí nespecificky navázaných proteinů. Zvyšováním gradientu iontové síly elučního pufru byly eluovány navázané molekuly 14-3-3 proteinu.



**Obr. 5.23** Chromatogram eluce aniontově výměnné chromatografie *monomerní* varianty 14-3-3 $\zeta$  proteinu. Průtoková rychlost 1,5 ml · min<sup>-1</sup>.

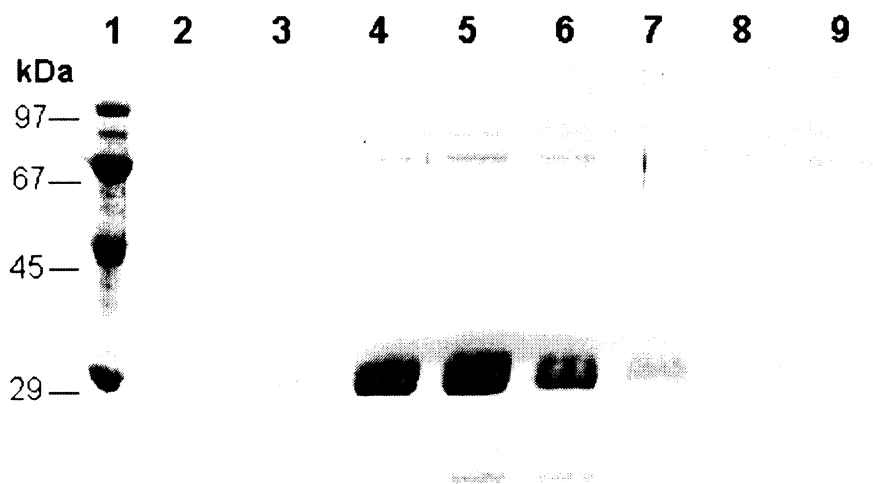


**Obr. 5.24** Chromatogram eluce aniontově výměnné chromatografie *dimerní* varianty 14-3-3 $\zeta$  proteinu. Průtoková rychlost 1,5 ml · min<sup>-1</sup>.

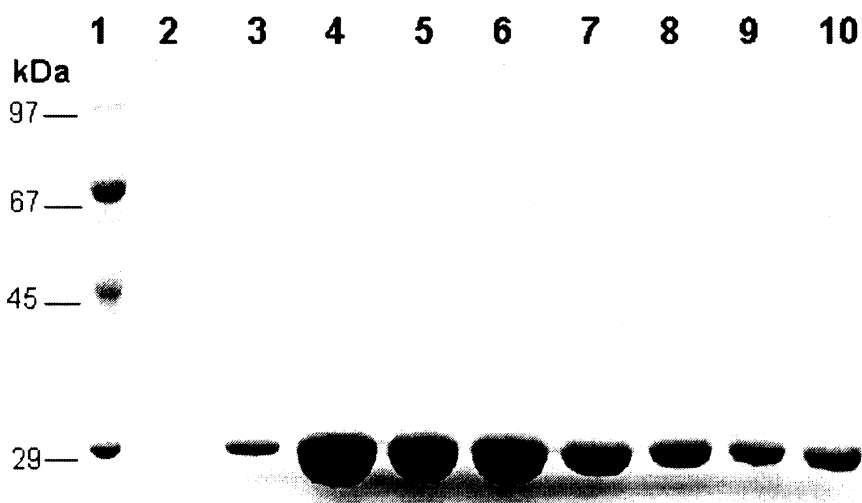
Na chromatogramech jsou v obou případech vidět dva eluční píky. První představuje nespecificky navázané proteiny, které byly z kolony vymyty nejdříve, druhý 14-3-3 protein. Jak v případě monomerní tak i dimerní varianty proběhla eluce proteinu v oblasti frakcí A11-B5 (**obr. 5.23 a 5.24**).

#### **5.3.1.3.1 SDS-PAGE frakcí po aniontově výměnné chromatografii 14-3-3 proteinu**

Vzorky vybraných frakcí byly naneseny na polyakrylamidový gel a byla provedena kontrola čistoty frakcí pomocí další vertikální elektroforézy SDS-PAGE.



**Obr. 5.25** Obrázek gelu SDS-PAGE frakcí po aniontové výměnné chromatografii monomerní varianty 14-3-3 proteinu. Frakce byly na gel nanášeny zleva. Nejprve roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách, v dráhách 2-9 vzorky frakcí A10-B5 (12% gel, 200 V).



**Obr. 5.26** Obrázek gelu SDS-PAGE frakcí po aniontové výměnné chromatografii dimerní varianty 14-3-3 proteinu. Frakce byly na gel nanášeny zleva. Nejprve roztok standardu obsahující fragmenty o známých molekulových váhách, v dráhách 2-10 vzorky frakcí A10-B6 (12% gel, 200 V).

Z gelu je patrné, že monomerní forma proteinu byla částečně degradována (obr. 5.25). Jak již bylo zmíněno, 14-3-3 monomer se podstatně hůře exprimuje a následně purifikuje, tudíž prakticky není možné získat v tomto kroku vzorek čistý a zcela nedegradovaný. Proto byl takto připravený 14-3-3 protein použit pro další pokusy. Pro jednoduché vazebné pokusy tyrozin hydroxylázy a 14-3-3 proteinu je tato čistota dostačující.

Na první pohled je patrné, že oproti gelu monomerní varianty 14-3-3 proteinu byla jeho dimerní varianta prostřednictvím aniontově výměnné chromatografie velice dobře zbavena nespecificky navázaných proteinů a nebyla přitom degradována (obr. 5.26).

Abychom docílili výměny pufru, byla u obou variant provedena poslední dialýza ( $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 7,5;  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl;  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA;  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT; 10% glycerol). Do dialyzační membrány byly v případě monomeru 14-3-3 přeneseny frakce A12-B2 po aniontově výměnné chromatografii, v případě dimeru 14-3-3 byly potom vybrány frakce A12-B7.

Dialýza probíhala 12 hodin při teplotě  $4^\circ\text{C}$ . Takto připravené bílkoviny byly uchovány v teplotě  $-80^\circ\text{C}$ .

## 5.4 Určení koncentrace vzorků

Pomocí Bradfordovy eseje byly zjištěny koncentrace jednotlivých vzorků, a to jak obou variant 14-3-3 proteinu, tak všech tří vzorků regulační domény tyrozin hydroxylázy včetně jejich fosforylovaných verzí. Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm a koncentrace následně odečteny z kalibrační křivky (kap. 9, příloha C).

vzorek	WT P	WT NP	34 P	34 NP	73 P	73 NP	M	D
A (595 nm)	0,21	0,24	0,19	0,21	0,52	0,52	0,15	0,71
c (mg.ml <sup>-1</sup> )	0,48	0,51	0,39	0,45	1,13	1,13	0,32	1,54

**Tab. 5.1** Koncentrace (c) a absorbance (A) vzorků bílkovin měřených na přístroji CECIL 800 (Buck Scientific, Velká Británie) při vlnové délce 595 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. **WT P:** fosforylovaný vzorek původní TH1R; **WT NP:**

*nefosforylovaný vzorek původní TH1R; 34 P: fosforylovaný vzorek mutantu Phe34Trp TH1R; 34 NP: nefosforylovaný vzorek mutantu Phe34Trp TH1R; 73 P: fosforylovaný vzorek mutantu Phe73Trp TH1R; 73 NP: nefosforylovaný vzorek mutantu Phe73Trp TH1R; M: monomerní varianta 14-3-3 proteinu; D: dimerní varianta 14-3-3 proteinu.*

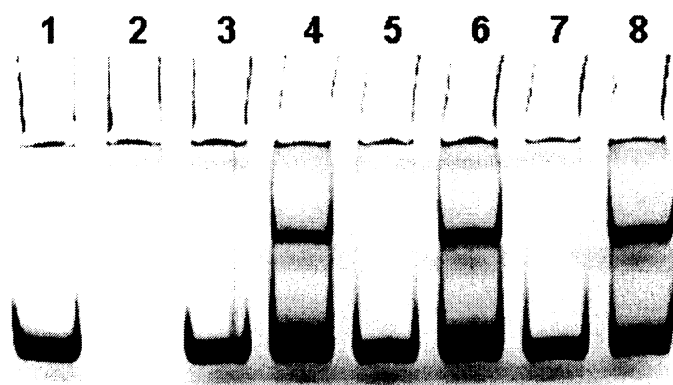
## 5.5 Test interakce TH1R a 14-3-3 proteinu

K vazebným pokusům byly použity tři vypořifikované, fosforylované vzorky TH1R a oba vypořifikované vzorky 14-3-3 proteinu. Nejprve byly připraveny vzorky komplexů **dimerní** varianty 14-3-3 proteinu se všemi třemi variantami TH1R, tzn. s mutantem Phe34Trp, Phe73Trp a WT. Stejně vzorky TH1R byly použity i pro vazebný experiment s **monomerní** verzí 14-3-3 proteinu. K důkazu tvorby komplexu zmiňovaných konstruktů byla použita elektroforetická metoda zvaná nativní elektroforéza, která je založena na dělení molekul v elektrickém poli na základě velikosti jejich nábojů. Na gel byly naneseny vzorky jak je popsáno v tabulce 5.2. Pro porovnání byly vedle fosforylovaných forem TH1R připraveny i vzorky 14-3-3 proteinu s nefosforylovanými verzemi TH1R. V dráze 1 byl pro srovnání nanesen vzorek samotného 14-3-3 proteinu, v dráze 2 vzorek TH1R WT v nefosforylované formě. Aby nedošlo k proteolytické degradaci bílkovinných komplexů, byly vzorky, pro ověření vazebných interakcí, okamžitě naneseny na polyakrylamidový gel a byla provedena nativní elektroforéza (**obr. 5.27**).

dráha	1	2	3	4	5	6	7	8
vzorek	14-3-3	THWT	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3
		(NP)	+	+	+	+	+	+
		THWT	THWT	THF34W	THF34	THF73	THF73	
		(NP)	(P)	(NP)	W (P)	W (NP)	W (P)	

**Tab. 5.2** *Vzorky nanesené na nativní polyakrylamidový gel (viz obr. 5.27). Komplexy dimerní varianty 14-3-3 proteinu a jednotlivých mutantních forem TH1R. Zkratkou NP jsou v tabulce označeny vzorky TH1R, které nebyly fosforylovány, P označuje fosforylované formy TH1R.*





**Obr. 5.27** *Ověření vazebných interakcí 14-3-3 proteinu s TH1R. Dimerní varianta 14-3-3 proteinu. Složení jednotlivých vzorků viz tabulka 5.2. V drahách 4, 6 a 8 jsou zřetelné vždy dva fragmenty, z nichž ten blíže aplikaci vzorku představuje komplex TH1R a 14-3-3 proteinu. Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, 12% gel, 150 V.*

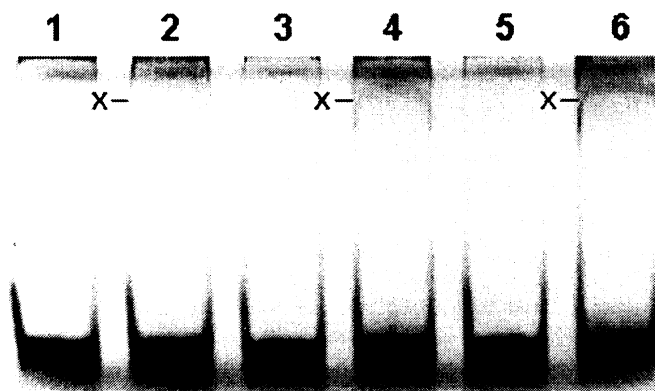
Jak již bylo řečeno, v nativním gelu jsou molekuly v elektrickém poli děleny na základě velikosti jejich nábojů. Silně negativně nabitý 14-3-3 protein určuje záporný náboj všem komplexům, které potom putují v nativním gelu směrem ke kladné elektrodě. Samotná tyrozin hydroxyláza (dráha 2) má kladný náboj, tudíž do gelu nemigruje. V drahách 3, 5 a 7 nebyly vzorky tyrozin hydroxylázy fosforylovány a, jak je z gelu patrné, nedošlo k žádné vazbě se 14-3-3 proteinem. V těchto drahách proto pozorujeme pouze 14-3-3 protein jako v dráze 1. Naproti tomu v drahách 4, 6 a 8 je zřetelně vidět tvorba komplexů. Zde k vazbě došlo, protože varianty TH1R byly fosforylovány. Fragment blíže k počátku aplikace vzorku (rychleji migrující) obsahuje komplex tyrozin hydroxylázy se 14-3-3 proteinem a fragment vzdálenější počátku vykazuje stejný náboj jako samotný 14-3-3 protein. Jedná se o přebytek 14-3-3 proteinu, který se nenařádal na TH1R. Regulační doména tyrozin hydroxylázy pozitivní náboj komplexu výrazně oslabuje, proto v gelu komplex migruje pomaleji (zhruba do poloviční vzdálenosti než 14-3-3 protein sám).

Nakonec následoval vazebný pokus TH1R, ve svých třech obměnách, s **monomerní** variantou 14-3-3 proteinu. V tabulce 5.3 jsou znázorněny vzorky, které byly naneseny na nativní polyakrylamidový gel.

dráha	1	2	3	4	5	6
vzorek	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3
	+	+	+	+	+	+
	THWT	THWT	THF34W	THF34W	THF73W	THF73W
	(NP)	(P)	(NP)	(P)	(NP)	(NP)

**Tab. 5.3** Vzorky nanesené na nativní polyakrylamidový gel (viz obr. 5.28).

*Komplexy dimerní varianty 14-3-3 proteinu a jednotlivých mutantních forem TH1R.*



**Obr. 5.28** *Ověření vazebných interakcí 14-3-3 proteinu s TH1R. Monomerní varianta 14-3-3 proteinu. Složení jednotlivých vzorků viz tabulka 5.3. V drahách 4, 6 a 8 jsou vždy dva fragmenty, z nichž ten blíže aplikaci vzorku (pomaleji migrující, označen písmenem „x“) představuje komplex TH1R a 14-3-3 proteinu. Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, 15% gel, 150 V.*

I v případě monomerní varianty 14-3-3 proteinu se třemi variantami TH1R byla vazebná interakce prokázána. V drahách 1, 3 a 5 byl nanesen vzorek 14-3-3 proteinu s nefosforylovanými formami jednotlivých mutovaných variant TH1R. Výrazný fragment ve spodní části gelu odpovídá 14-3-3 proteinu. Nenavázaná TH1R nesoucí kladný náboj putovala opačným směrem – ke katodě, respektive do gelu nemigrovala. V drahách 2, 4 a 6 můžeme pozorovat fragmenty dva. Slabé fragmenty v horní části gelu označené písmenem „x“ představují komplex 14-3-3 proteinu a TH1R. Fragment vzdálenější od počátku potom odpovídá samotnému 14-3-3 proteinu, jehož přebytek se na TH1R nenavázal. Pro vysvětlení musím uvést, že na původním gelu byly fragmenty komplexů zřetelně rozeznatelné. Na naskenované fotografii gelu jsou fragmenty komplexů bohužel patrně hůře.

## 6 Diskuze

Tyrozín hydroxyláza, enzym řídící syntézu dopaminu, podléhá aktivaci ve dvou stupních. Prvním stupněm je jeho fosforylace. Tyrozín hydroxyláza obsahuje ve své regulační doméně dvě fosforylační místa, a to v pozici Ser-19 a Ser-40 [Nagatsu, 2005; Sutherland a kol., 1993; Vulliet a kol., 1984]. Fosforylační místo Ser-40 je významné z hlediska enzymové aktivity. Fosforylace v pozici Ser-40 aktivitu tyrozín hydroxylázy výrazně zvyšuje [Kobori a kol., 2004; Sura a kol., 2004]. Dále je známo, že fosforylace Ser-19 nemá na enzymovou aktivitu TH žádný vliv a její hlavní úlohou je indukovat vazbu regulačního 14-3-3 proteinu [Bevilaqua a kol., 2001]. Navázání 14-3-3 proteinu je druhý proces nezbytný pro aktivaci enzymu. Vzhledem k tomu, že fosforylovaný Ser-40 velmi snadno podléhá defosforylaci, je pravděpodobné, že vazba 14-3-3 proteinu na TH má za úkol Ser-40 před defosforylací chránit [Ichimura a kol., 1987; Leal a kol., 2002]. O funkci fosforylace Ser-19 se stále spekuluje. Z toho důvodu je právě fosforylace Ser-19 předmětem nejen našeho zájmu.

Hlavním úkolem této práce bylo připravit sérii mutantních verzí regulační domény TH, které budou vhodné pro studium strukturních změn vyvolaných fosforylací Ser-19 a Ser-40 a následnou vazbou 14-3-3 proteinu. Regulační doména enzymu tyrozín hydroxylázy sama o sobě neobsahuje žádnou aminokyselinu, která by vykazovala silné fluorescenční vlastnosti. Této skutečnosti bylo využito a do okolí míst genu TH1R, kde se vyskytují fosforylační místa Ser-19 a Ser-40 a k tomu ještě do několika dalších oblastí, byly pomocí cílené bodové mutagenese vneseny tryptofanové zbytky, jakožto vhodné fluorescenční chromofory. Aby záměnou aminokyseliny nedošlo k výraznému narušení struktury enzymu, byla pro cílenou bodovou mutagenesi vybrána aminokyselina, která má podobné chemické a fyzikální vlastnosti jako tryptofan. Tryptofanové zbytky byly vneseny do pěti různých míst genu na pozice původních fenylyalaninů, což je, stejně jako tryptofan, hydrofobní aminokyselina. Mutovány byly fenylyalaniny v pozicích 14, 34, 73, 103 a 131. Dvě z těchto mutantních verzí TH1R (Phe34Trp a Phe73Trp) byly dále exprimovány, purifikovány a byla ověřena jejich schopnost interagovat se 14-3-3 proteinem. Expresní test ukázal velice vysokou produkci jak původní nemutované TH1R, tak i obou mutovaných verzí bílkoviny. Proto mohla být provedena dvoustupňová purifikace těchto proteinů. Prvním purifikačním

krokem byla niklová afinitní chromatografie a následně byla provedena iontově výměnná chromatografie. Stejným postupem byly purifikovány i dvě verze 14-3-3 proteinu a to jeho monomerní a dimerní varianta. Výtěžky jednotlivých variant TH1R se výrazně odlišují. Nejlépe se exprimovala a purifikovala varianta TH1R Phe73Trp. Dosáhla zhruba trojnásobného výtěžku v porovnání s mutantem TH1R Phe34Trp či nemutovanou verzí TH1R WT. Stejně tak dimerní varianta 14-3-3 proteinu se exprimovala výrazně lépe, s výtěžkem až pětikrát vyšším než monomerní varianta 14-3-3 proteinu.

Tyrosin hydroxyláza je velice citlivý enzym. V první řadě velmi snadno podléhá proteolytické degradaci. Této degradaci jsem se snažila v průběhu řešení úkolu předcházet používáním inhibitorů proteáz (EDTA a PMSF) a prováděním všech purifikací při teplotách od 0 °C do 4 °C. Jak je z těchto informací patrné, experimenty s tyrosin hydroxylázou vyžadovaly pečlivé zacházení, a i přesto musely být některé pokusy opakovány z důvodu proteolytické degradace proteinu. Z toho důvodu také nebyla purifikace TH1R dovedena do absolutní dokonalosti, nýbrž do takového stavu, který byl dostačující na vazebné pokusy se 14-3-3 proteinem.

Výsledky pokusů, které ověřovaly vazbu 14-3-3 proteinu s TH1R potvrdily teorii, že regulační doména tyrosin hydroxylázy je skutečně schopna vázat 14-3-3 protein pouze po předchozí fosforylaci [Vulliet a kol., 1984; Sutherland a kol., 1993]. U vzorků, které obsahovaly nefosforylované verze regulační domény tyrosin hydroxylázy, k vazbě na 14-3-3 protein nedošlo. K vazbě fosforylovaných vzorků TH1R došlo jak s dimerní, tak s monomerní verzí 14-3-3 proteinu. Dimerní verze 14-3-3 proteinu však vykazovala signifikantně lepší vazbu s TH1R než monomerní verze. *In vivo* se 14-3-3 protein vyskytuje pouze v dimerní podobě a je patrné, že většina důležitých vlastností tohoto proteinu je přímo spjata s jeho dimerní strukturou, což potvrdily i experimenty 14-3-3 proteinu s dalšími bílkovinami [Ganguly a kol., 2005].

V rámci této diplomové práce bylo ověřeno, že 14-3-3 protein se na fosforylované mutantní verze regulační domény tyrosin hydroxylázy váže stejně dobře jako na původní TH1R WT. To znamená, že mutanty TH1R připravené a vypurifikované pomocí uvedených protokolů mohou být použity k dalšímu studiu. Konkrétně budou podrobeny studiu vlivu fosforylace Ser-19 a Ser-40 na strukturu regulační domény tyrosin hydroxylázy pomocí fluorescenční spektroskopie. Zde bude využito již

popisované mutageneze – záměny fenylalaninu za tryptofan coby fluorofor. Prostřednictvím fluorescenční spektroskopie bude také studován vliv vazby 14-3-3 proteinu na konformaci regulační domény tyrosin hydroxylázy.

## 7 Závěr

Byly splněny všechny zadané cíle této diplomové práce:

1. Pomocí cílené bodové mutageneze se podařilo připravit sérii mutantů regulační domény enzymu tyrozin hydroxylázy obsahující pouze jeden tryptofanový zbytek na předem vybraných místech.
2. Byla provedena exprese a purifikace původní nemutované verze regulační domény tyrozin hydroxylázy.
3. Dále byla provedena exprese a purifikace dvou mutantních verzí regulační domény tyrozin hydroxylázy.
4. Podařilo se provést expresi a purifikaci dvou variant 14-3-3 proteinu, a to jeho monomerní a dimerní varianty.
5. Byl proveden test vazebné interakce mezi 14-3-3 proteinem a regulační doménou tyrozin hydroxylázy, který vazbu potvrdil.

## 8 Seznam citované literatury

- Benzinger, A.; Popowicz, G. M.; Joy, J. K.; Majumdar, S.; Holak, T. A.; Hermeking H.: The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Research* **15**:4, 219-27 (2005).
- Bevilaqua, L. R.; Graham, M. E.; Dunkley, P. R.; von Nagy-Felsobuki, E. I.; Dickson, P. W.: Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40). *The Journal of biological chemistry* **276**:44, 40411-6 (2001).
- Borges, N: Tolcapone in Parkinson's disease: liver toxicity and clinical efficacy. *Expert opinion on drug safety* **4**:1, 69-73 (2005).
- Daubner, S. C.; Hillas, P. J.; Fitzpatrick, P. F.: Expression and characterization of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase. *Archives of biochemistry and biophysics* **348**:2, 295-302 (1997b).
- Daubner, S. C.; Hillas, P. J.; Fitzpatrick, P. F.: Characterization of chimeric pterin-dependent hydroxylases: contributions of the regulatory domains of tyrosine and phenylalanine hydroxylase to substrate specificity. *Biochemistry* **36**:39, 11574-82 (1997a).
- Daubner, S. C.; Lohse, D. L.; Fitzpatrick, P. F.: Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2**, 1452-60 (1993).
- Eisensmith, R. C.; Woo S. L.: Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene. *Molecular biology & medicine* **8**, 3-18 (1991).
- Ferl, R. J.; Manak, M. S.; Reyes, M. F.: The 14-3-3s. *Genome Biology* **3**:7 REVIEWS3010 (2002).
- Fitzpatrick, P. F.; Chlumsky, L. J.; Daubner, S. C.; O'Malley, K. L.: Expression of rat tyrosine hydroxylase in insect tissue culture cells and purification and characterization of the cloned enzyme. *The Journal of biological chemistry* **265**:4, 2042-7 (1990).
- Fitzpatrick, P. F.: Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* **9**:42, 14083-91 (2003).
- Fitzpatrick, P. F.: Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annual Review of Biochemistry*; **68**, 355-81 (1999).
- Fu, H.; Subramanian, R. R.; Masters, S. C.: 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**, 617-47 (2000).
- Ganguly, S.; Weller, J. L.; Ho, A.; Chemineau, P.; Malpoux, B.; Klein, D.C.: Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:4, 1222-7 (2005).
- Goodwill, K. E.; Sabatier, C.; Marks, C.; Raag, R.; Fitzpatrick, P. F.; Stevens, R. C.: Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nature structural biology* **4**, 578-85 (1997).
- Goodwill, K. E.; Sabatier, C.; Stevens, R. C.: Crystal structure of tyrosine hydroxylase with bound

- cofactor analogue and iron at 2.3 Å resolution: self-hydroxylation of Phe300 and the pterin-binding site. *Biochemistry* **37**:39, 13437-45 (1998).
- Haavik, J.; Toska, K.: Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology* **16**, 285-309 (1998).
  - van Hemert, M. J.; Steensma, H. Y.; van Heusden, G. P.: 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**:10, 936-46 (2001).
  - Hermeking, H.: The 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews. Cancer* **3**:12, 931-43 (2003).
  - Choi, H. J.; Lee, S. Y.; Cho, Y.; No, H.; Kim, S. W.; Hwang, O.: Tetrahydrobiopterin causes mitochondrial dysfunction in dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. *Neurochemistry International* **48**:4, 255-62 (2006).
  - Ichimura, T.; Isobe, T.; Okuyama, T.; Yamauchi, T.; Fujisawa, H.: Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monoxygenase and tyrosine 3-monoxygenase in the presence of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Letters* **13**:219, 79-82 (1987).
  - Itagaki, C.; Isobe, T.; Taoka, M.; Natsume, T.; Nomura, N.; Horigome, T.; Omata, S.; Ichinose, H.; Nagatsu, T.; Greene, L. A.; Ichimura, T.: Stimulus-coupled interaction of tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins. *Biochemistry* **23**:38, 15673-80 (1999).
  - Kalous, V.; Pavlíček, Z.: *Biofyzikální chemie*, Praha, SNTL, 1980.
  - Kleppe, R.; Toska, K.; Haavik, J.: Interaction of phosphorylated tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins: evidence for a phosphoserine 40-dependent association. *Journal of neurochemistry* **77**, 1097-107 (2001).
  - Kobori, N.; Waymire, J. C.; Haycock, J. W.; Clifton, G. L.; Dash, P. K.: Enhancement of tyrosine hydroxylase phosphorylation and activity by glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry* **279**:3, 2182-91 (2004).
  - Kumer, S. C.; Vrana, K. E.: Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *Journal of neurochemistry* **67**, 443-62 (1996).
  - Leal, R. B.; Sim, A. T.; Goncalves, C. A.; Dunkley, P. R.: Tyrosine hydroxylase dephosphorylation by protein phosphatase 2A in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochemical Research* **27**:3, 207-13 (2002).
  - Liu, D.; Bienkowska, J.; Petosa, C.; Collier, R. J.; Fu, H.; Liddington, R.: Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **13**:376, 191-4 (1995).
  - Maass, A.; Scholz, J.; Moser, A.: Modeled ligand-protein complexes elucidate the origin of substrate specificity and provide insight into catalytic mechanisms of phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *European journal of biochemistry* **270**:6, 1065-75 (2003).
  - Miyasaki, J. M.; Shannon, K.; Voon, V.; Ravina, B.; Kleiner-Fisman, G.; Anderson, K.; Shulman, L. M.; Gronseth, G.; Weiner, W. J.: Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease. *Neurology* **66**:7, 996-1002 (2006).
  - Nagatsu, T.: Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays in biochemistry* **30**, 15-35 (1995).
  - Nestler, E. J.; McMahon, A.; Sabban, E. L.; Tallman, J. F.; Duman, R. S.: Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus.



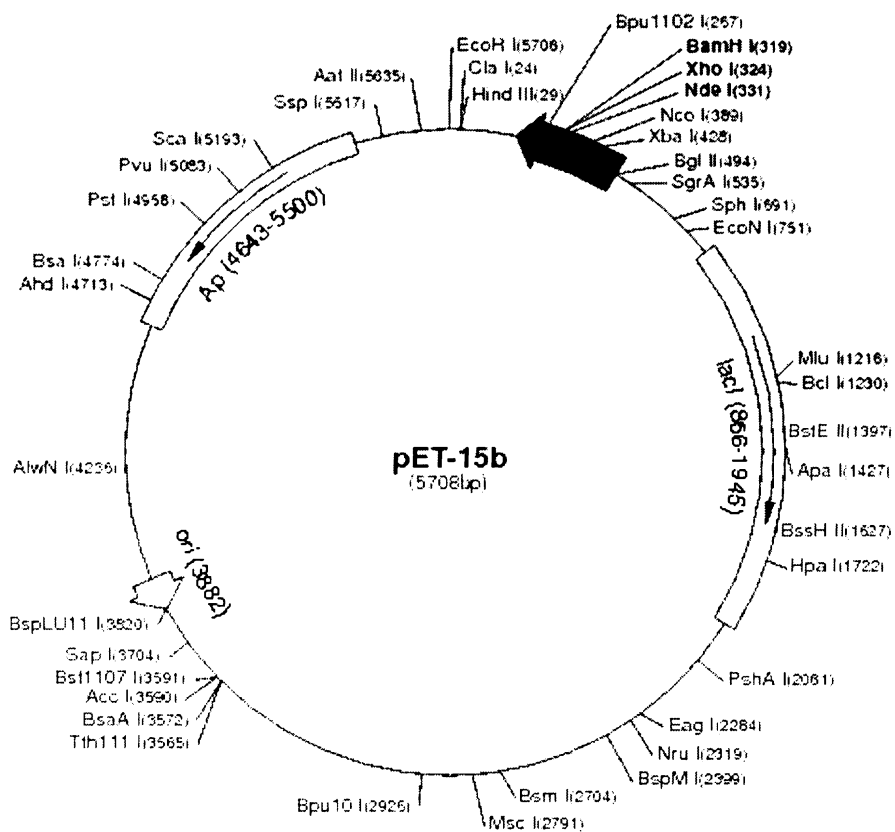
- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7522-6 (1990).
- Obsil, T.; Ghirlando, R.; Klein, D. C.; Ganguly, S.; Dyda, F.: Crystal structure of the 14-3-3zeta: serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **20**:105, 257-67 (2001).
  - Petosa, C.; Masters, S. C.; Bankston, L. A.; Pohl, J.; Wang, B.; Fu, H.; Liddington, R. C.: 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *The Journal of biological chemistry* **273**:26, 16305-10 (1998).
  - Rujescu, D.; Giegling, I.; Bondy, B.; Gietl, A.; Zill, P.; Moller, H. J.: Association of anger-related traits with SNPs in the TPH gene. *Molecular psychiatry* **7**, 1023-9 (2002).
  - Schloss, P.; Williams, D. C.: The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *Journal of psychopharmacology* **12**, 115-21 (1998).
  - Spillmann, M. K.; Van der Does, A. J.; Rankin, M. A.; Vuolo, R. D.; Alpert, J. E.; Nierenberg, A. A.; Rosenbaum, J. F.; Hayden, D.; Schoenfeld, D.; Fava, M.: Tryptophan depletion in SSRI-recovered depressed outpatients. *Psychopharmacology* **155**, 123-7 (2001).
  - Stavridi, E. S.; Chehab, N. H.; Malikzay, A.; Halazonetis, T. D.: Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer Research* **61**:19, 7030-3 (2001).
  - Sura, G. R.; Daubner, S. C.; Fitzpatrick, P. F.: Effects of phosphorylation by protein kinase A on binding of catecholamines to the human tyrosine hydroxylase isoforms. *Journal of neurochemistry* **90**, 970-8 (2004).
  - Sutherland C.; Alterio J.; Campbell D. G.; Le Bourdelles B.; Mallet J.; Haavik J.; Cohen P.: Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. *European journal of biochemistry* **15**:217, 715-22 (1993).
  - Voet, D.; Voet, J. G.: Straightening out the straighteners. *Trends in biochemical sciences* **18**:12, 464 (1993).
  - Vulliet, P. R.; Woodgett, J. R.; Cohen, P.: Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by calmodulin-dependent multiprotein kinase. *The Journal of biological chemistry* **25**:259, 13680-3 (1984).
  - Wang, L.; Erlandsen, H.; Haavik, J.; Knappskog, P. M.; Stevens, R. C.: Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry* **41**:42, 12569-74 (2002).
  - Xiao, B.; Smerdon, S. J.; Jones, D. H.; Dodson, G. G.; Soneji, Y.; Aitken, A.; Gamblin, S. J.: Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**, 188-91 (1995).
  - Yaffe, M. B.; Rittinger, K.; Volinia, S.; Caron, P. R.; Aitken, A.; Leffers, H.; Gamblin, S. J.; Smerdon, S. J.; Cantley, L. C.: The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**:7, 961-71 (1997).
  - Yaffe, M. B.: How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters* **20**:513, 53-7 (2002).

### Seznam citovaných internetových odkazů:

- <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>>: Fluorofory v biomedicině [cit. 20.3.2006].
- <<http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB045.pdf>> [cit. 7.4.2006].
- <<http://www.expasy.org/sprot/>>: Protein knowledgebase [cit. 17.1.2006].
- <<http://www.michaeljfox.org/parkinsons/index.php>>: *The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research* [cit. 15.3.2006].
- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.figgrp.1711>>: *Molecular Cell Biology* [cit. 22.1.2006].
- <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfsar/fluorescence/soubory/principy.htm>>: Principy fluorescenční spektroskopie [cit. 15.3.2006].

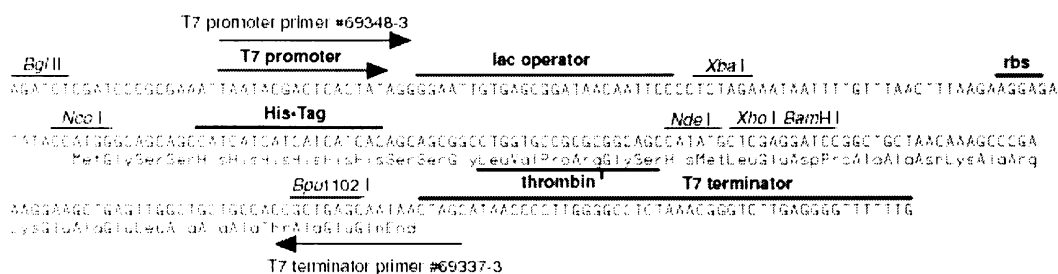
## 9 Přílohy

### Příloha A



*Mapa vektoru pET-15b. Plazmid pET-15b obsahuje polyklonovací místo (znázorněné černou šipkou). Toto místo obsahuje T7-promotor, na kterém T7-RNA-polymeráza zahajuje transkripci genu (viz příloha B) [Benzinger, a kol.; <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB045.pdf>].*

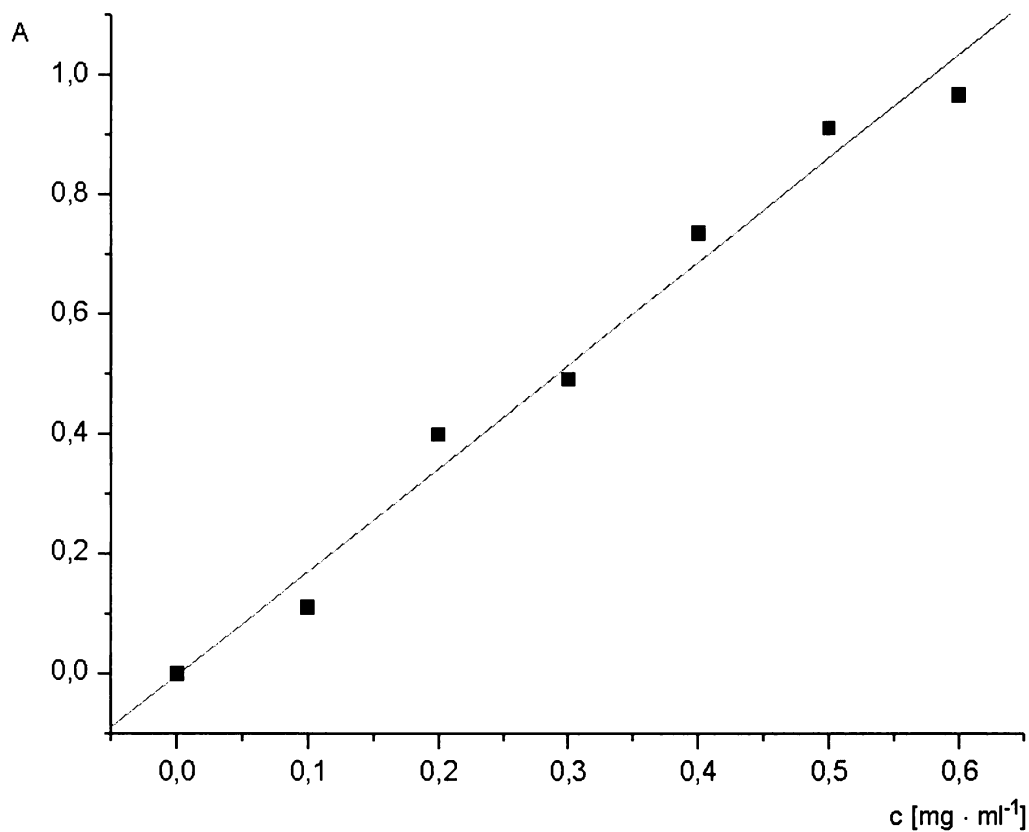
## Příloha B



*Polyklonovací místo vektoru pET-15b. T7-promotor se překrývá s místem (lac operátor), na které nasedá lac represor, ten inhibuje započetí transkripce. His-Tag je gen šesti histidinových reziduí, jež se váží na kov na chelatující sepharose [Voet, D. a Voet, G., 1993].*

## Příloha C

$c$ [mg · ml <sup>-1</sup> ]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
$A$ ( $\lambda=595$ nm)	0	0,11	0,40	0,49	0,74	0,91	0,97



*Kalibrační přímka závislosti koncentrace proteinu na absorbanci vzorku při vlnové délce 595 nm.*