

45

**Univerzita Karlova v Praze**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**Cílená mutagenese regulátoru G proteinové signalizace**  
**RGS3**

**Bakalářská práce**

Biochemie

Školitel: RNDr. Tomáš Obšil, PhD.

Garant: Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

Praha 2007

Lenka Řežábková

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli vypracovat tuto bakalářskou práci.

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. a doktorandovi Mgr. Evženu Bouřovi za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, věnovaný čas a energii, které mi během mé práce poskytli.

Děkuji svému garantovi Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za pečlivou korekturu mé práce.

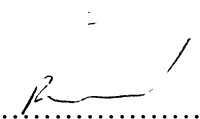
Děkuji ostatním studentům a pracovníkům naší laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji svým rodičům za jejich podporu a všestrannou pomoc, kterou mi poskytují po celou dobu mého studia.

## Prohlášení

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

V Praze dne 5. 6. 07 .....



.....

Lenka Řežábková

## Seznam použitých zkratek

A	alanin
ATP	adenosin trifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
BamH I	restrikční enzym
BL21 (Rosseta)	kmen bakterií <i>E.coli</i>
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
Da, kDa	dalton, kilodalton
DEAE	diethylaminoethyl
DH5 $\alpha$	kmen bakterií <i>E.coli</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	směs nukleotidů dATP, dTTP, dCTP, dGTP
Dpn I	restrikční enzym
ds	dvojvláknová („double stranded“)
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F	fenylalanin
$G_{\alpha}$ , $G_{\beta}$ , $G_{\gamma}$	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ podjednotka G proteinu
GAP	GTPase activating protein
GDP	guaninnukleotid difosfát
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
GPCR	G protein coupled receptor
GTP	guaninnukleotid trifosfát
His-tag	motiv šesti histidinů za sebou
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfát
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D- thio-galaktopyranosid
LB	médium dle Luria-Bertaniho
MAPK	mitogen activated protein kinase

MCO	Molecular cut off
Nde I	restrikční enzym
P	prolin
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
pET-15b	komerčně dostupný plasmid
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PKA	protein kinasa A
PKC	protein kinasa C
pS	fosforylovaný serinový zbytek
R	arginin
RGS	regulátor G proteinové signalizace
rpm	otáčky za minutu
S	serin
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS - polyakrylamidová gelová elektroforéza
ss	jednovláknová („single stranded“)
TEMED	N,N,N',N' - tetrametyletylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymetyl)-aminometan
U	unit, tj. jednotka katalické aktivity
W	tryptofan
W295F	mutace tryptofanu na pozici 295 na fenylalanin
W391F	mutace tryptofanu na pozici 391 na fenylalanin
wt	wild type
X	libovolná aminokyselina

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	4
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>9</b>
2.1 G proteinová signální dráha.....	9
2.2 RGS.....	9
2.2.1 RGS3.....	11
2.3 14-3-3 proteiny.....	12
2.4 Vazba RGS3 s 14-3-3 proteinem.....	13
<b>3 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>15</b>
<b>4 MATERIÁLY A METODY.....</b>	<b>16</b>
4.1 Použitý materiál.....	16
4.1 Chemikálie.....	16
4.1 Přístroje.....	17
4.1 Ostatní materiál.....	17
4.2 Plasmid.....	18
4.3 Kultivace bakterií.....	18
4.3.1 Příprava LB média.....	18
4.3.2 Příprava LB agarových misek.....	19
4.4 Skladování bakterií.....	19
4.5 Expresní systém.....	19
4.6 Izolace plasmidové DNA.....	20
4.7 PCR.....	20
4.8 Štěpení pomocí restrikčního enzymu Dpn I.....	22
4.9 Transformace bakterií.....	23
4.10 SDS-PAGE.....	23
4.11 Sonikace.....	24
4.12 Niklová afinitní chromatografie.....	25
4.13 Dialýza.....	26
4.14 Gelová filtrace.....	26
4.15 Zakoncentrování roztoků proteinů.....	27

4.16 Fosforylace proteinů.....	27
4.17 Nativní elektroforéza.....	28
<b>5 VÝSLEDKY.....</b>	<b>29</b>
5.1 Příprava RGS3 mutantů W295F a W391F.....	29
5.2 Expresní test.....	30
5.3 Purifikace proteinů.....	31
5.3.1 Exprese.....	31
5.3.2 Afinity ní niklová chromatografie.....	31
5.3.3 Gelová filtrace.....	32
5.4 Test interakce RGS3 (isoforma 1) a 14-3-3 $\zeta$ proteinu.....	34
<b>6 DISKUSE.....</b>	<b>36</b>
<b>7 ZÁVĚR.....</b>	<b>39</b>
Seznam citované literatury.....	40

# 1 Úvod

Všechny buňky přijímají a odpovídají na signály z okolí. Dokonce i ty nejjednodušší bakterie plavou k místu s vysokou koncentrací potravy jako je glukóza či aminokyseliny. Mnoho jednobuněčných eukaryot odpovídá na signální molekuly vylučované ostatními buňkami, což umožňuje mezibuněčnou komunikaci. U mnohobuněčných organismů dosahuje tato komunikace nejvyšší úrovně. Zatímco prokaryotické a jednobuněčné eukaryotické organismy jsou do značné míry samostatné, chování každé individuální buňky v mnohobuněčných rostlinách a živočiších musí být regulováno, aby organismus mohl fungovat jako celek. To je doprovázeno sekrecí a exprimováním mnoha signálních molekul a jejich navázáním na receptory jiné buňky, čímž je umožněna koordinace funkcí mnoha individuálních buněk, které pak vytváří organismus tak komplexní jako je lidská bytost. Buněčná signalizace je základem vývoje, opravy tkání a imunity stejně jako normální tkáňové homeostáze. Chyby ve zpracování informací jsou zodpovědné za nemoci jako je rakovina, diabetes a mnoho dalších [1].

Buněčná signalizace vyžaduje nejen extracelulární signální molekuly, ale také komplementární proteinové receptory. Některé malé hydrofobní signální molekuly jako steroidy či thyroïdní hormony difundují skrze plasmatickou membránu cílové buňky a aktivují intracelulární receptorové proteiny, které přímo regulují transkripci specifického genu. Některé rozpuštěné plyny jako oxid dusný nebo oxid uhelnatý se chovají jako místní přenašeče tím, že difundují skrze plasmatickou membránu cílové buňky a aktivují intracelulární enzymy, nejčastěji guanylát cyklastu, která v cílové buňce začne vytvářet cGMP. Většina extracelulárních signálních molekul je ale hydrofilních a může tudíž aktivovat pouze proteinové receptory na povrchu cílové buňky, které pak přenesou signál přes membránu [2].

Signální dráhy se skládají z velkého množství molekul, které mohou být dále regulovány rozmanitými sloučeninami. Mezi velmi významné signální dráhy patří tzv. G proteinová signální dráha, jejíž činnost je ovlivňována mimo jiné regulátory G proteinové signalizace (RGS) a právě tyto proteiny společně s mnoha dalšími jsou studovány v naší laboratoři. Hlavním cílem této práce je příprava mutantních verzí RGS3 proteinu, jejich purifikace a zkouška vazby s 14-3-3 proteinem.



## 2 Literární přehled

### 2.1 G proteinová signální dráha

G proteinová signální dráha je nezbytná pro všechny aspekty buněčné a orgánové fyziologie. Její součástí jsou GPCRy (G protein coupled receptors) spojené s  $G_\alpha$  podjednotkou heterotrimérního G proteinu (guanine nukleotide-binding protein) a signál generující efekty. Byly identifikovány stovky GPCRy, všechny ale vykazují shodnou topologii - sedm transmembránových  $\alpha$ -helixů. G proteiny se skládají z  $G_\alpha$ ,  $G_\beta$  a  $G_\gamma$  podjednotky, kde  $G_\alpha$  je schopna vázat guaninové nukleotidy.

Navázáním ligandu jako je např. adrenalin, noradrenalin, histamin, serotonin nebo parathormon na GPCRy dojde k jejich konformační změně, čímž je aktivován G protein. Aktivace způsobí uvolnění GDP z  $G_\alpha$  podjednotky a jeho výměnu za GTP. Navázání GTP dále způsobí konformační změny G proteinu, které vyústí disociací  $G_{\beta,\gamma}$  podjednotky. Deaktivace vyžaduje hydrolýzu GTP, čímž se posune rovnováha ve prospěch opětovného spojení podjednotek a tak dojde k přerušení přenosu signálu [3].

Objev a popis vlastností přenosu signálu pomocí heterotrimérního G proteinu ukázal, že vlastní GTPasová aktivita  $G_\alpha$  podjednotky *in vitro* je výrazně nižší než rychlost deaktivace některých signálů zprostředkovaných G proteiny *in vivo*. Tento paradox poukázal na to, že se procesu deaktivace účastní ještě další faktory. Byla popsána nová rodina proteinů, RGS proteiny, která reguluje G proteinovou signalizaci a to tím, že se přímo váží na aktivovanou  $G_\alpha$ -GTP podjednotku a tak urychlují hydrolýzu GTP. Slouží tedy jako GAPs (GTPase-activating proteins), jsou limitující pro životnost  $G_\alpha$ -GTP a ukončují přenos signálu [4,5].

### 2.2 RGS

Regulátory G proteinové signalizace (RGS) jsou součástí poměrně velké skupiny GAPs (GTPase activating proteins) proteinů pojmenovaných podle své schopnosti urychlovat GTPasovou aktivitu, a tudíž deaktivovat  $G_\alpha$  podjednotku.

RGS proteiny byly objeveny díky genetickým studiím GPCR signálních drah prováděných v modelových organismech. Velký význam těmto proteinům začal být přikládán v roce 1996, kdy bylo na základě sekvenčních homologií s konzervovanou 120 aminokyselinovou doménou v Sst2 proteinech *Saccharomyces cerevisiae* a EGL-10 proteinech *Caenorhabditis elegans*, identifikováno kolem 20 členů RGS proteinů u savců [6,7].

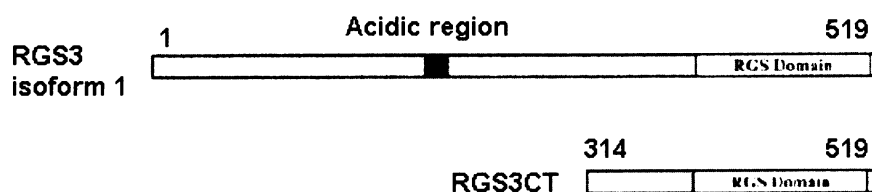
Dnes je známo více než 30 savčích členů RGS rodiny, přičemž všechny obsahují vysoce konzervovanou doménu (RGS doména), která specificky interaguje s aktivovanou formou  $G_{\alpha}$  podjednotky. Vně RGS domény jsou jednotlivé členové RGS rodiny strukturně odlišné a mohou obsahovat další domény, které ovlivňují jejich cíl v buňce nebo vytvoření signálního komplexu, popř. obojí. Přestože některé RGS proteiny obsahují pouze RGS doménu, existují i členové obsahující další domény, které slouží k navázání rozmanitých signálních molekul. V minulých letech bylo zodpovězeno mnoho otázek týkajících se způsobu, jakým RGS ovlivňuje funkci  $G_{\alpha}$  podjednotky. Nicméně stále zůstává mnoho nejasností v otázce selektivity, s jakou si jednotliví členové RGS vybírají typ  $G_{\alpha}$  podjednotky, kterou regulují. Vezmeme-li v úvahu, že je známo zhruba 20  $G_{\alpha}$  podjednotek a kolem 30 členů RGS rodiny, pak není překvapivé, že první spekulace předpovídaly, že  $G_{\alpha}$  a RGS tvoří konkrétní funkční páry. Přestože některé podrodiny RGS se opravdu selektivně váží na konkrétní třídu  $G_{\alpha}$  podjednotky (např. p115RhoGEF a  $G_{\alpha,12/13}$  [8]), tak je to spíše výjimka. Většina RGS proteinů je schopna vázat větší množství  $G_{\alpha}$ . Otázkou tedy zůstává jak přesně si RGS v živých organismech vybírá  $G_{\alpha}$ , na kterou se naváže [shrnuto v 9].

Podle distribuce RGS proteinů do tkání by se tato rodina dala rozdělit na několik tříd. Jedna z nich obsahujících například RGS12 se vyskytuje v mnoha tkáních, dá se tedy předpokládat, že jejich funkce je zcela obecná [10]. Naopak jiní členové se specificky vyskytují v určité tkáni a mohou tudíž mít zcela specifickou funkci, např. exprese RGS9 v retině nejspíše odráží jeho roli při přenosu signálu zprostředkovaného rhodopsinem [11].

Rozdílná distribuce RGS proteinů v rámci buňky je dána strukturními odlišnostmi, které však nevypadají, že by nějakým způsobem ovlivňovaly jejich funkci jako GAPs. RGS proteiny se mohou vyskytovat v jádře, cytoplazmě nebo mohou mezi těmito lokalizacemi přecházet a chovat se jako člunkové proteiny [12].

### 2.2.1 RGS3

Všeobecně můžeme RGS proteiny rozdělit na dvě skupiny: ty co se skládají především z RGS domény jako jsou RGS1, RGS2, RGS4, RGS5 a ty co navíc obsahují další domény. Do této skupiny patří např. RGS6, RGS7, RGS9, RGS11, RGS12, RGS14. RGS3 existuje v několika isoformách a může tudíž spadat do obou skupin. Mezi kratší verze obsahující především RGS doménu patří např. RGS3CT, mezi delší isoformy obsahující navíc kyselou oblast patří RGS3 (isoforma 1) (viz. Obr.2.1). Obě isoformy mají GTPasovou aktivitu pro  $G_{\alpha,i}$  a  $G_{\alpha,q}$  [13,14].



**Obr 2.1:** Schéma krátké a dlouhé isoformy (isoforma 1 a RGS3CT) [13].

Mapování exonů odhalilo, že RGS doména, vysoce konzervovaná mezi všemi členy RGS rodiny, je kódovaná třemi exony, zatímco N-koncová doména specifická pro RGS3 je kódována pouze jedním [15]. RGS3 je lokalizován především v cytoplasmě (není navázán na plasmatickou membránu), translokace na plasmatickou membránu probíhá až po aktivaci G proteinu [16].

Stále nebyl přesně ukázán mechanismus regulace RGS3 proteinů. Zkoumání G proteinové signalizace v neuronech ukázalo velmi rychlou terminaci či oslabení přenosu signálu pokud se do buňky skrz napětově řízené kanály dostalo velké množství vápenatých iontů. Rychlé oslabení přenosu signálu je nejspíše způsobeno vazbou vápenatých iontů na RGS3, neboť delece EF-hand domény v RGS3 eliminovala jak oslabení signálu, tak vazbu vápenatých iontů na RGS3. To znamená, že vzestup koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky může být dalším regulačním způsobem G proteinové signalizace [17].

Jedna ze studií ukázala, že RGS3 mimo regulace  $G_\alpha$  podjednotky G proteinu ovlivňují i  $G_{\beta,\gamma}$  signalizaci. RGS3 je schopné potlačit  $G_{\beta,\gamma}$  aktivaci MAPK (mitogen activated protein kinase) dráhy a k úplné inhibici vyžaduje sekvence 314-390 a 391-458, tzn. jak N-koncovou, tak RGS doménu [13]. V jiné studii autoři poukazují na možnost účasti RGS3 proteinu v regulaci GnRH (gonadotropin-releasing hormone). Exprese RGS3 v buňce může potlačit produkci  $IP_3$ , která je indukovaná právě GnRH, až o 75% [18]. Jednotlivé studie dokazují, že funkce RGS3 proteinu jsou velmi rozmanité a na to, aby jim bylo zcela porozuměno je třeba dalších výzkumů.

### 2.3 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou hojně se vyskytující sloučeniny, které se podílejí na mnoha biologicky důležitých procesech. Je to vysoce konzervovaná skupina proteinů vyskytující se v eukaryotických buňkách. U savců se vyskytuje nejméně 7 isoform -  $\beta, \gamma, \epsilon, \sigma, \zeta, \tau, \eta$ . Fosforylované formy  $\beta$  a  $\zeta$  byly zpočátku popsány jako isoformy  $\alpha$  a  $\delta$  [19]. U rostlin bylo objeveno 15 isoform [20]. 14-3-3 proteiny poprvé identifikovali vědci Moore, B.W. a Perez, V.J. v roce 1967 jako výhradně mozkové, kyselé proteiny. Byly pojmenovány podle čísla, které měla frakce při separaci pomocí dvoudimensionální DEAE-celulosové chromatografie a škrobové elektroforézy [shrnuté v 21].

Doposavad bylo identifikováno okolo 300 proteinů vázajících se na 14-3-3. Mezi významné vazebné partnery patří protein kinasy (např. PKC [22]), fosfatázy (např. Cdc25A [23]), receptory, G proteiny a s nimi spojené proteiny (např. RGS3 [24]), enzymy podílející se na syntéze neuropřenašečů (např. serotonin N-acetyltransferáza [25]) a mnoho dalších.

Příčinou rozmanitosti vazebných partnerů je hlavně charakteristická fosfoserinová/fosfothreoninová vazebná aktivita [26]. Analýza známých vazebných míst 14-3-3 společně s využitím peptidových knihoven umožnila definovat dva vysoce afinitní fosforylačně-dependentní vazebné motivy, které jsou rozeznávány všemi isoformami 14-3-3: RSXpSXP a RXYpSXP, kde X značí libovolnou aminokyselinu a pS fosforylovaný serinový zbytek [27,28].

14-3-3 proteiny tvoří hetero- i homodimery [29]. Vyřešená krystalická struktura pro isoformy  $\tau$  a  $\zeta$  ukázala, že každý monomer se skládá z devíti antiparalelních  $\alpha$ -helixů (viz. Obr. 2.2), uspořádaných do N-terminální a C-terminální domény. Dimer

vytváří značně negativně nabitý kanál. Ty oblasti 14-3-3 proteinu, které jsou shodné pro všechny isoformy lemují vnitřek kanálu, zatímco variabilní zbytky se nacházejí na povrchu proteinu [30]. Každý dimer obsahuje dvě vazebná místa pro své partnery a může tedy simultánně interagovat se dvěma motivy, které mohou být součástí jednoho či více vazebných partnerů [25,27,28].



*Rittinger a kol. (1999) Mol. Cell 4, 153-166.*

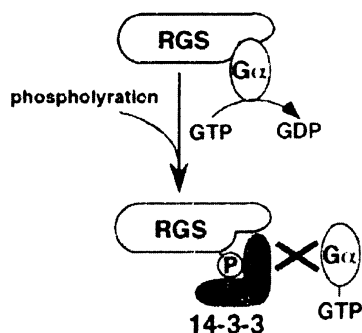
*Obr. 2.2: Schéma struktury dimerní formy 14-3-3 proteinu.*

## 2.4. Vazba RGS3 s 14-3-3 proteinem

RGS3 patří do skupiny regulátorů G proteinové signalizace (RGS), která se váže na  $G_{\alpha}$  podjednotku heterotrimerního G proteinu skrze homologní RGS doménu. Nicméně, RGS proteiny jsou schopné interagovat i s dalšími molekulami, např. s fosfoserinovým vazebným místem 14-3-3 proteinu. RGS3 obsahuje jedno vazebné místo pro 14-3-3, které se nachází mimo RGS doménu – S(264). S(264)A mutace vyústila ve ztrátu schopnosti vazby RGS3 na 14-3-3, zatímco schopnost vazby na  $G_{\alpha}$  podjednotku byla zachována. Vazebné experimenty ukázaly, že RGS3 existuje ve dvou oddělených formách, jednak vázaný na 14-3-3 nebo vázaný na G protein a že RGS3 navázaný na 14-3-3 není schopný interagovat s G proteinem. Toto ukazuje na další možnou regulaci G proteinové

signalizace, kdy inhibitory G proteinů, RGS proteiny, jsou samy regulovány fosforylací a vazbou na 14-3-3 (viz. Obr.2.3) [31,32].

Studie ukázala, že nezbytnou podmínkou vazby RGS3 s 14-3-3 je jeho fosforylace. Pokud byl ke zkoumaným buňkám přidán staurosporin (širokospektrý inhibitor protein kinas, který zabránil fosforylaci RGS), nedošlo k téměř žádné vazbě mezi RGS3 a 14-3-3 [33].



**Obr. 2.3:** Regulace RGS pomocí fosforylace a vazby s 14-3-3 proteinem [34].

## 3 Cíl práce

### Hlavním cílem této bakalářské práce bylo:

- Pomocí cílené mutagenese vnést do sekvence DNA kódující regulátor G proteinové signalizace RGS3 (isoforma 1) fenylalaninový zbytek namísto tryptofanového
  - na pozici 295
  - na pozici 391
- Ověřit expresi připravených RGS3 mutantů W295F, W391F a provést porovnání s RGS3 wt.
- Purifikovat RGS3 mutanty W295F, W391F a RGS3 wt.
- Pomocí PKA *in vitro* fosforylovat RGS3 mutant W295F, W391F a RGS3 wt.
- Provést test vazby fosforylovaného a nefosforylovaného RGS3 mutantu W295F, W391F a RGS3 wt s 14-3-3 $\zeta$  proteinem.

# 4 Metody a materiál

## 4.1 Použitý Materiál

### 4.1.2 Chemikálie

- agar - Carl Roth GmbH, Německo
- agarosa - Carl Roth GmbH, Německo
- akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo
- ampicilin - Sigma, USA
- ATP - Sigma, USA
- bacto trypton (pepton) - Carl Roth GmbH, Německo
- bacto yeast extract (kvasniční extrakt) - Carl Roth GmbH, Německo
- bis-akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo
- bromfenolová modř - Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 - Lachema a.s, ČR
- dihydrogenfosforečnan draselný - Lachema a.s, ČR
- DTT (dithiotreitol) - Carl Roth GmbH, Německo
- EDTA - Sigma, USA
- etanol - Lachema a.s., Neratovice
- glycerol - Lachema a.s., Neratovice
- glycin - Carl Roth GmbH, Německo
- hydrogenfosforečnan sodný - Lachema, ČR
- chlorid draselný - Lachema a.s, ČR
- chlorid hořečnatý - Lachema a.s, ČR
- chlorid sodný - Carl Roth GmbH, Německo
- imidazol - Carl Roth GmbH, Německo
- IPTG - Sigma, USA
- isopropylalkohol - Sigma, USA
- kyselina boritá - Lachema a.s, ČR
- kyselina chlorovodíková - Lachema a.s., Neratovice
- kyselina octová - Lachema a.s., Neratovice
- kyselina octová - Lachema a.s, ČR
- methanol - Lachema a.s., Neratovice
- NP40 - Sigma, USA
- persulfát amonný - Sigma, USA
- SDS - Sigma, USA



- síran nikelnatý - Penta, ČR
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) - Carl Roth GmbH, Německo
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) - Carl Roth GmbH, Německo
- trypton - Carl Roth GmbH, Německo
- β-merkapt ethanol - Carl Roth GmbH, Německo

#### 4.1.2 Přístroje

- centrifuga - pro koncentrování proteinů – Eppendorf 5804R, rotor A-4-44
- centrifuga - pro mikrozkušavky – MPW 52, rotor no. 11 3271
- centrifuga - rotor GSA a SS34 – Sorval RC-5B, DuPont Instruments
- elektroforesa pro SDS - BioRad, Itálie
- chromatografie - HPLC-AKTA, Amersham Biosciences, USA
- iluminátor - UVT-14M, Herolab
- laboratorní váhy - HF-200g, AND, USA
- magnetická míchačka MM 2A - Lab.přístroje Praha, ČR
- peristaltická pumpa - Stavebnicové čerpadlo SC4, Vývojové dílny ČSAV
- pH metr - JenWay 3505, Felsted Velká Británie
- přístroj pro PCR - Hybaid – PCR Express, USA
- sonikátor - Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA
- termostat BT 120M - Lab.přístroje Praha, ČR
- třepačka - Orbital Incubator, Gallenkamp
- UV-Vis absorpční spektrofotometr - Agilent 8453
- vodní lázeň – Memmert, Velká Británie
- vortex - Zx3, Velp Scientifica, Itálie
- zdroj pro elektroforesu - Consort E143, Belgie

#### 4.1.3 Ostatní materiál

- dialyzační membrána - MCO (Molecular weight cut off) 14000 - Roth, Německo
- DNA primery - VBC-Genomics, Rakousko
- Dpn I - New England Biolabs, USA
- E.coli BL21 (Rosseta) - Stratagene, USA
- E.coli DH α - Stratagene, USA
- filtry 0,45μm - Whatmann Internation Ltd, Velká Británie
- injekční stříkačky pro nános a filtraci roztoků proteinu - Chirana T. Injecta a.s., SR
- Jetquick Plastid Miniprep spin kit - Genomed, USA
- laboratorní sklo – Simax, ČR
- lysozym - New England BioLabs, USA
- mikrozkušavky - Axygen Scientific Inc., USA

- náplně do kolon a kolony - Amersham Biosciences, USA
- vektor - pET-15b - Invitrogen, USA
- petriho misky - Gama Group a.s., Trhové Sviny
- pipeta 25 µl pro nanášení vzorků na elektroforézu - Hamilton Co, USA
- pipety – Eppendorf, Německo
- PKA - Promega, USA
- Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit - Stratagene, USA
- rukavice - Beromed GmbH Hospital Products, Německo
- standard molekulových vah - Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, USA
- špičky pro pipety - INSET, Praha
- zdroj deionizované vody Milli Q - Millipore, USA

## 4.2 Plasmid

Pro pokusy byl využit vektor pET-15b, ve kterém byl gen kódující RGS3 (isoforma 1) zaklonován mezi restrikční místa pro endonukleázy Nde I a BamH I.

Plasmid pET-15b umožňuje produkci proteinu našeho zájmu jako fuzního proteinu s „His-tagem“. Jako „His-tag“ je označován motiv šesti histidinů za sebou, který umožňuje jako jeden z purifikačních kroků využít niklovou afinitní chromatografii. Žádaný protein navíc obsahuje štěpné místo pro proteasu thrombin, která umožňuje odštěpení „His-tagu“.

Použitý plasmid pET-15b nese gen s resistencí vůči antibiotiku ampicilin.

## 4.3 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány na pevném LB agaru nebo v tekutém LB médiu, při 37 °C přes noc v termostatu nebo třepačce (konstantní třepání 190 rpm). Použitý plasmid pET-15b nese gen s resistencí vůči antibiotiku ampicilin, který byl přidáván jak do LB agaru tak do tekutého LB média, tak aby jeho finální koncentrace byla 100 µg/ml.

### 4.3.1 Příprava LB média

Směs 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl byla doplněna do 1 l destilovanou vodou a pH bylo upraveno na 7,4. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu.

### 4.3.2 Příprava LB agarových misek

Směs 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl, 20 g agaru byla doplněna do 1 l destilovanou vodou. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu. Po sterilizaci a ochlazení byl přidán 1 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. LB agar byl nalit na Petriho misky (cca 15 ml na 1 misku).

### 4.4 Skladování bakterií

Bakterie na Petriho miskách, zabezpečené proti vyschnutí, byly krátkodobě skladovány při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování byly čerstvě narostlé bakterie v živném bujónu smíchány se sterilním glycerolem do výsledné koncentrace 30% a skladovány v -80 °C.

### 4.5 Expresní systém

Expres proteinu byla prováděna v bakteriálním expresním systému: kmen bakterií *E.coli* BL21 (Rosseta). BL21 (Rosseta) je speciální kmen bakterií *E.coli* vhodný pro dlouhodobé uchování a efektivní expresi proteinů umožňující indukci pomocí IPTG. IPTG je induktor exprese rekombinantních proteinů a po jeho přidání k bakteriální kultuře transformované vektorem pET-15b obsahující oblast kódující jeden z RGS3 mutantů W295F, W391F nebo wt došlo ke spuštění proteosyntézy rekombinantního proteinu.

1 kolonie bakterií byla přenesena pomocí sterilního očka do 5 ml LB media. Bakterie byly v médiu inkubovány přes noc při 37 °C a konstantního třepání (190 rpm) a následně z nich bylo přeneseno 200 µl (resp. 5 ml) bakteriální kultury do 5 ml (resp. 1 l) LB média a zde se bakterie pěstovaly do té doby, než dosáhly optické density 0,7-0,8 (měřeno při 600 nm). Poté byly bakterie indukovány pomocí IPTG (finální koncentrace 1 mM). Po jeho přidání k bakteriální kultuře došlo ke spuštění proteosyntézy rekombinantního proteinu. Bakteriální kultura byla inkubována přes noc na třepáčce (190 rpm) při 37 °C v případě 5 ml bakteriální kultury nebo při pokojové teplotě v případě 1 l buněčné kultury.

## 4.6 Izolace plasmidové DNA

Plasmid je kruhová dsDNA, vyskytující se především v bakteriích, schopná autonomní replikace. Použitý plasmid pET-15b nese gen s resistencí vůči antibiotiku ampicilin.

Plasmidová DNA byla izolována z bakterií *E.coli* kmene DH5 $\alpha$ , které byly inkubovány při 37°C v 5 ml LB media po dobu cca 16 hodin. K izolaci byl využit Jetquick Plastid Miniprep spin kit (Genomed, USA) a bylo postupováno podle instrukcí výrobce.

Stručně shrnuto, z narostlé buněčné kultury byla pomocí centrifugace vytvořena peleta, která byla následně resuspendována v roztoku G1 obsahující RNAasu, která štěpí přítomnou RNA. Dále byly v několika krocích pomocí roztoků G2, G3 a G4 a centrifugace odstraněny nečistoty. V posledním kroku bylo využito afinitní chromatografie. Plasmidová DNA byla z kolony eluována pomocí TE pufru zahřátého na 80 °C.

### Složení roztoků

- G1: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNAsa H
- G2: 200 mM NaOH, 1% SDS
- G3: acetát sodný, guanidin hydrochlorid
- G4: ethanol, NaCl, EDTA, Tris/HCl
- TE: 10 mM Tris (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

## 4.7 PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) je enzymaticky řízená reakce, kdy dochází k amplifikaci určitého úseku DNA. Jde vlastně o replikaci DNA in vitro. Tato metoda je běžně využívána v laboratořích k určování dědičných nemocí, diagnostice infekčních nemocí, určování otcovství, klonování, mutagenesím atd.

Pro praktické provedení PCR reakce potřebujeme: templátovou DNA obsahující segment, který chceme amplifikovat (zmnožit); primery určující počátek a konec úseku, který bude amplifikován; DNA polymerasu syntetizující komplementární vlákno podle templátové DNA; dNTP, ze kterých DNA polymerasa syntetizuje nově vznikající vlákno; reakční pufr zajišťující optimální reakční prostředí a vodu.

DNA polymerasa syntetizuje nové vlákno ve směru 5' → 3', není schopna vytvořit vlákno „*de novo*“, ale pouze připojovat dNTP k volnému 3' konci vznikajícího vlákna, proto jsou součástí reakční směsi uměle nasyntetizované oligonukleotidy, tzv. primery, které nasedají na komplementární úsek templátové DNA a na jejich volné 3' konce pak DNA polymeráza připojuje dNTP.

PCR reakce probíhá v termocykleru ve třech opakujících se krocích. V prvním kroku je teplota zvýšena na 94-96 °C a dochází k denaturaci DNA, tzn. k separaci řetězců dsDNA. Ve druhém kroku dojde ke snížení teploty na 45-65 °C, což je teplota, kdy dochází k annealingu (nasednutí) primerů na komplementární úsek templátové ssDNA. Ve třetím kroku je teplota opět zvýšena na 70-74 °C, kdy probíhá elongace (prodlužování řetězce). Tyto tři kroky se opakují 20-30x, tak aby došlo k syntéze požadovaného množství DNA. Množství amplifikovaného úseku roste geometrickou řadou, konečný produkt tudíž obsahuje velké množství požadovaného segmentu DNA a pouze velmi malé množství templátové DNA.

PCR reakce byla využita pro provedení bodové mutace tryptofanu (W) 295 a 391 na fenylalanin (F). Nejdříve byly navrhnuty vhodné primery. Zvolené oligonukleotidy obsahovaly 33 nukletidů, nebyly však komplementární k templátové DNA v celém úseku, ale záměrně byla pozměněna sekvence tak, aby triplet kódující tryptofan byl nahrazen tripletem kódujícím fenylalanin.

### **Použité primery (VBC – Genomics, Rakousko)**

RGS W295F/1

5' ggc gcc gcc tcc acc **ttc** ggc atg cct tcg ccc 3'

RGS W295F/2

5' ggg cga agg cat gcc **gaa** ggt gga ggc gcc gcc 3'

RGS W391F/1

5' gag gaa gcc ctc aag **ttc** ggc gag tcc ttg gag 3'

RGS W391F/2

5' ctc caa gga ctc gcc **gaa** ctt gag ggc ttc ctc 3'

Pro namíchání PCR reakční směsi byly použity chemikálie ze sady Quick Change<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA)

**PCR reakční směs** obsahovala:

4  $\mu$ l primer W295F/1 (resp. W391F/1)

4  $\mu$ l primer W295F/2 (resp. W391F/2)

3  $\mu$ l dNTP

5  $\mu$ l reakční pufr

1  $\mu$ l Pfu DNA polymerasa

31  $\mu$ l ultračistá voda

Složení reakčního pufru: 0,1 M KCl; 0,1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,02 M  $\text{MgSO}_4$ ; 1% Triton-X-100; 1 g/dm<sup>3</sup> BSA

PCR reakce proběhla v termocykleru (Hybrid – PCR Express, USA). **Program PCR reakce** byl nastaven následovně:

1.fáze – 95 °C, 30 s

2.fáze – 51 °C, 60 s

3.fáze – 68 °C, 12 min

Tyto tři fáze se opakovaly 20x a následně se teplota snížila na 4 °C až do doby, kdy byl produkt ze cycleru vyjmut.

#### **4.8 Štěpení pomocí restrikčního enzymu Dpn I**

Výsledný produkt PCR reakce obsahoval velké množství mutované DNA a malé množství původní templátové DNA, kterou bylo nutno odstranit. Toho bylo docíleno štěpením pomocí restrikčního enzymu Dpn I, který specificky štěpí methylovanou DNA, a protože templátová DNA vznikla v bakteriích je na rozdíl od mutované DNA vzniklé PCR reakcí methylována. K PCR produktům byly přidány 2  $\mu$ l Dpn I a směs byla inkubována 2 hod při 37 °C.

## 4.9 Transformace bakterií

Transformace je proces, při kterém dochází k horizontálnímu přenosu genetické informace z donorového kmene bakterií do kompetentních buněk. V laboratorní praxi se k transformaci využívá metody teplotního šoku („*heat shock*“), kdy jsou bakterie ponořeny na 45 sekund do lázně o teplotě 42 °C a následně vloženy na 2 minuty do ledu.

Ke 100 µl kompetentních buněk DH5α (JM109) nebo 20 µl BL21 (Rosseta) bylo přidáno 10 µl, resp. 1 µl PCR produktu a směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byla směs ponořena na 45 s do lázně o teplotě 42 °C a následně vložena na 2 minuty do ledu. Dále bylo přidáno 400 µl LB média. Směs byla inkubována při 37 °C za konstantního třepání (190 rpm, 1 hod) a následně vynesena na 2 Petriho misky obsahující LB médium a ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml. Misky byly umístěny do inkubátoru o teplotě 37 °C a zde inkubovány přes noc. Protože plasmid použitý jako vektor nese gen s rezistencí vůči ampicilinu, na Petriho miskách narostly pouze ty bakterie, které tento plasmid úspěšně přijaly.

## 4.10 SDS-PAGE

Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecyl sulfátu sodného (SDS) je elektromigrační metoda využívající pohybu nabitých částic v elektrickém poli. SDS je aniontový detergent, který se na proteiny váže v konstantním poměru, čímž jim udává jednotný záporný náboj. Proteiny tedy putují od katody k anodě v závislosti na své velikosti, menší molekuly se pohybují rychleji.

Pro pokusy byl použit 5% zaváděcí a 15% separační gel. Elektroforéza byla prováděna za konstantního napětí 200 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí obarvení roztokem Coomassie Brilliant Blue R250. Velikost proteinů byla určena porovnáním s vhodně zvoleným standardem.

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

- Separací gel (12%): 3 ml akrylamid/bis-akrylamid; 2,5 ml pufr pro separační gel; 2,6 ml voda; 45 µl 10% persulfát amonný; 5 µl TEMED

- Zaváděcí gel: 0,5 ml akrylamid/bis-akrylamid; 1 ml pufr pro zaváděcí gel; 2,25 ml voda; 45  $\mu$ l 10% persulfát amonný; 5  $\mu$ l TEMED
- Akrylamid/bis-akrylamid: 29,2 g akrylamid; 0,8 g bis-akrylamid, voda do 100 ml
- Pufr pro separační gel: 75 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml voda
- Pufr pro zaváděcí gel: 50 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml voda
- Pufr pro přípravu vzorků (5x koncentrovaný): 0,6 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8); 5 ml 50% glycerol; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml  $\beta$ -merkaptoethanol; 1 ml 10% bromfenolová modř; 0,9 ml voda
- Pufr pro elektroforézu: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3); 385 mM glycin; 0,1% SDS
- Barvicí roztok: 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 450 ml methanol; 100 ml ledová kyselina octová; 450 ml voda
- Odbarvovací roztok: 100 ml methanol; 100 ml ledová kyselina octová; 800 ml voda
- Standard molekulových vah: Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad; obsahuje směs fragmentů 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa.

#### 4.11 Sonikace

Sonikace patří mezi základní mechanické techniky, která slouží k rozrušování buněk a tkání a využívá k tomu ultrazvuku. Před samotnou sonikací byla peleta získaná z 1 l bakteriální kultury resuspendována v 25 ml lyzovacího pufru a dále inkubována s lysozymem (finální koncentrace 100  $\mu$ g/ml, 1 hod, 4 °C, konstantní míchání). Lysozym je enzym štěpící peptidoglykany tvořící buněčnou stěnu bakterií.

Při sonikaci bylo nutno kádinku s bakteriální kulturou neustále chladit (byla vložena do misky s ledem) a sonikaci přerušovat – 2 min sonikace, 3 min pauza, aby nedošlo k zahřátí vzorku. Celkový čas čisté sonikace byl 30 min. Poté byl vzorek stočen (1 hod, 4 °C, 13500 rpm, rotor SS34) a pro následnou purifikaci byl použit supernatant obsahující proteinové frakce.

Složení lyzovacího pufru: 1x PBS; 1 M NaCl; 4 mM  $\beta$ -merkaptoethanol; 2 mM imidazol; 0,05% NP40

Složení 10x PBS: 1,36 M NaCl; 27 mM KCl; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>



## 4.12 Niklová afinitní chromatografie

Chromatografické metody jsou založeny na postupném rozdělování složek směsi mezi dvě fáze – mobilní a stacionární. Při afinitní chromatografii dochází ke specifické interakci mezi izolovanou látkou a ligandem kovalentně navázaným na povrch nosiče.

Niklová afinitní chromatografie se využívá k separaci látek obsahujících motiv šesti histidinů, tzv. „His-Tag“.

Pro niklovou afinitní chromatografii byla použita kolona obsahující chelatující sepharosovou matici (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla nejdříve promyta. Při promytí kolony došlo k navázání  $\text{Ni}^{2+}$  iontů na sepharosu. Nyní bylo možno na kolonu aplikovat roztok proteinu. Mezi imidazolové zbytky histidinů a  $\text{Ni}^{2+}$  ionty se vytvořily koo:rdinační vazby. Nespecificky vázané proteiny byly z kolony vymyty pomocí 300 ml 10% pufru F v E obsahující imidazol o koncentraci 0,06 M. Následně na koleně zůstal především protein obsahující „His-Tag“, který byl eluován pomocí 20 ml pufru F. Frakce byly jímány do připravených mikrozkušavek. Obsah proteinu v jednotlivých frakcích a jeho čistota byl zkontrolován pomocí SDS-PAGE.

Průtok nanášených roztoků na kolonu byl zajištěn peristaltickou pumpou o objemovém průtoku 3 ml/min. Kolonu bylo třeba během průběhu celé chromatografie účinně chladit (4 °C), aby se zamezilo degradaci proteinů.

### Promytí kolony

10 ml voda

10 ml Stripp solution (50 mM EDTA; 0,5 M NaCl)

15 ml voda

50 ml  $\text{Ni}^{2+}$  (0,1 M  $\text{NiSO}_4$ )

10 ml voda

10 ml pufr E

### Složení pufrů:

- Pufr E: 1x PBS; 0,5 M NaCl; 1 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol, 0,05% NP40

- Pufř F: 1x PBS; 0,5 M NaCl; 0,6 M imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkapt ethanol, 0,05% NP40
- Pufř 10% F v E: 1x PBS; 0,5 M NaCl; 0,06 M imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkapt ethanol, 0,05% NP40

### 4.13 Dialýza

Dialýza je metoda sloužící k oddělení nízkomolekulárních látek nebo k výměně prostředí, ve kterém je látka rozpuštěna. Dialyzační membrána je nepropustná pro vysokomolekulární látky a současně propustná pro nízkomolekulární látky. Nízkomolekulární látky se pohybují přes membránu ve směru koncentračního gradientu.

Použitá membrána: MCO (Molecular weight cut off) 14000 (propustná pro molekuly s  $M_r < 14000$  (Roth, Německo)

### 4.14 Gelová filtrace

Gelová filtrace je separační metoda, při které se molekuly dělí na základě své velikosti. Náplň chromatografické kolony tvoří pórovitý gel, na kterém dochází ke stérickému vyloučení molekul větších rozměrů než jsou póry. Malé molekuly pronikají do gelu a zpožďují se. Obecně platí, že velké molekuly jsou v porovnání s malými molekulami eluovány rychleji.

Pro gelovou filtraci byla použita kolona Superdex<sup>TM</sup>200 (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla připojena k přístroji AKTAprime<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC a data byla analyzována pomocí programu Unicorn 4.11 dodaným spolu s přístrojem.

Kolona byla nejdříve promyta vodou (průtoková rychlost 0,5 ml/min; cca 20 min) a následně elučním pufřem (průtoková rychlost 0,5 ml/min; až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku). Vzorky byly před nanesením zakoncentrovány tak, aby jejich objem byl maximálně 2 ml. Jednotlivé frakce byly sbírány po 0,5 ml do předem připravených mikrozkuvek. Eluce byla manuálně ukončena v okamžiku, kdy eluční křivka jasně ukazovala, že došlo k vyloučení veškerého proteinu. Gelová filtrace byla prováděna za pokojové teploty. Přítomnost proteinu a jeho čistota v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE.

Složení elučního pufru: 20 mM Tris (pH 7,5); 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 3 mM DTT; 0,01% NP40; 10% glycerol

#### 4.15 Zakoncentrování roztoků proteinů

Při každém purifikačním kroku a následné dialýze dochází k naředění roztoku proteinu. Pro zvýšení účinnosti purifikace a následných pokusů je třeba protein po každém purifikačním kroku zakoncentrovat. K tomu se používají koncentrátoři skládající se ze zkumavky, na jejímž dně je umístěná celulosová ultracentrifugační membrána propustná pro molekuly určité velikosti a dále ze sběrné zkumavky, do které se jímá roztok, který během centrifugace proteče přes membránu.

Pro zakoncentrování roztoků proteinů byly použity koncentrátoři s MCO 10000. Centrifugace byla prováděna při 4 °C (3500 rpm; rotor A-4-44), tak dlouho než roztok dosáhl požadované koncentrace.

Pro výpočet koncentrace byla změřena absorbance při 280 nm a pomocí „Protparam tool“ volně přístupného na [www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html) vypočítány extinkční koeficienty proteinů.

#### 4.16 Fosforylace proteinu

Fosforylace je reakce, při které je fosfátová skupina  $PO_4^{3-}$  připojena k organické molekule. Jako zdroj fosfátových skupin slouží především ATP a reakce je katalyzována kinasami.

K fosforylaci RGS mutantních proteinů byla použita protein kinasa A (PKA; EC:2.7.11.11; 76 U/μl). PKA je cAMP dependentní protein kinasa, jejíž aktivita závisí na koncentraci cAMP v buňce a katalyzuje přenos koncové fosfátové skupiny ATP na hydroxylovou skupinu serinu či threoninu.

Pro účinnou fosforylaci mutantních RGS proteinů byla reakční směs inkubována 6 hod při 4 °C v přítomnosti 5000 u PKA a reakce byla ukončena přidáním EDTA (finální koncentrace 15 mM).

Složení reakční směsi: protein rozpuštěný v pufru (20 mM Tris (pH 7,5); 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 3 mM DTT; 10% glycerol); 0,75 mM ATP; 15 mM  $MgCl_2$

## 4.17 Nativní elektroforéza

Při nativní elektroforéze je vzorek nanášen v nativní formě. Při samotném průběhu elektroforézy je elektroforetickou vanu třeba chladit, aby nedošlo k denaturaci vzorku.

Na rozdíl od SDS-PAGE není přidán detergent (SDS) a vzorky nejsou povářeny s  $\beta$ -merkapt ethanolom, nedochází tudíž k denaturaci a proteinům není udělen jednotný náboj. Rychlost pohybu proteinu závisí na jeho elektroforetické mobilitě, která je ovlivněna jeho nábojem a tvarem.

Pro pokusy byl použit 15% gel. Gel byl vizualizován stejně jako při SDS-PAGE (viz. kapitola 4.9).

**Složení gelu a pufrů** použitých při nativní elektroforéze:

Složení gelu: 4 ml akrylamid/bis-akrylamid; 0,5 ml 20x TBE; 5,45 ml voda; 75  $\mu$ l 10% persulfát amonný; 8  $\mu$ l TEMED

Elektroforetický pufr: vychlazený 1x TBE

10x TBE: 107,88 g Tris, 55 g kyselina boritá, 7,44 g Na<sub>2</sub>-EDTA, voda do 1 l

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava RGS3 mutantů W295F a W391F

K cílené mutagenesi tryptofanu (W) 295 a 391 na fenylalanin (F) byla použita PCR reakce (viz. kapitola 4.7). Jako templát sloužila plasmidová DNA (vektor pET-15b se zaklonovaným genem kódujícím RGS3 (isoforma 1)), která byla izolována z bakterií *E.coli* kmene DH5 $\alpha$ , které byly inkubovány při 37°C v 5ml LB media obsahujícím ampicilin (100  $\mu$ g/ml) po dobu cca 16 hodin. Dále byly navrženy primery. Zvolené oligonukleotidy obsahovaly 33 nukleotidů, nebyly však komplementární k templátové DNA v celém úseku, ale záměrně byla pozměněna sekvence tak, aby triplet kódující tryptofan byl nahrazen tripletem kódujícím fenylalanin. Po proběhnutí PCR reakce byla původní methylovaná DNA štěpena pomocí restrikčního enzymu Dpn I (viz. kapitola 4.8).

Přítomnost mutace bylo třeba ověřit sekvenací. Mutovaná DNA byla transformována do bakterií *E.coli* kmene DH5 $\alpha$  (viz. kapitola 4.9) a z nich pak byla izolována DNA (viz. kapitola 4.6). Tato DNA byla předána k sekvenaci Dr. J. Felsbergovi, Mikrobiologický ústav AV ČR. Z detailního prozkoumání výsledků sekvenace (viz. Obr.5.1,5.2) bylo potvrzeno úspěšné zavedení mutace na požadovaná místa. Nyní bylo třeba ověřit expresi rekombinantních proteinů obsahujících mutace W295F a W391F.

```

      880           890           900           910           920
CCTCCACCTTGGGGGCATGCCTTCGCCAGCACCCCTCAAGAAA-GAGCTGGGCCGCAA
:::::::::  :::::::::  :::::::::  :::::::::  :::::::::
CCTCCACCTTTCGGGCATGCNTTCGCCAGCNCCCTCAAGAAAAGAGCTGGGCCGCAA
      330           340           350           360           370

```

**Obr.5.1:** Porovnání původní a mutované RGS3 DNA. Mutace tryptofanu (tgg) na pozici 295 na fenylalanin (ttc). Porovnání bylo provedeno pomocí programu volně přístupného na stránkách [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)

```

      1160           1170           1180           1190           1200
TCAGAGGAAGCCCTCAAGTGGGGCGAGTCCTTGGAGAAGCTGCTGGTTCACAAATA
:::::::::  :::::::::  :::::::::  :::::::::  :::::::::
TCAGAGGAAGCCCTCAAGTTCGGCGAGTCCTTGGAGAAGCTGCTGGTTCACAAATA
      590           600           610           620           630

```

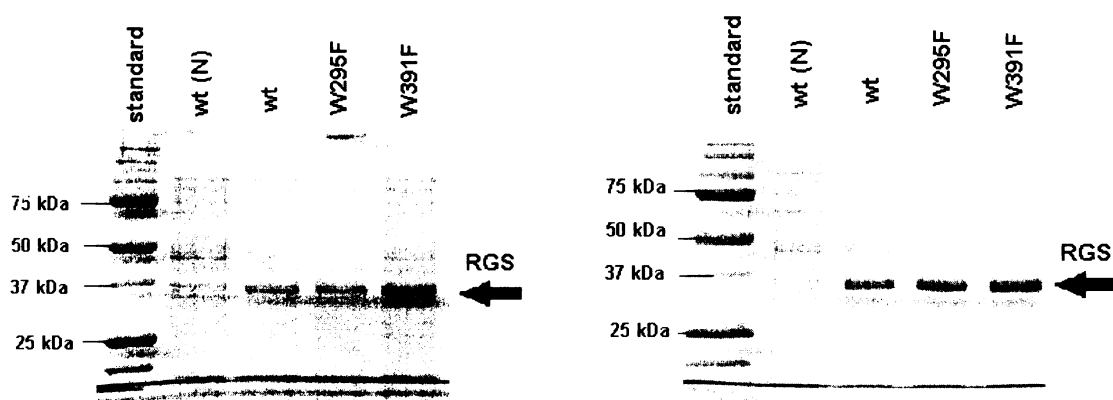
**Obr.5.2:** Porovnání původní a mutované RGS3 DNA. Mutace tryptofanu (tgg) na pozici 391 na fenylalanin (ttc). Porovnání bylo provedeno pomocí programu volně přístupného na stránkách [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)

## 5.2 Expresní test

Expresní test (*viz. kapitola 4.5*) byl proveden jak pro RGS3 mutanty W295F a W391F, tak pro wt. Jako kontrola sloužila bakteriální kultura obsahující wt, který však nebyl na rozdíl od RGS3 mutantů W295F a W391F a jiné bakteriální kultury obsahující wt indukovan pomocí IPTG.

Po 3 a 19 hodinách po přidání IPTG byly z bakteriální kultury odebrány vzorky, které se následně analyzovaly pomocí SDS-PAGE (*viz. kapitola 4.10*). Na gel bylo nanášeno 20  $\mu$ l vzorku odebraného po 3 hod a 10  $\mu$ l vzorku odebraného po 19 hod. Vzorky byly nanášeny v tomto pořadí: standard molekulových vah, neindukovaný wt, indukovaný wt, indukovaný RGS mutant W295F a indukovaný RGS mutant W391F.

Z analýzy gelů (*viz. Obr. 5.3*) je jasné, že oba dva RGS mutanty W295F i W391F se exprimují velmi dobře. Také je vidět, že množství exprimovaného proteinu se s časem výrazně zvýšilo. Přítomnost proteinu nebyla pozorována u vzorku obsahující neindukovaný wt, neboť přítomnost induktoru je nutnou podmínkou exprese proteinu.



**Obr. 5.3:** Výsledek expresního testu (15% SDS-PAGE) – vzorky RGS3 odebrané po 3 hod (vlevo) a po 19 hod (vpravo). Vzorky při SDS-PAGE byly nanášeny v tomto pořadí: standard molekulových vah, neindukovaný wt, indukovaný wt, indukovaný mutant W295F, indukovaný mutant W391F. Z gelů je zřejmé, že jak wt, tak oba dva mutanty se exprimují velmi dobře. Z gelů je také vidět, že množství exprimovaného proteinu roste s časem.

## 5.3 Purifikace proteinů

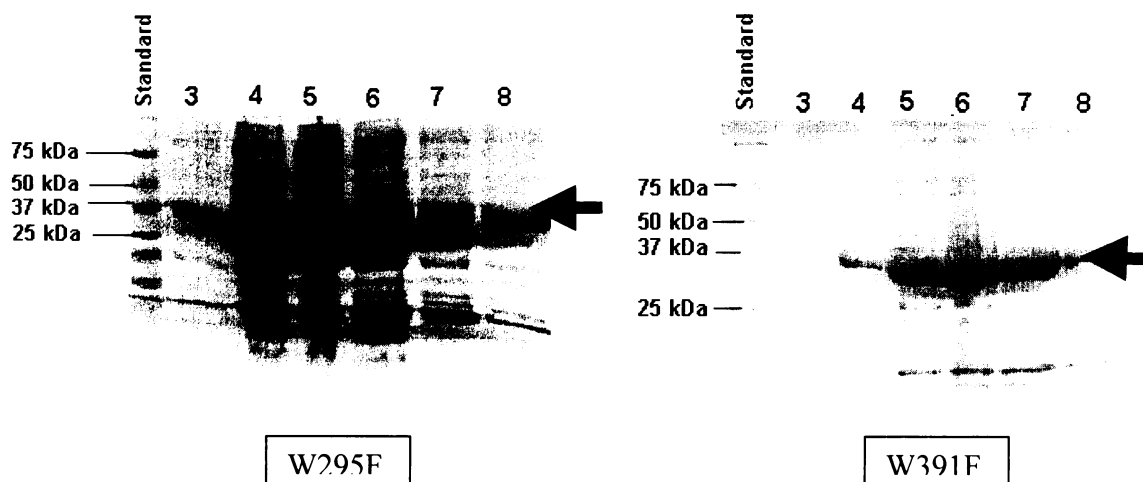
### 5.3.1 Exprese

Pro úspěšnou purifikaci bylo nutné exprimovat protein v dostatečném množství (viz. kapitola 4.5). Byly vypěstovány 3 l buněčné kultury obsahující RGS3 mutant W295F, 3 l buněčné kultury obsahující RGS3 mutant W391F a 3 l buněčné kultury obsahující RGS3 wt. Každá peleta získaná centrifugací 1 l bakteriální kultury byla resuspendována v lyzovacím pufru, inkubována s lysozymem, sonikována a nakonec opět centrifugována (viz. kapitola 4.11). Při centrifugaci došlo k oddělení supernatantu, který obsahoval exprimované proteiny, od pelety obsahující zbytky rozbitých buněk.

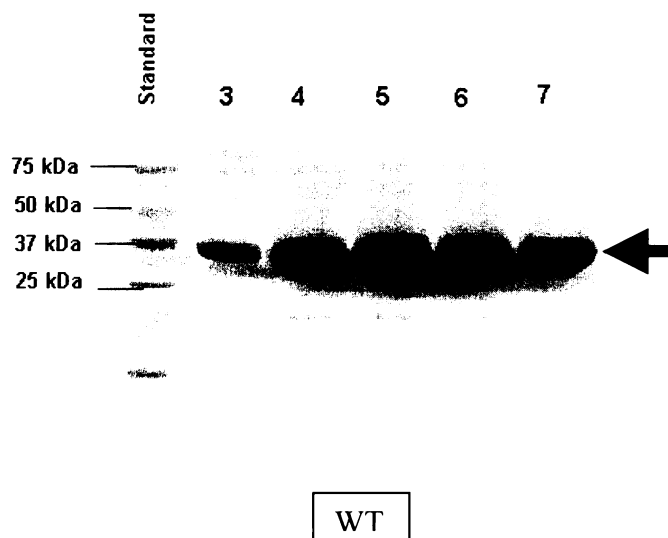
### 5.3.2 Afinitní niklová chromatografie

Vektor pET-15b použitý pro zaklonování RGS3 genu obsahuje motiv šesti histidinů za sebou (tzv. „His-tag“) umožňující purifikaci pomocí afinitní niklové chromatografie (viz. kapitola 4.12). Obsah proteinu v jednotlivých frakcích a jeho čistota byl zkontrolován pomocí SDS-PAGE (viz. kapitola 4.10). Na gel bylo nanášeno 10  $\mu$ l z každé frakce 3 – 8 (viz. Obr. 5.4, Obr. 5.5). Frakce s vysokou koncentrací proteinu (tzn. frakce 4, 5, 6, 7, 8 u RGS3 mutantu W295F a W391F a frakce 3, 4, 5, 6, 7 u RGS3 wt) byly spojeny a dále purifikovány.

RGS3 wt sloužil při dalších pokusech pouze jako kontrola, jeho purifikace byla ukončena po niklové afinitní chromatografii.



**Obr. 5.4:** Výsledek 15% SDS-PAGE provedené po niklové afinitní chromatografii RGS3 mutantu W295F (vlevo) a W391F (vpravo). Vzorky byly na gel nanášeny v tomto pořadí: standard molekulových vah, frakce 3 – 8 RGS3 mutantu W295F (resp. W391F). Šipkou je znázorněn RGS3 protein.



**Obr. 5.5:** Výsledek 15% SDS-PAGE provedené po niklové afinitní chromatografii RGS3 wt. Vzorky byly na gel nanášeny v tomto pořadí: standard molekulových vah, frakce 3 – 7 RGS3 wt. Šipkou je znázorněn RGS3 protein.

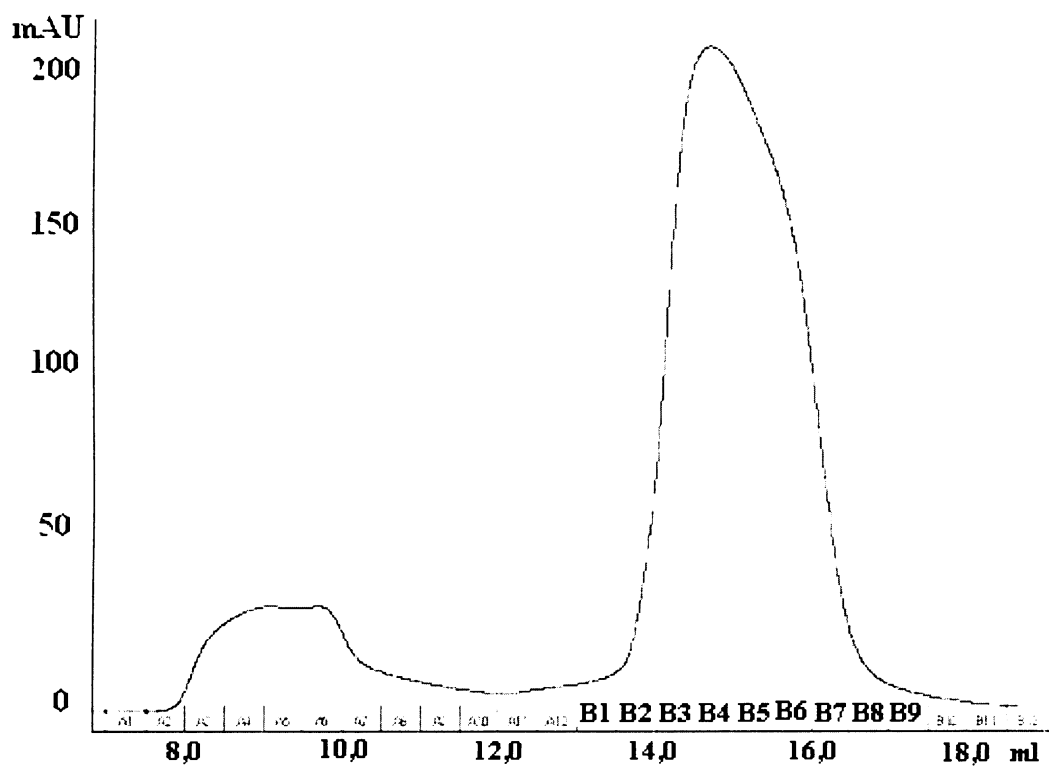
### 5.3.3 Gelová filtrace

Jako další purifikační krok pro RGS3 mutant W295F a RGS3 mutant W391F byla vybrána gelová filtrace (*viz. kapitola 4.14*).

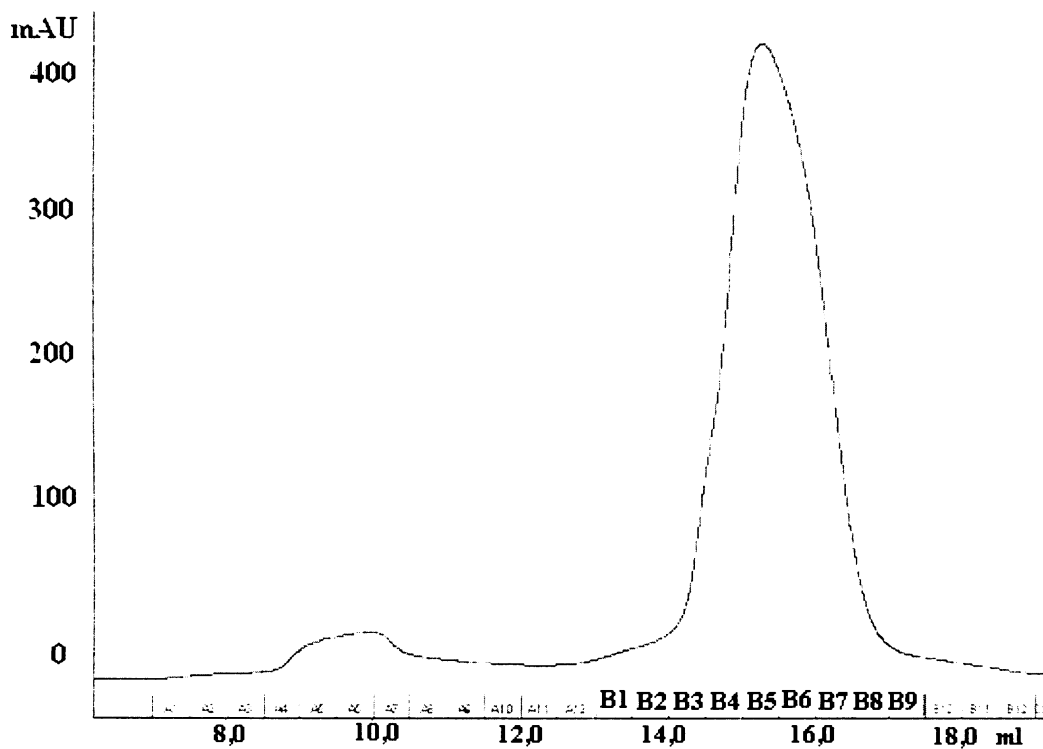
Protože se při gelové filtraci používá jiný eluční pufr, než je ten, ve kterém byl protein rozpuštěn po niklové afinitní chromatografii (1x PBS; 0,5M NaCl; 0,6 M imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol, 0,05% NP40), bylo třeba změnit pufrací prostředí (*viz. kapitola 4.13*) (20 mM Tris (pH 7,5); 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 3 mM DTT; 0,01% NP40; 10% glycerol). Obsah proteinu v jednotlivých frakcích a jeho čistota byl zkontrolován pomocí SDS-PAGE (*viz. kapitola 4.10*). Na gel bylo naneseno 10  $\mu$ l z každé frakce B3 - B8 u RGS3 mutantu W295F (resp. W391F)

Na základě porovnání chromatogramů (*viz. Obr.5.6, Obr.5.7*) a gelů z SDS-PAGE (*viz. Obr.5.8*) byl identifikován RGS3 pík a vybrány frakce pro další pokusy (tzn. frakce B4 – B8).

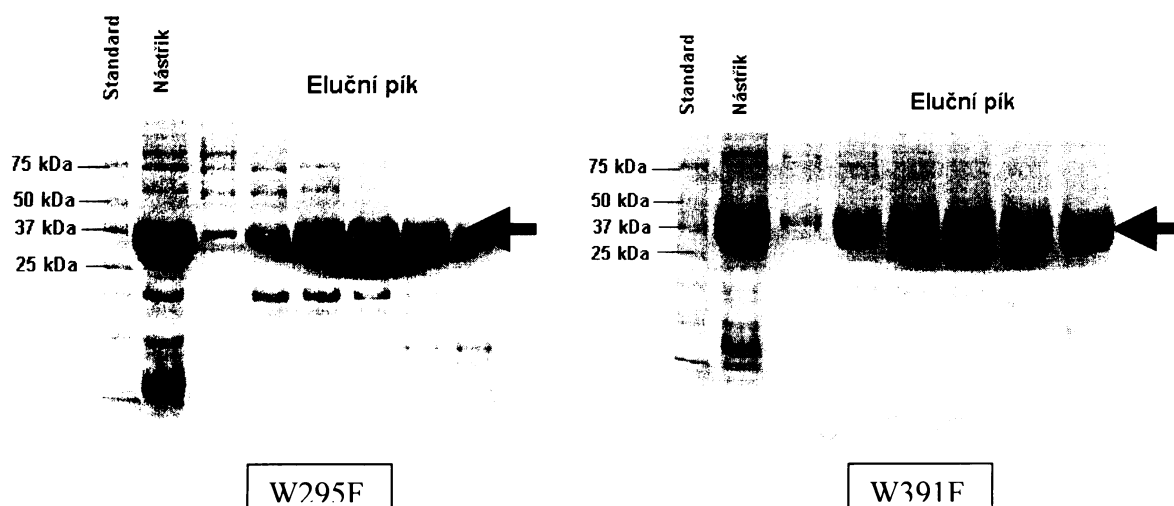




**Obr.5.6:** Chromatogram eluce gelové filtrace RGS3 mutantu W295F. Průtoková rychlost 0,5 ml/min.



**Obr.5.7:** Chromatogram eluce gelové filtrace RGS3 mutantu W391F. Průtoková rychlost 0,5 ml/min.



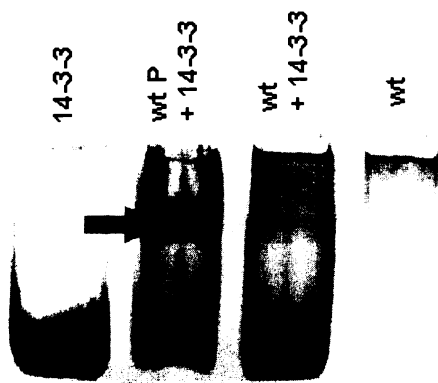
**Obr. 5.8:** Výsledek 15% SDS-PAGE provedené po gelové filtraci RGS3 mutantu W295F (vlevo) a W391F (vpravo). Vzorby byly na gel nanášeny v tomto pořadí: standard molekulových vah, frakce B3-B8 RGS3 mutantu W295F (resp. W391F).

#### 5.4 Test interakce RGS3 (isoforma 1) a 14-3-3 $\zeta$ proteinu

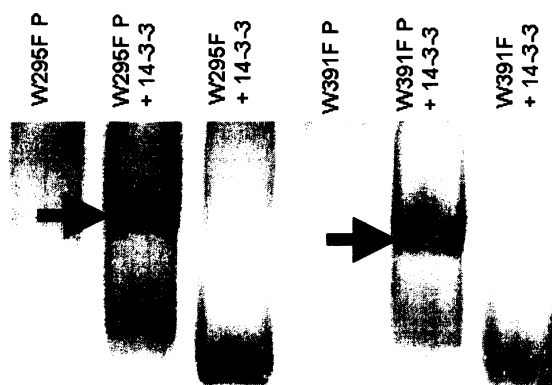
Po finální fázi purifikace byl 1 ml RGS3 wt (koncentrace 4 mg/ml), 1 ml RGS3 mutantu W295F (koncentrace 2 mg/ml) a 1 ml RGS3 mutantu W391F (koncentrace 2 mg/ml) fosforylován (viz. kapitola 4.16). ATP bylo odstraněno dialýzou proti pufru (20 mM Tris (pH 7,5); 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 3 mM DTT; 0,01% NP40; 10% glycerol).

Pro ověření vazby mutantních verzí RGS3 proteinu bylo využito nativní TBE-PAGE elektroforézy (viz. kapitola 4.17). Při nativní elektroforéze není přidáván detergent, který by molekulám udával jednotný náboj. Do gelu tudíž vstupují pouze záporně nabitě molekuly. 14-3-3 protein je v nativním stavu záporně nabitý, tudíž do gelu vstupuje. Naopak RGS3 je kladně nabitý protein, do gelu tedy nevstupuje. Pokud však vytvoří komplex se 14-3-3 proteinem je celý komplex záporně nabitý, na gelu je pak vytvořený komplex dobře viditelný (je oproti samotnému 14-3-3 proteinu výrazně posunut). Byly připraveny 2 gely pro nativní elektroforézu. Na jednom z gelů (viz. Obr.5.9) byla vyzkoušena interakce 14-3-3 $\zeta$  proteinu s fosforylovaným a nefosforylovaným RGS3 wt a na druhém (viz. Obr.5.10) interakce 14-3-3 $\zeta$  proteinu s fosforylovaným a nefosforylovaným RGS3 mutantem W295F (resp. W391F). Z gelů je patrné, že jak fosforylovaný RGS3 wt, tak fosforylovaný RGS3 mutant W295F (resp. W391F) s velkou

pravděpodobností tvoří s 14-3-3  $\zeta$  komplex. Naopak nefosforylované formy RGS3 s 14-3-3 proteinem neinteragují, zdá se tedy, že fosforylace je nutnou podmínkou vazby jak RGS3 wt, tak RGS3 mutantu W295F s 14-3-3 proteinem.



**Obr. 5.9:** Výsledek 15% TBE nativní elektroforézy. Vzorky byly nanášeny v pořadí 14-3-3 protein, fosforylovaný RGS3 wt společně s 14-3-3 proteinem, nefosforylovaný RGS3 wt společně s 14-3-3 proteinem, RGS3 wt. Šipka značí vytvořený komplex mezi fosforylovaným RGS3 wt a 14-3-3 proteinem.



**Obr. 5.10:** Výsledek 15% TBE nativní elektroforézy. Vzorky byly nanášeny v pořadí fosforylovaný RGS3 mutant W295F, fosforylovaný RGS3 mutant W295F společně s 14-3-3 proteinem, nefosforylovaný RGS3 mutant W295F společně s 14-3-3 proteinem, fosforylovaný RGS3 mutant W391F, fosforylovaný RGS3 mutant W391F společně s 14-3-3 proteinem, nefosforylovaný RGS3 mutant W391F společně s 14-3-3 proteinem, . Šipka značí vytvořený komplex mezi fosforylovaným RGS3 mutantem W295F (resp. W391F) a 14-3-3 proteinem.

## 6 Diskuse

G proteinová signální dráha je velmi důležitá pro regulaci mnoha životních funkcí. Není proto překvapivé, že jakékoli sloučeniny, které ji pozitivně či negativně ovlivňují, jsou středem zájmu vědeckého výzkumu. Regulátory G proteinové signalizace RGS mají schopnost se přímo vázat na aktivovanou  $G_{\alpha}$ -GTP podjednotku a urychlit tak hydrolýzu GTP. Slouží tedy jako GAPs (GTPase-activating proteins), jsou limitující pro životnost  $G_{\alpha}$ -GTP a ukončují přenos signálu [4,5]. Díky této své funkci by se RGS proteiny mohly stát potenciálním cílem mnoha léků. Malé molekuly, které inhibují interakci mezi RGS a  $G_{\alpha}$  by mohly být navrženy jako nové léky, které umocňují účinek endogenních neurotransmiterů při nemocích jako je např. Alzheimerova choroba, ale i mnoha dalších. Eventuálně by tyto terapeutické látky mohly být využity k znásobení účinku doposud známých léků, jejichž cílem jsou GPCRs, čímž by se mohla snížit dávka léků majících za cíl GPCR a zároveň by se zvýšila místní specifita, tím pádem by se snížil vedlejší efekt [35,36].

Některé RGS proteiny (např. RGS3 a RGS7) mohou být samy regulovány fosforylací a vazbou na jiné proteiny, např. 14-3-3 proteiny. Ve chvíli, kdy dojde k fosforylaci a vazbě na 14-3-3 protein je inhibována interakce mezi RGS proteinem a aktivovanou  $G_{\alpha}$  podjednotkou heterotrimérního G proteinu. Právě vliv vazby 14-3-3 proteinu na fosforylovaný RGS3 protein, a to jakým způsobem tato vazba inhibuje interakci mezi RGS3 proteinem a  $G_{\alpha}$  podjednotkou, zda 14-3-3 protein indukuje konformační změnu RGS3 proteinu, či zda jde pouze o stérické bránění se snažíme prostudovat v naší laboratoři. Zvolili jsme dva přístupy – jednak krystalizaci komplexu RGS3 proteinu se 14-3-3 proteinem a jednak spektroskopické studie, především měření fluorescence a CD spekter. RGS3 protein (isoforma 1) obsahuje tři tryptofanové zbytky na pozici 295, 391 a 424 (zbytky 391 a 424 jsou v rámci RGS domény), což je příliš mnoho pro detailní analýzu. Ideální je, aby daný protein obsahoval pouze jeden tryptofanový zbytek. Cílem mé práce bylo pomocí cílené metagenese snížit počet tryptofanových zbytků v RGS3 proteinu, tyto proteiny exprimovat, purifikovat, *in vitro* fosforylovat a vyzkoušet jejich vazbu se 14-3-3 proteinem.

Pomocí cílené mutagenese byly připraveny mutanty W295F a W391F. Jejich exprese byla ověřena expresním testem (viz Obr.5.3, str.30), který ukázal, že exprese je srovnatelná s RGS3 wt. Dále byly proteiny částečně purifikovány pomocí niklové afinitní chromatografie a následné gelové filtrace. Nakonec byly purifikované proteiny fosforylovány *in vitro* pomocí PKA a vyzkoušena jejich vazba s 14-3-3 proteinem. Mimo RGS3 mutantů byla niklová afinitní chromatografie provedena i u RGS3 wt. Tato verze však sloužila při dalších krocích jen jako kontrola, proto nebyl prováděn další purifikační krok, čistota proteinu byla dostačující.

Při purifikaci jsem se zpočátku potýkala s velkými problémy, neboť RGS3 proteiny jsou poměrně nestabilní, snadno podléhají proteolytické degradaci a při snížení iontové síly precipitují. Bylo tedy nutné stále udržovat teplotní rozmezí 0-4 °C, kdy je činnost proteas značně omezena. Při prvních experimentech byly RGS3 proteiny exprimovány v bakteriích *E.coli* BL21 (DE3) a po indukci pomocí IPTG byla udržována konstantní teplota 30 °C. Za těchto podmínek však docházelo k předčasné terminaci translace, protein byl teda značně znečištěn a navíc exprese byla poměrně nízká. Změnou experimentálních podmínek – snížení expresní teploty na pokojovou a použití jiného expresního kmene – *E.coli* BL21 (Rosseta) došlo k výraznému zlepšení výtěžku purifikace proteinu a především jeho čistoty.

Část purifikovaných proteinů byla fosforylována pomocí PKA. U RGS3 wt byla fosforylace ověřena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektroskopie (Dr. M. Šulc, MBÚ AV ČR, v.v.i.). Vzhledem k tomu, že mutované Trp zbytky nejsou v blízkosti fosforylačního místa, nebyla fosforylace mutantů ověřována pomocí MALDI-TOF. Pro ověření vazby mutantních verzí RGS3 proteinu bylo využito nativní TBE-PAGE elektroforézy. Při nativní elektroforéze není přidáván detergent, který by molekulám udával jednotný náboj. Do gelu tudíž vstupují pouze záporně nabitě molekuly. 14-3-3 protein je v nativním stavu záporně nabitý (jeho pI je ~ 4), tudíž do gelu vstupuje. Naopak RGS3 je kladně nabitý protein (pI ~ 8,5), do gelu tedy nevstupuje. Pokud však vytvoří komplex se 14-3-3 proteinem je celý komplex záporně nabitý, na gelu je pak vytvořený komplex dobře viditelný (je oproti samotnému 14-3-3 proteinu výrazně posunut). Tyto výsledky souhlasí s údaji uvedenými v literatuře. 14-3-3 proteiny interagují především s fosforylovanými ligandy. V případě interakce s RGS3 by nutnou podmínkou vazby měla být fosforylace serinu na pozici 264 [31,32]. Výsledky této bakalářské práce tento fakt potvrzují (viz Obr.5.9, Obr.5.10, str.35), kde komplex RGS3 (isoforma 1) s 14-3-3  $\zeta$  proteinem byl vytvořen pouze v případě fosforylovaných forem mutantu W295F, W391F

a wt. Rovněž bylo ověřeno, že mutace W295F a W391F neovlivnila schopnost RGS3 proteinu (isoforma 1) vázat 14-3-3 $\zeta$  protein. Tryptofan na pozici 295 a 391 lze tedy úspěšně mutovat na fenylalanin.

Regulátory G proteinové signalizace RGS jsou velmi rozmanité signální proteiny, které jsou jednak schopné umlčet G proteinové signální dráhy, ale také na sebe vázat velké množství dalších molekul, což je dostatečným důvodem pro výzkum jejich dalších fyziologických funkcí. Důležité cíle dalšího výzkumu jsou: určení úlohy doposud známých vazebných partnerů RGS v buňce, identifikace dalších vazebných partnerů a jejich funkce v buňce a charakterizace vzájemného ovlivňování mezi GPCRs, G proteiny a RGS. Informace získané těmito studiemi by měly umožnit širší pochopení úlohy RGS proteinů ve fyziologii a při mnoha nemocech.

## 7 Závěr

### Hlavní výsledky této práce jsou:

- Pomocí cílené mutagenese byla do sekvence DNA kódující lidský regulátor G proteinové signalizace RGS3 (isoforma 1) vnesena mutace, která umístila
  - fenylalaninový zbytek na místo tryptofanového na pozici 295
  - fenylalaninový zbytek na místo tryptofanového na pozici 391
- U obou mutantů W295F i W391F byl proveden expresní test, který potvrdil expresi obou rekombinantních proteinů. Ta byla porovnatelná s RGS3 wt.
- Oba rekombinantní proteiny obsahující mutace W295F a W391F byly částečně purifikovány pomocí niklové afinitní chromatografie a následné gelové filtrace.
- RGS3 wt byl purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie.
- RGS3 mutant W295F, W391F a RGS3 wt byly fosforylovány *in vitro* pomocí PKA.
- Byla vyzkoušena vazba fosforylované a nefosforylované formy RGS3 mutantu W295F, W391F a RGS3 wt s 14-3-3  $\zeta$  proteinem, která potvrdila, že mutace W295F ani mutace W391F s velkou pravděpodobností neovlivnila schopnost RGS3 vázat 14-3-3  $\zeta$ .
- **Tryptofan na pozici 295 a 391 lze mutovat na fenylalanin.**

## Seznam citované literatury

1. Cooper, G.M.: The Cell: A molecular Approach., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts (2000)
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Molecular Biology of the Cell, Garland Science, London, New York (2002)
3. Gerhard Krauss: Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Wiley-Wch, New York (2001)
4. Berman, D.M., Wilkie T.M., Gilman, A.G.: GAIP and RGS4 Are GTPase-Activating Proteins for the G<sub>i</sub> Subfamily of G Protein  $\alpha$  Subunits, Cell, 86, 445-452 (1996)
5. Watson N., Linder, M.E., Druey, K.M., Kehrl J.H., Blumer, K. J.: RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein  $\alpha$  -subunits, Nature, 383, 172 – 175 (1996)
6. Koelle, M.R., Horvitz, H.R.: EGL-10 regulates G protein signaling in the C.elegans nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins, Cell, 84,115–125 (1996)
7. Siderovski, D.P., Hessel, A., Chung, S., Mak, T.W. and Tyers, M.: A new family of regulators of G-protein-coupled receptors?, Curr. Biol., 6, 211–212, 1996
8. Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweias, W.D.: p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G <sub>$\alpha_{12}$</sub>  and G <sub>$\alpha_{13}$</sub> , Science, 280, 2109-2111 (1998)
9. Hepler, J.R.: RGS Protein and G Protein Interaction: A Little Help from Their Friends, Mol. Pharmacol., 64, 547-549 (2003)
10. Snow, B.E., Antonio, L., Suggs, S., Gutstein, H.B., Siderovski, D.P.: Molecular Cloning and Expression Analysis of Rat Rgs12 and Rgs14, Biochem. Biophys. Res. Commun., 233, 770-777 (1997)
11. He, W., Cowan, CH.W., Wensel, T.G.: RGS9, a GTPase Accelerator for Phototransduction, Neuron, 20, 95-102 (1998)
12. Chatterjee T.K., Fischer, R.A.: Cytoplasmic, Nuclear, and Golgi Localization of RGS Proteins, J. Biol. Chem., 275, 24013-24021 (2000)
13. Shi, CH., Lee, S.B., Sinnarajah, S., Dessauer, W., Rhee, S.G., Kehrl, J.H.: Regulator of G-protein Signaling 3 (RGS3) Inhibits G <sub>$\beta_{1\beta 2}$</sub> -induced Inositol Phosphate Production, Mitogen-activated Protein Kinase, Activation, and Akt Activation, J. Biol. Chem., 276, 24293-24300 (2001)
14. Scheschonka, A., Dessauer, C.W., Sinnarajah, S., Chidiac, P., Shi Ch.: RGS3 Is a GTPase-Activating Protein for G <sub>$\alpha_{1\alpha}$</sub>  and G <sub>$\alpha_{q\alpha}$</sub>  and a Potent Inhibitor of Signaling by GTPase-Deficient Forms of G <sub>$\alpha_{q\alpha}$</sub>  and G <sub>$\alpha_{11\alpha}$</sub> , Mol. Pharmacol., 58, 719-728 (2000)
15. Chatterjee, T.K., Eapen, A., Kanis, A.B., Fisher, R.A.: Genomic Organization, 5'-Flanking Region, and Chromosomal Localization of the Human RGS3 Gene, Genomics, 45, 429-433 (1997)
16. Dulin, N.O., Sorokin, A., Reed, E., Elliott, S., Kehrl, J.H., Dunn, M.J.: RGS3 Inhibits G Protein-Mediated Signaling via Translocation to the Membrane and Binding to G $\alpha_{11}$ , Mol. Cell. Biol., 19, 714-723 (1998)
17. Tosetti, P., Pathak, N., Jacob, M.H., Dunlap, J.K.: RGS3 mediates a calcium-dependent termination of G protein signaling in sensory neurons, Proc.Natl.Acad.SW.USA, 100, 7337-7342 (2003)



18. Neill, J.D., Duck, L.W., Sellers, J.C., Musgrove, L.C., Scheschonka, A., Druey, K.M., Kehrl., J.H.: Potential Role for a Regulator of G Protein Signaling (RGS3) in Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Stimulated Desensitization, *Endocrinology*, 138, 2834-2846 (1997)
19. Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J. and Patel, Y.: 14-3-3  $\alpha$  and  $\delta$  are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3  $\beta$  and  $\zeta$  . In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J. Biol. Chem.*, 270, 5706-5709 (1995)
20. Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C. and Sommarin, M.: Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes, *Plant Physiol.*, 127, 142-149 (2001)
21. Dougherty, M.K., Morison, D.K.: Unlocking the code of 14-3-3, *J. Cell Sci.*, 117, 1875-1884 (2004)
22. Hoeven, P.,C.,J.,Van Der Wal, J.C.M.,Ruurs, P., Van Blitterswijk, J.: Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3, *Biochem. J.*, 347, 781-785 (2000)
23. Conklin, D.S., Galaktionov, K., Brach, D.: 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7892-6 (1995)
24. Benzing, T., Yaffe, M.,B., Arnould, T., Sellin, L., Schermer, B., Schilling, B., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Leparac, G.G., Kim, E., Walz, G.: 14-3-3 Interacts with Regulator of G Protein Signaling Proteins and Modulates Their Activity, *J. Biol. Chem.*, 36, 28167-28172 (2000)
25. Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S. and Dyda, F.: Crystal structure of the 14-3-3  $\zeta$  :serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation, *Cell*, 105, 257-267 (2001)
26. Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S.. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine, *Cell*, 84, 889-897 (1996)
27. Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. and Yaffe, M. B.. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding, *Mol. Cell*, 4, 153-166 (1999)
28. Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C.: The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91, 961-971 (1997)
29. Jones, D. H., Ley, S. and Aitken, A.: Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett.*, 368, 55-58 (1995)
30. 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)
31. Niu, J., Scheschonka, A., Druey, K.M., Davis, A., Reed, E., Kolenko, V., Bodnar, R., Voyno-Yasenetskaya, T., Du, X., Kehrl, J., Dulin, N.,O.: RGS3 interacts with 14-3-3 via N-terminal region distinct from RGS (regulator of G-protein signalling) domain, *Biochem J.*, 365, 677-684 (2002)
32. Ward, R.J., Milligan, G.: A key serine for the GTPase-activating protein function of regulator of G protein signaling proteins is not a general target for 14-3-3 interactions, *Mol. Pharmacol.*, 68, 1821-30 (2005)

33. Benzing, T., Yaffe, M.B., Arnold, Y.T., Sellin, L., Schermer, B., Schilling, B., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Leparc, G.G., Kim, E., Walz, G.: 14-3-3 Interacts with Regulator of G Protein Signaling Proteins and Modulates Their Activity, *J. Biol. Chem.*, 275, 28167-28172 (2000)
34. Ishii, M., Kurachi, Y.: Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins, *Life Sci.*, 74, 163–171 (2003)
35. Neubig, R.R., Siderovski D.P.: Regulators of G-protein signaling as new central nervous system drug target, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1, 187-197 (2002)
36. Neubig, R.R.: Regulators of G-protein signaling (RGS proteins): novel central nervous system drug targets, *J. Pept. Res.*, 60, 312-326 (2002)

