

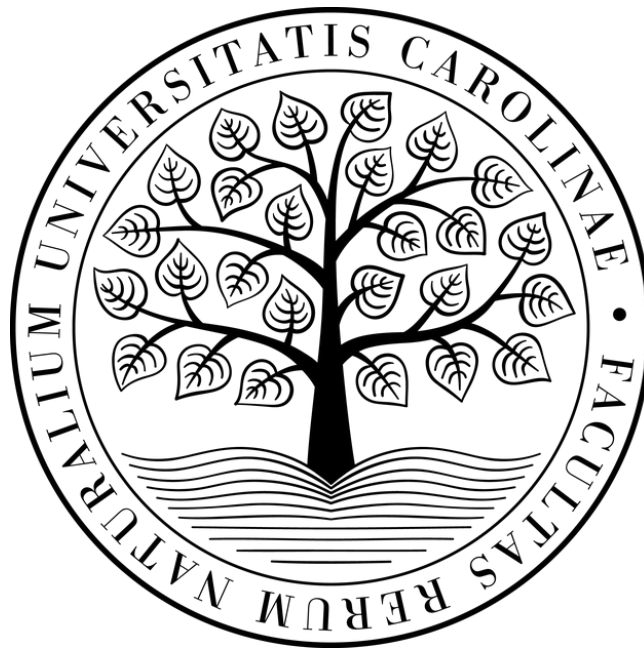
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Matúš Friček

Biofyzikální charakterizace protein-proteinových komplexů s PPM1D

Biophysical characterization of protein-protein complexes involving PPM1D

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Dalibor Košek, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 18. 8. 2024

Bc. Matúš Friček

Poděkování

Moc rád bych na tomto místě poděkoval především svému školiteli Mgr. Daliborovi Koškovi, Ph.D. za přátelský a trpělivý přístup a všechny rady a vědomosti, které mi během dvou let předal.

Chtěl bych také poděkovat RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. a prof. RNDr. Tomášovi Obšilovi Ph.D. za cenné rady a všem členům laboratoře strukturní biologie signálních proteinů za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Jmenovitě bych chtěl taktéž poděkovat Mgr. Daně Kalábové, Ph.D. za pomoc v oblasti molekulární biologie. Za hmotnostně-spektrometrická měření děkuji Mgr. Pavle Vaňkové, Ph.D.

Velké dík patří mé rodině a přátelům za jejich podporu a motivaci během celého studia.

Abstrakt

Proteinfosfatasa PPM1D je negativním regulátorem odpovědi buněk na poškození DNA. V procesech opravy poškozené DNA má nezastupitelnou funkci tumor supresorový protein p53. Jedním z jeho hlavních negativních regulátorů je právě fosfatasa PPM1D, jejíž exprese je proteinem p53 zároveň řízena. Fyziologicky se PPM1D inaktivací p53 podílí na obnově homeostázy v buňkách. Nadměrná exprese PPM1D je však spojena se vznikem a rozvojem několika typu nádorů. Porozumění mechanismům, jakými dochází k regulaci PPM1D, proto může být důležitým krokem v boji proti nádorovým onemocněním.

Struktura PPM1D se kromě kompaktní fosfatasové domény vyznačuje i přítomností několika flexibilních a nestrukturovaných částí. Obtížným úkolem je proto i příprava tohoto proteinu, což výrazně sťažuje možnosti jeho charakterizace *in vitro*. Proto byl v této práci použit zkrácený protein PPM1D₁₋₃₉₇ (PPM1D NTD). S cílem získat stabilní protein o vysoké čistotě byla exprese a purifikace PPM1D NTD extenzivně optimalizována. Získané SAXS data naznačují, že smyčka bohatá na prolin (30–99), která je specifická pro PPM1D, zaujímá v roztoku rozvinutou a pravděpodobně flexibilní konformaci. Dlouhodobým cílem projektu je studium protein-proteinových interakcí fosfatasy PPM1D. Jedním z interakčních partnerů PPM1D je i protein LZAP. Měření fosfatasové aktivity v přítomnosti LZAP prokazují negativní vliv LZAP na aktivitu PPM1D. Tato zjištění jsou v rozporu s předcházejícími studiemi vlivu LZAP na aktivitu PPM1D. V rámci této diplomové práce je diskutována také možná interakce PPM1D s proteiny 14-3-3. Tyto proteiny vazbou na fosforylované motivy modulují aktivitu a strukturu svých vazných partnerů. PPM1D obsahuje několik sekvenčních motivů, které jsou rozeznávány proteiny 14-3-3. Dvě z těchto míst (Ser46, Ser97) jsou zároveň fyziologicky fosforylována a nacházejí se v nestrukturované smyčce bohaté na prolin. Pro účely studia této interakce byl optimalizován protokol, jímž byla PPM1D NTD *in vitro* fosforylována využitím proteinkinasy A.

Klíčová slova: rekombinantní proteiny, fosfatasa, signalizace, inhibice, regulace, p53

Abstract

PPM1D protein phosphatase is a negative regulator of the cellular response to DNA damage. The tumor suppressor protein p53 plays an irreplaceable role in these processes. PPM1D phosphatase is one of its main negative regulators and expression of PPM1D is also regulated by p53. Physiologically, PPM1D contributes to the restoration of cellular homeostasis by inactivating p53. However, overexpression of PPM1D is associated with the development and progression of several types of tumors. Understanding the mechanisms by which PPM1D is regulated could therefore be an important step towards the fight against cancer.

The structure of PPM1D is characterized not only by a compact phosphatase domain but also by the presence of several flexible and unstructured regions. Therefore, the preparation of this protein is a challenging task, which significantly complicates its characterization *in vitro*. For this reason, a truncated protein PPM1D₁₋₃₉₇ (PPM1D NTD) was used in this thesis. In order to obtain a stable protein with high level of purity, the expression and purification of PPM1D NTD were extensively optimized. SAXS data suggest that the proline-rich loop (30–99), which is specific to PPM1D, adopts an extended and likely flexible conformation in solution. The long-term goal of the project is to study the protein-protein interactions of PPM1D phosphatase. One of the interaction partners of PPM1D is LZAP protein. Phosphatase assays results in the presence of LZAP demonstrate a negative effect of LZAP on PPM1D activity. These findings contradict previous studies on the effect of LZAP on PPM1D activity. This thesis also discusses the possible interaction of PPM1D with 14-3-3 proteins. These proteins modulate the activity and structure of their binding partners through binding to phosphorylated motifs. PPM1D contains several sequence motifs that are recognized by 14-3-3. Two of these sites (Ser46, Ser97) are also physiologically phosphorylated and are located in the unstructured proline-rich loop. For the purpose of studying this interaction, *in vitro* phosphorylation protocol for PPM1D was optimized using protein kinase A.

[IN CZECH]

Key words: recombinant proteins, phosphatase, signalization, inhibition, regulation, p53

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
1 Úvod	9
1.1 Odpověď buněk na poškození DNA – DDR dráha	10
1.2 Negativní regulace a ukončení DDR dráhy	12
1.3 Proteinfosfatasy a jejich role	12
1.3.1 Strukturní charakterizace PPM fosfatas	13
1.3.2 Strukturní charakterizace PPM1D: Specifické úseky – klinický význam, konformace, konzervace	15
1.3.2.1 Krystalová struktura katalytické domény PPM1D	16
1.3.2.2 C-terminální doména	18
1.3.2.3 Flap doména a pantová oblast	19
1.3.2.4 Smyčka bohatá na prolin a posttranslační modifikace PPM1D	20
1.3.3 Substrátové spektrum PPM1D – specifita, fyziologické substráty, význam....	22
1.3.3.1 pS/pTQ sekvenční motiv	22
1.3.3.2 pTXpY sekvenční motiv	23
1.3.4 Proteiny interagující s fosfatasou PPM1D	24
2 Cíle	26
3 Materiál a metody	27
3.1 Použité přístroje	27
3.2 Ostatní materiál a pomůcky	27
3.3 Použité chemikálie	28
3.4 Použité roztoky	29
3.5 Metody	34
3.5.1 PCR vnášející mutaci	34
3.5.1.1 Agarosová horizontální elektroforéza	35
3.5.2 Exprese proteinů v <i>E. coli</i>	36
3.5.2.1 Transformace buněk <i>E. coli</i>	36
3.5.2.2 Proteinová exprese	37
3.5.3 Purifikace proteinů	38
3.5.3.1 Příprava buněčného lyzátu	39
3.5.3.2 Niklová afinitní chromatografie	39
3.5.3.3 Amylosová afinitní chromatografie	40
3.5.3.4 Štěpení TEV proteasou	41
3.5.3.5 Reverzní niklová afinitní chromatografie	41
3.5.3.6 Kationtově výměnná chromatografie	42

3.5.3.7	Gelová permeační chromatografie	43
3.5.4	Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).....	44
3.5.5	Měření fosfatasové aktivity	45
3.5.5.1	Měření vnitřní fosfatasové aktivity vůči para-nitrofenylfosfátu	45
3.5.5.2	Měření fosfatasové aktivity stanovením uvolněného fosfátu pomocí malachitové zeleně	45
3.5.6	Malouhlový rozptyl rentgenového záření	46
3.5.6.1	SEC-SAXS	47
3.5.6.2	Zpracování SEC-SAXS dat.....	48
3.5.7	<i>In vitro</i> fosforylace	48
3.5.7.1	Příprava fosforylované formy PPM1D NTD pomocí proteinkinasy A.....	48
3.5.7.2	Příprava fosforylované formy p38 MAPK pomocí kinasy MKK6.....	49
3.5.8	Nativní TBE elektroforéza	50
4	Výsledky.....	51
4.1	PCR vnášející mutaci – příprava mutantní formy PPM1D NTD D314A	51
4.2	Optimalizace exprese proteinu TRX-PPM1D NTD.....	52
4.3	Optimalizace purifikace proteinu PPM1D NTD	52
4.3.1	Finální purifikační protokol	55
4.4	Purifikace PPM1D NTD D314A, LZAP, p38 MAPK.....	57
4.5	Charakterizace PPM1D NTD.....	59
4.5.1	<i>In vitro</i> měření vnitřní fosfatasové aktivity se substrátem pNPP.....	59
4.5.2	SEC-SAXS	60
4.5.2.1	Modelování proteinové obálky <i>ab initio</i>	62
4.6	Studium interakce PPM1D NTD/LZAP	64
4.6.1	Nativní TBE elektroforéza	64
4.6.2	Měření vnitřní fosfatasové aktivity PPM1D NTD v přítomnosti LZAP.....	65
4.6.3	Měření fosfatasové aktivity PPM1D NTD vůči fyziologickému substrátu v přítomnosti LZAP.....	66
4.7	Studium interakce PPM1D/14-3-3	68
4.7.1	Predikce vazných míst pro 14-3-3.....	68
4.7.2	Optimalizace <i>in vitro</i> fosforylace PPM1D NTD.....	68
5	Diskuse.....	70
6	Závěr.....	76
	Seznam použité literatury	77
	Příloha 1	83

Seznam zkratek a symbolů

APS	peroxodisíran amonný
ATM	z angl. „Ataxia Telangiectasia Mutated“
ATP	adenosin trifosfát
ATR	z angl. „Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein“
BSA	hovězí sérový albumin
β -ME	β -merkapt ethanol
CDK	Cyklin-Dependentní Kinasa
DTT	dithiotreitol
DDR	z angl. „DNA Damage response“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
fosfop38 MAPK	fosforylovaná forma mitogeny aktivované proteinkinasy p38
Chk1	z angl. „Checkpoint Kinase 1“
Chk2	z angl. „Checkpoint Kinase 2“
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
LZAP	z angl. „leucine zipper-containing ARF-binding protein“
MBP	protein vázající maltosu, z angl. „maltose binding protein“
Mdm2	E3 ubikvitinligasa, z angl. „Mouse Double Minute 2“
MKK6	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa
NLS	jaderná lokalizační sekvence, z angl. „nuclear localisation sequence“
p38 MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkinasa p38
p53	tumorsupresor, transkripční faktor
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerasová řetězová reakce
PK A	proteinkinasa A
pNPP	para-nitrofenylfosfát
PPM	z angl. „ProteinPhosphatase Metal-dependent“
PPM1D NTD	proteinový konstrukt PPM1D ₁₋₃₉₇ S44R, PPM1D N-terminální doména
PPP	z angl. „PhosphoProtein Phosphatase“
RPM	otáčky za minutu, z angl. „rotation per minute“
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SDS	dodecylsíran sodný
SEC	gelová permeační chromatografie
TBE	pufr pro nativní elektroforézu, Tris-borát-EDTA
TCEP	z angl. „tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	N, N, N', N' - tetraethylendiamin
TRX	thioredoxin
WIP1	z angl. „wild-type p53-induced protein 1“

1 Úvod

Genotoxický stres vyvolaný různými endogenními a exogenními vlivy může vést v buňkách k narušení stability genomu. Pro tyto případy má buňka vyvinuty mechanismy spočívající v aktivaci konzervovaných signálních drah, jejichž důsledkem je zastavení buněčného cyklu u dělících se buněk a umožnění opravy poškozené DNA (dále jen DDR dráhy, z angl. „DNA damage response“). V závislosti na rozsahu poškození DNA dojde buď k dočasnému zastavení buněčného cyklu nebo se z buněk stanou buňky senescentní, u kterých je buněčný cyklus zastaven trvale¹. Důsledkem reakce na poškození DNA může být i programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Všechny tyto procesy představují pro organismus klíčové nástroje pro zachování integrity genomu, jejíž ztráta může vést k rozvoji nádorového onemocnění^{1,2}.

Inaktivující mutace v proteinech účastnících se DDR signálních drah jsou spojeny s rozvojem nádorových procesů, a proto tyto geny klasifikujeme jako tumor supresorové. Přenos signálů v DDR signálních dráhách je umožněn a regulován zejména díky posttranslačním modifikacím, jako je fosforylace (či defosforylace), acetylace nebo ubikvitinylace³. Zásadní roli zde plní enzymy z rodiny Ser/Thr proteinkinasy, jejichž mutace jsou často asociované s rozvojem nádorového onemocnění a které jsou zároveň častými cíli terapeutického zásahu⁴. DDR signální dráhy vedou k aktivaci proteinu p53, jehož funkce spočívá v regulaci transkripce genů důležitých pro zastavení buněčného cyklu, opravu DNA, apoptózu či metabolismus. V případě, že je buňka v genotoxickém stresu dlouhodobě, je protein p53 stabilizován prostřednictvím posttranslačních modifikací s cílem zvýšit transkripci genů důležitých pro regulaci progresu buněčného cyklu^{2,5,6}. V momentu, kdy je poškození DNA odstraněno, je aktivita DDR drah utlumena činností jejich negativních regulátorů, a to zejména ubikvitinligasou Mdm2 (z angl. „Mouse Double Minute 2“) a enzymy z rodiny Ser/Thr proteinfosfatas PPM (z anglického „metal-dependent protein phosphatases“). Zatímco proteinkinasy jsou relativně dobře prostudovanou enzymovou skupinou, úroveň poznání struktury a mechanismů funkce proteinfosfatas je dosud značně nízká. Jedním z klíčových negativních regulátorů signálních drah proteinu p53 je proteinfosfatasa PPM1D neboli WIP1 (z anglického „wild-type p53-induced protein 1“)^{7,8}. Fyziologickou funkcí této fosfatasy je homeostatická regulace v buňce a zajištění návratu buněk do klidového stavu⁹. Ovšem patologicky zvýšená exprese genu pro PPM1D byla nalezena v několika typech nádorů a v současnosti je tento enzym považován za onkogen¹⁰. Informace o struktuře a regulaci aktivity PPM1D jsou proto důležité v boji proti některým nádorovým onemocněním.

1.1 Odpověď buněk na poškození DNA – DDR dráha

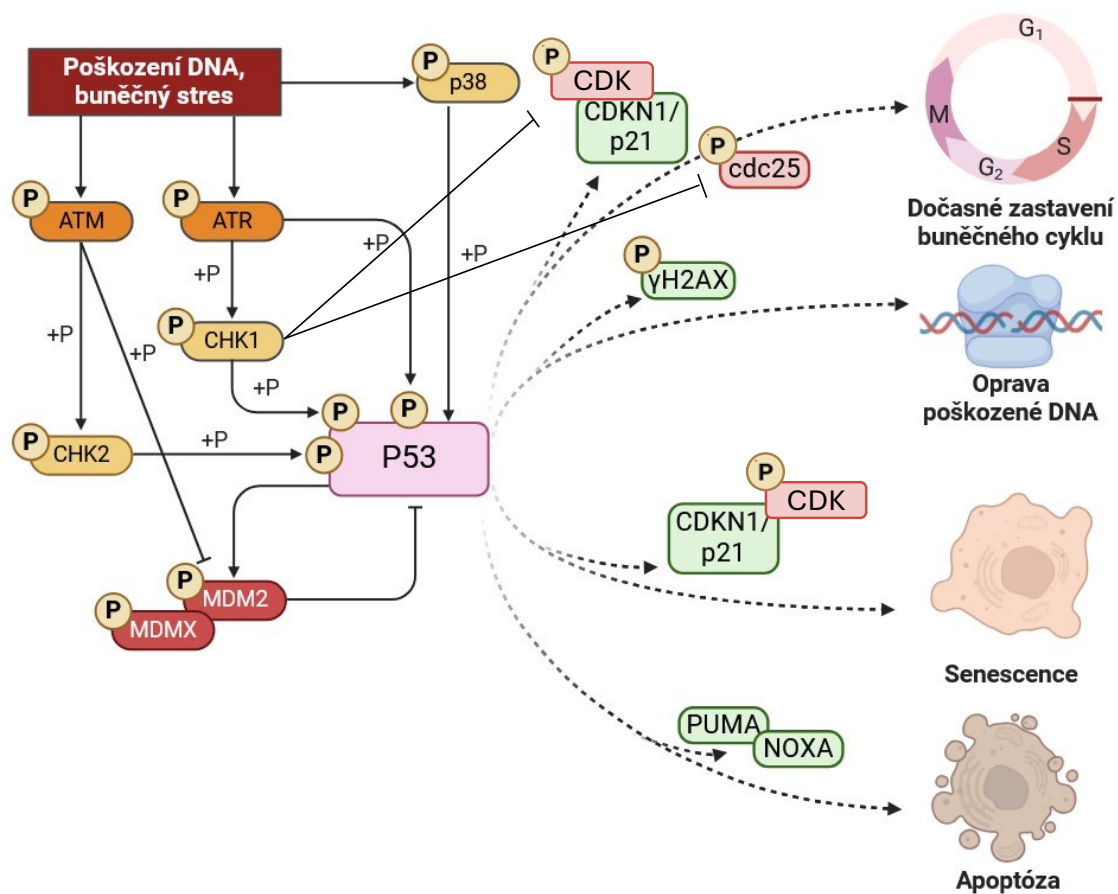
Genotoxický stres má různé podoby a úrovně a v závislosti od toho na něj buňka reaguje. Poškození DNA je rozeznáno sensorovými proteiny, které aktivují kinasy z fosfatidylinositol-3-kinasové rodiny. Konkrétně v případě dvouvláknových zlomů DNA je to kinasa ATM (z angl. „Ataxia Telangiectasia Mutated“) nebo v případě jednovláknových zlomů je to kinasa ATR (z angl. „Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein“)⁴. Tyto kinasy šíří fosforylací dalších kinas signál dál, a to nejdřív na efektorové kinasy Chk1 a Chk2 (z angl. „Checkpoint Kinase“), jejichž aktivitou dochází k inaktivaci cyklin-dependentních kinas (CDK) (viz Obrázek 1, str. 11). CDK jsou aktivní ve své nefosforylované formě. Defosforylací CDK zabezpečují cdc25 fosfatasy (z angl. „cell division cycle 25“). Cdc25 fosfatasy jsou také inaktivovány v důsledku fosforylace kinasami Chk1 a Chk2, díky čemuž CDK nemůžou být zpětně aktivovány. Výsledkem je zastavení buněčného cyklu^{11–13}.

K zastavení buněčného cyklu může v buňce dojít i jiným způsobem. V případě dvouvláknových zlomů v DNA se spouští kaskáda ATM/Chk2 vedoucí k apoptóze nebo k zastavení buněčného cyklu přes dráhu p53/p21 (viz Obrázek 1, str. 11)^{13,14}. Protein p53, jakožto transkripční faktor, je v této kaskádě klíčovým aktérem. Ve fyziologickém stavu, to znamená ve stavu, kdy nedošlo k poškození DNA, je množství a aktivita proteinu p53 regulována a udržována na nízké bazální úrovni. To zabezpečuje E3 ubikvitinligasa Mdm2, jejíž funkce vede k ubikvitinylaci p53, což indukuje jeho export z jádra a následnou degradaci proteasomem¹. Jeho transkripční aktivita je také negativně řízena proteinem Mdmx (ubikvitinylačně neaktivní homolog Mdm2)^{15–17}. Nicméně, v důsledku poškození DNA je p53 posttranslačně modifikován kinasami ATM/Chk2, což vede k jeho stabilizaci, tetramerizaci a ke zvýšení jeho transkripční aktivity (viz Obrázek 1, str. 11). Konkrétně kinasa ATM zvyšuje transkripční aktivitu proteinu p53 skrze fosforylací na pozici Ser15. Tato fosforylace vede u p53 ke změně v doméně vázající DNA. Takto fosforylovaný p53 zároveň není ubikvitinylován Mdm2 a tedy jeho proteosomální degradace je eliminována¹⁸. Díky tomu p53 indukuje expresi genů účastnících se procesu apoptózy, zastavení buněčného cyklu či opravy DNA¹⁹. Primárním transkripčním cílem proteinu p53 je i gen pro CDKN1/p21, který inhibuje CDK a dočasně zastavuje buněčný cyklus v G1, resp. G2 fázi (viz Obrázek 1, str. 11)¹⁴.

Kromě trvalého nebo dočasného zastavení buněčného cyklu je buňka v reakci na poškození DNA schopna i aktivně zahájit procesy opravy těchto poškození. V kontextu těchto signálních drah je toho umožněno fosforylací histonu H2AX kinasou ATM v pozici Ser139 v oblasti chromatinu blízko DNA poškození (viz Obrázek 1, str. 11). Fosforylovaná forma

H2AX histonu (označována jako γ H2AX) je značkou pro poškozenou oblast DNA a zároveň je klíčová pro spojení poškozeného chromatinu s opravným proteinovým aparátem²⁰.

Další způsob reakce buněk na poškození DNA skrze protein p53 je exprese proapoptických proteinů BAX (z angl. „Bcl-2-associated X protein“), PUMA (z angl. „p53 upregulated modulator of apoptosis“) nebo NOXA (z latinského „*noxa*“, což znamená poškození)²¹. Tyto proteiny indukují apoptózu uvolněním cytochromu c z mitochondrií, který se pak v cytosolu váže na apoptický faktor aktivující proteasu 1 (APAF1) a indukuje tzv. vnitřní apoptózu²². Průběh těchto signálních drah je schematicky znázorněn na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schematické znázornění signální dráhy zahájené při poškození DNA. Poškození DNA vede k aktivaci ATR/Chk1 dráhy, která cílí na cdc25 rodinu fosfatasy s cílem zabránit aktivaci CDK kinas, což vede k zastavení buněčného cyklu. Dvouvláknové zlomy v DNA indukované ionizujícím zářením aktivují ATM kinasu, která fosforyluje p53 a Mdm2, což vede k celkové stabilizaci p53. Ten pak může indukovat expresi CDKN1/p21. Primárním cílem ATM kinas je histon H2AX, jehož fosforylovaná forma (γ H2AX) spouští opravné mechanismy. Vysoká úroveň aktivace p53 pak vede k expresi proapoptických proteinů PUMA a NOXA a posléze k apoptóze. Obrázek byl připraven pomoci šablony „Protein Function Scheme“ v internetovém programu BioRender.com.

1.2 Negativní regulace a ukončení DDR dráhy

Za normálních okolností je hladina p53 regulována zejména díky aktivitě E3 ubikvitinligasy Mdm2²³. Gen, který kóduje Mdm2, je zároveň transkripčním cílem proteinu p53 a po opravě DNA je tak koncentrace p53 v buňce zpětnovazebně snížena zvýšenou transkripcí genu *MDM2*²⁴. V důsledku poškození DNA ale v rámci DDR dráhy dochází mimo jiné k fosforylaci p53 na pozici Ser15, což vede k neschopnosti Mdm2 p53 vázat (viz kapitola 1.1, str. 10)¹⁸. Během tohoto procesu dochází aktivitou kinasy ATM k fosforylaci i u Mdm2 na pozici Ser395, jejíž aktivita je touto modifikací značně snížena. Díky tomu je protein p53 v jádře kumulován a jeho transkripční aktivita je zvýšena (viz Obrázek 1, str. 11)²⁵. Fosforylace má v kontextu DDR drah tedy nezastupitelné postavení. Opačným procesem, tedy defosforylací, lze průběh DDR zvrátit. Proto mají v regulaci a ukončení DDR drah významné postavení proteinfosfatasy. Takovým příkladem je proteinfosfatasa PPM1D, která specifickou defosforylací cílových proteinů negativně reguluje signální dráhy vedoucí k opravě DNA (viz kapitola 1.3.3, str. 22)¹.

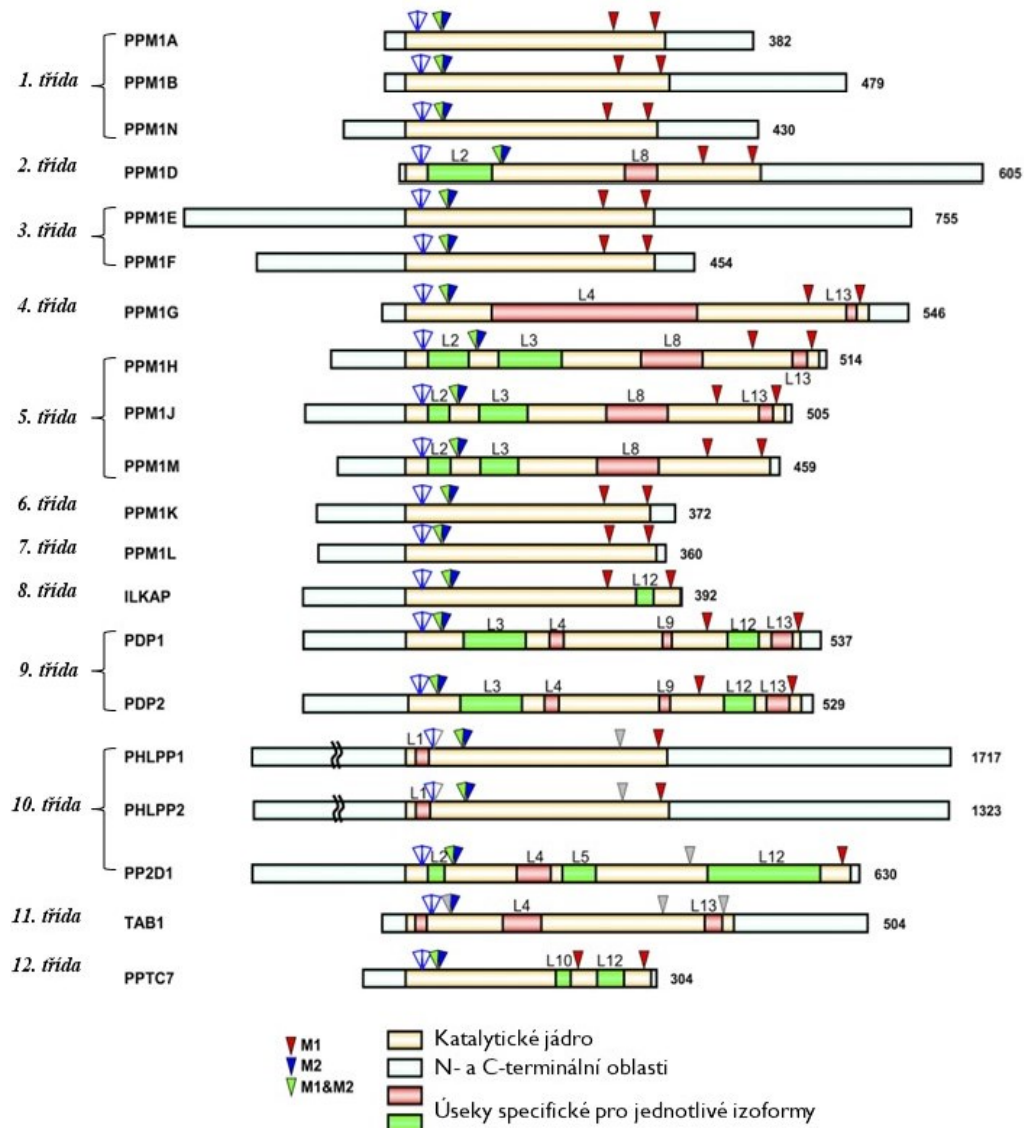
1.3 Proteinfosfatasy a jejich role

Proteinfosfatasy hrají důležitou roli v několika buněčných procesech, včetně diferenciaci, proliferace nebo také odpovědi buněk na stres. V rámci této odpovědi je zásadním prostředkem pro přenos signálu fosforylace (viz kapitola 1.1, str. 10). Zatímco funkcí proteinkinasy je přenos fosfátové skupiny z ATP na protein, čímž můžou radikálně měnit jejich vlastnosti, proteinfosfatasy naopak fosfátovou skupinu z proteinů odstraňují. Právě díky regulaci reverzibilní proteinové fosforylace se z proteinfosfatasy stává významný hráč na poli signálních kaskád.

Proteinfosfatasy lze rozdělit do několika skupin dle jejich substrátové specifity vůči různým fosforylovaným aminokyselinovým postranním řetězcům [threonin/serin (tvoří 98 % proteinfosfatasy), tyrosin, histidin...]^{26,27}. Ser/Thr proteinfosfatasy lze pak rozdělit do dvou evolučně nepříbuzných rodin PPP (z angl. „PhosphoProtein Phosphatase“) a PPM (z angl. „Protein Phosphatase Metal-dependent“)²⁸. V kontextu této práce je významná skupina PPM proteinfosfatasy, pro jejichž funkci jsou nezbytné kationty kovu ve vysokých koncentracích. Tato třída byla v minulosti označována také jako PP2C, což napovídá, že pro jejich katalytickou funkci jsou důležité dva ionty kovu²⁷. Rodina PPM proteinfosfatasy je jednou z nejvíce konzervovaných genů v organismech^{29,30}. Savci exprimují 20 různých izoform (viz Obrázek 2, str. 13), jejichž rozdíly jsou dány aminokyselinovými substitucemi a insercemi v katalytickém centru či různými adicemi na obou koncích proteinů²⁷. Vysoce konzervováno je zejména katalytické jádro PPM fosfatasy²⁷.

1.3.1 Strukturní charakterizace PPM fosfatas

PPM fosfatasy se v buňce fyziologicky vyskytují jako monomerní proteiny s vázanými ionty kovu, kterým obvykle bývá hořečnatý iont. Jednotlivé enzymy z PPM rodiny se liší svými C- a N-terminálními doménami, či insercemi v rámci katalytické domény, díky kterým mají unikátní vlastnosti v kontextu interakce s vazebnými partnery, rozeznávání substrátů či substrátové specifity (viz kapitola 1.3.2, str. 15)²⁷. Na základě sekvenční homologie můžou být lidské izoformní enzymy z PPM rodiny rozděleny do 12 tříd (viz Obrázek 2).

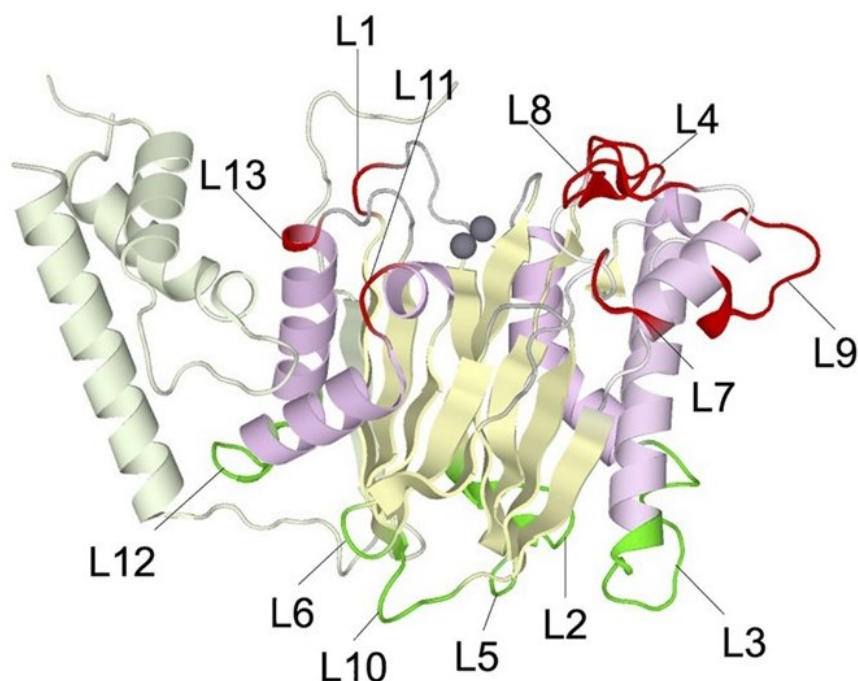


Obrázek 2: Schematické znázornění 12 tříd lidských izoform PPM fosfatas. Jednotlivé izoformy se liší různými insercemi v rámci katalytického jádra, různou délkou C- a N-terminálních oblastí proteinů. Vysoce konzervované je katalytické jádro PPM fosfatas obsahující aminokyselinové řetězce zodpovědné za vazbu iontů kovu (modré, zelené, červené šipky). Některé z izoform tyto aminokyselinové řetězce během evoluce ztratily a jejich katalytické vlastnosti se od jiných PPM fosfatas liší. Převzato a upraveno z²⁷.

Prvním a zároveň nejlépe prostudovaným enzymem z rodiny PPM fosfatas je PPM1A, jejíž krystalová struktura byla vyřešena v roce 1996³¹. Nicméně vzhledem k vysoké konzervaci genů pro PPM fosfatasy (i na základě vyřešených struktur dalších izoforem PPM1B, PPM1K) lze níže uvedené informace zobecnit pro většinu z enzymů z této rodiny.

Katalytické jádro PPM fosfatas obsahuje centrální β -sendvič, který je obklopen pěti α -helixy, přičemž takovéto uspořádání vytváří kavitu, v níž jsou chelatovány dva dvojmocné ionty kovu (viz Obrázek 3, str. 15)^{28,31}. Každý z iontů kovu je oktaedricky koordinován postranními řetězci aminokyselin a molekulami vody. Ionty kovu tímto způsobem pomáhají vázat a aktivovat molekuly vody, které se pak nukleofilním útokem na atom fosforu podílí na defosforylaci cílových fosforylovaných proteinů^{28,31}. Strukturální studie z roku 2018 dokonce potvrdila vazbu až třech iontů (Ca^{2+}) v katalytickém centru³². Třetí iont kovu je v struktuře PPM1A vázán velmi slabě (submikromolární afinity pro první dva ionty, vs. milimolární afinita pro třetí iont kovu), což naznačuje, proč enzymy z této rodiny vykazují *in vitro* fosfatasovou aktivitu jen v koncentracích hořečnatých iontů v řádu desítek mmol/l^{33} . Zajímavé je porovnání s intracelulární koncentrací hořčíku v buňkách. Absolutní koncentrace hořečnatých iontů se pohybuje na úrovni 15–25 mM, ale velká většina z tohoto hořčíku je vázána na nukleových kyselinách a proteinech. Odhaduje se, že koncentrace volných hořečnatých iontů je tak mnohem nižší (zhruba 2–3mM) a tak zůstává otázkou, jakým způsobem je v buňce zajištěn přístup hořečnatých iontů pro PPM fosfatasy³⁴.

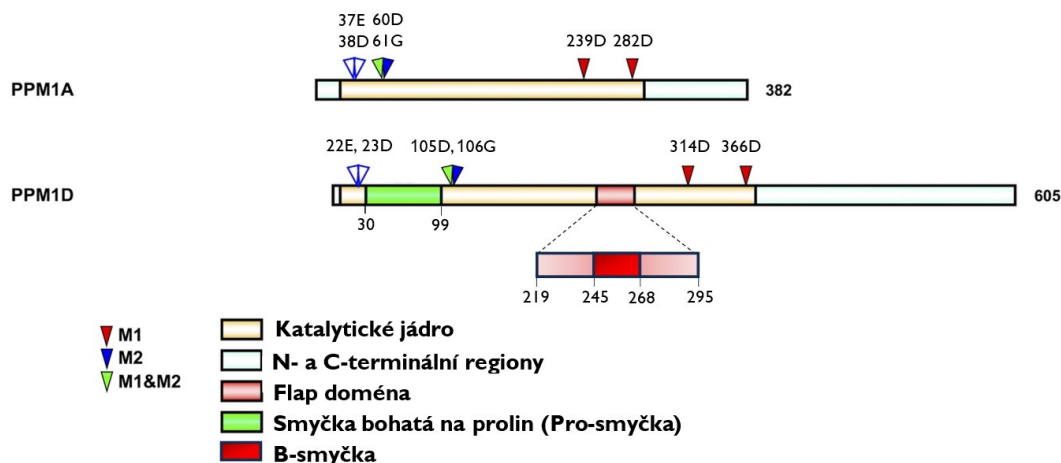
I když jsou hořečnaté ionty vázány preferenčně, některé studie potvrdily aktivační vliv i u vazby železnatých iontů³⁵. Naopak inhibiční vliv na fosfatasovou aktivitu PPM fosfatas mají kademnaté ionty, jejichž toxický účinek může být zapříčiněn i tímto jevem³⁶. Vzhledem k velkému významu iontů kovu pro aktivitu PPM fosfatas není překvapením, že aminokyselinové řetězce zodpovědné za vazbu iontů kovu jsou v rámci celé PPM rodiny vysoce konzervovány. U izoforem, které některé z těchto aminokyselin ztratily, se jejich nepřítomnost projevila sníženou nebo dokonce žádnou fosfatasovou aktivitou a řadíme je do skupiny pseudofosfatas. Vysoce konzervovaných je také několik glycinových a argininových zbytků na N-terminálním konci PPM fosfatas, které se zřejmě podílejí na stabilizaci katalytického jádra²⁷.



Obrázek 3: Krystalová struktura PPM1A (PDB: 4RA2). Struktura katalytického jádra je vysoce konzervována napříč izoformami PPM fosfatas. Katalytické jádro je složeno z β -skládaných listů tvořících β -sendvič (žlutě), který je z obou stran obklopen α -helixy (fialově). Krystalová struktura ukazuje vazbu dvou iontů kovů v katalytickém jádře (černě), ale na základě novějších strukturálních studií lze předpokládat i slabou vazbu třetího iontu kovu, což může také vysvětlovat potřebu milimolárních koncentrací hořečnatých iontů pro aktivitu enzymů z této rodiny. Červeně jsou znázorněny smyčková spojení (L) na straně katalytického centra, zeleně zase spojení na opačné straně. Převzat z²⁷.

1.3.2 Strukturální charakterizace PPM1D: Specifické úseky – klinický význam, konformace, konzervace

Jak lze vidět na Obrázku 2 (str. 13), jednotlivé izoformy v PPM rodině se od sebe liší přítomností různých sekvencí v rámci katalytického jádra, nebo insercemi či delecemi na jejich N- a C-konci. Tyto úseky zřejmě vedou k určení funkce a specifity jednotlivých izoform. Vhodným příkladem jsou rozdíly mezi izoformami PPM1A a PPM1D. Přesto, že oba enzymy sdílejí vysoce konzervované katalytické jádro, přítomnost dvou specifických sekvencí u PPM1D má za důsledek to, že zatímco PPM1A vykazuje tumor supresorovou aktivitu, PPM1D je díky své aktivitě v buňce prokázáným onkogenem^{32,37}. Na Obrázku 4 (str. 16) je schematicky znázorněn rozdíl v primární struktuře PPM1A a PPM1D. Jak je uvedeno v kapitole 1.3.1 (str. 13), krystalová struktura PPM1A byla vyřešena. V červenci 2024 byla publikovaná studie, která jako vůbec první přináší experimentální detailní strukturu katalytické domény PPM1D.

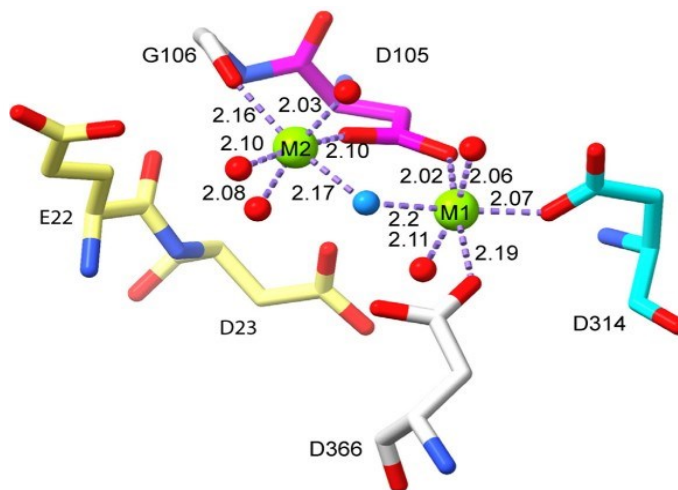


Obrázek 4: Rozdíl v primární struktuře dvou nejvíce studovaných zástupců PPM rodiny proteinfosfatas PPM1A a PPM1D. Struktura PPM1D se vyznačuje přítomností dvou specifických sekvencí. Konkrétně se jedná o úsek 30-99, který představuje specifickou smyčku bohatou na proliny a úsek 219-295, který se v literatuře označuje pojmem flap doména, vzhledem na předpokládanou vysokou konformační heterogenitu. Flap doména (obsahující B-smyčku specifickou pro PPM1D) je velmi studovaným úsekem tohoto enzymu, který se s největší pravděpodobností podílí na substrátové specifitě enzymu PPM1D. Důležitou roli zřejmě hraje i při inhibici enzymové aktivity PPM1D. Význam prodloužené C-terminální domény pro PPM1D není znám. Na obrázku jsou vyznačeny řetězce zodpovědné za vazbu iontů kovů (M1 – aminokyselina vázající jeden iont, M2 – aminokyselina vázající druhý iont, M1&M2 – aminokyseliny vázající oba ionty kovů). Prázdnými modrými šipkami jsou znázorněny řetězce, které tvoří vodíkové vazby s molekulami vody. Tyto molekuly vody koordinují ionty kovů v aktivním centru. Obrázek převzat a upraven z²⁷.

1.3.2.1 Krystalová struktura katalytické domény PPM1D

Vzhledem k vysokému zastoupení nestrukturovaných úseků ve struktuře fosfatasy PPM1D byla její strukturní charakterizace obtížná. V červenci 2024 byla publikována studie, ve které autoři pomocí rentgenostrukturní analýzy přinášejí detailní pohled na strukturu katalytické domény PPM1D³⁸. V rámci studie autoři pracovali s několika proteinovými konstrukty, které byly optimalizovány tak, aby poskytovaly rozpustný protein schopný tvořit krystaly. Katalytická doména PPM1D obsahuje 2 vysoce specifické úseky: smyčku bohatou na prolin (30–99) a B-smyčku (součást flap domény, 235–268). Pro získání detailní struktury autoři použili proteinový konstrukt PPM1D (1–403, Δ 37–94, R250A, R258A, R259A, G8R, P33E). Finální krystalová struktura tedy neobsahuje informace o smyčce bohaté na prolin (informace o tomto úseku viz kapitola 1.3.2.4, str. 20). Zároveň finální konstrukt obsahuje mutace některých aminokyselin v oblasti B-smyčky (informace o flap doméně a B-smyčce viz kapitola 1.3.2.3, str. 19). Nicméně i přes tato omezení přináší studie mimořádně užitečné informace o struktuře katalytické domény PPM1D, které mohou přispět k lepšímu pochopení mechanismu působení PPM1D či k návrhu specifických inhibitorů³⁸.

Struktura demonstruje vysokou konzervaci katalytického jádra PPM rodiny, které obsahuje centrální β -sendvič s dvěma α -helixy na jedné straně a třemi α -helixy na druhé straně. V souladu se strukturami jiných fosfatů z PPM rodiny jsou v katalytickém jádře vázány dva hořečnaté ionty koordinovány aminokyselinovými řetězci a molekulami vody znázorněnými na Obrázku 5³⁸.

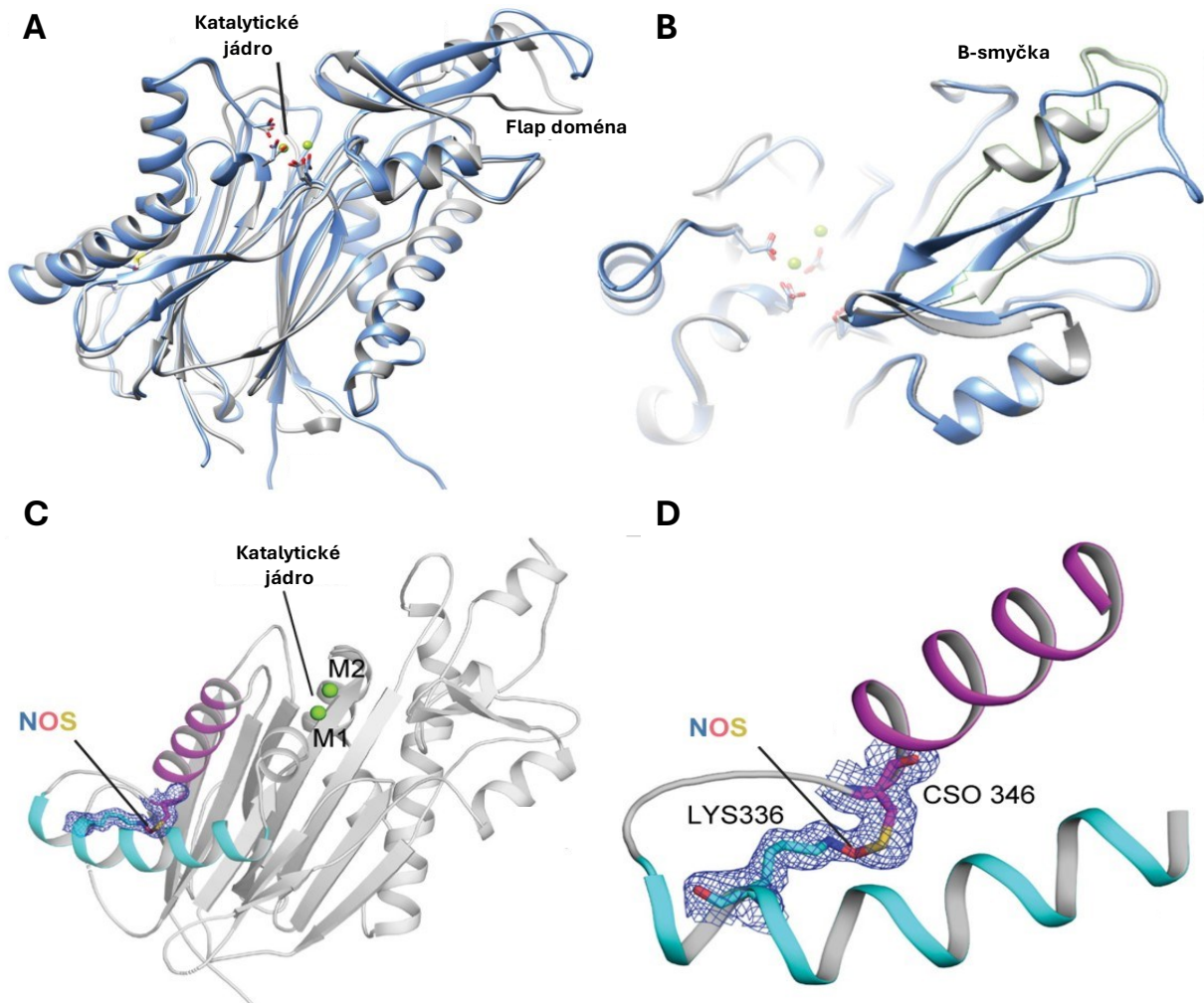


Obrázek 5: Geometrie katalytického jádra s vázanými dvěma hořečnatými ionty (M1, M2, zelené koule). Za vazbu iontů v katalytickém jádře jsou zodpovědné aminokyselinové řetězce D105, G106 (skrze karbonylovou skupinu), D314, D366 a E22, D23, které vážou ionty nepřímo skrze tvorbu vodíkových vazeb s molekulami vody (červené koule). Obrázek převzat z³⁸. (PDB:8T2J)

Významná je informace o flap doméně s B-smyčkou specifickou pro PPM1D (o významu flap domény s B-smyčkou je pojednáváno v kapitole 1.3.2.3, str. 19). Naproti strukturním predikcím (využitím algoritmu Alphafold2) je B-smyčka v krystalové struktuře tvořena β -skládaným listem následovaným α -helixem (viz Obrázek 6, panel A, B). Struktura ale v této oblasti obsahuje několik mutací (R250A, R258A, R259A), které mohou mít vliv na konformaci B-smyčky³⁸.

Zajímavým výstupem z této studie je pozorování tvorby NOS můstku (z angl. „Nitrogen-Oxygen-Sulphur“) mezi Lys336 a Cys346 (viz Obrázek 6, panel C, D). Tvorba takových můstků v proteinech je strukturními biology pozorována jen krátce a jejich vliv na funkci proteinů není zcela objasněn. Předpokládá se, že k jejich tvorbě v buňkách dochází v reakci na oxidativní stres s cílem předejít nevratné oxidaci postranních řetězců cysteinů. Kinetická měření mezi proteiny bez a s NOS můstkem neprokázala výrazný rozdíl v katalytické aktivitě. Oba aminokyselinové řetězce jsou ale mezi savci a ptáky vysoce konzervovány, což může naznačovat jejich funkční význam (protektivní či alosterický)³⁸. Další kapitoly shrnují

dosavadní informace o významu jednotlivých úseků PPM1D a vycházejí ze strukturálních predikcí.



Obrázek 6: Znázornění důležitých strukturálních prvků PPM1D vycházejících z krystalové struktury katalytické domény PPM1D (PDB:8T2J). A) Porovnání experimentální krystalové struktury PPM1D (šedě) se strukturou predikovanou algoritmem AlphaFold2 (modře). (B) Přibližný pohled na superponovanou konformaci B-smyčky poukazuje na rozdíly mezi strukturální predikcí (modře) a experimentální strukturou (šedě). (C) Krystalová struktura katalytické domény PPM1D se zvýrazněnou pozicí NOS můstku, jehož tvorba byla v krystalové struktuře pozorována. (D) Detailní pohled na NOS můstek mezi Lys336 a Cys346, který vytváří spojení mezi dvěma α -helixy (modře a fialově). Převzato z³⁸.

1.3.2.2 C-terminální doména

Proteinfosfatasa PPM1D je složena z 605 aminokyselin. Sekvenci je možno rozdělit na dvě hlavní subdomény. Výrazně prostudovanější částí je vysoce konzervovaná N-terminální fosfatasová doména (1–375) následovaná méně konzervovanou C-terminální oblastí (376–605). U savčích orthologů PPM1D je C-terminální doména konzervována poměrně dobře s minimem podobnosti s ostatními izoformami z PPM rodiny^{39,40}. Naproti tomu je konzervace C-terminální domény u nesavců výrazně nižší⁴⁰. Podle strukturálních predikcí se jedná o vysoce

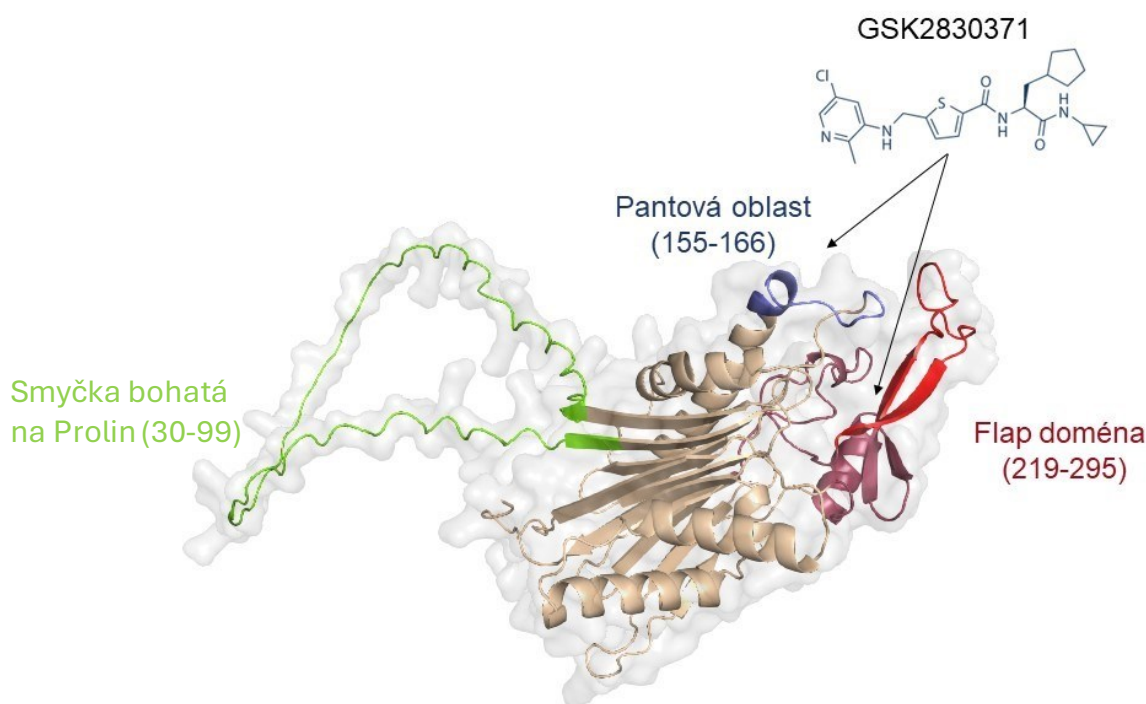
nestrukturovanou oblast. V několika typech nádorů bylo pozorováno několik zkrácených variant právě na C-konci proteinu. Jednou z častých zkrácených variant je PPM1D₁₋₄₁₀. I když nebylo pozorováno, že by protein s C-terminální delecí vykazoval vyšší nebo nižší aktivitu *in vitro*, několik studií prokázalo, že takto zkrácený protein je v buňce stabilnější, což umožňuje jeho akumulaci, a proto jeho buněčná aktivita roste⁴¹.

1.3.2.3 Flap doména a pantová oblast

Vzhledem k vysoké konzervaci katalytického jádra napříč různými izoformami PPM fosfatase je selektivní inhibice PPM1D (nebo jiných zástupců z PPM rodiny) kompetitivními inhibitory poměrně náročným úkolem, a proto byla snaha objevit inhibitory vázající se mimo katalytické centrum, které by PPM1D selektivně a efektivně inhibovali. Screeningem chemických knihoven byla objevena molekula GSK2830371, která vůči fosfatase PPM1D vykazuje vysokou specifitu a afinitu⁴². Selektivita tohoto inhibitoru se stala hned oblastí zájmu, přičemž studie z roku 2014 prokázala vazbu do alosterického místa mimo aktivní centrum enzymu a položila základ pro studium molekulárního mechanismu možné inhibice PPM1D⁴². V literatuře se dnes toto místo označuje pojmem flap doména (z angl. „flap“ = mávat). Konkrétně se tímto pojmem označuje aminokyselinová sekvence 219–295 (viz Obrázek 4, str. 16). V rámci flap domény byl ještě dřív popsán aminokyselinový úsek 235–268, který je bohatý na bazické aminokyseliny a který je označován jako B-smyčka. B-smyčka je pro fosfatase PPM1D vysoce specifická. Předpokládá se, že tento kladně nabitý úsek se podílí na vazbě a rozeznávání záporně nabitě fosfátové skupiny^{1,43}. Vysoký obsah bazických aminokyselin v této oblasti také koresponduje s velkým výskytem kyselých aminokyselin v okolí fosforylovaných motivů substrátů. Na B-smyčce je lokalizována jedna ze dvou NLS sekvencí (z angl. „nuclear localisation sequence“), která se nachází v úseku 247-KRPR-250 (druhá NLS je pak přítomná na C-konci proteinu v úseku 535–552)¹. Konformace flap domény a B-smyčky je znázorněna na Obrázku 6 (str. 18, panel A, B) no je možné předpokládat, že při vazbě substrátů zajímá jiné, kompaktnější uspořádání³⁸.

Jak již název flap domény naznačuje, jedná se pravděpodobně o konformačně heterogenní část proteinu. Pochopení těchto konformačních změn a jejich důsledků pro aktivitu enzymu může být mimo jiné zásadní také pro vývoj dalších inhibitorů PPM1D nebo optimalizaci vlastností již známých molekul (jako třeba GSK2830371). V posledních letech přibýlo několik studií, které se konformačním změnám flap domény a pochopením mechanismu inhibice PPM1D zabývají. Podle strukturní studie z roku 2022 se PPM1D v roztoku nachází v rovnováze dvou konformačních stavů, které jsou definovány pohyby flap domény⁴⁴. PPM1D

takto přechází mezi aktivním a neaktivním stavem. Tento přechod je zprostředkován díky flexibilitě části enzymu, kterou autoři studie označují pojmem pantová oblast (z angl. „hinge region“). Důležitým závěrem této studie je také zjištění, že za vazbu inhibitoru GSK2830371 není zodpovědná flap doména, ale právě tato nově identifikovaná pantová oblast (úsek 155–166), která je také vysoce specifická pro PPM1D (viz Obrázek 7)⁴⁴. Vazba GSK2830371 do této proteinové oblasti podle studie indukuje pohyb flap domény a způsobuje posunutí rovnováhy směrem k neaktivní formě enzymu⁴⁴.



Obrázek 7: Struktura fosfatasové domény PPM1D predikována algoritmem AlphaFold2 s možnými vaznými místy pro molekulu GSK2830371. Studie se mezi sebou liší v pohledu na možnou vazbu inhibitoru GSK2830371. Dřívější studie a predikce naznačovaly vazbu inhibitoru do úseku zvaného flap doména (červeně)⁴². Novější studie z roku 2022 ale identifikovala novou specifickou oblast pro PPM1D, tzv. pantovou oblast (modře), která má být za vazbu inhibitoru zodpovědná. Vazba inhibitoru do pantové oblasti podle této studie způsobuje konformační změnu flap domény, což vede k inhibici enzymu⁴⁴. Zeleně je na obrázku vyznačena smyčka bohatá na prolin (30–99). Obrázek byl vytvořen v programu PyMol⁴⁵.

1.3.2.4 Smyčka bohatá na prolin a posttranslační modifikace PPM1D

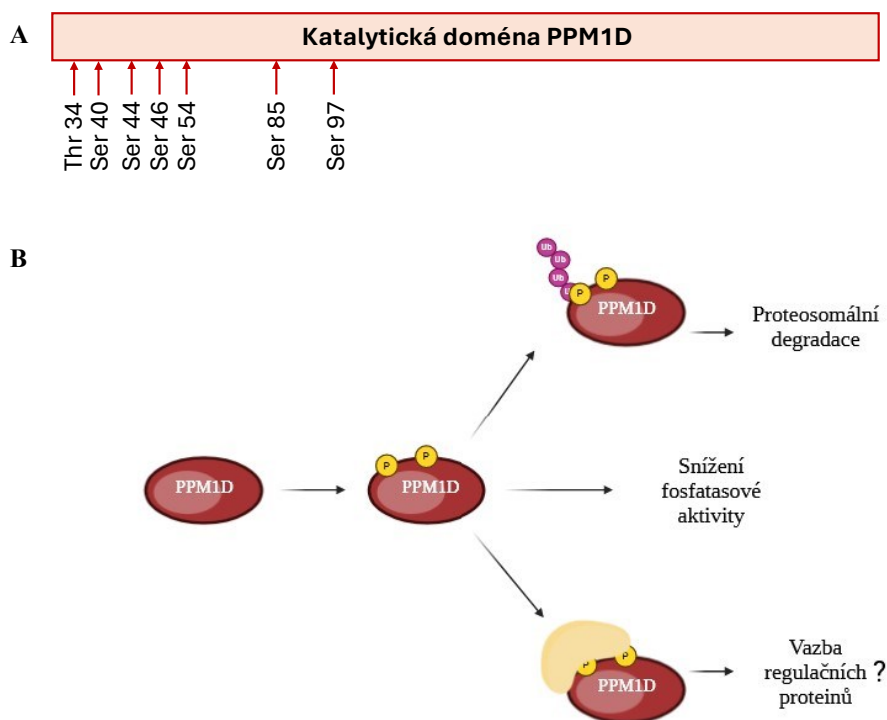
V katalytické doméně je přítomen ještě jeden, pro PPM1D specifický úsek, který je označován jako smyčka bohatá na prolin (dále jen Pro-smyčka). Jedná se o úsek 30–99, a podobně jako C-terminální část proteinu vykazuje nízkou úroveň konzervace napříč organismy⁴⁴. Strukturní predikce naznačují nízkou míru strukturovanosti a vysokou flexibilitu v této oblasti. Význam této smyčky pro aktivitu a funkci proteinu není znám, ale některé studie prokazují, že je v této sekvenci lokalizováno několik míst, která v různých fázích buněčného cyklu podléhají fosforylaci (viz Obrázek 8, panel A, str. 22)⁴⁶. Dokonce všechny dosud identifikovaná

fosforylovaná (nebo potenciálně fosforylovaná) místa v rámci katalytické domény jsou přítomná na Pro-smyčce PPM1D⁴⁶.

Studie z roku 2013 identifikovala 7 fosforylačních míst v rámci katalytické domény (T34, S40, S44, S46, S54, S85, S97, viz Obrázek 8, panel A, str. 22) a dalších několik míst na C-terminální doméně proteinu⁴⁶. Z nich Ser40 byl v této studii potvrzen jako přímý cíl CDK1/cyklin B komplexu, ale z výsledků je zřejmé, že i zbylá místa během mitózy podléhají fosforylaci. Samotná fosforylace na Ser40 nevedla ke signifikantní změně fosfatasové aktivity v buňkách ale při ostatních fosforylovaných formách PPM1D byl zjevný významný pokles fosfatasové aktivity⁴⁶. Závěrem zmíněné studie je, že během mitózy dochází k rapidnímu poklesu fosfatasové aktivity PPM1D v buňkách, což je důsledkem dvou jevů, a to zvýšené míry proteosomální degradace PPM1D (skrze APC/C^{cdc20} systém) v kombinaci s negativním vlivem fosforylace na enzymovou aktivitu. Výsledkem je tedy snížení celkové aktivity PPM1D v buňkách. V tomto kontextu je ale důležité zmínit, že výsledky týkající se vlivu fosforylace na fosfatasovou aktivitu enzymu publikované v této práci vycházejí z fosfomimikujících mutací (ve kterých je fosforylované místo nahrazeno glutamátem), jejichž efekt ne vždy musí souhlasit s efektem skutečné fosforylace. Důležitou informací studie je i maximum hladiny PPM1D v G2 fázi, která ale při vstupu buněk do mitózy prudce klesá⁴⁶.

Již ze zmíněné studie (⁴⁶) je zřejmé, že CDK1 není jedinou kinasou regulující buněčnou aktivitu PPM1D. Jiná studie prokázala vztah mezi PPM1D a HIPK2 kinasou vedoucí k fosforylaci PPM1D na pozicích Ser54 a Ser85 (obě místa byla identifikována i ve výše zmíněné studii⁴⁶)⁴⁷. Jak zmiňuje kapitola 1.1 (str. 10), v reakci na poškození DNA se spouští signální dráha, která vede kromě jiného k fosforylaci kinasy HIPK2 kinasou AMPK α 2, což vede k rozpadu komplexu HIPK2/PPM1D a tedy k celkové stabilizaci PPM1D, která má svou aktivitou umožnit návrat buňky do původních, nestresových podmínek⁴⁷. Fosforylace na Ser54 a Ser85 je důležitá pro udržování nízké hladiny PPM1D za normálních nestresových podmínek skrze proteosomální degradaci zprostředkované právě díky těmto fosforylacím. Pro pozorování zvýšené ubikvitinylatione stačí dokonce fosforylace jenom jednoho ze dvou fosforylačních míst⁴⁷.

Vliv zbývajících identifikovaných fosforylačních míst na PPM1D dosud nebyl přesně objasněn. Závěrem lze shrnout, že i přes absentující strukturální informace o Pro-smyčce specifické pro PPM1D se zdá, že se jedná o funkčně důležitou oblast, která v buňce podléhá řadě posttranslačních modifikací, které výrazným způsobem ovlivňují její aktivitu (viz Obrázek 8, panel B, str. 22).



Obrázek 8: Schematické znázornění fosforylačních míst identifikovaných v rámci katalytické domény PPM1D (A). Výskyt fosforylace se pojí se snížením fosfatasové aktivity PPM1D v buňce. To může být výsledkem více jevů (B). Některé studie prokázaly zvýšenou proteosomální degradaci PPM1D v důsledku fosforylace. Fosforylace na zmíněných místech může také vést ke změně konformace PPM1D, čehož důsledkem může být snížená nebo žádná fosfatasová aktivita. Jedním ze scénářů vysvětlujících regulační vliv fosforylace je vazba regulačních proteinů, výsledkem které může být modifikace proteinové konformace, nebo stínění vazebného místa pro substrát. Obrázky byly vytvořeny v internetovém programu Biorender.com.

1.3.3 Substrátové spektrum PPM1D – specifita, fyziologické substráty, význam

Substráty proteinfosfatasy PPM1D jsou charakterizovány specifickými sekvenčními motivy, pro které je typická nízká evoluční konzervace, vysoké zastoupení vnitřně nestrukturovaných úseků, či vysoký obsah kyseliny glutamové⁴⁸. Mnoho z těchto substrátů obsahuje domény vázající DNA/RNA a podílejí se na opravě DNA. Konkrétní způsob, jakým fosfatasa PPM1D rozeznává své substráty není objasněn, ale tyto substráty sdílejí dva sekvenční motivy, které byly identifikovány jako specifické substráty pro PPM1D. Jedním z těchto motivů je pS/pTQ, druhým je pTXpY (viz Obrázek 9, panel B, str. 24)^{1,39,48}.

1.3.3.1 pS/pTQ sekvenční motiv

Fosforylace proteinů na tomto sekvenčním motivu je důsledkem signálních kaskád ATM/ATR kinas (viz Obrázek 9, panel A, str. 24). Jedná se zejména o proteiny v rámci drah vedoucích k opravě DNA. PPM1D je skrze jejich defosforylaci antagonistou vůči těmto procesům, a to hned na několika úrovních (viz Obrázek 1, str. 11). Nicméně, bylo ukázáno, že pouze třetina fosforylovaných proteinů s tímto motivem je fosfatasa PPM1D opravdu defosforylována,

a tak zůstává nezodpovězenou otázkou, jakým způsobem PPM1D rozeznává své substráty. Odpověď buněk na poškození DNA silně závisí na aktivitě fosfatidylinositol-3-kinasové rodiny kinas ATM, ATR a DNA-PK (viz Obrázek 1, str. 11)⁴⁹. Jak je zmíněno v kapitole 1.1 (str. 10), fosforylace je v této dráze klíčovým aktivačně-regulačním prvkem, a proto je defosforylace zúčastněných proteinů pro regulaci kaskády mimořádně důležitá. PPM1D defosforyluje ATM kinasu na pozicích Ser1981 a Ser365, čímž snižuje její aktivitu⁵⁰. Dalšími substráty pro PPM1D jsou Chk1 (Ser345), Chk2 kinasa (Thr68) a H2AX (Ser139)⁵¹⁻⁵⁶. Dráhy, kterých se účastní tyto proteiny vedou k fosforylaci p53, který je efektorovým proteinem této kaskády. PPM1D také přímo negativně reguluje p53 skrze defosforylaci na pozici Ser15⁵⁶. Významným negativním regulátorem p53 je i ubikvitinligasa Mdm2, která je v důsledku kaskády také fosforylována, čehož výsledkem je snížení její aktivity. Fosfatasa PPM1D defosforyluje Mdm2 (Ser395), čímž její aktivitu obnovuje^{57,58}.

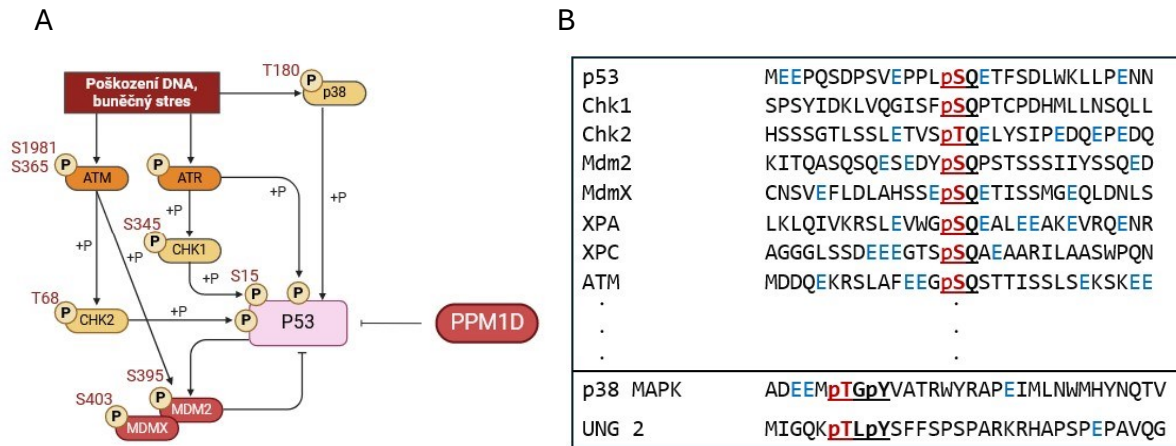
1.3.3.2 pTXpY sekvenční motiv

Dosud byly s tímto motivem identifikovány dva fyziologické substráty, a to kinasa p38 MAPK a uracil-DNA-glykosylasa 2 (UNG2). p38 MAPK byl vůbec první identifikovaný substrát PPM1D a v buňce se podílí na regulaci p53 jeho fosforylací na pozici Ser33 a Ser46 a tím i na procesech vedoucích k opravě DNA⁵⁹. p38 MAPK je aktivována fosforylací na pozicích Thr180 a Tyr182 díky kinasám MKK4/6 (z angl. „MAP kinase kinase 4/6“)⁶⁰. Fosfatasa PPM1D inaktivuje p38 MAPK defosforylací na pozici Thr180, čímž také nepřímou reguluje aktivitu p53⁵⁹.

Později byl identifikován další substrát s tímto motivem, kterým je UNG2. Tento enzym se podílí přímo na opravě DNA v procesu excizní reparace bází a jeho aktivita v buňce se zvyšuje po expozici buněk UV zářením. UV zářením vyvolána fosforylace UNG2 na pozici Thr6 a Thr126 skrze MKK kinasu vede k aktivaci UNG2. PPM1D se podílí na regulaci mechanismů opravy DNA defosforylací UNG 2 na pozici Thr6⁶¹.

Při *in vitro* měřeních vykazuje fosfatasa PPM1D aktivitu i vůči monofosforylovanému substrátu (pTXY) s konstantou substrátové specifity (k_{cat}/K_M) 6-8 krát nižší než pro difosforylované substráty (pTXpY)³⁹. Konkrétní aminokyselinové složení před a za tímto motivem podle kinetických studií nehraje při specifitě PPM1D roli, ale pro rozeznání takového peptidu je důležitá přítomnost sekvence dlouhé alespoň 5 aminokyselin. Optimální substrát s tímto motivem je ten, ve kterém X je jakákoliv alifatická aminokyselina. Naopak inhibiční schopnost vykazují peptidy s motivem pSI/VpY. I když bylo identifikováno mnoho proteinů s různými fosforylovanými motivy, fosforylovaný protein s tímto motivem (pSI/VpY) dosud

identifikován nebyl. Endogenní inhibitory s tímto motivem zřejmě neexistují, několik prací se ale zabývá studiem cyklických peptidů s tímto sekvenčním motivem za účelem selektivní inhibice fosfatasy PPM1D^{39,62}.



Obrázek 9: Substrátové spektrum proteinfosfatasy PPM1D. A) Schematické znázornění DDR signální dráhy s vyznačenými substráty fosfatasy PPM1D. Defosforylace těchto (a jiných) proteinů vede k destabilizaci p53 a dysregulaci celé kaskády. B) Sekvenční porovnání motivů rozeznávaných PPM1D. Proteinfosfatasa PPM1D rozeznává dva sekvenční motivy (pSQ, resp. pTXpY). Ze sekvenčního porovnání je vidět zvýšený obsah glutamové kyseliny (modře) v okolí fosforylované aminokyseliny. Mnohokrát se jedná o nestrukturované úseky proteinů, pro které je fosforylace klíčovým způsobem regulace. Obrázky byly vytvořeny v internetovém programu Biorender.com

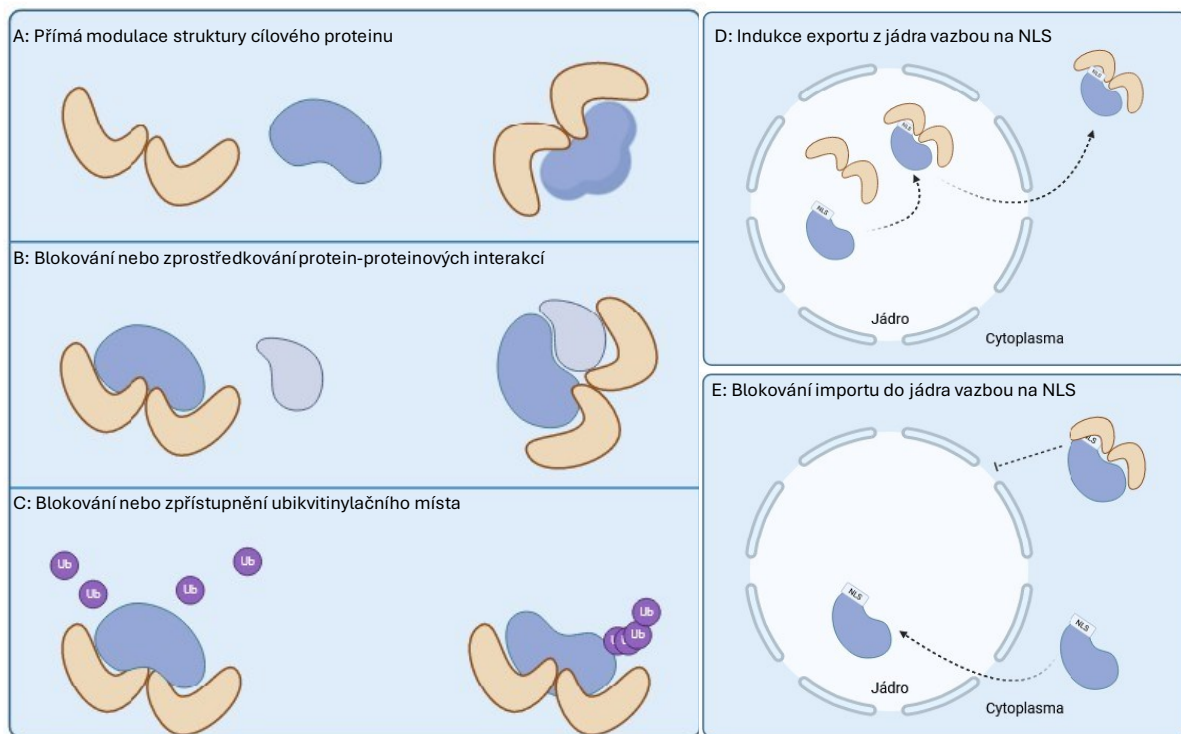
1.3.4 Proteiny interagující s fosfatou PPM1D

Kromě proteinkinas, které se podle novějších studií podílejí na regulaci aktivity PPM1D skrze fosforylaci (viz kapitola 1.3.2.4, str. 20), se zřejmě její regulace účastní i jiné, enzymově neaktivní proteiny, jejichž regulační aktivita spočívá ve vazbě na své vazebné partnery. Taková proteinová „lešení“ se v signálních kaskádách objevují běžně a studium těchto interakcí má proto velký význam. Studium molekul, které takovéto protein-proteinové interakce narušují může být významným krokem v léčbě nemocí.

Jak bylo zmíněno výše (viz kapitola 1.3.2.4, str. 20), některé proteinkinasy svou aktivitou zřejmě negativně regulují fosfatovou aktivitu PPM1D a tím přispívají k šíření signálu např. i při poškození DNA^{46,47}. Tento zásah do aktivity PPM1D se v buňce projevuje zvýšením hladiny fosforylovaných substrátů. Naproti tomuto jevu byl identifikován protein LZAP (z angl. „leucine-zipper-containing ARF-binding protein“), jehož exprese a funkce naopak souvisí s výrazným poklesem hladiny fosforylace u více proteinů (Chk1/2, p38 MAPK, Mdm2 aj.)^{63,64}. Až později ve studii z roku 2016 byla imunochemickými metodami prokázána interakce LZAP s fosfatou PPM1D vedoucí ke zvýšení aktivity PPM1D⁶⁵. Zajímavým zjištěním je i fakt, že LZAP kromě PPM1D váže i její substráty, což vede k hypotéze, že LZAP může v tomto ohledu sloužit jako lešení zprostředkávající interakci PPM1D se

substráty^{63,65,66}. Nicméně, žádnou z těchto interakcí se zatím biofyzikálními metodami nepodařilo popsat a tedy způsob, jakým LZAP reguluje aktivitu PPM1D zůstává dosud neznámý.

Protein-proteinovými interakcemi lidských proteinfosfatas se využitím kvantitativní afinitní proteomiky věnuje studie z roku 2017⁶⁷. Práce identifikovala pro PPM1D několik nových interakčních partnerů, mezi kterými se nachází i protein 14-3-3 β (data k této interakci byla součástí přílohy studie). 14-3-3 proteiny se na několika úrovních mimo jiné účastní i regulace p53 (interakcemi s jeho regulátory, či přímo vazbou na p53)⁶⁸. Proteiny 14-3-3 jsou homodimerní proteiny, které v buňkách rozeznávají fosforylované motivy. Vazbou na své interakční partnery moduluji jejich aktivitu, schopnost tvorby komplexů, či lokalizaci v buňce (viz Obrázek 10, str. 2522)⁶⁹.



Obrázek 10: Schematické znázornění role proteinů 14-3-3 v regulaci proteinů. Proteiny 14-3-3 katalytickou aktivitu postrádají. Jejich činnost je založena na vazbě jiných proteinů, čehož důsledkem může být: přímá modulace struktury vazebního partnera (A), která se projeví v jeho buněčné aktivitě; blokování nebo naopak umožnění tvorby protein-proteinových komplexů (B); regulace proteinů skrze umožnění nebo zabránění ubikvitinylace (C), nebo například vliv na lokalizaci proteinů v buňce (D, E).

2 Cíle

Byly stanoveny cíle diplomové práce:

- Optimalizace heterologní exprese proteinového konstruktu PPM1D NTD v buňkách *E. coli*
- Optimalizace purifikačního protokolu pro proteinový konstrukt PPM1D NTD
- Příprava vazných partnerů PPM1D (LZAP, p38 MAPK včetně fosforylované formy p38 MAPK) a příprava katalyticky neaktivní mutantní formy PPM1D NTD D314A
- Biochemická a strukturní charakterizace připraveného proteinového konstruktu PPM1D NTD
- Studium vlivu proteinu LZAP na aktivitu PPM1D NTD
- Studium vlivu proteinů 14-3-3 na aktivitu PPM1D NTD

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

ÄKTAprime	GE Healthcare, USA
centrifuga HERMLE Z323K	Hermle, Německo
centrifuga 5804 R (rotor A-4-44)	Eppendorf, Německo
centrifuga SIGMA 8K (rotor 12510-H)	Sigma, USA
centrifuga Rotina 420 R	Hettich, Švýcarsko
inkubátor HT Multitron	Infors, Švýcarsko
inkubátor Shaking Incubator NB-205	N-Biotek, Korea
peristaltická pumpa	IDEX Health & Science, Švýcarsko
pH-metr JENWAY 3505	P-LAB, Česko
Sonicator3000 Misonix	Cole-Parmer, USA
spektrofotometr NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Inc., USA
spektrofotometr The Infinite™ 200	TECAN, Group Ltd., Švýcarsko
termoblok	Grant, UK
termocyklér TProfessional Basic	Analytik Jena, Německo
transluminátor Fusion Solo S	Vilber, Francie
zdroj pro horizontální agarosovou elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
zdroj pro SDS-PAGE elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

3.2 Ostatní materiál a pomůcky

aparatura pro elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
dialyzační membrány (MWCO = 14 kDa)	SERVA, Německo
<i>E.coli</i> kmen BL21(DE3)	Stratagene Corporation, USA
<i>E.coli</i> kmen DH5α	Stratagene Corporation, USA
filtry SPARTAN 13/0,45 RC	GE Healthcare, USA
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
Kolona MBPTrap™ HP	GE Healthcare, USA
kolony pro gelovou permeační chromatografii	GE Healthcare, USA
kolona HiTrap SP	GE Healthcare, USA
kolonka pro niklovou chelatační chromatografii	Bio-Rad Laboratories, USA
koncentrátory Amicon Ultra	EMD Millipore, USA

3.3 Použité chemikálie

Agilent, USA

*Pfu*Ultra HF DNA polymerase, 10×*Pfu*Ultra Reaction buffer

Carl Roth, Německo

agarosa, DTT, akrylamid, bisakrylamid, bromfenolová modř, EDTA, chlorid sodný, chlorid draselný, imidazol, MgCl₂ · 6 H₂O, Tris, TEMED, LB agar, LB médium, glycin, lysozym, ROTI® Mark TRICOLOR, kyselina boritá

Fisher Scientific, USA

para-nitrofenylfosfát

Geneaid, Taiwan

High-Speed Plasmid Mini Kit

Lachema, ČR

glycerol, Coomassie Brilliant Blue R 250, isopropanol, kyselina chlorovodíková, methanol

New England Biolabs, USA

DpnI, 1 kb DNA ladder, 5×koncentrovaný vzorkovací pufr

Nippon Genetics, Německo

Midori Green Advance DNA Strain,

Penta, ČR

ethanol, ethanol pro UV spektroskopii, hexahydrát síranu nikelnatého, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, hydroxid sodný

Sigma Aldrich, USA

ampicilin, APS, SDS, IPTG, PMSF, β-merkptoethanol, mutagenézní „primery“, ATP, Malachite Green Phosphate Assay kit MAK307, DMSO, proteinkinasa B, BSA, TCEP, HEPES

Thermo Scientific, USA

dNTPs

3.4 Použité roztoky

Tabulka 1: Složení 1×koncentrovaného lyzačního pufru pro připravované proteiny. Uvedeno je tedy výsledné složení pufrů v buněčné suspenzi. V případě proteinu LZAP je složení 1×koncentrovaného lyzačního pufru shodné se složením vazného pufru pro amylosovou afinitní chromatografii.

PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A	LZAP	p38 MAPK
1×PBS (pH = 7,5)	1×PBS (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)
500mM KCl	500mM KCl	200mM NaCl	500mM NaCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
5mM β-ME	5mM β-ME	1mM EDTA	2mM β-ME
20mM imidazol	20mM imidazol	1mM DTT	20mM imidazol

Tabulka 2: Složení vazného pufru pro niklovou afinitní chromatografii pro purifikované proteiny.

PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A	p38 MAPK
1×PBS (pH = 7,5)	1×PBS (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)
500mM KCl	500mM KCl	500mM NaCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
2mM β-ME	2mM β-ME	2mM β-ME
20mM imidazol	20mM imidazol	20mM imidazol

Tabulka 3: Složení promývacího pufru pro niklovou afinitní chromatografii pro purifikované proteiny.

PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A	p38 MAPK
1×PBS (pH = 7,5)	1×PBS (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)
500mM KCl	500mM KCl	500mM NaCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
2mM β-ME	2mM β-ME	2mM β-ME
60mM imidazol	60mM imidazol	40mM imidazol

Tabulka 4: Složení elučního pufru pro niklovou afinitní chromatografii pro purifikované proteiny.

PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A	p38 MAPK
1×PBS (pH = 8,0)	1×PBS (pH = 8,0)	50mM Tris (pH = 8,0)
500mM KCl	500mM KCl	500mM NaCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
2mM β-ME	2mM β-ME	2mM β-ME
250mM imidazol	250mM imidazol	150mM imidazol

Tabulka 5: Složení dialyzačního pufru pro reverzní afinitní chromatografii pro proteiny PPM1D NTD, PPM1D NTD D314A.

PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A
1×PBS (pH = 7,5)	1×PBS (pH = 7,5)
0,5M KCl	0,5M KCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
2mM β-ME	2mM β-ME
20mM imidazol	20mM imidazol

Tabulka 6: Složení dialyzačního pufru pro gelovou permeační chromatografii pro připravované proteiny.

p38 MAPK	LZAP	PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A
50mM Tris (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)	50mM Tris (pH = 7,5)
-	-	175mM KCl	175mM KCl
200mM NaCl	200mM NaCl	25mM NaCl	25mM NaCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
2mM β-ME	1mM DTT	2mM β-ME	2mM β-ME
10mM MgCl ₂	1mM EDTA	10mM MgCl ₂	10mM MgCl ₂

Tabulka 7: Složení dialyzačního pufru pro kationtově výměnnou chromatografii.

Látka	Koncentrace
Tris (pH 7,0)	50 mM
KCl	40 mM
Glycerol	10 % (w/v)
β-ME	5 mM
MgCl ₂	10 mM

Tabulka 8: Složení elučního pufru pro kationtově výměnnou chromatografii.

Látka	Koncentrace
Tris (pH 7,0)	50 mM
KCl	1 M
Glycerol	10 % (w/v)
β-ME	5 mM
MgCl ₂	10 mM

Tabulka 9: Složení pufrů pro gelovou permeační chromatografii pro připravované proteiny.

PPM1D NTD	PPM1D NTD D314A	LZAP	p38 MAPK
50mM Tris (pH=7,5)	50mM Tris (pH=7,5)	50mM Tris (pH=7,5)	50mM Tris (pH=7,5)
175mM KCl	175mM KCl	-	-
25mM NaCl	25mM NaCl	200mM NaCl	200mM NaCl
10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)	10% glycerol (w/v)
1mM TCEP	1mM TCEP	1mM TCEP	1mM TCEP
10mM MgCl ₂	10mM MgCl ₂	1mM EDTA	10mM MgCl ₂

Tabulka 10: Složení pufrů pro separační SDS-PAGE gel.

Složka	Objem (ml)
Tris-HCl (1,5M; pH 8,8)	75,0
SDS (10%) (w/v)	4,00
Destilovaná voda	21,0

Tabulka 11: Složení pufrů pro zaváděcí SDS-PAGE gel.

Složka	Objem (ml)
Tris-HCl (1M; pH 6,8)	50,0
SDS (10%) (w/v)	4,00
Destilovaná voda	46,0

Tabulka 12: Složení 5×koncentrovaného vzorkového pufru.

Látka (zásobní roztok)	Objem [ml]
Tris-HCl (1M; pH 6,8)	0,6
glycerol (50% vodný roztok) (w/v)	5
β-ME	0,5
bromfenolová modř (1% vodný roztok) (w/v)	1
SDS (10% vodný roztok) (w/v)	2
destilovaná voda	0,9

Tabulka 13: Složení 10×koncentrovaného elektroforetického SDS-PAGE pufru (destilovanou vodou doplněno na 1 litr).

Látka (zásobní roztok)	Hmotnost [g]
Tris	30
SDS	10
glycin	144

Tabulka 14: Složení barvicího roztoku (destilovanou vodou doplněno na 1 litr).

Látka (zásobní roztok)	Množství
methanol	450 ml
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
Kyselina octová	100 ml

Tabulka 15: Složení fosfatasového pufru.

Látka	Koncentrace (mM)
HEPES (pH = 7,5)	20
KCl	175
NaCl	25
TCEP	0,1

Tabulka 16: Složení SAXS pufru.

Složka	Koncentrace
Tris (pH = 7,5)	50 mM
KCl	175 mM
NaCl	25 mM
TCEP	1 mM
MgCl ₂	10 mM
Glycerol	3 % (w/v)

Tabulka 17: Složení PK A fosforylačního pufru.

Složka	Koncentrace
HEPES (pH = 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM
DTT	5 mM

Tabulka 18: Složení MKK6 fosforylačního pufru.

Složka	Koncentrace (mM)
Tris (pH = 7,5)	50
NaCl	200
TCEP	1

Tabulka 19: Složení 10×koncentrovaného TBE pufru pro nativní TBE elektroforézu (Destilovanou vodou doplněno na 0,5 l).

Látka (zásobní roztok)	Hmotnost [g]
Tris (pH = 8,3)	54 g
kyselina boritá	27,5 g
0,5 M EDTA (pH = 8,0)	20 ml

Tabulka 20: Složení 5×koncentrovaného vzorkovacího pufru pro nativní TBE elektroforézu.

Látka (zásobní roztok)	Objem [ml]
10× TBE pufr (pH = 8,3)	1
1% bromfenolová modř (w/v)	1
glycerol	3
destilovaná voda	5

Tabulka 21: Složení 10×koncentrovaného TAE pufru pro horizontální agarosovou elektroforézu (destilovanou vodou doplněno na 1 l).

Látka (zásobní roztok)	Množství
Tris (pH = 8,3)	48,5 g
Kyselina octová	11,4 ml
EDTA	3,7 g

3.5 Metody

Všechna měření v této diplomové práci byla prováděna s proteinovým konstruktem PPM1D₁₋₃₉₇ S44R a pro přehlednost je tento konstrukt v této práci označován jako PPM1D NTD (PPM1D N-Terminální doména). Sekvence proteinového konstruktu PPM1D NTD je uvedena v Příloze 1.

3.5.1 PCR vnášející mutaci

Pro cílené zavedení mutací do genu kódujícího cílový protein je možno využít polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Princip takové mutagenese spočívá v navrhnutí dvojice navzájem komplementárních oligonukleotidových sekvencí (tzv. „primerů“), které ve své sekvenci mají změněn triplet odpovídající mutované aminokyselině. Mutagenézní „primery“ slouží pak DNA polymerase jako začátek pro syntézu nových vláken DNA. Tímto způsobem vznikají kopie linearizovaného plasmidu nesoucího gen se zavedenou mutací. Templátem pro PCR je plasmid získaný amplifikací v buňkách *E. coli*. Takto získaný plasmid je methylován a proto ho po PCR reakci dokážeme selektivně odstranit využitím restriční enzymu DpnI. Amplifikovaný mutovaný plasmid je pak transformován do *E. coli*, kde je ligován a amplifikován a posléze izolován.

Pro účely měření fosfatasové aktivity bylo nutné připravit katalyticky neaktivní protein PPM1D NTD D314A, který sloužil jako negativní kontrola. Templátem pro mutagenesi byl konstrukt TRX-PPM1D NTD (ve vektoru pst39)⁷⁰. Na základě DNA sekvence proteinového konstruktu získané sekvenací byla navržena dvojice mutagenézních „primerů“, ve kterých byl triplet kódující Asp314 nahrazen tripletem kódujícím Ala (viz Tabulka 22).

Tabulka 22: Sekvence navržených mutagenézních „primerů“. Červeně jsou vyznačeny triplety odpovídající mutované aminokyselině.

Oligonukleotid	Sekvence (ve směru 5' – 3')
Přímý mutagenézní „primer“	GTA TAT TAT ATT GGG GAG TGC TGG ACT TTG GAA TAT GAT TCC
Zpětný mutagenézní „primer“	GGA ATC ATA TTC CAA AGT CCA GCA CTC CCC AAT ATA ATA TAC

Byla připravena reakční směs o objemu 50 ul (složení reakční směsi viz Tabulka 23, str. 35). Vlastní PCR reakce pak probíhala v termocykleru TProfessional (Analytik Jena) podle programu uvedeném v Tabulce 24 (str. 35). Parametry PCR reakce museli být několikrát optimalizovány, pro přehlednost je uveden finální PCR protokol. Parametrům, které musely být v rámci optimalizačního procesu upraveny je věnována výsledková část této diplomové práce.

Tabulka 23: Složení reakčních směsí pro PCR vnášející mutaci. Byly připraveny dvě reakční směsi, jedna s obsahem DMSO, druhá bez obsahu DMSO.

Látka	Objem (μl)	
dH ₂ O	37.4	35.9
10× „PfuUltra Reaction buffer“	5	5
10mM dNTP	1	1
10μM přímý primer	2,5	2,5
10μM zpětný primer	2,5	2,5
TRX-PPM1D NTD (cDNA 80 ng/μl)	0,6	0,6
Pfu Ultra HF DNA polymerasa 2.5 U/μl	1	1
DMSO	-	1,5

Tabulka 24: Finální parametry programu pro reakci PCR použité pro zavedení mutace D314A.

Počet opakování	Krok	Teplota	Čas
1×	1	95	1 m
30×	2	95	30 s
	3	58	1 min
	4	68	6 min
1×	5	68	10 min
1×	6	4	∞

Přítomnost vzniklého produktu byla ověřena agarosovou horizontální elektroforézou (postup viz kapitola 3.5.1.1). K reakční směsi bylo pak přidáno 1,5 μl DpnI a směs byla inkubována 2 hodiny při teplotě 37 °C. Po této době byly z této směsi odebrány 3 ul pro transformaci do buněk *E. coli* DH5α. Z vybraných kolonií byly připraveny noční bakteriální kultury, ze kterých byla plasmidová DNA izolována využitím komerčně zakoupeného kitu (High-Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid). Přítomnost mutace v izolované DNA byla ověřena Sangerovou sekvenací v společnosti Eurofins Genomics (postup transformace a přípravy noční bakteriální kultury viz kapitola 3.5.2.1, str. 36).

3.5.1.1 Agarosová horizontální elektroforéza

K separaci a následné vizualizaci separovaných molekul DNA se využívá horizontální agarosová elektroforéza. Její princip spočívá v separaci DNA na základě různé mobility v elektrickém poli. Molekuly DNA nesou záporní náboj a v elektrickém poli migrují směrem ke kladně nabitě anodě a separace tak probíhá na základě jejich velikosti (ale i tvaru).

Bylo připraveno 40 ml 1% agarosového gelu rozpuštěním 0,4 g agarosy v 40 ml 1×koncentrovaného TAE pufru (složení zásobního 10×koncentrovaného TAE pufru je uvedeno v Tabulce 21, str. 33). Po mírném ochlazení bylo k této směsi přidáno 1,6 μl barviva Midori

Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics). Toto fluorescenční barvivo se váže na DNA a po excitaci UV zářením umožňuje vizualizovat separované molekuly DNA. Roztok byl nalit do elektroforetické vaničky a 30 minut ponechán k ztuhnutí. Vzorky nanášené na gel byly připraveny smícháním PCR reakční směsi (po proběhlé reakci) se vzorkovým pufrem v poměru 5:1 (celkový objem 30 μ l). Elektroforéza probíhala v 1 \times koncentrovaném TAE pufru (pH = 8,3; složení 10 \times koncentrovaného TAE pufru viz Tabulka 21, str. 33) po dobu 45 minut při výkonu 100 V. Jako standard byla použita komerčně dostupná směs DNA fragmentů 1kb DNA ladder-Sigma (New England Biolabs). DNA produkty mutagenézní PCR byly vizualizovány pomocí transiluminátoru (Fusion Solo S, Vilber).

3.5.2 Expres proteinů v *E. coli*

V rámci této diplomové práce bylo exprimováno několik proteinových konstruktů, pro které byly zvoleny různé expresní podmínky (PPM1D NTD, PPM1D NTD D314A, LZAP, p38 MAPK). Pro větší přehlednost je postup proteinové exprese zobrazen a pro jednotlivé proteiny blíže charakterizován v Tabulce 25 na konci kapitoly 3.5.2.2 (str. 38).

3.5.2.1 Transformace buněk *E. coli*

Vnesení plasmidu do bakteriálních buněk v laboratoři probíhá procesem transformace. Je několik postupů transformace, kterými lze do buněk vnést plasmid s cílovým genem. Pro tyto účely se používají tzv. kompetentní buňky. Kompetence je vlastnost buněk přijímat cizorodou DNA. Kompetentní buňky podléhají speciální kultivaci, která zvyšuje prostupnost jejich buněčných stěn. Prostupnost cytoplazmatické membrány je zvýšena např. teplotním šokem, elektroporací apod. (podle toho, či jsou buňky připraveny jako chemokompetentní či elektrokompetentní apod.).

Chemokompetentní buňky *E. coli* BL21 (resp. DH5 α při amplifikaci plasmidu) byly pomalu rozmrazeny na ledu. K 40 μ l bakteriálních buněk byl přidán 1 μ l plasmidu (koncentrace uvedeny v Tabulce 25, str. 38) nesoucího gen pro proteinový konstrukt (připravované proteinové konstrukty a odpovídající vektory použité k transformaci jsou uvedeny v Tabulce 25, str. 38). Takto připravená transformační směs byla inkubována 30 minut na ledu. Po uplynutí 30 minut byla mikrozkuhavka s transformační směsí přenesena z ledu do vodné lázně, kde byla ponechána k inkubaci při 42 $^{\circ}$ C po dobu 45 sekund. Vlastní transformace proběhla následným teplotním šokem, při kterém byla transformační směs prudce schlazena přenesením z 42 $^{\circ}$ C na led. Zhruba po dvou minutách bylo k transformační směsi přidáno 430 μ l LB média (temperováno na 37 $^{\circ}$ C, bez antibiotik) a výsledná směs byla alespoň po dobu 30 minut inkubována v termobloku při 37 $^{\circ}$ C. Buněčná suspenze o objemu 200 μ l byla nanesena na

agarovou misku s ampicilinem (o výsledné koncentraci 100 µg/ml, agarové misky byly připraveny Bc. Gabrielou Kočárovou) a misky byly inkubovány dnem vzhůru přes noc při teplotě 37 °C. Druhý den po transformaci byly pomocí sterilní špičky z misek vybrány kolonie, které byly inokulovány vždy do 5 ml LB média s ampicilinem (o výsledné koncentraci 100 µg/ml). Buňky byly v třepačce Shaking Incubator NB-205 (Infors) kultivovány přes noc při 37 °C, 200 RPM. Tato noční kultura pak představovala východiskový bod pro velkoobjemovou proteinovou expresi.

3.5.2.2 Proteinová exprese

Expresce proteinů probíhala v buňkách *E. coli* BL21, které obsahují DE3 element pro T7 RNA polymerasu, jejíž exprese je řízena *lac* operonem (expresní vektory pro cílové proteiny totiž obsahují T7 promotor/T7 terminátor). Expresce cílového proteinu je v takovém systému zahájena přidáním isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG, strukturní analog allolaktosy spouštějící uvolnění *lac* represoru). To vede ke zvýšení exprese T7 RNA polymerasy, která rozeznává T7 promotorovou sekvenci v použitém vektoru a tím pádem spouští expresi cílového proteinu.

Do Erlenmeyerovy baňky s 900 ml LB média byl přidán roztok ampicilinu (výsledná koncentrace ampicilinu 100 µg/ml). Do tohoto objemu LB média s antibiotikem bylo přidáno vždy 5 ml noční kultury, která byla připravena postupem uvedeným výše (viz kapitola 3.5.2.1, str. 36). Buňky byly kultivovány při 37 °C a 190 RPM (HT Multitron, Infors) do doby, kdy naměřená OD₆₀₀ nedosáhla hodnoty 0,6–0,8. Po její dosažení byla teplota snížena a do bakteriálních kultur byl přidán IPTG pro indukci proteinové exprese (konkrétní expresní podmínky pro připravované proteiny jsou uvedeny v Tabulce 25, str. 38). Kultura byla po přidání IPTG inkubována při zvolené teplotě přes noc (190 RPM). Na druhý den byly narostlé buňky převedeny do litrových kyvet. Kyvety byly vyváženy a při otáčkách 2073×g a teplotě 4 °C centrifugovány po dobu 20 minut (Sigma 8K, rotor 12510-H, Sigma). Supernatantní část byla odstraněna a pelet resuspendován v roztoku 20mM Tris (pH 7,5; 25 ml/pelet z 900 ml LB média). Resuspendované buňky byly převedeny do 50ml zkumavek, ve kterých byly zamrazeny a uchovávány při teplotě -80 °C. V případě PPM1D NTD bylo nutno expresní podmínky optimalizovat, v Tabulce 25 (str. 38) jsou ale pro přehlednost uvedeny finální podmínky.

Tabulka 25: Parametry exprese proteinových konstruktů připravovaných v rámci této diplomové práce. TRX je zkratka pro thioredoxin, MBP pro protein vázající maltosu, P/N znamená přes noc. Afinitní a solubilizační kotvy jsou od proteinu odděleny místem pro TEV proteasu.

Exprimovaný proteinový konstrukt	Použitý vektor (ng/μl)	Afinitní kotva	Expresní teplota a čas	Výsledná koncentrace IPTG (mM)
TRX-PPM1D NTD	pST39 (110)	6×His (2×)	16 °C, P/N	0,05
TRX-PPM1D NTD D314A	pST39 (130)	6×His (2×)	16 °C, P/N	0,05
MBP-LZAP	pMAL5x (90)	MBP	15 °C, P/N	0,20
p38 MAPK	pET-15b (100)	6×His	25 °C, 3 hodiny	1,00

3.5.3 Purifikace proteinů

V rámci této diplomové práce bylo připravováno několik proteinových konstruktů, pro které byly zvoleny různé purifikační přístupy a podmínky. Obrázek 11 schematicky znázorňuje zvolené purifikační přístupy pro jednotlivé proteiny. Následující kapitoly popisují použité purifikační techniky a s ohledem na rozdíly při purifikaci různých proteinů jsou tyto metodické rozdíly (např. složení použitých pufrů) uvedeny zvlášť pro každý z připravovaných proteinů. Některé z purifikačních kroků bylo nutné optimalizovat, a proto je jejich popisu věnována i výsledková část této diplomové práce.

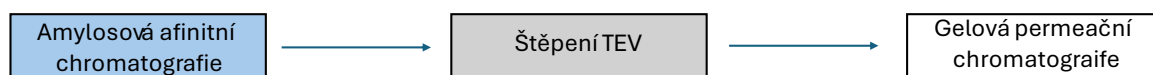
PPM1D NTD



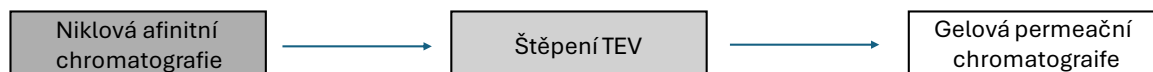
PPM1D NTD D314A



LZAP



P38 MAPK



Obrázek 11: Schematické znázornění postupů pro purifikaci proteinů v této diplomové práci. Proteiny byly exprimovány s využitím různých afinitních či solubilizačních kotev, a proto se postupy jejich purifikace liší. V případě PPM1D NTD musel být purifikační protokol optimalizován.

3.5.3.1 Příprava buněčného lyzátu

Jedním z nejužívanějších postupů lyze buněk je sonikace. Sonikace k lyzi buněk využívá vysokofrekvenčních ultrazvukových vln, které vedou k rozrušení buněk. Pro zvýšení účinnosti lyze se k lyzační směsi přidává i lysozym, enzym štěpící peptidoglykanovou vrstvu buněčné stěny. Během tohoto procesu se k lyzační směsi také přidává fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), což je inhibitor serinových proteas, s cílem eliminovat proteolytické štěpení cílového proteinu.

Buňky s exprimovanými proteiny byly po vytažení z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rozmrazeny při pokojové teplotě a hned po rozmražení byla zahájena lyze buněk přidáním 2×koncentrovaného lyzačního pufru (výsledný poměr 1:1; výsledné složení lyzačního pufru v buněčné suspenzi pro různé proteinové konstrukty je uvedeno v Tabulce 1, str. 29). Do směsi byl přidán lysozym (15 mg/50 ml lyzační směsi) a za stálého míchání v chladové místnosti se směs nechala inkubovat po dobu 30 minut. Těsně před zahájením sonikace byl do směsi přidán PMSF (výsledná koncentrace 1 mM). Následovala sonikace, jejíž podmínky byly stejné pro všechny připravované proteiny (3 sekundy pulz; 17 sekund bez pulzu; doba pulzu celkem 6,5 min pro 100 ml lyzační směsi, sonikátor Sonicator3000 Misonix, Cole-Parmer). Během sonikace byla směs uchovávána na ledu. Vzniklý sonikát byl posléze centrifugován ($19\,561\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifuga HERMLE Z323K) po dobu 45 minut. Ze supernatantní části byl dalšími purifikačními kroky izolován cílový, rozpustný protein.

3.5.3.2 Niklová afinitní chromatografie

Pro primární izolaci proteinů nesoucích histidinovou afinitní kotvu ($6\times\text{His}$, využito při přípravě PPM1D NTD, PPM1D NTD D314A a p38 MAPK) se využívá niklová afinitní chromatografie. Metoda je založena na použití nosiče s kovalentně vázaným tzv. „raménkem“ (v této diplomové práci nitrilotrioctovou kyselinou, NTA). Toto raménko koordinační vazbou váže ionty kovů (Ni^{2+}), které slouží k zachycení cílového proteinu skrze histidinovou kotvu. Proteiny běžně takovou sekvencí neobsahují a proto se preferenčně na kolonu váže hlavně cílový protein.

Kolona naplněná 1–1,5 ml matrice (Chelating SepharoseTM Fast Flow) byla připojena k peristaltické pumpě a při průtoku 12 ml/min regenerována následujícími promývacími kroky:

- 20 ml H_2O (Millipore)
- 60 ml 0,1M NiSO_4
- 20 ml H_2O (Millipore)

- 20 ml vazného pufru pro niklovou afinitní chromatografii (pH 7,5; složení pro různé proteiny viz Tabulka 2, str. 29)

Následovala adsorpce supernatantu při průtoku 2 ml/min. Po adsorpci byla kolona promyta 100 ml promývacího pufru pro niklovou afinitní chromatografii (pH 7,5; složení pro různé proteiny viz Tabulka 3, str. 29). Kolona byla poté odpojena od peristaltické pumpy a zachycený protein byl posléze eluován 20 ml elučního pufru pro niklovou afinitní chromatografii (pH 8,0; složení pro různé proteiny viz Tabulka 4, str. 29) do 50ml zkumavky. V případě proteinů TRX-PPM1D NTD a TRX-PPM1D NTD D314A byl pro ředění imidazolu protein eluován do 10 ml vazného pufru. Z jednotlivých kroků (od sonikace po eluci) byly sbírány frakce, díky kterým byl výsledek niklové afinitní chromatografie ověřen pomocí SDS-PAGE (postup viz kapitola 3.5.4, str. 44). Sjedené frakce TRX-PPM1D NTD, PPM1D NTD D314A byly dialyzovány proti dialyzačnímu pufru pro reverzní niklovou afinitní chromatografii (složení viz Tabulka 5, str. 30) a štěpeny TEV proteasou (postup viz kapitola 3.5.3.4, str. 41) V případě proteinu p38 MAPK byl eluát z niklové afinitní chromatografie dialyzován proti dialyzačnímu pufru pro gelovou permeační chromatografii (složení pro p38 MAPK viz Tabulka 6, str. 30) a štěpen TEV proteasou (postup viz kapitola 3.5.3.4, str. 41).

3.5.3.3 Amylosová afinitní chromatografie

Protein LZAP byl exprimován jako fúzní protein MBP-LZAP. Protein vázající maltosu (MBP) se využívá jako afinitní kotva, zároveň také ale výrazně zlepšuje rozpustnost cílového proteinu. Při amylosové afinitní chromatografii se využívá specifické vazby MBP na amylosu (amylosa je polysacharid složený z glukosových zbytků propojených α -(1→4)-glykosidovými vazbami). Pro eluci se využívá roztok maltosy, nebo je cílový protein od MBP odštěpen využitím specifických proteas a z kolony eluován již bez MBP.

Supernatant ze sonikace obsahující fúzní protein MBP-LZAP (příprava sonikátu viz kapitola 3.5.3.1, str. 39) byl při průtoku 1 ml/min nanesen na kolonu (MBPTrapTM HP, 5 ml), která byla předem promyta vazným pufrům pro amylosovou afinitní chromatografii (složení shodné se složením 1×koncentrovaného lyzačního pufru pro LZAP, viz Tabulka 1, str. 29). Po adsorpci supernatantu byla kolona promyta 30 ml vazného pufru pro amylosovou afinitní chromatografii. Fúzní protein MBP-LZAP byl štěpen TEV proteasou na koloně. Na kolonu byla nanesena TEV proteasa (připravená v laboratoři Bc. Gabrielou Kočárovou; 8 ml roztoku TEV (o koncentraci 0,125 mg/ml)/protein exprimovaný v 2 l LB média). Štěpení na koloně probíhalo přes noc při 4 °C a protein LZAP byl z kolony eluován 30 ml vazného pufru pro amylosovou

afinitní chromatografii (složení shodné se složením 1×koncentrovaného lyzačního pufru pro LZAP, viz Tabulka 1, str. 29). Čistota proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE a eluát byl dialyzován vůči dialyzačnímu pufru pro gelovou permeační chromatografii (složení pro protein LZAP viz Tabulka 6, str. 30).

3.5.3.4 Štěpení TEV proteasou

Cílové exprimované proteiny obsahovaly afinitní kotvu (6×His, MBP) a/nebo solubilizační protein, se kterým byly pro účely exprese a purifikace fúzovány (Thioredoxin, MBP). Tyto proteinové části mohou ovlivňovat vlastnosti cílového proteinu. Všechny proteinové konstrukty, které byly připravovány v rámci této diplomové práce, měly proto tyto proteinové části odděleny štěpicím místem pro TEV proteasu (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln×Gly/Ser), díky čemuž je bylo možné odstranit.

Eluát z niklové afinitní chromatografie byl převeden do dialyzačního střeva (dělicí rozsah 14 kDa). Eluát byl dialyzován proti 1 l dialyzačního pufru (v případě PPM1D NTD a PPM1D NTD D314A proti dialyzačnímu pufru pro reverzní niklovou afinitní chromatografii (složení viz Tabulka 5, str. 30), v případě proteinu p38 MAPK proti 1 l dialyzačního pufru pro gelovou permeační chromatografii (viz Tabulka 6, str. 30). V případě fúzního proteinu MBP-LZAP probíhalo štěpení TEV proteasou na koloně a tento postup je popsán v kapitole 3.5.3.3 (str. 40).

Po dvou hodinách dialýzy byla měřena absorbance při 280 nm (proti použitému dialyzačnímu pufru, spektrofotometr NanoDrop Thermo Fisher Scientific) a na základě Lambertova-Beerova zákona bylo spočteno množství proteinu (mg). Do dialyzačního střeva byla k eluátu přidána TEV proteasa (o koncentraci 0,8 mg/ml, připravená rekombinantní expresí v laboratoři Bc. Gabrielou Kočárovou). K eluátu bylo přidáváno 35 ul TEV proteasy/1 mg proteinu. Štěpení probíhalo během dialýzy přes noc v chladové místnosti. Takto štěpený protein byl koncentrován a dál podroben gelové permeační chromatografii (v případě proteinu p38 MAPK). V případě proteinů PPM1D NTD a PPM1D NTD D314A, u kterých nebylo štěpení kvantitativní, byl do protokolu zařazen krok reverzní afinitní niklové chromatografie (postup viz kapitola 3.5.3.5).

3.5.3.5 Reverzní niklová afinitní chromatografie

Princip metody je stejný jako při standardním uspořádání niklové afinitní chromatografie. Rozdílem je, že zatímco cílový protein je při běžném uspořádání zachycen na koloně díky histidinové kotvě a posléze eluován, při reverzním uspořádání cílový protein již afinitní kotvu

neobsahuje a z kolony vyteče. Tento přístup je vhodný v případě, že štěpení fúzního proteinu není kvantitativní. Tímto způsobem se neštěpený protein zachytí na koloně a finální vzorek pak tento neštěpený fúzní protein již neobsahuje. Vhodný je tento postup i ve chvíli, kdy jsou vlastnosti štěpených proteinů (pI, Mw) podobné a jejich oddělení je proto náročné. Po první afinitní chromatografii a následném štěpení TEV proteasou byl proto konkrétně pro proteiny PPM1D NTD a PPM1D NTD D314A zařazen i tento krok.

Kolona na reverzní niklovou afinitní chromatografii (naplněná Chelating Sepharose™ Fast Flow) byla regenerována postupem uvedeným v kapitole 3.5.3.2 (str. 39). Po promytí kolony i vazným pufrům pro niklovou afinitní chromatografii (složení pro PPM1D NTD a PPM1D NTD D314A viz Tabulka 2, str. 29) se celý objem dialyzovaného proteinového eluátu z niklové afinitní chromatografie nechal protéct kolonou a protein vytékající z kolony byl zachycen do 50ml zkumavky. Díky nespecifickým interakcím s nikelnatými ionty se na koloně může zachytit i značná část cílového proteinu, a proto byla kolona promyta ještě 20 ml promývacího pufru pro niklovou afinitní chromatografii (složení viz Tabulka 3, str. 29) a vytékající obsah byl také jímán do 50ml zkumavky. Tyto frakce představovaly cílový protein, který byl dialyzován přes noc proti dialyzačnímu pufru pro gelovou permeační chromatografii (složení pro PPM1D NTD a PPM1D NTD D314 viz Tabulka 6, str. 30).

3.5.3.6 Kationtově výměnná chromatografie

V rámci optimalizačního procesu purifikace PPM1D NTD bylo testováno i zařazení kationtově výměnné chromatografie. Ve finálním purifikačním protokolu bylo od tohoto kroku upuštěno a tento krok byl nahrazen reverzní niklovou afinitní chromatografií. Iontově výměnná chromatografie zabezpečuje separaci molekul na základě rozdílu v jejich náboji (tedy v případě proteinů na základě rozdílných hodnot izoelektrického bodu). Při kationtově výměnné chromatografii se využívá elektrostatické interakce mezi kladně nabitými molekulami proteinu a záporně nabitou funkční skupinou chromatografického nosiče (např. sulfopropylová skupina kovalentně vázaná na sefarovém nosiči). pH zvoleného vazného pufru je nižší než izoelektrický bod cílového proteinu. Vzhledem k tomu, že se při metodě využívá elektrostatických interakcí je důležité, aby iontová síla použitého vazného pufru byla co nejnižší. Eluce je pak prováděna v gradientu pH nebo iontové síly.

Eluát z niklové afinitní chromatografie byl dialyzován proti 1 litru dialyzačního pufru pro kationtově výměnnou chromatografii přes noc za současného štěpení TEV proteasou (složení pufru viz Tabulka 7, str. 30). Na druhý den byla kolona (HiTrap SP, GE Healthcare) při průtoku 5 ml/min ekvilibrována promytím 30 ml pufru pro kationtově výměnnou

chromatografii (pH 7,0; složení stejné jako je uvedeno v Tabulce 7, str. 30). Při průtoku 1,5 ml/min byl na kolonu nanesen dialyzovaný protein po štěpení. Po adsorpci proteinu byla kolona postupně promývána gradientem chloridu draselného (0–1M; složení viz Tabulka 6, str. 30). Během eluce byly sbírány frakce. Frakce odpovídající eluovanému proteinu (ověřeno SDS-PAGE, postup viz kapitola 3.5.4, str. 44) byly sjednoceny a koncentrovány na 2 ml (dělicí rozsah 30 kDa). S koncentrovaným vzorkem byla provedena gelová permeační chromatografie (viz kapitola 3.5.3.7).

3.5.3.7 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metoda, která separuje proteiny na základě jejich hydrodynamického poloměru. Separace tedy neprobíhá jen na základě velikosti molekul (a tedy jejich molekulové hmotnosti) ale i na základě jejich tvaru. Dvojice kompaktního globulárního proteinu a nestrukturovaného proteinu o stejné velikosti bude tedy pravděpodobně eluovat s jiným retenčním objemem. Kolona je naplněna porézním materiálem s definovanou velikostí pórů. Zatímco menší molekuly budou do těchto pórů difundovat, čímž budou v koloně zadržovány, větší molekuly budou eluovány rychleji.

Na závěr každého purifikačního protokolu byl pro zvýšení čistoty ale především pro zabezpečení monodisperzity vzorku zařazen krok gelové permeační chromatografie. Pro různé proteiny byly použité různé kolony a proteiny na ní byly nastříkovány v různých objemech (parametry gelové permeační chromatografie pro jednotlivé proteiny jsou uvedeny v Tabulce 26, str. 44). Po afinitní chromatografii, resp. reverzní afinitní chromatografii, resp. kationtově výměnné chromatografii (v závislosti od připravovaného proteinu) byly proteiny koncentrovány pomocí koncentrátoru (ve finálních protokolech koncentrátor s dělicím rozsahem 10 kDa, v rámci optimalizace purifikace PPM1D NTD byl používán i koncentrátor s rozsahem 30kDa). Těsně před nástřikem byl koncentrovaný protein filtrován (využitím filtrů SPARTAN 13/0,45 RC; 0,45 μ m). Protein byl nastříknout na kolonu (GE Healthcare), která byla předem ekvilibrována pufrům pro gelovou permeační chromatografii (složení pro jednotlivé proteiny viz Tabulka 9, str. 31). Smyčka a průtok byly zvoleny pro různé proteiny a různé kolony zvláště a jsou uvedeny v Tabulce 26 (str. 44). Frakce odpovídající elučním objemům purifikovaných proteinů byly sbírány a čistota finálních preparátů byla ověřena metodou SDS-PAGE (postup viz kapitola 3.5.4, str. 44). Nejčistější proteinové frakce byly sjednoceny, koncentrovány a uskladněny při teplotě -80 °C

Tabulka 26: Parametry gelové permeační chromatografie pro připravované proteiny.

Protein	Použitá kolona	Smyčka (ml)	Průtok (ml/min)
PPM1D NTD	Superdex S75 pg HiLoad 26/600	10	2,0
PPM1D NTD D314A	Superdex S75 pg HiLoad 26/600	10	2,0
LZAP	Superdex S75 pg HiLoad 26/600	5	1,2
p38 MAPK	Superdex S200 pg HiLoad 16/600	5	2,0

3.5.4 Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Čistota a množství proteinů během jejich purifikace byly ověřovány využitím 12% SDS-PAGE gelů (složení viz Tabulce 27). Při SDS-PAGE je využíván dodecylsírany sodný (SDS), který vazbou na proteiny dává proteinům jednotný záporný náboj. Metoda tak využívá separaci molekul na základě velikosti, neboť různě velké proteiny migrují v elektrickém poli různou rychlostí.

Vzorky proteinů byly vždy před pipetováním do jamek smíchány s 5×koncentrovaným vzorkovacím pufrem (složení viz Tabulka 12, str. 31) v poměru 4:1 a zahřívány při 95 °C po dobu dvou minut. Pro vyhodnocení byl na gel vždy nanesen i standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR, Carl Roth). Elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru 60 minut při výkonu 200 V (složení 10×koncentrovaného elektroforetického pufru je uvedeno v Tabulce 13, str. 31). Pro vizualizaci proteinů byl polyakrylamidový gel následně obarven barvicím roztokem Coomassie R-250 (složení viz Tabulka 14, str. 32) povařením v tomto roztoku po dobu pěti minut. Gel byl promyt destilovanou vodou a pro úplné odbarvení ponechán v destilované vodě přes noc. Složení pufrů pro separační a zaváděcí SDS-PAGE gel je uvedeno v Tabulce 10, resp. Tabulce 11 (str. 31).

Tabulka 27: Složky separačního a zaváděcího gelu pro SDS-PAGE.

Složka	12% separační gel	5% zaváděcí gel
	Objem (ml)	Objem (ml)
akrylamid/bis-akrylamid	3,000	0,5
pufr pro separační gel	2,000	1
destilovaná voda	2,500	2,25
APS (10% vodný roztok) (w/v)	0,045	0,045
TEMED	0,005	0,005

3.5.5 Měření fosfatasové aktivity

3.5.5.1 Měření vnitřní fosfatasové aktivity vůči para-nitrofenylfosfátu

Pro měření vnitřní fosfatasové aktivity proteinového konstruktu PPM1D NTD byl jako substrát využit para-nitrofenylfosfát (pNPP). Odštěpením fosfátové skupiny vzniká para-nitrofenol, který v alkalických podmínkách disociuje na para-nitrofenolát. Měřením absorbance při 405 nm je pak možné detekovat množství para-nitrofenolátu a tak i kvantifikovat vnitřní aktivitu fosfatas. V rámci této práce byla metoda použita k enzymové charakterizaci připraveného konstruktu a k studiu vlivu vazných partnerů na vnitřní aktivitu PPM1D NTD. V budoucnosti může být metoda také vhodná k testování aktivity různých mutantních forem enzymu.

Před každým měřením byly použité proteiny (PPM1D NTD; PPM1D NTD D314A, LZAP) dialyzovány proti 500 ml fosfatasového pufru (složení viz Tabulka 15, str. 32) minimálně po dobu 3 hodin. Po dialýze byla koncentrace proteinů změřena (měřením absorbance při 280 nm proti fosfatasovému pufru z dialýzy, spektrofotometr NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) a proteiny byly následně koncentrovány nebo ředěny na vhodnou koncentraci. Všechny další zásobní roztoky složek reakčních směsí byly připraveny rozpuštěním ve fosfatasovém pufru (složení viz Tabulka 15, str. 32). Reakční směs obsahovala 20mM MgCl₂, BSA (0,2 mg/ml), 1mM pNPP. Reakční směsi byly připraveny smícháním všech složek a objem byl doplněn fosfatasovým pufrem na 125 μ l. Koncentrace PPM1D NTD i LZAP použité při těchto měřeních jsou uvedeny ve výsledkové části. Reakce byly vždy zahájeny přidávkem enzymu (PPM1D NTD, resp. PPM1D NTD D314A jako negativní kontrola) a reakční směsi byly inkubovány při 25 °C po dobu 2 hodin. Průběh reakce byl zastaven přidávkem 125 μ l 2M NaOH. Po proběhlé reakci byla mikrotitrační destička s reakčními směsmi centrifugována při 230 \times g po dobu 5 minut (Rotina 420 R, Hettich) a posléze bylo 200 μ l reakční směsi převedeno do nové mikrotitrační destičky. Pro vyhodnocení byla měřena absorbance při 405 nm (spektrofotometr The Infinite™ 200, TECAN) a koncentrace produktu spočtena podle Lambert-Beerova zákona (hodnota délky absorpční vrstvy l byla experimentálně zjištěna, $l = 0,61$ cm).

3.5.5.2 Měření fosfatasové aktivity stanovením uvolněného fosfátu pomocí malachitové zeleně

Pomocí metody je detekován uvolněný fosfát, jakožto produkt fosfatasové reakce. Kvantifikace metody je umožněna tvorbou zeleného komplexu mezi malachitovou zelení, kyselinou molybdenovou (resp. její solí) a volným fosfátem. Vzniklý produkt má absorpční maximum při

600–660 nm a na základě kalibrace standardními roztoky kyseliny fosforečné lze množství uvolněného fosfátu kvantifikovat. Metoda byla provedena využitím komerčně dostupné sady Malachite Green Phosphate Assay Kit MAK307 (Sigma-Aldrich).

Jako substrát pro fosfatasovou reakci sloužila fosforylovaná forma myší izoformy p38 MAPK (dále jen fosfop38 MAPK, příprava viz kapitola 3.5.7.2, str. 49). Proteiny PPM1D NTD i fosfop38 MAPK byly dialyzovány proti fosfatasovému pufru a zásobní roztok MgCl_2 byl připraven rozpuštěním ve fosfatasovém pufru (složení fosfatasového pufru viz Tabulka 15, str. 32). Posléze byla připravena reakční směs, která obsahovala $1\ \mu\text{M}$ PPM1D NTD, $20\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0,02\ \text{mg/ml}$ BSA, $15\ \mu\text{M}$ fosfop38 MAPK. Směs byla doplněna fosfatasovým pufrům (složení viz Tabulka 15, str. 32) na $50\ \mu\text{l}$. Pro studium vlivu proteinu LZAP na aktivitu PPM1D byl k reakční směsi přidán roztok proteinu LZAP (dialyzovaný proti fosfatasovému pufru). Množství proteinu LZAP v reakčních směsích je uvedeno ve výsledkové části. Reakční směsi byly inkubovány při $30\ ^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut a po této době byla reakce ukončena přidávkem $12,5\ \mu\text{l}$ pracovního roztoku (součást komerčně dostupné sady Malachite Green Phosphate Assay Kit, Sigma-Aldrich). Následně byla měřena absorbance při $620\ \text{nm}$ (spektrofotometr The Infinite™ 200, TECAN).

3.5.6 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS, z angl. „Small Angle X-ray Scattering“) je strukturní technika, která umožňuje studovat tvar a velikost molekul. SAXS je metoda s nízkým rozlišením, která ale nevyžaduje krystalizaci proteinů či náročnou přípravu vzorků. Metoda využívá elastického rozptylu rentgenového záření na elektronech v roztoku proteinu. Při průchodu rentgenového záření objektem se z elektronů stávají sekundární zdroje záření. Při krystalech, kde jsou molekuly proteinu v pravidelném uspořádání toto záření konstruktivně interferuje, čehož výsledkem je difrakční obrazec s informacemi o elektronové hustotě molekuly. Při SAXS tvorbu difrakčního obrazce nepozorujeme, neboť molekuly jsou v roztoku v pohybu a v náhodné orientaci. Rozptylový signál ze SAXS je spojitý a radiálně symetrický, a tedy destruktivní interferencí se detailní informace ztrácí. I přesto je SAXS užitečná technika, která poskytuje množství informací o tvaru, velikosti či flexibilitě molekul.

Za předpokladu, že vzorek obsahuje monodisperzní, homogenní částice, které spolu neinteragují, je závislost intenzity rozptýleného záření I na s (tzv. momentum transfer, funkce rozptylového úhlu θ ; definován jako $s=4\pi\sin(\theta)/\lambda$) dána vztahem:

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr \quad (\text{Rovnice 1})$$

Kde D_{max} představuje maximální vzdálenost mezi elektrony přítomnými v částici, $P(r)$ je párová distribuční funkce, s je momentum transfer, r je vzdálenost mezi elektrony. $P(r)$ funkce a intenzita $I(s)$ jsou provázány Fourierovou transformací:

$$P(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds \quad (\text{Rovnice 2})$$

Z $P(r)$ funkce lze odčíst hodnotu gyračního poloměru R_g , intenzitu rozptylu v nulovém úhlu $I(0)$, či D_{max} . Dalším způsobem vyhodnocení SAXS měření je analýza dat podle Guiniera. Pro malé hodnoty s platí:

$$I(s) = I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 s^2\right) \quad (\text{Rovnice 3})$$

Z Guinierova výnosu ($\ln[I(s)]$ vs s^2) dokážeme určit hodnoty gyračního poloměru R_g (spočteno ze směrnice) i intenzitu rozptylu v nulovém úhlu $I(0)$ (z průsečíku přímky s osou $I(s)$). Guinierov výnos pro $sR_g < 1,3$ by měl být lineární. Nelinearita Guinierova výnosu v této oblasti naznačuje přítomnost agregovaných částic, či repulzi mezi nimi.

Intenzita $I(0)$ je úměrná velikosti částice a díky kalibraci známým standardem z ní dokážeme vypočítat molekulovou hmotnost částic v roztoku. Nicméně přesnost bývá často nízká (závislost na kontaminacích, neideálním chování, poškození radiací...). Odhad M_w ze SAXS dat je zejména důležitý při studiu proteinových komplexů či různých oligomerních stavů proteinů. Pro odhad molekulové hmotnosti lze využít i Porodův objem V_p (objem hydratované částice, [nm^3]).

Metoda SAXS je vhodná k studiu flexibilních systémů. K těmto účelům se používá Kratkyho bezrozměrný výnos ($((sR_g)^2 I(s)/I(0))$ vs sR_g). Informaci o kompaktnosti částice poskytuje poloha maxima a intenzita poklesu křivky. Posun maxima k vyšším hodnotám a pomalejší pokles křivky indikují, že studovaná částice vykazuje strukturální flexibilitu.

3.5.6.1 SEC-SAXS

Pro charakterizaci PPM1D NTD bylo využito měření rozptylu rentgenového záření v uspořádání SEC-SAXS, při kterém vlastnímu měření předchází gelová permeační chromatografie.

Připravený protein PPM1D NTD byl dialyzován proti 500 ml SAXS pufru po dobu 3 hodin a koncentrován (koncentrátorem s dělicím rozsahem 10kDa) na 3,2 mg/ml (složení SAXS pufru uvedeno v Tabulce 16, str. 32). Proteinový roztok o objemu 50 μl byl filtrován a nastříknut na kolonu Superdex 200 Increase 5/150 GL (předem promytou SAXS pufrem).

Jako referenční vzorek byl použit roztok hovžzího sérového albuminu. Měření probíhalo na pracovišti P12 v Evropské laboratoři pro molekulární biologii (DESY, Hamburg, Německo).

3.5.6.2 Zpracování SEC-SAXS dat

SAXS je kontrastní metoda. Signál pufru proto musel být odečten od signálu proteinu. Chromatografický záznam byl zobrazen v programu CHROMIXS, ve kterém byly oblasti odpovídající signálu pufru a signálu proteinu označeny. Po odečtení byl záznam převeden na rozptylovou křivku pomocí programu PRIMUS. Následovala analýza rozptylových dat. Parametry R_g , $I(0)$, D_{max} , V_p či odhad molekulové hmotnosti (z Guinierova výnosu a/nebo z $P(r)$ distribuční funkce) byly určeny díky programu PRIMUS stejně jako provedení Kratkyho bezrozměrného výnosu.

Důležitým výstupem ze SAXS je model rozptylové proteinové obálky. *Ab initio* modelování rozptylové obálky bylo provedeno využitím programu DAMMIF. K výpočtu teoretické křivky PPM1D NTD bylo využito struktury predikované algoritmem Alphafold2 (AF-O15297-F1, úsek 1–397) a výpočet byl proveden v programu CRY SOL. Teoretická rozptylová křivka byla porovnána s experimentálními daty. Kvalitu proložení dat odráží funkce nesrovnalosti χ^2 dána vztahem:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_i \left[\frac{I(s_i)_{exp} - cI(s_i)_{teoret}}{\sigma(s_i)} \right]^2 \quad (\text{Rovnice 4})$$

Kde N je počet bodů, $\sigma(s_i)$ je experimentální chyba, $I(s)_{exp}$ je experimentálně měřena intenzita rozptýleného záření, $I(s)_{teoret}$ je spočtena intenzita rozptylového záření pro model PPM1D₁₋₃₉₇ (AF-O15297-F1), c je škálovací faktor.

Další optimalizace atomového modelu PPM1D NTD byla provedena v programu EOM nebo SREFLEX, který na základě experimentálních dat nachází konformace proteinu, které nejlépe odpovídají experimentální rozptylové křivce. Výsledky byly vizualizovány superimpozicí získaného atomového modelu do spočtené proteinové obálky v programu SUSPALM. Všechny programy použité pro vyhodnocení SAXS dat byly součástí ATSAS 3.2.1⁷¹.

3.5.7 *In vitro* fosforylace

3.5.7.1 Příprava fosforylované formy PPM1D NTD pomocí proteinkinasy A

K *in vitro* fosforylaci PPM1D NTD byla použita proteinkinasa A (PK A). PK A je cAMP-dependentní proteinkinasa, která rozeznává sekvenční motiv Arg-Arg-X-Ser, kde X může být jakákoliv aminokyselina. K fosforylaci je nutná přítomnost ATP a Mg^{2+} . V této práci byla

využita PK A, která byla rekombinantně připravena v laboratoři Bc. Gabrielou Kočárovou a jejíž aktivita byla 172 U/ μ l (1 U = 1pmol fosfátu přenesený na molekulu kaseinu za 1 min).

Roztok PPM1DNTD byl ředěn PK A fosforylačním pufrem na koncentraci 0,2 mg/ml (složení PK A fosforylačního pufru je uvedeno v Tabulce 17, str. 32). Ředěný protein o objemu 2 ml byl dialyzován proti 200 ml PK A fosforylačního pufru po dobu 3 hodin. Po dialýze byla připravena fosforylační směs obsahující 0,15 mg PPM1D NTD, 20mM MgCl₂, 0,75mM ATP, 280 U PK A/mg PPM1D NTD. Ve standardním protokolu v naší laboratoři se používá 80 U/mg fosforylovaného proteinu. Po optimalizaci fosforylačního protokolu byl ve výsledném protokolu tedy použit 3,5×nadbytek PK A. Fosforylační směs byla doplněna PK A fosforylačním pufrem na požadovaný objem. Po přidání PK A byla fosforylační směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Po této době bylo k směsi přidáno čerstvé ATP a PK A ve stejných množstvích jako předtím a fosforylační směs byla inkubována při 4 °C přes noc. V rámci optimalizace byla za použití stejného protokolu využita i proteinkinasa B (PK B, komerčně dostupná, použito 4 μ l (730 U/ml, 1 U zabuduje 1nmol fosfátu za minutu při 30 °C)). Na druhý den byl vzorek fosforylovaného proteinu PPM1D NTD poslán k hmotnostně spektrometrické analýze, která byla provedena Mgr. Pavlou Vaňkovou, Ph.D. v rámci servisního pracoviště hmotnostní spektrometrie (Biocev, Praha).

3.5.7.2 Příprava fosforylované formy p38 MAPK pomocí kinasy MKK6

Pro přípravu fosforylované formy p38 MAPK (fosfop38 MAPK) byla využita kinasa MKK6, která p38 fyziologicky fosforyluje na pozicích Thr180 a Tyr182. MKK6 podléhá autofosforylaci, díky čemuž se aktivuje. V této diplomové práci byla fosforylovaná kinasa p38 MAPK použita jako substrát pro PPM1D. Kinasa MKK6 byla připravena heterologní rekombinantní expresí v *E. coli* Mgr. Daliborem Koškem, Ph.D. (koncentrována na A₂₈₀ = 0,65).

Byla připravena fosforylační směs obsahující 20mM MgCl₂; 1mM ATP; MMK6 (20 μ l rekombinantně připravené MKK6/0,1 mg p38 MAPK); p38 MAPK. Reakční směs byla doplněna MKK6 fosforylačním pufrem na požadovaný objem (složení MKK6 fosforylačního pufru viz Tabulka 18, str. 32). Po přidání kinasy MKK6 byla reakční směs inkubována po dobu 2 hodin při 37 °C a po této době ještě ponechána přes noc k inkubaci při pokojové teplotě.

3.5.8 Nativní TBE elektroforéza

K studiu tvorby komplexu PPM1D NTD a LZAP byla využita nativní TBE elektroforéza. Metoda využívá migraci proteinů v elektrickém poli na základě jejich velikosti a náboje.

Byl připraven 12% nativní polyakrylamidový gel. Složení gelu, 10×koncentrovaného TBE pufru a 5×koncentrovaného vzorkovacího pufru je uvedeno v Tabulkách 28 (str. 50), 19, 20 (str. 33). Byl připraven vzorek PPM1D NTD, LZAP a směsi těchto proteinů v molárních poměrech 1:2, 1:10, 1:20 (LZAP (50 pmol):PPM1D NTD). Vzorky byly smíchány s 5×koncentrovaným vzorkovacím pufrům (složení viz Tabulka 20, str. 33, výsledná koncentrace 1×) a pufrům pro gelovou permeační chromatografii pro PPM1D NTD (složení viz Tabulka 9, str. 31) doplněny na objem 20 μ l. Elektroforéza probíhala při napětí 150 V po dobu 3 hodin. Po skončení elektroforézy byl gel obarven postupem uvedeným v kapitole 3.5.4 (str. 44).

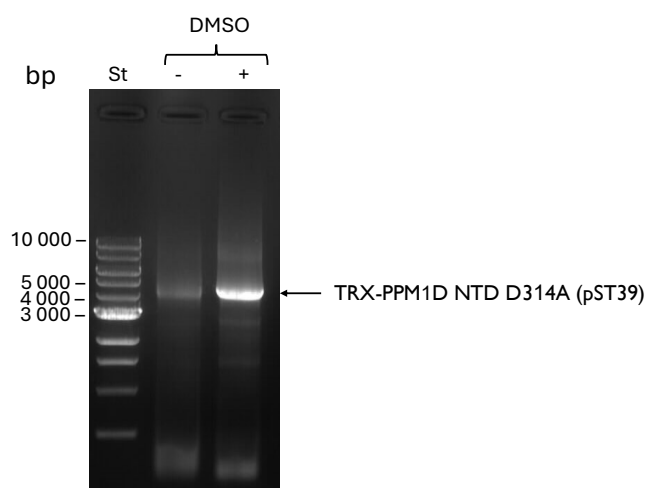
Tabulka 28: Složení 12% polyakrylamidového gelu pro nativní TBE elektroforézu.

Složka	Objem (ml)
akrylamid/bisakrylamid	4,00
10× TBE pufr	1,00
10% (w/v) persulfát amonný	0,075
TEMED	0,008
destilovaná voda	4,95

4 Výsledky

4.1 PCR vnášející mutaci – příprava mutantní formy PPM1D NTD D314A

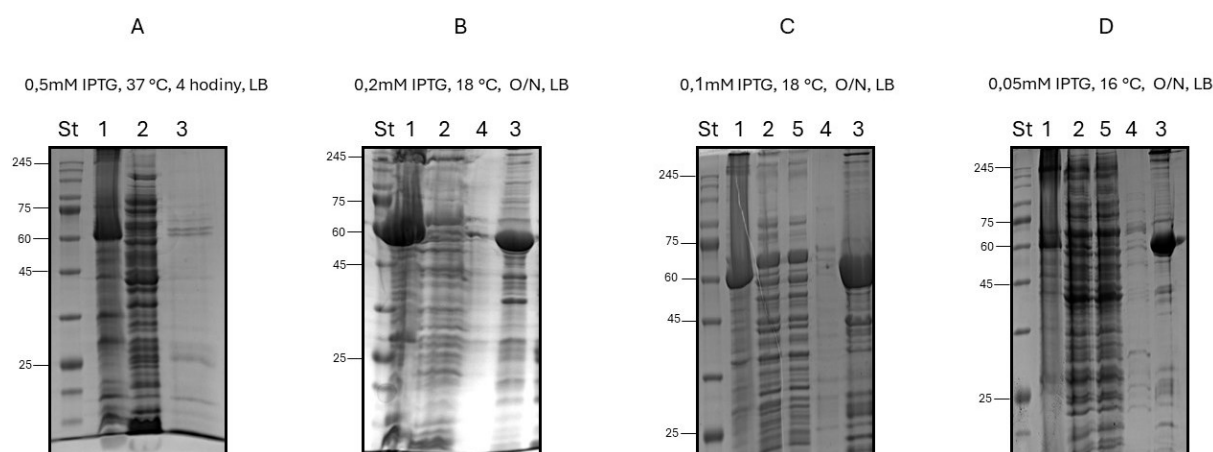
Pro účely měření fosfatasové aktivity bylo nutné připravit mutantní formu enzymu PPM1D s vnesenou inaktivující mutací D314A. Tento konstrukt pak v enzymových měřeních sloužil jako negativní kontrola. Pro vnesení mutace D314A do genu pro TRX-PPM1D NTD (plasmid pST39) byla využita polymerázová řetězová reakce. S cílem získat cílový PCR produkt (linearizovaný plasmid se zavedenou mutací D314A) musela být optimalizována sekvence použitých „primerů“ tak, aby „primery“ netvořily sekundární útvary (výsledný návrh mutagenézních „primerů“ je uveden v Tabulce 22, str. 34). Ve finálním protokolu jsou použity „primery“ purifikovány pomocí HPLC. Neboť v obdržném produktu PCR byla dlouhodobě pozorována přítomnost několika repeticí „primerů“ v okolí mutovaného místa, musela být tzv. „nasedací“ teplota programu zvýšena na 58 °C (z původních 55 °C) a pro amplifikaci musela být využita DNA polymerasa s vyšším teplotním optimem (*Pfu* Ultra HF DNA polymerasa), díky čemuž byly tyto repetice odstraněny. Na Obrázku 12 je znázorněn výsledek horizontální agarosové elektroforézy s výsledným produktem mutagenézní PCR reakce (mezi 4000–5000 bp). Tvorba produktu byla pozorována v reakční směsi s i bez DMSO a pro transformaci do buněk byla využita reakční směs bez DMSO. Po izolaci plasmidové DNA z buněk *E. coli* byla přítomnost mutace D314A v plasmidu ověřena Sangerovou sekvenací.



Obrázek 12: Výsledek horizontální agarosové elektroforézy po mutagenézní PCR reakci. Pro vizualizaci PCR produktů byl využit 1% agarosový gel. V první dráze zleva je standard molekulových hmotností (bp, počet párů bazí). Na pravé straně gelu jsou lineární produkty mutagenézní PCR reakce (TRX-PPM1D NTD D314A v plasmidu pST39) s a bez DMSO. Pro transformaci do buněk *E. coli* byla využita reakční směs bez DMSO. Vzorky byly na gel nanášeny v objemu 30 μ l a elektroforéza probíhala při výkonu 100 V po dobu 45 minut.

4.2 Optimalizace exprese proteinu TRX-PPM1D NTD

Během optimalizace exprese byla provedena série expresních testů, v rámci kterých byla měněna expresní teplota i koncentrace IPTG. Ve všech expresních testech bylo použito LB médium. Míra exprese rozpustného cílového proteinu za různých podmínek byla vyhodnocena pomocí 12% SDS-PAGE gelů po niklové afinitní chromatografii (viz Obrázek 13). Pruh v okolí 60kDa odpovídá fúznímu proteinu TRX-PPM1D NTD. Srovnání výsledků různých expresních podmínek ukázalo změnu zastoupení cílového proteinu TRX-PPM1D NTD v peletní frakci a eluované frakci z niklové afinitní chromatografie. Na základě dosažených výsledků byla jako optimální zvolena expresní teplota 16 °C a 0,05mM koncentrace IPTG (Obrázek 13, panel D). Tyto podmínky, díky kterým byl poměr rozpustného a nerozpustného proteinu TRX-PPM1D NTD nejvyšší, byly použity i pro expresi mutantní formy TRX-PPM1D NTD D314A.

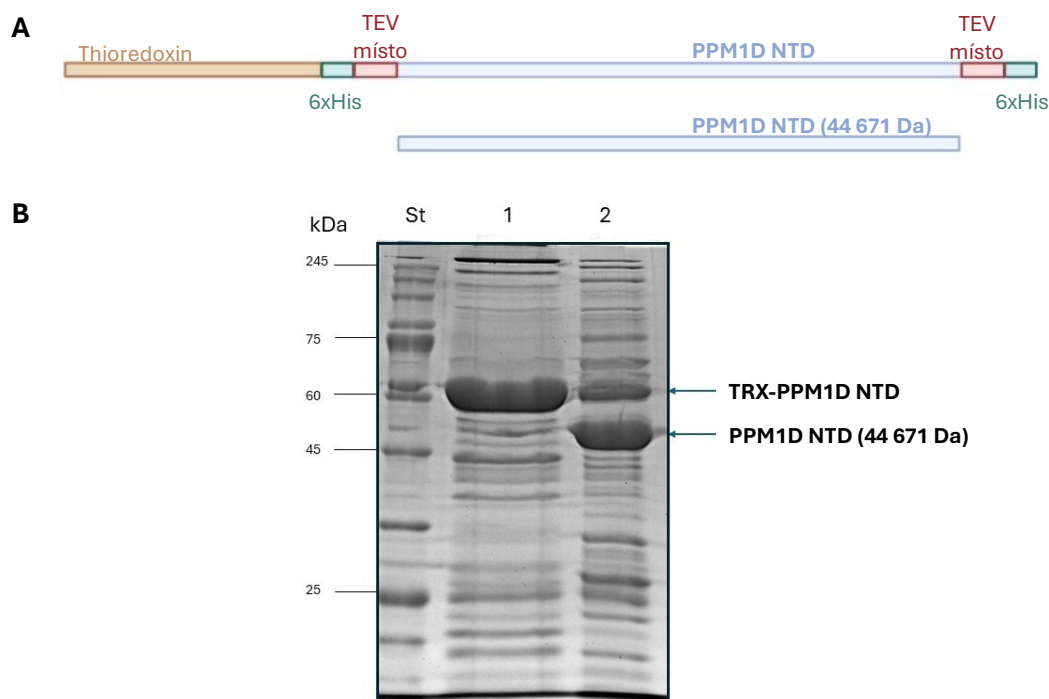


Obrázek 13: Výsledek SDS-PAGE po niklové afinitní chromatografii pro vyhodnocení expresních testů pro proteinový konstrukt TRX-PPM1D NTD. Dráha St – standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR), dráha 1 – peletní frakce (po sonikaci a následné centrifugaci), 2 – supernatantní frakce (po sonikaci a následné centrifugaci), 3 – eluovaná frakce z niklové afinitní chromatografie, 4 – frakce z promývacího kroku, 5 – vzorek roztoku proteklého kolonou, P/N – přes noc. Panely A, B, C, D odpovídají různým expresním podmínkám. Podmínky niklové afinitní chromatografie byly vždy stejné, v některých případech vzorky z jednotlivých kroků ale nebyly podrobeny analýze pomocí SDS-PAGE. Elektroforéza probíhala v 12% gelu při 200 V po dobu 60 minut. Pro další práci s proteinem TRX-PPM1D NTD i jeho mutantní formu PPM1D NTD D314A byly zvoleny podmínky D (16 °C; 0,05mM IPTG; P/N).

4.3 Optimalizace purifikace proteinu PPM1D NTD

V strukturní biologii je nutné pracovat se stabilním a definovaným vzorkem o vysoké čistotě. Charakterizaci PPM1D NTD proto předcházela optimalizace purifikace. Cílový protein byl exprimován ve fúzi s thioredoxinem (TRX) a konstrukt obsahoval dva histidinové kotvy (6×His) na N- i C-konci. Tyto části byly od PPM1D NTD odděleny štěpícím místem pro proteasu TEV. Prvním identifikovaným problémem souvisejícím s purifikací PPM1D NTD bylo právě nekvantitativní štěpení proteasou TEV. Ve finálním protokolu byla proteasa TEV k fúznímu proteinu přidávána v nadbytku, přesto se tento problém nepodařilo odstranit (viz

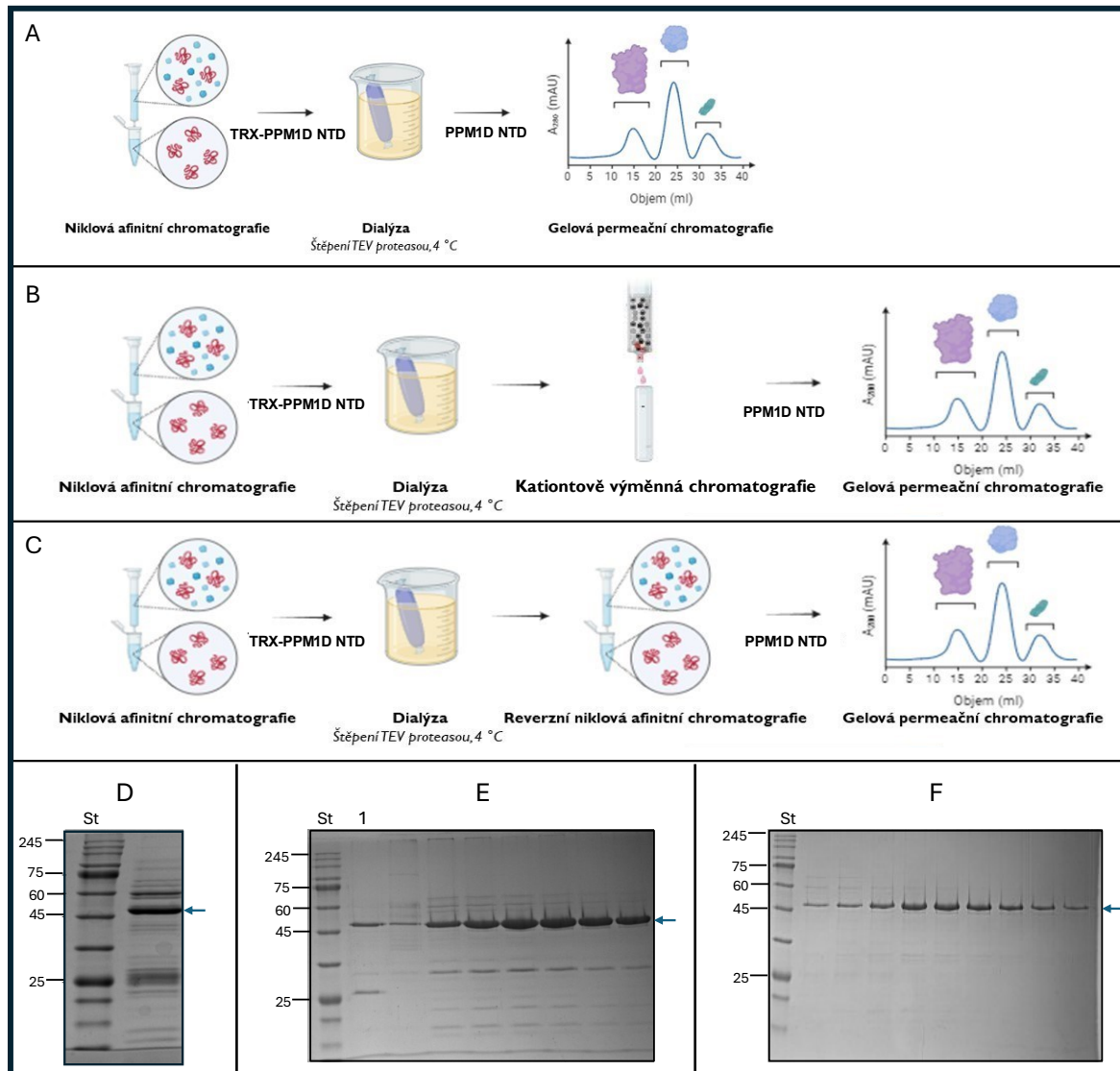
Obrázek 14, panel B), a proto bylo vyzkoušeno zařazení různých purifikačních kroků s cílem neštěpený protein odstranit z finálního proteinového preparátu. Pruh, jenž svou migrací odpovídá velikosti těsně nad 45 kDa, patří PPM1D NTD (44,6 kDa, ověřeno hmotnostní spektrometrií).



Obrázek 14: Znázornění cílového proteinu před a po štěpení proteasou TEV. Štěpení probíhalo přes noc v chladové místnosti. A – Schematické znázornění proteinového konstruktů před a po štěpení proteasou TEV, které následovalo po niklové afinitní chromatografii. B – Výsledek SDS-PAGE (12% gel) před (dráha 1) a po (dráha 2) štěpení. St – standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR). I po štěpení byl ve vzorku stále přítomen fúzní protein obsahující thioredoxin a 2 histidinové kotvy (6×His).

Bylo vyzkoušeno několik přístupů, jak odstranit neštěpený fúzní protein TRX-PPM1D NTD z finálního preparátu. Kromě toho bylo cílem také odstranit i ostatní kontaminující proteiny pocházející z buněk *E. coli*, které byly ve vzorku přítomny i po gelové permeační chromatografii (viz Obrázek 15, panel D, str. 54). Celkově byly testovány tři purifikační strategie, které byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co největší čistoty finálního preparátu. Jednou ze strategií bylo využití kationtově výměnné chromatografie, která pro separaci využívá rozdílů v náboji částic ($pI_{\text{PPM1D NTD}} = 8,35$; $pI_{\text{TRX-PPM1D NTD}} = 7,1$). Jak lze vidět na Obrázku 15 (panel E, str. 54), využitím protokolu zahrnujícího kationtově výměnnou chromatografii (viz Obrázek 15, panel B) byl odstraněn neštěpen fúzní protein TRX-PPM1D NTD. Pro vazbu proteinu na sulfopropyllovou skupinu chromatografického nosiče byla ale potřebná nízká iontová síla roztoku proteinu, důsledkem čehož byla precipitace, a tedy i výrazné ztráty cílového proteinu. Obrázek 15 schematicky znázorňuje návrhy purifikačních protokolů, které byly v rámci této diplomové práce vyzkoušeny. Pro další optimalizaci byl vybrán protokol

s reverzní niklovou afinitní chromatografií (viz Obrázek 15, panel C), při kterém bylo dosaženo nejvyšší čistoty proteinu (viz Obrázek 15, panel F). Před další optimalizací zvoleného purifikačního protokolu byl finální proteinový výtěžek na úrovni 0,5 mg ze 4 litrů LB média. Ve všech protokolech byla pro gelovou permeační chromatografií využita kolona Superdex75 HiLoad 26/600. Zvýšení kvality finálního preparátu bylo dosaženo na úkor proteinového výtěžku (viz intenzita pruhů zvýrazněných modrou šipkou na Obrázku 15, panely D, E, F) a proto bylo dalším cílem finální výtěžek zvýšit.

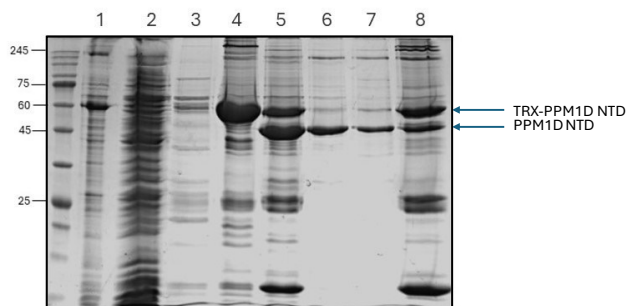


Obrázek 15: Purifikační přístupy použité při optimalizace purifikace PPM1D NTD. A, B, D – Schematické znázornění použitých purifikačních protokolů. D, E, F – Výsledek SDS-PAGE elektroforézy (12% gel) po gelové permeační chromatografii (Superdex75 HiLoad 26/600) demonstrující čistotu finálního proteinového preparátu při použití různých protokolů. D – odpovídá protokolu A, E – odpovídá protokolu B, F – odpovídá protokolu C. Na gel byly naneseny vzorky frakcí odpovídající eluovanému proteinu. St – standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR). V případě panelu D je znázorněna kvalita vzorku po sjednocení eluovaných frakcí. K další optimalizaci s cílem zvýšit proteinový výtěžek byl zvolen protokol C. Modrá šipka v panelech D, E a F odpovídá poloze PPM1D NTD ve 12% SDS-PAGE gelu. Dráha 1 (panel E) odpovídá frakci z gelové permeační chromatografie, která odpovídá agregovanému proteinu.

4.3.1 Finální purifikační protokol

Na základě výsledků uvedených v kapitole 4.3 byl pro další optimalizaci použit purifikační protokol sestávající z niklové afinitní chromatografie, štěpení TEV proteasou, reverzní niklové afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie. Tento protokol ve své původní podobě vedl sice k proteinu PPM1D NTD o vysoké čistotě, výtěžek z jeho purifikace ale činil maximálně ~0,5 mg ze čtyř litrů LB média. Proto bylo cílem další optimalizace purifikačního protokolu zvýšení proteinového výtěžku.

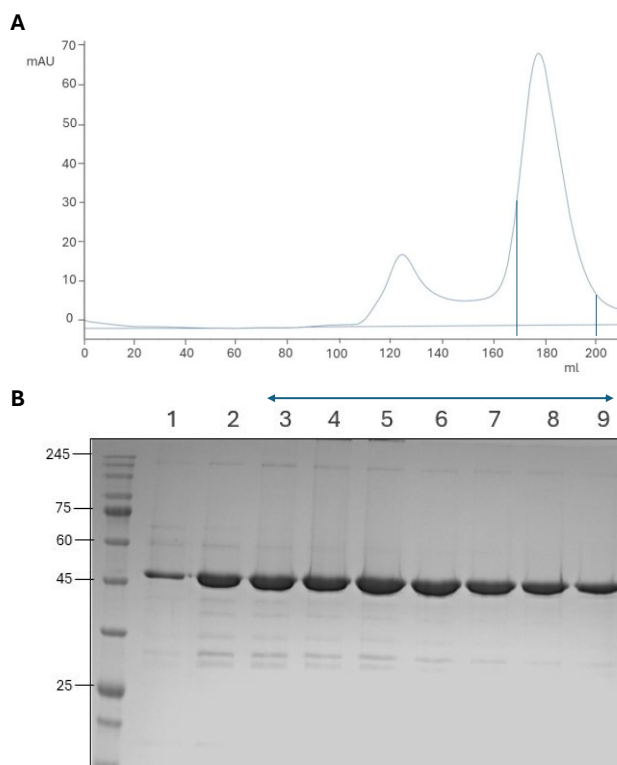
Během všech purifikačních kroků (protokol schematicky znázorněn na Obrázku 15, panel C, str. 54) bylo nutné zajistit stabilitu proteinu PPM1D NTD. Prvním krokem k dosažení tohoto cíle byla náhrada chloridu sodného za chlorid draselný. Draselné ionty jsou dominantními kationty v intracelulárním prostředí, a proto se v případě méně stabilních proteinů preferuje jejich použití v pufrech. Při eluci proteinu PPM1D NTD z kolony při niklové afinitní chromatografii (využitím elučního pufru s 250mM koncentrací imidazolu) docházelo k bezprostřední precipitaci proteinu ve zkumavce. Tento jev je při purifikaci proteinů pozorován poměrně často, a proto byl pro ředění imidazolu protein z kolony eluován do vazného pufru pro niklovou afinitní chromatografii (viz kapitola 3.5.3.2, str. 39). Po štěpení proteasou TEV byl neštěpený fúzní protein TRX-PPM1D NTD odstraněn díky reverzní niklové afinitní chromatografii, při které se neštěpený protein obsahující histidinovou kotvu zachytil na koloně (viz dráha 8, Obrázek 16, str. 55) a pro další postup pak byla využita frakce, která kolonou pro niklovou afinitní chromatografii protekla. Tímto způsobem byly odstraněny i další kontaminanty, které s kolonou pro niklovou afinitní chromatografii nespecificky interagují, nebo proteasa TEV (použitá TEV ve své sekvenci obsahuje histidinovou kotvu). Frakce 6, 7 (viz Obrázek 16, str. 55) byly použity pro další purifikaci (malé množství neštěpeného proteinu je i v nich stále přítomno).



Obrázek 16: Výsledek SDS-PAGE elektroforézy po niklové a reverzní niklové afinitní chromatografii při purifikaci PPM1D NTD. 1 – peletní frakce, 2 – supernatantní frakce, 3 – frakce z promývacího kroku, 4 – eluovaná frakce, 5- vzorka proteinu po štěpení, 6 – frakce po protečení z reverzní niklové afinitní chromatografie, 7 – frakce z promývacího kroku při reverzní niklové afinitní chromatografii, 8 – frakce po eluci 250mM imidazolem (nepoužita v dalším postupu). Frakce 6, 7 byly sjednoceny a použity pro další purifikaci.

Po reverzní niklové afinitní chromatografii následovala dialýza do dialyzačního pufru pro gelovou permeační chromatografii. Během dialýzy docházelo opakovaně k precipitaci proteinu PPM1D NTD. Zvýšení koncentrace soli z 150 mM na 200 mM (175mM KCl, 25mM NaCl) v dialyzačním pufru pro gelovou permeační chromatografii (i v pufru pro gelovou permeační chromatografii) vedlo k výraznému zvýšení stability vzorku (precipitace již pozorována nebyla). Pomocí gelové permeační chromatografie byl protein dál přečištěn a oddělen od proteinových agregátů (viz Obrázek 17, panel A, eluční objem 120 ml (mrtvý objem kolony), potvrzeno pomocí SDS-PAGE, viz Obrázek 17, dráha 1, panel B), díky čemuž byla zajištěna monodisperzita vzorku.

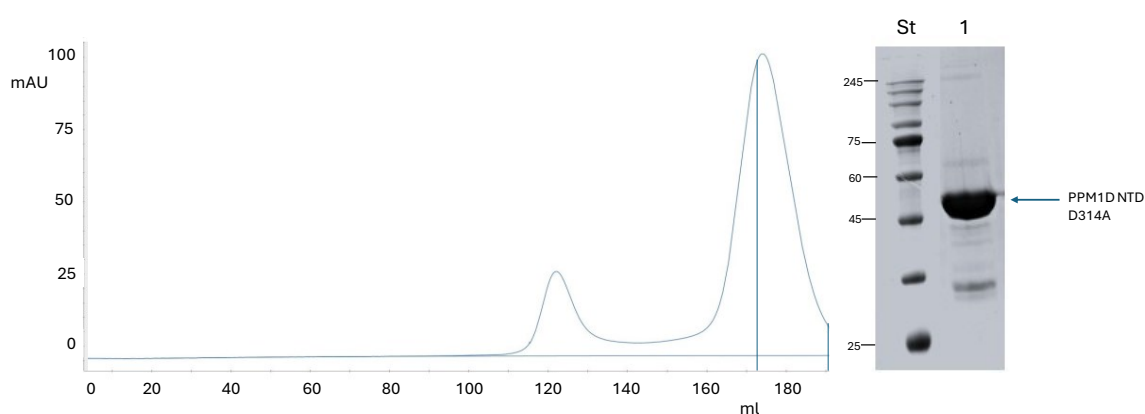
Díky těmto úpravám purifikačního protokolu byl finální výtěžek zvýšen na 3 mg PPM1D NTD ze čtyř litrů LB média. Posléze bylo přistoupeno k přípravě PPM1D NTD ze šesti litrů LB média. Výtěžek v takovém případě činil kolem 4 mg proteinu. Finální kvalita preparátu, který byl používán ve všech dalších měřeních, je znázorněna na Obrázku 17 (panel B, sjednoceny byly frakce 3-9).



Obrázek 17: Výsledek gelové permeační chromatografie. A – chromatogram z gelové permeační chromatografie (kolona Superdex 75 pg HiLoad 26/600, průtok 2 ml/min, 4 °C, pufr: 50mM Tris (pH = 7,5), 175mM KCl, 25mM NaCl, 10% glycerol, 10mM MgCl₂, 1mM TCEP). Pro SDS-PAGE analýzu (B) byly použity frakce odpovídající elučním objemům 125 ml (dráha 1, panel B) a 160–200 ml (dráhy 2–9). Frakce odpovídající dráhám 3–9 byly sjednoceny (indikováno modrými čarami na chromatogramu, panel B), koncentrovány na 1 mg/ml, zamrazeny a uchovány v -80 °C k dalšímu použití. St – standard molekulových hmotností (ROTI[®]Mark TRICOLOR).

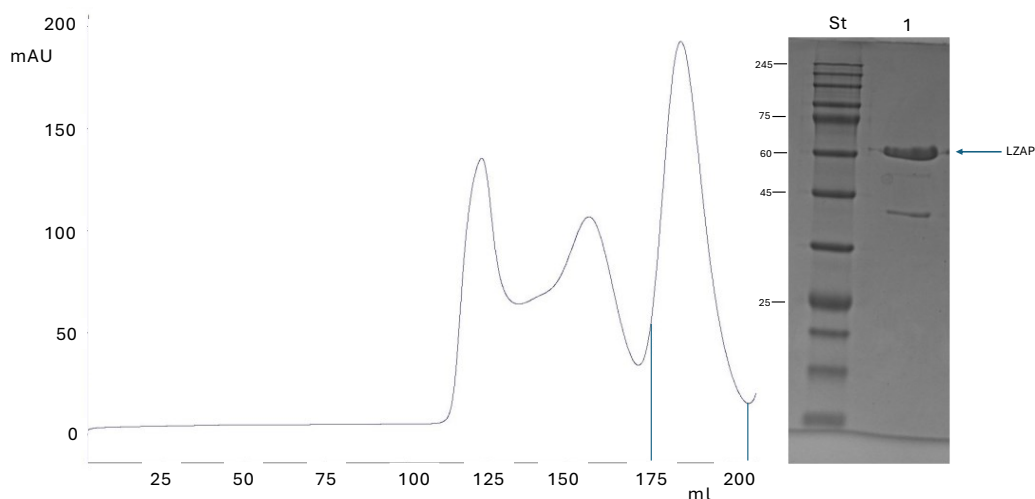
4.4 Purifikace PPM1D NTD D314A, LZAP, p38 MAPK

Pro další studium proteinu PPM1D NTD bylo nutné připravit i jeho katalyticky neaktivní analog PPM1D NTD D314A. Tento protein sloužil při měřeních jako negativní kontrola a jeho příprava byla shodná s přípravou PPM1D NTD. Pomocí gelové permeační chromatografie byl proteinový preparát zbaven agregovaných částic (jež byly eluovány v rámci mrtvého objemu kolony, 120 ml). Z purifikace PPM1D NTD D314A ze šesti litrů LB média bylo získáno 4,5 mg proteinu. Pro přehlednost je uveden jenom výsledek z gelové permeační chromatografie a čistota finálního proteinového preparátu po sjednocení a koncentrování eluovaných frakcí (175–200 ml, viz Obrázek 18).



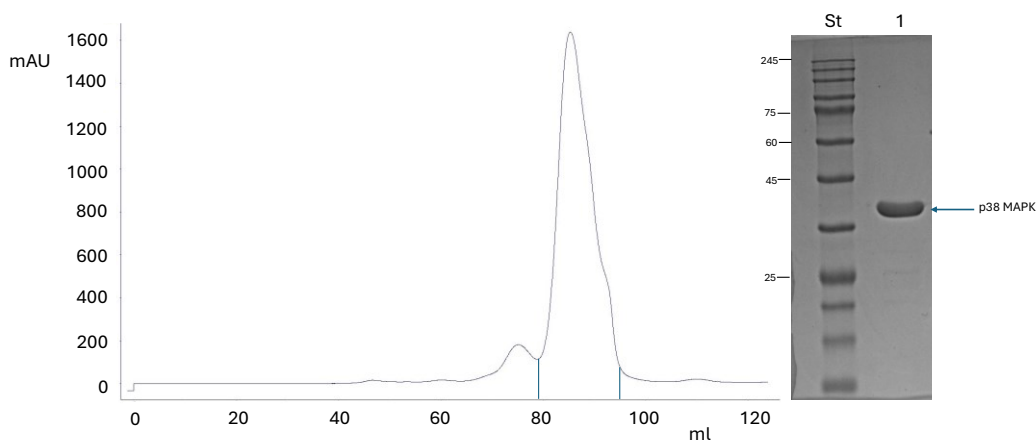
Obrázek 18: Výsledek gelové permeační chromatografie při purifikaci PPM1D NTD D314A. V levé části je na chromatogramu znázorněn eluční profil PPM1D NTD D314A (kolona Superdex 75 pg HiLoad 26/600, průtok 2 ml/min, 4 °C, pufr: 50mM Tris (pH = 7,5), 175mM KCl, 25mM NaCl, 10% glycerol, 10mM MgCl₂, 1mM TCEP). Eluční objem 120 ml odpovídá mrtvému objemu kolony, při kterém dochází k eluci agregovaných částic. Frakce odpovídající elučnímu objemu 175–200 ml byly sjednoceny (indikováno modrými čarami na chromatogramu), koncentrovány na 1 mg/ml a uchovány v -80 °C pro další použití. Výsledná čistota proteinového preparátu je znázorněna na výsledku SDS-PAGE elektroforézy (12% gel, pravá část Obrázku). St – standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR).

Protein LZAP byl exprimován ve fúzi s MBP. Purifikace proto sestávala z amylosové afinitní chromatografie, štěpení MBP-LZAP proteasou TEV na koloně a na konec purifikace byla pro zajištění monodisperzity vzorku zařazena gelová permeační chromatografie. Od finálního preparátu byl gelovou permeační chromatografií oddělen agregát a dimerní frakce LZAP (viz Obrázek 19, str. 58, eluční objemy 120 ml, resp. 160 ml). Eluované frakce odpovídající monomernímu LZAP (eluční objem 175–200 ml, viz Obrázek 19, str. 58) byly sjednoceny, koncentrovány a uchovány při -80 °C. Výtěžek z purifikace LZAP činil 11 mg.



Obrázek 19: Výsledek gelové permeační chromatografie při purifikaci LZAP. V levé části je na chromatogramu znázorněn eluční profil LZAP (kolona Superdex 75 pg HiLoad 26/600, průtok 2 ml/min, 4 °C, pufr: 50mM Tris (pH = 7,5), 200mM NaCl, 10% glycerol, 1mM TCEP, 1mM EDTA). Eluční objem 120 ml odpovídá mrtvému objemu kolony, při kterém dochází i k eluci agregovaných částic. Frakce odpovídající elučnímu objemu 150–170 ml zřejmě obsahovaly dimerní protein LZAP. Frakce 175–200 ml s monomerním LZAP byly sjednoceny (indikováno modrými čarami na chromatogramu), koncentrovány na 5 mg/ml a uchovány v -80 °C pro další použití. Výsledná čistota proteinového preparátu je znázorněna na výsledku SDS-PAGE elektroforézy (12% gel, pravá část Obrázku). St – standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR).

Jako specifický substrát pro měření fosfatasové reakce byla použita myšší izoforma kinasy p38 MAPK. Kinasa p38 MAPK byla exprimována v *E. coli* s histidinovou kotvou pro účely niklové afinitní chromatografie. Po odštěpení histidinové kotvy proteasou TEV následovala gelová permeační chromatografie s cílem zajistit monodisperzitu vzorku. Finální proteinový výtěžek ze dvou litrů LB média činil přes 80 mg a jeho čistota byla po sjednocení eluovaných frakcí (80–100 ml) ověřena pomocí SDS-PAGE (viz Obrázek 20).



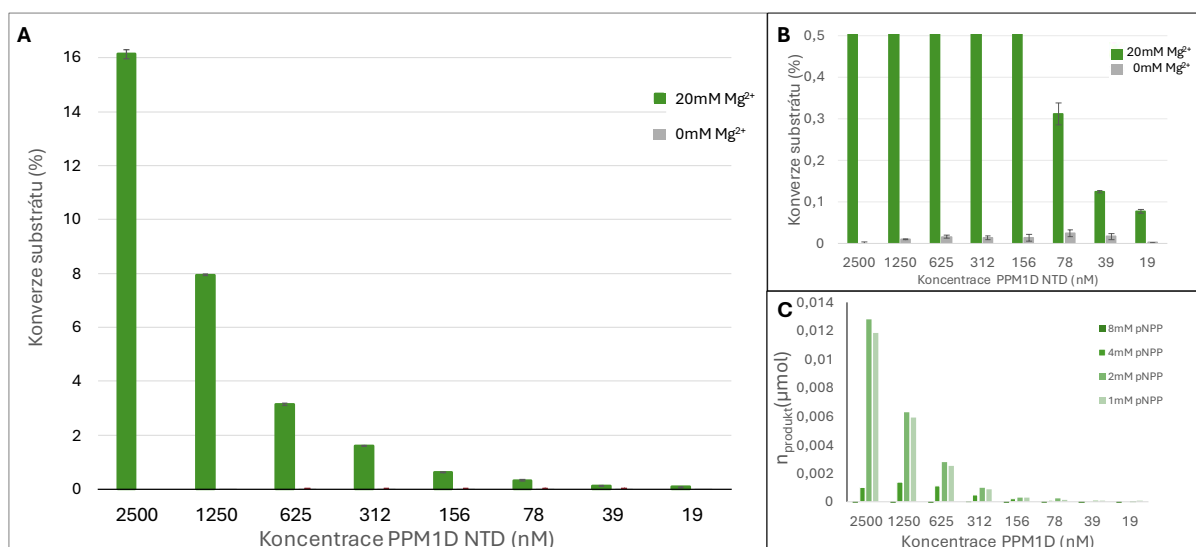
Obrázek 20: Výsledek gelové permeační chromatografie při purifikaci p38 MAPK. V levé části je na chromatogramu znázorněn eluční profil p38 MAPK (kolona Superdex 200 pg HiLoad 16/600, průtok 0,75 ml/min, 4 °C, pufr: 50mM Tris (pH = 7,5), 200mM NaCl, 10% glycerol, 1mM TCEP, 10mM MgCl₂). Eluční objem 45 ml odpovídá mrtvému objemu kolony. Frakce odpovídající elučnímu objemu 80–100 ml s p38 MAPK byly sjednoceny (indikováno modrými čarami na chromatogramu), koncentrovány na 1 mg/ml a uchovány v -80 °C pro další použití. Výsledná čistota proteinového preparátu je znázorněna na výsledku SDS-PAGE elektroforézy (12% gel, pravá část Obrázku). St – standard molekulových hmotností (ROTI®Mark TRICOLOR).

4.5 Charakterizace PPM1D NTD

Po optimalizaci exprese a purifikace PPM1D NTD, díky které byl získán stabilní protein o vysoké úrovni čistoty, bylo přistoupeno k charakterizaci tohoto proteinového konstruktů v kontextu enzymové aktivity a struktury.

4.5.1 *In vitro* měření vnitřní fosfatasové aktivity se substrátem pNPP

Před další charakterizací a studiem proteinu PPM1D NTD bylo nutné ověřit, že proteinový konstrukt vykazuje fosfatasovou aktivitu v *in vitro* podmínkách. Pro tyto účely bylo využito nespecifického substrátu, jímž byl para-nitrofenylfosfát (pNPP). Metoda musela být optimalizována v kontextu složení reakčního pufru i množství substrátu v reakční směsi, neboť v počátečních fázích měření nebyl pozorován žádný signál. Jak ukazuje Obrázek 21 (panel C), při vysokých koncentracích pNPP (8mM, 4mM) nevykazuje fosfatasa PPM1D NTD spolehlivě detekovatelnou aktivitu vůči substrátu. Optimální koncentrací pNPP pro měření fosfatasové aktivity PPM1D NTD byla 1mM. Při změně množství enzymu PPM1D NTD (2600nM–19nM) byl pozorován koncentračně závislý pokles konverze substrátu (viz Obrázek 21, panel A). Napříč různými koncentracemi PPM1D NTD není bez přítomnosti hořečnatých iontů fosfatasová aktivita pozorována (viz Obrázek 21, panel B).

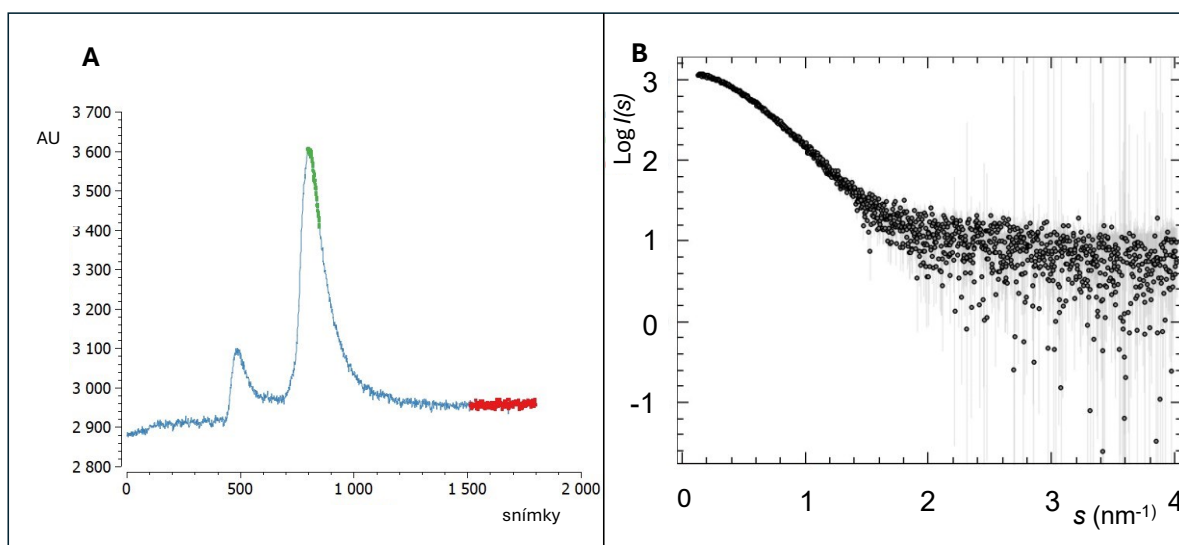


Obrázek 21: Výsledek měření fosfatasové aktivity proteinového konstruktů PPM1D NTD vůči pNPP. A – Závislost konverze substrátu (%) na koncentraci PPM1D NTD (nM) (zeleně s hořečnatými ionty, šedě bez hořečnatých iontů). B – Závislost konverze substrátu (%) na koncentraci PPM1D NTD (nM) (zeleně s hořečnatými ionty, šedě bez hořečnatých iontů) s detailem na výsledek bez hořečnatých iontů. C – Závislost látkového množství produktu reakce na koncentraci PPM1D NTD pro různé koncentrace pNPP (odstíny zelené). Objem reakčních směsí byl 125 µl. Reakce probíhala při 25 °C po dobu 2 hodin (20mM HEPES, 175mM KCl, 25mM NaCl, 20mM MgCl₂, 0,1mM TCEP, 0,2mg/ml BSA). Reakce byla zastavena přidáním 125 µl 2M NaOH. Množství produktu bylo získáno měřením absorbance při 405 nm a konverze substrátu spočtena vůči přidávanému množství substrátu do reakčních směsí.

4.5.2 SEC-SAXS

SAXS je strukturní metoda s nízkým rozlišením. I přesto metoda poskytuje užitečné informace o velikosti, flexibilitě a tvaru molekul. V uspořádání SEC-SAXS předchází měření gelové permeační chromatografie. Synchrotronová rozptylová data byla získána na pracovišti P12 na okruhu Petra III v rámci Evropské laboratoře pro molekulární biologii (DESY, Hamburg, Německo).

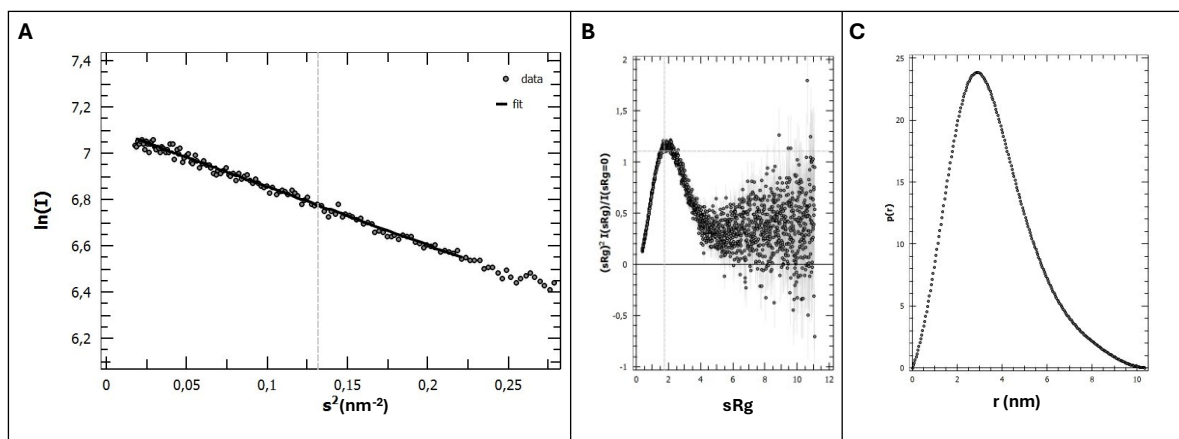
Pomocí gelové permeační chromatografie byl od proteinu oddělen proteinový agregát (viz Obrázek 22, panel A), který by rozptylem rentgenového záření poskytoval zkreslená data. SAXS je kontrastní metoda, a tak signál z rozptylu rentgenového záření pufr (viz Obrázek 22, panel A, červeně) musel být odečten od signálu z rozptylu na proteinu (viz Obrázek 22, panel A, zeleně) pomocí programu CHROMIXS. Pomocí programu PRIMUS byla pak po odečtení obdržena experimentální rozptylová křivka pro PPM1D NTD (viz Obrázek 22, panel B). Při vyšších hodnotách s se intenzita rozptýleného záření přibližuje k nulovým hodnotám, čímž se ztrácí detailní informace o struktuře.



Obrázek 22: Data získané ze SEC-SAXS měření. A – Chromatogram z gelové permeační chromatografie, která předcházela měření SAXS. B – Rozptylová křivka spočtena po odečtení signálu pufru (panel A, červeně) od signálu proteinu (panel A, zeleně). Podmínky gelové permeační chromatografie – kolona Superdex 200 Increase 5/150 GL, pufr (50mM Tris (pH = 7,5), 175mM KCl, 25mM NaCl, 3% glycerol, 10mM MgCl₂, 1mM TCEP). Na kolonu bylo nastříknuto 50 μ l roztoku proteinu o koncentraci 3,2 mg/ml. Vyhodnoceno pomocí programů CHROMIXS a PRIMUS⁷¹.

Pomocí programu PRIMUS pak byla získaná rozptylová data vyhodnocena. K vyhodnocení SAXS dat se využívá několik přístupů. Jak ukazuje Obrázek 23 (panel A, str. 61), výnos dat podle Guiniera je lineární. Linearita Guinierova výnosu (pro malé hodnoty s) poukazuje na dobrou kvalitu vzorku. Kratkyho bezrozměrný výnos (viz Obrázek 23, panel B)

po dosažení maxima prudce klesá, což je trend typický pro kompaktní proteiny, ale maximum je mírně posunuto k vyšším hodnotám sR_g (maximum u $sR_g = 1,73$ je typické pro kompaktní globulární proteiny). Na Obrázku 23 (panel C) je také znázorněna $P(r)$ distribuční funkce pro částici PPM1D NTD s maximální vzdáleností v rámci molekuly (D_{max}) v hodnotě 10,37 nm.



Obrázek 23: Zpracování dat ze SEC-SAXS měření pro PPM1D NTD. A – Vynesení dat podle Guiniera, jehož linearita znamená dobrou kvalitu vzorku. B – Kratkyho bezrozměrný výnos. Poloha maxima a intenzita poklesu křivky poskytuje informace o kompaktnosti, resp. flexibilitě studovaného systému. C – $P(r)$ distribuční funkce znázorňující maximální vzdálenost v rámci molekuly (D_{max}) v hodnotě 10,37 nm. Vyhodnoceno pomocí programu PRIMUS⁷¹.

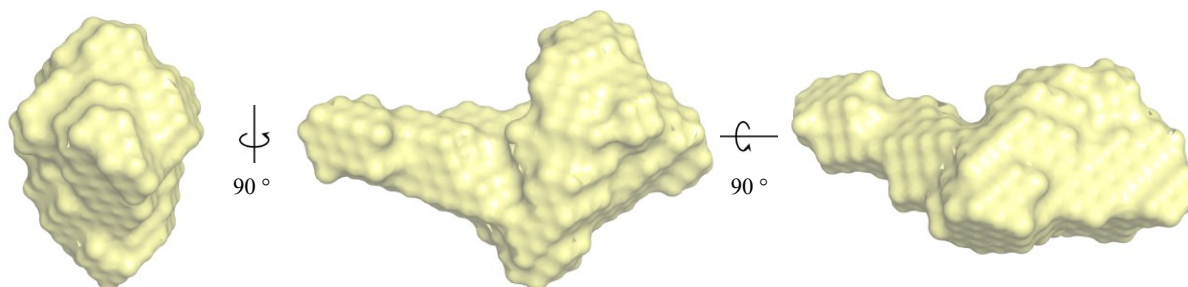
Z $P(r)$ distribuční funkce i Guinierovy aproximace (platí pro malé hodnoty s) pak bylo možné spočítat parametry proteinu PPM1D NTD (gyrační poloměr R_g , maximální vzdálenost v rámci molekuly D_{max} , Porodův objem molekuly V_p , odhad molekulové hmotnosti částice M_w^P (z Porodova objemu, užitečné při studiu komplexů)). Odhad molekulové hmotnosti (~43,2 kDa) poměrně dobře odpovídá molekulové hmotnosti proteinu vypočtené z jeho sekvence (44,67 kDa). Výpočet gyračního poloměru R_g získaný z Guinierovy aproximace, resp. $P(r)$ distribuční funkce poskytuje porovnatelné hodnoty. Parametry PPM1D NTD získané metodou SAXS jsou uvedeny v Tabulce 29.

Tabulka 29: Strukturální parametry získané z vyhodnocení SAXS dat

Parameter	Experimentální hodnota
R_g (nm) (z Guinierové aproximace)	$2,84 \pm 0,01$
R_g (nm) (z $P(r)$ funkce)	$2,85 \pm 0,01$
D_{max} (nm)	10,37
Porodův objem (nm ³)	78,46
Odhad M_w^P (kDa)	~43,2

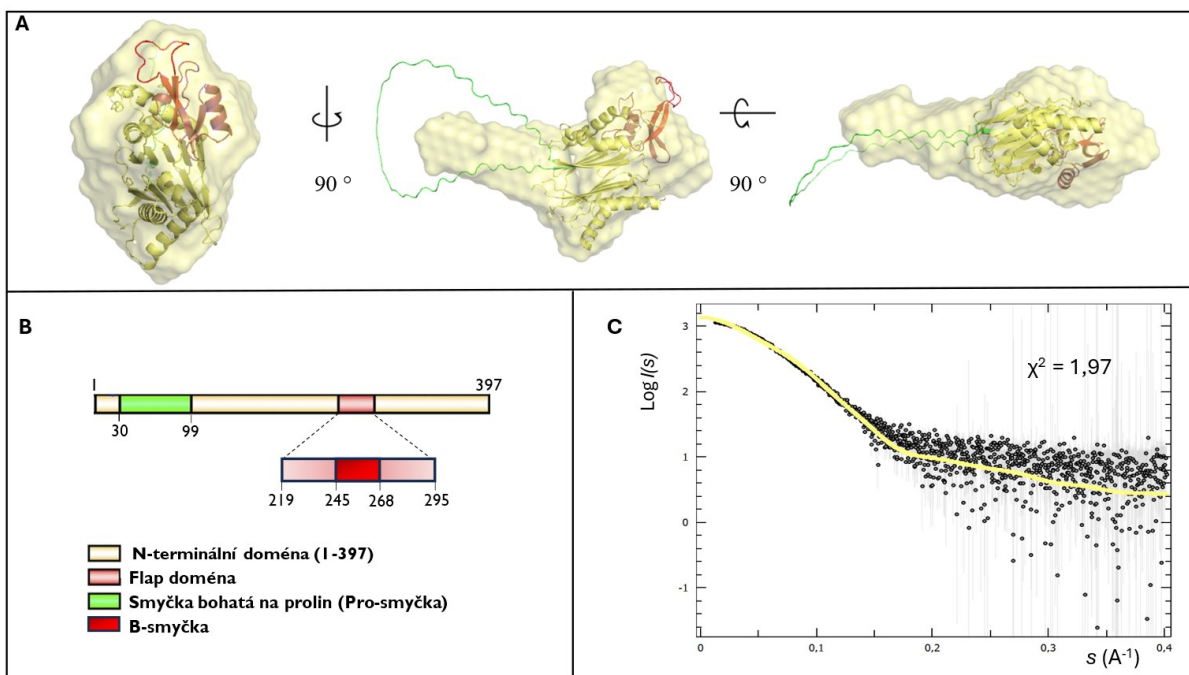
4.5.2.1 Modelování proteinové obálky *ab initio*

Z rozptylových dat byl vypočten model proteinové rozptylové obálky odrážející tvar proteinové částice v roztoku. Jedná se tedy o průměrovaný tvar molekuly. *Ab initio* modelování bylo provedeno v programu DAMMIF. Jak lze vidět na Obrázku 24, model proteinové obálky sestává z velké kompaktní centrální části a užší boční částí.



Obrázek 24: SAXS model rozptylové obálky proteinu PPM1D NTD. Obálka byla modelována v programu DAMMIF⁷¹. Znázorněn je pohled z různých úhlů. Obálka byla zobrazena a upravena v programu Pymol⁴⁵.

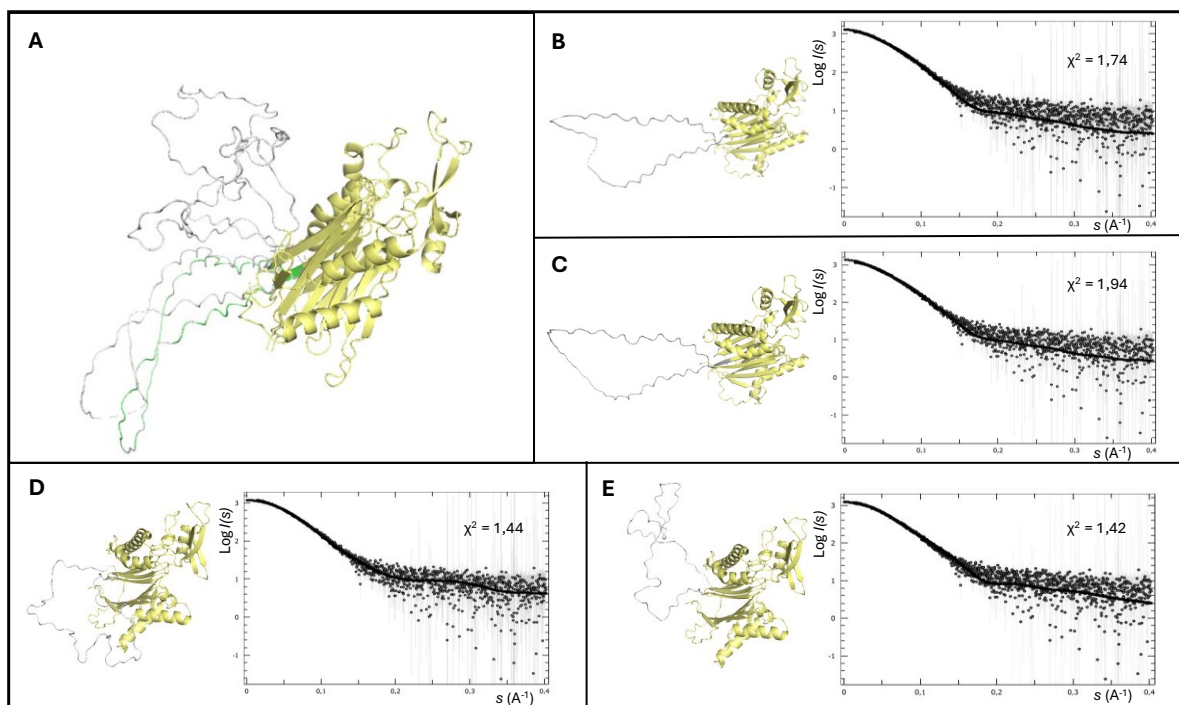
Získaná experimentální data pak dále sloužila pro tvorbu strukturního modelu PPM1D NTD. K těmto účelům je potřebná sekvence cílového proteinu, jeho struktura a experimentální rozptylová křivka získaná ze SAXS měření. Experimentální struktura PPM1D s Pro-smyčkou není dostupná, proto byla použita struktura predikována algoritmem Alphafold2 (konkrétně její úsek 1–397, v této práci označován jako PPM1D NTD). Teoretická křivka predikované struktury PPM1D NTD byla získána v programu CRY SOL (na kvalitu proložení s experimentálními daty poukazuje funkce nesrovnalosti χ^2). Pomocí programu SUSPALM byla predikovaná struktura superponována do modelu proteinové obálky. Jak lze vidět na Obrázku 25 (panel A, str. 63) boční úzká část v proteinové obálce na základě superimpozice odpovídá Pro-smyčce. Mohutnější část obálky zcela jistě odpovídá katalytickému jádru.



Obrázek 25: Predikovaná struktura PPM1D NTD (pomocí algoritmu Alphafold2, AF-O15297-F1) superponována do proteinové obálky (A). Zeleně je znázorněna Pro-smyčka, tmavě červeně je znázorněna flap doména se sytě červenou B-smyčkou. Zobrazen je pohled z různých úhlů. B – Schematické znázornění primární struktury PPM1D NTD s vyznačenými úseky (barvy korespondují s modelem v panelu A). C – Teoretická rozptylová křivka struktury (žlutě) predikované Alphafoldem2 po proložení s experimentálními rozptylovými daty. χ^2 je tzv. funkce nesrovnalostí a poukazuje na kvalitu proložení. Vyhodnoceno pomocí programů SUSPALM a CRY SOL⁷¹.

Kvalita proložení struktury predikované algoritmem Alphafold2 byla na úrovni hodnoty $\chi^2 = 1,97$. S cílem zvýšit kvalitu proložení bylo přistoupeno k tvorbě strukturních modelů, jichž rozptylové křivky by naměřeným datům odpovídaly více (nižší hodnota χ^2). Pomocí programů EOM byly z predikované struktury modelovány konformace PPM1D NTD, které měly odpovídat experimentálním datům a pro které byly vypočteny teoretické rozptylové křivky.

Strukturní modely se od predikované struktury liší změnami v konformaci Pro-smyčky. Kvalita proložení (hodnota χ^2) se pro různé konformace signifikantně neliší a ani jeden z konformerů není v úplné shodě s experimentálními daty (viz Obrázek 26, panely B–E, str. 64). Lze ale pozorovat, že ve všech případech Pro-smyčka zaujímá extendovanou konformaci se značnou flexibilitou.



Obrázek 26: Modely reprezentantů různých konformerů PPM1D NTD vycházející ze struktury predikované algoritmem Alphafold2 (zeleně). A – Strukturní porovnání modelovaných konformačních stavů Pro-smyčky. B–E – Jednotlivé konformační stavy Pro-smyčky s vypočtenými teoretickými křivkami. Modelování konformerů bylo provedeno v programu. Teoretické rozptylové křivky byly získány využitím programu CRY SOL⁷¹. χ^2 je tzv. funkce nesrovnalosti a poukazuje na kvalitu proložení.

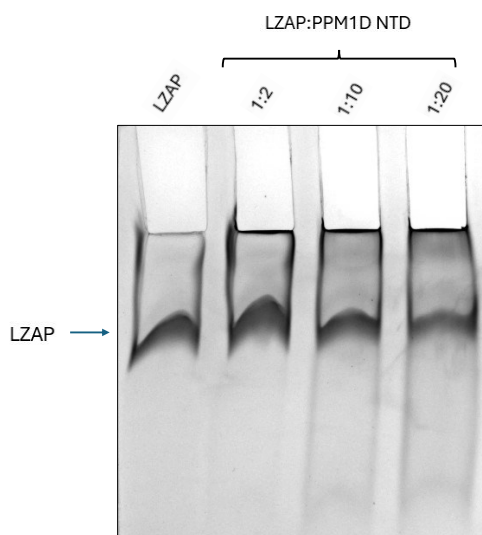
4.6 Studium interakce PPM1D NTD/LZAP

Cílem této části předkládané diplomové práce bylo nejen studium interakce mezi proteiny PPM1D NTD a LZAP ale i sledování vlivu LZAP na fosfatasovou aktivitu PPM1D NTD. Pro studium schopnosti PPM1D NTD tvořit komplex s proteinem LZAP byla využita nativní TBE elektroforéza. Měření vnitřní fosfatasové aktivity v přítomnosti a nepřítomnosti LZAP bylo provedeno s nespecifickým substrátem, jímž by para-nitrofenylfosfát. Pro měření fosfatasové aktivity PPM1D NTD vůči fyziologickému substrátu (kterým byla fosfop38 MAPK) bylo využito komerčně zakoupené sady, která umožňuje detekovat uvolněný fosfát, jakožto produkt fosfatasové reakce.

4.6.1 Nativní TBE elektroforéza

Schopnost PPM1D NTD tvořit komplex s proteinem LZAP byla studována za využití nativní TBE elektroforézy. Byly připraveny 3 vzorky obsahující směs LZAP a PPM1D NTD v různých molárních poměrech (LZAP:PPM1D NTD – 1:2, 1:10, 1:20) a 1 kontrolní vzorek obsahující protein LZAP. Kontrolní vzorek pro PPM1D NTD připraven nebyl, neboť v případě PPM1D NTD kvůli precipitaci i kvůli pH použitého pufru nedocházelo k migraci v gelu.

Cílem proto bylo pozorovat migraci LZAP při titraci proteinem PPM1D NTD. Jednoznačnou tvorbu komplexu nebylo možné pozorovat ani při vysokých molárních poměrech LZAP:PPM1D NTD. Při zvyšování poměru LZAP:PPM1D NTD lze pozorovat pouze nepatrný úbytek LZAP v dráhách v závislosti na množství PPM1D NTD (intenzita pruhů postupně klesá, viz Obrázek 27).

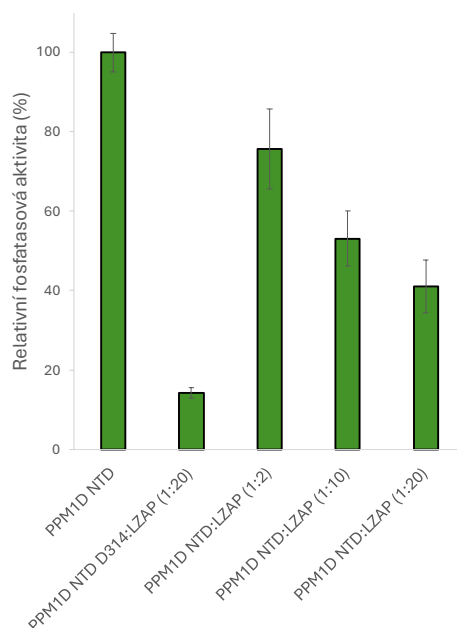


Obrázek 27: Výsledek nativní elektroforézy pro ověření interakce mezi PPM1D NTD a LZAP. Vzorky ve všech dráhách byly naneseny o objemu 20 μ l. Jednotlivé dráhy odpovídají různým molárním poměrům LZAP:PPM1D NTD. V první dráze je samotný protein LZAP (50 pmol), ve druhé dráze je LZAP:PPM1D NTD (50 pmol:100 pmol), ve třetí dráze je LZAP:PPM1D NTD (50 pmol:500 pmol) a ve čtvrté dráze je LZAP:PPM1D NTD (50 pmol:1000 pmol). Elektroforéza probíhala v TBE pufru (pH = 8,7) po dobu 2,5 hodin při výkonu 150 V.

4.6.2 Měření vnitřní fosfatasové aktivity PPM1D NTD v přítomnosti LZAP

I přesto, že výsledek nativní elektroforézy jednoznačně nepotvrdil tvorbu komplexu mezi PPM1D NTD a LZAP, bylo dalším úkolem sledování vlivu LZAP na aktivitu fosfatasy PPM1D NTD. Pro tyto účely byl jako substrát použit para-nitrofenylfosfát. Poměry použité při tomto měření odpovídají poměrům z kapitoly 4.6.1 (vice versa) a pro všechny vzorky byla také provedena kontrolní reakce s katalyticky neaktivním mutantním proteinem PPM1D NTD D314A.

Z dosažených výsledků je zřejmý pokles fosfatasové aktivity PPM1D NTD v závislosti na přítomnosti proteinu LZAP (viz Obrázek 28, str. 66). Více než 20% pokles aktivity lze pozorovat již při molárním poměru 1:2. Dalším zvyšováním poměru PPM1D NTD:LZAP tento trend pokračuje a při poměru 1:20 je pokles aktivity PPM1D NTD na úrovni 60 %. Pro negativní kontrolu (PPM1D NTD D314A s LZAP) je pozorován jenom signál pozadí, jenž odpovídá asi 15 % signálu pozitivní kontroly.



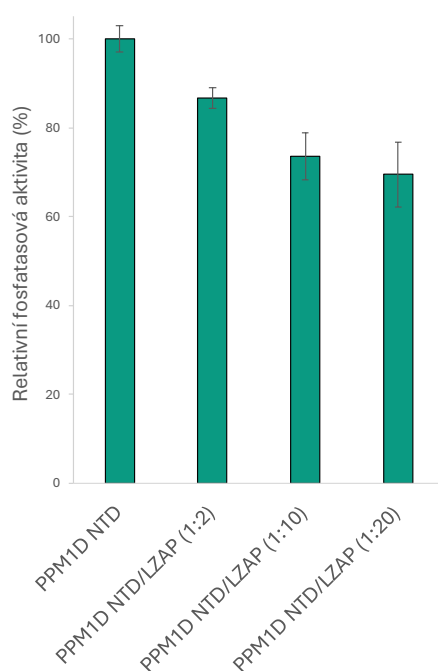
Obrázek 28: Studium fosfatasové aktivity PPM1D NTD v přítomnosti proteinu LZAP využitím pNPP jako substrátu. Reakce probíhala při 25 °C po dobu dvou hodin. Reakční směs byla složena z 2,5 μ M PPM1D NTD, 20mM MgCl₂, 0,02mg/ml BSA, 1mM pNPP. Všechny složky byly dialyzovány nebo rozpuštěny ve fosfatasovém pufru (pH = 7,5; 20mM HEPES; 175mM KCl; 25mM NaCl; 0,1mM TCEP). Reakční směs měla objem 125 μ l. Reakce byla zahájena přidáním enzymu a zastavena přidáním 125 μ l 2M NaOH. Po reakci bylo množství para-nitrofenolátu stanoveno měřením absorbance při 405 nm. Při výsledcích odpovídajících různým poměrům PPM1D:LZAP (osa x) je v závorce uveden použitý molární poměr obou proteinů.

4.6.3 Měření fosfatasové aktivity PPM1D NTD vůči fyziologickému substrátu v přítomnosti LZAP

pNPP není fyziologickým substrátem proteinfosfatasy PPM1D (jedná se spíše o modelový substrát při studiu aktivity různých fosfatas) a jeho využití neposkytuje informace o vlivu proteinu LZAP v kontextu schopnosti PPM1D rozeznávat a defosforylovat fyziologické substráty. Toho bylo docíleno využitím komerčně zakoupené sady Malachite green assay kit (Sigma Aldrich). Metoda umožňuje detekovat uvolněný fosfát a tím i studovat aktivitu proteinfosfatas vůči specifickým substrátům jako jsou fosforylované peptidy nebo fosforylované proteinové substráty.

Substrátem pro tuto reakci byla fosforylovaná forma myší izoformy proteinkinasy p38 MAPK (95% sekvenční identita s lidskou izoformou). Fosfop38 MAPK byla připravena pomocí kinasy MKK6, která p38 MAPK fyziologicky dvojité fosforyluje (na pozicích T180 a Y182, tento motiv je v buňce rozeznáván PPM1D) v reakci na buněčný stres. Fosforylace p38 MAPK na sekvenčním motivu rozeznávaném PPM1D (pTGpY, pozice T180, Y182) byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostně spektrometrická analýza prokázala asi 50% populaci fosforylované p38 MAPK (ve směsi mono a difosforylované formy).

Z výsledků měření fosfatasové aktivity PPM1D NTD vůči takto připravené fosforylované p38 MAPK lze znovu pozorovat úbytek fosfatasové aktivity PPM1D NTD v závislosti na přítomnosti proteinu LZAP (viz Obrázek 29). Pro toto měření byly využity stejné poměry obou proteinů (s rozdílem v použitých koncentracích, pro toto měření byla použita 1 μ M koncentrace PPM1D). Jako negativní kontrola byl opět využit mutantní enzym PPM1D NTD D314A. Výsledky tohoto měření mají stejný trend jako v případě měření aktivity vůči pNPP, no v tomto případě je pozorovaný pokles fosfatasové aktivity menší. Pro molární poměr 1:20 je pokles aktivity 30%.

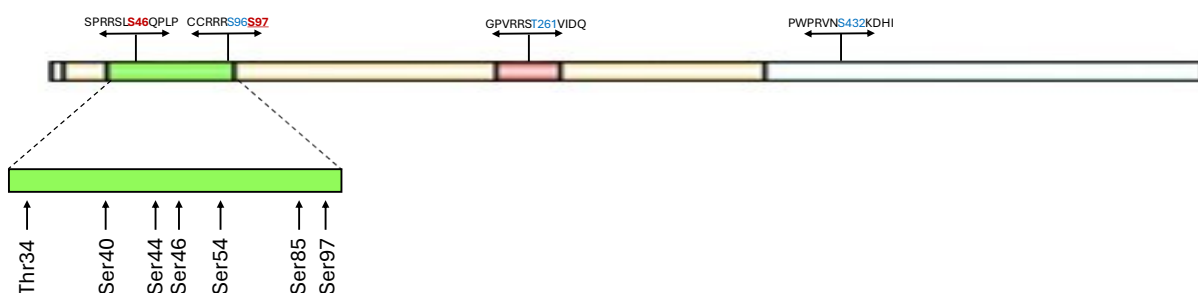


Obrázek 29: Studium fosfatasové aktivity PPM1D NTD v přítomnosti proteinu LZAP využitím *in vitro* fosforylované p38 MAPK jako substrátu. Reakce probíhala při 30 °C po dobu jedné hodiny. Reakční směs byla složena z 1 μ M PPM1D NTD, 20mM MgCl₂, 0,02mg/ml BSA, 15 μ M fosforylované p38 MAPK. Všechny složky byly dialyzovány nebo rozpuštěny ve fosfatasovém pufru (pH = 7,5; 20mM HEPES; 175mM KCl; 25mM NaCl; 0,1mM TCEP). Reakční směs měla objem 50 μ l. Reakce byla zahájena přidáním substrátu a zastavena přidáním 12,5 μ l pracovního roztoku (dodáno v rámci zakoupené sady Malachite Green Assay kit). Po reakci bylo množství uvolněného fosfátu stanoveno měřením absorbance při 620 nm. Při výsledcích odpovídajících různým poměrům PPM1D:LZAP (osa x) je v závorce uveden použitý molární poměr obou proteinů.

4.7 Studium interakce PPM1D/14-3-3

4.7.1 Predikce vazných míst pro 14-3-3

Proteiny 14-3-3 rozeznávají (s pár výjimkami) fosforylované motivy. V rámci možné interakce s PPM1D byla nejdřív identifikována vazná místa pro proteiny 14-3-3. K těmto účelům slouží algoritmus 14-3-3-Pred. Algoritmus využívá k predikci tři metody. Vybrána byla místa, která byla určena jako vazná místa pro 14-3-3 využitím všech tří metod. Takto byla v sekvenci PPM1D nalezena místa Ser46, Ser96/97, Thr261, Ser432. Po porovnání s publikovanými daty o fosforylaci PPM1D byla jako fyziologicky relevantní určena místa Ser46 a Ser97 (viz Obrázek 30, červeně). Oba tyto místa jsou lokalizovány na Pro-smyčce.

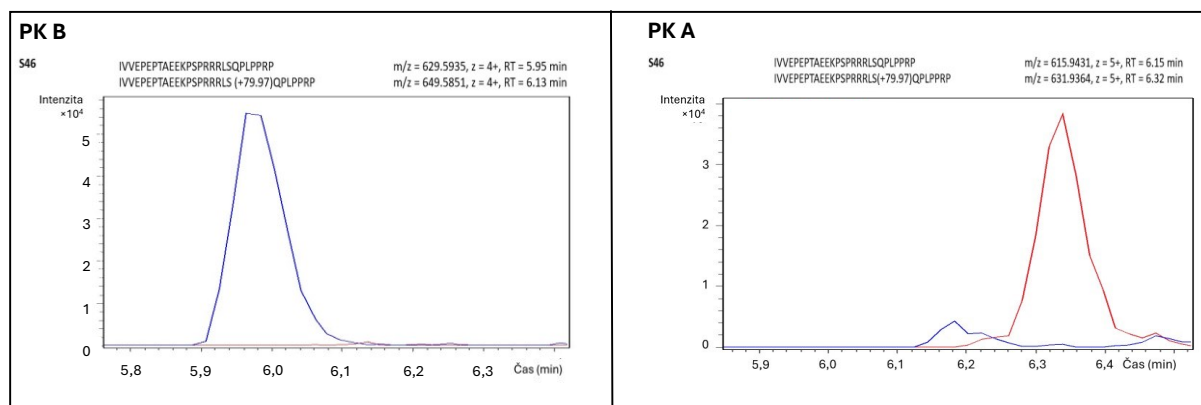


Obrázek 30: Schematické znázornění primární sekvence PPM1D. V dolní části obrázku jsou znázorněny místa, jejichž fosforylace byla zmíněna v publikacích. Všechna tato místa se nacházejí v oblasti Pro smyčky (zeleně). V horní části jsou vyznačeny sekvenční motivy, které byly predikovány jako vazná místa pro proteiny 14-3-3. Červeně jsou vyznačena místa, která jsou ve shodě s publikovanými daty o fosforylaci. Modře ta, o jejichž fosforylaci dosud nejsou informace.

4.7.2 Optimalizace *in vitro* fosforylace PPM1D NTD

K *in vitro* fosforylaci PPM1D NTD na pozicích Ser46 a Ser97 bylo využito proteinkinasy A (PK A). Aby byla eliminována možnost fosforylace na pozici Ser44, která by mohla interferovat při vazbě 14-3-3, byla tato pozice mutována za arginin (proto byla všechna měření v této diplomové práci provedena s konstruktem PPM1D₁₋₃₉₇ S44R, který je v této práci označován jako PPM1D NTD). V rámci optimalizace bylo zkoušeno několik fosforylačních protokolů (různá inkubační teplota, čas inkubace, použitá kinasa (PK A nebo PK B), množství použité kinasy, koncentrace PPM1D NTD, použitý pufr). Finální protokol uvedený v metodické části této práce (viz kapitola 3.5.7.1, str. 48) je tedy výsledkem dlouhodobého optimalizačního procesu.

Použitím tohoto protokolu bylo dosaženo fosforylace jenom na pozici Ser46. Na základě hmotnostně spektrometrických měření (měření intaktní hmotnosti proteinu PPM1D) je populace této monofosforylované formy téměř 100%. Pozice v aminokyselinové sekvenci byla ověřena díky štěpení trypsinem pomocí LC-MS měření. Fosforylovaný peptid obsahuje 2 seriny, které by mohli podléhat fosforylaci, ale jenom pozice Ser46 svou okolní sekvencí odpovídá cíli rozeznávanému PK A. Měření a analýza hmotnostně spektrometrických dat byly provedeny Mgr. Pavlou Vaňkovou, Ph.D..



Obrázek 31: Výsledky LC-MS měření po optimalizaci *in vitro* fosforylace PPM1D NTD pomocí PK B, resp. PK A. Při použití obou PK B nebyla pozorována tvorba fosforylované formy PPM1D na žádné pozici (modře, viz chromatografický záznam z LC-MS měření po štěpení vzorku trypsinem). Při použití PK A byla pozorována fosforylace na pozici Ser46. Měření intaktní hmotnosti PPM1D NTD prokázalo téměř 100% tvorbu této monofosforylované formy PPM1D NTD. Fosforylační směs obsahovala 0,15 mg PPM1D NTD; 20mM MgCl₂; 0,75mM ATP; 280 U PK A/mg PPM1D NTD; resp. 4 μ l PK B (730 U/ml)/0,15 mg PPM1D NTD. Hmotnostně spektrometrická měření byla provedena Mgr. Pavlou Vaňkovou.

5 Diskuse

Proteinfosfatasy jsou významnou skupinou enzymů. Vzhledem k důležitosti fosfátové skupiny (nejen) v signálních dráhách je význam a důležitost těchto enzymů nezpochybnitelná. Proteinfosfatasy lze rozdělit podle defosforylovaného aminokyselinového zbytku na několik skupin. Svou četností výrazně převažují Ser/Thr proteinfosfatasy, jež lze rozdělit na dvě rodiny, PPP a PPM. Předkládaná diplomová práce se věnuje fosfatase PPM1D, důležitému zástupci rodiny PPM proteinfosfatasy. PPM1D, neboli WIP1 je důležitým negativním regulátorem tumor supresorového transkripčního faktoru p53. PPM1D se přímo podílí na regulaci p53 skrze jeho defosforylaci na pozici Ser15. Defosforylací jeho dalších regulátorů (Chk1/2, Mdm2, ATM atd...) se PPM1D na regulaci p53 podílí i nepřímým způsobem (viz kapitola 1.3.3, str. 22)¹. Zástupci rodiny PPM se mezi sebou liší přítomností inzercí v rámci katalytické domény, či délkou N- a C-terminálních částí, což z každého z nich například v kontextu substrátové specifity dělá zcela jedinečný enzym²⁷. Vhodným příkladem pro demonstraci těchto rozdílů je dvojice PPM1A a PPM1D. Zatímco PPM1A je díky své aktivitě řazen mezi tumor supresory, PPM1D je prokázaným onkogenem. Rozdílné chování těchto enzymů vychází z přítomnosti Pro-smyčky a B-smyčky v rámci katalytické domény PPM1D, či z její dlouhé C-terminální domény (popisem těchto úseků se věnuje kapitola 1.3.2, str. 15). O těchto úsecích PPM1D, jakými jsou Pro-smyčka či C-terminální doména, máme dosud málo informací, neboť jejich přítomnost výrazně stěžuje práci s tímto proteinem. Krystalová struktura katalytické domény PPM1D, jež byla publikována v červenci 2024, například zcela postrádá Pro-smyčku a i v oblasti funkčně důležité flapy domény obsahuje několik mutací³⁸.

Vzhledem k informacím o struktuře proteinu PPM1D, jeho vlastnostem, a i vzhledem na neúspěšné snahy připravit protein PPM1D o celé délce 1–605 (data nejsou součástí diplomové práce), bylo v rámci této diplomové práce přistoupeno k zkrácení proteinu PPM1D na délku 1–397. Tato varianta proteinu byla navržena tak, aby bylo dosaženo co největší stability. Jak již bylo naznačeno, v případě studia fosfatasy PPM1D se k její zkrácení přistupuje poměrně často. Tento postup je ve strukturní biologii běžný, přesto nepředstavuje optimální řešení, nakořlík je informační výstup o proteinu omezen pouze na jeho část. V tomto případě je studium podobně zkrácených konstruktů PPM1D vysoce relevantní, neboť v několika studiích jsou popsány zkrácené formy PPM1D (například 1–410), které jsou proteolyticky stabilnější, což vede k jejich akumulaci v nádorových buňkách⁴¹. Konstrukt PPM1D₁₋₃₉₇ pro účely dalších studií obsahoval mutaci S44R a v této práci je pro přehlednost označován jako PPM1D NTD.

Pro další zvýšení proteinové exprese bylo kromě zkrácení přistoupeno i k fúzi PPM1D NTD s thioredoxinem.

Experimentální část předkládané diplomové práce lze rozdělit na dvě hlavní části. První a časově velmi náročná část měla za cíl optimalizovat přípravu PPM1D NTD na úrovni exprese a purifikace. V části druhé byla s optimalizovaným vzorkem provedena měření za účelem jeho charakterizace a také studia jeho protein-proteinových interakcí.

Jak bylo zmíněno, v první části bylo nejdřív nutné optimalizovat heterologní expresi TRX-PPM1D NTD v buňkách *E. coli*. V úvodních krocích byl pozorován vysoký obsah proteinu v peletní frakci sonikátu (viz Obrázek 13, str. 52). Buňky *E. coli* takovým způsobem reagují na nepřirozeně vysokou a rychlou expresi proteinů, jež je dosažena využitím expresního systému s T7 polymerasou⁷². Vysoká rychlost exprese neumožňuje proteinům zaujmout nativní uspořádání a buňky *E. coli* tak s cílem zamezit tvorbě nerozpustných proteinových agregátů v cytoplasmě indukují jejich transport do inkluzních tělísek⁷². Pro optimalizaci exprese bylo provedeno několik expresních testů s různými expresními podmínkami (doba exprese, teplota, koncentrace IPTG). Zpomalení exprese (dosaženo nižší expresní teplotou či nižší koncentrací IPTG) vedlo k obohacení rozpustné supernatantní části, resp. proteinu v eluátu z niklové afinitní chromatografie (viz srovnání panelů A–D na Obrázku 13, str. 52). Tento jev si vysvětlujeme tím, že za finálních zvolených podmínek (16 °C; 0,05mM IPTG; přes noc) byla exprese zpomalena natolik, že nedocházelo k tak intenzivní agregaci nesbalených molekul proteinu TRX-PPM1D NTD, čímž byl eliminován jejich transport do inkluzních tělísek (viz panel D, Obrázek 13, str. 52).

Následovala optimalizace purifikačního protokolu s cílem zvýšit čistotu, stabilitu a výtěžek cílového preparátu. První pokusy purifikovat PPM1D NTD byly provázeny nekvantitativním štěpením TRX-PPM1D NTD, vysokou mírou precipitace štěpeného proteinu a nízkou úrovní čistoty finálního preparátu (viz výsledky uvedené v kapitole 4.3, str. 52). Pro dosažení vyšší čistoty proteinového preparátu bylo vyzkoušeno několik purifikačních protokolů zahrnujících různé purifikační kroky. Jako optimální byl zvolen protokol složený z niklové afinitní chromatografie, dialýzy za současného štěpení proteasou TEV přes noc, reverzní niklové afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie (viz kapitola 4.3.1, str. 55). Tento protokol vedl k preparátu o nejvyšší kvalitě a byl dále optimalizován pro zvýšení proteinového výtěžku. To si vyžadovalo změny v použitých pufrách (použití chloridu draselného místo chloridu sodného, zvýšení iontové síly pufrů,...), promývacích krocích v rámci niklové a reverzní niklové afinitní chromatografie, či detailů jako použití koncentrátorů

s nižším dělicím rozsahem. Přídavek dalších aditiv (např. detergentů) již nevedl ke zvýšení stability vzorku (prokázáno měřením diferenční skenovací fluorimetrie, data nejsou součástí práce). Výsledkem je finální purifikační protokol uveden v metodické části práce, jehož využití umožnilo reprodukovatelně připravit kolem 4 mg proteinu PPM1D NTD o vysoké čistotě (výsledná kvalita proteinového preparátu znázorněna na Obrázku 17, panel B, str. 56). Celkový výtěžek byl v propočtu na expresi z jednoho litru LB média zhruba pětkrát vyšší než na začátku práce s tímto konstruktem (~0,15 mg vs. ~0,7 mg z litru LB média), což výrazně zjednodušilo další práci.

V druhé části této diplomové práce byl proteinový konstrukt PPM1D NTD charakterizován na úrovni aktivity a struktury s následným studiem jeho komplexů. Fosfatasová aktivita PPM1D NTD byla měřena využitím para-nitrofenylfosfátu (pNPP). Tento postup musel být optimalizován a v budoucnu bude moci být využit například pro testování aktivity různých konstruktů PPM1D a sledování vlivu případných mutací na vnitřní aktivitu enzymu. Jak ukazuje Obrázek 21 (panel B str. 59), bez přítomnosti hořčnatých iontů nevykazoval enzym PPM1D NTD žádnou, resp. spolehlivě detekovatelnou fosfatasovou aktivitu. Toto pozorování je ve shodě s informacemi o PPM rodině fosfatas, jež pro *in vitro* aktivitu vyžadují koncentrace iontů v řádech desítek mM. Jak je uvedeno v kapitole 1.3.1 (str. 13), tento jev lze vysvětlit potřebou vazby třetího iontu kovu, jenž se má do aktivního centra vázat velmi slabě³³.

Dalším krokem v charakterizaci konstruktů PPM1D NTD bylo měření SAXS. Konkrétně bylo přistoupeno k uspořádání SEC-SAXS. Bylo totiž pozorováno, že při koncentrování PPM1D NTD dochází k jeho agregaci a standardní uspořádání by zřejmě vedlo k výsledkům ovlivněným přítomností proteinových agregátů, jež byly díky uspořádání SEC-SAXS odstraněny (viz Obrázek 22, panel A, str. 60). Výslednou kvalitu vzorku odráží i linearita Guinierova výnosu (viz Obrázek 23, panel A, str. 61). Cílem tohoto měření bylo získat informace o povaze proteinového konstruktů PPM1D NTD s ohledem na Pro-smyčku (30–99). Tento úsek je algoritmem Alphafold2 predikován jako nestrukturovaný, ale zároveň je tento region vysoce specifický pro PPM1D. To má za důsledek to, že ho není možné ztotožnit s podobnými motivy v přírodě a Alphafold ho tak predikuje s velmi nízkou mírou určitosti (pLDDT < 50).

Ze SAXS dat plyne několik závěrů. Z poklesu křivky v Kratkyho výnosu (viz Obrázek 23, panel B, str. 61) lze usoudit, že se jedná o kompaktní částici. Ta je tvořena především

katalytickým jádrem, které je napříč rodinou PPM vysoce konzervováno. Kompaktnost katalytického jádra je ve shodě se strukturami ostatních zástupců PPM rodiny²⁷. Maximum křivky je ale mírně posunuto směrem k vyšším hodnotám součinu sR_g , kde jsou údaje zároveň zatíženy vyšší variabilitou. Tyto heterogenity obvykle vycházejí z výskytu flexibilních částí⁷³. Tyto závěry byly dále srovnány s modelem rozptylové proteinové obálky. Ta byla vypočtena z experimentálních dat. Jak lze vidět na Obrázku 24 (str. 62), na obálce jde rozlišit dvě části. Hrubší mohutnější část, která na základě superimpozice odpovídá katalytickému jádru a menší užší část, která odpovídá zřejmě Pro-smyčce. Další modelování PPM1D NTD přineslo několik modelů lišících se konformací Pro-smyčky. Ve všech těchto modelech zaujímá Pro-smyčka extendovanou konformaci. Zároveň žádný z těchto modelů experimentálními datům zcela neodpovídá ($\chi^2 = 1,4-1,9$) a lze předpokládat, že se jedná o flexibilní úsek, který může v roztoku zaujímat několik konformací. Získaná rozptylová obálka tedy reprezentuje jejich průměr.

Informace o Pro-smyčce jsou důležité z několika důvodů. Vzhledem na její vysokou specifickou představuje důležitý strukturní úsek PPM1D a tato práce jako první pojednává o jejím skutečném chování v roztoku. Dosud byly strukturní informace o Pro-smyčce omezeny na úrovni predikcí. Na základě dosud zjištěných informací víme, že se zřejmě jedná o regulačně důležitou oblast. Bylo popsáno několik míst v rámci Pro-smyčky, které podléhají fosforylaci *in vivo*, což na základě publikovaných výsledků vede ke snížení fosfatasové aktivity PPM1D v buňkách (viz kapitola 1.3.2.4, str. 20)⁴⁶. Studium vlivu fosforylace například na konformaci Pro-smyčky může být proto do budoucna zajímavým cílem. Vzhledem k vysokému obsahu prolinu v této oblasti totiž lze předpokládat, že Pro-smyčka může zaujímat i jiné, rigidnější uspořádání. V rámci této diplomové práce byla jedním z úkolů i optimalizace *in vitro* fosforylace na pozicích Ser46 a Ser97. Té bylo dosaženo jenom na pozici Ser46 a na tomto místě je důležité zmínit, že i při použití stejného protokolu byly dosaženy výsledky nereprodukovatelné a pro další účely bude nutné *in vitro* fosforylaci dále optimalizovat. Fosforylace na těchto (případně i jiných) pozicích je kromě výše zmíněných důvodů zajímavá i v kontextu vazby proteinů 14-3-3. Proteiny 14-3-3 jsou mimořádně zajímavou skupinou proteinů. Samy katalytickou aktivitu postrádají. Vazbou na fosforylované motivy ale výrazným způsobem modulují své vazné partnery. Studie z roku 2017, která se věnovala systematické analýze interaktomu proteinfosfatas, prokázala interakci PPM1D s isoformou 14-3-3 β ⁶⁷. Interakce ve zmíněné práci není diskutována, ale je identifikována s vysokým skóre určitosti. A právě pozice Ser46 a Ser97 byly v rámci této diplomové práce určeny jako místa zprostředkující tuto interakci (viz kapitola 4.7.1, str. 68). Konkrétně motiv kolem Ser46 je

kanonickým 14-3-3 vazným místem, proti kterému jsou navrženy protilátky využívající se při charakterizaci, izolaci, či identifikaci proteinů vázaných 14-3-3⁷⁴. Proteiny 14-3-3 mají zároveň vysokou preferenci pro vazbu nestrukturovaných regionů, což je ve shodě s našimi SAXS daty o Pro-smyčce, která obsahuje obě s potenciálních vazných míst. Důsledky takovéto interakce jsou otázkou. Vzhledem na pozorovanou sníženou fosfatasovou aktivitou fosforylované PPM1D v buňkách je možností několik. Vazba 14-3-3 na PPM1D může bránit vazbě substrátů, či způsobit konformační změny znemožňující průběh reakce. Jedním z efektů popsaných v souvislosti s fosforylací je i zvýšená míra ubikvitinylace PPM1D. Bylo popsáno, že 14-3-3 můžou regulovat své partnery i zpřístupněním místa pro ubikvitinylací (způsoby, jakými mohou 14-3-3 regulovat své vazné partnery jsou schematicky znázorněny na Obrázku 10, str. 25). Nicméně jsou v tomto bodě tyto scénáře v souvislosti s PPM1D zcela spekulativní a pro jejich studium je nutné interakci spolehlivě prokázat biofyzikálními (SEC, nativní elektroforéza, AUC, ITC...) či biologickými (koimunoprecipitace, dvouhybridní systém...) metodami.

Mezi vazebné partnery PPM1D, které jsou v rámci této diplomové práce představeny, patří i protein LZAP (viz kapitola 1.3.4, str. 24). LZAP je protein, který svou funkční podstatou připomíná 14-3-3. Katalytickou aktivitu postrádá, vazbou na jiné proteiny ale může modulovat jejich aktivitu, strukturu či interakce. Až donedávna nebyly dostupné informace o struktuře LZAP (mimo jiné zvaného také CDK5RAP3, IC53 či HSF-27). Tento rok byla publikována Cryo-EM struktura nukleoproteinového komplexu, ve kterém hraje LZAP důležitou roli „lešení“⁷⁵. V roce 2011 byla publikovaná studie, jenž prvá naznačuje vztah a interakci mezi LZAP a PPM1D⁶⁶. Studie z roku 2016 tuto interakci imunochemickými metodami dále potvrdila. Závěrem bylo pozorování zvýšené fosfatasové aktivity PPM1D, jenž bylo závislé na přítomnosti LZAP⁶⁵. Prvním cílem bylo proto studium interakce LZAP a PPM1D. Výsledek nativní elektroforézy nepotvrdil jednoznačnou tvorbu komplexu, při titraci LZAP proteinem PPM1D NTD ale docházelo k mírnému úbytku LZAP v dráhách gelu (viz kapitola 4.6.1, str. 64). Tento výsledek nelze považovat za průkazný, ale je nutno zmínit, že nativní gelová elektroforéza zřejmě není vhodným nástrojem pro studium protein-proteinových interakcí našeho proteinového konstruktů, jenž při nízké iontové síle precipituje. Hodnota pH pufru pro nativní elektroforézu (pH = 8,7) je zároveň v blízkosti teoretické hodnoty izoelektrického bodu PPM1D NTD (pI = 8,3). Pro další studium této interakce proto navrhuje použití analytické centrifugace, která zároveň umožňuje studium i slabých interakcí ($K_d \sim \mu\text{M}$).

I přesto, že se fyzickou interakci nepodařilo prokázat, bylo přistoupeno k měření fosfatasové aktivity v přítomnosti LZAP (ve dvounásobném, desetinásobném a dvacetinásobném nadbytku vůči PPM1D NTD). *In vitro* měření vnitřní fosfatasové aktivity vůči pNPP vedlo k překvapivým výsledkům. S rostoucím poměrem LZAP:PPM1D NTD docházelo ke snižování fosfatasové aktivity PPM1D NTD, což je v rozporu s dosavadními poznatky o vlivu LZAP na aktivitu PPM1D. Práce z roku 2016 využívá jako substráty k studiu vnitřní aktivity PPM1D fosforylované peptidy (se sekvenčním motivem p38 MAPK (pThr180), p53 (pSer15) ...). Z tohoto důvodu tyto výsledky nelze přímo porovnat a interpretace dosažených výsledků je problematická, neboť pNPP není fyziologickým substrátem PPM1D. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k přípravě fosforylované formy p38 MAPK, která byla vůbec prvním identifikovaným substrátem PPM1D. K těmto účelům bylo využito kinasy MKK6 (postup viz kapitola 3.5.7.2, str. 49). Použitá sada Malachite Green Assay (Sigma-Aldrich) umožňuje detekovat uvolněný fosfát a tím poskytuje i větší variabilitu použitých substrátů. I při využití tohoto přístupu byl pozorován míň intenzivní ale stejný trend ve výsledcích. Přítomnost LZAP vedla k inhibici PPM1D NTD a i při použití fyziologického substrátu bylo dosaženo výsledku, jenž je v absolutním rozporu s dosavadními představami o roli interakce LZAP a PPM1D v nádorovém procesu. LZAP byl popsán jako interakční partner několika substrátů PPM1D i samotné PPM1D. Spolu s výsledky prokazujícími pozitivní vliv LZAP na aktivitu PPM1D tyto závěry představovaly základ pro hypotézu, že LZAP hraje roli zprostředkovatele interakce mezi fosfatasou PPM1D a její substráty. Pro lepší objasnění mechanismu působení LZAP na PPM1D bude nutné vykonat experimenty i s dalšími substráty PPM1D. Strukturální charakterizace komplexu LZAP/PPM1D (resp. LZAP/PPM1D NTD), či LZAP a substrátů PPM1D může přinést důležité informace o roli LZAP v regulaci proteinfosfatasy PPM1D.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací proteinfosfatasy PPM1D a její protein-proteinových komplexů. Stanovených cílů bylo dosaženo získáním výsledků, jež lze shrnout v následujících bodech:

- Optimalizované expresní podmínky (16 °C, 0,05mM IPTG) vedly k lepší expresi rozpustného fúzního proteinu TRX-PPM1D NTD
- Optimalizace přípravy PPM1D NTD umožnilo ze 6 litrů LB média získat protein PPM1D NTD s vysokou čistotou a výtěžkem přes 4 mg
- SAXS data naznačují kompaktnost katalytické domény a flexibilitu pravděpodobně extendované nestrukturované Pro-smyčky
- Identifikovaná vazebná místa pro 14-3-3 v rámci PPM1D NTD, Ser46 a Ser96, se nacházejí v oblasti Pro-smyčky, jejíž flexibilita je ve shodě s preferencí 14-3-3 proteinů. Z těchto míst bylo možné využitím proteinkinasy A fosforylovat Ser46 (~100 %)
- Protein LZAP negativně reguluje aktivitu PPM1D NTD na úrovni vnitřní fosfatasové aktivity i na úrovni schopnosti PPM1D NTD defosforylovat fyziologický substrát, jímž v této diplomové práci byla fosforylovaná forma p38 MAPK, která byla připravena *in vitro* využitím kinasy MKK6

Seznam použité literatury

1. Pecháčková S, Burdová K, Macurek L. WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. doi:10.1007/s00109-017-1536-2
2. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071. doi:10.1038/NATURE08467
3. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. 2011;25(5):409-433. doi:10.1101/GAD.2021311
4. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis*. 2003;24(10):1571-1580. doi:10.1093/CARCIN/BGG137
5. Leontieva O V., Gudkov A V., Blagosklonny M V. Weak p53 permits senescence during cell cycle arrest. *Cell Cycle*. 2010;9(21):4323-4327. doi:10.4161/CC.9.21.13584
6. Zhang XP, Liu F, Cheng Z, Wang W. Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(30):12245-12250. doi:10.1073/PNAS.0813088106
7. Fiscella M, Zhang, Appella E. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6048-6053. doi:10.1073/PNAS.94.12.6048
8. Lammers T, Lavi S. Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007;42(6):437-461. doi:10.1080/10409230701693342
9. Husby S, Hjermind Justesen E, Grønbæk K. Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺-dependent 1D (PPM1D) mutations in haematological cancer. *Br J Haematol*. 2021;192(4):697-705. doi:10.1111/BJH.17120
10. Lu X, Nannenga B, Donehower LA. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev*. 2005;19(10):1162-1174. doi:10.1101/GAD.1291305
11. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997;277(5331):1501-1505. doi:10.1126/SCIENCE.277.5331.1501
12. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374(6518):131-134. doi:10.1038/374131A0
13. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003;3(5):421-429. doi:10.1016/S1535-6108(03)00110-7
14. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*. 2017;23(4):310-319. doi:10.1016/J.MOLMED.2017.02.001
15. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 1997;420(1):25-27. doi:10.1016/S0014-5793(97)01480-4
16. Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget*. 2012;3(3):228-235. doi:10.18632/ONCOTARGET.443

17. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-299. doi:10.1038/387296A0
18. Canman CE, Lim DS, Cimprich JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998;281(5383):1677-1679. doi:10.1126/SCIENCE.281.5383.1677
19. Zhang XP, Liu F, Cheng Z, Wang W. Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(30):12245-12250. doi:10.1073/PNAS.0813088106
20. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*. 2012;47(4):497-510. doi:10.1016/J.MOLCEL.2012.07.029
21. Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest*. 2001;108(7):965. doi:10.1172/JCI14123
22. Hao Q, Chen J, Lu H, Zhou X. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *J Mol Cell Biol*. 2023;14(10). doi:10.1093/JMCB/MJAC074
23. Kussie PH, Levine AJ, Pavletich NP. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996;274(5289):948-953. doi:10.1126/SCIENCE.274.5289.948
24. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J*. 1993;12(2):461. doi:10.1002/J.1460-2075.1993.TB05678.X
25. Maya R, Katzir E, Oren M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*. 2001;15(9):1067. doi:10.1101/GAD.886901
26. Olsen J V., Blagoev B, Mann M. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*. 2006;127(3):635-648. doi:10.1016/J.CELL.2006.09.026
27. Kamada, Rui K, Fuki I, Shogo T, Itsumi I, Jose J, Omichinski B , Sakaguchi J G. Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107622
28. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. 2009;139(3):468-484. doi:10.1016/J.CELL.2009.10.006
29. Chen MJ, Dixon JE, Manning G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal*. 2017;10(474). doi:10.1126/SCISIGNAL.AAG1796
30. Fuchs S, Grill E, Meskiene I, Schweighofer A. Type 2C protein phosphatases in plants. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x
31. Das AK, Helps NR, Cohen PTW, Barford D. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J*. 1996;15(24):6798-6809. doi:10.1002/J.1460-2075.1996.TB01071.X
32. Debnath S, Kosek D, Tagad D, Durell R, Appella H, Acevedo R, Grishaev A, Dyda F, Appella E, Mazur S J. A trapped human PPM1A–phosphopeptide complex reveals structural features critical for regulation of PPM protein phosphatase activity. *J Biol Chem*. 2018;293(21):7993-8008. doi:10.1074/JBC.RA117.001213

33. Tanoue K, Miller J, Lisa M, Durell S R, Debnath S, Sakai H, Tagad H D, Ishida K, Appella E, Mazur S J. Binding of a third metal ion by the human phosphatases PP2C α and Wip1 is required for phosphatase activity. *Biochemistry*. 2013;52(34):5830-5843. doi:10.1021/BI4005649
34. Romani A, Scarpa A. Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298(1):1-12. doi:10.1016/0003-9861(92)90086-C
35. Fjeld CC, Denu JM. Kinetic Analysis of Human Serine/Threonine Protein Phosphatase 2C α . *J Biol Chem*. 1999;274(29):20336-20343. doi:10.1074/JBC.274.29.20336
36. Pan C, Liu H, Gong Z, Yu X, Hou X, Xie D, Zhu X, Li H, Tang J, Xu Y, Yu J, Zhang L, Fang H, Xiao K, Chen Y, Wang J, Pang Q, Chen W, Sun J. Cadmium is a potent inhibitor of PPM phosphatases and targets the M1 binding site. doi:10.1038/srep02333
37. Takekawa M, Maeda T, Saito H. Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J*. 1998;17(16):4744-4752. doi:10.1093/EMBOJ/17.16.4744
38. Prakash K J, Kosek D, Durell S R, Jenkins L, Debnath M M S, Coussens N P, Hall M, D, Appella D H, Dyda F, Mazur S J, Appella E. Crystal structure and mechanistic studies of the PPM1D serine/threonine phosphatase catalytic domain. *J Biol Chem*. Published online 2024. doi:10.1016/j.jbc.2024.107561
39. Yamaguchi H, Minopoli G, Demidov O N, Chatterjee D K, Anderson C W, Durell S R, Appella E. Substrate specificity of the human protein phosphatase 2C δ , Wip1. *Biochemistry*. 2005;44(14):5285-5294. doi:10.1021/BI0476634
40. Lu X, Nguyen TA, Moon SH, Darlington Y, Sommer M, Donehower LA. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27(2):123-135. doi:10.1007/S10555-008-9127-X
41. Kleiblova P, Shaltiel I A, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohlreich P, Voest E E, Dundr P, Bartek J, Kleibl Z, Medema R H, Macurek L. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J Cell Biol*. 2013;201(4):511-521. doi:10.1083/JCB.201210031
42. Gilmartin A G, Faitg T H, Heering D A, Kumar R. Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat Chem Biol*. 2014;10(3):181-187. doi:10.1038/NCHEMBIO.1427
43. Chuman Y, Yagi H, Fukuda T, Nomura T, Matsukizono M, Shimohigashi Y, Sakaguchi K. Characterization of the active site and a unique uncompetitive inhibitor of the PPM1-type protein phosphatase PPM1D. *Protein Pept Lett*. 2008;15(9):938-948. doi:10.2174/092986608785849236
44. Miller P G, Sathappa M, Moroco J A, Jiang W, Qian Y, Iqbal S, Guo Q, Giacomelli A O, Shaw S, Vernier C, Garvie C W, Ebert B L. Allosteric inhibition of PPM1D serine/threonine phosphatase via an altered conformational state. *Nat Commun*. 2022;13(1). doi:10.1038/S41467-022-30463-9
45. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.
46. Macurek L, Benada J, Müllers E, Halim V A, Krejčíková K, Burdová K, Pecháčková S, Hodný Z, Lindqvist A, Medema R H, Bartek J. Downregulation of Wip1 phosphatase

- modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell Cycle*. 2013;12(2):251. doi:10.4161/CC.23057
47. Choi D W, Na W K, Humayun Y E, Kwon S, Yeom J, Ahn J W, Choi H H, Lee Y, Seo K W, Shin M K, Park S H, Yoo H Y, Isono K, Koseki H, Kim S T, Lee C, Kwon Y K, Choi C Y. WIP1, a homeostatic regulator of the DNA damage response, is targeted by HIPK2 for phosph. *Mol Cell*. 2013;51(3):374-385. doi:10.1016/J.MOLCEL.2013.06.010
 48. Gräf J F, Mikicic I, Ping X, Scalera C, Mayr K, Stelzl L S, Beli P, Wagner S A. Substrate spectrum of PPM1D in the cellular response to DNA double-strand breaks. *iScience*. 2022;25(9):104892. doi:10.1016/J.ISCI.2022.104892
 49. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-817. doi:10.1016/J.MOLCEL.2017.05.015
 50. Shreeram S, Demidov O N, Hee W K, Yamaguchi H, Onishi N, Kek C, Timofeev O N, Dudgeon C, Fornace A J, Anderson C W, Minami Y, Appella E, Bulavin D V. Wip1 Phosphatase Modulates ATM-Dependent Signaling Pathways. *Mol Cell*. 2006;23(5):757-764. doi:10.1016/J.MOLCEL.2006.07.010
 51. Cha H, Lowe J M, Li H, Lee J S, Belova G I, Bulavin D V, Fornace A J. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res*. 2010;70(10):4112-4122. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4244
 52. Moon S H, Lin L, Zhang X, Nguyen T A, Darlington Y, Waldman A S, Lu X, Donehower L A. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J Biol Chem*. 2010;285(17):12935-12947. doi:10.1074/JBC.M109.071696
 53. Macurek L, Lindqvist A, Voets O, Kool J, Vos HR, Medema RH. Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*. 2010;29(15):2281-2291. doi:10.1038/ONC.2009.501
 54. Fujimoto H, Onishi N, Kato N, Takekawa M, Xu X Z, Kosugi A, Kondo T, Imamura M, Oishi I, Yoda A, Minami Y. Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death Differ*. 2006;13(7):1170-1180. doi:10.1038/SJ.CDD.4401801
 55. Yoda A, Xiao Z X, Onishi N, Toyoshima K, Fujimoto H, Kato N, Oishi I, Kondo T, Minami Y. Intrinsic kinase activity and SQ/TQ domain of Chk2 kinase as well as N-terminal domain of Wip1 phosphatase are required for regulation of Chk2 by Wip1. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24847-24862. doi:10.1074/JBC.M600403200
 56. Lu X, Nannenga B, Donehower LA. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev*. 2005;19(10):1162-1174. doi:10.1101/GAD.1291305
 57. Xinna Z, Lin L, Huarong G, Jianhua Y, Jones S N, Jochemsen A, Lu X. Phosphorylation and degradation of MdmX is inhibited by Wip1 phosphatase in the DNA damage response. *Cancer Res*. 2009;69(20):7960-7968. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0634
 58. Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, Donehower LA. The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell*. 2007;12(4):342-

354. doi:10.1016/J.CCR.2007.08.033

59. Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y, Imai K. 53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* 2000;19(23):6517-6526. doi:10.1093/EMBOJ/19.23.6517
60. Juyoux P, Galdadas I, Gobbo D, von Velsen J, Pelosse M, Tully Mark, Vadas Oscar, Gervasio F L, Pellegrini E, Bowler M W. Architecture of the MKK6-p38 α complex defines the basis of MAPK specificity and activation. *Science.* 2023;381(6663):1217-1225. doi:10.1126/SCIENCE.ADD7859
61. Lu X, Bocangel D, Nannenga B, Yamaguchi H, Appella E, Donehower LA. The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair. *Mol Cell.* 2004;15(4):621-634. doi:10.1016/J.MOLCEL.2004.08.007
62. Yamaguchi H, Durell SR, Feng H, Bai Y, Anderson CW, Appella E. Development of a substrate-based cyclic phosphopeptide inhibitor of protein phosphatase 2Cdelta, Wip1. *Biochemistry.* 2006;45(44):13193-13202. doi:10.1021/BI061356B
63. Wang J. LZAP: A break on phosphorylation. *Cell Cycle.* 2017;16(19):1737. doi:10.1080/15384101.2017.1285632
64. Zhao J J, Pan K, Li Jian J, Chen Y B, Chen J G, Lv L, Wang D D, Pa Q Z, Chen M S, Xia J C. Identification of LZAP as a New Candidate Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2011;6(10):e26608. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0026608
65. Wamsley JJ, Issaeva N, An H, Lu X, Donehower LA, Yarbrough WG. LZAP is a novel Wip1 binding partner and positive regulator of its phosphatase activity in vitro. *Cell Cycle.* 2017;16(2):213. doi:10.1080/15384101.2016.1261767
66. An H, Lu X, Liu D, Yarbrough WG. LZAP inhibits p38 MAPK (p38) phosphorylation and activity by facilitating p38 association with the wild-type p53 induced phosphatase 1 (WIP1). *PLoS One.* 2011;6(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0016427
67. Yadav L, Tamene F, Göös H, van Drogen A, Katainen R, Aebersold R, Gstaiger M, Varjosalo M. Systematic Analysis of Human Protein Phosphatase Interactions and Dynamics. *Cell Syst.* 2017;4(4):430-444.e5. doi:10.1016/J.CELS.2017.02.011
68. Yang H-Y, Wen Y-Y, Chen C-H, Lozano G, Lee M-H. 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Mol Cell Biol.* 2003;23(20):7096-7107. doi:10.1128/MCB.23.20.7096-7107.2003
69. Obsilova V, Obsil T. Structural insights into the functional roles of 14-3-3 proteins. *Front Mol Biosci.* 2022;9. doi:10.3389/FMOLB.2022.1016071
70. Selleck W, Tan S. Recombinant protein complex expression in E. coli. *Curr Protoc protein Sci.* 2008;Chapter 5(SUPPL. 52). doi:10.1002/0471140864.PS0521S52
71. Manalastas-Cantos K, Konarev P V, Hajizadeh N R, Kikhney A G, Petoukhov M V, Molodenskiy D S, Panjkovich A, Mertens Haydyn D T, Gruzinov A, Borges C, Jeffries C M, Svergun D I, Franke D. ATSAS 3.0: Expanded functionality and new tools for small-angle sc. *J Appl Crystallogr.* 2021;54:343-355. doi:10.1107/S1600576720013412
72. Bhatwa A, Wang W, Hassan YI, Abraham N, Li XZ, Zhou T. Challenges Associated

With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:630551. doi:10.3389/FBIOE.2021.630551/BIBTEX

73. Burger VM, Arenas DJ, Stultz CM. A Structure-free Method for Quantifying Conformational Flexibility in proteins. *Sci Reports* 2016 61. 2016;6(1):1-9. doi:10.1038/srep29040
74. Phospho-(Ser) 14-3-3 Binding Motif Antibody | Cell Signaling Technology. Accessed July 29, 2024. <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-ser-14-3-3-binding-motif-antibody/9601>
75. DaRosa P A, Penchev I, Gumbin S C, Scavone F, Wąchalska M, Paulo J A, Ordureau A, Peter J J, Kulathu Y, Harper J W, Becker T, Beckmann R, Kopito R R. UFM1 E3 ligase promotes recycling of 60S ribosomal subunits from the ER. *Nat* 2024 6278003. 2024;627(8003):445-452. doi:10.1038/s41586-024-07073-0

Příloha 1

Aminokyselinová sekvence proteinového konstruktu PPM1D NTD ($M_w = 44\ 671\ \text{Da}$, $pI = 8,31$) po štěpení proteasou TEV:

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
GSAMAGLYSL	GVSVFSDQGG	RKYMEDVTQI	VVEPEPTAEE	KPSPRRRLSQ	PLPPRPSPAA
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LPGGEVSGKG	PAVAAREARD	PLPDAGASPA	PSRCCRRRSS	VAFFAVCDGH	GGREAAQFAR
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
EHLWGFICKQ	KGFTSSEPAK	VCAAIRKGFL	ACHLAMWKKL	AEPKMTMTGL	PSTSGTTASV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
VIIRGMKMYV	AHVGDSGVVL	GIQDDPKDDF	VRAVEVTQDH	KPELPKERER	IEGLGGSVMN
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
KSGVNRVWK	RPRLTHNGPV	RRSTVIDQIP	FLAVARALGD	LWSYDFFSGE	FVVSPEPDTS
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
VHTLDPQKHK	YIILGSDGLW	NMIPPQDAIS	MCQDQEEKKY	LMGEHGQSCA	KMLVNRALGR
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>		
WRQRMLRADN	TSAIVICISP	EVDNQGNFTN	EDELYLNLTG	ENLYFQ	