

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Fyziologický ústav AV ČR

**Mgr. Dana Veisová**

Studium faktorů ovlivňující vazebnou specifitu 14-3-3 proteinů

Study of the factors affecting the binding specificity of the 14-3-3 proteins

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze,

DANA VEISOVÁ

Podpis

**Identifikační záznam:**

VEISOVÁ, Dana. *Studium faktorů ovlivňující vazebnou specifitu 14-3-3 proteinů.* [Study of the factors affecting the binding specificity of the 14-3-3 proteins]. Praha, 2013. 123 s., 2 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. Vedoucí práce Obšilová, Veronika.

## **Poděkování:**

Děkuji RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné vedení, veškeré rady a pomoc, které mi v průběhu disertační práce poskytla.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odbornou pomoc k danému tématu, RNDr. Lence Řežábkové, Ph.D. za provedení sedimentačních měření a všem členům oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc. z Fyzikálního ústavu Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy za realizaci časově rozlišených fluorescenčních měření, doc. RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. z katedry Fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy za provedení měření dynamického rozptylu světla, Ing. Pavlíně Novotné z Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze za měření CD spekter, doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za realizaci MS analýzy, RNDr. Haně Sychrové, DrSc. a Pavle Herynkové z Fyziologického ústavu AVČR, v.v.i. za pomoc při realizaci pokusů v organismu *Saccharomyces cerevisiae*.

Děkuji svým rodičům, Liborkovi a Elince.

## **Tato disertační práce byla realizována díky finanční podpoře:**

Grantové agentury České republiky GAČR P207/11/0455

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 350111

Grantové agentury Akademie Věd GAAV IAA501110801

Doktorskému grantu GAČR GD305/08/H037

Centru základního výzkumu MŠMT LC554

Tato práce vznikla na oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu Akademie Věd České Republiky. Práce je založena na následujících článcích, jejichž přiložené kopie jsou přiložené v příloze:

**VEISOVA, D., REZABKOVA, L., STEPANEK, M., NOVOTNA, P., HERMAN, P., VECER, J., OBSIL, T., OBSILOVA, V.** (2010) C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms. *Biochemistry* **49**, 3853-3861. (IF<sup>2011</sup> = 3.422)

**VEISOVA, D., MACAKOVA, E., REZABKOVA, L., SULC, M., VACHA, P., SYCHROVA, H., OBSIL, T., OBSILOVA, V.** (2012) Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochem. J.* **443**, 663-670. (IF<sup>2011</sup> = 4.897)

Publikace autorky, která není zahrnuta v této disertační práci:

**MACAKOVA, E., KOPECKA M, KUKACKA Z, VEISOVA D, NOVAK P, MAN P, OBSIL T, OBSILOVA V** (2013) Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* accepted. (IF<sup>2011</sup> = 5.000)

Interní obhajoba na Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i. proběhla dne 14. června 2013.

## Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Literární přehled</b> .....	<b>5</b>
2.1. Proteiny 14-3-3 .....	5
2.1.1. Historický přehled .....	6
2.1.2. Struktura proteinů 14-3-3 .....	11
2.1.2.1. Vazebný žlábek.....	14
2.1.2.2. Vazebné motivy .....	15
2.1.2.3. C-terminální konec .....	18
2.1.3. Isoformy proteinů 14-3-3 .....	19
2.1.3.1. Živočišné isoformy .....	20
2.1.3.2. Rostlinné isoformy .....	20
2.1.3.3. Kvasničné isoformy .....	21
2.1.4. Funkce proteinů 14-3-3 .....	21
2.1.5. Význam a vazební partneři proteinů 14-3-3 .....	22
2.1.5.1. Význam proteinů 14-3-3 při regulaci buněčného cyklu .....	23
2.1.5.2. Význam proteinů 14-3-3 ve vnitrobuněčné signalizaci.....	23
2.1.5.3. Význam proteinů 14-3-3 při apoptóze .....	24
2.1.5.4. Význam proteinů 14-3-3 v procesu rakoviny .....	24
2.1.5.5. Význam proteinů 14-3-3 v procesech neurodegenerativních onemocnění.....	25
2.1.5.6. Enzym neutrální trehalasa 1 jako vazebný partner proteinů 14-3-3 .....	26
2.2. Neutrální trehalasa 1 .....	27
2.2.1. Historický přehled trehalas.....	27
2.2.2. Trehalasové isoformy .....	28
2.2.3. Trehalasová funkce.....	28
2.2.4. Fosforylační místa enzymu neutrální trehalasy 1 .....	31
<b>3. Cíle práce</b> .....	<b>33</b>
<b>4. Použitý materiál</b> .....	<b>34</b>

4.1. Chemikálie.....	34
4.2. Materiál .....	35
4.3. Přístroje .....	36
<b>5. Metody.....</b>	<b>38</b>
<b>ODDÍL A</b>	
5.1. Používané vektory .....	38
5.2. Cílená bodová mutageneze pomocí PCR .....	39
5.3. Odstranění templátové DNA .....	42
5.4. Ověření výsledku PCR reakce pomocí TBE agarosové elektroforézy .....	42
5.5. Transformace kompetentních buněk metodou teplotního šoku.....	42
5.6. Izolace plasmidové DNA .....	43
5.7. Bakteriální expresní systém.....	44
5.8. Glycerolový roztok transformovaných bakterií.....	45
5.9. Purifikace proteinů Bmh a lidské 14-3-3 $\zeta$ isoformy.....	46
5.9.1. Sonikace buněk .....	46
5.9.2. Chelatační afinitní chromatografie .....	47
5.9.3. Vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (SDS-PAGE).....	48
5.9.4. Dialýza .....	50
5.9.5. Thrombinové štěpení.....	50
5.9.6. Aniontově výměnná chromatografie .....	50
5.9.7. Zakoncentrování proteinu.....	51
5.9.8. Gelová permeační chromatografie .....	51
5.10. Kovalentní modifikace proteinů 14-3-3 fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS.....	52
5.11. Stacionární měření anizotropie fluorescence.....	52
5.12. Časově rozlišené měření fluorescence.....	54
5.13. Dynamický rozptyl světla.....	55
5.14. Eluční profily 14-3-3 proteinů (WT a forem s odstraněným C-koncovým segmentem) získané metodou gelové permeační chromatografie .....	57
5.15. Analytická ultracentrifugace.....	57
5.16. Cirkulární dichroismus .....	59

## **6. Metody ..... 61**

### **ODDÍL B**

6.1. Používané vektory .....	61
6.2. Klonování kvasničné neutrální trehalasy do pET-32b .....	62
6.2.1. Příprava vektoru pET-32b .....	62
6.2.1.1. Kultivace buněk v tekutém LB médiu .....	62
6.2.1.2. Izolace plasmidové DNA.....	62
6.2.1.3. Štěpení vektoru.....	62
6.2.1.4. TBE elektroforéza a izolace vektoru z gelu.....	63
6.2.2. Příprava inzertu neutrální trehalasy 2 (2340 bází) .....	63
6.2.2.1. Amplifikace inzertu pomocí PCR.....	63
6.2.2.2. Přečištění inzertu NTH2 .....	65
6.2.2.3. Štěpení inzertu NcoI a BamHI.....	65
6.2.2.4. Přečištění inzertu pomocí PCR Purification Kitu .....	65
6.2.2.5. Ligace inzertu .....	66
6.3. Transformace do kompetentních buněk .....	66
6.4. Kultivace na pevném LB agaru .....	66
6.5. Izolace plasmidové DNA .....	66
6.6. Kontrola pomocí LA DNA polymerasového mixu .....	66
6.7. Sekvence DNA .....	67
6.8. Cílená bodová mutageneze neutrální trehalasy 1 ve vektoru pET-32b .....	67
6.9. Transformace a exprese neutrální trehalasy 1 a 2.....	69
6.10. Purifikace neutrální trehalasy 1 .....	70
6.10.1. Sonikace .....	70
6.10.2. Chelatační afinitní chromatografie .....	70
6.10.3. Dialýza .....	70
6.10.4. Thrombinové štěpení.....	71
6.10.5. Kationtově výměnná chromatografie .....	71
6.10.6. Gelová permeační chromatografie .....	72



6.11. Fosforylace neutrální trehalasy 1.....	72
6.12. Expres a purifikace 14-3-3 proteinů .....	72
6.13. Analytická ultracentrifugace.....	72
6.14. Analýza neutrální trehalasy 1 pomocí hmotnostní spektrometrie .....	73
6.15. Limitovaná proteolýza.....	73
6.16. Měření enzymové aktivity .....	73
6.17. Konstrukce plasmidu pro pokusy aktivace Nth1 <i>in vivo</i> .....	74
6.17.1. Používané vektory .....	74
6.17.2. Příprava buněk.....	75
6.17.3. Příprava inzertu NTH1 .....	76
6.17.3.1. Amplifikace inzertu pomocí PCR.....	76
6.17.3.2. TBE agarosová elektroforéza .....	77
6.17.4. Příprava vektoru .....	77
6.17.4.1. Štěpení vektoru YEp-352 pomocí enzymu PstI.....	77
6.17.4.2. Přečištění štěpeného vektoru YEp-352/PstI .....	77
6.17.5. Příprava minimálního média YNB.....	77
6.17.6. Transformace <i>Saccharomyces cerevisiae</i> elektroporací.....	78
6.17.7. Izolace pDNA z kvasinek.....	79
6.17.8. Transformace <i>E. coli</i> elektroporací .....	80
6.17.9. Aktivace neutrální trehalasy 1 <i>in vivo</i> .....	81
<b>7. Výsledky .....</b>	<b>82</b>
<b>ODDÍL A</b>	
7.1. Expres a purifikace proteinů 14-3-3 .....	82
7.2. Dynamický rozptyl světla.....	83
7.3. Časově rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence .....	85
7.4. Měření stacionární anizotropie fluorescence .....	87
7.5. Gelová permeační chromatografie.....	88
7.6. Sedimentační analýza .....	89
7.7. Cirkulární dichroismus .....	91

## **ODDÍL B**

7.8. Příprava vektoru pET-32b .....	92
7.9. Purifikace neutrální trehalasy 1 .....	92
7.10. Expresní test neutrální trehalasy 2.....	93
7.11. Analýza pNth1 WT hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF .....	94
7.12. Bmh1 a Bmh2 tvoří stabilní komplexy s fosforylovanou neutrální trehalasou 1 a obě kvasničné isoformy zvyšují její enzymovou aktivitu <i>in vitro</i> .....	98
7.13. Studium oligomerního stavu Nth1 <i>Saccharomyces. cerevisiae</i> pomocí metody analytické ultracentrifugace .....	100
7.14. Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 interagují s N-koncovou částí Nth1 .....	101
7.15. Význam individuálních fosforylačních míst pNth1 při interakci s kvasničnými 14-3-3 proteiny v pokusech <i>in vitro</i> .....	103
7.16. Aktivace mutantních forem neutrální trehalasy 1 v pokusech <i>in vivo</i> .....	106
<b>8. Diskuze .....</b>	<b>108</b>
<i>Část A</i> .....	108
<i>Část B</i> .....	109
<b>9. Závěrečné shrnutí.....</b>	<b>110</b>
<b>10. Souhrn .....</b>	<b>111</b>
<b>11. Summary .....</b>	<b>113</b>
<b>12. Seznam citované literatury .....</b>	<b>115</b>
<b>13. Přílohy .....</b>	<b>123</b>
Příloha 1: <i>The C-terminal segment of BMH proteins Exhibits different structure compared to other 14-3-3 isoforms.</i>	
Příloha 2: <i>Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1.</i>	



## Seznam použitých zkratk

14-3-3	označení proteinu podle čísla frakce při eluci na DEAE chromatografii a pozici na 2D škrobové elektroforéze
AANAT	arylalkylamin N-acetyltransferasa
Abl	z angl. Abelson tiro sine kinase gen; Philadelphský chromosom (Bcr-Abl)
Ath1	enzym kyselá trehalasa 1
ATP	adenosintrifosfát
BamHI	restrikční enzym
Bcr	z angl. break-point cluster region
BL21(DE3)	buněčný kmen
Bmh1	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3
Bmh2	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3
Bmh2 W243	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3 s tryptofanovou mutací na pozici 243
Bmh2 W264	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3 s tryptofanovou mutací na pozici 264
Bmh2 WT	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3 divokého typu, z angl. <b>Wild Type</b>
Bmh2 $\Delta$ C	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3 s odštěpeným C-koncovým segmentem
CBP	z angl. Cruciform Binding Protein
CD	cirkulární dichroismus
cDNA	komplementární DNA
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CJN	Creutzfeldt-Jakobova nemoc
CV	z angl. column volume
Da	Dalton; atomová hmotnostní jednotka
DBD	z angl. DNA binding domain, DNA vazebná doména FoxO4
DEAE	iontosorb obsahující <b>DiEthylAminoEthyl</b> ové funkční skupiny
DER	Drosophila receptor
DNA	deoxyribonukleová kyselina

DLS	z angl. <b>D</b> ynamic <b>L</b> ight <b>S</b> cattering; Dynamický rozptyl světla
Dpn I	enzym, který specificky štěpí methylovanou DNA
DTT	dithiotreitol
EDTA	<b>E</b> thylen <b>D</b> iamin <b>T</b> etraoctová kyselina ( <b>A</b> cid)
Exo1	protein 14-3-3
ExoS	Exoenzym S
FAS	z angl. Factor activating Exoenzyme S
f <sub>B</sub>	frakce navázaného peptidu
FBP	z angl. Fusicoccin binding protein
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FRET	z angl. Förster resonance energy transfer
G <sub>2</sub>	fáze buněčného cyklu
GF14	rostlinná isoforma proteinu 14-3-3
H1-H9	α-helixy 1-9
His-Tag	tzv. histidinová kotva; šest po sobě jdoucích histidinů
HPLC	z angl. High performance liquid chromatography, vysoce účinná kap. chrom.
IMAC	z angl. Immobilized Metal Affinity Chromatography; afinitní chromatografie
IPTG	isopropylthiogalaktosid
KCIP-1	z angl. Protein kinase C inhibitor 1
K <sub>D</sub>	disociační konstanta
LB	Luria-Bertani médium
M	fáze buněčného cyklu; mitóza
Nde I	restrikční enzym
NIP	z angl. Nitrate reductase Inhibitor Protein
Nth1, Nth2	enzym neutrální trehalasa 1, 2
p53	protein zastávající klíčovou úlohu v procesu vzniku rakoviny
Par5	protein 14-3-3 <i>C. elegant</i>
PCR	z angl. Polymerase Chain Reaction; polymerasová řetězová reakce
PCS	fotokorelační spektroskopie (dynamický rozptyl světla)
pET-15b	označení vektoru

pET-32b	označení vektoru
Pfu	z <b>Pyrococcus furiosus</b> ; Pfu DNA polymerasa
PKB	protein kinasa B (Akt)
polyQ	polyglutaminový segment
pRaf-259	fosforylovaný Raf protein
QELS	kvasielastický rozptyl světla (dynamický rozptyl světla)
R18	označení proteinu
Rad24	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3
Rad25	kvasničná isoforma proteinu 14-3-3
Raf-259	označení proteinu
$r_{\max}$	maximální anizotropie
$r_{\min}$	minimální anizotropie
$r_{\text{obs}}$	pozorovaná anizotropie
rpm	z angl. revolutions per minute; otáčky za minutu
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SDS/ SDS-PAGE	dodecylsulfát sodný/ polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS
TBE	<b>T</b> ris-HCl, <b>B</b> oritá kyselina, <b>E</b> DTA
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
Top10	buněčný kmen
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	z angl. Ultra Violet
YEp-352	označení vektoru
$\alpha A$ - $\alpha I$	označení $\alpha$ -helixů proteinů 14-3-3

# 1. Úvod

Hlavním úkolem této disertační práce bylo studium faktorů ovlivňující vazebnou specifitu proteinů 14-3-3. Hlavní pozornost byla věnována studiu kvasničných isoform proteinů 14-3-3 a úloze kvasničných proteinů 14-3-3 při regulaci funkce kvasničného enzymu neutrální trehalasy Nth1.

Proteiny 14-3-3 jsou molekuly, které jsou si sekvenčně velmi podobné. Liší se od sebe zejména ve svých C-terminálních koncích. Kvasničné C-terminální konce jsou v porovnání se savčími isoformami významně delší a obsahují polyQ opakování.

V první části této disertační práce byly pomocí metod fluorescenční spektroskopie, dynamického rozptylu světla, sedimentační analýzy a gelové permeační chromatografie studovány konformační změny C-koncového segmentu molekuly kvasničného proteinu 14-3-3, oligomerní stav a velikost molekul proteinů Bmh, vliv odstranění C-koncového segmentu na vazebnou afinitu proteinů Bmh a vliv vazby fosforylovaného peptidu na mobilitu C-koncového segmentu proteinů Bmh.

V druhé části práce byla studována regulace aktivity enzymu neutrální trehalasy kvasničnými isoformami proteinů 14-3-3 *in vitro* a *in vivo* pomocí technik bodové mutagenese, kinetických měření a sedimentační analýzy. Neutrální trehalasa 1 (Nth1) je enzym patřící do skupiny hydrolas, který zajišťuje degradaci neredukujícího disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Obě kvasničné isoformy jsou zodpovědné za kompletní enzymovou aktivitu Nth1 po fosforylaci PKA *in vitro*.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou dimerní bílkovinné intracelulární molekuly vyskytující se ve všech eukaryotických organismech. Tvoří rodinu vysoce konzervovaných kyselých proteinů s charakteristickým tvarem a relativní molekulovou hmotností 28-33 tisíc. U savců bylo identifikováno sedm isoform proteinů 14-3-3, které se běžně označují řeckými písmeny (*Ichimura, T. et al., 1988*). V rostlinách bylo objeveno nejméně 12, pravděpodobně 15 isoform (*Rosenquist M. et al. 2000*) a dvě isoformy v kvasinkách (*van Heusden G. P. H. et al., 1995*).

Proteiny 14-3-3 byly objeveny v roce 1967 Moorem a Perezem v hovězí mozkové tkáni a tvoří téměř 1 % ze všech rozpustných proteinů v mozku (*Boston et al., 1982*). Vyskytují se v převážně v neuronech, ale byly objeveny v nízkých koncentracích i v jiných tkáních, např. v dřeni nadledvinek a ve střevech (*van Heusden G. P. H. et al., 1992*). Doposud bylo zjištěno přes 300 vazebných partnerů proteinů 14-3-3, mezi které řadíme některé enzymy, transkripční faktory, receptorové, strukturní i cytoskeletální proteiny, proteiny účastníci se regulace buněčného cyklu a apoptózy. Některé isoformy proteinů 14-3-3 (isoformy  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\zeta$  vytváří dohromady 70 kDa CBP protein) mohou interagovat s DNA (*Todd A. et al., 1998*), isoforma 14-3-3 $\zeta$  může interagovat s kyselinou arachidonovou (*Brock, T. G. 2007*). Proteiny 14-3-3 byly objeveny jako první skupina proteinů, která interaguje se svými partnery skrze fosforylovaný, přesně definovaný vazebný motiv (*Muslin A. J. et al., 1996*).

Název proteinů 14-3-3 byl odvozen podle čísla frakce (14.) aniontové chromatografie na celulóse s navázaným diethylaminoethylem a podle pozice (3.3) na škrobové gelové elektroforéze (*Moore, B. W., Perez, V. J. 1967*). Členové skupiny proteinů 14-3-3 jsou nazýváni různými alternativními názvy (*Aitken, A. 2006*), viz **Tab.1**.

Zájem o studium proteinů 14-3-3 od roku 1990 vysoce vzrostl, protože se proteiny 14-3-3 podílí na mnoha důležitých buněčných dějích, jako jsou např. přenos signálu v buňce, diferenciaci a proliferaci buňky, regulace buněčného cyklu, apoptóza, jsou úzce spjaty s procesem rakoviny a mohou sloužit i jako indikátory některých neurodegenerativních onemocnění.



**Tab. 1** Příklady alternativních názvů proteinů 14-3-3 (převzato z Aitken, A. 2006, doplněno).

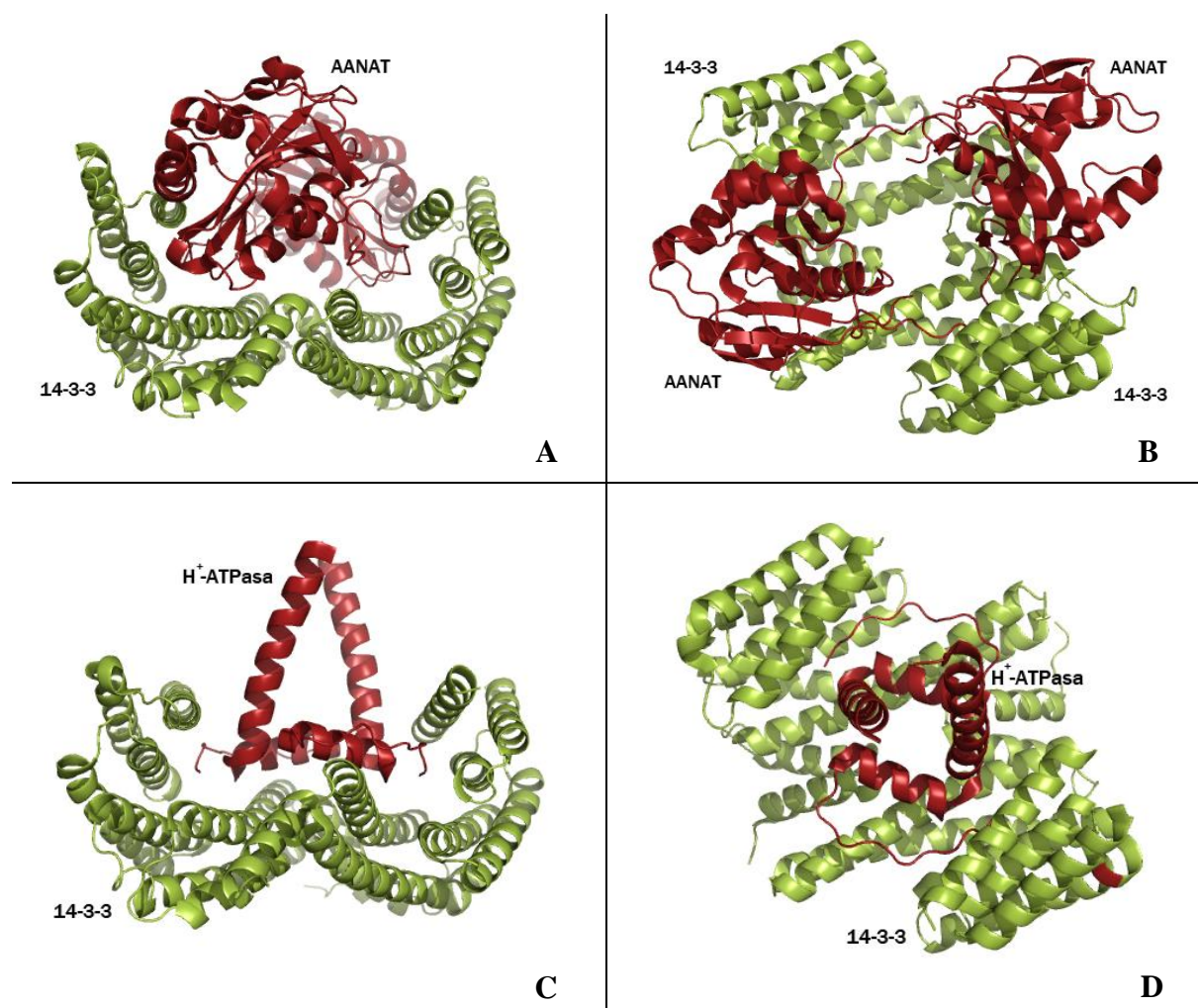
Název	Isoforma proteinu 14-3-3 / organismus/ funkce	Citace
AS1	14-3-3 $\eta$	(Leffers, H. et al., 1993)
BAP-1	14-3-3 $\tau$ / z angl. <u>B</u> cr <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein- <u>1</u>	(Reuther G. W. et al., 1994)
BMH1, BMH2	kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 / <i>S. cerevisiae</i> ; z angl. <u>B</u> rain <u>M</u> odulosignalin <u>H</u> omologue	(van Heusden G. P. H. et al., 1992)
CBP	z angl. <u>C</u> ruciform <u>B</u> inding <u>P</u> rotein; 70 kDa, obsahuje isoformy $\epsilon$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\zeta$	(Todd A. et al., 1998)
DER	<i>drosophila</i> receptor patřící do rodiny proteinů 14-3-3	(McConnell, J. E., Hodges, P. E. 1993)
Exo1	stimuluje Ca <sup>2+</sup> dependentní exocytózu	(Morgan, A., Burgoyne, R. D. 1992)
FAS	14-3-3 $\zeta/\delta$ ; z angl. <u>F</u> actor <u>A</u> ctivating <u>E</u> xoenzyme <u>S</u>	(Fu, H. et al., 1993)
FBP	z angl. <u>F</u> usicoccin <u>B</u> inding <u>P</u> rotein	(Marra, M. 1994, Korthout, H. A., de Boer, A. H. A. 1994, Oecking, C. et al., 1994)
GF14	<u>G</u> -box <u>F</u> actor <u>14-3-3</u> homolog	(Lu, G. 1992)
HS1	14-3-3 $\theta$ , další alternativní název: 14-3-3 protein T-cell	(Leffers, H. et al., 1993)
KCIP-1	14-3-3 $\beta/\alpha$ , 14-3-3 $\gamma$ , 14-3-3 $\zeta/\delta$ ; z angl. <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u> <u>I</u> nhibitor <u>P</u> rotein <u>1</u>	(Toker, A. et al., 1992)
Leonardo	14-3-3 $\zeta$ / <i>Drosophila melanogaster</i>	(Skoulakis, E. M., Davis, R. L. 1996)
MSF	14-3-3 $\epsilon$ / z angl. <u>M</u> itochondrial import <u>S</u> timulation <u>F</u> actor	(Alam, R. et al., 1994)
NIP	z angl. <u>N</u> itrate reductase <u>I</u> nhibitory <u>P</u> rotein	(Moorhead, G. et al., 1996, Bachmann, M. et al., 1996)
Par 5	14-3-3 $\theta$ / <i>Caenorhabditis elegans</i>	(Hurd, T. W. et al., 2003)
Rad24, Rad25	Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3/ <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	(Ford, J. C. et al., 1994)
Stratifin	14-3-3 $\sigma$ ; další alternativní název: Epithelial cell marker protein 1	(Leffers, H. et al., 1993)
14-3-3E	14-3-3 $\epsilon$	(Bunney, T. D. et al., 1993)

### 2.1.1. Historický přehled

Proteiny 14-3-3 doposud zaznamenaly od svého objevení v roce 1967, kdy byly izolovány Moorem a Perezem z extraktu hovězí mozkové tkáně a označeny pro tuto tkáň za specifické (spolu se 14-3-2 a S100 proteiny) (Moore, B. W., Perez, V. J., 1967), obrovský

vývoj. Proteiny 14-3-3 byly poprvé purifikovány spolu s proteiny 14-3-2 (proteiny 14-3-2 se skládají pouze z jednoho polypeptidového řetězce a jejich relativní molekulová hmotnost je 50 kDa) v roce 1980 (Erickson, P. F., Moore, B. W., 1980). V roce 1982 byly stanoveny v cerebrospinální tekutině a označeny jako potenciální indikátory některých neurodegenerativních onemocnění (Boston, P. F. et al., 1982). V letech 1987-1988 byla rodině proteinů 14-3-3 připsána funkce enzymové regulace aktivací tyrosin a tryptofan monooxygenasy za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a kalmodulin dependentní proteinkinasy II. Obě tyto oxygenasy jsou zahrnuty do syntézy neurotransmiterů (Ichimura, T. et al., 1987, Yamauchi, T. et al., 1981). V roce 1988 byly proteiny 14-3-3 separovány z mozkové tkáně na HPLC a pojmenovány řeckými písmeny (Ichimura, T. et al., 1988). Následně bylo v roce 1990 prokázáno, že mohou proteiny 14-3-3 regulovat (inhibovat) aktivitu proteinkinasy C (Aitken, A. et al., 1990). Od roku 1990 bylo publikováno mnoho prací o proteinech 14-3-3 především díky jejich schopnosti interagovat s vysokým počtem vazebných partnerů. Výčet všech publikovaných studií by byl nad rámec této disertační práce, zmíním zde proto pouze některé. Události roku 1992 zahrnují: objevení genu BMH1 organismu *Saccharomyces cerevisiae* (van Heusden G. P. H. et al., 1992), zjištění, že Exo1 patřící do skupiny proteinů 14-3-3, může ovlivňovat PKC zprostředkovanou kontrolu  $\text{Ca}^{2+}$  závislé exocytózy (Morgan, A., Burgoyne, R.D., 1992). Dále bylo zjištěno, že se proteiny 14-3-3 vyskytují v dalších eukaryotických organismech: kvasinkách, rostlinách (špenát, hrách, pupalka) a *Xenopus* (drápatka) (van Heusden, G. P. H. et al., 1992, Hirsch, S. et al., 1992, Martens, G. J. et al., 1992, Lu, G. et al., 1992), že GF14 patří do rodiny proteinů 14-3-3 a tvoří komplex s G-box DNA (Lu, G. 1992), a že existují fosforylované formy proteinů 14-3-3 (Toker, A. et al., 1992). V roce 1993 skupina Colliera et al. zjistila, že exoenzym S (mono-ADP-ribosyltransferasa), jako virulentní faktor *Pseudomonas aeruginosa*, vyžaduje pro svou aktivitu faktor zvaný FAS (Factor Activating ExoS) patřící do rodiny proteinů 14-3-3 (Fu, H. et al., 1993). Do výčtu důležitých událostí ve vývoji proteinů 14-3-3 patří interakce s proteinkinásami, např. asociace 14-3-3 s Raf kinasou (Fantl, W. J. et al., 1994, Fu, H. et al., 1994, Freed, E. et al., 1994), interakce 14-3-3 $\tau$  s c-Bcr a Bcr-Abl (Reuther, G.W. et al., 1994). V roce 1994 bylo dále zjištěno, že proteiny 14-3-3 jsou zahrnuty do kontroly buněčného cyklu (Ford, J. C. et al., 1994), byla popsána jejich interakce s arylalkylamin-N-acetyltransferasou (AANAT, Roseboom, P. H. et al., 1994), a byly identifikovány dva geny organismu *Schizosaccharomyces pombe* rad24 a rad25, které jsou spojené s procesem buněčné proliferace (Ford, J. C. et al., 1994). V roce 1995 publikovaly dvě skupiny krystalovou strukturu proteinu 14-3-3 v časopise Nature. Liu,

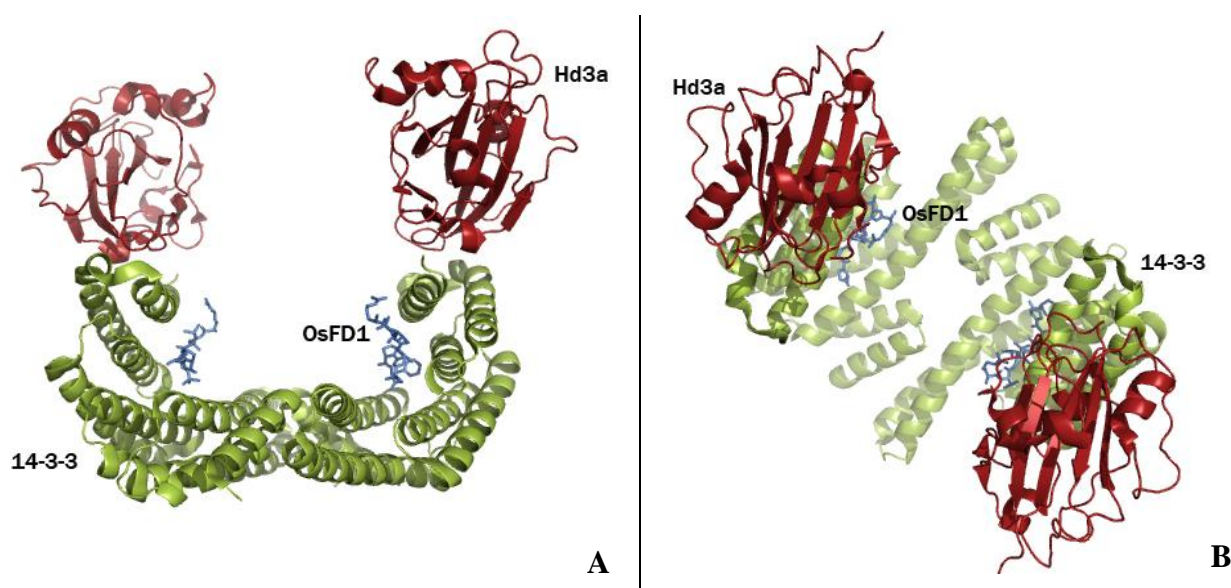
*D. et al.*, 1995 publikovala krystalovou strukturu isoformy 14-3-3 $\zeta$  o rozlišení 2,9 Å (**Obr. 3A, B**) a *Xiao, B. et al.*, 1995 krystalovou strukturu isoformy 14-3-3 $\tau$  o rozlišení 2,6 Å.



**Obr. 1 A:** Stuhková reprezentace krystalové struktury komplexu 14-3-3 $\zeta$  s AANAT (*Obsil, T. et al.*, 2001, PDB kód: 1IB1), pohled ze strany. **B:** Stuhková reprezentace krystalové struktury komplexu 14-3-3 $\zeta$  s AANAT (*Obsil, T. et al.*, 2001, PDB kód: 1IB1), pohled shora. **C:** Stuhková reprezentace krystalové struktury 14-3-3 $\zeta$  s H<sup>+</sup>-ATPasou (*Ottmann, C. et al.*, 2007, PDB kód: 2O98), pohled ze strany. **D:** Stuhková reprezentace krystalové struktury 14-3-3 $\zeta$  s H<sup>+</sup>-ATPasou (*Ottmann, C. et al.*, 2007, PDB kód: 2O98), pohled shora.

V tomto roce bylo dále zjištěno, že isoformy 14-3-3 $\alpha$  a 14-3-3 $\delta$  jsou fosfoformy 14-3-3 $\beta$  a 14-3-3 $\zeta$  (*Aitken, A. et al.*, 1995). V roce 1996 byly proteiny 14-3-3 objeveny v neuronálních klubkách u pacientů s Alzheimerovou chorobou (*Layfield, R. et al.*, 1996), dále byla popsána interakce závislá na fosforylaci skrze vazebný motiv RSxpSxP (*Muslin, A. J.*, 1996) a zjištěna

interakce proteinů 14-3-3 s pro-apoptickým BAD proteinem (Zha, J. et al., 1996). Isoforma 14-3-3 $\sigma$  je zahrnuta do procesu regulace buněčného cyklu, kdy se buňky s delecí 14-3-3 $\sigma$  genu nemohou zastavit v G2/M kontrolním bodu buněčného cyklu a začínají se nekontrolovaně množit (Chan, T. A. et al., 1999). V roce 2001 byla vyřešena krystalová struktura komplexu 14-3-3/AANAT (Obsil, T. et al., 2001). Jedná se o první strukturu komplexu proteinu 14-3-3 s kompletním ligandem (viz **Obr. 1 A, B**). V roce 2005 byl navržen vazebný motiv III., který obsahuje ve své sekvenci místo aminokyseliny prolinu terminální COOH (Ganguly, S. et al., 2005). V tomto roce byla vyřešena krystalová struktura isoformy 14-3-3 $\sigma$  (o rozlišení 2,8 Å) a její porovnání se známými krystalovými strukturami 14-3-3 $\zeta$  a 14-3-3 $\tau$ : rozdíly v části molekuly 203-215 aminokyselin jsou pravděpodobně zodpovědné za interakce se specifickými ligandy (Benzinger, A. et al., 2005, Wilker, E. W. et al., 2005). Druhou vyřešenou krystalovou strukturou s celým ligandem je komplex proteinu 14-3-3 s H<sup>+</sup>-ATPasou (viz **Obr. 1 C, D** Ottmann, C. et al., 2007).



**Obr. 2:** Stuhková reprezentace heterohexamerní struktury ternárního komplexu FAC složená ze dvou molekul Hd3a (červená), dimeru GF14c (zelená, rýžový protein 14-3-3) a dvou OsFD1 peptidů (modrá). **A:** Pohled ze strany. **B:** Pohled shora (Taoka, K. et al., 2011, PDB kód: 3AXY).

V roce 2011 byl objeven první inhibitor kovalentně vázaný k proteinům 14-3-3 označovaný jako FOBISIN101. FOBISIN101 z angl. Fourteen-three-three Binding Small molecule Inhibitor. Tato molekula inhibuje interakce proteinů 14-3-3 s fosforylovanými, a stejně tak i

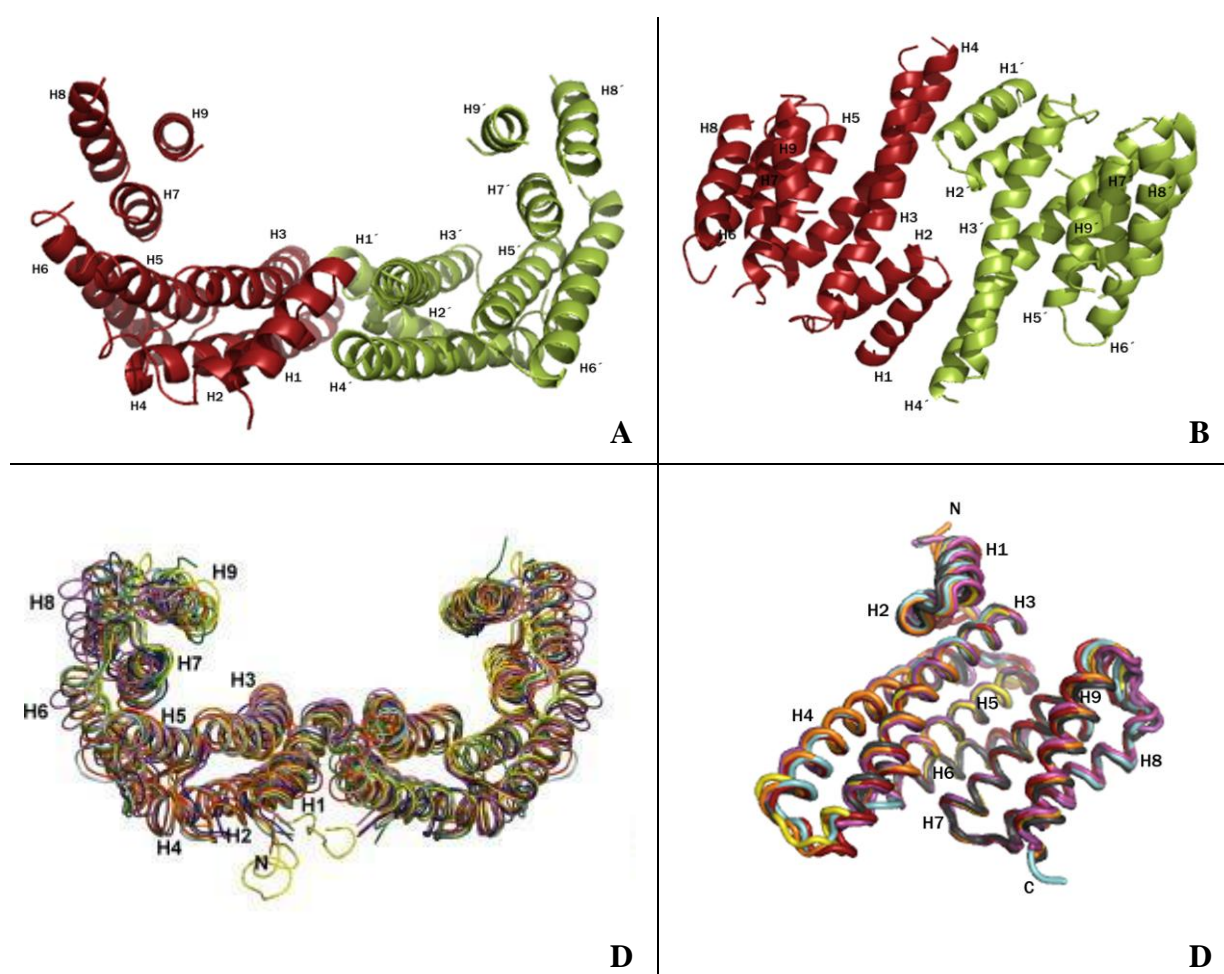
nefosforylovanými, vazebnými partnery kovalentním navázáním na Lys120 uvnitř vazebného žlábků proteinu 14-3-3 (Zhao, J. et al., 2011). Doposud poslední vyřešená krystalová struktura komplexu s obsaženým proteinem 14-3-3 je Hd3a/OsFD1/GF14c (FAC) komplex o rozlišení 2,4 Å viz **Obr. 2 A, B** z roku 2011 (Taoka et al., 2011). Florigen je syntetizován v listech rostlin, odkud je transportován do vrcholků výhonků, kde spouští proces kvetení. Florigen je kódován FT (Flowering locus T) genem, který je u vyšších rostlin konzervovaný (Zeevaart, J. A. 2008, Kobayashi, Z., Weigel, D. 2007, Truck, F. et al., 2008). Rýžový FT homolog Hd3a reaguje se proteiny 14-3-3 ve vrcholových buňkách výhonků. Vzniklý binární komplex je přemístěn do jádra, kde na sebe váže (Os)FD1 transkripční faktor (Os = *Oryza sativa*, rýžový homolog *Arabidopsis thaliana* FD). Výsledný ternární komplex FAC (Florigen Activating Complex) vyvolává transkripci OsMADS15 (homolog *Arabidopsis thaliana* APETALA1, AP1), která vede k procesu kvetení. FAC komplex je heterohexamer sestávající se ze dvou molekul Hd3a, GF14c (rýžový protein 14-3-3) a OsFD1, kde dvě Hd3a monomerní jednotky přiléhají na C-terminální oblasti dimeru GF14c viz **Obr. 2 A, B**. Vazebné místo GF14c pro Hd3a se sestává hydrofóbní dutiny tvořené helixy H a I a z laloku obsahujícího smyčku mezi těmito dvěma helixy (aminokyseliny 206-215). Interakce GF14c s OsFD1 probíhá přes vazebný motiv I (Taoka, K. et al., 2011). V roce 2013 byla studována interakce proteinů 14-3-3 s NF-L (z angl. Neurofilament Protein-L) a regulace agregace neurofilament. NF proteiny jsou stavební části neuronových axonů. NF protein s lehkým řetězcem NF-L se nachází především ve velkých myelinizovaných axonech. Hladina NF-L v mozkomíšním moku koreluje s množstvím bílé mozkové hmoty, NF-L tedy může sloužit jako biomarker degenerace velkých myelinizovaných axonů např. u Alzheimerovy demence (Miao, L. et al., 2013). Mutace NF-L nacházející se u CMT (Charcot-Marie-Tooth) choroby vede k agregaci NF-L a degeneraci neuronových axonů. CMT choroba se projevuje zhoršením hybnosti končetin a poškozením periferních nervů. Proteiny 14-3-3 interagují s NF-L skrze fosforylovaný motiv. Zvýšená exprese proteinů 14-3-3 působí rozklad neurofilament. Navíc, proteiny 14-3-3 zmírňují tvorbu agregátů mutantních CMT NF-L proteinů (Miao, L. et al., 2012, Rudrabhatla, P. et al., 2011). Ve stávajícím roku 2013 vyšla publikace o aktivaci NF-κB signalizace fusicoccinem (FC) indukovanou dimerizací. Systém chemicky indukované dimerizace (CID) je důležitým nástrojem pro studium proteinových funkcí v buňkách se schopností přemístění proteinových molekul do jiných buněčných kompartmentů. Je založen na FC, jako faktoru způsobující dimerizaci. FC může současně vázat dvě odlišné proteinové molekuly. FC je znám svou funkcí, že stabilizuje interakci proteinu 14-3-3 s regulační doménou C-terminální části H<sup>+</sup>ATPasy PMA2 (CT). Import NF-



$\kappa$ B do jádra je zajištěn FC indukovanou dimerizací NF- $\kappa$ B-CT s proteinem 14-3-3 lokalizovaným v jádře (Skwarczynska, M. et al., 2013).

### 2.1.2. Struktura proteinů 14-3-3

Aminokyselinová sekvence všech proteinů 14-3-3 může být rozdělena do tří částí: N-terminální konec, ve kterém se jednotlivé isoformy mohou lišit aminokyselinovým složením, konzervovaná oblast vazebného žlábků a C-terminální konec, který je při porovnávání isoform vysoce variabilní (Ferl, R. J. et al., 2002).



**Obr. 3.:** Reprezentace krystalové struktury proteinů 14-3-3.

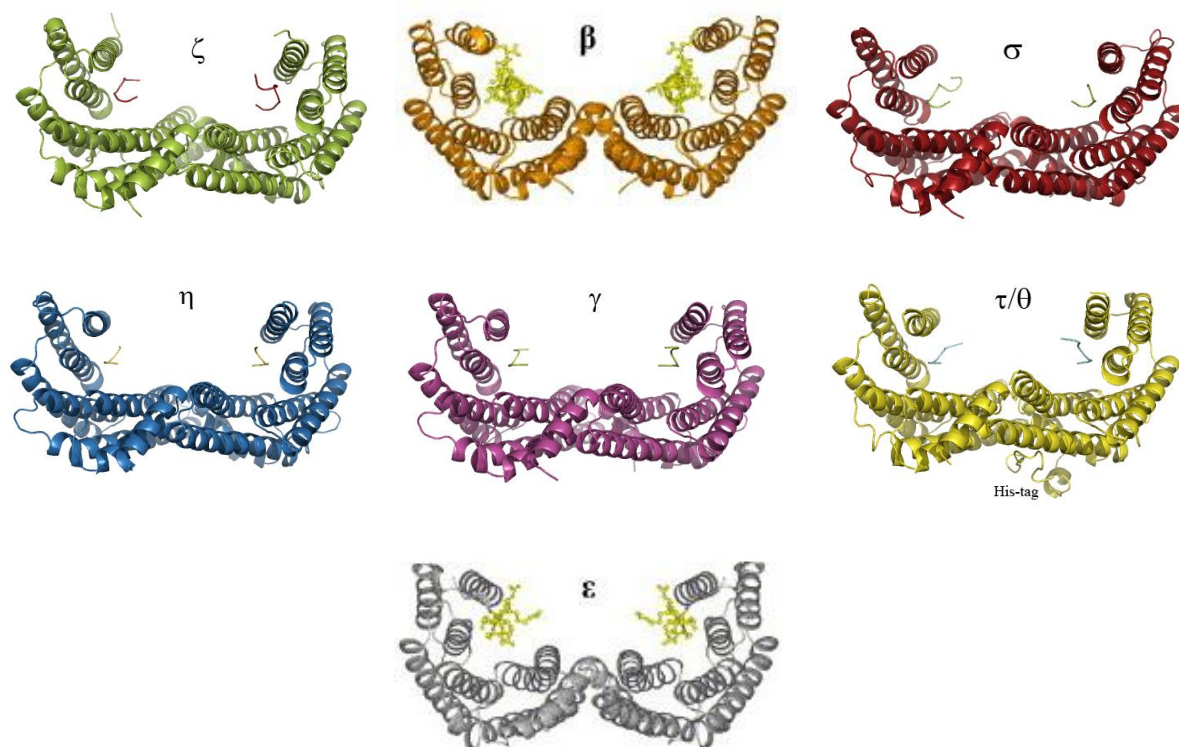
**A:** Boční pohled na dimerní molekulu proteinu 14-3-3. Každá monomerní jednotka (zelená, červená) je složena z devíti antiparalelních  $\alpha$ -helixů označených písmeny H1-H9, resp. H1'-H9'. Vazebné místo pro ligand tvoří helixy H3, H5, H7 a H9, resp. H3', H5', H7' a H9' (Liu, D. et al., 1995, PDB kód: 1A4O). **B:** Pohled shora na dimerní molekulu proteinu 14-3-3. Na

dimerizaci proteinu se podílí helixy H1 a H2 jedné monomerní jednotky (červená) s helixy H3' a H4' druhé monomerní jednotky (zelená) a helixy H3 a H4 (červené) monomerní jednotky s helixy H1' a H2' (zelené) monomerní jednotky (Liu, D. et al., 1995, PDB kód: 1A4O). **C:** Strukturální porovnání sedmi lidských isoform dimerů proteinů 14-3-3. Je zde patrná vysoká konzervovanost všech lidských molekul 14-3-3:  $\beta$  isoforma (šedá, PDB 2C23),  $\gamma$  isoforma (žlutá, 2B05),  $\epsilon$  isoforma (červená, 2BR9),  $\zeta$  isoforma (modrá, 1QJB),  $\eta$  isoforma (oranžová, 2C74),  $\sigma$  isoforma (magenta, 1YWT),  $\tau$  isoforma (světlá magenta, 2BTP) (Obsil, T., Obsilova, V. 2011). **D:** Strukturální porovnání monomerních jednotek sedmi lidských isoform proteinů 14-3-3. Barevné provedení viz popisky Obr. 3C (Obsil, T., Obsilova, V. 2011).

První vyřešené krystalové struktury proteinů 14-3-3 pochází z roku 1995. V tomto roce byly publikovány isoformy 14-3-3 $\zeta$  (Liu, D. et al., 1995, **Obr. 3A, B**) a 14-3-3 $\tau$  (Xiao, B. et al., 1995). Další významnou krystalovou strukturou je komplex 14-3-3 s enzymem serotonin N-acetyltransferasou AANAT (Obsil, T. et al., 2001).

Proteiny 14-3-3 jsou stálé homo- nebo heterodimerní molekuly s charakteristickým tvarem a velikostí. Na dimerizaci proteinu se podílí čtyři N-terminální helixy (H1, H2, H3, H4) každé monomerní jednotky, přičemž helixy H1 a H2 jedné monomerní jednotky interagují s helixy H3' a H4' druhé monomerní jednotky. Každá monomerní jednotka je složena z devíti antiparalelních  $\alpha$ -helixů (H1-H9, možné je i označení  $\alpha A$ - $\alpha I$ ), které jsou propojeny různě dlouhými ohyby a připomíná z boku tvar písmene L. Její relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 28-33 tisíc. Vnitřní část monomerní jednotky je tvořena čtyřmi helixy (H3, H5, H7 a H9), které tvoří tzv. amfipatický žlábek, který vytváří vazebné místo pro ligand. Spojením dvou monomerních jednotek vzniká hluboká centrální dutina o rozměrech 35 Å x 35 Å x 20 Å se dvěma vazebnými místy, kde jsou vazební partneři orientováni naproti sobě. Monomerní jednotky jsou spojeny elektrostatickými a hydrofóbními interakcemi.

I přes velmi vysokou strukturální podobnost sedmi lidských isoform proteinů 14-3-3 (viz **Obr. 3, 4**) existuje několik individuálních rozdílů, např. pozice monomerních jednotek, resp. úhel, mezi dvěma monomerními jednotkami (Yang, X. et al., 2006). Tato dimerní flexibilita usnadňuje interakce proteinů 14-3-3 s ligandy o odlišných velikostech a tvarech. Dalším rozdílným faktorem jednotlivých isoform je odlišná délka a konformace ohybů mezi helixy (Obsil, T., Obsilova, V., 2011). Jedná se zejména o oblasti mezi  $\alpha$ -helixy H3 a H4 a mezi  $\alpha$ -helixy H8 a H9 (Bezinger, A. et al., 2005, Gardino, K. A. et al., 2006).



**Obr. 4.:** *Stužkové reprezentace krystalových struktur savčích isoform protein 14-3-3. U každé isoformy je navázán vazebný partner, u isoformy  $\theta/\tau$  je patrná histidinová kotva (His-tag).  $\zeta$ : PDB kód 1QJB (zelená),  $\beta$ : PDB kód 2C23 (oranžová),  $\sigma$ : PDB kód 1YWT (červená),  $\eta$ : PDB kód 2C74 (tmavě modrá),  $\gamma$ : PDB kód 2B05 (magenta),  $\tau/\theta$ : PDB kód 2BTP (žlutá),  $\varepsilon$ : PDB kód 2BR9 (šedá). Převzato z Gardino, K. A. et al., 2006.*

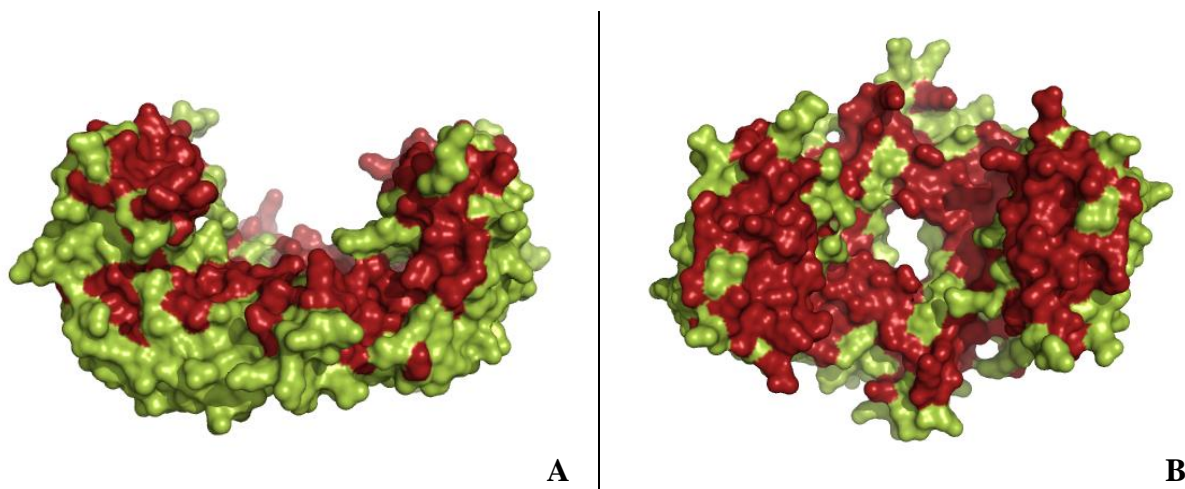
Všechny proteiny 14-3-3 jsou dimerní molekuly. Jednotlivé isoformy se ovšem liší ve schopnosti vytvářet homo- nebo heterodimery. Helixy H1 a H2 jedné monomerní jednotky interagují s helixy H3 a H4 druhé monomerní jednotky za vzniku dimeru. Na dimerizaci obou jednotek se u 14-3-3 $\zeta$  isoformy (homodimeru) podílejí tři solné můstky mezi aminokyselinami Arg18–Glu89, Glu5–Lys74 a Asp21–Lys85 a další polární a hydrofóbní interakce (Liu, D. et al., 1995). Ve všech lidských isoformách je konzervován pouze první solný můstek a všechny klíčové polární a hydrofóbní interakce. V isoformách  $\sigma$ ,  $\eta$ ,  $\varepsilon$  a  $\gamma$  chybí druhý solný můstek a v pořadí třetí solný můstek se nachází ve všech lidských 14-3-3 isoformách s výjimkou isoformy  $\varepsilon$ . Přítomnost jediného solného můstku u  $\varepsilon$  isoformy vede ke schopnosti této isoformy tvořit zejména heterodimery. Naopak, krystalová struktura 14-3-3 $\sigma$  isoformy obsahuje další alternativní solný můstek zahrnující aminokyseliny Lys9 a Glu83, který spolu s ostatními interakcemi zajišťuje schopnost  $\sigma$  isoformy tvořit pouze homodimerní molekuly (Gardino, K. A. et al., 2006).



Isoforma 14-3-3 $\zeta$  obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci tři fosforylační místa: Ser58, Ser184 a Thr232. Fosforylační místo Ser58 se nachází na rozhraní monomerů. Fosforylace Ser58 významně zeslabuje dimerizaci a vazebné schopnosti 14-3-3 $\zeta$ , stejně jako mutace Ser58 na kyselinu asparagovou (S58D) (Powell, D. et al., 2003).

### 2.1.2.1. Vazebný žlábek

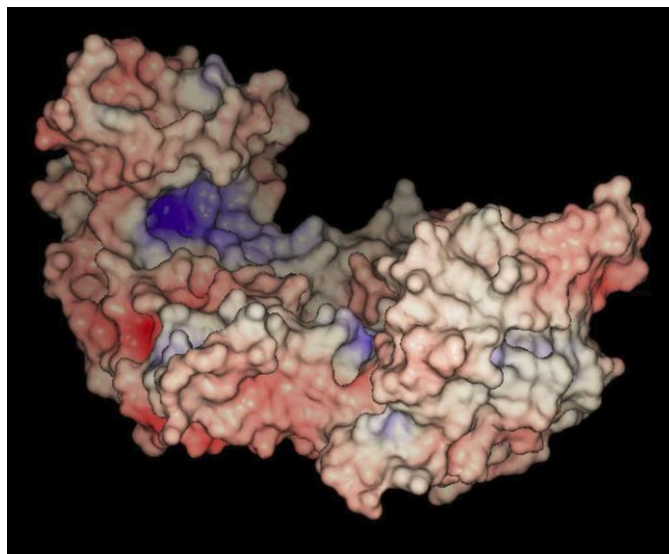
Proteiny 14-3-3 obsahují konzervované aminokyselinové zbytky, které se nacházejí zejména uvnitř vazebného žlábků (viz **Obr. 5A, B**). Ten je tvořen čtyřmi  $\alpha$ -helixy (H3, H5, H7 a H9). Helixy H3 a H5 obsahují zejména polární aminokyseliny, helixy H7 a H9 obsahují především hydrofóbní aminokyseliny. Uvnitř vazebného žlábků obou monomerních jednotek se nacházejí tři pozitivně nabitě konzervované aminokyseliny, které interagují s fosforylovaným serinem nebo threoninem vazebného partnera proteinu 14-3-3. Jsou to aminokyseliny Lys<sup>49</sup>, Arg<sup>56</sup>, Arg<sup>127</sup>, které jsou součástí  $\alpha$ -helixů 3 a 5 (Rittinger, K. et al., 1999).



**Obr. 5:** Struktura dimeru lidské 14-3-3 $\zeta$  isoformy v povrchové reprezentaci (PDB 1QJB). Červeně jsou označeny konzervované aminokyseliny u všech lidských isoform proteinů 14-3-3. **A:** Boční pohled na povrchovou reprezentaci proteinu 14-3-3. **B:** Pohled shora na povrchovou reprezentaci proteinu 14-3-3 (Obsil, T., Obsilova, V., 2011).

Aminokyseliny, ve kterých se jednotlivé isoformy odlišují, se nacházejí především na vnějším povrchu dimeru, N-terminálním konci, v některých ohybech proteinů 14-3-3 a zejména na C-terminálním konci, který se nachází za 9.  $\alpha$ -helixem. Tato oblast je sekvenčně

velmi rozmanitá. Celkový elektrostatický potenciál proteinů 14-3-3 je negativní, jak naznačuje **Obr. 6**.



**Obr. 6.:** *Povrchová reprezentace dimeru 14-3-3 $\zeta$ . Modře jsou obarvena místa s kladným elektrostatickým potenciálem, červeně místa se záporným elektrostatickým potenciálem. Tři bazické aminokyseliny (Lys<sup>49</sup>, Arg<sup>56</sup>, Arg<sup>127</sup>) označují modře zabarvenou oblast kladného potenciálu uvnitř vazebného žlábků (Obsil, T. et al., 2001).*

#### 2.1.2.2. Vazebné motivy

Proteiny 14-3-3 interagují s vysokým počtem fosforylovaných partnerů (přes 300) především kvůli charakteristické fosfoserinové/fosfothreoninové (pS/pT) vazebné aktivitě (Muslin, A. J. et al., 1996). Vedle dvou hlavních pS/pT vazebných motivů existují ještě dva další, jeden obsahující terminální COOH a poslední motiv je příkladem na fosforylaci nezávislé interakce (viz níže). Navíc mohou proteiny 14-3-3 se svými vazebnými partnery interagovat mimo místo vazebného žlábků.

Vazebný motiv I. určuje sekvence aminokyselin **RSX(pS/pT)XP**, kde R značí aminokyselinu arginin, S značí aminokyselinu serin, X označuje libovolnou aminokyselinu (obvykle Leu, Glu, Ala, Met), pS značí fosforylovaný serin, pT značí fosforylovaný threonin a P označuje aminokyselinu prolin (Muslin, A. J. et al., 1996).

Vazebný motiv II. je určen konsensus sekvencí **RX(Y/F)X(pS/pT)XP**, kde R značí aminokyselinu arginin, X značí libovolnou aminokyselinu (obvykle Leu, Glu, Ala, Met), Y značí aminokyselinu tyrosin, F označuje aminokyselinu fenylalanin, pS značí fosforylovaný

serin, pT značí fosforylovaný threonin a P značí aminokyselinu prolin (*Yaffe, M. B. et al., 1997*).

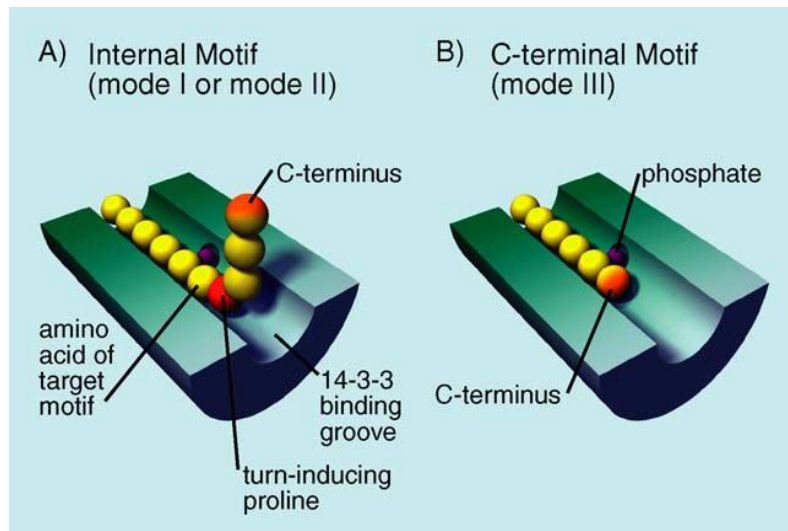
Ve vazebném motivu III. není obsažena aminokyselina prolin, ale terminální **COOH**. Do skupiny vazebného motivu III. můžeme zahrnout např. tyto vazebné partnery proteinů 14-3-3:

1) Arylalkylamin-N-acetyltransferasu (AANAT), enzym metabolické dráhy melatoninu, který je určen sekvencí *-RRNpSDR-COOH*. AANAT je fosforylována na T31. Tato fosforylace napomáhá vazbě AANAT s 14-3-3, a tím aktivuje AANAT. Fosforylace AANAT na T31 je součástí vazebného motivu I. AANAT je ovšem fosforylována ještě na S205. Vazba skrze pS205 je v porovnání s pT31 slabší a je součástí vazebného motivu III. AANAT tedy může interagovat skrze pT31 (vazebný motiv I.) s jednou monomerní jednotkou a pomocí pS205 s druhou monomerní jednotkou 14-3-3 dimeru (*Ganguly, S. et al., 2005*).

2) Rostlinnou H<sup>+</sup>ATPasu, určenou sekvencí *-QQXYpT<sub>948</sub>V-COOH* (*Svennelid, F. et al., 1999*). Mutace threoninu na aminokyselinu alanin ruší schopnost vazby s proteiny 14-3-3.

3) Iba podjednotku glykoproteinu Ib-IX-V, určenou sekvencí *-RYSGHSL-COOH* (*Andrews, R. K. et al., 1998*).

Všechny uvedené vazebné motivy obsahují C-terminální sekvenci, která funkčně nahrazuje smyčku, kterou jinak poskytuje prolin u vazebných motivů I. a II., ke zvýšení vazebných schopností (*Aitken, A. 2002, Obr. 7*). Vazebné sekvence enzymů AANAT a H<sup>+</sup>ATPasy obsahují pS/pT, zprostředkovávají tedy vazbu závislou na fosforylaci. Na základě těchto dat byla navržena sekvence vazebného motivu III. *-pS/pT(X<sub>1-2</sub>)-COOH*, kde pS/pT značí fosforylovaný serin/fosforylovaný threonin a X značí libovolnou aminokyselinu (*Ganguly, S. et al., 2005*).



**Obr. 7.:** Sekvence vazebného motívu I. a II. obsahuje aminokyselinu prolin, ktorá spôsobuje ohyb ligandu ven z vazebného žlábkú proteínu 14-3-3 C-koncovou časťou. **B:** -COOH skupina ligandu vazebného motívu III. sa nachádza uvnitř vazebného žlábkú (převzato z Coblitz, B. et al., 2006).

Vazebný motív IV. je príkladom interakcie, ktorá je nezávislá na fosforylácii. Tento motív bol odvoden od cytotoxínu ExoS s ADP-ribosyltransferasovou aktivitou z gramnegatívnej bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Zajímavosťou je, že nikoli C-terminálny koniec, ale N-terminálny koniec ExoS je vytočen z vazebného žlábkú (*Ottman, C. et al., 2007*). Do skupiny vazebného motívu IV. patrí napr. lidská telomerasa (hTERT) (*Seimiya, H., 2000*), enteropatogénický Tir proteín z *Escherichia coli* (*Patel, A., 2006*), amyloidný  $\beta$  proteín prekursor (*Sumioka A. et al., 2005*), a cytotoxín ExoS (*Masters, S. C. et al., 1999*). U vazebných motívů I. II. a III. prevažujú pri vazbe proteínu 14-3-3 s ligandem elektrostatické interakcie, zatiaľčo u vazebného motívu IV. interakcie hydrofóbné (*Ottman, C. et al., 2007*).

Do tých vyššie uvedených vazebných motívů nezařazujeme uměle nasyntetizovaný nefosforylovaný peptid R18. R18 (*PHCVPRDLSWLDLEANMCLP*) sa váže přes WLDLE sekvenci s vysokou afinitou do vazebného žlábkú proteínu 14-3-3. Skupina Petosy et al. (1998) studovala krystalovú štruktúru 14-3-3 $\zeta$  v komplexu se dvěma peptidovými ligandami – R18 a pSRaf-259 (fosfopeptid skládající se z reziduí 251-265 Raf-1). Pro vazbu pSRaf-259 (*LSQRQRSTpSTPNVHVMV*) se 14-3-3 jsou důležitá aminokyselinová residua Lys<sup>49</sup>, Arg<sup>56</sup>, Arg<sup>60</sup> a Arg<sup>127</sup> uvnitř vazebného žlábkú. Bylo zjištěno, že peptid R18 inhibuje vznik 14-3-3/Raf-1 komplexu, snižuje na Raf-1 závislou transkripční buněčnou aktivitu a brání aktivaci ExoS pomocí proteinů 14-3-3.

### 2.1.2.3 C-terminální konec

Struktura C-terminálního konce nebyla dosud identifikována na žádné z publikovaných krystalových struktur. Oblast C-terminálního konce je, na rozdíl od helikální oblasti  $\alpha 1 - \alpha 9$ , sekvenčně vysoce variabilní. Usuzuje se, že C-terminální konec je velmi flexibilní a může zaujmout řadu různých konformací.

Mezi jednotlivými isoformami proteinů 14-3-3 se C-terminální segment liší ve své primární struktuře a také délce. Rostlinné a kvasničné isoformy se vyznačují významně delším C-terminálním koncem než isoformy savčí (viz **Obr. 8**). Tato různorodost C-terminální části je považována za příčinu specifčnosti jednotlivých isoform.

```
1433z --MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKT---EG 71
BMH1 MSTSREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKTAVASSGQELSVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRIVSSIEQKEESKEK 76
BMH2 MSQTREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKAVASSGQELSVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRIVSSIEQKEESKEK 76

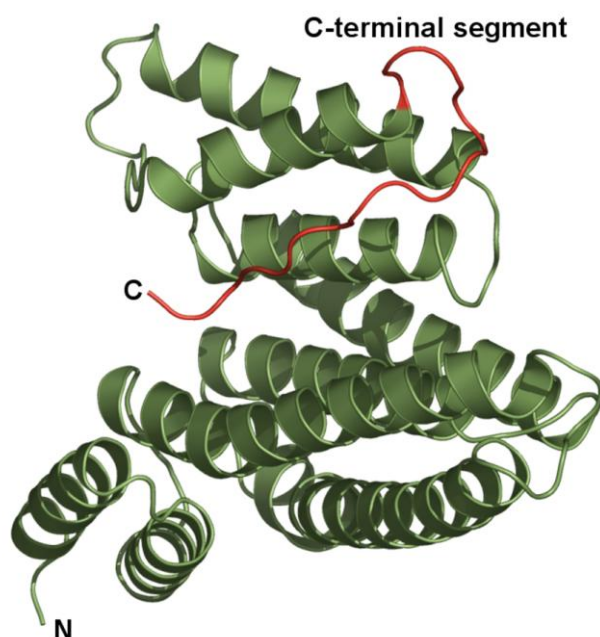
1433z AEKKQQMAREYREKIETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYKMKGDYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQ 147
BMH1 SEHQVELICSYRSKIETELTKISDDILSVLDShLIPsATTGESKVFYKMKGDYHRYLAEFSSGDAREKATNASLE 152
BMH2 SEHQVELIRSYRSKIETELTKISDDILSVLDShLIPsATTGESKVFYKMKGDYHRYLAEFSSGDAREKATNSLE 152

1433z AYQEAFFEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRD 223
BMH1 AYKTASEIATTELPPHPIRLGLALNFSVFYIEIQNSPKACHLAKQAFDDAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRD 228
BMH2 AYKTASEIATTELPPHPIRLGLALNFSVFYIEIQNSPKACHLAKQAFDDAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRD 228

1433z NLTTLWTSDTQGDEA-EAGEGGEN----- 245
BMH1 NLTTLWTS DMSESGQAEDQQQQQQHQQQQ-----PPAAAEGEAPK 267
BMH2 NLTTLWTS DISESGQEDQQQQQQQQQQQQQQQAPAEQTQGEPTK 273
```

**Obr. 8:** Sekvenční porovnání lidské isoformy 14-3-3 $\zeta$  s kvasničnými isoformami Bmh1 a Bmh2 bylo provedeno pomocí programu ClustalW (Thompson, J.D. et al., 1994).

Dřívější studie u savčích isoform naznačují, že oblast C-terminálního konce zastává důležitou autoinhibiční úlohu. V nepřítomnosti vazebného partnera proteinu 14-3-3 se C-terminální segment váže do vazebného žlábků tohoto proteinu, a tím zároveň brání vazbě nevhodných ligandů (**Obr. 9**). C-terminální konec většinou obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci negativně nabitě zbytky, které napodobují fosfát vazebného partnera. Vazba fosforylovaného ligandu vytěsňuje C-terminální konec z vazebného žlábků a tím se zvýší jeho pohyblivost. Odstranění C-koncového segmentu vedlo ke zvýšení vazebné afinity a zároveň snížení vazebné specifity proteinu 14-3-3 (Truong A. B. et al., 2002).



**Obr. 9:** *Stužková reprezentace monomerní jednotky lidské isoformy 14-3-3ζ (zeleně) s naznačeným C-terminálním segmentem (červeně) umístěným uvnitř vazebného žlábku (Veisova, D. et al., 2010).*

Savčí isoformy 14-3-3ζ a 14-3-3τ obsahují fosforylační místo na pozici Thr232. Toto místo se nachází právě v C-terminální části a může být fosforylováno jak *in vitro*, tak *in vivo* kaseinkinasou Ia (Dubios, T. et al., 1997). Předpokládá se, že fosforylace 14-3-3ζ a τ isoformem na Thr232 snižuje vazebnou afinitu proteinu 14-3-3. Fosforylace 14-3-3ζ na Thr232 způsobí konformační změnu C-terminálního konce, který je pravděpodobně odpovědný za pozorované snížení vazebné afinity pro peptid pRaf-259 a serotonin N-acetyltransferasu (AANAT) (Obsilova, V. et al., 2004).

### 2.1.3. Isoformy proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 byly objeveny v mozkové tkáni, proto byly původně považovány pro tuto tkáň za specifické. Postupem času bylo zjištěno, že jsou proteiny 14-3-3 přítomny i v jiných tkáních, a to nejen v savcích, ale vyskytují se ve všech eukaryotických organismech. U nižších eukaryotických organismů bylo pozorováno méně genů 14-3-3 v porovnání s vyššími eukaryoty - např. kvasničné organismy *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* obsahují dvě isoformy proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 resp.



Rad24 a Rad25, savci obsahují sedm isoform a v rostlinném modelovém organismu *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) bylo objeveno 13 isoform (Aitken, A., 2011).

### 2.1.3.1. Živočišné isoformy

V savčích buňkách bylo identifikováno sedm isoform proteinů 14-3-3, které se označují řeckými písmeny (**Obr. 4**). Prvních pět isoform bylo označeno podle pořadí frakce při eluci na HPLC -  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta/\delta$ ,  $\eta$ , přičemž formy  $\alpha$  a  $\delta$  jsou fosfoformy  $\beta$  a  $\zeta$ . 14-3-3 $\delta$  je 14-3-3 $\zeta$  isoforma fosforylovaná na Ser184. Tato fosforylace zvyšuje možnost proteinu 14-3-3 interagovat s PKC *in vitro* (Aitken, A. et al., 1995). Další dvě isoformy se označují  $\sigma$  a  $\tau$  ( $\tau$  je někdy též označovaná jako  $\theta$ ). Pojmenování isoformy  $\tau/\theta$  pochází z “T-buněk”, ve kterých se tato isoforma exprimuje. Isoforma  $\sigma$ , původně označovaná jako Stratifin, je tkáňově specifická, vyskytuje se v epitelálních buňkách a byla pojmenována v souladu s označením řeckými písmeny (Aitken, A., 2011). 14-3-3 $\sigma$  se výrazně odlišuje od ostatních lidských isoform svou neschopností tvořit heterodimery s ostatními isoformami (Wilker, E. W. et al., 2005).

### 2.1.3.2. Rostlinné isoformy

25 let od objevení proteinů 14-3-3 (1967, Moore a Perez) se předpokládalo, že se všechny proteiny 14-3-3 vyskytují pouze v mozkové tkáni a jsou pro tuto tkáň specifické. U zástupců rostlinné říše byl objeven nejvyšší počet isoform proteinů 14-3-3. Konkrétně u *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) je známo 13 isoform proteinů 14-3-3, ovšem *Arabidopsis thaliana* obsahuje 15 genů těchto proteinů. U *Hordeum vulgare* (ječmen) je známo pět isoform proteinů 14-3-3 označovaných velkými písmeny A, B, C, D, E (Aitken, A., 2006, Ferl, R. J. et al., 2002). Analýza konzervované oblasti vazebného žlábků ukazuje, že se rostlinné isoformy rozdělují do dvou skupin - skupina epsilon ( $\epsilon$ ) a skupina non-epsilon. Rostlinná skupina non-epsilon je vysoce odlišná od rostlinné epsilon skupiny a zvířecích isoform (Chung, H. J. et al., 1999). Skupina proteinů 14-3-3 *Arabidopsis*  $\epsilon$  (epsilon) zahrnuje pět členů:  $\mu$ ,  $\epsilon$  (tyto dvě formy se vyskytují v chloroplastech, granulích škrobu),  $\pi$ ,  $\iota$  a  $\omicron$ . Skupina non-epsilon obsahuje osm členů:  $\kappa$  (výskyt v plazmatické membráně),  $\lambda$ ,  $\psi$ ,  $\nu$  (výskyt v chloroplastech),  $\upsilon$  (výskyt v cytosolu, chloroplastech),  $\omega$ ,  $\phi$  a  $\chi$  (Ferl, R. J. et al., 2002).

### 2.1.3.3. Kvasničné isoformy

Nejlépe prostudované kvasničné proteiny 14-3-3 pochází z pekařského droždí, z organismu *Saccharomyces cerevisiae*. BMH1 gen byl objeven shodou okolností v letech 1991/1992 během klonování sousedního genu (*van Heusden, G.P.H. et al., 1992*). V kvasničném organismu *Saccharomyces cerevisiae* byly objeveny dvě isoformy proteinů 14-3-3 označované jako Bmh1, Bmh2. Toto označení pochází z angl. **B**rain **M**odulosignalin **H**omologue díky vysoké podobnosti s proteiny 14-3-3 mozkové tkáně. Proteiny Bmh1 a Bmh2 jsou z více než 60 % identické s lidskou 14-3-3 $\epsilon$  isoformou, přičemž Bmh1 isoforma je identická z 91 % a Bmh2 isoforma je z 97 % identická k  $\epsilon$  isoformě v pořadí prvních 250 aminokyselinových zbytků. Z toho pravděpodobně vyplývá, že rozdílná funkce proteinů 14-3-3 je způsobena v odlišném C-terminálním segmentu. C-terminální segment kvasničných isoform je v porovnání s lidskými isoformami významně delší a obsahuje tzv. polyglutaminový (polyQ) segment. Funkce C-terminálního segmentu není dosud známa. Je pravděpodobné, že C-terminální segment je důležitý např. při regulaci vezikulárního transportu (*Gelperin, D. et al., 1995*). První část práce se zabývá studiem konformace C-koncového segmentu a vlivu odstranění C-koncového segmentu na vazebnou afinitu proteinů 14-3-3 (*Veisova, D. et al., 2010*).

Pokusy provedené v *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*, z nichž oba organismy obsahují dva 14-3-3 geny, ukazují, že jsou proteiny 14-3-3 nezbytné pro životaschopnost buňky. Vyřazení obou genů (knock out) u kvasinek je neslučitelné se životem buňky, ačkoli vyřazení pouze jednoho genu mělo minimální následky a buňka byla plně funkční. To naznačuje, že obě kvasničné isoformy projevují podobné funkční vlastnosti, které vycházejí z vysokého stupně konzervovanosti obou molekul (*van Hemert, M.J., 2001*).

### 2.1.4. Funkce proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 zastávají klíčové role v rozmanitých buněčných procesech, jako jsou buněčná signalizace, růst, dělení a diferenciaci, regulují proces apoptozy atd. I když přesná úloha proteinů 14-3-3 není zcela známá, můžeme definovat některé základní mechanismy interakce proteinů 14-3-3 s jejich vazebnými partnery (viz níže). První biochemickou funkcí proteinů 14-3-3, která byla identifikována, je aktivace tyrosin a tryptofan hydroxylasy v reakci vyžadující vápník, cAMP dependentní kinasu nebo kalmodulin dependentní proteinkinasu II (*Ferl, R.J. et al., 2002*).



Interakce proteinů 14-3-3 s jejich vazebnými partnery můžeme rozdělit do čtyř kategorií:

a) Vazba proteinu 14-3-3 s jeho vazebným partnerem může změnit konformaci vazebného proteinu a tím i ovlivnit jeho funkci. V případě, že vazebným partnerem je enzym, může dojít ke zvýšení (vazba proteinu 14-3-3 aktivuje serotonin-N-acetyltransferasu (*Obsil, T. et al., 2001*) nebo snížení (kdy vazba proteinu 14-3-3 inhibuje nitratreduktasu) (*Schoonheim, P. J. et al., 2007*) jeho katalytické aktivity.

b) Dimerní forma proteinů 14-3-3 obsahuje dvě vazebná místa pro ligandy. Tímto se může zprostředkovat kontakt dvou molekul a protein 14-3-3 může sloužit jako tzv. adaptorový protein. Příkladem může být kontakt Raf-1 kinasy a proteinkinasy PKC- $\zeta$ . PKC- $\zeta$  fosforyluje a aktivuje Raf-1 kinasu. Tato interakce je zprostředkována pomocí  $\beta$  a  $\theta$  isoform proteinů 14-3-3 *in vitro* i *in vivo* (*van der Hoeven, P.C.J. et al., 2000*). Dalším příkladem potenciální úlohy dimeru 14-3-3 sloužícího jako adaptorový protein je interakce 14-3-3 s  $H^+$ -ATPasou a rostlinným toxinem fusicoccinem. 14-3-3 váže C-terminální část  $H^+$ -ATPasy za přítomnosti  $Mg^{2+}$  a tím dojde k vytvoření vazebného místa pro toxin fusicoccin a k následné interakci (*Ferl, R.J. et al., 2002*).

c) Proteiny 14-3-3 mohou regulovat buněčnou lokalizaci vazebného partnera tím, že zakryjí nebo odkryjí jeho jadernou signální sekvenci. Příkladem může být regulace pohybu FOXO transkripčních faktorů mezi cytoplasmou a jádrem (*van Der Heide, L.P. et al., 2004*).

d) Proteiny 14-3-3 ve vazbě s jejich vazebnými partnery mohou zabránit defosforylaci a degradaci těchto vazebných partnerů (*Ganguly, S. et al., 2001*).

### **2.1.5. Význam a vazební partneři proteinů 14-3-3**

Jak již bylo popsáno výše, proteiny 14-3-3 interagují s vysokým počtem vazebných partnerů, ovlivňují jejich funkce a tím se účastní mnoha rozmanitých buněčných dějů. Příklady některých významných interakcí a dějů, které proteiny 14-3-3 regulují, jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

### 2.1.5.1. Význam proteinů 14-3-3 při regulaci buněčného cyklu

Proteiny 14-3-3 regulují buněčný cyklus v těchto pochodech: přechod z G1 do S fáze a přechod z G2 do M fáze buněčného cyklu.

Při přechodu z G1 do S fáze (syntetická fáze, ve které dochází ke zdvojování chromozomů) se proteiny 14-3-3 váží a negativně regulují CDC25A fosfatasy, která je rovněž zahrnuta v regulaci CDK komplexů, které jsou potřebné pro vstup do S fáze. CDC25A defosforyluje CDK2 na pozicích Thr-14 a Thr-15. Navíc 14-3-3 interaguje s CDK2 a CDK4 kinasami pravděpodobně skrze vazbu nezávislou na fosforylaci. Pokud se naváže CDC25A s proteiny 14-3-3, dojde k jejímu rozpadu v cytoplazmě. 14-3-3 $\sigma$  brání inaktivaci CDK komplexu pokračování buněčného cyklu u buněk rakoviny prsu.

Přechod z G2 do M fáze zajišťuje u savčích buněk aktivace proteinkinasy CDC2 defosforylací. Během S fáze a po procesu poškození DNA je aktivita CDC2 potlačena fosforylací WEE1 a MZT/MIK1 kinasami na pozicích Thr-14 a Thr-15. Fosfatasa CDC25C defosforyluje tato threoninová residua, což vede k aktivaci CDC2 a iniciaci vstupu do mitotické fáze. Proteiny 14-3-3 mohou zabránit vstupu do mitotické fáze vazbou s fosforylovanou CDC25C a tím ji deaktivují. Pokud dojde k poškození DNA a proteiny 14-3-3 nemohou interagovat s CDC25C, vstupuje buňka do mitotické fáze i s poškozenou DNA.

Po poškození DNA dochází ke zvýšené expresi 14-3-3 $\sigma$ , která inaktivuje CDC2 a brání vstupu do mitotické fáze ovlivněním lokalizace CDC2 (14-3-3 zamezí CDC2 vstup do jádra) (*Hermeking, H., Benziger, A., 2006*).

### 2.1.5.2 Význam proteinů 14-3-3 ve vnitrobuněčné signalizaci a diferenciaci

Nejlépe prostudovaná úloha proteinů 14-3-3 v regulaci enzymové aktivity je regulace Raf1 (serin/threoninová kinasa, označovaná též jako MAP z angl. **M**itogen **A**ctivated **P**rotein), která se významně podílí na procesech buněčného růstu, diferenciaci a onkogenetické transformace (*Fantl, W. J. et al. 1994*).

Bylo prokázáno, že proteiny 14-3-3 dokáží stimulovat rychlou změnu stavu Raf1 mezi neaktivní a aktivní formou (*Yip-Schneider, M. T. et al., 2000*) a zprostředkovávají vazbu Raf1 s ostatními proteiny, které ji aktivují, jako je Bcr, PKC a KSR (z angl. Kinase Suppressor of Ras) (*Braselmann, S., McCormick, F., 1995, Xing, H. et al., 1997*). Raf1 fosforyluje MEK, což má za následek stimulaci MAPK. Mutace N-terminální části 14-3-3, kde se nachází

vazebné místo pro Raf1, má za následek neschopnost aktivace MEK dráhy a tím ovlivnění buněčné diferenciaci (*Dhillon, A.S. et al., 2003*).

Význam Raf1 signální dráhy pro neuronální diferenciaci a normální funkci CNS byl studován u myši mozkové tkáně. U poškozených neuronů se předpokládá, že aktivace Raf1 se může účastnit nervové regenerace (*Namikawa, K. et al., 1998*).

### **2.1.5.3. Význam proteinů 14-3-3 při apoptóze**

*Arachidonová kyselina* - interakce 14-3-3 $\zeta$  s vyšší mastnou kyselinou, kyselinou arachidonovou, může způsobit snížení vazebné afinity 14-3-3 $\zeta$  s fosforylovaným ligandem BAD. Interakce 14-3-3 $\zeta$  s BAD je důležitá při regulaci apoptozy (*Yang H, et al. 2001*). Uvolnění proteinu 14-3-3 z komplexu 14-3-3/BAD vede k defosforylaci BAD proteinfosfatasou 2A, což umožňuje přechod BAD z cytoplasmy do mitochondrie, kde může nahradit Bax z Bcl-xL (*Chiang, C. W. et al., 2003, Zha, J. et al. 1996*). Tento pochod vede k apoptóze. Zjednodušeně BAD, jako pro-apoptický protein zapříčiňuje apoptózu interakcí s anti-apoptickými proteiny, jako jsou Bcl-2 a Bcl-x a tím je inaktivuje. Překvapivě může také interakce proteinu 14-3-3 s BAD podněcovat buněčný růst (*Maslyar, D. J. et al., 2001*). To naznačuje, že protein-proteinová interakce 14-3-3/BAD může fungovat jako přepínač mezi buněčnou proliferací a buněčnou smrtí. Vysoké koncentrace arachidonové kyseliny mohou způsobovat polymeraci 14-3-3 $\zeta$  isoformem pozorované u některých neurodegenerativních onemocnění (*Brock, T. G. 2008*).

### **2.1.5.4. Význam proteinů 14-3-3 v procesu rakoviny**

Potenciální úloha proteinů 14-3-3 v rakovinném procesu naznačuje jejich schopnost interagovat a regulovat různé produkty onkogenů a tumor supresorových genů. Bylo zjištěno, že proteiny 14-3-3 mohou vázat a regulovat některé onkogenní proteiny jako jsou např. Raf, Bcr a Bcr-Abl, proteiny zahrnuté v regulaci apoptózy a přežití buňky, Bad, Bax, ASK-1 a tumor supresorové proteiny, jako jsou p53, TSC2 a p27, proteiny regulující buněčný cyklus – Cdc25 A, B a C, Wee1, Chk1 (*Tzivion, G. et al. 2006*).

Dalším příkladem může být interakce proteinu 14-3-3 s protoonkogenem Cbl, který umožňuje přenos signálu z tyrosinkinasy spojených s receptory. Proteiny 14-3-3 váží Cbl skrze definovaný fosforylovaný motiv (*Liu, Y. et al., 1999*). Tato vazba inhibuje na Cbl fosforylaci

tyrosinu, což má za následek blokáce místa pro přenos signálu z T-buněčného receptoru a proto i aktivaci Cbl (*Tzivion, G. et al. 2006*).

#### 2.1.5.5. Význam proteinů 14-3-3 v procesech neurodegenerativních onemocnění

Proteiny 14-3-3 byly zjištěny v cerebrospinálním moku (mozkomíšni mok) u různých neurodegenerativních onemocnění, jakým je např. **Creutzfeldt-Jakobova (CJN)** nebo **Alzheimerova choroba (AD)**. Proteiny 14-3-3 jsou spojovány např. i s **Parkinsonovou chorobou (PD)** díky jejich výskytu, vazebným partnerům a neuroprotektivní funkci.

Význam proteinů 14-3-3 v kontextu k CJN je široce diskutován. CJN je nejčastějším lidským prionovým onemocněním, které je smrtelné a jeho znakem je nahromadění patogenního prionového proteinu PrP<sup>Sc</sup> (Sc je odvozeno od slova Scrapie), projevy degenerace neuronů a houbovitě změny mozku. Protein PrP<sup>c</sup> se fyziologicky nachází v neuronech a liší se od PrP<sup>Sc</sup> prostorovým uspořádáním. Přeměna PrP<sup>c</sup> na PrP<sup>Sc</sup> může být spontánní nebo způsobena mutací. Vedle klinického vyšetření se provádí ještě další vyšetření při podezření na CJN, kde se mimo jiné stanovuje i průkaz proteinu 14-3-3 v likvoru. V cerebrospinálním moku se u pacientů s CJN nachází isoformy  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  a  $\eta$ . (*Frankova, V., Krausova, M., 2008, Berg, D. et al. 2003*).

Alzheimerova choroba je patologicky charakterizována vznikem neuritických (senilních) plaků a neuronálních klubek. Za fyziologických podmínek je amyloidový prekurzorový protein APP štěpen  $\alpha$ -sekretasou, její produktem je rozpustný APP $\alpha$ , který má neuroprotektivní charakter. Za patologických podmínek je APP štěpen nejprve  $\beta$ -sekretasou a poté  $\gamma$ -sekretasou. Produkty štěpení jsou  $\beta$ -amyloidy, které již nejsou rozpustné a po agregaci vytváří jádra neuritických plaků. V případě  $\tau$ -proteinu se za patologických podmínek tento protein nadměrně fosforyluje a agreguje, což má za následek vznik neuronálních klubek, zánik neuronů a demenci. Za fyziologických podmínek se  $\tau$ -protein účastní výstavby mikrotubulů (*Koudelkova, M., 2010*).

$\tau$ -protein obsahuje nejméně dvě vazebná místa pro proteiny 14-3-3. První vazebné místo se nachází na N-terminální doméně a obsahuje Ser214, který je rozhodující pro vazbu závislou na fosforylaci pomocí PKA/PKB. Druhé vazebné místo se nachází na C-terminální doméně a vazba zprostředkovaná skrze toto místo je na fosforylaci nezávislá. Bylo zjištěno, že proteiny 14-3-3 váží nefosforylované  $\tau$ -proteiny (*Hashiguchi et al. 2000*) a podporují jejich agregaci (*Hernandez et al. 2004*). Pokud jsou  $\tau$ -proteiny fosforylovány na Ser214 pomocí PKA nebo PKB, zvýší se jejich vazebná afinita k proteinům 14-3-3 12-14x. Tento pochod ruší

původní agregaci  $\tau$ -proteinů vyvolanou pomocí proteinů 14-3-3. Shrnuto dohromady tyto studie naznačují, že proteiny 14-3-3 prostřednictvím vazby závislé na fosforylaci na Ser214 mění konformaci  $\tau$ -proteinů a slouží k zachování  $\tau$ -proteinů v neagregovaném stavu. Tato interakce má veliký fyziologický a patologický význam, nicméně není hlavní a jedinou příčinou neagregovaných stavů  $\tau$ -proteinů. V mozkové tkáni u Alzheimerovy choroby se především zvýší exprese 14-3-3 isoform  $\gamma$  a  $\epsilon$ , isoforma 14-3-3 $\zeta$  se nachází zejména v neuronálních klubkách a isoforma 14-3-3 $\eta$  je komponentou neuritických plaků (*Sadik, G., et al. 2009, Gajofatto, A., et al. 2011*).

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy charakterizované přítomností Lewyho tělísek a úbytkem nervových buněk v části mozku *substantia nigra pars compacta (SNc)* produkujících za normálních podmínek neurotransmiter dopamin. Lewyho tělíška jsou abnormální proteinové agregáty uvnitř nervových buněk s hlavní složkou  $\alpha$ -synukleinem. Mnohé studie dokazují přítomnost čtyř lidských isoform proteinů 14-3-3 ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ) v Lewyho tělíškách (*Berg, D. et al. 2003*). Navíc, 14-3-3 $\zeta$  isoforma interaguje a aktivuje tyrosinhydroxylasu (TH), enzym dopaminové syntézy.  $\alpha$ -synuklein interaguje jak s proteiny 14-3-3, tak může vázat i TH a snižovat její aktivitu. Proto může být interakce těchto tří proteinů významná v regulaci dopaminové syntézy u PD. Neuroprotektivní funkci vykazují isoformy  $\theta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ . Tyto isoformy snižují toxicitu indukovanou neurotoxiny způsobující buněčnou smrt dopaminergních buněk (*Foote, M., Zhou, Y. 2012*).

#### **2.1.5.6. Enzym neutrální trehalasa 1 jako vazebný partner proteinů 14-3-3**

V roce 2008 publikovala skupina L. Castagnoli (*Panni, S. et al., 2008*) studii, že kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů Bmh1 a Bmh2 tvoří komplex s neutrální trehalasou 1 (Nth1). Nth1 je enzym odpovědný za degradaci neredukujícího disacharidu trehalosy a je také vyžadován při nejrůznějších stresových podmínkách. V systému *in vitro* jsou obě kvasničné isoformy (Bmh1 a Bmh2) nezbytné pro plnou aktivitu Nth1 po fosforylaci pomocí PKA. Bmh1 a Bmh2 interagují s N-terminální částí fosforylované neutrální trehalasy 1 a prostřednictvím této vazby ovlivňují její funkci.

## 2.2. Neutrální trehalasa 1

### 2.2.1. Historický přehled trehalas

Neredukující disacharid trehalosa (1- $\alpha$ -D-glukopyranosyl  $\alpha$ -Dglukopyranosid) vyskytující se jako hlavní cukerná složka hemolymfy hmyzu (Wyatt, G.R., Kale, G.F. 1957) objevený roku 1832 Wiggersem v námelu žita (Wiggers, H.A.L., 1832) je hlavní zásobní disacharid kvasinek. Přítomnost trehalosy v kvasničním organismu byla poprvé popsána Kochem a Kochem (Koch, E.M., Koch, F.C., 1925) a Tanretem (Tanret, M.G. 1932). Enzym odpovědný za hydrolýzu trehalosy byl objeven roku 1893 Bourquelotem (Bourquelot, E., 1893) v organismu *Aspergillus niger*. Následně byla trehalasová aktivita nalezena v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Fischer, E., 1895), houbách (Iwanoff, N. N., 1925), bakteriích (Bloch, H., Süllmann, H., 1945), bezobratlých, rybách i savcích (Willstaedt, H., Borggard, M., 1946). U savců byla trehalasa objevena v ledvinách (Yoneyama, Y., Lever, J.E., 1987) a buňkách střevní sliznice (Dahlqvist, A. 1968). V roce 1982 publikovala skupina A. Wiemkena (Keller, F. et al., 1982) studii, že trehalasa stimulující se fosfátem je lokalizována v cytosolu a že je v buňce přítomna ještě jedna, trvale aktivní trehalasa vyskytující se ve vakuolách. Londensborough a Varino určili pH optima těchto dvou enzymů. Fosforylovatelný enzym, který se nachází v cytosolu, je určen maximální aktivitou při pH optimu 7, a proto byl nazván *neutrální trehalasou*. Aktivita enzymu vyskytujícího se ve vakuolách je maximální při pH 4,5, a proto nese označení *kyselá trehalasa* (Londensborough, J., Varimo, K., 1984). Neutrální trehalasa je aktivována pomocí cAMP, ATP, Mg<sup>2+</sup> (Londensborough, J., Varimo, K., 1984, App, H., Holzer, H., 1989). V roce 1994 byl objeven a popsán gen NTH2 (YBR0106) (Wolfe, K.H., Lohan, A.J.E., 1994) kódující neutrální trehalasu 2 (Nth2), jehož funkce zatím není zcela známa. V roce 1999 skupina J. M. Theveleina publikovala výsledky demonstrující, že za efektivní zotavení kvasničných buněk z teplotního šoku je trehalasová aktivita Nth1 (Wera, S. et al., 1999). V roce 2003 bylo prokázáno, že aktivace Nth1 u kvasničního organismu *Schizosaccharomyces pombe* je závislá na vazbě Ca<sup>2+</sup> skrze konzervovaný Ca<sup>2+</sup> vazebný motiv, který se také vyskytuje u Nth1 organismu *Saccharomyces cerevisiae* (Franco, A. et al., 2003). V roce 2008 bylo zjištěno (Panni, S. et al., 2008), že kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 tvoří stabilní komplex s neutrální trehalasou 1 (Nth1) a zvyšují její aktivitu.

### 2.2.2. Trehalasové isoformy

V kvasničném organismu *Saccharomyces cerevisiae* byly nalezeny tři trehalasové isoformy:

- neutrální trehalasa 1 (Nth1) kódovaná genem NTH1 s úsekem otevřeného čtecího rámce 2253 bp odpovídající proteinové molekule o relativní molekulové hmotnosti 86 tisíc (App H, Holzer H., 1989). Enzym neutrální trehalasa 1 se nachází v cytosolu a je zodpovědný za hydrolýzu intracelulární trehalosy a je nezbytný pro účinné zotavení se po teplotním šoku (Wera, S. et al., 1999). pH optimum Nth1 je 6.8-7.0 (Londensborough, J., Varimo, K., 1984, App, H., Holzer, H., 1989). Deleceí NTH1 genu dochází ke ztrátě trehalasové aktivity, k vyšším hodnotám koncentrace trehalosy ve fázi exponenciálního růstu, stresujícím podmínkám způsobenými vysokými teplotami a neschopnosti hydrolyzovat trehalosu, která buňce napomáhá při „zotavení se“ po teplotním stresu (Kopp, M. et al., 1993).
- neutrální trehalasa 2 (Nth2) kódovaná genem NTH2 je ze 77 % identická svou aminokyselinovou sekvencí k Nth1. Delece NTH2 genu nezpůsobuje změny v trehalasové aktivitě (Nwaka, S. et al. 1995).
- kyselá trehalasa 1 (Ath1) kódovaná genem ATH1 se nachází ve vakuolách. Ath1 nevykazuje žádnou sekvenční podobnost s Nth1. Ath1 je nezbytná při zotavení buňky po teplotním šoku a pro růst kvasničných buněk na médiu obsahující trehalosu jako jediný zdroj uhlíku (Destruelle et al., 1995, Nwaka et al., 1996). Ath1 hydrolyzuje extracelulární trehalosu a může zprostředkovávat transport extracelulární trehalosy do buňky. pH optimum kyselých trehalas se pohybuje v rozmezí 4.5-5.0.

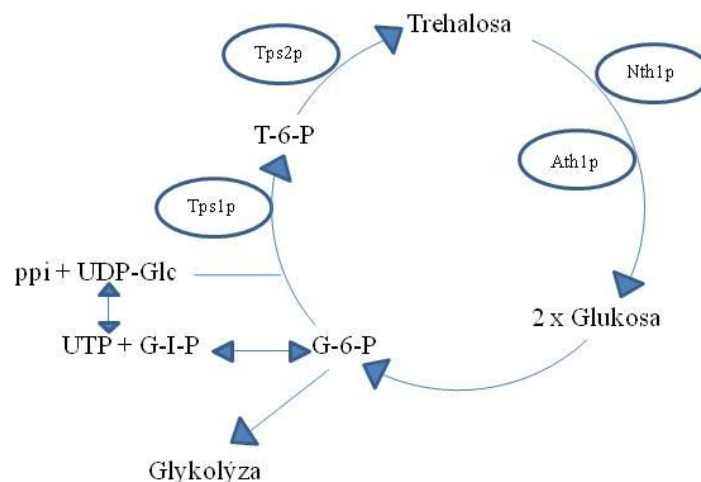
### 2.2.3. Trehalasová funkce

Neredukující disacharid trehalosa je v buňce nahromaděn jako přirozená odpověď na stresové situace, jako jsou teplotní výkyvy, dehydratace, změny tlaku, působení toxických látek aj. Biologická funkce trehalas spočívá v kontrole koncentrace nahromaděné trehalosy degradací na glukosové jednotky. Neutrální trehalasa 1 je zodpovědná za intracelulární

degradaci trehalosy, na rozdíl od kyselé isoformy Ath1, která využívá extracelulární trehalosy (Nwaka, S., Holzer, H. 1998).

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mohou trehalosu jak syntetizovat, tak degradovat v závislosti na vnějších podmínkách a fázi životního cyklu. Díky těmto pochodům může být trehalosa přítomna v buňce v množství menším než 1 % nebo větším než 23 % hmotnosti sušiny (Kuenzi, M.T., Fiechter, A., 1969, Kuenzi, M.T., Fiechter, A., 1972). Tato rozdílná množství trehalosy napovídají, že neredukující disacharid trehalosa hraje velmi důležitou roli v životním cyklu kvasinek, mimo jiné jako např. zásoba uhlíku a energie hladovějících buněk (Chester, V.E, 1963), stresový faktor (Nwaka, S., Holzer, H., 1998) a faktor stabilizující proteiny a membrány v nativním stavu a snižuje schopnost proteinové agregace (Crowe, J.H. et al, 1984, Wiemken, A., 1990, Singer, M.A., Lindquist, S., 1998 ).

Biosyntéza trehalosy je katalyzována enzymy trehalosa-6-fosfát-syntasou (Tsp1p, kódováno TSP1 genem) a trehalosa-6-fosfát fosfatasou (Tsp2p, kódováno genem TSP2) tvořícími tzv. trehalosa syntázový komplex využívající UDP-glukosu a glukosa-6-fosfát jako substráty (**Obr. 10**). Hydrolýza trehalosy je katalyzována neutrální trehalasou 1, (Nth1 kódováno genem NTH1), neutrální trehalasou 2 (Nth2, kódováno genem NTH2), a kyselou trehalasou 1 (Ath1) (Nwaka, S., Holzer, H. 1998).

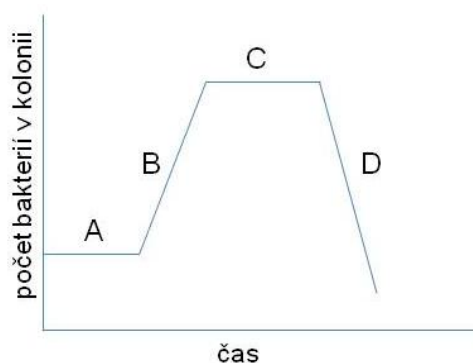


**Obr. 10.:** Metabolismus trehalosy u *Saccharomyces cerevisiae*. Enzymy neutrální trehalasa 1 (Nth1p) a kyselá trehalasa 1 (Ath1p) se účastní hydrolýzy trehalosy na dvě molekuly glukosy. Biosyntéza trehalosy probíhá následovně: Trehalosa-6-fosfát syntasa (Tps1p; UDP-glukosa:D-glukosa-6-fosfát 1–glukosyltransferasa) přenáší UDP-glukosu (UDP-Glc) na



Glukosa-6-fosfát (G-6-P) za vzniku trehalosa-6-fosfátu (T-6-P). Následuje odštěpení fosfátové skupiny specifickou fosfátasou Trehalosa-6-fosfát fosfohydrolasou (Tsp2p) za vzniku trehalosy (Bell, W. et al., 1992). Tento proces byl poprvé popsán roku 1958 Cabibem a Leloirem. Převzato z (Nwaka, S., Holzer, H. 1998).

Exponenciální fáze růstu kvasničných buněk na médiu obsahující glukosu nebo jiný fermentovatelný zdroj (jako je např. fruktosa nebo galaktosa) vykazuje velice nízkou koncentraci trehalosy (okolo 0,1-0,5 mM) a bazální aktivitu syntetizujících a hydrolyzujících enzymů trehalosy (Nwaka, S., Holzer, H. 1998). Pokud dojde ke spotřebování glukosy jako zdroje uhlíku, začne koncentrace trehalosy prudce narůstat (okolo 25 mM) (Kienle, I. et al., 1993) do doby stacionární fáze. Na rozdíl od medií obsahujících fermentovatelný zdroj uhlíku, buňky rostoucí na nefermentovatelných médiích, jako je glycerol, ethanol a acetát, vykazují vysoké koncentrace trehalosy jak v exponenciální, tak ve stacionární fázi způsobené nutričním stresem (Nwaka, S., Holzer, H., 1998, Elliot, B., Fuchter, B., 1993, Van Dijck, P., 1995). Růstová křivka bakteriální populace obsahující klidovou, exponenciální, stacionární fázi a fázi odumírání buněk naznačuje **Obr. 11.** V pokusech *in vivo* se spouští fosforylační dráha cAMP-PKA (buněk rostoucích na nefermentovatelném médiu) přidavkem glukosy. Po tomto glukosovém přidavku okamžitě vzrůstá trehalosová aktivita (Thevelein, J.M., de Winde, J.H., 1999).



**Obr. 11.:** Růstová křivka bakteriální populace. Fáze A – klidová fáze, nebo lag fáze. Bakterie se připravují na růst a množení v novém prostředí. B – exponenciální fáze, log fáze. Dochází k exponenciálnímu množení bakterií, dokud nejsou vyčerpány živiny. C – stacionární fáze. Dochází ke zpomalení množení buněk. V poslední fázi, D – fáze odumírání, dochází k převaze odumřelých buněk nad buňkami živými (Rosypal, S., 2003).

Akumulace neredukujícího disacharidu trehalosy a odolnost buněk vůči stresovému prostředí naznačuje, že hlavní funkce trehalosy není zásobní, ale funguje jako faktor, který chrání buňku před nepříznivými okolními vlivy (*Wiemken, A., 1974, Van Laare, A., 1989*).

U obratlovců, včetně lidí, byla trehalasa objevena v renálním proximálním tubulu, a proto může být použita jako diagnostický marker některých onemocnění ledvin, při kterých se tento enzym vyskytuje v moči (*Niwa, T. et al., 1993*).

#### 2.2.4. Fosforylační místa enzymu neutrální trehalasy 1

Porovnání aminokyselinových sekvencí u různých organismů naznačuje, že trehalasové enzymy *Saccharomyces cerevisiae* a *Kluyveromyces lactis* obsahují, na rozdíl od ostatních organismů, významně delší N-terminální konec (*Nwaka, S., Holzer, H. 1998*). Podle dosavadních studií vyplývá, že oblast N-terminálního konce obsahuje několik PKA fosforylačních míst a hraje důležitou roli v regulaci enzymu kvasničné neutrální trehalasy.

Podle studií z let 1993-1994 obsahuje N-terminální oblast Nth1 a Nth2 dvě cAMP-závislá fosforylační místa ve svých aminokyselinových sekvencích. Jedná se o Arg<sup>17</sup>ArgLysSer<sup>20</sup> s fosforylovatelným Ser<sup>20</sup> a Arg<sup>80</sup>ArgGlySer<sup>83</sup> s fosforylovatelným Ser<sup>83</sup> v případě Nth1 a o Arg<sup>49</sup>ArgLysSer<sup>52</sup> a Arg<sup>109</sup>ArgGlySer<sup>112</sup> u Nth2 (*Rittenhouse, J. et al., 1986, Kopp, M. et al., 1993, Kopp, M. et al., 1994*).

Skupina Theveleina et al. publikovala v roce 1999 studii, že aktivace neutrální trehalasy 1 organismu *Saccharomyces cerevisiae*, která obsahuje 17 potenciálních fosforylačních míst, je zprostředkována pomocí více než jednoho fosforylačního místa – Ser20, Ser21 a Ser83 (*Wera, S. et al., 1999*). Fosfoproteomová analýza buněčného lysátu naznačuje, že fosforylační místa důležitá pro aktivaci Nth1 *in vivo* jsou Ser21, Ser23 a Ser83 (*Ficarro, S.B. et al., 2002*), přičemž se spekuluje, že fosforylační místo Ser23 může být fosforylováno odlišnou proteinkinasou než PKA.

V roce 2003 bylo prokázáno (*Franco A. et al., 2003*), že aktivace Nth1 u *Schizosaccharomyces pombe* je závislá na vazbě Ca<sup>2+</sup> skrze konzervovaný Ca<sup>2+</sup> vazebný motiv, který se také vyskytuje u Nth1 *Saccharomyces cerevisiae*.

Skupina (*Panni, S. et al., 2008*) v roce 2008 zjistila, že proteiny 14-3-3 interagují s Nth1 a navíc zvyšují její aktivitu. Z jejich studie krátkých syntetických fosfopeptidů obsahujících fosforylační místa 21 (QRRLS<sup>21</sup>LSEFN), 23 (RLSSLs<sup>23</sup>EFNDP) a 83 (QTRRGs<sup>83</sup>EDDTY) vyplývá, že pro vazbu s proteiny 14-3-3 jsou důležitá fosforylační místa Ser21 a Ser23, nikoli Ser83.

Naše skupina se ve druhé části práce zabývala studiem fosforylačních míst enzymu neutrální trehalasy 1 vhodných pro vazbu s kvasničnými proteiny 14-3-3. Publikace „*Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1*: Veisova, D., Macakova, E., Rezabkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., Obsilova, V. (2012), *Biochemical Journal* **443**(3), 663-670“ jsou přílohou v kapitole 13.

### 3. Cíle práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo objasnit faktory ovlivňující vazebnou specifitu proteinů 14-3-3. Část práce **A** se zabývá studiem vlastností C-koncového segmentu kvasničných isoform proteinů 14-3-3, ke kterému byly použity techniky fluorescenční spektroskopie, dynamického rozptylu světla, sedimentační analýzy, cirkulárního dichroismu a gelové permeační chromatografie. Část **B** se zabývá regulací aktivity enzymu neutrální trehalasy pomocí kvasničných isoform proteinů 14-3-3 *in vitro* a *in vivo*. K tomu byly použity techniky bodové mutagenese, kinetická měření a sedimentační analýza.

Konkrétní cíle práce:

**A.** Objasnění konformace C-koncového segmentu a oligomerního stavu kvasničných isoform proteinů 14-3-3:

- Jaký je oligomerní stav a velikost molekul proteinů Bmh?
- Jaký vliv má odstranění C-koncového segmentu na vazebnou afinitu proteinů Bmh?
- Jak ovlivňuje vazba fosforylovaného peptidu mobilitu C-koncového segmentu proteinů Bmh?

**B.** Regulace enzymové aktivity kvasničného enzymu neutrální trehalasy 1 pomocí kvasničných isoform proteinů 14-3-3:

- Identifikace fosforylačních míst enzymu neutrální trehalasy vhodných pro vazbu s kvasničnými proteiny 14-3-3 *in vitro*.
- Kinetické studie mutantních forem enzymu neutrální trehalasy pro stanovení nejdůležitějších fosforylačních míst neutrální trehalasy pro regulaci její aktivity pomocí kvasničných isoform 14-3-3 proteinů.
- Jaká je stechiometrie vazby kvasničných isoform proteinů 14-3-3 s neutrální trehalasou?
- Jaká je aktivace enzymu neutrální trehalasy v závislosti na  $\text{Ca}^{2+}$ ?
- Regulace enzymové aktivity enzymu neutrální trehalasy pomocí kvasničných proteinů 14-3-3 v organismu *Saccharomyces cerevisiae* *in vivo* a porovnání efektivity fosforylačních míst *in vivo* versus *in vitro*.

## 4. Použitý materiál

### 4.1. Chemikálie

agarosa - Carl Roth GmbH, Německo

akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo

ampicilin - Sigma, USA

bacto trypton (pepton) - Carl Roth GmbH, Německo

bacto yeast extract (kvasničný extrakt) - Carl Roth GmbH, Německo

boritá kyselina – Lachema a.s., Neratovice, ČR

bis-akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo

bromfenolová modř - Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250 - Lachema a.s, Neratovice, ČR

dihydrogenfosforečnan draselný - Lachema a.s, Neratovice, ČR

DTT (dithiotreitol) - Carl Roth GmbH, Německo

EDTA - Sigma, USA

ethanol - Lachema a.s, Neratovice, ČR

ethidium bromid - Sigma, St. Louis, USA

glycin - Carl Roth GmbH, Německo

glycerol – Penta, Chrudim, ČR

heptahydrát síranu nikelnatého - Penta, Chrudim, ČR

hydroxid sodný - Lachema a.s, Neratovice, ČR

chloramfenikol - Sigma, USA

chlorid draselný - Lachema a.s, Neratovice, ČR

chlorid sodný - Penta, Chrudim, ČR

chlorovodíková kyselina - Lachema a.s, Neratovice, ČR

imidazol - Carl Roth GmbH, Německo

isopropanol - Lachema a.s, Neratovice, ČR

IPTG - Sigma, USA

LB Agar (Luria/Miller) - Carl Roth GmbH, Německo

LB Medium (Luria/Miler) - Carl Roth GmbH, Německo

methanol - Lachema a.s, Neratovice, ČR

octová kyselina - Lachema a.s, Neratovice, ČR

persulfát amonný - Sigma, USA

SDS - Sigma, USA

síran nikelnatý - Penta, ČR

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) - Carl Roth GmbH, Německo

Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) - Carl Roth GmbH, Německo

trypton - Carl Roth GmbH, Německo

$\beta$ -merkптоethanol - Carl Roth GmbH, Německo

## **4.2. Materiál**

Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit – Invitrogen, USA

ATP - Sigma, USA

dialyzační membrána - MCO (Molecular weight cut off) 14000 - Roth, Německo

DNA primery - VBC-Genomics, Rakousko

Dpn I - New England Biolabs, USA

E. coli BL21 (Rosetta) - Stratagene, USA

E. coli DH $\alpha$  - Stratagene, USA

filtry 45  $\mu$ m Rotilabo-Spritzfilter (PVDF) - Carl Roth GmbH, Německo

Jetquick Plastid Miniprep spin kit - Genomed, USA

lysozym - New England BioLabs, USA

náplně do kolon a kolony - Amersham Biosciences, Švédsko

Protease Inhibitor Coctail – Sigma, USA

thrombin - Sigma, USA

vektor pET-15b - Invitrogen, USA

pET-32b

YEp352 (z angl. Yeast Episomal Plasmid)

peptidy značené FITC (Raf-259, pRaf-259) – EZ Biolab (Westfield, USA)

PKA - Promega, USA

Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit - Stratagene, USA

standard molekulových vah - Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, USA

### **4.3. Přístroje**

analytické váhy R160V, Sartorius, Goettingen, Německo

centrifuga 5804R, rotor A-4-44, Eppendorf, Hamburg

centrifuga 5415D, rotor F45-24-11, Eppendorf, Hamburg

centrifuga K80, rotor S6/6,6, MLW, Leipzig, Německo

horizontální agarosová elektroforéza, Omni-bio, Brno, Česká republika

HPLC-AKTA, Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko

iluminátor UVT 14-M, Herolab, Wiesloch, Německo

inkubátor, Melag, Berlín, Německo

MasterCycler Personal, Eppendorf, Hamburg, Německo

peristaltická pumpa, Ismatec, Glattbrugg, Švýcarsko

pH metr Jen Way 3505, Feldsted, Velká Británie

sonikátor 3000 Misonix, Cole Parmer, Vernon Hills, USA

spektrofluorimetr Photon Counting Spectrofluorimeter PC1, ISS, Champaign, USA

spektropolarimetr J-810, Jasco, Japonsko

třepačka Orbital incubator, Gallenkamp, Loughborough, Velká Británie

UV-VIS absorpční spektrofotometr Agilent 8453, Agilent, Santa Clara, USA

vertikální polyakrylamidová elektroforéza, Bio-Rad, Hercules, USA

vodní lázeň, Memmert, Schwabach, Německo

vortex Zx3, Velp Scientifica, Milán, Itálie

zdroj pro horizontální elektroforézu, Omni-bio, Brno, Česká republika

zdroj pro vertikální elektroforézu Consort EV243, Sigma-Aldrich, USA

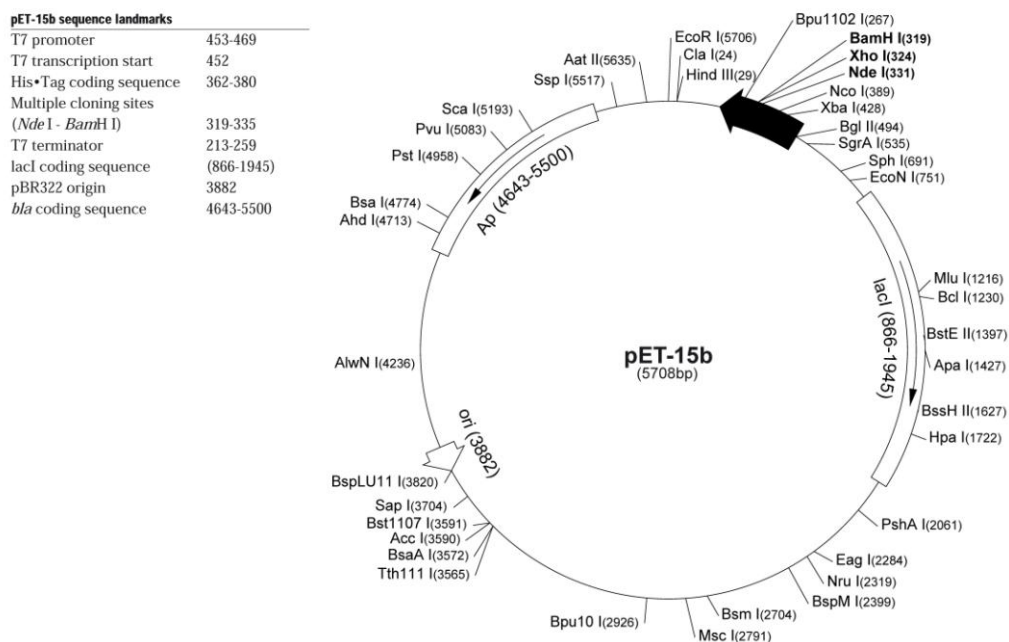


## 5. Metody

### ODDÍL A

#### 5.1. Používané vektory

Expresní vektor je plasmid (tedy kruhová molekula DNA) navržený pro expresi rekombinantních proteinů v bakteriích. Expresní vektor pET15-b obsahuje jako jednu ze svých komponent histidinovou sekvenci. Tato sekvence je úsek DNA kódující tzv. histidinovou kotvu (His-tag), což je motiv šesti aminokyselin histidinů za sebou. Histidinová kotva je důležitá pro detekci a purifikaci proteinů. Využívá se jí v purifikačním kroku afinitní chromatografie, jejíž principem je vazba purifikovaného proteinu s histidinovou kotvou na ionty kovu (ligand) ukotvené na koloně. Po expresi vznikaly fúzní proteiny s histidinovou kotvou na N-konci, která byla podle potřeby odštěpena thrombinem. Používaný vektor pET15-b v sobě nese gen s rezistencí na antibiotikum ampicilin.



**Obr. 12.:** Mapa vektoru pET-15b. Mezi místa pro restriční endonukleázy NdeI a BamHI byla zaklonována cDNA pro Bmh1, Bmh2 a 14-3-3ζ proteiny. Důležité složky vektoru jsou uvedeny vlevo od obrázku. Jsou jimi T7 promotor (na tuto sekvenci specificky nasedá enzym T7 RNA polymerasa, která je zodpovědná za transkripci inzertu), T7 počátek transkripce (je místo vektoru, kde začíná T7 RNA polymerasa syntetizovat mRNA inzertu), His-Tag kódující

*sekvence (sekvence vektoru kódující histidinovou kotvu), klónovací místo (místo, kam lze zaklonovat inzert), T7 terminátor (místo ukončující transkripci inzertu), lacI kódující sekvence (sekvence kódující lac represor, který se za nepřítomnosti IPTG váže na DNA vektoru v části blízce T7 promotoru a tím je blokována transkripční aktivita T7 RNA polymerasy; zahájení transkripce je možné v přítomnosti molekuly IPTG, na kterou se represor naváže), pBR322 origin (místo důležité pro replikaci plasmidu při kultivaci bakterií) a bla kódující sekvence (kóduje rezistenci k ampicilinu). Převzato z <http://www.aidsreagent.org/pdfs/pet15b.pdf>.*

K produkci kvasničných proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 a jejich mutantů Bmh1 M237Stop, Bmh2 I237Stop (237Stop značí proteiny s odstraněným C-terminálním koncem) byl použit expresní vektor pET15-b (Novagen, viz **Obr. 12**), do kterého byla mezi místa pro restriční endonukleázy NdeI a BamHI zaklonována cDNA pro BMH1 WT, BMH2 WT. Zaklonování cDNA BMH1 WT a BMH2 WT bylo provedeno dříve RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. Pro expresi 14-3-3 WT, 14-3-3 deltaC byl použit opět expresní vektor pET15-b.

## **5.2. Cílená bodová mutageneze pomocí PCR**

Cílená bodová mutageneze provedená pomocí řetězové polymerasové reakce (PCR; z angl. Polymerase Chain Reaction) umožňuje získání mutace na vyžadovaném genu v přesně definovaném místě. V této reakci jsou využívány syntetické oligonukleotidy délky okolo 30 nukleotidů zakončené nejlépe bázemi C nebo G, jejichž sekvence je identická s výjimkou místa změny, které se nachází přibližně uprostřed.

Cílená mutageneze cDNA BMH1 WT pomocí PCR byla použita pro přípravu Bmh1  $\Delta$ C, kde jsem změnila triplet kódující methionin 237 na Stop kodon, po expresi vznikl Bmh1 mutant s odstraněným C-koncem.

Cílená mutageneze cDNA BMH2 WT ve vektoru pET15-b byla provedena na místě 237. Triplet kódující isoleucin 237 jsem změnila na Stop kodon, po expresi tak vznikl mutant Bmh2 s odstraněným C-koncem.

Cílená mutageneze cDNA BMH2 noW (noW značí verzi Bmh2, kde byly dva přirozeně se vyskytující tryptofany na pozicích 61 a 233 nahrazeny fenylalaniny; tento konstrukt jsem dostala od RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D.) ve vektoru pET15-b byla provedena na místech E243 a A264. Zde byl vnesen tryptofanový zbytek buď na pozici 243 (triplet kódující kyselinu glutamovou byl změněn na triplet kódující aminokyselinu tryptofan;

E243W) před polyQ sekvencí C-terminálního konce nebo na pozici 264 (triplet kódující aminokyselinu alanin byl změněn na triplet kódující aminokyselinu tryptofan; A264W) za polyQ sekvencí C-terminálního konce.

Cílená mutagenese cDNA 14-3-3ζ ve vektoru pET15-b byla provedena na místě 231, kde byla nahrazena kyselina asparagová Stop kodonem. Tato mutace byla provedena RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D.

Tyto bodové mutace umožnily studium vlastností C-konce Bmh2 proteinu metodami fluorescenční spektroskopie, gelové permeační chromatografie, sedimentační analýzy a dynamického rozptylu světla a jejich porovnání se savčí isoformou 14-3-3ζ. Navržené oligonukleotidy (VBC-Genomics, Rakousko) jsou uvedeny v **Tab. 2**, složení reakční směsi udává **Tab. 3**.

**Tab. 2.:** *Oligonukleotidy použité pro metodu cílené bodové mutagenese.*

---

<b>BMH1 M237Stop_up</b>												
5'	tta	tgg	act	tca	gac	<u>tag</u>	tcc	gag	tcc	ggt	caa	3'
<b>BMH1 M237Stop_down</b>												
5'	ttg	acc	gga	ctc	gga	<u>cta</u>	gtc	tga	agt	cca	taa	3'
<b>BMH2 I237Stop_up</b>												
5'	tta	tgg	acc	tct	gat	<u>taa</u>	tct	gaa	tct	ggt	caa	3'
<b>BMH2 I237Stop_down</b>												
5'	ttg	acc	aga	ttc	aga	<u>tta</u>	atc	aga	ggc	cca	taa	3'
<b>BMH2 E243W_up</b>												
5'	tct	gaa	tct	ggt	caa	<u>tgg</u>	gat	caa	caa	caa	caa	3'
<b>BMH2 E243W_down</b>												
5'	ttg	ttg	ttg	ttg	atc	<u>cca</u>	ttg	acc	aga	ttc	aga	3'
<b>BMH2 A264W_up</b>												
5'	caa	caa	caa	gct	cca	<u>tgg</u>	gaa	caa	act	caa	ggt	3'
<b>BMH2 A264W_down</b>												
5'	acc	ttg	agt	ttg	ttc	<u>cca</u>	tgg	agc	ttg	ttg	ttg	3'

---

PCR reakční směs obsahovala:

**Tab.3:** Složení reakční směsi v mikroskopu pro provedení bodových mutagenéz pomocí PCR.

	množství	finální koncentrace v 50 $\mu$ l PCR směsi
250 ng/ $\mu$ l templátová DNA	1 $\mu$ l	
10 mM primer Bmh(14-3-3) up	2 $\mu$ l	400 $\mu$ M
10 mM primer Bmh(14-3-3) down	2 $\mu$ l	400 $\mu$ M
10x Pfu pufr HF	5 $\mu$ l	
1,6 $\mu$ M dNTP	2,5 $\mu$ l	0,08 mM (každý dNTP)
ultračistá H <sub>2</sub> O	36,5 $\mu$ l	
Pfu Ultra polymerasy HF	1 $\mu$ l	2,5 U/ $\mu$ l

Pro mutagenézi byla použita souprava Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA).

Program PCR reakce na termocycleru probíhal následovně:

1. fáze	95 °C	1 min
2. fáze	95 °C	30 s
3. fáze	51 °C	1 min
4. fáze	68 °C	12 min
5. fáze	68 °C	12 min
6. fáze	4 °C	neomezeně dlouho

Cyklus fází 2-4 byl 20x opakován.

Dvouvláknová DNA je při teplotě 95 °C denaturována po dobu 30 s na dvě jednovláknové templátové molekuly. Při teplotě 51 °C (fáze 3) hybridizují (annealing) na obou stranách cílové DNA oligonukleotidové primery, které řídí syntézu nových vláken. Ve 4. fázi probíhá prodlužování řetězce (elongace) DNA připojováním dNTP k volnému 3' konci nově vznikajícího vlákna pomocí termostabilní DNA polymerasy. Syntéza nového vlákna tedy probíhá ve směru 5' → 3'.

### 5.3. Odstranění templátové DNA

V bakteriích existují tzv. restrikčně-modifikační systémy, které chrání bakterie před vstupem cizorodých DNA tím, že methyloují vlastní DNA. Templátová DNA byla odstraněna použitím restrikční endonukleasy DpnI, která specificky štěpí methylovanou DNA. V produktu po PCR reakci byla přítomna převážně mutovaná DNA a templátová DNA v malém množství, která byla odstraněna přidávkem 30 U (1,5  $\mu$ l) enzymu DpnI (20000 U/ml). Směs byla inkubována 90 minut při teplotě 37 °C.

### 5.4. Ověření výsledku PCR reakce pomocí TBE agarosové elektroforézy

Pro kontrolu kvality DNA vzniklé PCR reakcí byla provedena TBE agarosová elektroforéza. Pro přípravu 1 % agarosového gelu bylo smícháno 0,8 g agarosy s 80 ml 1x TBE pufru (viz **Tab. 4**). Směs byla zahřáta do rozpuštění v mikrovlnné troubě a po mírném ochlazení nalita do stojanu pro horizontální elektroforézu a vložen hřeben pro vytvoření jamek. Připravený gel byl vložen do elektroforetické vany, převrstven 1x TBE pufrům a následně byly nanесeny vzorky a standard velikostí DNA. 15  $\mu$ l směsi po PCR reakci bylo smícháno s 6x Loading Dye Solution (Fermentas, 5  $\mu$ l) a vodou (10  $\mu$ l). Přístroj byl připojen ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí o 70 V a elektroforéza probíhala 120 minut. Poté byl gel na 15 minut vložen do roztoku ethidiumbromidu (0,01 % w/v), který umožňuje vizualizaci v UV světle tím, že interkaluje mezi jednotlivé báze DNA.

**Tab. 4.:** Složení 1x TBE pufru použitého pro TBE agarosovou elektroforézu.

---

#### 1x TBE pufr

40 mM Tris-HCl pH 8,0

90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

2 mM EDTA pH 8,0

---

### 5.5. Transformace kompetentních buněk metodou teplotního šoku

Po odstranění templátové DNA byla provedena transformace DNA do buněk *E. coli* BL21(DE3) metodou teplotního šoku (angl. „heat shock“), kdy jsou buňky nejprve ponořeny do vodní lázně o teplotě 45 °C a následně do ledu.

Zmrazená směs buněk BL21(DE3) (50 µl) byla opatrně rozehrána na ledu. K této směsi bylo přidáno 3 µl DNA vzniklé PCR metodou s odstraněnou templátovou DNA. Inkubace probíhala 20 minut na ledu (0 °C). Po inkubaci při 0 °C byla zvýšena teplota mikrozkuhavky obsahující směs buněk BL21(DE3) a DNA ve vodní lázni na 42 °C po dobu 45 s. Poté byla směs opět inkubována na ledu (0 °C) po dobu 2 minut. Nakonec bylo ke směsi přidáno 450 µl tekutého LB média (viz. **Tab. 5**) temperovaného na 37 °C a výsledná směs byla inkubována minimálně 1 hod při 37 °C za konstantního třepání 200 rpm.

**Tab. 5.:** Složení tekutého a pevného LB média.

složení tekutého LB média		složení pevných agarosových misek s ampicilinem	
trypton	10 g	trypton	10 g
kvasničný extrakt	5 g	kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g	NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 l	agar	15 g
vysterilizovat		H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 l
		vysterilizovat	
		po ochlazení přidat ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml	

Buňky byly nakonec přeneseny na Petriho misky s pevným LB médiem (viz **Tab. 5**) temperované na teplotu 37 °C. Roztok bakterií byl sterilně rozetřen po celé ploše misky a vložen do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C.

## 5.6. Izolace plasmidové DNA

Z kolonií, které vyrostly na Petriho miskách po transformaci kompetentních buněk, byly připraveny bakteriální kultury, které byly vždy pouze z jedné kolonie. Kličkou byly sterilně přeneseny jednotlivé kolonie do 5 ml tekutého LB média s antibiotikem ampicilinem o finální koncentraci 100 µg/ml. Směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 15 hodin za konstantního třepání 200 rpm.

Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí sady JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN), která obsahuje podrobný návod, všechny potřebné roztoky G1-G4, TE a mikrozkuhavky. Nejprve byla směs resuspendována roztokem G1, který obsahuje RNAsu již se využívá k úplné degradaci RNA při purifikacích DNA. Poté byl přidán roztok

obsahující NaOH a SDS, který způsobil lyzi buněk. Následovala neutralizace octanem sodným, která způsobila precipitaci chromatinové DNA a proteinů, které byly odstraněny centrifugací. Supernatant, který obsahoval uvolněnou plasmidovou DNA, byl přenesen na kolonku. Poté byla DNA 2x promyta ethanolem a v poslední fázi byla plasmidová DNA eluována z kolony TE pufrém o teplotě 65 °C. Výsledným produktem bylo získání čisté plasmidové DNA, jejíž část byla zaslána na sekvenaci.

Složení používaných roztoků:

G1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A

G2: 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)

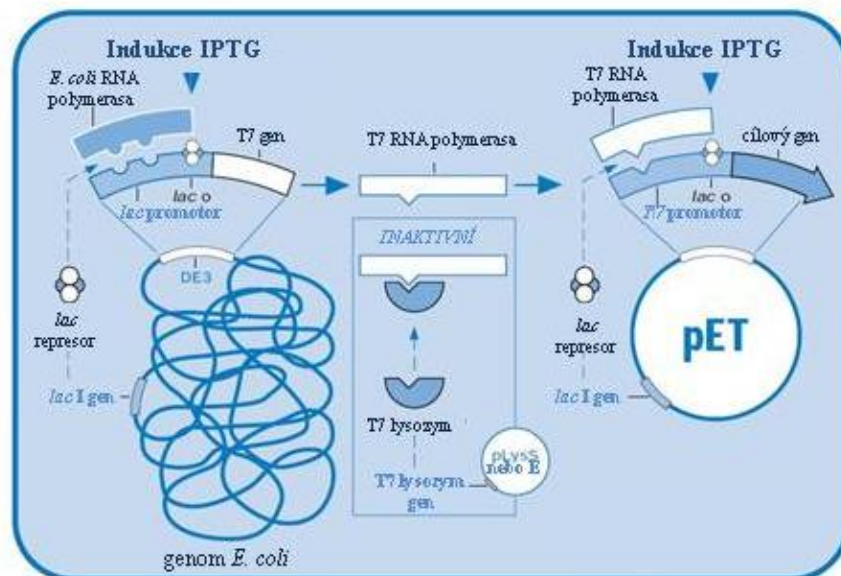
G3: acetát a guanidin chlorid

G4: ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl

TE: pufr 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

## 5.7. Bakteriální expresní systém

Nejpoužívanějším systémem pro expresi rekombinantních proteinů je systém bakteriální. Výhodou je zejména vysoký výtěžek exprimovaného proteinu, nízká časová a finanční náročnost. Pro expresi Bmh proteinů byl použit kmen BL21(DE3). BL21 jsou geneticky modifikované kmeny *E. coli*. Důležitou roli zde zastává gen lacI, který kóduje lac represor a gen DE3, který v sobě nese informaci pro syntézu T7 polymerasy. V nepřítomnosti induktoru IPTG nasedá lac represor na lac promotor (promotor genu DE3). Tím se blokuje syntéza T7 RNA polymerasy. Pokud je v buňce přítomen IPTG, váže na sebe lac represor a syntéza T7 RNA polymerasy může probíhat. Tím dochází ke spuštění transkripce rekombinantního proteinu viz **Obr. 13**.



**Obr. 13.:** Schéma bakteriálního systému pro expresi rekombinantních proteinů. Převzato z <http://www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level>.

Transformace plasmidové DNA do buněk BL21(DE3) byla provedena metodou teplotního šoku viz kap. 5.5. Z Petriho misky byly sterilně přeneseny bakteriální kolonie do 5 ml tekutého LB média temperovaného na 37 °C s přidavkem ampicilinu o finální koncentraci 100 µg/ml. Tato směs byla inkubována 15 hodin při teplotě 37 °C za konstantního třepání 200 rpm. Následně byla směs bakterií přenesena do 1 l tekutého LB média temperovaného na teplotu 37 °C s přidavkem ampicilinu o finální koncentraci 100 µg/ml za konstantního třepání 200 rpm do té doby, než dosáhla hodnota optické density 0,8 při 600 nm vzhledem k čistému LB médiu. Expres byla indukována přidavkem 0,5 mM roztoku IPTG. Inkubace bakteriální kultury probíhala po dobu 15 hodin při teplotě 30 °C za konstantního třepání 200 rpm.

### 5.8. Glycerolový roztok transformovaných bakterií

Glycerolové roztoky slouží k dlouhodobému skladování bakteriální kultury, ke které je přidán sterilní glycerol do finální koncentrace 30 %. Bakteriální kolonie byly sterilně přeneseny z Petriho misky do 5 ml tekutého LB média temperovaného na 37 °C s přidavkem ampicilinu o finální koncentraci 100 µg/ml. Tato směs byla inkubována 15 hodin při teplotě 37 °C za konstantního třepání 200 rpm. K 1000 µl bakteriální kultury bylo přidáno 300 µl sterilního glycerolu. Následně byla směs promíchána a skladována při -80 °C.



## 5.9. Purifikace proteinů Bmh a lidské 14-3-3ζ isoformy

Po expresi byly buňky centrifugovány 20 min při 3400 rpm (rotor S6/6,6) a teplotě 4 °C. Peleta buněk z 1 l byla resuspendována ve 30 ml lyzačním pufru (viz **Tab. 6**) pomocí vortexu a výsledné směsi byly před sonikací zamrazeny na -80 °C po dobu 15 hodin, protože nízké teploty napomáhají narušení bakteriální buněčné stěny.

**Tab. 6.:** Složení resuspendačního/lyzačního pufru a 1x PBS pufru.

Složení lyzačního pufru	Složení 1 x PBS pufru, pH 7,4
1 x PBS	138 mM NaCl
1 M NaCl	3 mM KCl
2 mM imidazol	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
4 mM β-merkapt ethanol	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 5.9.1. Sonikace buněk

Sonikace buněk je metoda, která pomocí ultrazvuku rozrušuje buněčné stěny. K rozmrzlé suspenzi buněk byl přidán lysozym o finální koncentraci 100 µg/ml. Lysozym je enzym štěpící peptidoglykany bakteriální buněčné stěny. Tato směs byla za stálého míchání inkubována 20 min při teplotě 4 °C. Následně byly buňky sonikovány (Sonicator 3000 Misonix, Cole-Parmer, USA) při nastavení programu 6 (viz **Tab. 7**). Buňky byly udržovány při konstantní teplotě 0 °C. Po sonikaci byly buňky centrifugovány (rotor 3746) 45 min, při 13500 rpm a teplotě 4 °C. Výsledný supernatant, který obsahuje proteinové frakce, byl použit pro afinitní chromatografii nebo skladován při -80 °C.

**Tab. 7:** Podmínky nastavení programu 6 při sonikaci kvasničných Bmh proteinů a lidské isoformy 14-3-3ζ.

Nastavení programu 6	
pulsy	10 s
pauza	20 s
výkon	57 W
pulsní doba	20 min

### 5.9.2. Chelatační afinitní chromatografie

Chelatační afinitní chromatografie (angl. IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) je metoda založená na interakci iontů přechodných kovů s ligandy. U chromatografických metod jsou složky směsi postupně rozdělovány mezi dvě fáze – mobilní a stacionární. Jako stacionární fáze byla použita chelatující sepharosa (iminodiacetát-sepharosa, Amersham Biosciences, Švédsko) s navázanými  $\text{Ni}^{2+}$  ionty. K  $\text{Ni}^{2+}$  chelatovanými iminodiacetátem se váží exprimované fúzní rekombinantní proteiny obsahující na svém N-konci histidinovou kotvu (šest aminokyselin histidinů za sebou). Mezi kovem ( $\text{Ni}^{2+}$ , akceptor elektronů) a proteinem (resp. aminokyselinovými zbytky s vysokou elektronovou hustotou, His) vzniká koordinační vazba.

Kolona byla připojena na peristaltickou pumpu a byla promývána rychlostí průtoku 3 ml/min. Při promývání se na sepharosu navázaly  $\text{Ni}^{2+}$  ionty. Následně byla na kolonu nanášena směs získaná sonikací a centrifugací buněk. Na kolonu se navázaly proteiny, které obsahovaly histidinovou kotvu. Nespecificky vázané proteiny byly z kolony odstraněny pomocí roztoku obsahujícího imidazol o koncentraci 0,06 M. Protein obsahující his-tag byl eluován roztokem obsahující imidazol o koncentraci 0,6 M.

Postup:

20 ml  $\text{H}_2\text{O}$

60 ml  $\text{NiSO}_4$  – aktivace kolony, navázání  $\text{Ni}^{2+}$  iontů na kolonu

15 ml  $\text{H}_2\text{O}$

15 ml pufru E

nanesení supernatantu získaného sonikací a centrifugací buněk

60 ml pufru E - promytí

60 ml 60 mM imidazolu v PBS – odstranění nespecificky vázaných proteinů

20 ml pufru F – eluce

Vzorky byly jímány do připravených 1,5 ml mikrozkupek temperovaných na ledu. Kolona a všechny roztoky byly před používáním vychlazeny na teplotu 4 °C. Pro zamezení degradace proteinů byla kolona obsahující chelatující sepharosu během afinitní chromatografie ochlazována z vnější strany vlhkou buničinou.

**Tab. 8.:** Složení aktivujícího roztoku, pufru E, F a regeneračního Stripp roztoku.

<b>Pufr E</b>	1 x PBS	<b>Pufr F (pH 8)</b>	1 x PBS
	0,5 M NaCl		0,5 M NaCl
	1 mM imidazol		0,6 M imidazol
	2 mM $\beta$ -merkaptoethanol		2 mM $\beta$ -merkaptoethanol
<b>Stripp roztok</b>	0,5 M NaCl	<b>Aktivující roztok</b>	0,1 M NiSO <sub>4</sub>
	0,1 M EDTA		

K regeneraci kolony bylo použito 30 ml regeneračního Stripp roztoku viz **Tab. 8**. Poté byla kolona promyta 20 ml H<sub>2</sub>O a pro uskladnění (4 °C) byla kolona částečně promyta 20 ml 20 % roztoku ethanolu v H<sub>2</sub>O.

### 5.9.3. Vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacril Amide Gel Electrophoresis) je označení pro polyakrylamidovou elektroforézu, která se provádí v denaturujícím prostředí 0,1 % dodecylsulfátu sodného. Jedná se o elektromigrační metodu využívající pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Tato metoda byla prováděna pro ověření čistoty proteinových frakcí po purifikačních krocích afinitní chelatační chromatografie (kap. 5.9.2.), aniontově výměnné chromatografie (kap. 5.9.6.), gelové permeační chromatografie (kap. 5.9.8.) a po trombinovém štěpení (kap. 5.9.5.).

Proteiny mají v SDS prostředí gelu uniformní záporný náboj, proto je jejich separace založena pouze na velikosti molekul. Větší molekuly se pohybují pomaleji než molekuly menší směrem od katody k anodě. Vzorkový pufr (složení viz **Tab. 9**) obsahuje  $\beta$ -merkaptoethanol, který napomáhá rozrušení kvartérní a terciární struktury. Před nanesením vzorků Hamiltonovou pipetou do jamek zaváděcího gelu byly vzorky krátce povařeny (1 min, 100 °C).

**Tab 9.:** Složení vzorkového pufru pro přípravu vzorků na SDS-PAGE.

<b>Pufr pro přípravu vzorků, 5x</b>	
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50 % glycerol	5 ml
10 % SDS	2 ml
β-merkaptoethanol	0,5 ml
1 % bromfenolová modř	1 ml
H <sub>2</sub> O	0,9 ml

Polyakrylamidová gelová elektroforéza byla prováděna na přístroji Consort EV 243 (Sigma-Aldrich, USA) o použitém napětí 200 V. K separaci kvasničných Bmh proteinů a lidské 14-3-3ζ isoformy byly používány 12 % SDS gely se schopností separace 15-60 tisíc (složení 12 % gelu a vodícího pufru pro SDS-PAGE viz **Tab. 10**).

**Tab. 10.:** Složení 12 % separačního a zaváděcího gelu a příslušných pufrů, vodícího pufru a akrylamid/bisakrylamidu použitého pro SDS-PAGE kvasničných proteinů Bmh1 a Bmh2 a lidské isoformy 14-3-3ζ.

<b>Separací gel, 12 %</b>		<b>Pufr pro separační gel, 4x</b>	
akrylamid/bisakrylamid	3 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	75 ml
pufr pro separační gel s 10 % SDS	2 ml	10 % SDS	4 ml
H <sub>2</sub> O	2,6 ml	H <sub>2</sub> O	21 ml
10 % persulfát amonný	70 μl		
TEMED	8 μl		
<b>Zaváděcí gel</b>		<b>Pufr pro zaváděcí gel, 4x</b>	
akrylamid/bisakrylamid	0,5 ml	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	50 ml
pufr pro zaváděcí gel s 10 % SDS	1 ml	10 % SDS	4 ml
H <sub>2</sub> O	2,25 ml	H <sub>2</sub> O	46 ml
10 % persulfát amonný	70 μl		
TEMED	8 μl		
<b>Vodící pufr pro SDS, 10x</b>		<b>Akrylamid/bisakrylamid</b>	
Tris	30 g	akrylamid	29,2 g
glycin	144 g	bisakrylamid	0,8 g
SDS	10 g	H <sub>2</sub> O	dolít do 100 ml
H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 l		

Pro vizualizaci proteinů byly gely vloženy do barvicí lázně (viz **Tab. 11**) na dobu 60 min. Složení odbarvovacích roztoku viz **Tab. 11**.

**Tab. 11.:** Složení barvicího a odbarvovacího roztoku použitého při separaci Bmh1, Bmh2 a 14-3-3ζ isoformem na SDS-PAGE.

Barvicí roztok		Odbarvovací roztok	
Comasie Blue R-250	1 g	methanol	100 ml
methanol	450 ml	kyselina octová	100 ml
H <sub>2</sub> O	450 ml	H <sub>2</sub> O	800 ml
kyselina octová	100 ml		

#### 5.9.4. Dialýza

Dialýza je proces využívaný pro oddělení molekul s různou velikostí. Vzorek je nanesen do polopropustné membrány odkud přechází látky z míst o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací těchto látek. K dialýze byla používána dialyzační membrána s „cut off“ 14 000. Membrána se vzorkem byla vložena do 1 l dialyzačního pufru (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 2 mM β-merkptoethanol, 10 % glycerol) temperovaného na teplotu 4 °C. Dialýza probíhala po dobu 15 hodin za konstantního míchání při teplotě 4 °C.

#### 5.9.5. Thrombinové štěpení

Pro odstranění histidinové kotvy z N-terminálního konce fúzních proteinů 14-3-3 bylo provedeno štěpení lidským thrombinem (Sigma-Aldrich, USA). Na 1 mg proteinu byly použity 2 U thrombinu, který byl přidán ke vzorku do dialyzační membrány. Dialýza probíhala po dobu 24 hodin za konstantního míchání při teplotě 4 °C. Složení dialyzačního pufru použitého pro odštěpení histidinové kotvy pomocí thrombinu bylo 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % glycerol.

#### 5.9.6. Aniontově výměnná chromatografie

Při aniontové chromatografii byla využívána kolona o objemu 1 ml s náplní MonoQ Sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko) připojená na přístroj HPLC AKTAprime™ (Amersham Biosciences). Data byla zaznamenána pomocí programu Unicorn 5.01.

Vzorky byly nanášeny na kolonu ekvilibrovanou v pufru HQ-E (pH 8) při rychlosti průtoku 1 ml/min. Při pH 8 nesou proteiny 14-3-3 v pufru záporný náboj a mohou se vázat na kvartérní amonium MonoQ Sepharosy. Eluce probíhala lineárním gradientem NaCl od 0 do 1 M NaCl (0-100 %). Frakce byly jímány po 1,5 ml. Pufry (složení viz **Tab. 12**) HQ-E a HQ-F byly temperovány na teplotu 4 °C.

**Tab. 12.:** Složení vodícího a elučního pufru používaných při aniontové výměnné chromatografii.

<b>Pufr HQ-E (vodící)</b>		<b>Pufr HQ-F (eluční)</b>	
1 M Tris-HCl (pH 8)	50 ml	1 M Tris-HCl (pH 8)	50 ml
DTT	0,154 g	DTT	0,154 g
		NaCl	58,4 g
dolít do 1 l destilovanou H <sub>2</sub> O		dolít do 1 l destilovanou H <sub>2</sub> O	

### 5.9.7. Zakoncentrování proteinu

Všechny požadované frakce získané elucí při aniontové výměnné chromatografii byly přelity do koncentrátoru Centricon YM-10 (Milipore, USA). Následně byly odstředovány na centrifuze Centrifuge 5804R s rotorem A-4-44 po dobu 15 minut při 2500 rpm a teplotě 4 °C do objemu 0,5 ml.

### 5.9.8. Gelová permeační chromatografie

Technika gelové permeační chromatografie umožňuje dělení molekul podle jejich velikostí. Z kolony jsou nejprve vymývány rychlostí mobilní fáze velké molekuly, které nemohou pronikat do pórů gelu. Malé molekuly, oproti velkým, pronikají do pórů gelu a jsou zde zadržovány, dokud se difúzí nedostanou opět ven z gelové částice, kde je odnáší mobilní fáze k dalším gelovým částicím.

Gelová permeační chromatografie byla provedena na přístroji HPLC AKTAprime™ (Amershan Biosciences, Švédsko) s náplní kolony Superdex 75 (Amershan Biosciences, Švédsko). Kolona byla proplachována pufrem (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 2 mM DTT) rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Poté byl nanesen vzorek o objemu 0,5 ml a jímány frakce (po 0,5 ml). Tlak v koloně byl 0,43 MPa. Data byla zaznamenána pomocí programu Unicorn 5.01. Koncentrace proteinů byly stanoveny

spektrofotometriky pomocí měření absorbance při vlnové délce 280 nm na přístroji Agilent. Extinkční koeficienty při vlnové délce  $\lambda = 280$  nm byly stanoveny pomocí programu ProtParam tool na serveru [www.expasy.org](http://www.expasy.org) (viz **Tab. 13**).

**Tab. 13.:** Hodnoty extinkčních koeficientů a relativních molekulových hmotností použitých při výpočtu koncentrací proteinů stanovených pomocí programu ProtParam tool serveru [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

	Extinkční koeficient při $\lambda_{280}$ nm [ $\text{dm}^3\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	relativní molekulová hmotnost [Da]
Bmh1 WT	0,955	29005
Bmh1 $\Delta$ C	1.074	26850
Bmh2 WT	0,930	31061,3
Bmh2 $\Delta$ C	1,073	26912,1
14-3-3 $\zeta$	0,982	27515
14-3-3 $\zeta$ $\Delta$ C	1,036	27415

### 5.10. Kovalentní modifikace proteinů 14-3-3 fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS

Kovalentní modifikace Bmh proteinů obsahujících cysteinový zbytek na pozici 194 (isoforma Bmh1 obsahuje přirozeně dva cysteinové zbytky na pozicích 85 a 194, proto byl cystein C85 změněn na S) s thiol-reaktivní sondou 1,5-IAEDANS byla provedena následovně.

Proteiny o koncentracích 50  $\mu\text{M}$  v pufru 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl a 10 % (w/v) glycerolem byly smíchány v molárním poměru 1:40 s fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS. Inkubace probíhala 2 h při 30 °C a poté po dobu 15 h při 4 °C ve tmě. Nenavázaná sonda byla odstraněna pomocí gelové permeační chromatografie. Množství navázané sondy bylo ověřeno porovnáním absorbančních hodnot při 280 nm (absorbance proteinu) s 336 nm (absorbance s navázanou 1,5-IAEDANS fluorescenční sondou) s použitím extinkčního koeficientu 5700  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 5.11. Stacionární měření anizotropie fluorescence

Anizotropie fluorescence  $r$  charakterizuje depolarizaci fluorescence. Hodnota anizotropie fluorescence je závislá na velikosti a tvaru molekuly a viskozitě prostředí. Čím větší je molekula, tím pomaleji rotuje v roztoku a tím vyšší je naměřená anizotropie fluorescence. Vzorek je excitován lineárně polarizovaným světlem. Následně je měřena intenzita emise v rovnoběžném a kolmém směru (pomocí polarizátoru) k vektoru intenzity

elektrického pole použitého záření. Z těchto hodnot je vypočtena hodnota anizotropie  $r$  (**rovnice 1**):

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp}) \quad \text{rovnice 1}$$

kde  $r$  je (bezrozměrná) hodnota anizotropie fluorescence,  $I_{\parallel}$  je intenzita v rovnoběžném směru,  $I_{\perp}$  je intenzita v kolmém směru.

Protože se molekuly v roztoku neustále pohybují, excitovány lineárně polarizovaným světlem budou pouze molekuly, které jsou k němu vhodně natočeny. Čas, který uplyne mezi excitací molekuly a emisí fotonu se nazývá doba dohasínání  $\tau$ . Za tuto dobu se molekuly otočí do různých směrů (*Lakowicz, J. R, 1999*).

Stacionární anizotropie fluorescence byla měřena na přístroji PerkinElmer Life Sciences LS50B při teplotě 22 °C, při nastavení lampy 12A s 0,4  $\mu$ M fosfopeptidem Flc-pRaf-259 (EZBiolab, USA) značeným na N-konci fluoresceinem. Nejprve byla proměřena excitační a emisní spektra peptidu pRaf-259, který byl naředěn na finální koncentraci 300 nM. Poté byla naměřena anizotropie peptidu  $r_{min}$ . Anizotropie peptidu pRaf-259 je malá, protože se jedná o malou molekulu, která rotuje v roztoku velmi rychle. Následně byl do křemenné kyvety titrován roztok proteinu, promíchán pipetou a inkubován 2 min při 20 °C. Poté byla měřena anizotropie fluorescence roztoku  $r_{obs}$ . Tento komplex rotuje v roztoku výrazně pomaleji, a proto je jeho hodnota anizotropie vyšší. Excitační vlnová délka byla 485 nm, emisní vlnová délka byla 520 nm. Anizotropie byla vypočtena podle **rovnice 1**. Frakce navázaného peptidu  $F_B$  byla vypočtena podle **rovnice 2**.

$$F_B = (r_{obs} - r_{min}) / [(r_{max} - r_{obs})Q + (r_{obs} - r_{min})] \quad \text{rovnice 2}$$

kde  $Q$  značí kvantový výtěžek,  $r_{max}$  označuje hodnotu maximální anizotropie.  $r_{obs}$  označuje pozorovanou anizotropii a  $r_{min}$  je minimální pozorovaná anizotropie volného peptidu. Frakce navázaného peptidu  $F_B$  byla vynesena proti koncentraci Bmh proteinů a fitována pomocí **rovnice 3**.

$$F_B = \frac{K_D + [P1] + [P2] - \sqrt{(K_D + [P1] + [P2])^2 - 4[P1][P2]}}{2[P1]} \quad \text{rovnice 3}$$



kde  $K_D$  značí rovnovážnou disociační konstantu,  $[P1]$  je koncentrace značeného peptidu Flc-pRaf-259 a  $[P2]$  je koncentrace Bmh proteinů (Lacourciere, K. A. et al., 2000). Grafy byly vytvořeny pomocí programu Origin 6.0 (Microcal Software Inc.).

## 5.12. Časově rozlišené měření fluorescence

Časově rozlišené měření dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence bylo měřeno na fluorimetru s detektorem založeným na sčítání jednotlivých fotonů (single photon counting). Dohasínání intenzity fluorescence bylo měřeno pod magickým úhlem, kde hodnota dohasínání intenzity  $I(t)$  fluorescence je nezávislá na rotační difúzi chromoforu a udává objektivní informaci o středních dobách života. Všechny experimenty byly provedeny při teplotě 22 °C (vzorky byly umístěny do termostatického držáku) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 NaCl a 1 mM EDTA. Koncentrace proteinů byla 15  $\mu$ M. Dansylová fluorescence byla excitována při vlnové délce 315 nm. Fluorescenční spektra byla snímána při emisní vlnové délce 480 nm s použitím monochromátoru. Tryptofanová emise byla excitována při vlnové délce 298 nm a data byla sbírána pro emisní vlnovou délku 355 nm. Bylo předpokládáno multiexponenciální dohasínání fluorescence podle **rovnice 4**.

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad \text{rovnice 4}$$

kde  $\tau_i$  značí dobu života,  $\alpha_i$  značí příslušné amplitudy. Měřené intenzity  $I(t)$  byly analyzovány pomocí metody maximální entropie (SVD-MEM, Bryan, R. K., 1990). Střední doba života  $\tau_{mean}$  byla vypočítána podle **rovnice 5**.

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \tau_i \quad \text{rovnice 5}$$

kde  $f_i$  je frakční intenzita  $i$ -té složky podle následující **rovnice 6**.

$$f_i = \alpha_i \tau_i / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad \text{rovnice 6}$$

Dohasínání anizotropie  $r(t)$  bylo měřeno pomocí dohasínání rovnoběžné  $I_{\parallel}$  a  $I_{\perp}$  a kolmé komponenty. Data byla vyhodnocována pomocí metody maximální entropie SVD-MEM. Anizotropie byla vypočítána podle **rovnice 7**.

$$r(t) = \sum_i \beta_i e^{-t/\theta_i} \quad \text{rovnice 7}$$

kde  $\beta_i$  značí amplitudy reprezentující distribuci rotačně korelačních časů  $\theta_i$ .  $\beta_i$  je vztažen k počáteční anizotropii  $r_0$  vztahem podle **rovnice 8**.

$$\sum \beta_i = r_0 \quad \text{rovnice 8}$$

### 5.13. Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS, někdy označovaná jako kvazielastický rozptyl světla QELS, nebo fotokorelační spektroskopie PCS) udává informace o velikosti, resp. hydrodynamickém objemu molekul. Principem metody dynamického rozptylu světla je měření fluktuací intenzity světla rozptýleného molekulami vzorku v průběhu času. Protože se molekuly v roztoku pohybují Brownovým pohybem, dochází ke změnám intenzity rozptýleného světla. Pokud by byly molekuly v roztoku stacionární, intenzita rozptýleného světla by byla konstantní. Změny intenzity rozptýleného světla jsou ovlivňovány teplotou, viskozitou rozpouštědla a velikostí molekul. V případě teploty se zrychlí pohyb molekul se zvyšující se teplotou. S vyšší viskozitou rozpouštědla a molekulovou velikostí se zpomaluje pohyb molekul. Pokud jsou teplotní podmínky a viskozita světla konstantní, závisí změny intenzity rozptýleného světla pouze na velikosti částic. Z fluktuací intenzity se vyvozuje korelační funkce, která udává vztah mezi průměrem intenzity v čase  $t$ ,  $I(t)$  a v čase  $t+\tau$ ,  $I(t+\tau)$ . V případě kulovité částice je hodnota fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase  $\tau$  pro monodisperzní systém definována **rovnici 9**:

$$g(\tau) = \exp(-\tau/\tau_c) \quad \text{rovnice 9}$$

kde  $g(\tau)$  značí autokorelační funkci,  $\tau$  značí čas a  $\tau_c$  značí relaxační čas, který je úměrný difúznímu koeficientu částic  $D$  (viz rovnice 10). Hodnotu  $\tau_c$  získáme vynesemím  $\ln g(\tau)$  proti  $\tau$ .

$$\tau_c = 1/2DQ^2 \quad \text{rovnice 10}$$

kde  $D$  značí difuzní koeficient,  $Q$  značí rozptylový vektor, jehož hodnota je udávána jako funkce vlnové délky dopadajícího záření, indexu lomu dispersního média a úhlu  $\theta$ , pod kterým je intenzita rozptýleného světla měřena, viz **rovnice 11**:

$$Q = (4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2) \quad \text{rovnice 11}$$

Stokes-Einsteinova rovnice pro difuzní koeficient uvádí **rovnice 12**:

$$D = kT/6\pi\eta a \quad \text{rovnice 12}$$

kde  $D$  je difuzní koeficient,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je absolutní teplota,  $\eta$  je viskozita prostředí a  $a$  průměr částice.

Z rovnice 10 a 12 se odvozuje hydrodynamický poloměr částic  $R_H$  podle **rovnice 13**:

$$R_H = (kT/6\pi\eta)Q^2 \tau_c \quad \text{rovnice 13}$$

kde  $R_H$  je hydrodynamický poloměr částice.

Měření dynamického rozptylu světla bylo provedeno na přístroji ALV, Langen, Německo, který je složen z 22 mW He-Ne laseru pracující při vlnové délce  $\lambda = 632,8$  nm, ALV CGS/8F goniometru, ALV High QE APD detektoru a ALV 5000/EPP autokorelátoru. Měření byla provedena při teplotě 25 °C a úhlu  $\theta = 90^\circ$ . Všechny vzorky byly měřeny ve čtyřech různých koncentracích (4, 2, 1 a 0,5 mg/ml) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -merkapt ethanol. DLS data byla vyhodnocena podle autokorelační funkce **rovnice 14**:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{rovnice 14}$$

kde  $\tau$  značí relaxační čas rovnice:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta \left[ \int_0^\infty A(\tau_r) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) d\tau_r \right]^2 \quad \text{rovnice 15}$$

kde  $\beta$  značí faktor koherence,  $A(\tau_r)$  označuje distribuční funkci relaxačních časů  $\tau_r$ . Fit byl proveden pomocí inverzní Laplaceovy transformace (ILT) podle CONTIN algoritmu. Hydrodynamický poloměr části byl počítán nenásledující **rovnice 16**:

$$R_H = \frac{8\pi n_0^2 k_B T}{3\eta_0 \lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \langle \tau_r \rangle \quad \text{rovnice 16}$$

kde  $n_0$  značí refraktivní index,  $\eta_0$  je viskozita rozpouštědla,  $k_B$  je Boltzmannova konstanta a  $T$  označuje teplotu.

#### 5.14 Eluční profily proteinů 14-3-3 (WT a forem s odstraněným C-koncovým segmentem) získané metodou gelové permeační chromatografie

Pokusy gelové permeační chromatografie sloužily k ověření velikostí molekul kvasničných isoform proteinů 14-3-3 s C-koncovým segmentem a bez něj v porovnání s lidskou 14-3-3 $\zeta$  isoformou (též s a bez C-koncového segmentu). Tyto pokusy byly provedeny na přístroji HPLC AKTApri<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Švédsko) s náplní kolony Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA a 5 mM DTT. Všechny experimenty probíhaly při teplotě 4 °C a rychlostí průtoku 0,5 ml/min.

#### 5.15. Analytická ultracentrifugace

Metoda analytické ultracentrifugace slouží k charakterizaci sedimentujících částic podle jejich molekulové hmotnosti a sedimentačního koeficientu. Z těchto dat lze získat odhad velikosti a tvaru částic. Měření sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy bylo provedeno na přístroji ProteomLab XL-I Beckman Coulter s rotorem AnTi50 se vzorky Bmh1 WT, Bmh1  $\Delta$ C, Bmh2 WT, Bmh2  $\Delta$ C, 14-3-3 $\zeta$  WT a 14-3-3 $\zeta$   $\Delta$ C dialyzovanými do pufru 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl a 2 mM  $\beta$ -merkptoethanol. Hustota pufru, viskozita a parciální objemy všech vzorků proteinů byly stanoveny programem SEDNTERP

(<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>). Naměřená data byla analyzována pomocí programů SEDFIT (Schuck, P., 2000) a SEDPHAT (Schuck, P., 2003).

Měření sedimentační rovnováhy je citlivé k hmotnosti makromolekul. Tato metoda je použitelná pro širokou oblast molekulových hmotností. Využívá se zde nižších otáček než pro sedimentačně rychlostní experimenty. Při sedimentaci rozpuštěných látek se zvyšuje jejich koncentrace u dna kyvety. Proti sedimentaci začíná působit difúze a po čase se dostanou tyto procesy do vzájemné rovnováhy a koncentrace rozpuštěných látek se exponenciálně zvyšuje směrem ke dnu kyvety.

Sedimentačně rychlostní experimenty jsou používány pro zjištění hmotnosti a tvaru makromolekul. Využívá se zde dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček ke stejnoměrné sedimentaci všech makromolekul ke dnu kyvety. Tím vzniká pohybující se rozhraní mezi sedimentujícími makromolekulami a roztokem bez přítomnosti makromolekul. Toto rozhraní se pohybuje konstantní rychlostí směrem ke dnu kyvety. Zároveň však dochází k rozmývání rozhraní vlivem difúze, která mění jeho tvar. Z rychlosti pohybu a tvaru rozhraní potom lze určit hodnotu sedimentačního koeficientu  $s$ , který je přímo závislý na hmotnosti částice a nepřímo závislý na hodnotě tzv. frikčního koeficientu (viz **rovnice 17**) a hodnotu difúzního koeficientu  $D$  (viz **rovnice 18**), který je závislý na tvaru částice. Poměr sedimentačního a difúzního koeficientu udává molekulovou hmotnost (viz **rovnice 19**).

$$s = u/\omega^2 r = M(1-v)/N_A f \quad \text{rovnice 17}$$

kde  $s$  značí hodnotu sedimentačního koeficientu,  $u$  je pozorovaná radiální rychlost pohybu makromolekuly neboli sedimentační rozhraní,  $\omega^2$  je úhlová rychlost rotoru,  $r$  je vzdálenost od osy otáčení,  $M$  značí molekulovou hmotnost,  $v$  je parciální specifický objem molekuly,  $N_A$  značí Avogadrovu konstantu a  $f$  označuje frikční koeficient.

$$D = RT/N_A f \quad \text{rovnice 18}$$

kde  $D$  značí difúzní koeficient,  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  je absolutní teplota,  $N_A$  je Avogadrova konstanta a  $f$  značí frikční koeficient.

$$M = sRT/D(1-v) \quad \text{rovnice 19}$$

kde  $M$  značí molekulovou hmotnost,  $s$  označuje hodnotu sedimentačního koeficientu,  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  je absolutní teplota,  $D$  značí difúzní koeficient a  $v$  je parciální specifický objem molekuly. Hodnota sedimentačního koeficientu se udává v jednotkách Svedberg (S), kdy  $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$ .

Vzorky proteinů Bmh1, Bmh2 a 14-3-3 $\zeta$  (vždy verze WT a  $\Delta C$ ) pro sedimentačně rychlostní experimenty byly měřeny při koncentraci proteinů  $17 \mu\text{M}$ , teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a rychlosti rotoru  $40000 \text{ rpm}$  s využitím absorpčního detekčního systému. Měření sedimentačních rovnováh bylo provedeno se vzorky proteinů o koncentraci  $10 \mu\text{M}$  a teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  s rychlostí rotoru  $10500\text{-}16500 \text{ rpm}$  s využitím absorpčního detekčního systému.

## 5.16. Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD) je technika, kterou můžeme získat informaci o sekundární struktuře biomakromolekul, jako je stanovení poměrného zastoupení  $\alpha$  šroubovice a  $\beta$  skládaných listů. Principem metody je fakt, že všechny aminokyseliny, s výjimkou glycinu, jsou chirální molekuly. Proto jsou jejich kondenzační produkty - peptidy a bílkoviny opticky aktivní. Opticky aktivní jsou látky, které stáčí rovinu polarizovaného světla. Lineárně polarizované světlo lze rozložit na dvě složky – levotočivou a pravotočivou složku kruhově (cirkulárně) polarizovaného světla. CD pak měří rozdíl v absorpci levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla. Levotočivá a pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla má jiný index lomu ( $n_L \neq n_R$ ) a dojde ke stočení roviny polarizovaného světla. Dále je levotočivá a pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla jinak absorbována roztokem chirální látky ( $\epsilon_L \neq \epsilon_R$ ). Dochází ke změně z lineárně polarizovaného světla na elipticky polarizované. CD spektrem je pak závislost  $\Delta\epsilon$  (rozdíl extinkčních koeficientů pro levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla) koeficientů na vlnové délce  $\lambda$ . Častěji je měřena molární elipticita udávaná ve stupních. Její vztah k  $\Delta\epsilon$  je dán **rovnici 20** (Kodíček, M., Karpenko, V., Academia, 2000).

$$[\theta] = 3300 \Delta\epsilon \quad \text{rovnice 20}$$

Měření cirkulárního dichroismu bylo provedeno na spektropolarimetru JASCO J810 (Japonsko). UV CD spektra byla měřena od  $200$  do  $270 \text{ nm}$  při rychlosti skenu  $100 \text{ nm/min}$  v křemenné jednomilimetrové optické kyvetě (Starna, USA) při teplotě  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Finální spektra

byla vyhodnocena jako průměrné hodnoty z 10 skenů. Koncentrace proteinů se pohybovaly v rozmezí 0,18-0,21 mg/ml v pufru složení 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2mM β-merkapt ethanol, 10 % (w/v) glycerol. Výsledná data představují střední zbytkovou elipticitu (MRE; z angl. Mean Residue Ellipticities) charakterizovanou **rovnici 21**.

$$MRE = \frac{\theta_{obs} \times 100 \times M_W}{c \times l \times N_R} \quad \text{rovnice 21}$$

kde  $\theta_{obs}$  značí pozorovanou elipticitu,  $M_W$  značí molekulovou hmotnost proteinu,  $c$  je koncentrace proteinu v mg/ml,  $l$  je délka kyvety v cm a  $N_R$  je počet aminokyselin v proteinu.





## 6.2. Klonování kvasničné neutrální trehalasy do pET-32b

### 6.2.1. Příprava vektoru pET32-b

(s delecí 81 bp po sekvenci (6xH) SSGLVPRGS od Dr. Ronninga)

#### 6.2.1.1. Kultivace buněk v tekutém LB médiu

Kultivace buněk v tekutém LB médiu byla využívána pro namnožení transformovaných buněk, izolaci plasmidové DNA, při přípravě exprese proteinu přenesením bakteriální kultury do objemu 1 l a při přípravě glycerolových roztoků sloužících k dlouhodobému uskladnění transformovaných bakterií v -80 °C.

Buňky byly kultivovány v 5 ml tekutého LB média při teplotě 37 °C v třepačce po dobu 15 hodin za konstantního třepání 200 rpm. Do LB média bylo přidáno antibiotikum ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml, protože vektor pET-32b nese gen s rezistencí vůči tomuto antibiotiku.

#### 6.2.1.2. Izolace plasmidové DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí komerční sady JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN). Postup izolace je popsán v kap. 5.6.

#### 6.2.1.3. Štěpení vektoru

Na místech pro restrikční endonuklasy NcoI a BamHI vektoru pET-32b bylo provedeno štěpení viz **Tab. 14**:

**Tab. 14.:** Štěpení vektoru pET-32b restrikčními endonukleasami NcoI a BamHI.

	množství	finální koncentrace
vektor pET 32-b	140 µl	3 µg plasmidu
10x NEB pufř 3	16 µl	10x méně než celkový objem
10000 U/ml NcoI	4 µl	40 U
20000 U/ml BamHI	4 µl	80 U
100x BSA 10 mg/ml	1,6 µl	16 µg

Štěpení vektoru probíhalo po dobu 15 hodin při teplotě 37 °C.

#### **6.2.1.4. TBE elektroforéza a izolace vektoru z gelu**

166 µl dvojité štěpeného linearizovaného vektoru (Double Digest, zkr. DD) spolu s 28 µl vzorkového pufru (6x Loading Dye Solution, Fermentas) bylo nanášeno na horizontální 1 % agarosovou elektroforézu převrstvenou 1x TBE pufrem pro ověření kvality, čistoty a velikosti vektorové DNA.

Pro vizualizaci byl po elektroforéze vložen gel do roztoku ethidiumbromidu. Následně byl izolován dvojitě štěpený vektor z gelu pomocí sady *Gel extraction Spin kit* (JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN)). Správnost izolace pET32-b/DD (DD z angl. double digest, dvojitě štěpený vektor) byla ověřena TBE agarosovou elektroforézou.

### **6.2.2. Příprava inzertu neutrální trehalasy 2 (2340 bází)**

#### **6.2.2.1. Amplifikace inzertu pomocí PCR**

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) byla objevena v roce 1983 K. B. Mullisem (Nobelova cena za chemii 1993). Jedná se o enzymově řízenou reakci, ve které dochází k mnohonásobnému namnožení daného úseku DNA, což usnadňuje její další analýzu. Pro provedení PCR reakce je potřeba templátová DNA, jejíž část chceme zmnožit, oligonukleotidové primery (složení viz **Tab. 15**, primery viz **Tab. 16**), které nasedají na konce úseku templátové DNA, který bude amplifikován, reakční pufr, který zajišťuje optimální podmínky reakce, směs deoxynukleotidtrifosfátů, ze kterých je syntetizováno nově vznikající vlákno, DNA polymerasa, syntetizující komplementární vlákno k templátové DNA a voda.

PCR reakční směs obsahovala:

**Tab. 15.:** Složení reakční směsi v mikrozkušavce pro amplifikaci inzertu neutrální trehalasy.

	množství	finální koncentrace v 50 µl PCR směsi
250 ng/µl templátová DNA NTH2	2 µl	
10 mM primer NTH2 up	2,5 µl	500 µM
10 mM primer NTH2 down	2,5 µl	500 µM
10x Pfu pufr HF	5 µl	
1,6 mM dNTP	3 µl	96 µM (každý dNTP)
ultračistá H <sub>2</sub> O	34 µl	
2,5 U/µl Pfu Ultra polymerasy HF	1 µl	

Složení reakčního pufru: 0,1 M KCl, 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,02 M MgSO<sub>4</sub>, 1 % Triton-X-100, 1 g/l BSA

**Tab. 16.:** Oligonukleotidy použité pro zaklonování NTH2 do pET32-b.

<b>NTH2_up (primer s NcoI místem pro pET32-b)</b>																
5'	cgc	ggt	tct	gcc	atg	gcg	atg	gta	gat	ttt	tta	cca	aaa	gta	acg	3'
<b>NTH2_down (primer a BamHI místem pro pET32-b)</b>																
5'	cga	att	cgc	atc	cga	tca	tag	gta	ata	caa	ttt	ttt	ctc	aga	ggg	3'

Program PCR reakce na termocycleru probíhal následovně:

1. fáze	95 °C	45 s
2. fáze	55 °C	1 min
3. fáze	72 °C	3 min
4. fáze	72 °C	12 min
5. fáze	4 °C	neomezeně dlouho

Cyklus fází 1-3 byl 30x opakován.

Dvouvláknová DNA je fází 1. při 95 °C denaturována po dobu 45 s na dvě jednovláknové templátové molekuly. Při teplotě 55 °C (fáze 2) hybridizují (annealing) na obou stranách cílové DNA oligonukleotidové primery, které řídí syntézu nových vláken. Ve 3. fázi probíhá prodlužování řetězce (elongace) DNA připojováním dNTP k volnému 3' konci

nově vznikajícího vlákna pomocí termostabilní DNA polymerasy. Syntéza nového vlákna tedy probíhá ve směru 5' → 3'.

#### 6.2.2.2. Přečištění insertu NTH2

Insert NTH2 byl přečištěn pomocí *PCR Purification Kitu* (JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN)) a následně byla provedena kontrola NTH2 na TBE agarosové elektroforéze.

#### 6.2.2.3. Štěpení insertu NcoI a BamHI

Pro zaklonování insertu NTH2 do vektoru pET-32b mezi místa pro restriční endonukleasy je nutné těmito endonukleasami štěpit i vzniklý insert NTH2. Reakční směs byla namíchána podle **Tab. 17.:**

**Tab. 17.:** Složení reakční směsi v mikrozkušavce pro štěpení insertu restričními endonukleasami NcoI a BamHI.

	množství	finální koncentrace v 50 µl PCR směsi
insert NTH2	43 µl	1,5 µg
10x NEB pufr 3	5 µl	10x méně než celkový objem
10000 U/ml NcoI	1 µl	10 U
20000 U/ml BamHI	1 µl	20 U
100x BSA 10 mg/ml	0,5 µl	5 µg

Tato reakční směs byla inkubována 15 hodin při 37 °C.

#### 6.2.2.4. Přečištění insertu pomocí PCR Purification Kitu

Výsledný štěpený insert byl přečištěn *PCR Purifikačním Kitem* (JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, SRN)) a eluován 35 µl TE pufru o teplotě 70 °C.

### 6.2.2.5. Ligace insertu

Ligace insertu NTH2 (2340 kb) štěpeného pomocí NcoI a BamHI restričních endonukleas do dvojité štěpeného vektoru pET-32b proběhla následovně:

6 µl insert DNA

2 µl pET-32b dvojité štěpeného (NcoI, BamHI)

1 µl 10x pufr

1 µl T4 DNA ligasy

Ligace probíhala 2 hod při teplotě místnosti, poté 15 hodin při 4 °C.

### 6.3. Transformace do kompetentních buněk

Transformace vektoru pET32-b se zaligovaným insertem NTH2 do kompetentních buněk *E. coli* Top10 s rezistencí na antibiotikum ampicilin byla provedena metodou teplotního šoku viz kap. 5.5.

### 6.4. Kultivace na pevném LB agaru

Buňky byly přeneseny na Petriho misky s pevným LB médiem temperované na teplotu 37 °C s rezistencí na ampicilin a chloramfenikol. Roztok bakterií byl sterilně rozetřen po celé ploše misky a vložen do inkubátoru nastaveného na 37 °C.

### 6.5. Izolace plasmidové DNA

Izolaci DNA popisuje kap. 5.6.

### 6.6. Kontrola pomocí LA DNA polymerasového mixu

Zda došlo k ligaci úspěšně a plasmid nese žádanou sekvenci DNA, je ověřeno pomocí LA DNA polymerasového mixu (TopBio) viz **Tab. 18**.

**Tab. 18.:** Složení reakční směsi v mikrozkušavce pro kontrolu izolované plasmidové DNA pomocí LA DNA polymerasového mixu.

	množství	finální koncentrace v 50 µl PCR směsi
250 ng/µl templátová DNA NTH2	1 µl	250 ng
10 mM primer NTH2 up	1 µl	200 µM
10 mM primer NTH2 down	1 µl	200 µM
10x LA PCR pufr	5 µl	
1,6 mM dNTP	2,5 µl	80 µM (každý dNTP)
PCR H <sub>2</sub> O	38 µl	
DMSO	1 µl	2 %
50 U/ml LA DNA polymerasy	0,5 µl	2,5 U

Program PCR reakce na termocycleru probíhal následovně:

1. fáze	94 °C	60 s
2. fáze	94 °C	15 s
3. fáze	61 °C	30 s
4. fáze	68 °C	4 min
5. fáze	4 °C	neomezeně dlouho

Cyklus fází 2-4 byl 30x opakován.

Složení 10x LA PCR reakčního pufru: 500 mM Tris-HCl, pH 9,3 (25 °C), 150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 % Tween 20, 22,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Výsledky PCR byly zkontrolovány prostřednictvím horizontální agarosové elektroforézy. Pozitivní PCR na gelu odpovídá velikosti inzertu NTH2 (2340 kb).

## 6.7. Sekvence DNA

Ověření úspěšného zaklonování inzertu NTH2 do vektoru pET-32b bylo provedeno ve spolupráci s Dr. J. Felsbergem z laboratoře Mikrobiologického ústavu AV ČR.

## 6.8. Cílená bodová mutagenese neutrální trehalasy 1 ve vektoru pET-32b

Cílená mutagenese cDNA NTH1 WT ve vektoru pET32-b s delecí 81 bp po sekvenci (6xH) SSGLVPRGS byla provedena následovně: bylo připraveno šest dvoubodových

mutantů, které obsahovaly vždy dva serinové zbytky S20+21, S20+83, S21+60, S21+83, S60+83 a čtyři jednobodové mutanty, které obsahovaly vždy pouze jeden serinový zbytek na pozicích 20 nebo 21 nebo 60 nebo 83, značeno S20, S21, S60 a S83. Nakonec byl připraven mutant Nth1, který neobsahoval žádný serinový zbytek na pozicích 20, 21, 60 a 83. Navržené oligonukleotidy (VBC-Genomics, Rakousko) jsou uvedeny v **Tab. 19**.

**Tab. 19.:** Navržené oligonukleotidy použité pro cílenou bodovou mutagenezi *Nth1*.

NTH1 S20A_up												
5'	cgt	caa	aga	aga	tta	<b><u>gca</u></b>	tca	cta	agt	gaa	ttc	3'
NTH1 S20A_down												
5'	gaa	ttc	act	tag	tga	<b><u>tgc</u></b>	taa	tct	tct	ttg	acg	3'
NTH1 S21A_up												
5'	caa	aga	aga	tta	tca	<b><u>gca</u></b>	cta	agt	gaa	ttc		3'
NTH1 S21A_down												
5'	gaa	ttc	act	tag	<b><u>tgc</u></b>	tga	taa	tct	tct	ttg		3'
NTH1 S60A_up												
5'	gt	acg	agg	act	atg	<b><u>gcg</u></b>	ggt	ttc	gat	aat	g	3'
NTH1 S60A_down												
5'	c	att	atc	gaa	aac	<b><u>cgc</u></b>	cat	agt	cct	cgt	ac	5'
NTH1 S83A_up												
5'	cag	act	aga	cgt	ggt	<b><u>gct</u></b>	gag	gat	gac	acc		3'
NTH1 S83A_down												
5'	ggt	gtc	atc	ctc	<b><u>agc</u></b>	acc	acg	tct	agt	ctg		3'
NTH1 S20A_S21A_up												
5'	caa	aga	aga	tta	<b><u>gca</u></b>	<b><u>gca</u></b>	cta	agt	gaa	ttc		3'
NTH1 S20A_S21A_down												
5'	gaa	ttc	act	tag	<b><u>tgc</u></b>	<b><u>tgc</u></b>	taa	tct	tct	ttg		3'

## 6.9. Transformace a exprese neutrální trehalasy 1 a 2

Pro expresi enzymu neutrální trehalasy 1 byly použity expresní buňky Rosetta, které jsou odvozené od kmenu BL21. Rosetta(DE3) buňky byly navrženy pro zvýšení exprese eukaryotických proteinů v prokaryotickém systému obsahující upravené tRNA kodony. Nth1 byla exprimována jako fúzní protein s thioedoxinovou a histidinovou kotvou na N-terminálním konci.

Transformace plasmidové DNA do buněk Rosetta(DE3) byla provedena metodou teplotního šoku viz kap. 5.5. Z Petriho misky byly sterilně přeneseny bakteriální kolonie do 5 ml tekutého LB média temperovaného na 37 °C s přidavkem ampicilinu o finální koncentraci 100 µg/ml a chloramfenikolu o finální koncentraci 34 µg/ml. Tato směs byla inkubována 15 hodin při teplotě 37 °C za konstantního třepání 200 rpm. Následně byla směs bakterií přenesena do 1 l tekutého LB média temperovaného na teplotu 37 °C s přidavkem ampicilinu o finální koncentraci 100 µg/ml a chloramfenikolu o finální koncentraci 34 µg/ml za konstantního třepání 200 rpm do té doby, než dosáhla hodnota optické density 0,6 při 600 nm vzhledem k čistému LB médiu. Expese byla indukována přidavkem 2,5 ml 0,2 mol.dm<sup>-3</sup> roztoku IPTG (finální koncentrace 0,5 mM). Inkubace bakteriální kultury probíhala po dobu 18 hodin při teplotě 25 °C za konstantního třepání 200 rpm. Napěstované buňky byly centrifugovány 30 min při 3400 rpm a teplotě 4 °C. Opatrně byl odstraněn supernatant a peleta buněk byla resuspendována ve 100 ml lyzačního pufru (viz. **Tab. 20**).

**Tab. 20.:** Složení lyzačního pufru použitého k resuspendaci peletu buněk Rosetta(DE3).

Finální koncentrace	
1 x PBS	10 ml
1 M NaCl	5,84 g
2 mM imidazol	13,6 mg
4 mM β-merkptoethanol	28 µl

Resuspendované buňky byly uloženy do -80 °C, protože zamrazení napomáhá narušení bakteriální buněčné stěny.



## 6.10. Purifikace neutrální trehalasy 1

### 6.10.1. Sonikace

Popis metody viz kap. 5.9.1. Buňky byly po rozmrazení inkubovány 20 minut s lysesymem (fin. konc. 100  $\mu\text{l/ml}$ ) při teplotě 4 °C. Těsně před sonikací byl přidán 1 ml 0,1 M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluorid; inhibitor serinových proteas) a jedna rozpuštěná tableta Inhibitor proteas v 1 ml pufru E (složení viz **Tab. 21**).

**Tab. 21.:** *Složení pufru E použitého při sonikaci Nth1.*

---

#### **Pufr E**

1x PBS

0,5 M NaCl

2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol

1 mM imidazol

---

Nastavení programu sonikátoru:

3 s ON

17 s OFF

celkem 15 minut

Po sonikaci následovala centrifugace: 13500 rpm, 45 minut, 4 °C a zamrazení do -80 °C.

### 6.10.2. Chelatační afinitní chromatografie

Princip a postup metody viz kap. 5.9.2. Po přidavku sonikátu na kolonku byl navázaný sonikát promyt 400 ml pufru E (složení pufru E viz **Tab. 21**).

### 6.10.3. Dialýza

Po eluci požadovaného proteinu byla ověřena jeho přítomnost a čistota pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.9.3). Protein byl vložen do dialyzační membrány a ponechán dialyzovat proti pufru viz kap. 5.9.4.

#### 6.10.4. Thrombinové štěpení

Pro odstranění histidinové a thioredoxinové kotvy z N-terminálního konce fúzní Nth1 bylo provedeno štěpení lidským thrombinem (Sigma-Aldrich, USA). Na 1 mg proteinu bylo použito 5 U thrombinu, které bylo přidáno ke vzorku do dialyzační membrány. Dialýza probíhala po dobu 8 hodin za konstantního míchání při teplotě 4 °C. Složení dialyzačního pufru použitého pro odštěpení histidinové a thioredoxinové kotvy pomocí thrombinu bylo 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % glycerol. Po 8 hodinách byla dialyzační membrána přendána do pufru E obsahující 50 mM kyselinu citronovou, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 6, pro kationtovou výměnu (O/N, 4 °C). Kontrola thrombinového štěpení byla provedena pomocí metody SDS-PAGE. Lidský thrombin byl odstraněn pomocí benzamidinové kolony, která byla nejprve promyta puftrem z dialýzy, a poté byl na ní nanesen vzorek.

#### 6.10.5. Kationtově výměnná chromatografie

Pokud je  $pH < pI$ , bílkovina nese kladný náboj a separujeme ji na katexu. Nth1 s odstraněnou thioredoxinovou a histidinovou kotvou má  $pI$  7,69 (ProtParam, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Kationtová výměna probíhala v prostředí o pH 6 (pufr E, F viz **Tab. 22**) na koloně o objemu 1 ml s náplní MonoS Sepharosou (Amersham, Biosciences, Švédsko) připojenou na přístroj HPLC AKTAprime<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences). Data byla zaznamenána pomocí programu Unicorn 5.01. Vzorky byly nanášeny na kolonu ekvilibrovanou v pufru E (pH 6) při rychlosti průtoku 1 ml/min. Eluce probíhala lineárním gradientem NaCl od 0 do 1 M NaCl (0-100 %).

**Tab. 22.:** Složení pufru E a F použitého při kationtově výměnné chromatografii.

<b>Pufr E, pH 6</b>	<b>Pufr F</b>
50 mM kyselina citronová	50 mM kyselina citronová
1 mM EDTA	1 mM EDTA
2 mM DTT	2 mM DTT
	1 M NaCl

### **6.10.6. Gelová permeační chromatografie**

Princip metody je popsán v kap. 5.9.8. Gelová permeační chromatografie byla provedena na přístroji HPLC AKTAprime<sup>TM</sup> (Amershan Biosciences, Švédsko) s náplní kolony Superdex 200 (Amershan Biosciences, Švédsko). Kolona byla proplachována pufrům (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 2 mM DTT) rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Koncentrace proteinů byly stanoveny spektrofotometricky pomocí měření absorbance při vlnové délce 280 nm na přístroji Agilent. Extinkční koeficient při vlnové délce  $\lambda = 280$  nm byl stanoven pomocí programu ProtParam tool na serveru [www.expasy.org](http://www.expasy.org) a udává hodnotu  $1,494 \text{ dm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Hodnota relativní molekulové hmotnosti pro Nth1 WT je 86 kDa.

### **6.11. Fosforylace neutrální trehalasy 1**

Fosforylace Nth1 WT a všech mutantních forem probíhala 2 hod při 30 °C a následně 15 hod při 4 °C s 80 U PKA/ mg proteinu (Promega) za přítomnosti 0,75 mM ATP a 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

### **6.12. Exprese a purifikace proteinů 14-3-3**

Exprese a purifikace obou kvasničných isoform je popsána v kap. 5.7. až 5.9.8.

### **6.13. Analytická ultracentrifugace**

Princip metody sedimentační analýzy je popsán v kap. 5.15. Sedimentačně rychlostní experimenty byly provedeny na přístroji ProteomLab XL-I (Beckman Coulter) s rychlostí rotoru 42000 a 48000 rpm při teplotě 20 °C. Data byla měřena při vlnové délce 280 nm. Koncentrace proteinů Bmh1, Bmh2, Nth1 WT a Nth1 mutantních forem se pohybovala v rozmezí od 0,5-10  $\mu\text{M}$ . Vzorky proteinu byly dialyzovány proti pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl a 2 mM  $\beta$ -merkptoethanol. Data byla analyzována pomocí programu SEDFIT a SEDPHAT (Houtman, J. C. et al., 2007, Schuck, P. 2000).

#### 6.14. Analýza neutrální trehalasy 1 pomocí hmotnostní spektrometrie

Vzorky Nth1 WT a jejích mutantních forem byly separovány pomocí 8 % SDS-PAGE. Příslušné proteinové pásy byly štěpeny trypsinovou endoproteasou (Promega) přímo na gelu s modifikací cysteinu iodoacetamidem. Výsledná směs peptidů byla extrahována 30 % acetonitrilem a 0,1 % trifluoroctovou kyselinou. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla provedena na přístroji UltraFLEX III (Bruker Daltonics, Bremen, Německo) vybaveným dusíkovým laserem (337 nm).

#### 6.15. Limitovaná proteolýza

Vzorky obsahující 50 µg Nth1 nebo pNth1 a 30 µg Bmh (molární poměr Nth1:Bmh je 1:2) byly inkubovány při 25 °C s 50 ng trypsinu nebo chymotrypsinu (w/w poměr proteasy a proteinu byl přibližně 1:1000) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % w/v glycerol. Reakce byla zastavena varem v přítomnosti SDS-PAGE vzorkového pufru v časových intervalech 0-30 min. Výsledné polypeptidy byly separovány na 10 % SDS-PAGE a vizualizovány barvicím roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250.

#### 6.16. Měření enzymové aktivity

Enzymová aktivita byla měřena pomocí komerčního kitu **Amplex red glucose assay kit** (Molecular Probes). V měření byla stanovována koncentrace glukosy získané degradací neredukujícího disacharidu trehalosy. Měření byla prováděna při teplotě 30 °C v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 % w/v glycerol s 0-30 mM roztokem trehalosy. Finální koncentrace Nth1 a Bmh proteinů v pokusech *in vitro* byly 80 nM a 12 µM. Reakční objem byl 50 µl. 40 µl proteinu (Nth1 nebo směs Nth1 s Bmh) bylo inkubováno 5 min ve vodní lázni o teplotě 30 °C. Poté bylo přidáno 10 µl roztoku trehalosy o určité koncentraci, promícháno a vloženo do vodní lázně, kde probíhala inkubace po dobu 30 s. Reakce byla zastavena varem (100 °C) mikrozkuřavky po dobu 3 min. Následně bylo napipetováno do každé mikrozkuřavky 50 µl roztoku Amplexu určeného pro detekci uvolněné glukosy. Tato směs byla inkubována 40 min při 37 °C. Pro vyhodnocení dat byly proměřeny absorbance při 571 nm. Data byla fitována podle rovnice Michaelis-Mentenové použitím programu Origin 8.0 (OriginLab Corp., USA).

## 6.17. Konstrukce plasmidu pro pokusy aktivace Nth1 *in vivo*

### 6.17.1. Používané vektory

Kvasničné episomální plasmidy (YEp) obsahují počátky replikace z tzv. 2 $\mu$  DNA plasmidu (kvasinkový plasmid) (Fusek, M. et al., 2008).

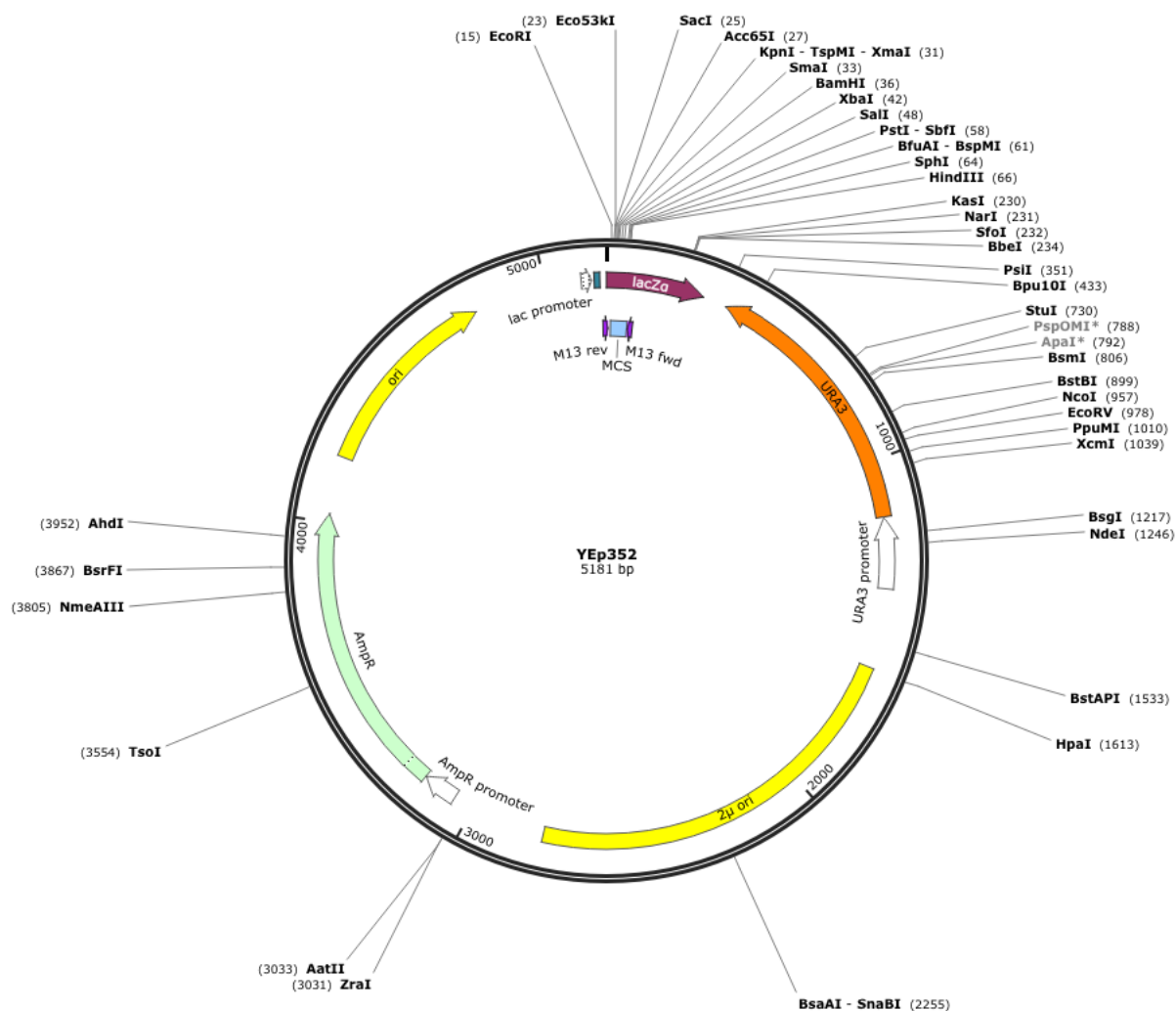
V pokusech *in vivo* byl používán expresní vektor YEp352 (5181 bází) linearizovaný restriční endonukleasou PstI, do kterého byla zaklonována cDNA kódující Nth1 WT, Nth1 S60, Nth1 S83, Nth1 S20+21 a Nth1 NoS za oblast NHA1 promotoru. Vektory byly konstruovány výměnou ScNHA 1 genu za ScNTH1 gen v oblasti pNHA1-985. Výsledné plasmidy byly transformovány do kmene *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 s delecí ydr001c (Nth1D): genotyp MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$  met15 $\Delta$  ura3 $\Delta$  ydr001c::kanMX4 (EUROSCARF).. Jako auxotrofní selekční znak byl využit gen URA3. DNA kódující Nth1 WT (2253 bází) a Nth1 S60, 883, S20+21, NoS byla amplifikována z vektoru pET32-b pomocí navržených primerů YEpN-NTH1-F a YEpN-NTH1-R viz **Tab. 23**.

**Tab. 23.:** Navržené oligonukleotidové primery použité pro amplifikaci DNA z vektoru pET-32b.

---

YEpN-NTH1-F															
5'	gta	cat	tat	aaa	aaa	aaa	tcc	tga	act	tag	cta	gat	att	3'	
YEp-N-NTH1-R															
5'	cac	gac	gtt	gta	aaa	cga	cgg	cca	gtg	cca	agc	ttg	cat	g	3'

---



**Obr. 15.:** Mapa vektoru *YEp-352* použitého pro zaklonování *Nth1* cDNA (<http://www.snapgene.com>).

### 6.17.2. Příprava buněk

BY4741 s delecí YDR001c (*NTH1*) byly přeneseny sterilní kličkou na misku a „rozkličkovány“. Buňky rostly při teplotě 30 °C. Do 80 ml YPD média byla naočkována sterilně 1 kolonie z narostlé misky – kmen BY4741 s delecí *NTH1*. Poté byla směs temperována na 30 °C za konstantního třepání 15 hodin.

YPD je bohaté médium, tekuté – bez agaru:

- 1 % Yeast extract
- 2 % Bactopecton

## 2 % Glukosa

80 ml narostlé kultury ( $OD_{600}$  0,6-0,7 Spekol 211,  $OD_{600}$  1,8-2,2 BioPhotometer Epp.) bylo centrifugováno 3 min při 4000 rpm a teplotě 24 °C. Peleta buněk byla promyta sterilní destilovanou  $H_2O$  a centrifugována 3 min při 4000 rpm a teplotě 24 °C. Následně byla peleta resuspendována do 8 ml 25 mM DTT v  $H_2O$  a inkubována při teplotě 23 °C za konstantního třepání 15 minut. Od této chvíle bylo pracováno na ledu (0 °C). Po této inkubaci byl roztok pelet centrifugován, promyt 1x ledovou sterilní destilovanou  $H_2O$ , centrifugován, promyt 1x ledovým TpEB pufrem (5 ml), opět centrifugován a resuspendován do 800  $\mu$ l elektroporačního pufru TpEB a vložen do ledu. Tímto byly buňky připraveny pro transformaci elektroporací.

TpEB = elektroporační pufr

Tris-HCl 10 mM pH 7,5

MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM

sacharosa 270 mM

### 6.17.3. Příprava insertu NTH1

#### 6.17.3.1. Amplifikace inzertu pomocí PCR

Princip metody PCR je popsán v kap. 5.2.

PCR: 10 $\mu$ l pufru 5x	PROGRAM: 98 °C 1min
1 $\mu$ l dNTP (10 mM)	98 °C 10s
1 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	50 °C 30s
2,5 $\mu$ l oligo 1	72 °C 3min – 2253 bazí
2,5 $\mu$ l oligo 2	72 °C 10min
28,5 $\mu$ l sterilní $H_2O$	4 °C hold (krok 1-4 byl 30x opakován)
4 $\mu$ l templátové DNA	
+ 0,5 $\mu$ l Phusion High Fidelity DNA Polymerase (FINNENZYMES, kód F-530)	

### **6.17.3.2. TBE agarosová elektroforéza**

Kontrola amplifikovaných inzertů Nth1 (WT a mutantních forem) byla provedena pomocí 1 % TBE agarosové elektroforézy smícháním 0,35 g agarosy s 35 ml 1x TBE pufru. Popis metody a složení 1x TBE pufru je uvedeno v kap. 5.4.

### **6.17.4. Příprava vektoru**

#### **6.17.4.1. Štěpení vektoru YEp-352 pomocí enzymu PstI:**

Vektor YEp-352 byl štěpen pomocí enzymu PstI následovně:

10 µl vektoru Yep-352 (0,245 µg/µl)

10 µl pufru 10x

2 µl enzymu PstI

78 µl sterilní H<sub>2</sub>O

Reakční směs byla inkubována 1 hod při 37 °C, poté byly přidány další 2 µl enzymu PstI a inkubace pokračovala 1 hod. při 37 °C.

#### **6.17.4.2. Přečištění štěpeného vektoru YEp-352/PstI**

Přečištění naštěpeného vektoru bylo provedeno pomocí kitu od Promegy (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System).

### **6.17.5. Příprava minimálního média YNB**

Minimální médium je označeno jako minimální proto, proto že neobsahuje žádné aminokyseliny. Minimální médium bylo připraveno podle následujícího protokolu:

YNB-NH<sub>4</sub>

0,67 % YNB w/o

2 % Glukosa

2 % Agar



Bylo připraveno 10 Petriho misek (jedna miska je cca 20 ml):

1,34 g YNB

4 g Glukosy

200 ml dest. H<sub>2</sub>O

4 g Agarů

Výsledná směs byla uzavřena alobalem a vysterilizována. Po sterilizaci bylo před naléváním na misky sterilně přidáno 800 µl zásobních roztoků (5 mg/ml) His, Met, Leu a zamícháno (fin. konc. je 20 µg/ml).

#### **6.17.6. Transformace *Saccharomyces cerevisiae* elektroporací**

Transformace *Saccharomyces cerevisiae* elektroporací byla provedena na přístroji Jouan při nastavení 625 V, 24 msec. Do elektroporační kyvety bylo napipetováno 100 µl buněk a přidáno 0,3 µg plasmidu: štěpený vektor + plasmid, pouze štěpený vektor (negativní kontrola), pouze neštěpený vektor (pozitivní kontrola). Při elektroporaci byla dosucha otřená kyveta umístěna do sáněk přístroje a spuštěn puls, který vystaví buňky elektrickému šoku, což umožňuje vniknutí cizorodé DNA do buněk tím, že se krátkodobě depolarizuje buněčná membrána. Poté bylo okamžitě přidáno 100 µl ledové sterilní H<sub>2</sub>O a směs byla inkubována při laboratorní teplotě 15 min. Transformované buňky byly rozetřeny na misky s YNB médiem pomocí sterilních skleněných kuliček. Misky byly inkubovány 2 dny při teplotě 30 °C. Z narostlých misek byla odebrána vždy 1 kolonie a naočkována na půlku misky. Buňky rostly 2 dny při 30 °C.

Následně bylo naočkováno YNB-AHLT médium (+ His, Met, Leu) sterilní kličkou: do 40 ml YNB-AHLT bylo přidáno 160 µl His, 160 µl Met, 160 µl Leu (zás. roztok je 5 mg/ml, fin. konc. je 20 mg/ml) a sterilně rozpipetováno po 2 ml do sterilních plastových zkumavek, které byly naočkovány a inkubovány za konstantního třepání ve vodorovné poloze 15 hod při teplotě 30 °C.

### 6.17.7. Izolace pDNA z kvasinek

Z narostlé kultury bylo odebráno 1,5 ml kultury do mikrozkušavky a odstředěno v centrifuze asi 1,5 min při 5000 rpm. Supernatant byl opatrně slit a zbytek kultury byl zvortexován a k němu přidán:

0,2 ml TSN (pH 8)  
0,2 ml fenol-chloroform-izoamylalkohol  
0,3 g acid washed glass (kuličky)

TSN: 2 % Triton X-100  
1 % SDS  
100 mM NaCl  
10 mM TRIS pH 8  
1 mM EDTA

Směs byla vortexována 1 min, ochlazená na ledu a opět vortexována 1 min. Poté byla směs centrifugována 5 min při 14 000 rpm a teplotě 4 °C. Mikropipetou byla odebrána horní vrstva (fenol zůstal ve zkumavce), vložena do druhé řady mikrozkušavek a přidán isopropanol o stejném objemu, jako byl v mikrozkušavce. Směs byla zamíchána překlopením a zamrazena (-20 °C) na 10 min. Poté byla směs centrifugována 15 min při 4 °C a 14 000 rpm. Supernatant byl opatrně slit, peleta osušena, promyta 80 % EtOH a centrifugována 2 minuty na nejvyšší rychlost. Opět byl odlit supernatant, vysušena peleta v termobloku (mikrozkušavky byly ponechány otevřené ve vodorovné poloze) při 37 °C, 15 min. Nakonec bylo do mikrozkušavek přidáno 20 µl H<sub>2</sub>O a zamícháno. Výsledná cDNA byla použita na elektroporaci a zamrazena (-20 °C).

Před elektroporací byl puštěn kontrolní PCR:

6 µl PPP Master Mix  
1 µl plasmidové DNA  
4 µl H<sub>2</sub>O  
0,5 µl oligo 1 – NHA1-2 (10 mM)  
0,5 µl oligo 2 – 15DOWN (10 mM) (oligonukleotidy viz **Tab. 24**).

Program PCR reakce na termocycleru probíhal následovně:

1. fáze	94 °C	2 min
2. fáze	94 °C	1 min
3. fáze	55 °C	1 min
4. fáze	72 °C	3 min
5. fáze	72 °C	10 min

Cyklus fází 2-4 byl 30x opakován.

**Tab. 24.:** Oligonukleotidy použité pro kontrolní PCR.

---

**NHA1-2**

5' gtt gac cag gtc ata caa gag 3'

**15DOWN**

5' acg gcc ttg ggc tac cgg tcc 3'

---

### 6.17.8. Transformace *E. coli* elektroporací

Do *E. coli* transformujeme kvůli sekvenaci (výhodou replikace v *E. coli* je dostatečné namnožení plasmidové DNA, která může být následně vnesena do eukaryotických buněk. U *S. cerevisiae* se vytvoří cca jen 20 kopií na buňku).

Kompetentní buňky XL Blue byly roztáty v ledu, kde byly temperovány elektroporační kyvety a LB médium. Do elektroporačních kyvet bylo napipetováno po 40 µl buněk a asi 1 µl DNA (pDNA ~ 10 – 50 pg). Směs byla opatrně promíchána na ledu. Elektroporace proběhla na přístroji Jouan s nastavením 1250 V, 8 msec. Při elektroporaci byla dosucha otřená kyveta umístěna do sáněk přístroje a spuštěn puls. Okamžitě bylo přidáno 100 µl ledového LB média. Tato směs byla inkubována asi 10 min při laboratorní teplotě. Transformované buňky byly rozetřeny na misky LB-Amp a inkubovány 15 hod při 37 °C. Z narostlých kolonií byly naočkovány miniprepy (LB-Amp) a inkubovány 15 hod při 37 °C. Poté byla izolována plasmidová DNA viz kap. 5.6 a vzorky byly osekvenovány (viz. kap. 6.7.).

### 6.17.9. Aktivace neutrální trehalasy 1 *in vivo*

Buňky exprimující Nth1 WT a příslušné mutantní formy (Nth1 S60, Nth1 S83, Nth1 S20+21, Nth1 NoS) rostly do exponenciální fáze (při  $OD_{600}$ : 1,5-2) na minimálním médiu YNB obsahujícím směs aminokyselin His, Met, Leu a 2 % glycerol. Buňky byly nejprve centrifugovány, promyty ledovou vodou a resuspendovány v pufru obsahujícím 100 mM MES/KOH (pH 7) a 50 mM  $CaCl_2$  na finální hustotu buněk 25 mg/ml. Před prvním odebráním vzorku byly buňky preinkubovány při 30 °C po dobu 10 minut. Aktivace neutrální trehalasy byla spuštěna glukosovým přídatkem (fin. konc. 4 % w/v). Vzorky o objemu 750  $\mu$ l byly odebrány před glukosovým přídatkem a po 10 min po přídatku glukosy. Ke každému vzorku bylo ihned po odebrání přidáno 40 ml ledové sterilní vody. Následně byly buňky centrifugovány 3 min při 4 °C. Peleta buněk byla resuspendována v 500  $\mu$ l ledového pufru obsahujícího 50 mM MES/KOH (pH 7) a 50  $\mu$ M  $CaCl_2$ . Buňky byly rozrušeny třepáním se skleněnými kuličkami. Enzymový extrakt byl centrifugován v mikrocentrifuze 3 min při 13000 rpm a teplotě 4 °C. Výsledný supernatant byl dialyzován proti pufru obsahujícím 5 mM MES/KOH (pH 7) a 50  $\mu$ M  $CaCl_2$  15 hod při 4 °C. Koncentrace všech rozpustných proteinů byly stanoveny metodou podle Bradforda.

Trehalosová esej byla provedena následovně: 40  $\mu$ l dialyzovaného extraktu bylo inkubováno 30 min při 30 °C s 30 mM roztokem trehalosy. Reakce byla zastavena povařením po dobu 3 min při 100 °C. Uvolněná glukosa byla měřena pomocí ***Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit*** (Invitrogen). Specifická aktivita trehalasy byla vyjádřena jako nmol glukosy uvolněné za 1 min na 1 mg proteinu.

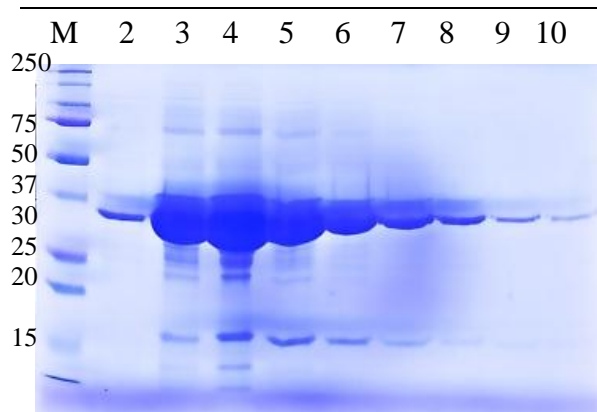
## 7. Výsledky

### ODDÍL A

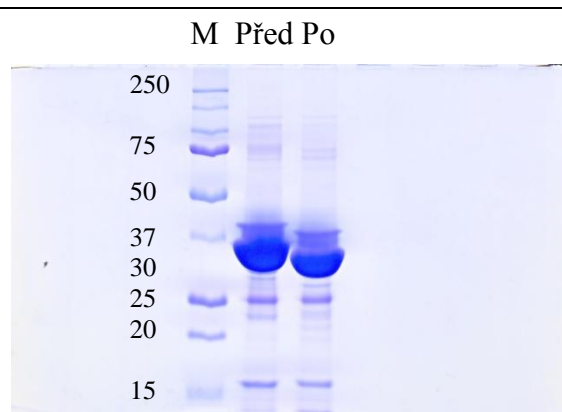
#### 7.1. Expresa a purifikace proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 značené na N-konci histidinovou kotvou byly exprimovány v buňkách *E. coli* BL21(DE3). Expresa byla zahájena induktorem IPTG po dobu 15 hod. při 37 °C viz kap. 5.7. Výsledné gely z purifikace jsou uvedeny v **Tab. 25.**

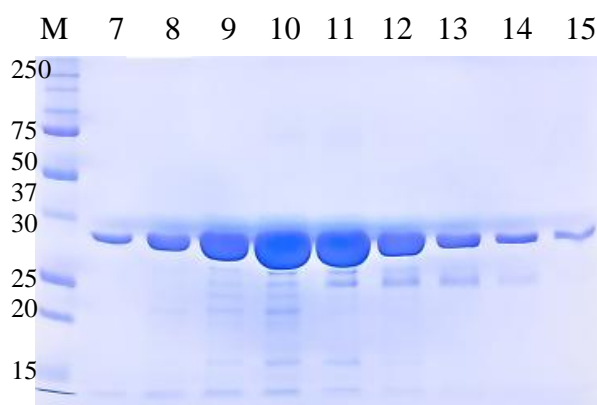
**Tab. 25.:** 12 % SDS-PAGE gely proteinů 14-3-3 získané jejich purifikací. M je označení pro marker molekulových hmotností.



12 % SDS-PAGE gel mutantní formy Bmh2 W243 ukazující frakce získané elucí při chelatační afinitní chromatografii.



12 % SDS-PAGE gel demonstrující frakce Bmh2 W243 před a po thrombinovém štěpení.



12 % SDS-PAGE gel demonstrující frakce Bmh2 W243 získané elucí aniontově výměnnou chromatografií.



12 % SDS-PAGE gel představující frakce Bmh2 W243 získané elucí při gelové permeační chromatografii.

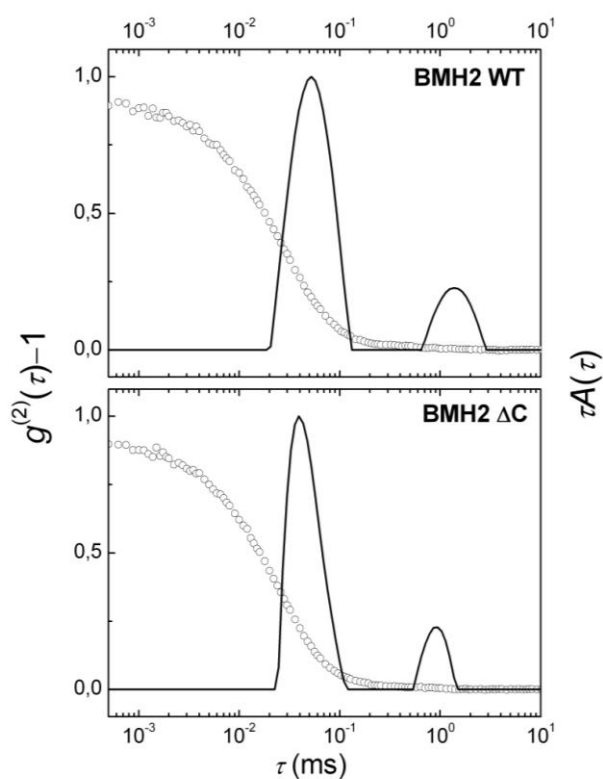
Afinita dvojmocných kationtů kovů  $\text{Ni}^{2+}$  k histidinům obsaženým v histidinové kotvě proteinů 14-3-3 byla využita při chelatační afinitní chromatografii. Následně byla histidinová kotva odstraněna inkubací s lidským thrombinem v poměru 2U/mg proteinu.

Po odštěpení His-tagu byly proteiny 14-3-3 purifikovány pomocí aniontově výměnné chromatografie na koloně s náplní MonQ Sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko). Proteiny 14-3-3 byly eluovány 0-1 M gradientem NaCl v prostředí 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM DTT. Požadované frakce proteinu získané elucí na aniontově výměnné chromatografii byly zkoncentrovány pomocí koncentrátoru Centricon YM-10. K přečištění a odstranění agregovaných proteinů byla použita gelová permeační chromatografie na přístroji HPLC AKTAprime™ (Amersham Biosciences, Švédsko) s náplní kolony Superdex 75.

## 7.2. Dynamický rozptyl světla

K porovnání velikosti molekul Bmh proteinů ve srovnání s lidskou 14-3-3 $\zeta$  isoformou a jejich verzí s odstraněnými C-koncovými segmenty byla použita, jako jedna z technik, metoda dynamického rozptylu světla. Měření dynamického rozptylu světla bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Štěpánkem, Ph.D. z katedry Fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, který provedl všechna DLS měření a vyhodnocení výsledků podle metody popisované v kap. 5.13. na přístroji ALV, Langen, Německo, který je složen z 22 mW He-Ne laseru pracující při vlnové délce  $\lambda = 632,8$  nm, ALV CGS/8F goniometru, ALV High QE APD detektoru a ALV 5000/EPP autokorelátoru. Měření byla provedena při teplotě 25 °C a úhlu  $\theta = 90^\circ$ . Všechny vzorky byly měřeny ve čtyřech různých koncentracích (4, 2, 1 a 0,5 mg/ml) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol.

Výsledný graf a hodnoty hydrodynamických poloměrů jsou zaznamenány na **Obr. 16.** a **Tab. 26.** Menší vrcholy v pravé části grafu Bmh2 WT i Bmh2  $\Delta$ C mohou být připisány difuzi agregovaných proteinů. Z posunu  $A(\tau_r)$  ke kratším relaxačním časům plyne menší  $R_H$  molekuly, což je patrné po odstranění C-terminální části Bmh2 proteinu viz **Obr. 16.**



**Obr. 16.:** Autokorelační funkce  $g^2(\tau)$  proteinů *Bmh2* WT a *Bmh2*  $\Delta C$  získané metodou dynamického rozptylu světla a odpovídající funkce relaxačních distribučních časů získané pomocí CONTIN analýzy (Veisova, D. et al., 2010).

Hodnoty hydrodynamických poloměrů naměřené metodou dynamického rozptylu světla jsou shrnuty v **Tab. 26**. Hydrodynamický poloměr molekuly *Bmh1* WT a *Bmh2* WT je 45 a 43 Å. Hydrodynamické poloměry *Bmh* proteinů s odstraněným C-koncovým segmentem ( $\Delta C$ ) jsou přibližně 36-38 Å, což jsou hodnoty srovnatelné pro lidskou isoformu 14-3-3 $\zeta$  WT.

**Tab. 26.:** Hodnoty hydrodynamických poloměrů proteinů 14-3-3 získané měřením dynamického rozptylu světla a sedimentačně rychlostních experimentů (Veisova, D. et al., 2010).

Protein	BMH1 WT	BMH1 $\Delta C$	BMH2 WT	BMH2 $\Delta C$	14-3-3 $\zeta$ WT	14-3-3 $\zeta$ $\Delta C$
$R_H$ , Å (DLS)	44.9 ± 0.9	36.0 ± 0.4	43.3 ± 0.4	37.9 ± 0.3	37.3 ± 0.3	34.6 ± 0.2
$R_H$ , Å (SV)	40.0 ± 1.0	35.2 ± 0.8	40.9 ± 0.8	34.1 ± 0.7	37.6 ± 0.6	33.0 ± 1.0

Odstraněním C-koncové části 14-3-3 $\zeta$  isoformy ( $\Delta C$ ) byla získána hodnota hydrodynamického poloměru 35 Å. Tato hodnota se příliš neliší od hodnoty isoformy s C-koncovým segmentem, což je v souladu s dřívějšími studiemi, které pojednávají o autoinhibiční funkci C-koncové oblasti lidské isoformy 14-3-3 $\zeta$ .

Z naměřených dat vyplývá, že odstraněním C-koncových segmentů kvasničných isoform proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 WT se významně sníží jejich hydrodynamický poloměr.

### 7.3. Časově rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence

Pro ověření natažené konformace C-koncového segmentu kvasničných isoform vyplývající z dat dynamického rozptylu světla, gelové permeační chromatografie a sedimentační analýzy byl studován vliv vazby fosforylovaného peptidu na mobilitu C-koncového segmentu Bmh2 proteinu pomocí tryptofanové fluorescence. Tryptofan je přirozeně se vyskytující fluorofor aminokyselin absorbující záření v blízké UV oblasti 250-300 nm vhodný pro studium struktury bílkovin.

Měření časově rozlišeného dohasínání anizotropie bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. z Fyzikálního ústavu UK Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kteří provedli všechna časově rozlišená měření a vyhodnocení výsledků podle metody popisované v kap. 5.12. na fluorimetru, který se skládal z femtosekundového Ti safírového laseru (Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP), detektoru založeného na čítání jednotlivých fotonů (single photon counting detector) a fotonásobiče (Hamamatsu, Japan, R3809U-50).

Přirozeně se vyskytující tryptofany na pozicích 61 a 233 byly pomocí cílené mutagenese zaměněny za fenylalaniny a vloženy nové tryptofanové zbytky na dvě různé pozice C-terminálního segmentu: na pozici 243 před polyQ opakování nebo na pozici 264 za polyQ opakování Bmh2. Výsledná data časově rozlišeného dohasínání intenzity a anizotropie tryptofanové fluorescence jsou uvedeny v **Tab. 27** a naznačují, že vazba peptidu nepůsobí dramatické konformační změny C-koncového segmentu Bmh2 proteinu, protože nedochází k významnému poklesu střední doby života excitovaného stavu  $\tau_{mean}$ .



**Tab. 27.:** Výsledky měření časově rozlišené tryptofanové fluorescence jednobodových tryptofanových mutantů Bmh2 proteinu (Veisova, D. et al., 2010).

Vzorek	$\tau_{mean}$ (ns)	$\beta_1$	$\Phi_1$ (ns)	$\beta_2$	$\Phi_2$ (ns)	$\beta_3$	$\Phi_3$ (ns)
BMH2w243	2.92	0.023	0.2	0.109	1.1	0.088	$\infty$
BMH2w243 + pRaf-259	2.89	0.022	0.3	0.113	1.1	0.087	$\infty$
BMH2w264	3.65	0.077	0.3	0.103	1.2	0.042	$\infty$
BMH2w264 + pRaf-259	3.52	0.069	0.2	0.114	1.2	0.039	$\infty$

Výsledky dále naznačují, že vazba ligandu má zanedbatelný efekt na anizotropii fluorescence. Nepatrný rozdíl se nachází při interakci Bmh2 W264 s peptidem pRaf-259, kdy jsou potlačeny rychlé pohyby charakterizované amplitudou  $\beta_1$  a pozitivně ovlivněny segmentální pohyby charakterizované amplitudou  $\beta_2$ . Změny dynamiky proteinu Bmh2 W243 nejsou významné. Díky krátké době života excitovaného stavu tryptofanových zbytků nebylo možné určení rotačně korelačního času  $\phi_3$  charakterizující rotaci celé molekuly.

Metoda časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence AEDANS-značených proteinů byla použita k porovnání velikosti molekul Bmh proteinů se 14-3-3 $\zeta$  isoformou. Střední doba života excitovaného stavu dansylové skupiny je mnohem delší v porovnání se střední dobou života tryptofanu. Molekuly Bmh proteinů byly označeny derivátem dansylu 1,5-IAEDANS na cysteinový zbytek na pozici 194. Relativně dlouhá střední doba života excitovaného stavu dansylové skupiny (13-16 ns) umožnila monitorování rotačně korelačního času  $\phi_3$  odpovídajícímu rotaci celé molekuly. Naměřené hodnoty rotačně korelačních časů a příslušných amplitud jsou shrnuty v **Tab. 28**.

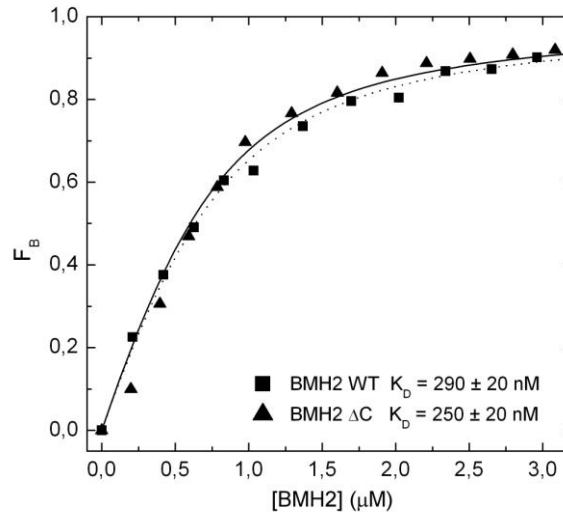
**Tab. 28.:** Hodnoty amplitud  $\beta$  a rotačně korelačních časů  $\phi$  získaných měřením časově rozlišené fluorescenční spektroskopie proteinů značených sondou AEDANS. Tučně jsou označeny amplitudy a rotačně korelační časy celé molekuly. Rotačně korelační čas  $\phi_4$  náleží frakci extrémně pomalé rotace velkých agregátů, které byly v minimálním množství přítomny ve vzorku. Střední doba života excitovaného stavu dansylové skupiny již neumožňuje měření  $\phi_4$  (Veisova, D. et al., 2010).

Protein	$\beta_1$	$\Phi_1$ (ns)	$\beta_2$	$\Phi_2$ (ns)	$\beta_3$	$\Phi_3$ (ns)	$\beta_4$	$\Phi_4$ (ns)
BMH1 WT	0.048	0.8	0.047	3.6	<b>0.048</b>	<b>19</b>	0.027	$\infty$
BMH1 $\Delta$ C	0.047	0.7	0.045	2.6	<b>0.060</b>	<b>14</b>	0.019	$\infty$
BMH2 WT	0.032	0.7	0.044	3.5	<b>0.059</b>	<b>20</b>	0.029	$\infty$
BMH2 $\Delta$ C	0.046	0.8	0.035	2.9	<b>0.060</b>	<b>12</b>	0.034	$\infty$
1433 $\zeta$ WT	0.035	0.8	0.037	3.0	<b>0.063</b>	<b>15</b>	0.035	$\infty$
1433 $\zeta$ $\Delta$ C	0.031	0.8	0.043	3.0	<b>0.064</b>	<b>15</b>	0.026	$\infty$

Z naměřených dat plyne, v souladu s výsledky z DLS měření, že nativní Bmh proteiny jsou výrazně větší nebo významně asymetričtější než Bmh isoformy s odstraněným C-koncovým segmentem. Odstranění C-koncového segmentu u 14-3-3 $\zeta$  isoformy nemá na velikost molekuly významný vliv.

#### 7.4. Měření stacionární anizotropie fluorescence

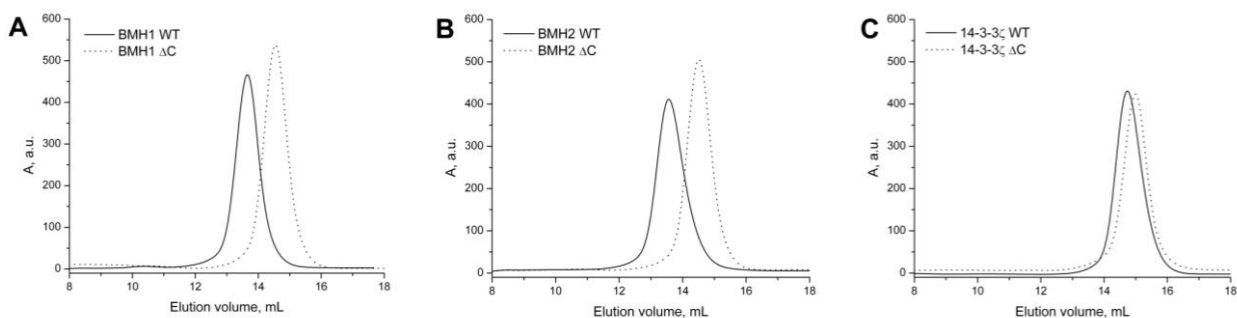
pRaf-259 je uměle nasyntetizovaný fosfopeptid obsahující sekvenci Raf-1 kinasy s okrajovým Ser259, který je součástí vazebného motivu proteinů 14-3-3. Bmh WT proteiny interagují s pRaf-259 o  $K_D \sim 290$  nM viz **Obr. 17**. Odstranění C-terminálního segmentu nemělo významný vliv na vazebnou afinitu Bmh2 proteinů studovanou pomocí stacionární anizotropie fluorescence.



**Obr. 17.:** Charakterizace vazebných vlastností Bmh2 proteinu pomocí stacionárního měření anizotropie fluorescence. Vazebná esej byla provedena s peptidem pRaf-259 značeném na N-konci fluoresceinem. Hodnoty  $K_D$  byly vypočteny podle rovnice 3.

## 7.5. Gelová permeační chromatografie

Eluční profily získané gelovou permeační chromatografií potvrzují data naměřená metodami DLS a časově rozlišeným dohasínáním anizotropie fluorescence. Molekuly Bmh1 WT a Bmh2 WT byly z kolony eluovány výrazně dříve oproti jejich formám s C-odstraněnými koncovými segmenty Bmh1 ΔC a Bmh2 ΔC, jejichž eluční profily jsou srovnatelné s profily 14-3-3ζ WT a 14-3-3ζ ΔC viz **Obr. 18**.



**Obr. 18.:** Eluční profily získané metodou gelové permeační chromatografie. SEC pokusy byly provedeny na koloně Superdex 200 HR 10/30 (Amershan Biosciences, Švédsko), v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA a 5 mM DTT. Všechny

experimenty probíhaly při teplotě 4 °C a rychlosti průtoku 0,5 ml/min (Veisova, D. et al., 2010).

Všechny dosud naměřené výsledky naznačují, že Bmh proteiny jsou v porovnání s lidskou 14-3-3ζ isoformou významně větší. Odstraněním C-konce Bmh proteinů dochází ke změně velikosti kvasničných molekul, které jsou poté srovnatelné s velikostí 14-3-3ζ WT nebo 14-3-3ζ ΔC. To je v souladu s představami, že C-terminální segment 14-3-3ζ má funkci autoinhibitoru a v nepřítomnosti vazebného partnera zaujímá místo ve vazebném žlábků. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli prostudovat oligomerní stav Bmh proteinů pomocí sedimentační analýzy (sedimentační data viz **Tab. 29**), protože je možné spekulovat, že Bmh proteiny mohou tvořit vyšší oligomery než předpokládané dimery.

## 7.6. Sedimentační analýza

Sedimentační analýza byla provedena ve spolupráci s RNDr. Lenkou Řežábkovou, Ph.D. z katedry Fyzikálního a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, která provedla všechna sedimentační měření a vyhodnocení výsledků podle metody popisované v kap. 5.15. na přístroji ProteomLab XL-I, Beckman Coulter.

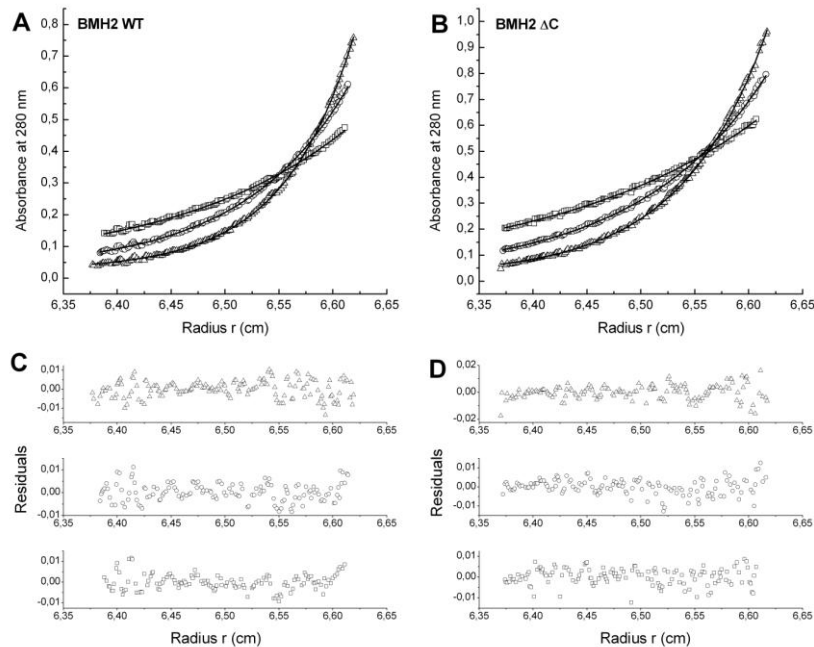
**Tab. 29.:** *Výsledky sedimentační analýzy v porovnání s fluorescenčním a teoretickým experimentem.*

$M_w (\times 10^3)$	BMH1 WT	BMH1 ΔC	BMH2 WT	BMH2 ΔC	14-3-3ζ WT	14-3-3ζ ΔC
SE <sup>a</sup>	61 ± 1.0	56 ± 2.0	64 ± 2.0	55 ± 1.0	55 ± 2.0	53 ± 2.0
SV <sup>a</sup>	61 ± 2.0	55 ± 1.0	63 ± 2.0	53 ± 1.0	59 ± 2.0	51 ± 2.0
Theoretical <sup>b</sup>	60.7	54.0	62.7	54.2	56.1	53.1
AEDANS <sup>c</sup>	55-73	41-54	58-77	35-46	44-58	44-58

<sup>a</sup>Hodnoty molekulových hmotností vypočítané pomocí metody nejmenších čtverců pro model uvažující ideální rozpouštěnou látku. <sup>b</sup>Hodnoty molekulových hmotností vypočítané podle aminokyselinové sekvence. <sup>c</sup>Orientační rozpětí molekulových hmotností vypočítané podle rotačně korelačního času  $\Phi_3$  (**Tab. 28**).

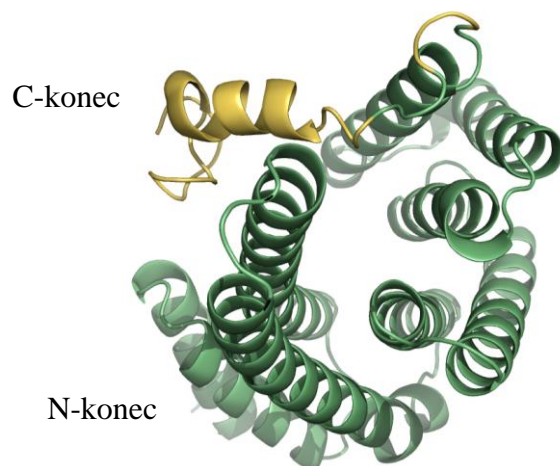
Sedimentační analýza ukázala, že obě kvasničné isoformy Bmh1 a Bmh2 tvoří stabilní dimery s molekulovou hmotností okolo 61 kDa a 64 kDa. Pro porovnání byly sedimentační pokusy provedeny na Bmh1 WT, Bmh2 WT, 14-3-3 WT a jejich mutantních

forem s odstraněnými C-terminálními konci. Z těchto výsledků plyne, že C-terminální konec kvasničných isoformů nezpůsobuje proteinové agregace ve vyšší oligomery, ale že zaujímá nataženou konformaci, která způsobuje zvýšený hydrodynamický poloměr.



**Obr. 19.:** Výsledky sedimentačně rovnovážných měření (A, B). Sedimentační rovnováhy proteinu Bmh2 WT a Bmh2 ΔC byly měřeny při 280 nm a teplotě 4 °C. Jednotlivé symboly odpovídají datům sesbíraným při 10500 (čtverce), 13500 (kružnice) a 16500 (trojúhelníky) rpm. C, D: Residua odpovídající analýze nejlepšího fitu (ze shora trojúhelníky, kružnice, čtverce).

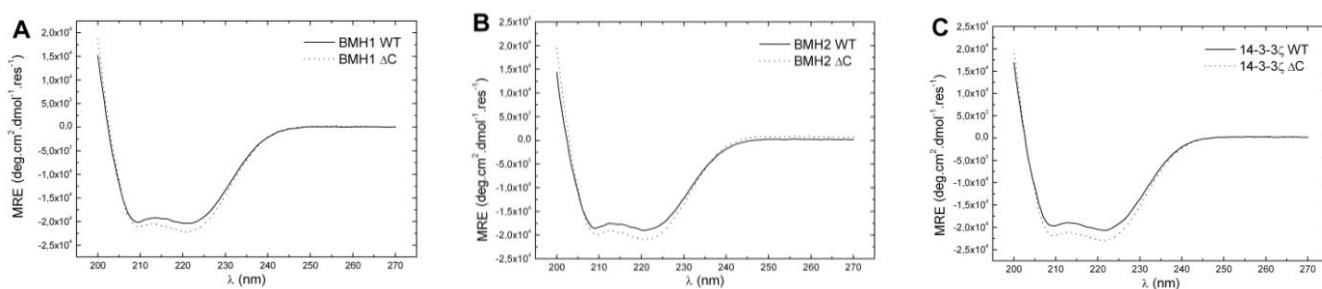
Hodnoty hydrodynamického poloměru získané z pokusů sedimentační analýzy jsou porovnatelné s výsledky z měření dynamického rozptylu světla a ukazují, že odstranění C-terminálního segmentu vede ke snížení hydrodynamického poloměru u všech tří studovaných proteinů.



**Obr. 20:** *Strukturní model monomerní jednotky kvasničného proteinu 14-3-3 Bmh2 (zeleně) s naznačeným C-koncovým segmentem (žlutě), který zaujímá široce rozlehlou otevřenou konformaci. Model byl připraven pomocí serveru I-TASSER (<http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/>, University of Michigan, 2011).*

### 7.7. Cirkulární dichroismus

CD spektroskopie byla použita k ověření, zda má odstranění C-koncového segmentu vliv na sekundární strukturu proteinů 14-3-3. Porovnání výsledných spekter (viz **Obr. 21**) vede k závěru, že odstranění C-koncového segmentu nemá významný vliv na sekundární strukturu kvasničných Bmh1 a Bmh2 isoform, ani lidské 14-3-3 $\zeta$  isoformy.



**Obr. 21.:** *CD spektroskopie kvasničných isoform Bmh1, Bmh2 a lidské isoformy 14-3-3 $\zeta$ . Ze spekter je patrné helikální uspořádání proteinů 14-3-3.*

Měření CD spekter bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Pavlínou Novotnou z Ústavu analytické chemie, VŠCHT v Praze, která provedla všechna měření viz kap. 5.16.

## **ODDÍL B**

### **7.8. Příprava vektoru pET-32b**

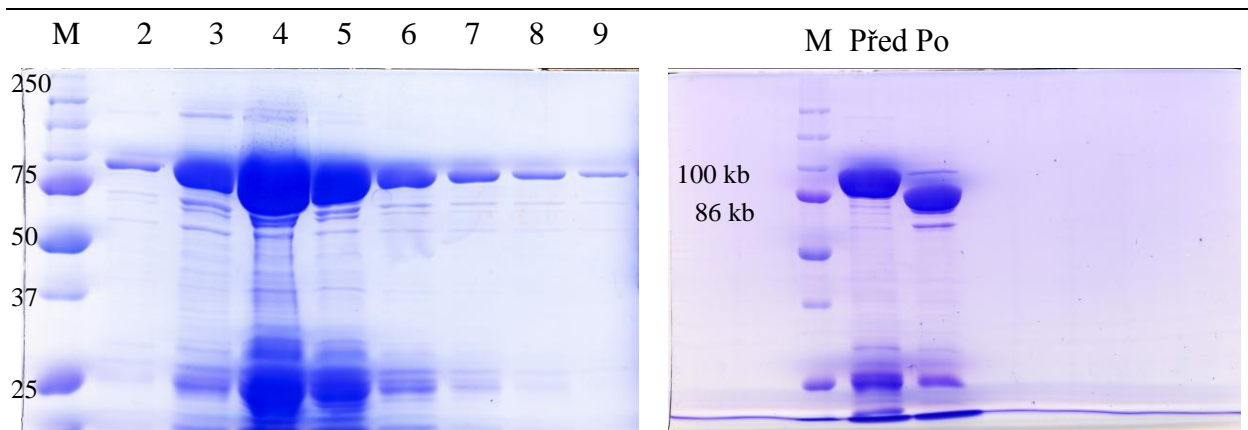
K produkci kvasničného enzymu Neutrální trehalasy 1 a 2 (Nth1, Nth2) pro pokusy *in vitro* byl použit expresní vektor pET32-b (Novagen) s delecí 81 bází po sekvenci kódující His-tag (6xH)SSGLVPRGS (5819 bází), do kterého byla zaklonována cDNA NTH1, (aminokyselinová sekvence 1-750) a NTH2 (aminokyselinová sekvence 1-780) mezi místa pro restriční endonukleasy NcoI a BamHI.

Na místech pro restriční endonukleasy NcoI a BamHI vektoru pET-32b bylo provedeno štěpení.

### **7.9. Purifikace neutrální trehalasy 1**

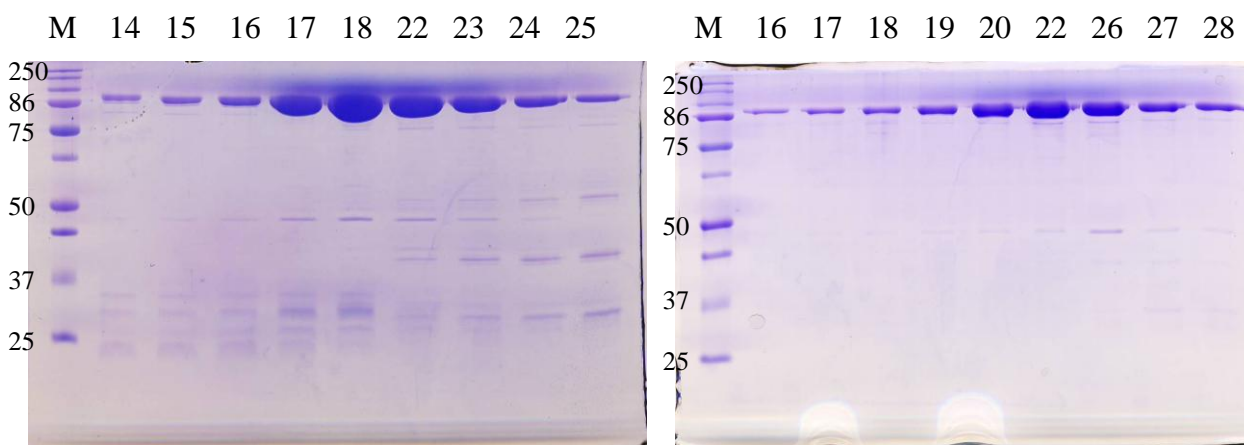
Neutrální trehalasa 1 značená na N-konci histidinovou a thioredoxinovou kotvou byla exprimována v buňkách *E. coli* Rosetta(DE3). Exprese byla zahájena induktorem IPTG po dobu 18 hod. při 25 °C viz kap. 6.9. Přítomnost a čistotu enzymu neutrální trehalasy 1 byla monitorována pomocí SDS-PAGE viz **Tab. 30**. Exprese neutrální trehalasy 2 neprobíhala, proto všechny experimenty byly provedeny pouze s isoformou neutrální trehalasy 1.

**Tab. 30.:** 10 % SDS-PAGE gely *Nth1* WT a mutantní formy *Nth1* S21+60 získané jejich purifikací. M je označení pro marker molekulových hmotností.



10 % SDS-PAGE gel proteinu *Nth1* WT ukazující frakce získané elucí při chelatační afinitní chromatografii.

10 % SDS-PAGE gel demonstrující frakce *Nth1* WT před a po thrombinovém štěpení.



10 % SDS-PAGE gel demonstrující frakce mutantní formy *Nth1* S21+60 získané elucí kationtově výměnnou chromatografií.

10 % SDS-PAGE gel představující frakce *Nth1* S21+60 získané elucí při gelové permeační chromatografii.

## 7.10. Expresní test neutrální trehalasy 2

Expresní test byl proveden následovně:

- 5 ml kultury NTH2 v pET-32b v buňkách Rosettách s 5  $\mu$ l ampicilinu bylo inkubováno 15 hodin při 37 °C a 200 rpm
- do čerstvého 5 ml LB média s ampicilinem (fin. konc. 100  $\mu$ g/ml) byl přidán 1 ml napěstované kultury



- naředěná kultura byla inkubována 1 hodinu při 37 °C a 200 rpm a byl odebrán vzorek pro SDS-PAGE
- do takto naředěné kultury bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 0,5 μM
- odebrání vzorku po 5 a 22 hodinách pro SDS-PAGE

Výsledný gel, který není přiložen, nevykazoval expresi enzymu Nth2.

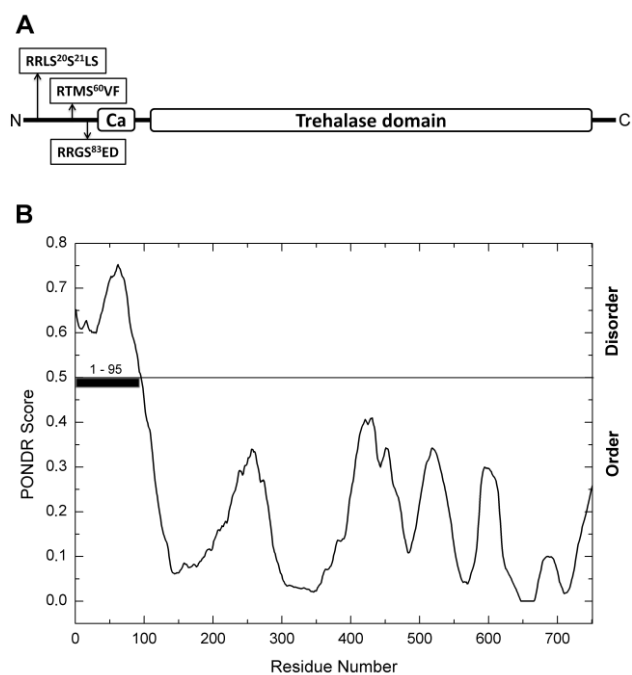
### **7.11. Analýza pNth1 WT hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF**

Purifikovanou Nth1 WT byla fosforylována pomocí PKA *in vitro*. Pro určení pozic Nth1, které jsou nezbytné pro vazbu s kvasničnými proteiny 14-3-3 byla použita metoda hmotnostní spektrometrie, která byla provedena ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., který provedl přípravu vzorku na měření, měření a vyhodnocení výsledků. Hmotnostní spektrum pNth1 WT udávalo signály pro čtyři fosforylované seriny na pozicích: Ser20, Ser21, Ser60a Ser83 (viz **Tab. 31**) nacházející se na neuspořádané N-koncové části Nth1 (**Obr. 22, 23**). Pro kontrolu, že se jedná právě o tyto čtyři fosforylační místa byla připravena Nth1 mutantní forma, která neobsahovala žádné z těchto čtyř (Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83) fosforylačních míst.

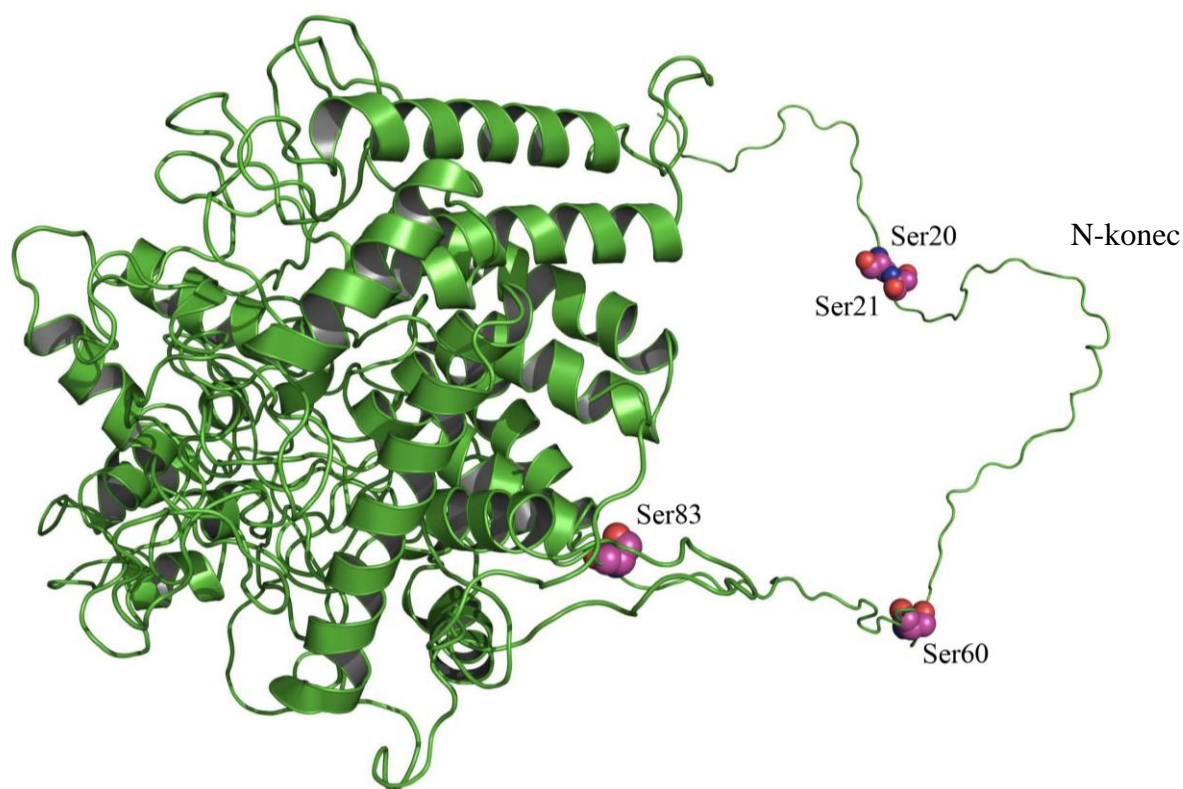
**Tab. 31.:** MALDI-TOF analýza *Nth1* proteinových variant (Veisova, D. et al., 2012).

varianta	m/z signál	Odpovídající sekvence	m/z signál	Odpovídající sekvence	m/z signál	Odpovídající sekvence
<i>Nth1</i>	v negativní nebo pozitivní MALDI-TOF-MS	peptidu, poznámka k detekované fosforylaci nebo jednobodové mutaci S→A peptidu	v negativní nebo pozitivní MALDI-TOF-MS	peptidu, poznámka k detekované fosforylaci nebo jednobodové mutaci S→A peptidu	v negativní nebo pozitivní MALDI-TOF-MS	peptidu, poznámka k detekované fosforylaci nebo jednobodové mutaci S→A peptidu
	Peptidy obsahující Ser <sup>20</sup> a Ser <sup>21</sup>		Peptidy obsahující Ser <sup>60</sup>		Peptidy obsahující Ser <sup>83</sup>	
WT	2802.30 [M + H] <sup>+</sup> 3010.37 [M + H] <sup>+</sup>	19–43 19–44	1371.62 [M + H] <sup>+</sup> 1499.72 [M + H] <sup>+</sup>	58–69 58–70	1658.67 [M + H] <sup>+</sup>	82–96
pWT	<b>3036.39 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3116.39 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3164.40 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3244.40 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>18–43, pSer<sup>20</sup></b> <b>18–43, pSer<sup>20</sup>, pSer<sup>21</sup></b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup></b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup>, pSer<sup>21</sup></b>	<b>1449.63 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1577.76 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>58–69, pSer<sup>60</sup></b> <b>58–70, pSer<sup>60</sup></b>	<b>1736.70 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1892.71 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>81–95, pSer<sup>83</sup></b> <b>81–96, pSer<sup>83</sup></b>
pS20	<b>3020.41 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3148.43 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>18–43, pSer<sup>20</sup>, mS21A</b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup>, mS21A</b>	1483.79 [M + H] <sup>+</sup> 1499.78 [M + H] <sup>+</sup>	58–71, mS60A 58–71Mox, mS60A	1642.61 [M + H] <sup>+</sup> 1798.63 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS21	<b>2864.27 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>19–43, pSer<sup>21</sup>, mS20A</b>	1483.78 [M + H] <sup>+</sup> 1499.77 [M + H] <sup>+</sup>	58–71, mS60A 58–71Mox, mS60A	1642.60 [M + H] <sup>+</sup> 1798.61 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS60	2770.30 [M + H] <sup>+</sup> 2898.33 [M + H] <sup>+</sup>	19–43, mS20A, mS21A 19–44, mS20A, mS21A	<b>1449.63 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1577.73 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>58–69, pSer<sup>60</sup></b> <b>58–70, pSer<sup>60</sup></b>	1642.63 [M + H] <sup>+</sup> 1798.63 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS83	2770.30 [M + H] <sup>+</sup> 2898.33 [M + H] <sup>+</sup>	19–43, mS20A, mS21A 19–44, mS20A, mS21A	1483.78 [M + H] <sup>+</sup> 1499.77 [M + H] <sup>+</sup>	58–71, mS60A 58–71Mox, mS60A	<b>1736.73 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1892.76 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>81–95, pSer<sup>83</sup></b> <b>81–96, pSer<sup>83</sup></b>
pNth1-noS	2770.30 [M + H] <sup>+</sup> 2898.33 [M + H] <sup>+</sup>	19–43, mS20A, mS21A 19–44, mS20A, mS21A	1483.75 [M + H] <sup>+</sup> 1499.74 [M + H] <sup>+</sup>	58–71, mS60A 58–71Mox, mS60A	1642.62 [M + H] <sup>+</sup> 1798.63 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS20 + 21	<b>3036.40 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3116.41 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3164.43 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3244.42 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>18–43, pSer<sup>20</sup></b> <b>18–43, pSer<sup>20</sup>, pSer<sup>21</sup></b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup></b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup>, pSer<sup>21</sup></b>	1483.77 [M + H] <sup>+</sup> 1499.76 [M + H] <sup>+</sup>	58–71, mS60A 58–71Mox, mS60A	1642.64 [M + H] <sup>+</sup> 1798.67 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS20 + 60	<b>3020.40 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3148.41 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>18–43, pSer<sup>20</sup>, mS21A</b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup>, mS21A</b>	<b>1449.61 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1577.71 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>58–69, pSer<sup>60</sup></b> <b>58–70, pSer<sup>60</sup></b>	1642.60 [M + H] <sup>+</sup> 1798.65 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS21 + 60	<b>2864.24 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>19–43, pSer<sup>21</sup>, mS20A</b>	<b>1449.60 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1577.69 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>58–69, pSer<sup>60</sup></b> <b>58–70, pSer<sup>60</sup></b>	1642.60 [M + H] <sup>+</sup> 1798.64 [M + H] <sup>+</sup>	82–96, mS83A 81–96, mS83A
pS20 + 83	<b>3020.34 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>3148.34 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>18–43, pSer<sup>20</sup>, mS21A</b> <b>18–44, pSer<sup>20</sup>, mS21A</b>	1355.68 [M + H] <sup>+</sup> 1483.77 [M + H] <sup>+</sup>	58–70, mS60A 58–71, mS60A	<b>1892.77 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>81–96, pSer<sup>83</sup></b>
pS21 + 83	<b>2864.36 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>19–43, pSer<sup>21</sup>, mS20A</b>	1355.72 [M + H] <sup>+</sup> 1483.81 [M + H] <sup>+</sup>	58–70, mS60A 58–71, mS60A	<b>1892.75 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>81–96, pSer<sup>83</sup></b>
pS60 + 83	2770.27 [M + H] <sup>+</sup> 2898.29 [M + H] <sup>+</sup>	19–43, mS20A, mS21A 19–44, mS20A, mS21A	<b>1449.61 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1577.70 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>58–69, pSer<sup>60</sup></b> <b>58–70, pSer<sup>60</sup></b>	<b>1736.72 [M – H]<sup>-</sup></b> <b>1892.74 [M – H]<sup>-</sup></b>	<b>81–95, pSer<sup>83</sup></b> <b>81–96, pSer<sup>83</sup></b>

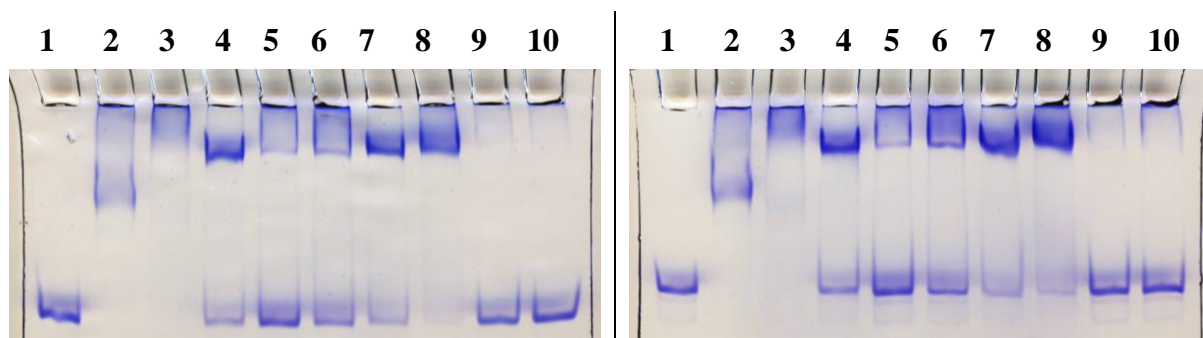
Tyto čtyři serinové pozice byly zaměněny za aminokyselinu alanin. Následně byl tento konstrukt fosforylován pomocí PKA (značen pNth1-NoS). pNth1-NoS byl podroben analýze hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF a spektrum již nevykazovalo žádná další fosforylovaná residua. Pro následné ověření úlohy těchto čtyř fosforylačních míst na *Nth1* v jejich interakci s proteiny Bmh byla provedena nativní TBE-PAGE (viz **Obr. 24**).



**Obr. 22. A:** Schéma naznačující umístění čtyř fosforylačních míst (Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83) na N-koncovém segmentu neutrální trehalasy 1. Analýza Nth1 provedená programem SMART předpověděla přítomnost dvou konzervovaných domén: trehalasové (aminokyselinová sekvence 163-721) a vápníkové domény (aminokyselinová sekvence 114-125). **B:** Bioinformaická analýza provedená pomocí programu PONDR naznačuje neuspořádanost N-koncového segmentu Nth1, kde jsou obsažena čtyři fosforylační místa vhodná pro vazbu s proteiny 14-3-3 (Veisova, D. et al., 2012).



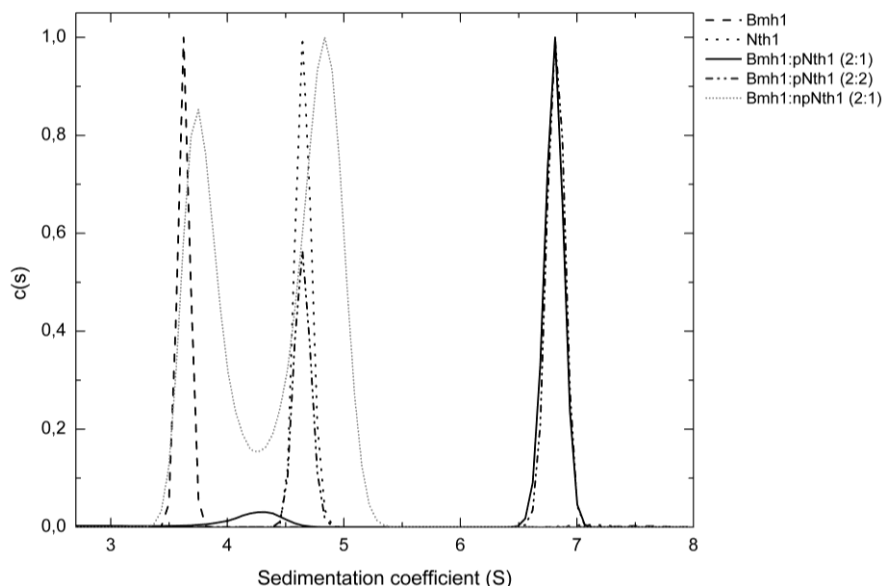
**Obr. 23.:** *Strukturní model Nth1 WT s vyobrazenými čtyřmi fosforylačními místy Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83 na N-terminálním konci důležitými pro vazbu s kvasničnými proteiny 14-3-3. Model byl vytvořen pomocí serveru I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>, University of Michigan, 2011).*



**Obr. 24.:** *12 % TBE-PAGE gely demonstrující interakci pNth1 s Bmh1 WT (vlevo) a interakci pNTH1 s Bmh2 WT (vpravo). Popis drah 1-10: 1 – Bmh, 2 – Nth1 WT, 3 – pNth1 WT, 4 – pNth1 WT: Bmh, 5 – pNth1 S20: Bmh, 6 – pNth1 S21: Bmh, 7 – pNth1 S60: Bmh, 8 – pNth1 S83: Bmh, 9 – pNth1 S20+21: Bmh, 10 – pNth1 NoS: Bmh. Molární poměr Nth1: Bmh je 1:2.*

## 7.12. Bmh1 a Bmh2 tvoří stabilní komplexy s fosforylovanou neutrální trehalasou 1 a obě kvasničné isoformy zvyšují její enzymovou aktivitu *in vitro*

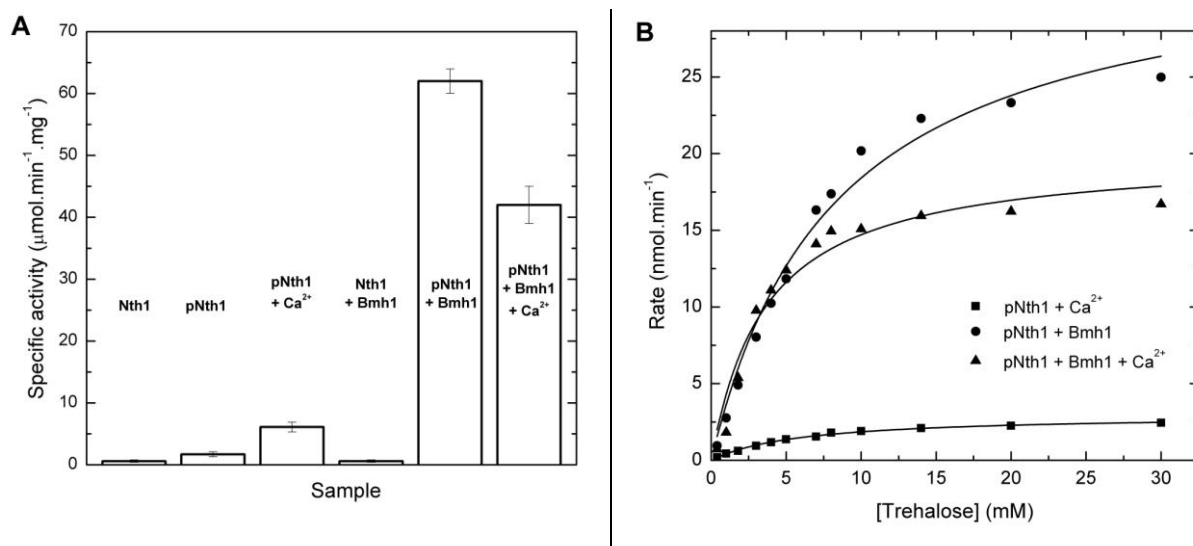
Výsledky sedimentačně rychlostních měření ukázaly, že samotná pNth1 existuje v roztoku jako monomerní částice s molekulovou hmotností 86 kDa. Jak bylo zjištěno dříve, Bmh proteiny tvoří stabilní dimery s molekulovou hmotností ~ 60 kDa. (Veisova, D. *et al.*, 2010). Zajímalo nás tedy, v jakém stechiometrickém poměru interagují pNth1 s Bmh proteiny. Sedimentačně rychlostní analýza ukázala (viz **Obr. 25**), že stechiometrie vazby komplexu pNth:Bmh je 1:2, tedy že dimerní molekula Bmh interaguje s jednou molekulou Nth1. Disociační konstanty  $K_D$  vazby pNth1 s Bmh1 a pNth1 s Bmh2 jsou uvedeny v **Tab. 34**).



**Obr. 25.:** Sedimentačně rychlostní analýza: distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  samotné Bmh1, Nth1 a komplexů Bmh1:pNth1 (2:1), Bmh1:pNth1 (2:2) a Bmh1:npNth1 (2:1). Plnou čarou je vyznačena interakce Bmh1:pNth1 (2:1).

Pro studium ovlivnění trehalasové aktivity Nth1 pomocí Bmh proteinů byla provedena kinetická měření pNth1 a Nth1 v přítomnosti a nepřítomnosti Bmh proteinů. Trehalasová aktivita byla měřena jako množství glukosy produkované hydrolýzou trehalosy. V souladu se studií z roku 2008 (Panni, S. *et al.*, 2008) byla naměřená aktivita pNth1 a Nth1 v nepřítomnosti Bmh proteinů velmi nízká (**Obr. 26 A**). Po navázání Bmh proteinu na fosforylovanou formu pNth1 se její aktivita prudce zvýšila. V těchto pokusech nebyly

pozorovány významné rozdíly mezi interakcí pNth1 a isoformou Bmh1 nebo Bmh2. Vazebná esej byla měřena i za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů. Jak bylo zjištěno dříve (Franco, A. et al., 2003), aktivita enzymu Nth1 organismu *S. pombe* je významně zesilována po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  přes konzervovaný  $\text{Ca}^{2+}$  vazebný motiv. Spekuluje se, že tato vazba může ovlivnit oligomerní stav enzymu Nth1.  $\text{Ca}^{2+}$  vazebný motiv je konzervovaný napříč všemi isoformám *S. cerevisiae* a je umístěn mezi aminokyselinovými zbytky 114-125 ( $\text{D}^{114}\text{TDKNYQITIED}^{125}$ ). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli prostudovat ovlivnění aktivity enzymu Nth1 kationty  $\text{Ca}^{2+}$  (**Obr. 26 A, B**). Z naměřených dat vyplývá, že  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM) zvyšují enzymovou aktivitu pNth1, ovšem v porovnání s kvasničnými proteiny 14-3-3 se jedná o aktivaci méně účinnou. Zajímavé je, že v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  i Bmh byla aktivita pNth1 významně nižší v porovnání se vzorkem v přítomnosti pouze Bmh bez  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Obr. 26. A:** Aktivace enzymu neutrální trehalasy 1 *in vitro*. Nefosforylovaná forma Nth1 a fosforylovaná pNth1 vykazují v nepřítomnosti vazebného partnera Bmh proteinu velice nízkou aktivitu (sloupce 1, 2), stejně jako interakce nefosforylované formy Nth1 s Bmh (sloupec 4). Po navázání Bmh proteinu na fosforylovanou formu pNth1 prudce stoupá její aktivita (sloupec 5). Sloupec 3 demonstruje ovlivnění (zvýšení) aktivity enzymu pNth1 po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  a po navázání Bmh i  $\text{Ca}^{2+}$  (sloupec 6). **B:** Kinetická měření Michaelis-Mentenové hydrolýzy trehalosy enzymem pNth1 v přítomnosti 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (čtverce), Bmh proteinu (kružnice) a obou komponent  $\text{Ca}^{2+}$  i Bmh (trojúhelníky). Reakční rychlost je vynesena proti koncentraci trehalosy. Trehalosovou aktivitu jsem měřila jako množství glukosy produkované hydrolýzou trehalosy. U grafů je uvedena pouze isoforma Bmh1 (Veisova, D. et al., 2012).

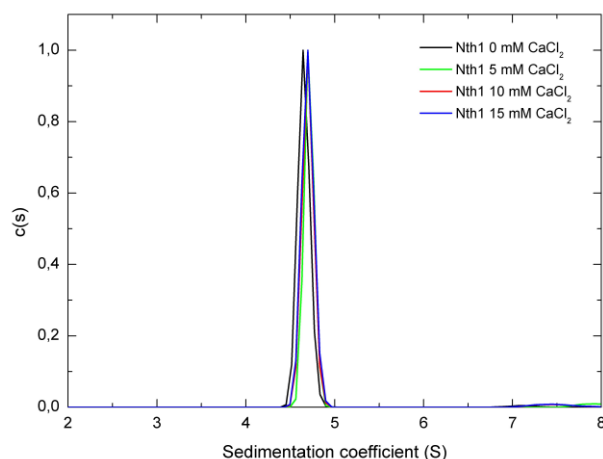
Kinetika podle Michaelis-Mentenové hydrolyzy trehalosy enzymem pNth1 v přítomnosti Bmh1 a/nebo 5 mM Ca<sup>2+</sup> na molekuly glukosy je uvedena na **Obr. 26. B**. Reakce probíhala při 30 °C a pH 7,5. Hodnoty Michealisovy konstanty  $K_m$ ,  $k_{cat}$  a poměru  $k_{cat}/K_m$  jsou uvedeny v **Tab. 32**. Hodnoty uvedené v **Tab. 32** nemohly být porovnány s měřeními pNth1 a Nth1 v nepřítomnosti Bmh a Ca<sup>2+</sup> kvůli jejich velice nízkým enzymovým aktivitám.

**Tab. 32.:** Hodnoty Michaelisovy konstanty, rychlostní konstanty  $k_{cat}$  a poměru  $k_{cat}/K_m$ . Tyto hodnoty naznačují, že vazba proteinu 14-3-3 významně zvyšuje (11x) rychlostní konstantu  $k_{cat}$  pNth1 v porovnání s vazbou pouze 5 mM Ca<sup>2+</sup>.

	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
v přítomnosti	pNth1		
Bmh1	8 ± 1 mM	71 ± 4 s <sup>-1</sup>	8,9 s <sup>-1</sup> · mM <sup>-1</sup>
5 mM Ca <sup>2+</sup>	6 ± 0,4 mM	6,2 ± 0,1 s <sup>-1</sup>	1,0 s <sup>-1</sup> · mM <sup>-1</sup>
Bmh1 a Ca <sup>2+</sup>	3,6 ± 0,7 mM	42 ± 2 s <sup>-1</sup>	11,7 s <sup>-1</sup> · mM <sup>-1</sup>

### 7.13. Studium oligomerního stavu Nth1 *S. cerevisiae* pomocí metody analytické ultracentrifugace

Výsledná data naznačují (**Obr. 27**), že se enzym Nth1 vyskytuje v přítomnosti 5, 10 a 15 mM CaCl<sub>2</sub> v monomerní formě s relativní molekulovou hmotností 86 tisíc. Z tohoto důvodu usuzujeme, že Ca<sup>2+</sup> závislou aktivací pNth1 se nemění monomerní stav pNth1 v oligomerní.

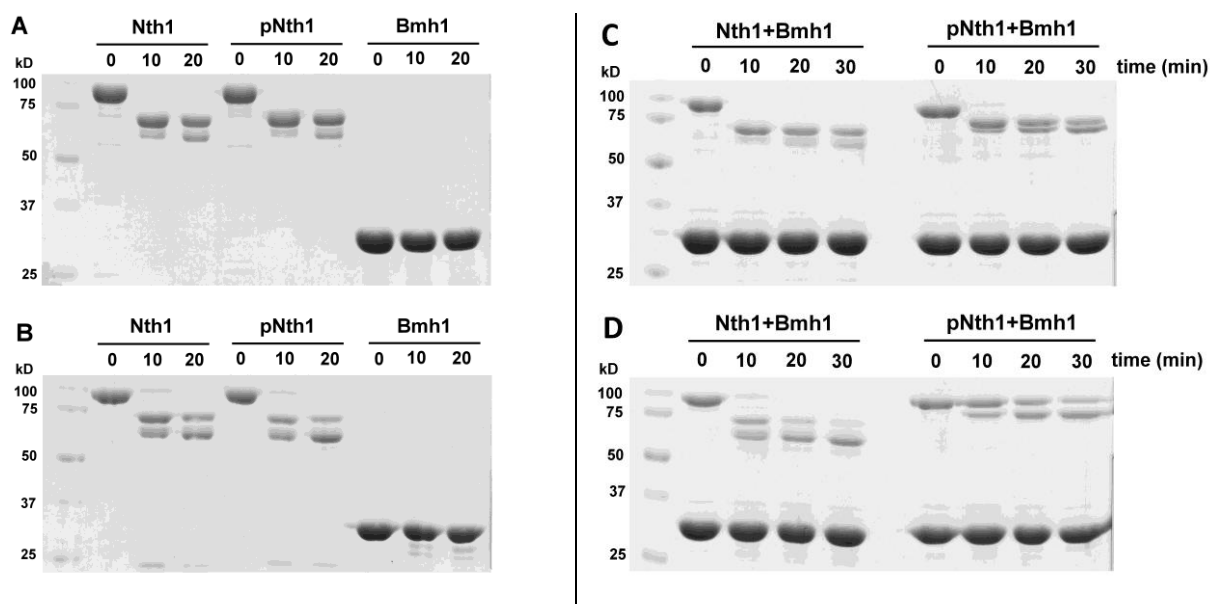


**Obr. 27.:** Distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  *Nth1* v přítomnosti 0 mM  $\text{CaCl}_2$  (černá), 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (zelená), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (červená) a 15 mM  $\text{CaCl}_2$  (modrá) křivka (Veisova, D. et al., 2012).

#### 7.14. Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 interagují s N-koncovou částí pNth1

Hmotnostní analýzou bylo zjištěno, že se všechna PKA fosforylační místa pNth1 (Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83) nacházejí na N-koncové části enzymu. Z tohoto důvodu usuzujeme, že kontakt mezi Bmh a pNth1 proteiny je zprostředkován právě skrze N-koncovou část Nth1. Pro ověření tohoto předpokladu byly kolegyní Mgr. Evou Macákovou provedeny pokusy limitované proteolýzy, které měly objasnit, zda má vazba proteinu 14-3-3 na pNth1 protektivní charakter z hlediska proteolytické degradace. 10 % SDS-PAGE gely demonstrující limitovanou proteolýzu samotných Nth1, pNth1 a Bmh1 a v komplexu Nth1 s Bmh1 a pNth1 s Bmh1 za přítomnosti protasy trypsinu nebo chymotrypsinu (w/w poměr proteasa/protein byl 1:1000) v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT a 10 % (w/v) glycerol jsou uvedeny na **Obr. 28**. Reakce byla zastavena varem v přítomnosti SDS-PAGE vzorkového pufru v určených časových intervalech.





**Obr. 28.** **A:** Vzorky proteinů *Nth1*, *pNth1*, *Bmh1* inkubované s proteasou trypsinem po dobu 10 a 20 min při 25 °C. **B:** Vzorky proteinů *Nth1*, *pNth1*, *Bmh1* inkubované s proteasou chymotrypsinem po dobu 10 a 20 min při 25 °C. **C:** Komplexy *Nth1* s *Bmh1* a *pNth1* s *Bmh1* inkubované s proteasou trypsinem po dobu 10, 20 a 30 min při 25 °C. **D:** Komplexy *Nth1* s *Bmh1* a *pNth1* s *Bmh1* inkubované s proteasou chymotrypsinem po dobu 10, 20 a 30 min při 25 °C (Veisova, D. et al., 2012).

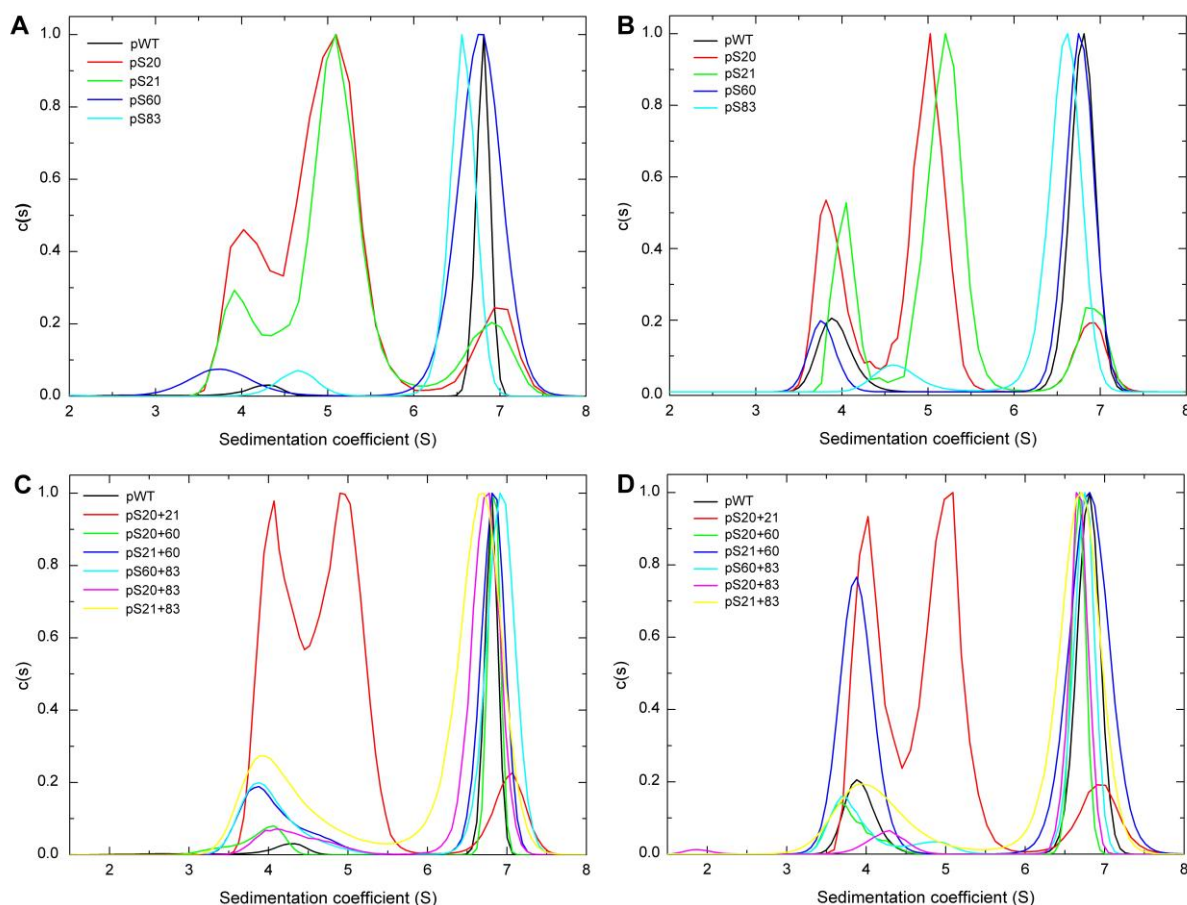
Výsledky z **Obr. 28** naznačují, že samotný protein *Bmh1* je (v daných časových intervalech) vůči proteasám trypsinu a chymotrypsinu odolný. Hmotnostní analýza peptidů *Nth1* a *pNth1* získaných po 30 minutové inkubaci s trypsinem nebo chymotrypsinem za přítomnosti *Bmh1* proteinu naznačuje jasný protektivní charakter proteinů 14-3-3 N-koncové části *Nth1* obsahující všechna PKA fosforylační místa. N-koncový segment *pNth1* byl v přítomnosti *Bmh1* chráněn před částečnou chymotrypsinovou proteolytickou degradací. První nalezený peptid z N-koncové části udával signál  $m/z$  1128,56 odpovídající aminokyselinové sekvenci 168-176. Signál  $m/z$  1630,78 odpovídá N-terminálnímu peptidu *pNth1* Ala(-1)-Arg(15), jehož peptidová sekvence byla potvrzena PSD analýzou.

Všechny fosforylované serinové zbytky (20, 21, 60, 83) byly detekovány ze získaných bandů proteinu. Při částečné proteolytické degradaci *pNth1* trypsinem při 30 minutové inkubaci v přítomnosti *Bmh1*, byly generovány peptidy se sekvenčním pokrytím od Thr58-Leu751 a první nalezený peptid od N-koncové části ukazoval  $m/z$  signál 1579,70 odpovídající aminokyselinové sekvenci Thr58-Leu70 s potvrzenou fosforylací PSD analýzou na místě

Ser60. Souhrnně lze říci, že proteiny 14-3-3 interagují s N-koncovou částí pNth1. Výsledná data jsou uvedena v **Tab. 31**.

### 7.15. Význam individuálních fosforylačních míst pNth1 při interakci s kvasničnými proteiny 14-3-3 v pokusech *in vitro*

Analýza pNth1 hmotnostní spektrometrií prokázala, že PKA fosforyluje neutrální trehalasu 1 na čtyřech serinových pozicích (20, 21, 60 a 83) umístěných v N-terminální oblasti enzymu (**Tab. 31**). Výsledná data také ukazují, že kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 interagují s pNth1 s vysokou afinitou právě v oblasti N-koncového segmentu a významně zvyšují aktivitu enzymu (**Obr. 24-28**).



**Obr. 29.** **A:** Distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  pro jednobodové fosforylované Nth1 mutantní formy v interakci s Bmh1 proteinem. **B:** Distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  pro jednobodové fosforylované Nth1 mutantní formy v interakci s Bmh2 proteinem. Barevně jsou vyznačeny různé komplexy Bmh proteinů s: pNth1 WT (černě), pS20 (červeně), pS21 (zeleně), pS60 (modře) a pS83 (bledě modře). **C:** Distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$

pro dvoubodové fosforylované *Nth1* mutantní formy v interakci s *Bmh1* proteinem. **D:** Distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  pro dvoubodové fosforylované *Nth1* mutantní formy v interakci s *Bmh2* proteinem. Barevně jsou vyznačeny různé komplexy *Bmh* proteinů *s*: *pNth1* WT (černě), *pS20+21* (červeně), *pS20+60* (zeleně), *pS21+60* (modře), *pS60+83* (bledě modře), *pS20+83* (magenta) a *pS21+83* (žlutá) (Veisova, D. et al., 2012).

Dále jsme se rozhodli prostudovat, která fosforylační místa *Nth1* jsou zodpovědná za vazbu s proteiny 14-3-3. Pro tuto studii jsem připravila čtyři mutantní formy *Nth1* obsahující pouze jedno fosforylační místo (*Nth1*-S20, *Nth1*-S21, *Nth1*-S60 a *Nth1*-S83).

Všechny ostatní seriny byly cílenou mutagenézí přeměněny na alaniny. Následně bylo připraveno šest dvoubodových mutantních verzí obsahujících vždy dva serinové zbytky (*Nth1*-S20+21, *Nth1*-S20+60, *Nth1*-S20+83, *Nth1*-S21+60, *Nth1*-S21+83 a *Nth1*-S60+83). Pro potvrzení významnosti těchto čtyř serinových residuí byla připravena i mutantní verze neobsahující žádné serinové místo.

Rozdíly ve vazebné afinitě k proteinům 14-3-3 všech připravených jednobodových a dvoubodových mutantních verzí fosforylované *pNth1* byly testovány pomocí metod sedimentační analýzy a TBE-PAGE elektroforézy (viz **Tab. 33**, **Obr. 24**, **Obr. 29**).

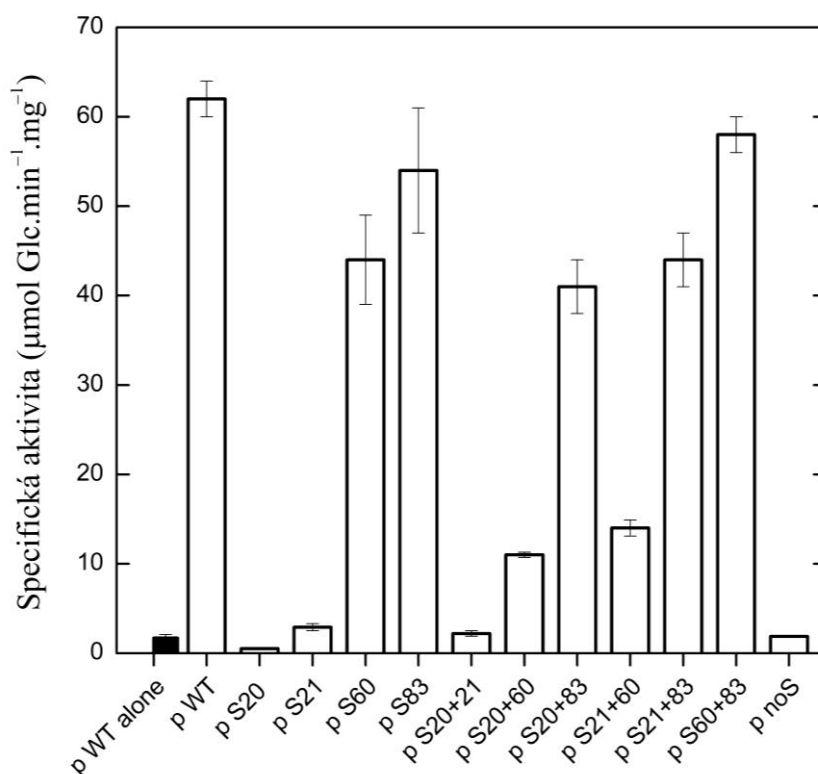
**Tab. 33.:** Hodnoty disociačních konstant komplexu *pNth1/14-3-3* vypočítané z pokusů sedimentační analýzy (Veisova, D. et al., 2012).

varianta <i>Nth1</i>	počet fosforylačních míst	$K_d$ ( $\times 10^6$ M) <i>Bmh1</i>	$K_d$ ( $\times 10^6$ M) <i>Bmh2</i>
pWT	4	$0,15 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,1$
pS20	1	$10 \pm 3$	$10 \pm 3$
pS21	1	$10 \pm 4$	$10 \pm 3$
pS60	1	$0,2 \pm 0,15$	$0,25 \pm 0,2$
pS83	1	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
pS20+21	2	$10 \pm 3$	$10 \pm 4$
pS20+60	2	$0,25 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,15$
pS20+83	2	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
pS21+60	2	$0,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
pS21+83	2	$0,3 \pm 0,2$	$0,25 \pm 0,15$
pS60+83	2	$0,3 \pm 0,15$	$0,25 \pm 0,15$

Vazebná afinita jednobodových a dvoubodových fosforylovaných mutantních forem *pNth1* obsahujících buď fosforylační místo Ser60 nebo Ser83 ke kvasničným proteinům 14-3-

3 ( $K_D$  se pohybuje v rozmezí od  $0,2 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-6}$  M) byla zjištěna jako plně srovnatelná s vazebnou afinitou pNth1 WT, který interaguje s Bmh1 o  $K_D$   $0,15 \times 10^{-6}$  a s Bmh2 o  $K_D$   $0,25 \times 10^{-6}$  M (viz **Tab. 33**). Mutantní formy pNth1 obsahující pouze fosforylační místa Ser20 a Ser21 (pNth1-S20, pNth1-S21, pNth1-S20+21) vykazují velice nízké hodnoty  $K_D$  ( $10 \times 10^{-6}$  M). Tyto výsledky naznačují, že pro vazbu pNth1 s kvasničnými proteiny 14-3-3 jsou nezbytná fosforylační místa Ser60 a Ser83.

Dále byla studována schopnost zvýšit enzymovou aktivitu pNth1 všech připravených mutantních forem kvasničnými isoformami proteinů 14-3-3 (viz **Obr. 30**).



**Obr. 30.:** Úloha jednotlivých fosforylačních míst pNth1 v interakci s kvasničnými proteiny 14-3-3 v pokusech *in vitro*. Specifická trehalasová aktivita samotné pNth1 WT je uvedena v černém sloupci. Ostatní mutantní formy pNth1 v přítomnosti Bmh1 proteinů a 30 mM trehalosy jsou uvedeny v bílých sloupcích (Veisova, D. et al., 2012).

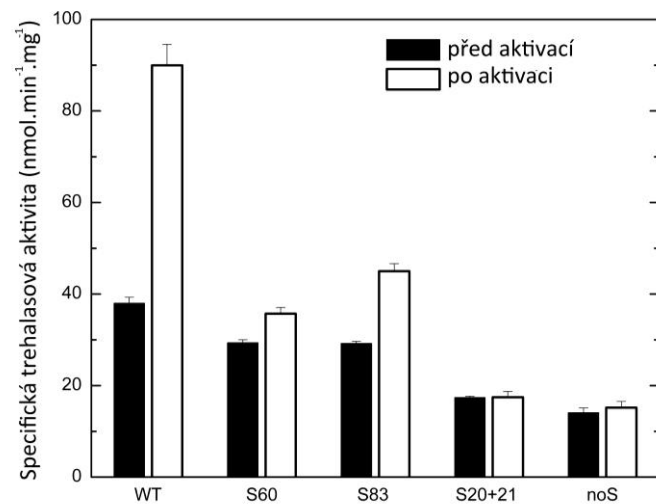
Trehalasová aktivita byla měřena jako produkce glukosy v přítomnosti 30 mM trehalosy. Tato měření odhalila podobné výsledky jako vazebné pokusy. Aktivita mutantních forem obsahujících pouze fosforylační místa Ser20 a Ser21 (pNth1-S20, pNth1-S21 a pNth1-S20+21) v komplexu s Bmh je srovnatelná s aktivitou nefosforylované Nth1, fosforylované pNth1-NoS a pNth1 WT v nepřítomnosti proteinů 14-3-3. Naopak, mutantní formy obsahující

fosforylační místa Ser60 a Ser83 vykazovaly v komplexu s Bmh významně vyšší aktivitu. Jednobodové fosforylované mutantní formy pNth1-S60 a pNth1-S83 stejně jako dvoubodové mutantní formy pNth1-S60+83, pNth1-S20+83 a pNth1-S21+83. Překvapivě ovšem dvoubodové pNth1-S20+60 a pNth1-S21+60 vykazovaly významně nižší aktivity, i když jsou hodnoty jejich vazebné afinity k proteinům 14-3-3 srovnatelné s pNth1 WT nebo pNth1-S60 (viz **Tab. 33**). Z toho můžeme spekulovat, že vazba proteinu 14-3-3 rozdílně ovlivňuje konformaci neutrální trehalasy1 ve srovnání s ostatními aktivními komplexy obsahujícími fosforylační místo Ser60 nebo Ser83.

### **7.16. Aktivace mutantních forem neutrální trehalasy 1 v pokusech *in vivo***

Úlohu fosforylačních míst určených pokusy *in vitro*, které jsou důležité pro vazbu s proteiny 14-3-3, jsme se rozhodli prostudovat v i pokusech *in vivo*. Bylo připraveno pět *nth1Δ* transformantů exprimujících Nth1 WT, Nth1-S60, Nth1-S83, Nth1-S20+21 a Nth1-NoS. Buňky *S. cerevisiae* byly kultivovány na médiu obsahující glycerol. Trehalasová aktivita byla spuštěna přidavkem glukosy do finální koncentrace 4 % (w/v) (*Pernambuco, M.B., 1996*). Graf specifické trehalasové aktivity extraktu kvasničných buněk před a po glukosovém přidavku je uveden na **Obr. 31**.

Statisticky významná data byla pozorována pouze u buněk exprimujících Nth1 WT, Nth1-S60 a Nth1-S83. Nejvyšší hodnoty aktivace byly pozorovány pro Nth1 WT (2,4x). Mutantní formy Nth1-S60 a Nth1-S83, každá obsahující jedno fosforylační místo, byly aktivovány 1,2x a 1,5x. Buňky exprimující Nth1-NoS a Nth1-S20+21 nevykazovaly významné změny specifické trehalasové aktivity po glukosovém přidavku. Hodnoty trehalasové aktivity pozorované v pokusech *in vivo* jsou nižší v porovnání s výsledky získanými z pokusů *in vitro*. Příčinou může být nedostatečná fosforylace Nth1 *in vivo* a/nebo nízké koncentrace Bmh proteinů, protože pokusy *in vitro* probíhaly se stechiometricky fosforylovanou Nth1 v nadbytku Bmh proteinů. Aktivační experimenty *in vivo* v organismu *S. cerevisiae* jsou v souladu s experimenty provedenými *in vitro*, tedy že pro aktivaci Nth1 jsou nezbytná fosforylační místa Ser60 a Ser83, nikoli Ser20+21.



**Obr. 31.:** Graf specifické trehalasové aktivity extraktu kvasničných buněk před a po glukosovém přidavku (Veisova, D. et al., 2012).

## 8. Diskuze

### *Část A*

Proteiny 14-3-3 jsou dimerní bílkovinné molekuly vyskytující se ve všech eukaryotických organismech, podílející se na mnoha buněčných dějích a interagující s vysokým počtem vazebných partnerů. Proto se v posledních letech staly zájmem mnoha vědeckých skupin. Jedná se o vysoce konzervované molekuly s charakteristickým tvarem a velikostí. Oblast C-terminálního konce se od zbytku molekuly odlišuje vysokou variabilitou a flexibilitou napříč jednotlivými isoformami.

Dřívější studie 14-3-3 proteinů ukazují, že C-koncový segment lidské isoformy 14-3-3 $\zeta$  zastává důležitou autoinhibiční úlohu. V nepřítomnosti vazebného partnera se váže do vazebného žlábků 14-3-3 $\zeta$  proteinu, a tím zároveň brání vazbě nevhodných ligandů. Vazbou fosforylovaného ligandu dojde k vytěsnění C-koncového segmentu z vazebného žlábků a zvýšení jeho pohyblivosti.

C-koncový segment kvasničných isoform je v porovnání s lidskou 14-3-3 $\zeta$  isoformou významně delší a obsahuje tzv. polyQ opakování (tzn. 17 za sebou jdoucích aminokyselin glutaminů) neznámé funkce. Tato polyQ opakování jsou v literatuře označována za původce agregace a toxicity proteinů.

Cílem této práce bylo studium konformace C-terminálního segmentu kvasničných isoform proteinů 14-3-3 pomocí biofyzikálních metod. Jak již bylo uvedeno výše, C-terminální segment kvasničných isoform obsahuje polyQ segment, který hraje roli při proteinové agregaci. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli prostudovat oligomerní stav Bmh proteinů. Metody dynamického rozptylu světla, sedimentační rychlosti, časově rozlišené fluorescenční spektroskopie a gelové permeační chromatografie naznačují zdánlivou, významně větší velikost molekul Bmh proteinů v porovnání s lidskou 14-3-3 $\zeta$  isoformou. Na druhou stranu, analýza sedimentační rovnováhy jasně ukazuje, že kvasničné Bmh proteiny tvoří dimery stejně jako ostatní proteiny 14-3-3. Měření časově rozlišené tryptofanové fluorescence ukazuje, že po navázání ligandu na molekulu Bmh, nedochází k významným strukturním změnám C-terminálního segmentu. Odstraněním C-terminálního segmentu se významně snížil hydrodynamický poloměr získaný metodami dynamického rozptylu světla a sedimentační analýzou u obou Bmh proteinů stejně jako eluční objemy získané metodou gelové permeační chromatografie. Tyto výsledky naznačují, že C-terminální segment Bmh

proteinů zaujímá nataženou konformaci a pravděpodobně nemá autoinhibiční funkci, jako je tomu u lidské 14-3-3ζ isoformy.

## Část B

Neutrální trehalasa 1 je enzym zajišťující degradaci neredukujícího disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Trehalosa je v kvasničném organismu nahromaděna jako přirozená odpověď na stresové situace. Bylo zjištěno (*Panni, S. et al., 2008*), že kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 interagují s neutrální trehalasou 1 a ovlivňují její enzymovou aktivitu.

Pro objasnění mechanismů interakce neutrální trehalasy 1 s kvasničnými proteiny 14-3-3 jsme se rozhodli prostudovat, která PKA fosforylační místa jsou důležitá pro tuto interakci *in vitro*. Metoda hmotnostní spektrometrie ukázala, že se jedná o čtyři serinové pozice Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83. Přítomnost těchto fosforylačních míst byla ověřena TBE-PAGE elektroforézou (viz **Obr. 24**). Výsledky sedimentačně rychlostních měření vypovídají o tvorbě stabilních komplexů fosforylované neutrální trehalasy 1 s kvasničnými isoformami Bmh1 a Bmh2 ve stechiometrickém poměru 1:2, tedy že dimer Bmh interaguje s jednou molekulou pNth1. Dále bylo potvrzeno, v souladu se studií z roku 2008 (*Panni, S. et al., 2008*), že je naměřená aktivita pNth1 a Nth1 v nepřítomnosti Bmh proteinů velmi nízká (**Obr. 26 A**). Po navázání Bmh proteinu na fosforylovanou formu pNth1 se její aktivita prudce zvyšuje. Dále jsme se rozhodli prostudovat ovlivnění aktivity enzymu Nth1  $\text{Ca}^{2+}$  kationty (**Obr. 26 A, B**). Z naměřených dat vyplývá, že  $\text{Ca}^{2+}$  zvyšují enzymovou aktivitu pNth1, ovšem v porovnání s kvasničnými proteiny 14-3-3 se jedná o aktivaci méně účinnou. Po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  se nezměnil monomerní stav molekuly Nth1 na oligomerní. Metodou hmotnostní spektrometrie a limitované proteolýzy se potvrdila hypotéza interakce proteinů 14-3-3 s N-koncovou částí pNth1. Kinetické studie v pokusech *in vitro* ukázaly na dvě nejdůležitější fosforylační místa nezbytná pro vazbu s Bmh proteiny – jedná se o Ser60 a Ser83. Ostatní dvě fosforylační místa Ser20 a Ser21 se účastní interakce s proteiny 14-3-3, nejsou ovšem pro tuto vazbu esenciální. Tyto výsledky korespondují s naměřenými daty v pokusech *in vivo*, kde se rovněž potvrdila významná úloha fosforylačních míst Ser60 a Ser83.



## 9. Závěrečné shrnutí

**A.** Použitím různých biofyzikálních technik jsme ukázali, že C-terminální konec Bmh proteinů zaujímá výrazně odlišnou konformaci v porovnání s lidskou 14-3-3 $\zeta$  isoformou. Podle dosažených výsledků zaujímá C-koncový segment Bmh proteinů nataženou konformaci, která pravděpodobně brání jeho „složení“ do vazebného žlábků, což způsobuje zdánlivou větší velikost molekuly. Z tohoto důvodu se můžeme domnívat, že C-terminální konec kvasničných isoform proteinů 14-3-3 neplní funkci autoinhibitoru, jako je tomu v případě lidské 14-3-3 $\zeta$  isoformy.

**B.** Použitím metod hmotnostní spektrometrie, sedimentační analýzy a kinetických studií jsme ukázali význam a ovlivnění jednotlivých fosforylačních míst Nth1 při interakci kvasničných isoform proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 s kvasničnou isoformou Nth1. Esenciální pro vazbu proteinů 14-3-3 s Nth1 jsou fosforylační místa Ser60 a Ser83 Nth1 nacházející se na neuspořádaném N-koncovém segmentu molekuly.

## 10. Souhrn

Proteiny 14-3-3 jsou dimerní molekuly s charakteristickým tvarem a velikostí okolo 30 kDa vyskytující se ve všech eukaryotických organismech. Zastávají klíčové role v rozmanitých buněčných procesech, jako jsou signalizace, buněčné dělení, apoptóza atd. C-koncový segment lidské isoformy proteinu 14-3-3 $\zeta$  zastává důležitou autoinhibiční úlohu, kdy se v nepřítomnosti vazebného partnera váže do vazebného žlábků tohoto proteinu, a tím zároveň brání vazbě nevhodných ligandů. Struktura C-koncového segmentu nebyla dosud identifikována v žádné z publikovaných krystalových struktur. Oblast C-koncového segmentu je, na rozdíl od helikální oblasti  $\alpha$ 1- $\alpha$ 9, sekvenčně vysoce variabilní. Usuzuje se, že C-koncový segment je velmi flexibilní a může zaujímat řadu různých konformací.

Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 se vyznačují významně delším C-koncovým segmentem s neznámou funkcí obsahující polyglutaminové sekvence. Úloha C-koncových částí kvasničných proteinů Bmh1 a Bmh2 byla prostudována rozmanitými biofyzikálními technikami. Měření dynamického rozptylu světla, sedimentační rychlosti, časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence a gelové permeační chromatografie naznačují zdánlivou, významně větší velikost molekul proteinů Bmh1 a Bmh2 v porovnání s lidskou isoformou 14-3-3 $\zeta$ . Z tohoto důvodu je možné spekulovat, že C-koncový segment kvasničných proteinů Bmh způsobuje tvorbu vyšších oligomerů než jsou předpokládáné dimery. Na druhou stranu, metoda sedimentační rovnováhy jasně prokázala, že kvasničné proteiny 14-3-3 tvoří stabilní dimery. Tryptofanová fluorescenční měření naznačují, že vazba ligandu nepůsobí žádné dramatické konformační změny C-koncové části. Odstranění C-koncového segmentu nemělo významný vliv na vazebnou afinitu proteinů Bmh studovanou pomocí metody stacionárního měření anizotropie fluorescence.

V roce 2008 bylo zjištěno, že kvasničné proteiny Bmh1 a Bmh2 interagují s enzymem neutrální trehalasou 1 (Nth1). Nth1 je zodpovědná za degradaci neredukujícího disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů Bmh1 a Bmh2 zvyšují prostřednictvím vazby závislé na fosforylaci aktivitu Nth1. Ke studiu interakce Nth1 s proteiny Bmh1 a Bmh2 byly použity techniky nativní gelové elektroforézy, měření enzymové kinetiky a sedimentační rychlosti. Bylo zjištěno, že kinasa PKA fosforyluje Nth1 *in vitro* na čtyřech serinových pozicích (20, 21, 60 a 83) *in vitro*, které se nacházejí na neuspořádaném N-koncovém segmentu tohoto enzymu. Výsledky sedimentační analýzy a enzymové kinetiky naznačují, že obě kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 tvoří s Nth1 stabilní

komplexy a významně zvyšují její enzymovou aktivitu. Aktivace Nth1 zprostředkovaná vazbou 14-3-3 je v porovnání s kationty  $\text{Ca}^{2+}$  mnohem více účinná. Kinetické studie mutantních forem provedené v pokusech *in vitro* a *in vivo* jasně dokazují, že za aktivaci Nth1 pomocí proteinů Bmh jsou primárně odpovědná fosforylační místa Nth1 na pozicích Ser60 a Ser83.

Z našich výsledků vyplývá, že C-koncový segment kvasničných proteinů zaujímá nataženou konformaci, která vyvolává zdánlivě větší velikost molekuly a pravděpodobně nemá autoinhibiční funkci, jako je tomu u lidské 14-3-3 $\zeta$  isoformy. Pro aktivaci Nth1 prostřednictvím PKA a kvasničných isoform proteinů 14-3-3 jsou důležitá zejména fosforylační místa Ser60 a Ser83.

## 11. Summary

The 14-3-3 proteins are dimeric molecules with a characteristic shape and molecular mass about 30 kDa found in all eukaryotes. They are playing a key role in a variety of biological processes such as signal transduction, cell differentiation and apoptosis. The C-terminal segment of human 14-3-3 $\zeta$  plays an important role as an autoinhibitor which can occupy the ligand binding groove in the absence of binding partner and blocks the binding of inappropriate ligand. The C-terminal segment structure has not been identified for any of the known crystallographic structures. Unlike the helical region  $\alpha 1$ - $\alpha 9$ , the C-terminal segment shows the highest sequence variability. It is believed that the C-terminal segment is the most flexible region and can exist in a lot of conformations.

The yeast isoforms of the 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 possess a distinctly variant C-terminal segment which is longer and contains a polyglutamine stretch of unknown function. The role of this C-terminal part has been studied with many of different biophysical methods. Dynamic light scattering, sedimentation velocity, time resolved fluorescence anisotropy decay, and size exclusion chromatography measurements showed that an apparent size of the molecules Bmh1 and Bmh2 is significantly bigger compared to the 14-3-3 isoforms. Therefore, it is reasonable to speculate that the C-terminal segment of the Bmh protein either induces formation of bigger oligomers than expected dimers. On the other hand analysis of the SE data revealed that Bmh1 and Bmh2 form stable dimers. Time resolved tryptophan fluorescence experiments revealed no dramatic structural changes of the C-terminal segment upon the ligand binding. The removal of the C-terminal segment does not have any significant effect on binding affinity of Bmh proteins which was studied by fluorescence anisotropy-based binding assay.

In 2008 it was found out that yeast 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 can interact with an enzyme neutral trehalase 1 (Nth1). Nth1 is responsible for degradation of nonreducing disaccharide trehalose into two molecules of glucose. The enzymatic activity of Nth1 in yeast is enhanced by 14-3-3 protein binding in a phosphorylation dependent manner. Native gel electrophoresis, sedimentation analysis, and enzyme kinetics measurement were used to study the interaction between Nth1 and yeast 14-3-3 isoforms Bmh1 and Bmh2. We determined four serine residues that are phosphorylated by PKA in vitro (20, 21, 60 and 83), which all are located in a disordered N-terminal segment of Nth1. Sedimentation analysis and enzyme kinetics measurements show that both yeast 14-3-3 isoforms form a stable complex with

phosphorylated Nth1 and significantly enhance its enzymatic activity. The 14-3-3 dependent activation of Nth1 is significantly more potent compared to calcium dependent activation. Kinetic studies of mutant forms *in vitro* and *in vivo* suggest that phosphorylation sites Ser60 and Ser83 are primarily responsible for PKA-dependent and 14-3-3-mediated activation of Nth1.

Taken together, the C-terminal part of Bmh proteins adopts an open and extended conformation, thus increasing the apparent molecular size and thus the C-terminal segment can hardly function as an autoinhibitor.

## 12. Seznam citované literatury

- Aitken, A. (2002) *Plant Mol. Biol.* **50**, 993–1010
- Aitken, A. (2006), *Seminars in Cancer Biology* **16**, 162-172
- Aitken, A. (2011), *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**, 673– 680
- Aitken, A., Ellis, C. A., Harris, A., Sellers, L. A., Toker, A. (1990), *Nature* **344**, 594
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Patel, Y. (1995), *J. Biol. Chem.* **270**(11), 5706-5709.
- Alam, R., Hachiya, N., Sakaguchi, M., Kawabata, S., Iwanaga, S., Kitajima, M. et al. (1994), *J. Biochem. (Tokyo)* **116**, 416-425
- Andrews, R. K., Harris, S. J., McNally, T. & Berndt, M. C. (1998) *Biochemistry* **37**, 638–647
- App, H., Holzer, H. (1989), *J Biol Chem.* **264**(29), 17583-17588
- Bachmann, M., Huber, J. L., Liao, P. C., Gage, D. A., Huber, S. C. (1996), *FEBS Letters* **387**, 127-131
- Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P., Wiemken, A. (1992), *Eur. J. Biochem.* **209**(3), 951-9
- Benzinger, A., Popowicz, G. M., Joy, J. K., Majumdar, S., Holak, T. A., Hermeking, H. (2005), *Cell Res.* **15**, 219-227
- Berg, D., Holzmann, C., Riess, O. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* **4**(9), 752-62
- Bloch, H., Süllmann, H. (1945), *Experientia* **1**(3), 94-95
- Boston, P. F., Jackson, P., Kynoch, P. A. M., Thompson, R. J. (1982). *J. Neurochem.* **38**, 1466–1474.
- Boston, P.F., Jackson, P., Thompson R.J. (1982), *Journal of Neurochemistry* **38**, 1475-1482
- Bourquelot, E. (1893), *Bull. Soc. mycol. France*, **9**, 189
- Brasemann, S., McCormick, F. (1995), *EMBO J.* **14**, 4839–4848
- Brock, T. G. (2008), *Neurochem. Res.* **33**(5), 801-807
- Bunney, T. D., De Boer, A. H., Levin, M. (2003), *Development* **130**, 4847-4858
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Chapman, D. (1984), *Science* **223**, 701
- Dahlqvist, A. (1968) *Anal Biochem.* **22**(1), 99-107
- Destruelle, M., Holzer, H., Klionsky, D. J. (1995), *Yeast* **11**, 1015-1025
- Dhillon, A. S., Meikle, S., Peyssonnaud, C., Grindlay, J., Kaiser, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H., Eychène, A., Kolch, W. (2003), *Mol. Cell Biol.* **23**(6), 1983-93

- Dubios, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhussen, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moelling, K., Aitken, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28882-28888
- Elliot, B., Fuchter, B. (1993), *Yeast* **9**, 33
- Erickson, P. F., Moore, B.W. (1980), *Journal of Neurochemistry* **35**, 232-241
- Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Gross, R. W. (1994), *Nature* **371**, 612-614
- Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Gross, R. W., Williams, L. T. (1994), *Nature* **371**, 612-614
- Ferl, R. J., Manak, M. S., Reyes, M. F. (2002), *Genome Biology* **3**(7), 3010,1-3010,7
- Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., White, F. M. (2002), *Nat. Biotechnol.* **20**(3), 301-5
- Fischer, E. (1895) *Ber. Chem. Ges.* **28**, 1429
- Foote, M., Zhou, Y. (2012), *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **3**(2), 152-164
- Ford, J. C., al-Khodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K. S., Griffiths, D. J., Carr, A. M. (1994), *Science* **265**, 533-535
- Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Paredes, V., Madrid, M., Gacto, M., Cansado, J. *Biochem. J.* (2003), **376**(Pt 1), 209-17
- Frankova, V., Krausova, M., (2008), *Psychiatr. praxe* **9**(3), 121-124
- Freed, E., Symons, M., Macdonald, S. G., McCormick, F., Ruggieri, R. (1994), *Science* **265**, 1713-1716
- Fu, H., Coburn, J., Collier, R. J. (1993), *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2320-2324
- Fu, H., Xia, K., Pallas, D. C., Cui, C., Conroy, K., Narsimhan, R. P., et al. (1994), *Science* **266**, 126-129
- Fusek, M., Káš, J., Ruml, T. (2008), *Bioléčiva, VŠCHT, Praha*
- Gajofatto, A., Bongianini, M., Zanusso, G., Benedetti, M., D., Monaco, S. (2011), *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 7960-7970
- Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J. A., Klein, D. C. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8083-8088
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., Klein, D. C. (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1222-1227
- Gardino, K. A., Smerdon, J. S., Yaffe, B. M. (2006) *Seminars in CancerBiology* **16**, 173-182
- Gelperin, D., Weigle, J., Nelson, K., Roseboom, P., Irie, K., Matsumoto, K., Lemmon, S. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(25),11539-43

- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996), *Science* **274**, 546-567
- Hermeking, H., Benzinger, A. (2006), *Seminars in Cancer Biology* **16**, 183-192
- Hirsch, S., Aitken, A., Bertsch, U., Soll, J. (1992), *FEBS Letters* **296**, 222-224
- Houtman, J. C., Brown, P. H., Bowden, B., Yamaguchi, H., Appella, E., Samelson, L. E., Schuck, P. (2007), *Protein Sci.* **16**(1), 30-42
- Hurd, T. W., Fan, S., Liu, C. J., Kweon, H. K., Hakansson, K., Margolis, B. (2003), *Curr. Biol.* **13**, 2082-2090
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, Ch., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1999), *Nature* **401**, 616-620
- Chester, V. E. (1963), *Biochem. J.* **86**, 153
- Chiang, C.W., Kanies, C., Kim, K.W., Fang, W.B., Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T., Yang, E. (2003), *Mol. Cell Biol.* **23**, 6350–6362
- Chung, H. J., Sehnke, P. C., Ferl, R. J. (1999), *Trends Plant Sci.* **4**(9), 367-371
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., and Takahashi, Y. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7084-7088
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T., Fujisawa, H. (1987), *FEBS Letters* **219**, 79-82
- Iwanoff, N. N. (1925), *Biochem. Z.* **162**, 455
- Keller, F., Schellenberg, M., Wiemken, A. (1982), *Arch Microbiol.* **131**(4), 298-301
- Kienle, I., Burgert, M., Holzer, H. (1993), *Yeast* **9**, 607
- Kobayashi, Z., Weigel, D. (2007), *Genes Dev.* **21**, 2371-2384
- Kodíček, M., Karpenko, V. (2000), *Biofyzikální chemie*, Academia
- Koch, E. M., Koch, F. C. (1925), *Science* **61**, 510
- Kopp, M., Muller, H., Holzer, H. (1993), *The Journal of Biological Chemistry* **268**(7), 4766-4774
- Kopp, M., Nwaka, S., Holzer, H. (1994), *Gene* **150**, 403
- Korthout HA, de Boer AH. A (1994), *Plant Cell* **6**, 1681-1692
- Koudelkova, M., (2010), *Labor Aktuell* **02/10**, 8-11
- Kuenzi, M. T., Fiechter, A. (1969), *Arch. Mikrobiol.* **64**, 154
- Kuenzi, M. T., Fiechter, A. (1972), *Arch. Mikrobiol.* **84**, 254
- Lacourciere, K. A., Stivers, J. T., Marino, J. P. (2000), *Biochemistry* **39**, 5630-5641
- Lakowicz, J. R (1999), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Spinger, second editon



- Layfield, R., Fergusson, J., Aitken, A., Lowe, J., Landon, M., Mayer, R. J. (1996), *Neurosci. Lett.* **209**(1),57-60
- Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Honore, B., Andersen, A. H., Walbum, E. et al. (1993), *J. Mol. Biol.* **231**, 982-998
- Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Honoré, B., Andersen, A.H., Walbum, E., Vandekerckhove, J., Celis, J. E. (1993), *J. Mol. Biol.* **231**(4), 982-998
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R., Fu, H., and Liddington, R., (1995), *Nature* **376**, 191-194
- Liu, Y., Liu, Y.C., Meller, N., Giampa, L., Elly, C., Doyle, M. et al. (1999), *J. Immunol.* **162**, 7095-7101
- Londensborough, J., Varimo, K. (1984), *Biochem. J.* **219**, 511
- Lu, G., DeLisle, A. J., de Vetten, N. C., Ferl, R. J. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11490-11494
- Macdonald, N., Welburn, J. P., Noble, M. E., Nguyen, A., Yaffe, M. B., Clynes, D. et al. (2005), *Mol. Cell* **20**, 199-211
- Marra, M., Fullone, M. R., Fogliano, V., Pen, J., Mattei, M., Masi, S., et al. (1994), *Plant Physiol* **106**, 1497-1501
- Martens, G. J., Piosik, P. A., Danen, E. H. (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1456-1459
- Maslyar, D. J., Aoki, M., Vogt, P. K. (2001) *Oncogene* **20**, 5087–5092
- Masters, S. C., Pederson, K. J., Zhang, L., Barbieri, J. T., Fu, H. (1999) *Biochemistry* **38**, 5216–5221
- McConnell, J. E., Hodges, P. E. (1993), *Gene* **126**, 293–294
- Miao L, Teng J, Lin J, Liao X, Chen J. (2013), *J. Cell Sci.* **126**(Pt 2), 427-36
- Moore, B. W. and Perez, V. J. (1967) *Physiological and biological aspects of nervous integration*, 343-359
- Moorhead, G., Douglas, P., Morrice, N., Scarabel, M., Aitken, A., MacKintosh, C. (1996), *Curr. Biol.* **6**, 1104-1113
- Morgan, A., Burgoyne, R. D. (1992), *Nature* **355**, 833-836
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., Shaw, A. S. (1996), *Cell* **84**, 889-897
- Namikawa, K., Su, Q., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. (1998), *Brain Res. Mol. Brain Res.* **55**, 315–320
- Niwa, T., Katsizaki, T., Yazawa, T., Tatemichi, N., Miyazaki, Y., Maeda, K. (1993), *Nephron* **63**, 423

- Nwaka, S. Kopp, M., Holzer, H. (1995), *J. Biol. Chem.* **270**, 10193-10198
- Nwaka, S., Holzer, H. (1998), *Progress in Nature Acid Research* **58**, 197-237
- Nwaka, S., Mechler, B., Holzer, H. (1996), *FEBS Letters* **386**, 235-238,
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S., Dyda, F. (2001), *Cell* **105**, 257-267
- Obsil, T., Obsilova, V. (2011), *Seminars in Cell & Development Biology* **22**, 663-672
- Oecking, C., Eckerskorn, C., Weiler, E. W. (1994), *FEBS Lett* **352**, 163-166
- Ottman, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J. L., Diaz, M. H., Palmer, R. H., Francis, M. S., Hauser, A. R., Wittinghofer, A., Hallberg, B., (2007), *EMBO J.* **26**, 902-913
- Panni, S., Landgraf, Ch., Volkmer-Engert, R., Cesareni, G. Castagnoli, L. (2008), *FEMS Yeast Res.* **8**, 53-63
- Patel, A., Cummings, N., Batchelor, M., Hill, P. J., Dubois, T., Mellits, K. H., Frankel, G., Connerton, I. (2006), *Cell Microbiol.* **8**, 55-71
- Pernambuco, M. B., Winderickx, J., Crauwels, M., Griffioen, G., Mager, W. H., Thevelein, J. M. (1996), *Microbiology* **142**(Pt 7), 1775-82
- Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., Liddington, R. C. (1998), *Journal of Biological Chemistry* **273** (26), 16305-16310
- Powell, D. W., Rane, M. J., Joughin, B. A., Kalmukova, R., Hong, J. H., Tidor, B., Dean, W. L., Pierce, W. M., Klein, J. B., Yaffe, M. B., and MacLeish, K. R., (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5376-5387
- Reuther, G. W., Fu, H., Cripe, L. D., Collier, R. J., Pendergast, A. M. (1994), *Science* **266**, 129-133
- Rittenhouse, J., Harrsch, P. B., Kim, J. N., Marcus, F. (1986), *The Journal of Biological Chemistry* **261**(9), 3939-3943
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin S. J., Yaffe, M. B. (1999), *Mol Cell*, **4**, 153-166
- Roseboom, P. H., Weller, J. L., Babila, T., Aitken, A., Sellers, L. A., Moffett, J. R. et al. (1994), *DNA Cell Biol.* **270**, 5706-5709
- Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C. (2000), *J. Mol. Evol.* **51**, 446-458
- Rosypal, S. Nový přehled biologie. [s.l.] : Scientia, 2003. s. 797.
- Rudrabhatla, P., Jaffe, H., Pant, H. C. (2011), *The FASEB Journal* **25**, 3896-3905
- Sadik, G., Tanaka, T., Kato, K., Yamamori, H., Nessa, B. N., Morihara, T., Takeda, M. (2009), *J. Neurochem.* **108**, 33-43

- Seimiya, H., Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T (2000), *EMBO J.* **19**, 2652–2661
- Schoonheim, P. J., Veiga, H., da Costa Pereira, D., Friso, G., van Wijk, K. J., de Boer, A. H. 2007, *Plant Physiol.* **143**, 670-683
- Schuck, P. (2000) *Biophys. J.* **78**(3), 1606-19
- Schuck, P. (2003), *Anal Biochem.* **320**(1), 104-24
- Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004), *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 49113-49119
- Singer, M. A., Lindquist, S. (1998), *Mol. Cell.* **1**, 639-648
- Skoulakis, E. M., Davis, R. L. (1996), *Neuron* **17**, 931-944
- Skwarczynska, M., Molzan, M., Ottmann, C. (2013), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**(5), 377-386
- Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Lin, A., Miura, M., Suzuki, T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42364–42374
- Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oecking, C., Sommarin, M. (1999) *Plant Cell* **11**, 2379–2391.
- Tanret, M. G. (1932), *C. R. Acad. Sci.* **180**, 598
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, Ch., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, Ch., Nakagawa, A., Kojima, Ch., Shimamoto, K. (2011), *Nature* **476**, 332-335,
- Thevelein, J. M., de Winde, J. H. (1999), *Mol. Microbiol.* **33**(5), 904-18
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994), *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
- Todd, A., Cossons, N., Aitken, A., Price, G. B., and Zannis-Hadjopoulos, M. (1998), *Biochemistry* **37** (40), 14317-14325
- Toker, A., Sellers, L. A., Amess, B., Patel, Y., Harris, A., Aitken, A. (1992), *Eur. J. Biochem.* **206**, 453-461
- Truong, Amy B., Masters, Shane C., Hongzhu, Yang, and Fu, Haiyan, (2002) *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* **49**, 321-325
- Turck, F., Fornara, F., Coupland, G. (2008), *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**, 573-594
- van der Heide, L. P., Hoekman, M. F., Smidt, M. P. (2004) *Biochem. J.*, **380**, 297-309
- van der Hoeven, P. C. J., van der Wal, J. C. M., Ruurs, P., van Dijk, M. C. M., van Blitterswijk, W. J. (2000), *Biochem. J.* **345**, 297-306
- van Dijk, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M. 1995, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 109
- van Hemert, M. J., van Heusden, G. P., Steensma, H. Y. (2001), *Yeast* **18**(10), 889-95

- van Heusden, G. Paul H., Griffiths, Dominic J. F., Ford, Jon C., Chin-A-Woeng, Thomas F. C., Schrader, Peter A. T., Carr, Anthony M., Steensma, H. Yde (1995), *Eur. J. Biochem.* **229**, 45-53
- van Heusden, G. Paul H., Wenzel, Thibaut J., Lagendijk, Ellen L., de Steensma, H. Y., van der Berg, Johan A. (1992), *FEBS Letters* **302**, 145-150
- van Laare, A. (1989), *FEMS Microbiol. Rev.* **63**, 201
- Veisova, D., Macakova, E., Rezabkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., Obsilova, V. (2012), *Biochemical Journal* **443**, 663-670
- Veisova, D., Rezabkova, L., Stepanek, M., Novotna, P., Herman, P., Vecer, J., Obsil, T., Obsilova, V. (2010), *Biochemistry* **49**, 3853-3861
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S., Thevelein, J. M. (1999), *Biochem. J.* **343**(3), 621-626
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S., Thevelein, J. M. (1999) *Biochem. J.* **343**, 621-626
- Wiemken, A. (1990), *Ant. Van Leeuwenhoek* **58**, 209-217
- Wiemken, A., Dürr, M. (1974), *Arch. Microbiol.* **101**(1), 45-57
- Wiggers, H. A. L. (1832), *Ann. Pharm. Pozna* **1**, 129
- Wilker, E. W., Grant, R. A., Artim, S. C., Yaffe, M. B. (2005), *J. Biol. Chem.* **280**, 18891-18898
- Willstaedt, H., Borggard, M. (1946), *Ark. Kemi, Mineral. o. Geol.*, **1**, B23
- Wyatt, G. R., Kale, G. F. (1957), *J. Gen Physiol.* **40**(6), 833-47
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S. J. (1995), *Nature* **376**, 188-191,
- Xing, H., Kornfeld, K., Muslin, A. J. (1997), *Curr. Biol.* **7**, 294-300
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., Cantley, L. C. (1997), *Cell* **91**, 961-971
- Yamauchi, T., Nakata, H. and Fujisawa, H. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 5404-5409
- Yang, H., Masters, S. C., Wang, H., Fu, H. (2001), *Biochim. Biophys. Acta* **1547**(2), 313-319
- Yang, X., Lee, W. H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C. V., Grossmann, J. G. et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17237-17242
- Yip-Schneider, M. T., Miao, W., Lin, A., Barnard, D. S., Tzivion, G., Marshall, M. S. (2000), *Biochem J.* **351**, 151-9
- Yoneyama, Y., Lever, J.E. (1987), *J. Cell Physiol.* **131**(3), 330-41
- Zeevaart, J.A. (2008), *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 541-547

Zha, J., Harada, H., Yang, E, Jockel, J., Korsmeyer, S. J. (1996), *Cell* **87**, 619-628

Zhao, J., Du, Y., Horton, J. R., Upadhyay, A. K., Lou, B., Bai, Y., Zhang, X., Du, L., Li, M., Wang, B., Zhang, L., Barbieri, J. T., Khuri, F. R., Cheng, X., Fu, H (2011), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**(39), 16212-16216

## **13. Přílohy**