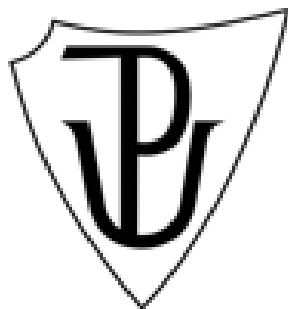


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Fluorescenční detekce molekulárních interakcí Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy.**

Fluorescence detection of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase molecular interactions.

Vypracovala:

Bc. Kateřina Šmídová

Studijní obor:

Biofyzika

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Děkuji vedoucímu diplomové práce, RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D., za ochotu, laskavou pomoc a za čas, který mi během experimentální i teoretické části práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marice Janovské za poskytnutou pomoc a spolupráci při expresi a purifikaci proteinu.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Martina Kubaly, Ph.D. za použití literatury uvedené v seznamu v závěru práce.

V Olomouci dne 27. 4. 2009

.....

## Souhrn

Tato práce poskytuje všeobecný přehled o struktuře, funkci a fyziologickém významu sodno-draselné pumpy a dále stručný přehled některých metabolitů a xenobiotik ovlivňujících aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Cílem této diplomové práce bylo sledovat molekulární interakce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy s fluoresceinem, proto je zde také věnována kapitola fluoresceinu, jeho chemickým a spektrálním charakteristikám, jeho možnému užití např. v medicíně a také jeho několika analogům, které byly již v souvislosti s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou zkoumány.

Experimenty probíhaly jednak na celé  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáze, ale i na její izolované velké cytoplasmatické kličce (C45). Z tohoto důvodu je zde detailněji popsána příprava této kličky, což zahrnuje heterologní expresi v *Escherichia coli* a následnou purifikaci získaného proteinu. Pro zkoumání interakce mezi fluoresceinem a sodno-draselnou pumpou bylo využito měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání fotonů (TCSPC) a dále měření zhášení steady-state fluorescence.

Výsledky měření zhášení fluorescence nenaznačují, že by zde k vazbě docházelo, ale měření kinetik dohasínání poskytlo výsledky, které danou interakci dokazují. Mimo to výsledky také umožňují rozlišit jednotlivé konformační stavy enzymu v přítomnosti různých ligandů a ukazují na významnou odlišnost konformace enzymu v přítomnosti ATP bez  $\text{Mg}^{2+}$ . To potvrzuje hypotézy publikované v práci [Gryčová a kol. 2009], které byly vysloveny na základě experimentů s izolovanou velkou cytoplasmatickou kličkou.

## Abstract

This thesis provides overall survey of a structure, function and physiological importance of sodium-potassium pump and also a summary of some metabolites and xenobiotics that affect the activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. The aim of this thesis was to study molecular interactions of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase with fluorescein, and therefore there is one chapter focused on the chemical and spectral characteristics of fluorescein and its use in medicine. The chapter also deals with some of the fluorescein analogues that have already been examined in the connection to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

The experiments were conducted on the entire  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, as well as on its isolated large cytoplasmic segment C45. Therefore preparation of C45 is described in more detail, which involves heterologous overexpression in *Escherichia coli* and subsequent purification of the protein. For the examination of fluorescein and sodium-potassium pump interaction, measurement of the fluorescence decay by the time-correlated single photon counting (TCSPC) technique and steady-state measurement of the fluorescence quenching were used.

The results of steady-state measurement quenching of fluorescence do not prove the binding of the fluorescein to the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, but the measurement of TCSPC does. Moreover, the results also enable to distinguish individual conformational states of the enzyme in the presence of various ligands and indicate a significant distinction of the conformation in the presence of ATP without  $\text{Mg}^{2+}$ . It confirms hypotheses published in the [Gryčová et al. 2009], which were stated on the basis of experiments with isolated large cytoplasmic segment C45.

# Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>Teorie</b> .....	2
<b>2.1</b>	<b>Sodno-draselná pumpa (<math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPáza)</b> .....	2
2.1.1	Fyziologický význam.....	2
2.1.2	Funkce.....	3
2.1.3	Struktura.....	6
2.1.4	Velká cytoplasmatická klička.....	7
2.1.5	Heterologní exprese velké cytoplasmatické kličky.....	8
<b>2.2</b>	<b>Interakce s jinými látkami</b> .....	10
<b>2.3</b>	<b>Fluorescein</b> .....	12
2.3.1	Chemické vlastnosti.....	13
2.3.2	Spektrální vlastnosti.....	14
2.3.3	Užití fluoresceinu v medicíně.....	14
2.3.4	Užití fluoresceinu při stopování podzemních vod.....	15
2.3.5	Interakce fluoresceinu s $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou.....	15
<b>2.4</b>	<b>Vybrané metody fluorescenční spektroskopie</b> .....	17
2.4.1	Měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání fotonů (TCSPC).....	17
2.4.2	Zhášení fluorescence.....	17
2.4.2.1	Teorie dynamického zhášení.....	18
2.4.2.2	Teorie statického zhášení.....	19
2.4.2.3	Rozlišení mezi statickým a dynamickým zhášením.....	19

<b>3.</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	20
3.1	<i>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza</i> .....	20
3.2	<i>Příprava velké cytoplazmatické kličky</i> .....	20
3.3	<i>Měření kinetiky dohasínání fluorescence</i> .....	23
3.4	<i>Zhášení fluorescence</i> .....	23
3.5	<i>Statistické zpracování dat</i> .....	25
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b> .....	26
4.1	<i>Heterologní exprese a purifikace velké cytoplazmatické kličky</i> .....	26
4.2	<i>Zhášení fluorescence</i> .....	27
4.3	<i>Měření kinetiky dohasínání fluorescence</i> .....	44
<b>5.</b>	<b>Diskuze</b> .....	50
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	54
<b>7.</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	55

## Seznam zkratek

AA .....	akrylamid
APS .....	persulfát amonný
DTT.....	dithiothreitol
FITC.....	fluorescein isothiokyanát
Hcy .....	homocystein
IPTG .....	isopropyl – $\beta$ – D - galaktopyranosid
NKB .....	neurokinin B
PMSF.....	phenylmethylysulphonyl fluoride
SDS .....	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE.....	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného)
SNX6 .....	sortin nexin 6
TEMED .....	tetramethylethylenediamine
TCTP.....	translationally                      controled                      tumor                      protein



# 1. Úvod

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza neboli sodno-draselná pumpa je enzym, který se nachází v každé živočišné buňce. Je to jeden z nejvýznamnějších enzymů živočišného metabolismu, hraje roli při tvorbě klidového membránového potenciálu, pomáhá udržovat osmotickou rovnováhu a vytváří gradient  $\text{Na}^+$ , který je důležitý pro činnost dalších enzymů. Narušená funkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy může být tedy příčinou celé řady onemocnění.

V této práci byla zkoumána interakce sodno-draselné pumpy s fluoresceinem, přičemž bylo využito fluorescenčních vlastností fluoresceinu. Fluorescein je látka, která se využívá v klinické praxi, nicméně její užívání je spojeno s nežádoucími vedlejšími účinky, jako např. alergické reakce, nevolnost, zvracení, ve vzácných případech i zástava srdečního svalu, nebo dokonce smrt. Možné ovlivnění sodno-draselné pumpy fluoresceinem by mohlo některé z těchto symptomů vysvětlit.

## 2. Teorie

### 2.1 Sodno- draselná pumpa ( $Na^+/K^+$ -ATPáza)

Pro existenci každé buňky je zapotřebí, aby docházelo k výměně látek s okolím. K tomu slouží celá řada transmembránových přenašečů. Některé fungují jen ve formě prostého kanálu, takový transport označujeme jako **pasivní**. Molekuly se pohybují na základě spádu elektrochemického gradientu a není třeba další energie. Na druhé straně existuje i transport **aktivní**, kde je však zapotřebí energie. Tu lze získat hydrolýzou ATP, u pump poháněných světlem se energie získává ze světelného záření a třetí možností je spřažení s jiným přenašečem; přenos jednoho druhu látky po směru spádu gradientu je spojen s přenosem látky jiné proti směru spádu gradientu. Takový spřažený přenašeč se řadí do tzv. sekundárního transportu. [Alberts a kol. 1998]

$Na^+/K^+$ -ATPáza neboli sodno-draselná pumpa (EC 3.6.3.9) je transmembránový protein nacházející se v každé živočišné buňce, který vytváří koncentrační gradient sodných a draselných iontů, přičemž spotřebovává energii z hydrolýzy ATP. Podle výše uvedené klasifikace se tedy jedná o primární aktivní přenašeč.

#### 2.1.1 Fyziologický význam

$Na^+/K^+$ -ATPáza je jedním z nejvýznamnějších enzymů živočišného metabolismu. Hraje roli při tvorbě klidového membránového potenciálu, vytváří gradient  $Na^+$ , kterého následně využívají další enzymy k přenosu jiných látek přes cytoplasmatickou membránu (sekundární aktivní transport) [Freel, Goldner 1981, Bers a kol. 2003] a pomáhá udržovat osmotickou rovnováhu v buňkách. O významu  $Na^+/K^+$ -ATPázy svědčí i to, že na činnost tohoto enzymu se spotřebuje až třetina veškerého ATP v buňce. [DeWeer a kol. 1985]

Membránový potenciál bývá označován jako elektro-chemický. Elektrická složka je dána rozdílným nábojem na opačných stranách membrány, chemická složka je pak dána rozdílem koncentrací jednotlivých solutů.  $Na^+/K^+$ -ATPáza vytváří gradienty sodíku i draslíku, čímž přispívá k chemické složce a díky tomu, že během jednoho katalytického cyklu za obvyklých podmínek exportuje 3 sodné ionty, ale importuje jen 2 draselné ionty, přispívá i k elektrické složce. Lze tedy říci, že pro nastavení membránového potenciálu je role  $Na^+/K^+$ -ATPázy zcela zásadní. [Kuhlbrandt 2004]

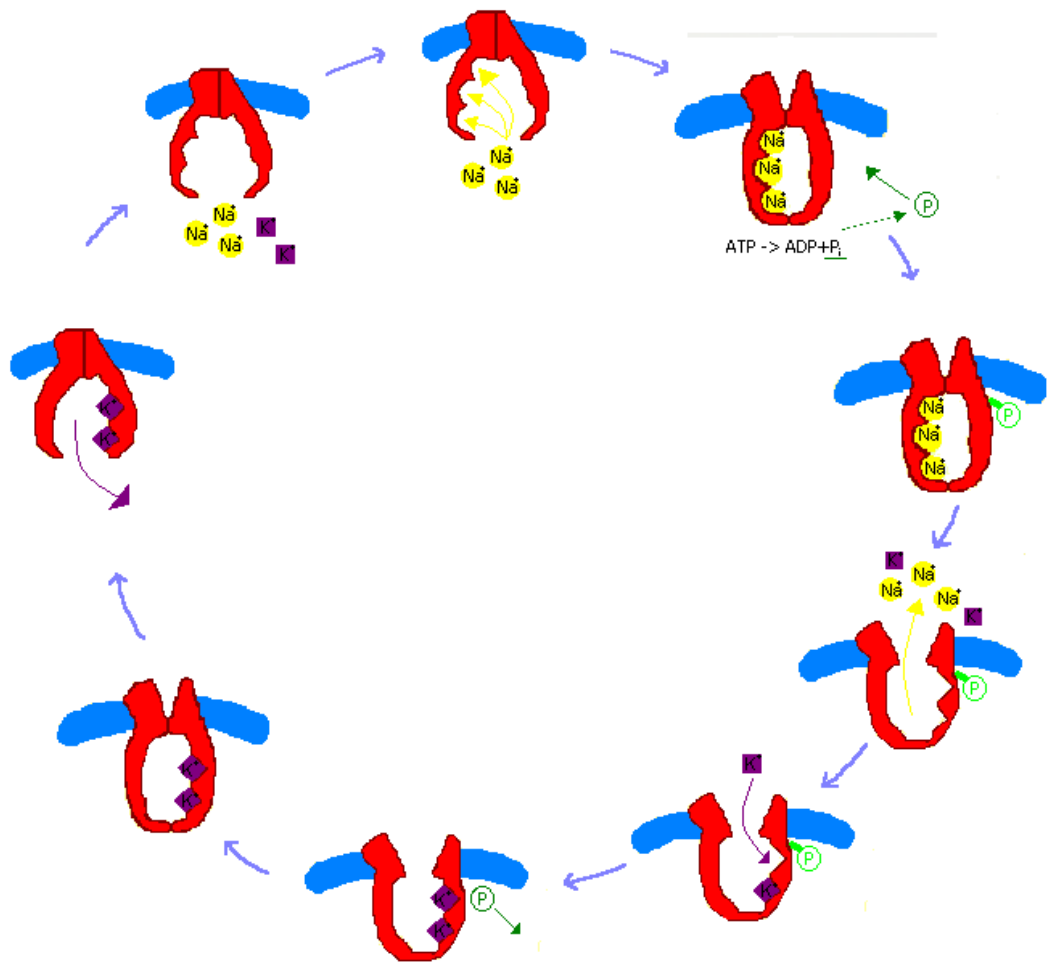
Neméně důležitý význam sodno-draselné pumpy spočívá v tom, že je jediným aktivním přenašečem sodných iontů ven z buňky. Vzniklého gradientu sodíku pak využívají další sekundární aktivní přenašeče k transportu jiných látek. Jedná se např. o glukoso-sodný symport,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport nebo  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport. [Bossuyt a kol. 2006]

Konečně sodno-draselná pumpa pomáhá udržovat osmotickou rovnováhu tím, že z buňky neustále odčerpává sodné ionty. Kdyby k tomu nedocházelo, vlivem osmózy by docházelo k proudění vody do buňky, což by mohlo skončit nabobtnáním a smrtí buňky.

Je tedy zřejmé, že jakékoliv ovlivnění funkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy může mít dramatický vliv na fungování buňky i celého organismu. Není tedy divu, že dysfunkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy je spojována s nemocemi nervového aparátu (membránový potenciál), *diabetes mellitus* či infarkt (sekundární transport) a šedý zákal či dysfunkce ledvin (osmotická rovnováha). [Schulpis a kol. 2006]

### 2.1.2 Funkce $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy

Za normálních podmínek funkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy spočívá v přenosu  $3\text{Na}^+$  ven z buňky a  $2\text{K}^+$  dovnitř buňky při hydrolýze 1 molekuly ATP na ADP a fosfát. Činnost tohoto enzymu je obvykle popisována Albers-Postovým cyklem [Albers 1967; Post a kol. 1969], který je zobrazen na obrázku 1.



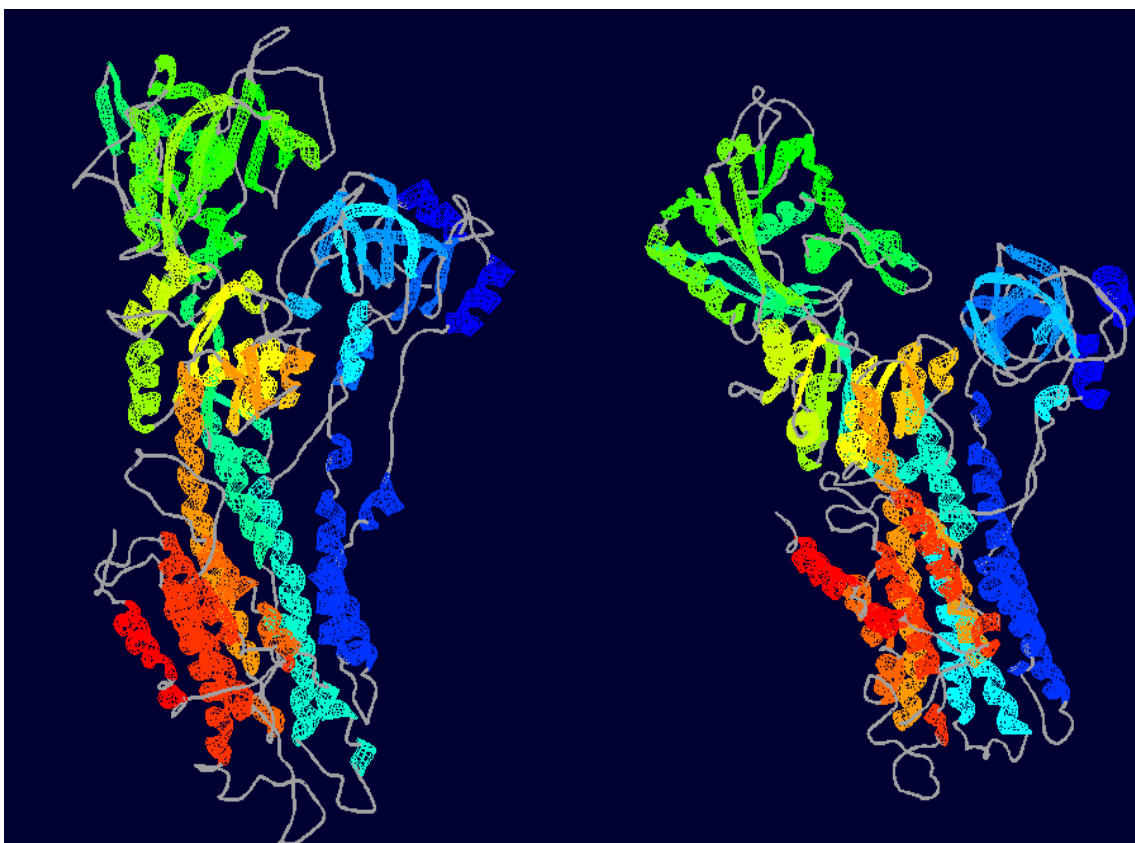
**Obrázek 1: Albers-Postův cyklus**

Prvním krokem je navázání  $3\text{Na}^+$  na vazebná místa na intracelulární straně, čímž se aktivuje ATPázová činnost enzymu. Dojde k rozštěpení  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$  a navázání fosfátové skupiny na enzym. Pumpa se autofosforyluje, což způsobí změnu konformace a přenos sodných iontů ven z buňky.

Na extracelulární straně se tak vystaví vazebná místa pro  $\text{K}^+$ , který má nyní vyšší afinitu k pumpě. Navázání draslíku způsobí defosforylaci enzymu, následnou změnu konformace a návrat do původní podoby. Tím se přenesou ionty  $\text{K}^+$  dovnitř buňky a celý cyklus se může opakovat. Délka tohoto cyklu je asi 10 ms a zablokování kteréhokoli kroku způsobí zastavení práce celé pumpy. *In vivo* se tento cyklus pohybuje jen v tomto směru (po směru hodinových ručiček), zajímavá je skutečnost, že *in vitro* byl tento cyklus pozorován i v opačném směru. [Kubala 2003].

V souladu s Albers-Postovým cyklem rozeznáváme 2 konformace  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy tradičně popisovány jako výsledek interakce s ionty sodíku a draslíku. Rozdíl spočívá v různé prostorové uspořádanosti. Konformace  $\text{E}_1$  se vyznačuje vysokou

afinitou k  $\text{Na}^+$  a nízkou afinitou k ATP a  $\text{K}^+$ , vazebná místa jsou přístupná z cytoplasmy. U konformace  $\text{E}_2$  je tomu přesně naopak. Vazebná místa jsou přístupná z extracelulárního prostoru a konformace  $\text{E}_2$  se vyznačuje vysokou afinitou ke  $\text{K}^+$  a nízkou k  $\text{Na}^+$  a ATP. [Albers 1967, Post a kol. 1972] Rozdíl v konformacích je znázorněn na modelu vápníkové pumpy na obrázku 2.



**Obr 2. Zobrazení rozdílů konformací  $\text{E}_1$  a  $\text{E}_2$  u  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázy ze sarkoplasmatického retikula**  
Peptidický řetězec je obarven podle barev spektra od N-konce (modrá) k C-konci (červená). V horní části obrázku jsou patrné tři cytoplasmatické domény A (modrá), N (zelená) a P (žlutozelená až žlutá), v dolní části jsou transmembránové helixy. Levý obrázek znázorňuje pumpu v  $\text{E}_2$  konformaci (PDB kód 1liw) [Toyoshima a Nomura 2002], na pravém obrázku je pumpa v konformaci  $\text{E}_1$  (PDB kód 1su4, [Toyoshima a kol. 2000])

Nedávná studie [Gryčová a kol. 2009] však hovoří také o vlivu  $\text{Mg}^{2+}$  na konformaci cytoplasmatické části  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Přítomnost hořčíku jako esenciálního kofaktoru, který není transportován skrz cytoplasmatickou membránu, ale pro funkci enzymu je nezbytný, odhalily už experimenty v roce 1960 [Skou, 1960]. Ukazuje se spojitost mezi navázáním  $\text{Mg}^{2+}$  a změnou konformace této části bez vlivu  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  jako transportovaných kationtů, kterým byla doposud přisuzována zodpovědnost za změnu konformace pumpy. Detailněji jsou tyto pokusy rozepsány v kapitole 2.1.4.

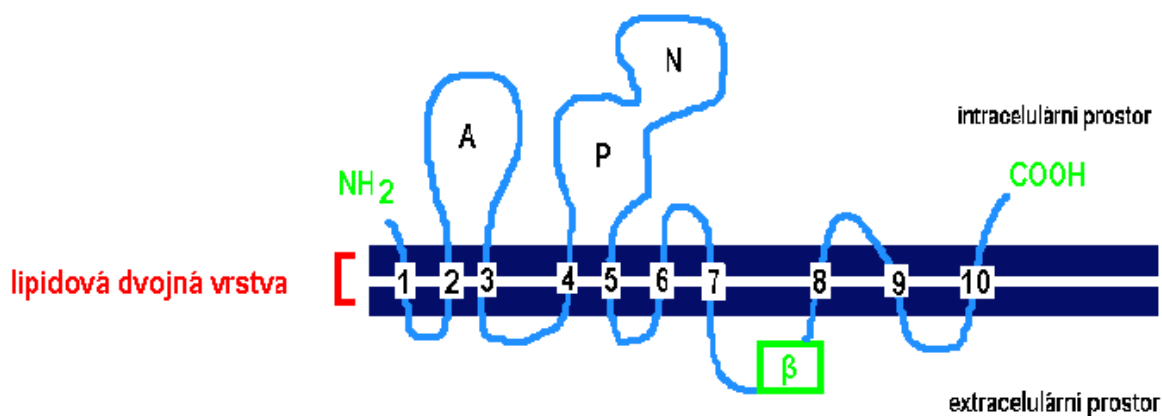
Existují také oligomerní modely předpokládající existenci dvou a více podjednotek. [Thoenges a kol. 1999; Tanoue a kol. 2006; Clarke a Kane 2007 ]

### 2.1.3 Struktura

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza se skládá z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Podjednotka  $\alpha$  je protein obsahující vazebná místa pro Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> a ATP, která jsou homologická pro P-typy ATPáz, jako např. Ca<sup>2+</sup>ATPáza. Podjednotka  $\alpha$  se skládá z deseti transmembránových domén (M1-M10) a tří velkých domén v cytoplazmě. Ty jsou označeny A, P a N. Doména A je tvořena cytoplazmatickým N-koncem a klíčkou mezi druhým a třetím transmembránovým helixem a tvoří ji zhruba 120 aminokyselin. Označení A pochází z anglického „actuator“ nebo „anchor“. N doména podle anglického „nucleotide“ obsahuje vazebné místo pro ATP a nachází se spolu s P doménou mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem. P doména („phosphorylation“) obsahuje konzervované fosforylační místo na Asp369. [Moller a kol. 1996]

Existuje mnoho experimentů prokazujících velikou podobnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy se strukturou Ca<sup>2+</sup>ATPázy [Sweadner a kol. 2001]. To potvrdila i nedávno publikovaná první krystalografická struktura Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy při 3,5Å rozlišení [Morth a kol. 2007].

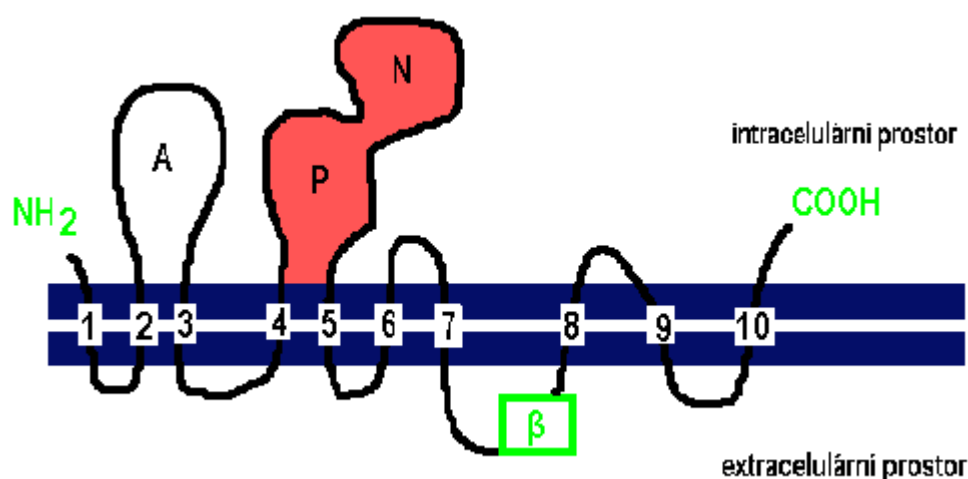
Beta podjednotka je glykoprotein o velikosti 55kD, který má jeden transmembránový helix. Její struktura ani role nejsou ještě zcela objasněny. Je prokázáno, že je nezbytná ke správnému sbalení podjednotky  $\alpha$  a také pro zabudování enzymu do plasmatické membrány. Další experimenty naznačují, že by mohla hrát roli při transportu draselných iontů [Kubala 2006; Morth a kol. 2007].



Obr.3: Struktura Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPázy

#### 2.1.4. Velká cytoplasmatická klička

Velká cytoplasmatické klička C45 představuje část mezi 4. a 5. transmembránovým helixem (červeně zobrazeno na následujícím obrázku) podjednotky  $\alpha$ . Tento cytoplasmatický segment je dlouhý 430 aminokyselin, z čehož 180 residuí náleží N-doméně. [Taylor a kol. 1989]



Obrázek 4: Červeně vyznačená část velké cytoplasmatické kličky C45

Při pokusech s touto izolovanou částí spojující 4. a 5. transmembránový helix bylo zjištěno, že zaujímá uzavřenou konformaci v nepřítomnosti jakéhokoli ligandu, v případě samotného  $Mg^{2+}$ , nebo v současné přítomnosti  $Mg^{2+}$  i ATP. Při navázání samotného ATP (bez  $Mg^{2+}$ ) byla pozorována konformace otevřená. Tyto výsledky naznačují, že konformační změny nejsou důsledkem navázání sodných nebo draselných iontů, jelikož v těchto experimentech se pracovalo jen s izolovanou částí velké cytoplasmatické kličky a změny konformace tak způsobila pouze interakce s ATP a  $Mg^{2+}$ . Výsledky souhlasí s modelem, kdy navázání ATP indukovalo konformační změny označované jako  $E_2 \rightarrow E_1$  a následné navázání  $Mg^{2+}$  na komplex enzym-ATP pak vyvolalo konformační změnu  $E_1 \rightarrow E_2$ . [Gryčová a kol. 2009]

V případě měření na velké cytoplasmatické kličce bylo zapotřebí nejprve kličku získat. Bylo dokázáno, že tento cytoplasmatický segment C45 obsahující N i P doménu lze beze zbytku enzymu získat heterologní expresí v bakteriích *E. Coli* a následnou izolací pomocí afinitní chromatografie. [Gatto a kol. 1998, Tran a kol. 1999, Kubala a kol. 2002, Kubala a kol. 2003, Lánský a kol. 2004].

Celý postup je detailně popsán v následujících odstavcích, přesné složení používaných roztoků a experimentální procedury jsou pak v kapitole „Materiál a metody“.

### 2.1.5. Příprava a izolace velké cytoplasmatické kličky

Pro expresi bylo použito bakterií *E.coli*, do kterých byla vnesena část DNA kódující velkou cytoplasmatickou kličku Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy.

Transformace *E.coli* (tyčinkovitá bakterie obsahující cirkulární chromozom dlouhý cca 3x10<sup>6</sup> párů bází) je děj, kdy dochází k přijetí cizorodé genetické informace (DNA) recipientními buňkami *E.coli*. To může nastat pouze za předpokladu, že se buňka nachází ve stavu tzv. kompetence, čili ve stavu, kdy je schopna z okolního prostředí přijmout DNA. K tomu, aby došlo k navození umělé kompetence buňky, je zapotřebí kultivovat buňky v médiu obsahujícím Mg<sup>2+</sup> a následně aplikace tepelného šoku (tzv. *heatshock*). Vnášená DNA se smíchá s kompetentními buňkami a nechá se tak určitou dobu, aby mohla adherovat k povrchu buněk. Vše se musí dít za nízkých teplot, proto je třeba suspenzi inkubovat na ledu. Poté následuje tepelný šok vysokou teplotou (42°C), který způsobí otevření pórů v membránách buněk a usnadní tak vstup DNA dovnitř buněk. Tepelný šok je přesně časově definovaný a bezprostředně po něm následuje opět zchlazení.

Alternativou k metodě tepelného šoku je metoda elektroporace. Při této metodě se buňky v roztoku obsahujícím DNA vystaví krátkému elektrickému pulzu o vysokém napětí, což způsobí dočasné otevření pórů v membráně buňky, kterými poté může DNA do buňky vniknout. Účinnost metody ovlivňuje jednak intenzita elektrického pole, délka pulzu, ale i teplota, koncentrace DNA, iontové složení média a velikost buněk.

Dalším krokem je kultivace v neselektivním médiu, při které dochází k syntéze proteinů kódovaných danou vstupující DNA, která zajistí např. rezistenci vůči antibiotiku. Nakonec jsou buňky vysety na pevné médium obsahující příslušné antibiotikum, vůči kterému má vnesená DNA zajistit rezistenci. Díky tomu existuje možnost pozdější identifikace příslušných transformantů.



## **Růst**

Poté je vybrána jedna určitá kolonie narostlých bakterií, která se nechá dále po dobu 13-16h růst v kapalném médiu. Pro vyhodnocování nárůstu bakterií se nejčastěji využívá odhad pomocí spektrofotometrického měření. Měření je založeno na odhadu počtu mikroorganismů na základě spektrofotometrického měření zákalu při vlnové délce 600nm. V hrubé aproximaci lze říci, že kultura *E. coli* o absorbanci  $A_{600} \sim 0,1$  obsahuje cca  $10^8$  buněk na 1 ml.

## **Indukce**

K indukci exprese je nezbytná přítomnost silného a dobře kontrolovatelného promotoru, jehož indukce ve výsledku zajistí produkci požadovaného proteinu. K indukci *lac promotoru* se používá IPTG, který je snadno transportován do buněk a slouží tam jako účinný induktor, ačkoli není buňkami metabolizován. I v našem případě byla indukována exprese kličky C45 pomocí IPTG. Přidáním této látky dosáhneme tedy cílené exprese námi požadovaného proteinu.

## **Purifikace**

Purifikaci zahrnuje několik kroků. Nejprve je potřeba rozbít buňky. To lze provést pomocí sonikace. Jedná se o působení ultrazvuku s takovou intenzitou, že dojde k rozbití buněčných stěn bakterií a vylití obsahu cytoplazmy do roztoku.

Následnou centrifugací se docílí oddělení zbytků buněčných stěn od cytoplazmatické frakce. Vzniklý pelet obsahuje nežádoucí zbytky a supernatant směs cytoplazmatických proteinů (jelikož klička C45 je cytoplazmatickou částí  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy, je rozpustná a nachází se v supernatantu). Při expresi nedochází pouze k vytvoření námi požadovaného proteinu, ale i dalších bakteriálních proteinů, proto je zapotřebí dalších kroků k získání čistého proteinu.

Toho se docílí metodou afinitní chromatografie. Gen kódující C45 je zfúzován s genem kódujícím hexahistidinovou kotvu, která se s vysokou afinitou váže na kobalt. Afinitní chromatografií na kolonách, obsahujících speciální náplň s kobaltem, dojde k selektivnímu navázání právě této kličky s histidinovou kotvou. Následným promytím kolony dojde k vyplavení všech ostatních proteinů, které nebyly uchyceny.

Posledním krokem je vytěsnění požadovaného proteinu z vazebného místa na koloně pomocí koncentrovaného roztoku imidazolu, který se kompetitivně váže na

kobalt. Eluovaný roztok je však třeba ještě dále upravit dialýzou, aby nedošlo k denaturaci proteinu.

Dialýza je děj založený na principu osmózy, při kterém jsou od sebe odděleny látky s různou rozpustností a velikostí. Prakticky se tak děje přechodem analyticky disperzních látek přes polopropustnou membránu z prostředí s vyšší koncentrací těchto látek do prostředí s nižší koncentrací. Dialýzou vzniklého roztoku obsahujícího kličku tak dojde k dalšímu vyčištění.

Čistotu purifikovaného proteinu lze ověřit pomocí elektroforézy (SDS-PAGE). Při gelové elektroforéze dochází k migraci proteinů v elektrickém poli skrz póry v polyakrylamidovém gelu na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Gel je polymerován pomocí APS a TEMED a jeho propustnost souvisí s velikostí pórů a tedy přímo úměrně s koncentrací polyakrylamidu. Elektroforetická pohyblivost závisí na mnoha faktorech jako délka polypeptidového řetězce, molekulární hmotnost, velikost pórů v gelu, nebo náboj a stupeň denaturace proteinu.

K denaturaci proteinu se používá detergent SDS, který se váže na hlavní polypeptidový řetězec a tím způsobí denaturaci proteinu a jednak ho učiní záporně nabitým a to přímo úměrně molekulové hmotnosti. Tyto záporně nabité proteiny poté v elektrickém poli putují směrem k anodě v závislosti na svých hmotnostech - těžší proteiny putují nižší rychlostí díky odporu kladenému gelem. Ve výsledku tak dojde k rozdělení proteinů podle jejich hmotnosti. Ke zkoumaným vzorkům se navíc přidávají proteiny o známé molekulové hmotnosti (markery), které usnadňují identifikaci proteinu ve vzorku. Na základě gelu lze pak zjistit identitu i přibližnou koncentraci testovaných vzorků.

## ***2.2 Interakce $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy s jinými látkami***

Vzhledem k fyziologickému významu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy (viz kapitola 2.1.1.), všechny látky, které mohou ovlivnit její funkci, si zasluhují zvýšenou pozornost. Interakce s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou byly pozorovány pro celou řadu látek, jako anorganické ionty, hormony (insulin, aldosteron, dopamin) [Ewart a kol. 1995], nebo biomakromolekuly. Aktivitu však může ovlivňovat i hladovění, či fyzická aktivita [Kotova 2006]. V následujících odstavcích jsou látky ovlivňující aktivitu rozděleny do tří skupin – anorganické ionty, malé organické molekuly a biomakromolekuly.

V případě anorganických iontů se jedná zejména o těžké kovy, které podle očekávání bez výjimky způsobují inhibici. Jedná se o  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , [Boiko a kol. 2004]  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{1+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ .

Další skupinou jsou organické molekuly, kde je situace již trochu složitější. Vyskytují se zde i látky, u kterých byla zjištěna stimulace aktivity sodno-draselné pumpy. Nejznámější a nejčastěji uváděnou látkou způsobující inhibici  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy je ouabain. [Stimac a kol. 2005] Jedná se o velmi specifickou a vysoce toxickou látku užívanou v malých dávkách pro stimulaci srdečního svalu. Princip spočívá v tom, že nefunkční  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázu nahradí buňka použitím  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pumpy, pomocí které se do buňky dostanou  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a spustí se tak svalová kontrakce.

Aspartam je další látkou, u níž bylo zjištěna inhibice sodno-draselné pumpy. Aspartam je umělé sladidlo, které se od roku 1981 používá do potravin a nápojů. V těle je metabolizován na kyselinu asparagovou (Asp), metanol a fenylalanin (Phe). U všech těchto metabolitů bylo prokázáno, že při vyšších koncentracích způsobují inhibici  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Té se však podařilo zčásti, nebo kompletně zabránit L-cysteinem. Klinické studie dokazují vliv na mozkovou aktivitu epilepsií postižených dětí, ukazuje se též souvislost aspartamu s výskytem záchvatů, bolestí hlavy a vzniku nádorů. [Van den Eeden a kol. 1994, Camfield a kol. 1992, Schulpis a kol. 2005]

Velmi rozšířenou třídou léků jsou kortikosteroidy. U těchto léků byl taktéž zjištěn vliv na aktivitu sodno-draselné pumpy. Ve studii [Kim a kol. 2006] bylo dokázáno, že kortikoidy zvyšují aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy v ledvinách krysích mláďat.

Dopamin je další látkou, u které byl dokázán vliv na aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Dopamin je chemická látka přirozeně vznikající v mozku. Funguje jako neurotransmiter a neurohormon a je vytvářen v hypotalamu. Ve studii [Chen a kol. 2006] jsou uváděny dva způsoby inhibice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy pomocí dopaminu. Jde zde o případ velmi složité interakce, kdy působení dopaminu spouští celou kaskádu dalších reakcí.

Tyto a další látky včetně jejich působení na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázu jsou uvedeny v následující tabulce. [Vu a kol. 2005, LaMarca a kol. 2005]

<b>látka</b>	<b>způsob interakce</b>
kyselina asparagová	inhibice
fenylalanin	inhibice
metanol	inhibice
kortikosteroidy	<i>stimulace</i>
marinobufagenin	inhibice
resibufogenin	inhibice
ouabain	inhibice
homocystein	<i>stimulace</i>
dopamin	inhibice
L-alanin	brání stimulaci způsobenou Hcy
L-cystein	<i>brání inhibici způsobenou aspartamem</i>

**Tabulka 1: Seznam molekul ovlivňujících aktivitu sodno-draselné pumpy**

Poslední skupinou jsou biomakromolekuly ovlivňující aktivitu sodno-draselné pumpy. Patří sem např. neuropeptid neurokinin B, u kterého bylo zjištěno, že hraje roli při ochraně před neurodegenerativními onemocněními typu Alzheimerovy choroby. Dále  $\beta$ -amyloid, kterému je naopak přisuzována role původce Alzheimerovy choroby, nebo třeba agrin, což je látka hrající roli při vedení nervových vzruchů, která je přítomna v nervových synapsích. Souhrn všech látek s jejich účinky je opět v následující tabulce. [Yoon a kol. 2006, Mantha a kol. 2005, Hilgenberg a kol. 2006, Zugno a kol. 2005]

<b>látka</b>	<b>způsob interakce</b>
guanidinoacetát	inhibice
agrin	inhibice
TCTP	inhibice
SNX6	<i>brání inhibici způsobenou TCTP</i>
NKB	<i>stimulace</i>
amyloid $\beta$	inhibice

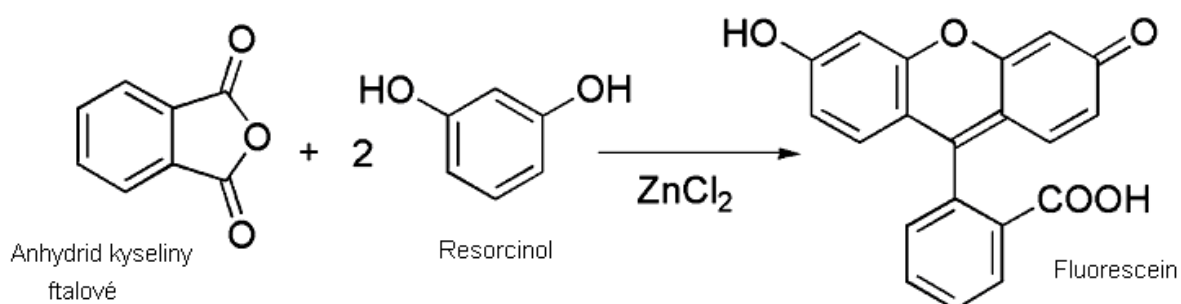
**Tabulka 2: Seznam biomakromolekul ovlivňujících aktivitu sodno-draselné pumpy**

## 2.3 Fluorescein

V této práci bylo zkoumáno, zda dochází k interakci  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy s fluoresceinem. Fluorescein je látka s širokým spektrem použití. Jednu takovou oblast představuje i medicína, kde je však při podání fluoresceinu jak intravenózně, tak perorálně, známa řada vedlejších účinků. Patří mezi ně alergické reakce, nevolnost, zvracení, prudká hypotenze, v krajních případech až anafylaktický šok, zástava srdečního svalu, či dokonce smrt. I tyto skutečnosti mohou naznačovat, že může docházet k interakci mezi fluoresceinem a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou.

### 2.3.1 Chemické vlastnosti fluoresceinu

Fluorescein byl poprvé syntetizován Adolfem von Baeyerem v roce 1871. Lze ho připravit reakcí resorcinolu a anhydridu kyseliny ftalové za přítomnosti  $\text{ZnCl}_2$ .



**Obrázek 5: Schéma výroby fluoresceinu** (upraveno podle wikipedia.com)

Fluorescein je žlutozelené organické barvivo s velmi vysokou intenzitou fluorescence, kterou lze pozorovat i ve velmi zředěných roztocích. Je poměrně levný a v menších dávkách netoxický, díky čemuž je široce použitelný. Jeho nevýhodou je fakt, že na světle dochází k jeho samovolnému rozkladu. Fluorescein existuje ve dvou formách– chinoidní a laktonové. Chinoidní forma fluoresceinu je tmavě červený krystalický prášek, zatímco laktonová forma je žlutý, nekystalický, dokonale sypký prášek. Molekulová hmotnost fluoresceinu je  $333 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , patří do skupiny xanthenů a mezi jeho deriváty patří např. eosin a erythrosin. V závislosti na pH můžeme pozorovat

různé iontové formy fluoresceinu v rozmezích pH od 0 do 13. Při velmi nízkém pH v kyselé oblasti existuje fluorescein v podobě kationtu, při pH 2-4 se vyskytuje v neutrální formě. Při dalším zvyšování pH molekula disociuje na aniont a při pH nad 8 disociuje na dianion. [Dandlike, Alonso 1969, Diehl, Markuszewki 1989, Horák 2007]. Hodnoty pK pro jednotlivé formy fluoresceinu jsou následující [Smith, Pretorius 2002]:

$$pK_{a1}=2.22$$

$$pK_{a2}= 4.34$$

$$pK_{a3}= 6.68$$

### 2.3.2 Spektrální vlastnosti fluoresceinu

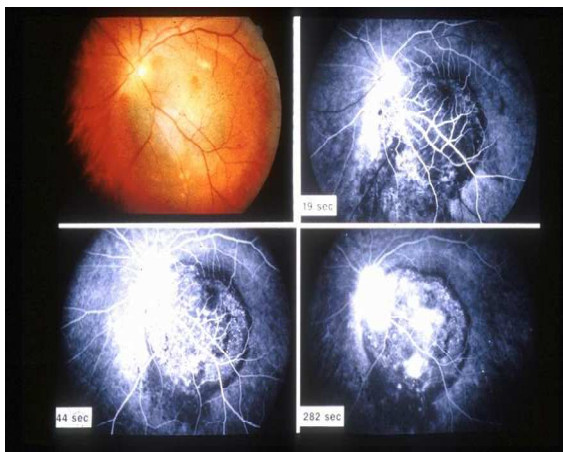
Při fyziologických hodnotách pH převažuje fluorescein ve formě dianiontu, což je společně s aniontem jediná forma fluoresceinu vykazující fluorescenci. Kvantový výtěžek aniontu je 0,37, dianiontu pak 0,93. Vlnová délka a tvar emisních spekter získaných excitací v blízkosti 490 nm je relativně nezávislá na pH, avšak intenzita se v kyselých roztocích může dramaticky snižovat. S ohledem na použité pufrы a pH v našich pokusech však můžeme toto zanedbat. Maximum absorpce pro dianiontovou formu fluoresceinu je 495 nm, emisní maximum potom 520 nm.

Vzhledem k tomu, že spektrální vlastnosti fluoresceinu závisí na kyselosti roztoku, je fluorescein často využíván jako sonda pro pH ve spektroskopických i mikroskopických studiích a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Lze ho využít v nejrůznějších odvětvích. Od mikroskopie, přes molekulární biologii, genetiku a medicínu, až třeba ke stopování podzemních vod.

### 2.3.3 Užití v medicíně

Příkladem použití fluoresceinu v medicíně je fluorescenční angiografie. Jedná se o kontrastní vyšetření cév uvnitř oka (v oční sítnici nebo duhovce). Pacientovi je do žíly na ruce zavedena kanyla, do které je následně aplikován fluorescein. Ten se během 8-10 sekund dostane do sítnicového řečiště (v krvi se vyskytuje jen minimum volného fluoresceinu, protože 75-85% se váže na proteiny séra a krvinky) a obraz cévního systému oka je pak zachycen na fotografii speciální digitální kamerou. Fyziologicky

fluorescein neprostupuje stěnou sítnicových cév, ale prostupuje stěnou poškozených cév, čímž lze získat informaci o úrovni poškození sítnice. Na obrázku 6 je znázorněn snímek z fluorescenční angiografie, kde lze pozorovat pronikání fluoresceinu krevním řečištěm sítnice oka.



**Obr.6: Záznam z fluorescenční angiografie sítnice oka**

(převzato z [http://www.eyetumour.com/images/large/fluorescein\\_angiogram.jpg](http://www.eyetumour.com/images/large/fluorescein_angiogram.jpg))

#### 2.3.4 Užití fluoresceinu při stopování podzemních vod

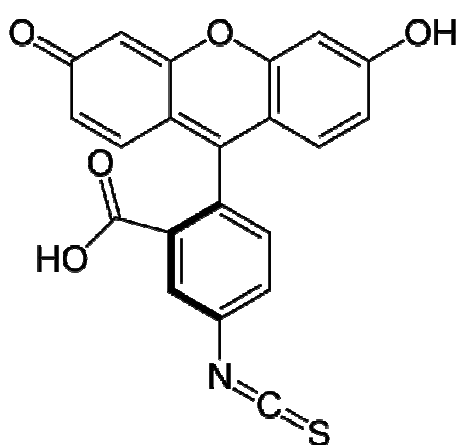
Dalším možným využitím fluoresceinu je stopování podzemních vod. Tradičně se fluorescein používá v hydrogeologickém výzkumu krasových oblastí.

Historicky první použití fluoresceinu jako stopovače se datuje krátce po jeho syntéze, kdy von Baeyer vlil roztok obsahující 10 kg fluoresceinu do Dunaje blízko hlavních pramenů. Po šedesáti hodinách se objevila jeho charakteristická fluorescence v malých řekách, které se vlévají do Bodamského jezera a následně do Rýna. [Horák 2007]

#### 2.3.5. Interakce fluoresceinu s $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou

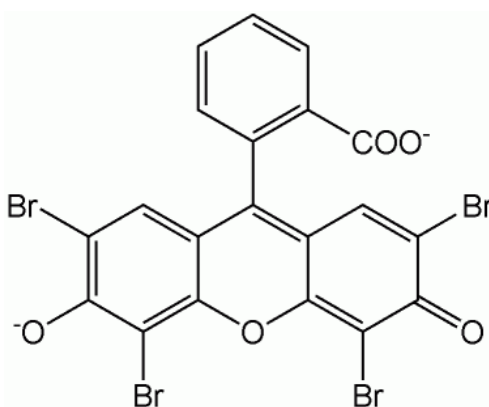
Již dlouho je známo, že  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza specificky váže analog fluoresceinu, fluoresceinizothiokyanát (FITC), který tvoří kovalentní vazby s postranními řetězci lysinových zbytků. Strukturní vzorec FITC je uveden na obrázku 7. V případě  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy se FITC specificky kovalentně váže na  $\text{Lys}^{501}$ , který je součástí vazebného místa pro ATP [Kubala a kol. 2006, Farley a kol. 1984]. Tato modifikace vazebného místa pro ATP však způsobuje irreverzibilní zablokování katalytického cyklu enzymu, což bylo poprvé publikováno již v roce 1980 [Karlsh 1980].

V kapitole 2.3.1 byl jako blízký analog fluoresceinu uveden eosin (tetrabromofluorescein). Strukturní vzorec je uveden na obrázku 8. Eosin reversibilně inhibuje  $\text{Na}^+$ -ATPázu. Z toho, že eosin zabraňuje navázání FITC autoři usoudili, že se kompetitivně váže na vazebné místo pro ATP (ATPázová aktivita byla měřena při absenci  $\text{K}^+$  iontů) [Ogan a kol. 2007]. Očekáváme, že fluorescein bez izothiokyanátové skupiny by se v případě vazby na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázu vázal podobným způsobem jako eosin, tzn. že by se nejednalo o kovalentní vazbu. Této skutečnosti by se dalo následně využít k monitorování vazby dalších (i nefluorescenčních) substrátů na  $\text{Na}^+$ -ATPázu pomocí kompetitivního vytěsňování [Kubala a kol. 2004].



**Obr.7: Fluorescein isothiokyanát**

(převzato z wikipedia.com)



**Obr. 8: Tetrabromofluorescein (eosin)**

(převzato z wikipedia.com)



## 2.4. Vybrané metody fluorescenční spektroskopie

### 2.4.1. Měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání fotonů

Dobu života excitovaného stavu fluoroforu je možné určit metodou korelovaného čítání fotonů (time-correlated single photon counting - TCSPC). Při této metodě budíme populaci fluoroforů krátkým excitačním pulsem (ideálně  $\delta$ -puls) a následně sledujeme časovou závislost depopulace excitovaného stavu. V praxi aplikujeme sérii pulzů, přičemž po každém pulzu dojde k zaznamenání nejvýše jednoho fotonu a měří se čas mezi excitačním pulzem a dobou zaznamenání emitovaného fotonu detektorem. Výsledkem je histogram znázorňující časovou distribuci fotonů. Závislost intenzity fluorescence na čase je potom fitována pomocí funkce:

$$(1) \quad I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t / \tau_i)$$

Střední doba života je pak vypočítána jako:

$$(2) \quad t = (\sum \alpha_i \tau_i^2 / \sum \alpha_i \tau_i)$$

### 2.4.2 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je jev, při kterém obecně dochází k poklesu intenzity fluorescence vzorku vlivem interakcí s dalšími molekulami. Zhášení fluorescence obvykle dělíme na dynamické (kolizní) a statické.

Při dynamickém (kolizním) zhášení molekuly fluoroforu nejsou chemicky změněny. Dochází k deaktivaci fluoroforu v excitovaném stavu molekulou zhášedla a fluorofor se následně vrací do základního stavu bez emise fotonu. Molekula zhášedla se v tomto případě musí difúzí dostat do kontaktu s fluoroforem během doby, kdy se fluorofor nachází v excitovaném stavu.

Statické zhášení je proces, kdy dojde k vytvoření chemického komplexu, který neemituje fluorescenci. Molekuly fluoroforu jsou tedy, narozdíl od předchozího případu, chemicky změněny.

Studium zhášení fluorescence nám tedy může poskytnou řadu informací o dějích, které probíhají mezi molekulami fluoroforu a zhášedla.

#### 2.4.2.1 Teorie dynamického zhášení

Závislost fluorescenčních charakteristik v případě kolizního zhášení fluorescence je popsána Stern-Volmerovou rovnicí (3)

$$(3) \quad F_0/F = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$

kde:

$F_0$ .....	intenzita fluorescence při absenci zhášedla
$F$ .....	intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedla o koncentraci $[Q]$
$k_q$ .....	bimolekulární zhášecí konstanta
$\tau_0$ .....	střední doba života fluoroforu při absenci zhášedla
$\tau$ .....	střední doba života fluoroforu v přítomnosti zhášedla o koncentraci $[Q]$ .....
$[Q]$ .....	koncentrace zhášedla
$K_{SV}$ .....	Stern-Volmerova zhášecí konstanta

Pokud se jedná o kolizní zhášení, Stern-Volmerova konstanta  $K_{SV}$  je dána součinem  $k_q \tau_0$ . Obvykle se data vynášejí jako závislost  $F_0/F$  na  $[Q]$  (tzv. Stern-Volmerův graf). Je to proto, že očekáváme lineární závislost  $F_0/F$  na koncentraci zhášedla. Pokud je tato závislost lineární, všeobecně to značí přítomnost jednoho druhu fluoroforu, kde jsou všechny molekuly zhášedlu stejně přístupné. Odchylky od lineárního chování pozorujeme při vysokých koncentracích zhášedla, nebo ve složitějších případech, např. pokud bychom měli dva druhy fluoroforu, z nichž jeden by nebyl zhášedlu přístupný.

Bimolekulární zhášecí konstanta (což je Stern-Volmerova zhášecí konstanta korigovaná na střední dobu života excitovaného stavu), je pak závislá především na molekulárních poloměrech fluoroforu a zhášedla a na jejich difúzních koeficientech. Z hlediska studia molekulárních interakcí nás pak zajímá vliv dalších faktorů a to především prostorové přístupnosti, popř. dalších interakcí (např. elektrostatických).

### 2.4.2.2 Teorie statického zhášení

Statické zhášení je výsledkem vytvoření nefluorescenčního komplexu mezi fluoroforem a zhášedlem. Pokud takovýto komplex absorbuje světlo, dojde k excitaci a následnému navrácení do základního stavu bez emise fotonu. Intenzita fluorescence je tedy přímo úměrná koncentraci volného fluoroforu. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci zhášedla je dána rovnováhou:

$$(4) \quad K_{sv} = [F-Q] / [F] [Q]$$

kde:

[F-Q] ...koncentrace komplexu

F... koncentrace volného fluoroforu

Q... koncentrace volného zhášedla

$K_{sv}$  ... asociační konstanta pro tvorbu komplexu

Porovnání s intenzitou fluorescence v nepřítomnosti zhášedla  $F_0$  lze odvodit vztah:

$$(5) \quad F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]$$

Závislost  $F_0/F$  na  $[Q]$  je lineární a rovnice je formálně shodná s rovnicí popisující dynamické zhášení, význam Stern-Volmerovy konstanty je však zcela odlišný.

### 2.4.2.3 Rozlišení mezi statickým a dynamickým zhášením

Statické a dynamické zhášení lze také rozlišit na základě měření doby života fluoroforu v excitovaném stavu. U statického zhášení k poklesu doby života nedochází. Fluorescenci totiž vykazují jen molekuly, které nejsou chemicky změněny. Zbylé molekuly fluorescence nevykazují, čili doba života je stále rovna  $\tau_0$  a platí:

$$(6) \quad \tau_0/\tau = 1$$

U dynamického zhášení se jedná o proces, který přispívá k depopulaci excitovaného stavu, což má za následek zkrácení střední doby života excitovaného stavu a platí vztah:

$$(7) \quad F_0/F = \tau_0/\tau$$

## 3. Materiál a metody

### 3.1 $Na^+/K^+$ -ATPáza

Izolovaná  $Na^+/K^+$ -ATPáza z prasečího mozku byla zakoupena od firmy Sigma a skladována v  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2 Příprava velké cytoplasmatické kličky

Pokusy s velkou cytoplasmatickou kličkou probíhaly s proteinem připraveným dle následujícího protokolu. Protokol se skládá z částí: transformace *E.coli*, očkování, indukce, purifikace a elektroforéza.

#### Transformace E.Coli

Nejprve bylo třeba připravit LB agar a LB médium ve složení:

##### LB agar:

LB médium + 10 g/l Bacto agar (Difco)

##### LB médium:

10 g/l Peptone from casein (Serva)

5 g/l Yeast extract (Serva)

10 g/l NaCl (Sigma)

pH 7,5 (upravit před sterilizací)

Sterilizovaný LB agar byl temperován na  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , poté bylo přidáno antibiotikum kanamycin (Roth) na finální koncentraci  $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Transformace byla provedena metodou *heat shock*. K  $5\text{ }\mu\text{l}$  zmrazených buněk (buňky Rosetta, skladovány při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) byl přidán  $1\text{ }\mu\text{l}$  DNA kódujícího kličku C45. Následovalo 10 min inkubace na ledu, po které se vzorek na 60 s vystavil tepelnému šoku při teplotě  $42\text{ }^\circ\text{C}$  a následně opět zchlazení na ledu po dobu 2 min.

Poté bylo k buňkám přidáno  $750\text{ }\mu\text{l}$  LB média o teplotě  $37\text{ }^\circ\text{C}$  a suspenze byla při stálém míchání na orbitální třepačce kultivována 1 h při  $37\text{ }^\circ\text{C}$  a 200 rpm. Nakonec byla suspenze buněk vyseta na agarovou matici obsahující kanamycin a buňky se nechaly při  $37\text{ }^\circ\text{C}$  na 12-15 h růst v inkubátoru.

## **Očkování**

Z misek byla pomocí očkovací kličky odebrána 1 kolonie narostlých bakterií, která byla následně převedena do 4 ml LB média obsahujícího 4 µl kanamycinu (zásobní roztok 30 mg/ml). Buňky byly takto při 37°C inkubovány 14 hodin.

Po 14ti hodinách následovalo přelití do objemu obsahujícího 100 ml LB média a kultivace při 37°C, během které byl růst průběžně sledován měřením absorbance na spektrofotometru při 600 nm v intervalech 30 min, až do dosažení absorbance v mezích 0,6-0,8.

## **Indukce**

Indukce exprese byla dosažena přidáním IPTG (Roth) na finální koncentraci 100 µM. Exprese poté probíhala po dobu 24h při 17°C.

## **Purifikace proteinu**

Po 24h následovala centrifugace na 5000 g po dobu 25 min při teplotě 4°C. Supernatant byl slit a pelet rozpuštěn v 10 ml pufru (10 mM TRIS, 10 mM NaCl, pH 8,8), obsahujícím tyto inhibitory proteáz:

### **inhibitory (na 10 ml):**

15 mg lysozym (Sigma)

26 mg PMSF (Sigma)

0,02 mg leupeptid (Sigma)

4 µl pepstatin (Sigma)

10 µl 1M DTT (Serva)

100 µl 1mM EDTA

Následovala sonikace na přístroji Ultrasonic homogenizer 3000 (Biologics Inc., USA). Sonikace probíhala 3 min s 20 s ON/OFF periodami při výkonu 20%. Suspenze byla následně centrifugována na 15000 g při teplotě 4°C po dobu 25 min. Poté se odebral vzorek peletu a sonikátu (supernatantu). Kontrolní vzorky byly odebírány po celou dobu purifikace.

Izolace kličky byla provedena pomocí afinitní chromatografie. Byly použity nové kolony, do kterých bylo nalito 6 ml Talon metal affinity resin (Clontech) tak, aby v koloně zbyly 3 ml pevné fáze. Po promytí byl supernatant nanesen na kolony a

inkubován po dobu 1 hodiny. Poté následovalo promytí pomocí 40 ml pufru (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, pH 8).

Pro vytěsnění proteinu z kolony bylo použito 2 ml 0,5 M imidazolu. Po 30 minutové inkubaci následovala eluce. To se opakovalo celkem 3x a poté proběhla dialýza. Dialýza probíhala v 1 litru dialyzačního pufru (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, pH 8) po dobu 24 hod při 4°C, přičemž po první hodině dialýzy byl vyměněn pufr za čistý.

### ***Elektroforéza***

Čistota exprimovaného proteinu byla ověřena pomocí *SDS-PAGE*. Složení roztoků pro elektroforézu bylo následující:

#### **Elektrodový pufr (run buffer)**

*na 1 litr:*

3g TRIS (Sigma)  
14,4g glycin (Bio-Rad)  
1g SDS (Serva)  
pH nebylo upravováno

#### **Vzorkovací pufr (SDS sample buffer)**

*na 1 litr:*

135 ml 1M TRIS (Sigma)  
150 ml glycerol  
22ml mercaptoetanol (Bio-Rad)  
720ml H<sub>2</sub>O  
30g SDS (Serva)

#### **separační gel: (na 10ml)**

2,5 ml 40% AA (Serva)  
2,5 ml separačního pufru  
4,95 ml H<sub>2</sub>O  
15 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Lachema)  
9,75 µl TEMED (Fluka)  
25 µl APS (100mg/ml) (Biorad)

#### **zaostřovací gel: (na 10ml)**

1ml 40% AA (Serva)  
2,5 ml zaostřovacího pufru  
6,5 ml H<sub>2</sub>O  
15mg Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Lachema)  
19,5 µl TEMED (Fluka)  
50 µl APS (100mg/ml) (Biorad)

#### **separační pufr:**

1,5 M Tris (Sigma)  
0,4% SDS (w/v) (Serva)  
pH 8,8

#### **zaostřovací pufr:**

0,5 M Tris (Sigma)  
0,4% SDS (w/v) (Serva)  
pH 6,8

Do jamek na elektroforézový gel bylo naneseno 10  $\mu$ l roztoku obsahujícího protein (získaného po dialýze) a jako marker bylo použito 5  $\mu$ l ovalbuminu (1 mg/ml) a 5  $\mu$ l BSA (1 mg/ml). Po skončení elektroforézy byl gel barven pomocí barviva *Bio-Save Coomassie Stain* (Serva) dobu 45 min a poté celou noc odbarvován.

Na závěr byla zjištěna koncentrace všech tří elucí měřením autofluorescence. [Albani, 2007]

### **3.3 Měření kinetiky dohasínání fluorescence**

Data byla získána měřením kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání fotonů (TCSPC) na spektrometru Picoquant se zdrojem pulsní laserové diody LDH-P-C-440 při excitaci 445 nm. Repetiční frekvence byla použita 10 MHz, šterbiny monochromátoru byly nastaveny na 4 nm (0,5 nm) a emisní monochromátor byl nastaven na 520 nm. Polarizátory byly natočeny pod magickým úhlem. Měření probíhalo 60 s pro vzorek a 120 s pro přístrojovou funkci při rozlišení 16 ps/kanál. Data byla zpracována v programu FluoFit 4.2.1.

Byly měřeny vzorky o stejném složení jako v pokusech na přístroji Hitachi. Střední doba života byla měřena jak pro vzorky s celým proteinem, tak pro izolovanou velkou cytoplasmatickou kličku. Přesné složení vzorků je tedy v kapitole 3.4, přehledněji pak v tabulce 3 a 4.

### **3.4 Zhášení fluorescence**

Zhášení fluorescence fluoresceinu bylo měřeno na fluorimetru značky Hitachi F4500 v módu *spectrophotometry* při excitaci 490 nm a emisi 520 nm. Šterbiny monochromátorů byly nastaveny na 5 nm pro excitaci a 5 nm pro emisi, integrační čas na 3 s.

Bylo prováděno několik druhů pokusů. Jednak s ohledem na různé konformace proteinu, a tedy na jeho různě vysokou afinitu ke  $K^+$  resp.  $Na^+$ , byla jedna série experimentů prováděna v pufru (10mM TRIS, pH 7,5) s vysokou koncentrací NaCl (140mM) a nízkou koncentrací KCl (10mM) (dále bude označován jako pufr NaCl), druhá série naopak s vysokou koncentrací KCl (140mM) a nízkou koncentrací NaCl (10mM) (dále bude označován jako pufr KCl). V každém druhu pufru bylo prováděno dalších 5 druhů experimentů.

Nejprve byl použit čistý fluorescein v roztoku pufru (blank) a pomocí titrace jodidem sodným nebo draselným byly změřeny zhášecí křivky. Koncentrace fluoresceinu ve všech vzorcích byla 1  $\mu\text{M}$ . Protein měl koncentraci 2  $\mu\text{M}$  v případě měření s celým proteinem a koncentraci 5  $\mu\text{M}$  v případě velké cytoplasmatické kličky C45.

První sada (označme „čistý protein“) byla měřena pouze za přítomnosti pufru a fluoresceinu. Obsahovala tedy 2  $\mu\text{M}$  protein, 1  $\mu\text{M}$  fluorescein a pufr. Druhá sada (označme „vysoké ATP“) byla navíc měřena za přítomnosti 3 mM ATP. Třetí skupina („nízké ATP“) obsahovala 10  $\mu\text{M}$  ATP. Čtvrtá skupina („vysoké ATP s hořčíkem“) obsahovala kromě 3mM ATP ještě 3 mM  $\text{MgCl}_2$ . Poslední, pátá skupina („nízké ATP s hořčíkem“), obsahovala 10  $\mu\text{M}$  ATP a 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ . Všechny tyto pokusy jsou pro přehlednost shrnuty v tabulce 3.

	<b>vzorek</b>	<b>koncentrace proteinu</b>	<b>koncentrace ATP</b>	<b>koncentrace <math>\text{MgCl}_2</math></b>	<b>koncentrace fluoresceinu</b>	<b>jodid</b> (zásobní roztok 0,33M)
<b>1</b>	<b>čistý protein</b>	2 $\mu\text{M}$	-	-	1 $\mu\text{M}$	titrace 10x 2 $\mu\text{l}$
<b>2</b>	<b>vysoké ATP</b>	2 $\mu\text{M}$	3 mM	-	1 $\mu\text{M}$	titrace 10x 2 $\mu\text{l}$
<b>3</b>	<b>nízké ATP</b>	2 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	-	1 $\mu\text{M}$	titrace 10x 2 $\mu\text{l}$
<b>4</b>	<b>vysoké ATP s hořčíkem</b>	2 $\mu\text{M}$	3 mM	3mM	1 $\mu\text{M}$	titrace 10x 2 $\mu\text{l}$
<b>5</b>	<b>nízké ATP s hořčíkem</b>	2 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	titrace 10x 2 $\mu\text{l}$
<b>6</b>	<b>blank</b>	-	-	-	1 $\mu\text{M}$	titrace 10x 2 $\mu\text{l}$

**Tabulka 3: Složení vzorků v jednotlivých sériích pokusů s celým proteinem**

Zhášení bylo prováděno titrací jodidem sodným v případě NaCl pufru a jodidem draselným v případě KCl pufru. Byly měřeny titrační křivky o 10 krocích po kroku 2  $\mu\text{l}$  jodidu (zásobní roztok byl 0,33 M, celkový objem v kyvetě byl 100  $\mu\text{l}$ ). Složení jednotlivých vzorků bylo shodné i pro měření střední doby života na přístroji PicoQuant.



V případě kličky C45 byla prováděna stejná série pokusů. V následující tabulce jsou pro přehlednost opět shrnuty koncentrace všech použitých látek v jednotlivých pokusech.

	vzorek	koncentrace proteinu	koncentrace ATP	koncentrace MgCl <sub>2</sub>	koncentrace fluoresceinu	jodid (zásobní roztok 0,33M)
1	čistý protein	5μM	-	-	1μM	titrace 10x 2μl
2	vysoké ATP	5μM	10mM	-	1μM	titrace 10x 2μl
3	nízké ATP	5μM	10μM	-	1μM	titrace 10x 2μl
4	vysoké ATP s hořčíkem	5μM	10mM	10mM	1μM	titrace 10x 2μl
5	nízké ATP s hořčíkem	5μM	10μM	10μM	1μM	titrace 10x 2μl

tabulka 4: Složení vzorků v jednotlivých sériích pokusů s velkou cytoplasmatickou kličkou

### 3.5 Statistické zpracování dat

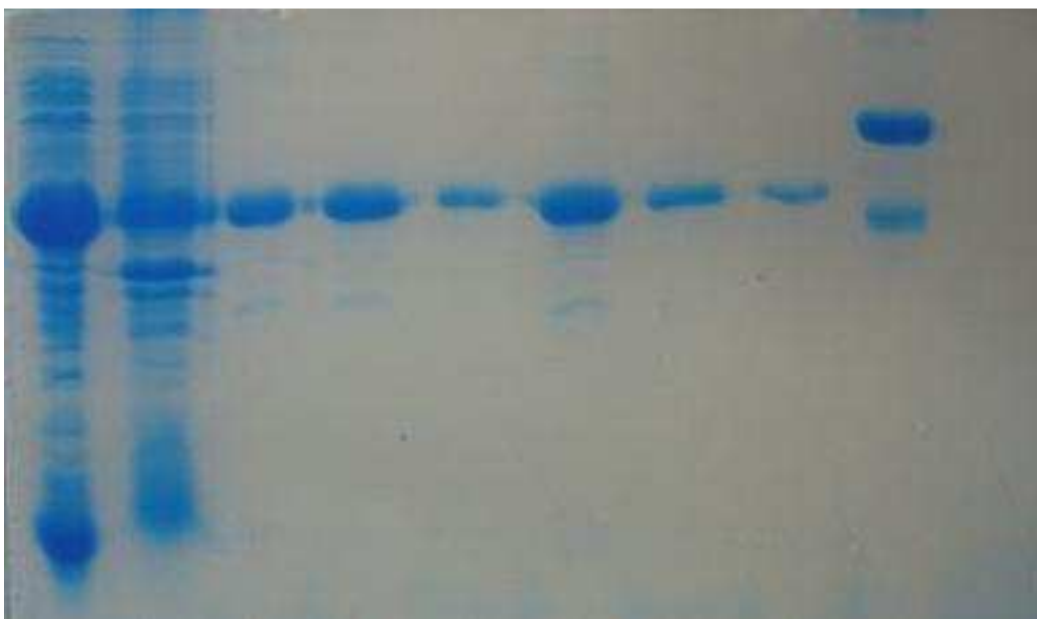
Zhášení fluorescence bylo vyhodnoceno v programech Excel a Origin. Byly provedeny korekce intenzity fluorescence na ředění způsobené postupným přidáváním zhášedla. Z každé titrační křivky byla spočítána hodnota  $K_{sv}$  a tyto hodnoty poté zprůměrovány a určena směrodatná odchylka. Hodnoty  $K_{sv}$  byly získány pomocí nelineárního fitu podle rovnice  $F = F_0 / (1 + K_{sv} [Q])$ . Pro srovnání signifikance rozdílu mezi jednotlivými sadami dat byl proveden oboustranný nepárový t-test.

Pro srovnání kinetik dohasínání fluorescence byl použit Kolmogorovův-Smirnovův test pro dva výběry s velkými rozsahy [Reisenauer, 1970].

## 4. Výsledky

### 4.1 Heterologní exprese a purifikace velké cytoplasmatické kličky

Výsledkem heterologní exprese byl protein, jehož identita a čistota byla ověřena SDS-PAGE. Výsledek elektroforézy je na obr.9:



Obr. 9: Fotografie gelu z elektroforézy

#### Vzorky byly naneseny v pořadí: (zleva)

sonikát (supernatant)

pelet

1.eluce před dialýzou

2. eluce před dialýzou

3.eluce před dialýzou

1.eluce po dialýze

2.eluce po dialýze

3.eluce po dialýze

marker

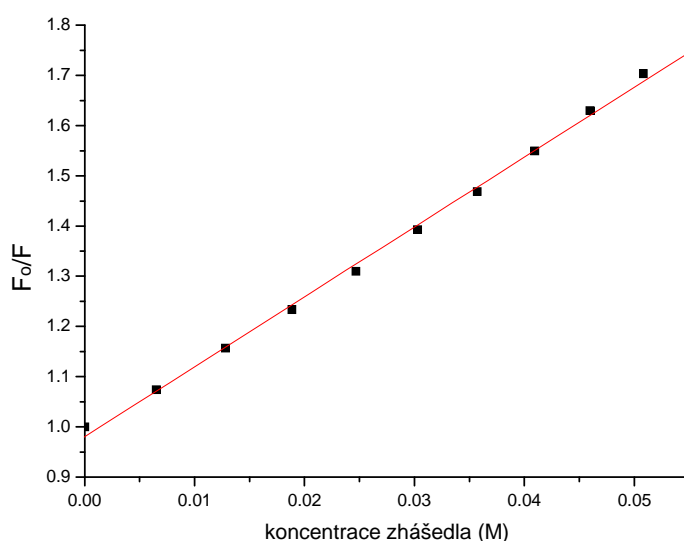
Změřením koncentrace bylo zjištěno, že ze 100 ml kultury činil celkový výtěžek čistého proteinu 6,15mg.

## 4.2 Zhášení fluorescence

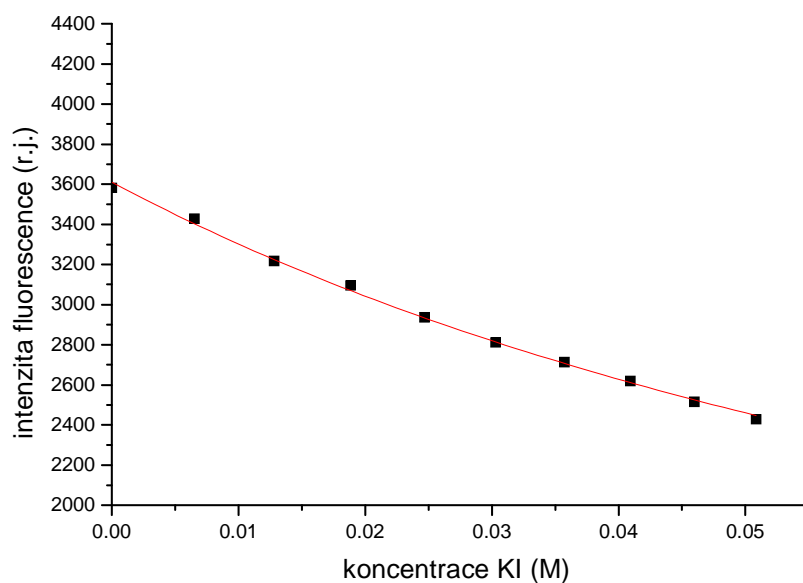
U všech vzorků bylo prováděno minimálně 5 sérií měření po 10 titračních krocích, z nichž byl nakonec spočítán průměr a ten následně vyhodnocen. V tabulce 5 jsou pro ilustraci uvedeny hodnoty fluorescence pro vzorek NaCl + ATP při zhášení NaI. Pro výslednou titrační křivku danou průměrem byl sestrojen graf. Takto se postupovalo i v dalších případech, kde je však pro jednoduchost uveden pouze výsledný graf. Spolu s ním je zde i počet měření, ze kterých byl průměr spočítán a hodnota Stern-Volmerovy zhášecí konstanty  $K_{sv}$ . Na obrázku 10 je uveden Stern-Volmerův graf. Je na něm patrná lineární závislost  $F_0/F$  na koncentraci zhášedla. Linearita této závislosti opravňuje použití modelu vedoucího na rovnici (3). Stejně tak ani tento graf již u dalších vzorků není uveden.

[NaI] (M)	1.titrace	2.titrace	3.titrace	4.titrace	5.titrace	průměr
0.000	3516	3777	3895	3577	3485	<b>3691,25</b>
0.007	3377	3521	3618	3290	3198	<b>3451,50</b>
0.013	3149	3257	3368	3111	2946	<b>3221,25</b>
0.019	2944	3066	3162	2903	2796	<b>3018,75</b>
0.021	2767	2871	2961	2774	2624	<b>2843,25</b>
0.030	2615	2766	2765	2594	2440	<b>2685,00</b>
0.036	2469	2563	2653	2438	2343	<b>2530,75</b>
0.041	2352	2434	2492	2336	2233	<b>2403,50</b>
0.046	2229	2299	2365	2241	2139	<b>2283,50</b>
0.051	2144	2200	2297	2132	2037	<b>2193,25</b>
hodnota $K_{sv}$	<b>8,10479</b>	<b>8,96473</b>	<b>8,94791</b>	<b>8,209</b>	<b>8,80851</b>	<b>8,61±0,37</b>

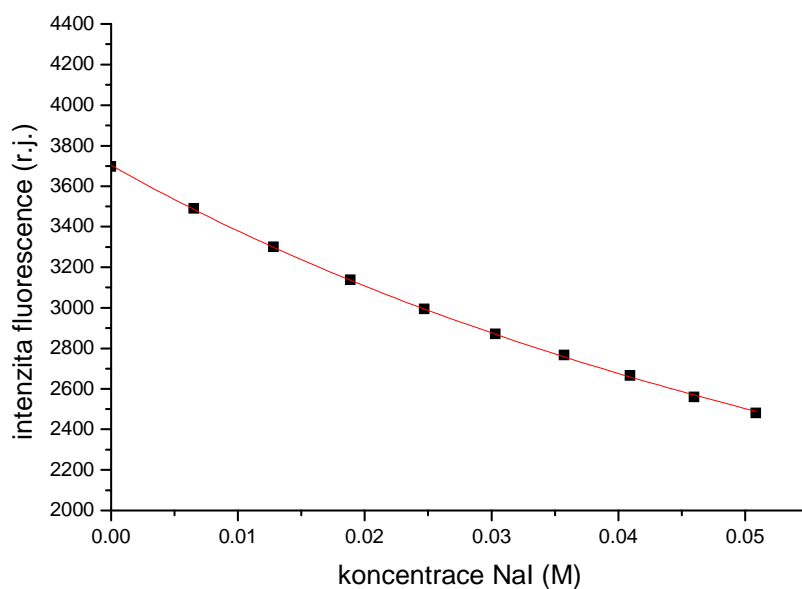
**Tabulka 5: Hodnoty relativní intenzity fluorescence pro vzorek celého proteinu v NaCl pufru s koncentrací 3mM ATP**



**Obr. 10: Stern-Volmerův graf pro vzorek celého proteinu v NaCl pufru s koncentrací 3mM ATP**

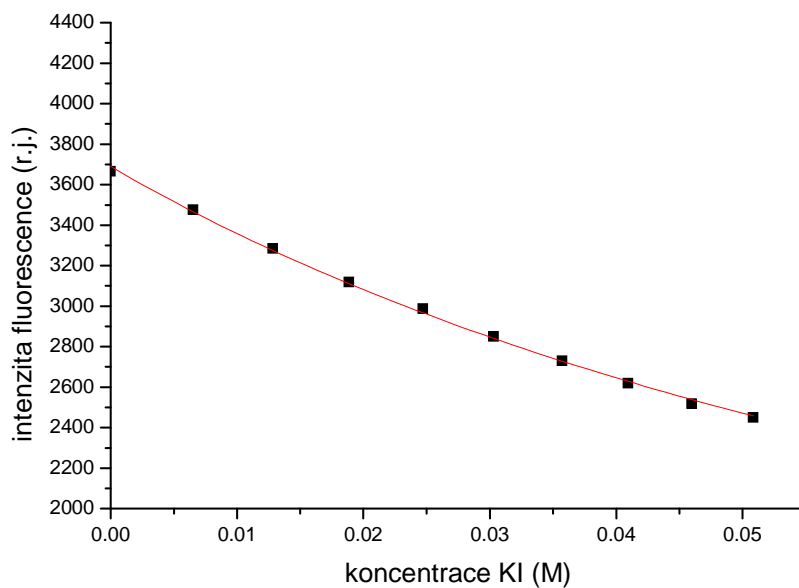


**Obr.11: Zhášení fluorescence fluoresceinu v KCl pufru bez přítomnosti proteinu – blank.**  
 (Průměr z 6 měření, Ksv = 10,29)

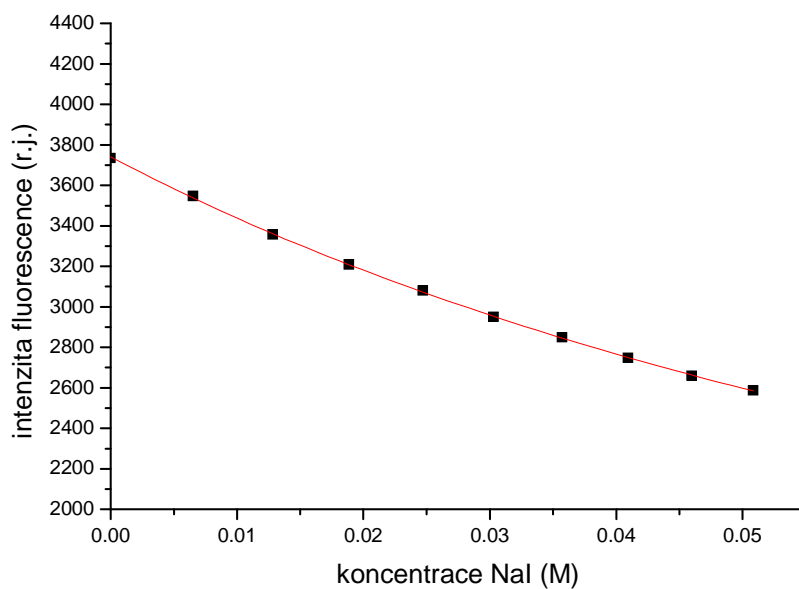


**Obr.12: Zhášení fluorescence fluoresceinu v NaCl pufru bez přítomnosti proteinu – blank.**  
 (Průměr z 5 měření, Ksv = 9,09)

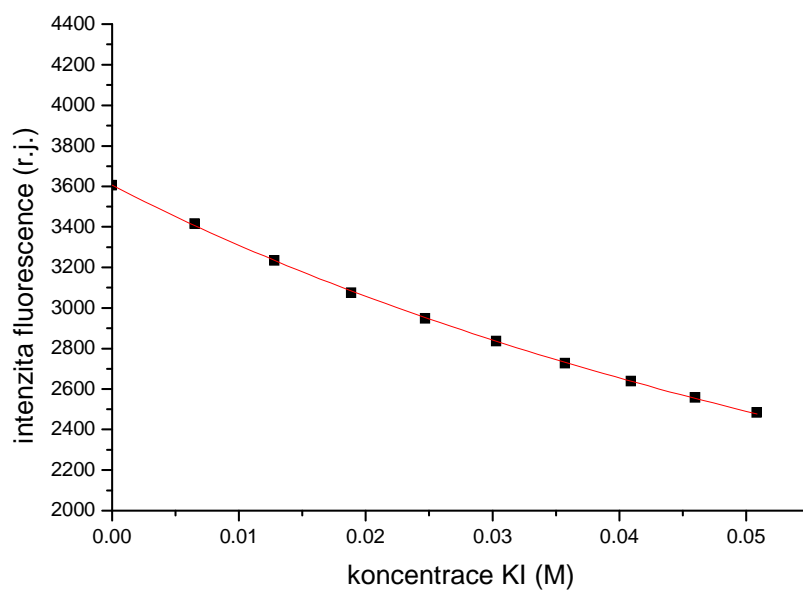
Měření zhášení fluorescence v přítomnosti celého proteinu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy o koncentraci  $2\mu\text{M}$ :



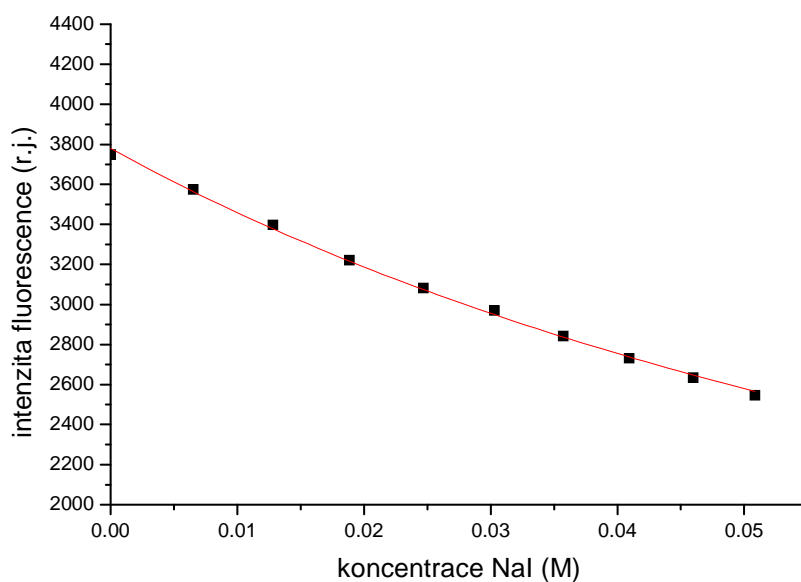
**Obr. 13: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti KCl pufru.**  
(Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 9,86$ )



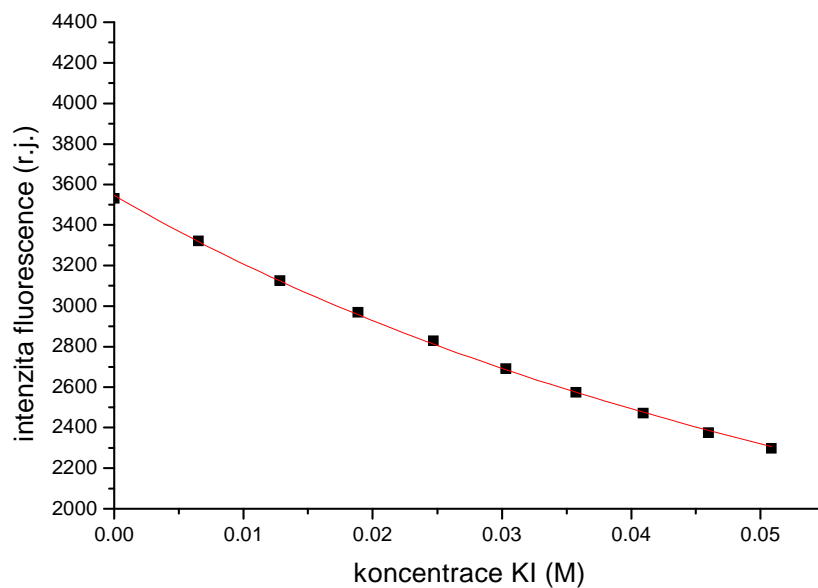
**Obr.14: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti NaCl pufru.**  
(Průměr z 6 měření,  $K_{sv} = 8,8$ )



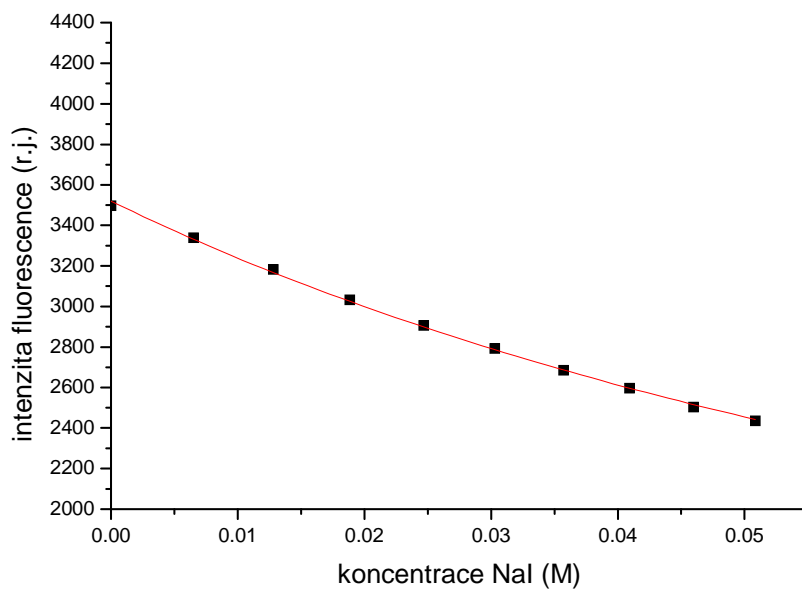
**Obr. 15: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 3 mM ATP v KCl pufru.**  
 (Průměr ze 7 měření,  $K_{sv} = 8,97$ )



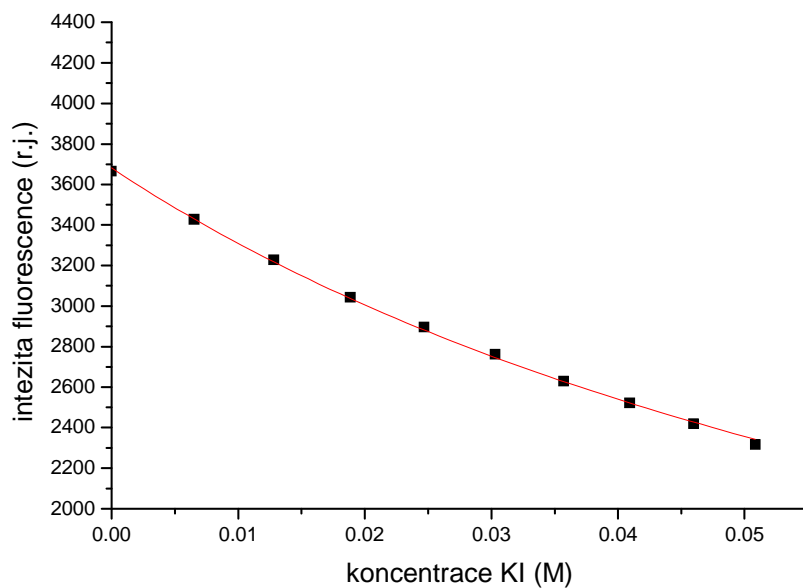
**Obr. 16: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 3 mM ATP v NaCl pufru.**  
 (Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 8,61$ )



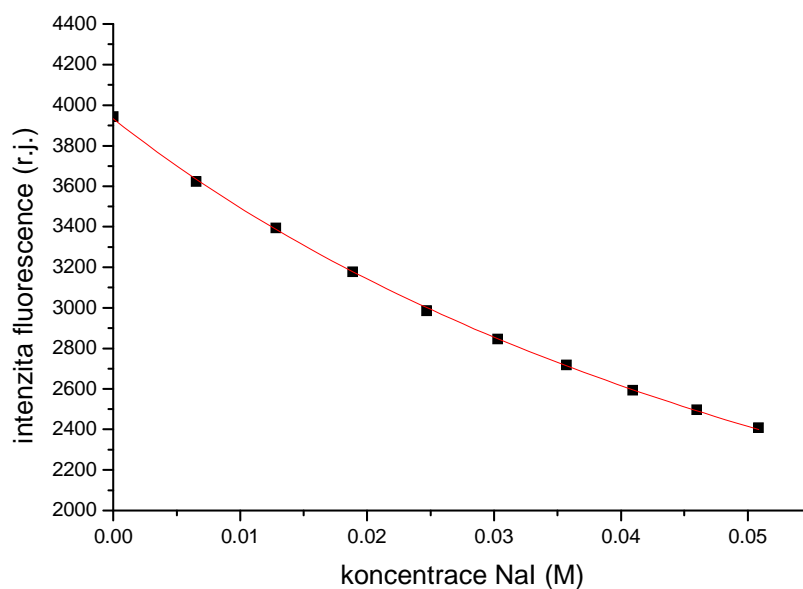
**Obr. 17: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 3 mM ATP a 3 mM MgCl<sub>2</sub> v KCl pufru. (Průměr ze 7 měření, K<sub>sv</sub> = 10,57)**



**Obr. 18: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 3 mM ATP a 3 mM MgCl<sub>2</sub> v NaCl pufru. (Průměr z 8 měření, K<sub>sv</sub> = 8,69)**

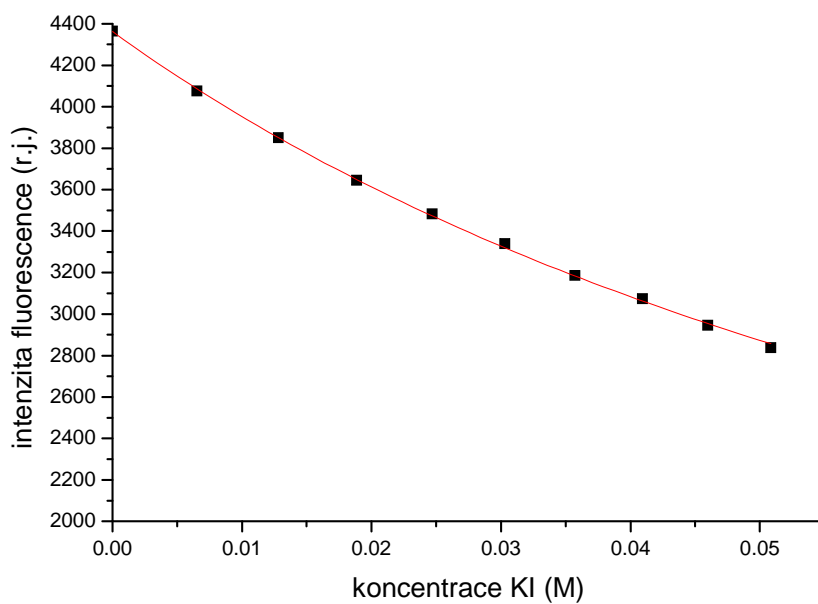


**Obr. 19: Zhášení fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu$ M ATP v KCl pufru.**  
 (Průměr ze 7 měření,  $K_{sv} = 11,23$ )

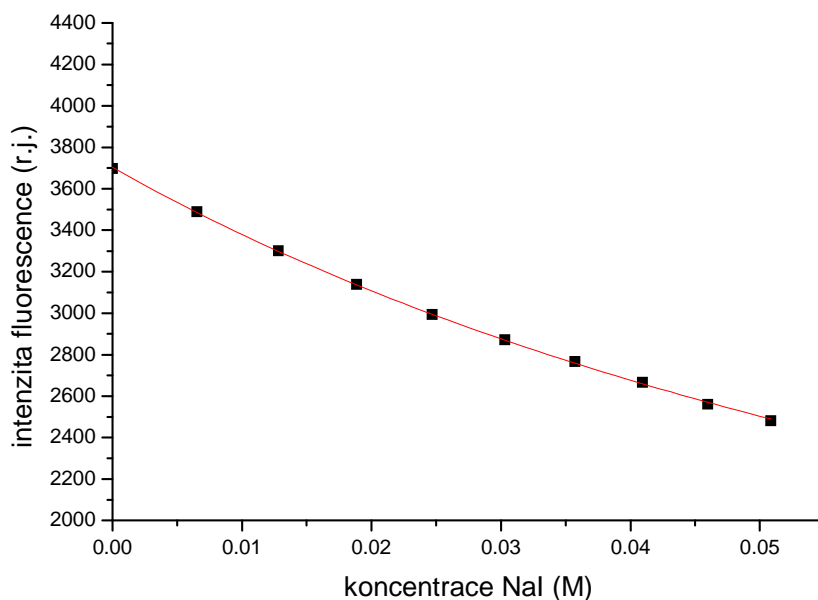


**Obr. 20: Zhášení fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu$ M ATP v NaCl pufru.**  
 (Průměr ze 7 měření,  $K_{sv} = 9,3$ )





**Obr. 21: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu\text{M}$  ATP a 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  v KCl pufru.  
(Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 10,33$ )**



**Obr. 22: Zhášení fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu\text{M}$  ATP a 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  v NaCl pufru.  
(Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 9,6$ )**

<b>vzorek (pro celý protein v KCl pufru)</b>	<b>Stern-Volmerova zhášecí konstanta ± směrodatná odchylka</b>	<b>počet měření</b>
blank KCl (bez proteinu)	10,29 ± 0,92	6
KCl	9,86 ± 0,56	5
KCl + 3 mM ATP	8,97 ± 0,61	7
KCl +3 mM ATP + 3 mM MgCl <sub>2</sub>	10,57 ± 0,49	7
KCl +10 μM ATP	11,23 ± 0,36	7
KCl +10 μM ATP+10 μM MgCl <sub>2</sub>	10,33 ± 0,42	5

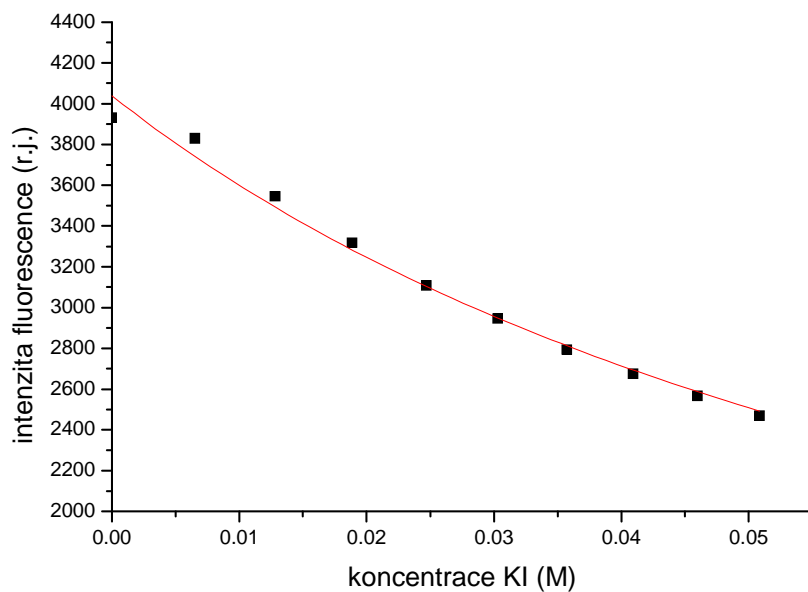
**Tabulka 6: Výsledky měření  $K_{sv}$  pro celý protein v KCl pufru**

<b>vzorek (pro celý protein v NaCl pufru)</b>	<b>Stern-Volmerova zhášecí konstanta ± směrodatná odchylka</b>	<b>počet měření</b>
blank NaCl (bez proteinu)	9,09 ± 0,87	5
NaCl	8,80 ± 0,36	6
NaCl + 3 mM ATP	8,61 ± 0,37	5
NaCl + 3 mM ATP + 3 mM MgCl <sub>2</sub>	8,69 ± 0,47	8
NaCl + 10 μM ATP	9,30 ± 0,41	7
NaCl +10 μM ATP +10 μM MgCl <sub>2</sub>	9,60 ± 0,88	5

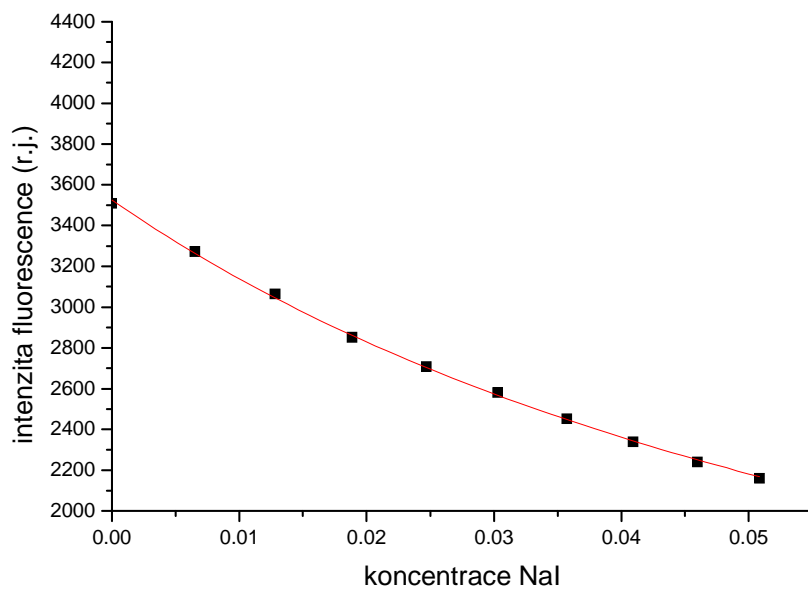
**Tabulka 7: Výsledky měření  $K_{sv}$  pro celý protein v NaCl pufru**

Výsledky měření na velké cytoplasmatické kličce jsou v následujících grafech, na konci je opět pro přehlednost uvedena tabulka se všemi výsledky. Při vyhodnocování bylo však zjištěno, že výsledky závisí na použitém zásobním roztoku zhášedla. Tabulka proto obsahuje i sloupec udávající číslo tohoto zásobního roztoku. (V případě měření na celém proteinu byl roztok namíchán pouze jednou, proto se zde toto číslo neuvádí.) Podrobněji je o všem pojednáno v kapitole „diskuze“.

Blank pro čistý fluorescein v pufru byl měřen znovu, ale pouze 3x, jelikož by hodnoty  $K_{sv}$  měly být shodné s měřením blanku v prvním případě.

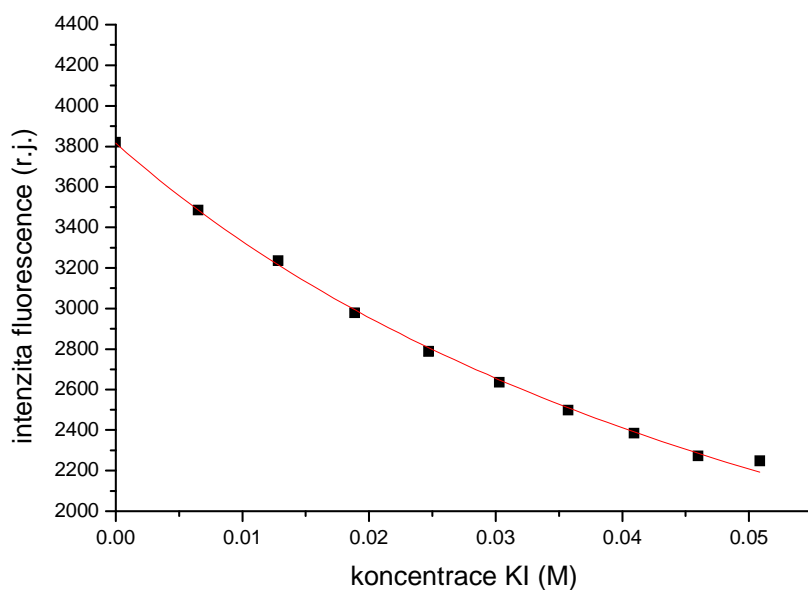


**Obr. 23: Zhášení fluorescence fluoresceinu v KCl pufru bez proteinu – blank.**  
 (Průměr ze 3 měření,  $K_{sv} = 12,89$ )



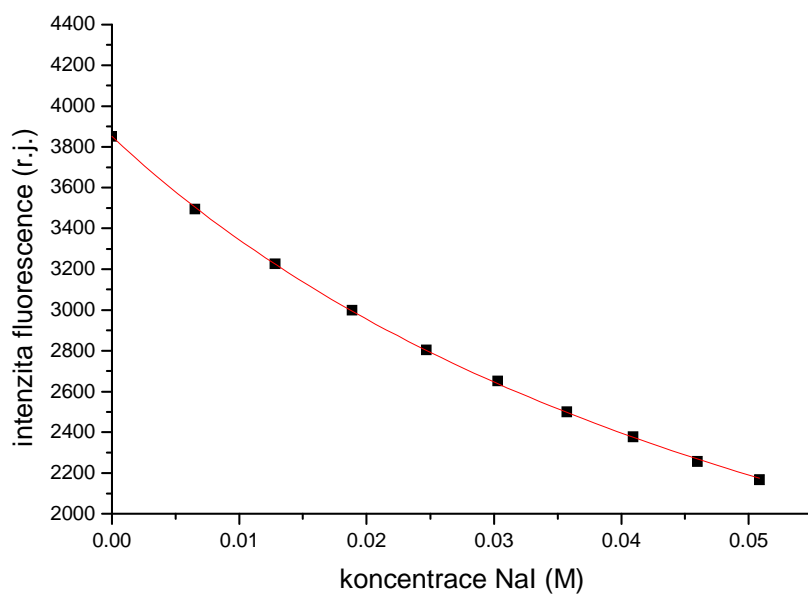
**Obr. 24: Zhášení fluorescence fluoresceinu v NaCl pufru bez proteinu – blank.**  
 (Průměr ze 3 měření,  $K_{sv} = 12,31$ )

Měření zhášení fluorescence v přítomnosti kličky C45 o koncentraci 5 $\mu$ M:



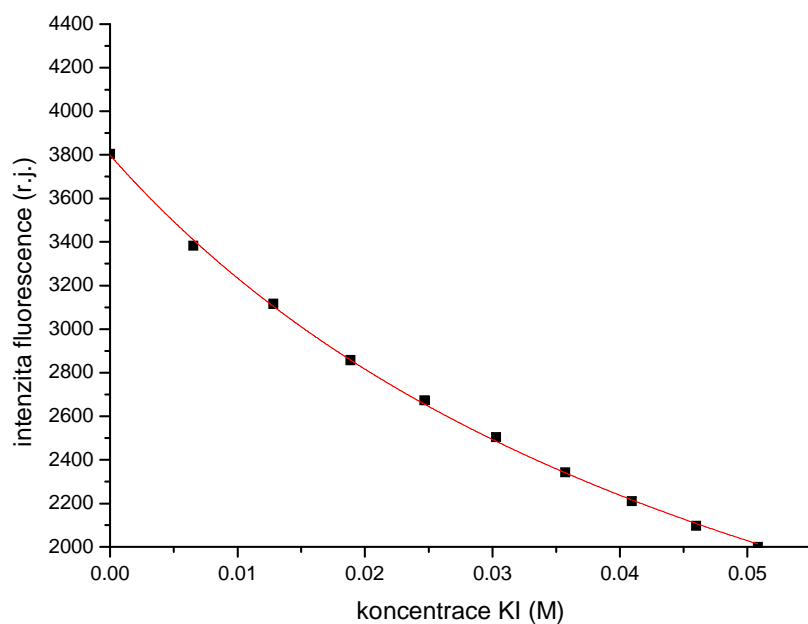
**Obr. 25: Zhášení fluorescence fluoresceinu v KCl pufru.**

(Průměr z 5 měření, Ksv = 14,94)

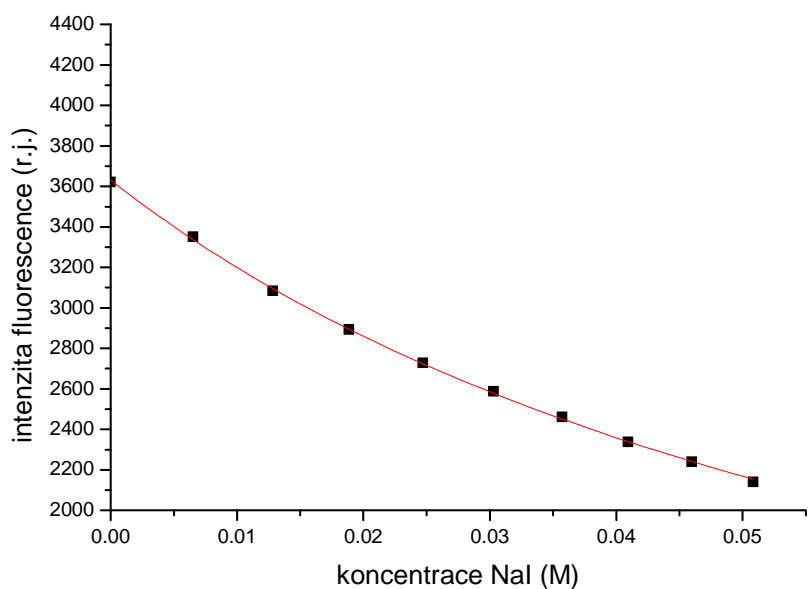


**Obr. 26: Zhášení fluorescence fluoresceinu v NaCl pufru.**

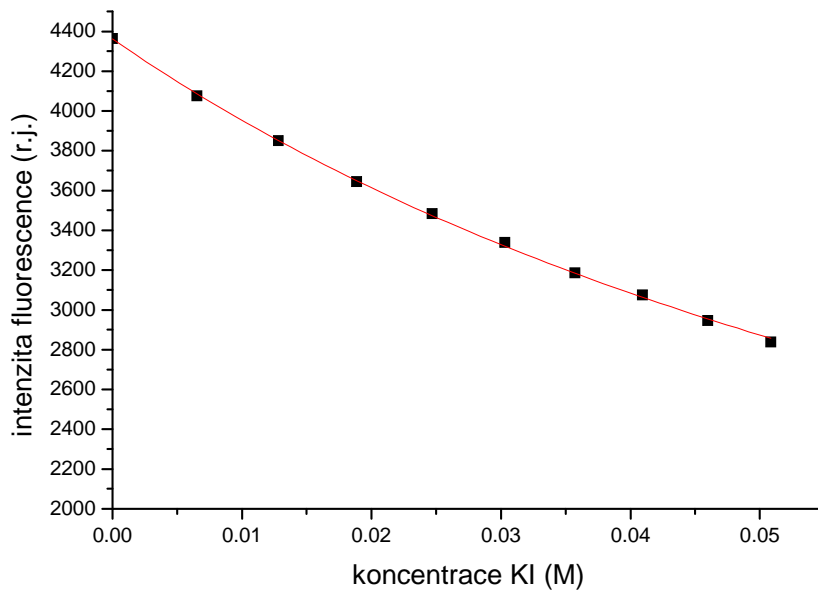
(Průměr z 6 měření, Ksv = 15,33)



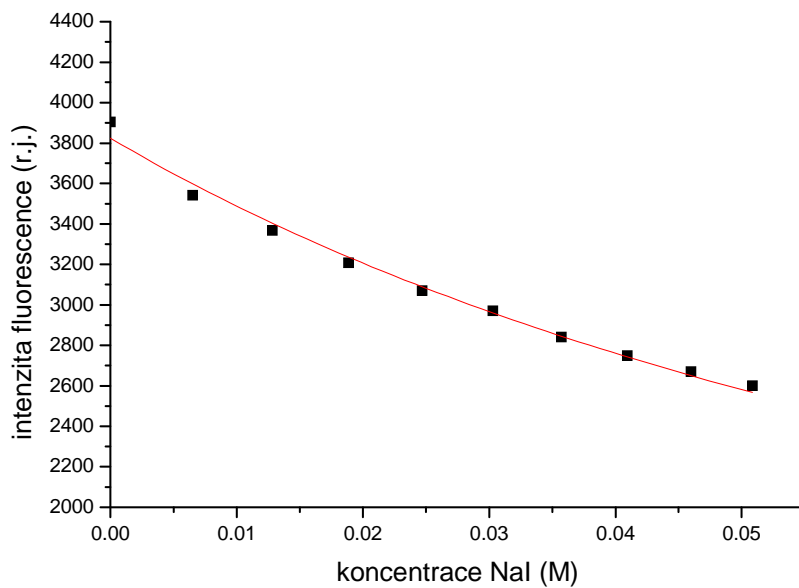
**Obr. 27: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10 mM ATP v KCl pufru.**  
 (Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 17,52$ )



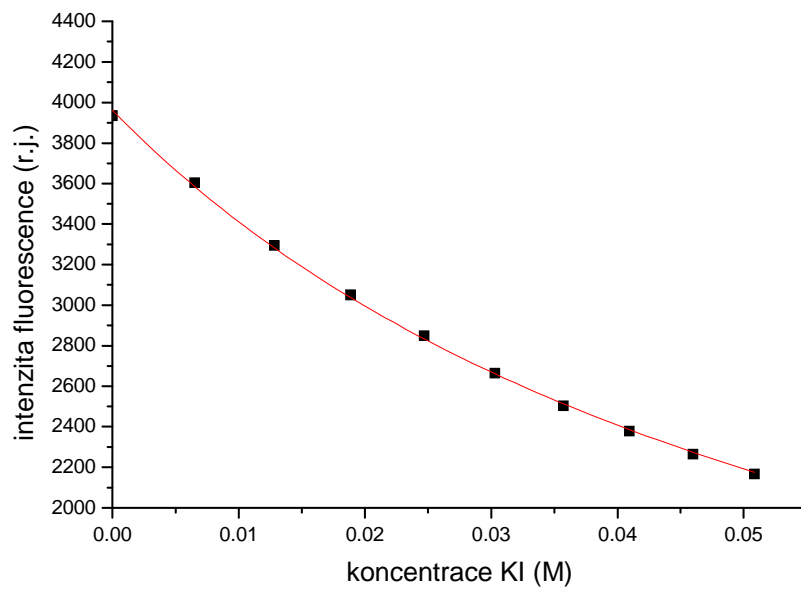
**Obr. 28: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10 mM ATP v NaCl pufru.**  
 (Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 13,52$ )



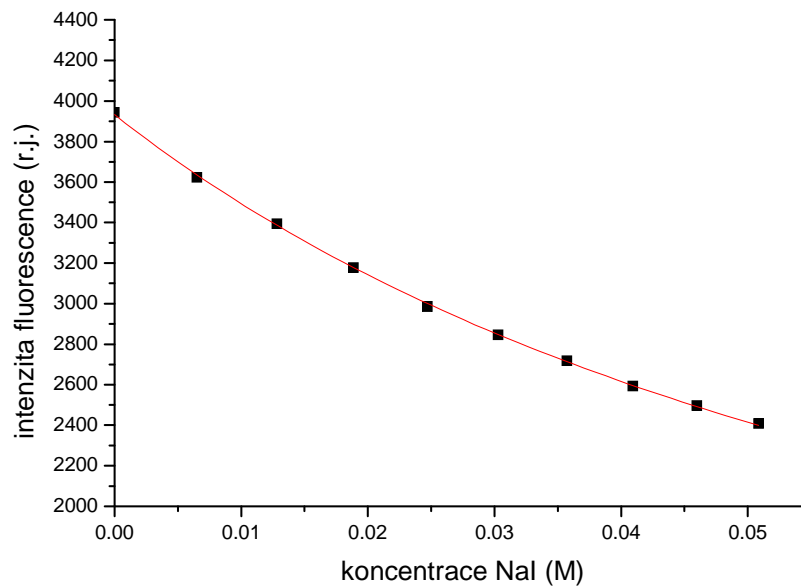
**Obr. 29:** Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10 mM ATP a 10 mM MgCl<sub>2</sub> v KCl pufru. (Průměr z 5 měření, K<sub>sv</sub> = 13,61)



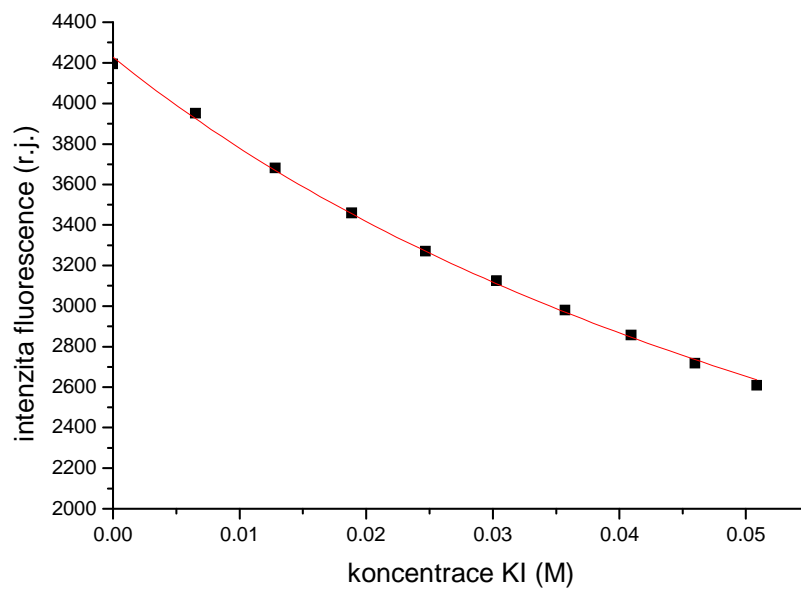
**Obr. 30:** Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10 mM ATP a 10 mM MgCl<sub>2</sub> v NaCl pufru. (Průměr z 5 měření, K<sub>sv</sub> = 10,43)



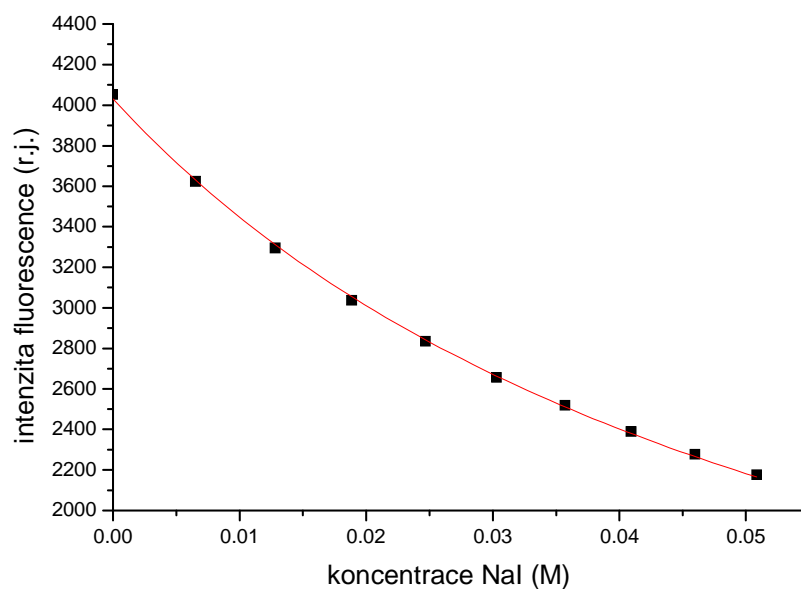
**Obr. 31: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu$ M ATP v KCl pufru.  
(Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 16,14$ )**



**Obr. 32: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu$ M ATP v NaCl pufru.  
(Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 12,65$ )**



**Obr. 33: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu$ M ATP a 10  $\mu$ M  $MgCl_2$  v KCl pufru. (Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 11,89$ )**



**Obr. 34: Zhášení fluorescence fluoresceinu v přítomnosti 10  $\mu$ M ATP a 10  $\mu$ M  $MgCl_2$  v NaCl pufru. (Průměr z 5 měření,  $K_{sv} = 16,98$ )**



<b>vzorek (klička C45) v KCl pufru</b>	<b>Stern-Volmerova zhášecí konstanta ± směrodatná odchylka</b>	<b>počet měření</b>	<b>číslo roztoku zhášedla</b>
blank KCl (bez proteinu)	12,89 ± 1,32	3	1
KCl	14.94 ± 2.96	5	1
KCl + 10 mM ATP	17.52 ± 1.51	5	2
KCl +10 mM ATP + 10 mM MgCl <sub>2</sub>	13.61 ± 1.93	5	1
KCl +10 μM ATP	16.14 ± 0.50	5	2
KCl +10 μM ATP+10 μM MgCl <sub>2</sub>	11.89 ± 1.30	5	3

**Tabulka 8: Výsledky měření  $K_{sv}$  na velké cytoplasmatické kličce C45 v KCl pufru**

<b>vzorek (klička C45) v NaCl pufru</b>	<b>Stern-Volmerova zhášecí konstanta ± směrodatná odchylka</b>	<b>počet měření</b>	<b>číslo roztoku zhášedla</b>
blank NaCl (bez proteinu)	12,31 ± 0,12	3	2
NaCl	15.33 ± 0.83	6	2
NaCl + 10 mM ATP	13.52 ± 1.32	5	2
NaCl + 10 mM ATP + 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10.43 ± 0.53	5	1
NaCl + 10 μM ATP	12.65 ± 1.63	5	2
NaCl +10 μM ATP +10 μM MgCl <sub>2</sub>	16.98 ± 1.36	5	3

**Tabulka 9: Výsledky měření  $K_{sv}$  na velké cytoplasmatické kličce C45 v NaCl pufru**

V následujících tabulkách 10-14 jsou znázorněny signifikance rozdílů, spočítané pomocí t-testu (oboustranný test pro dva výběry s různým rozptylem), pro jednotlivé vzorky s celým proteinem a kličkou C45 v KCl i NaCl pufru na hladině významnosti  $p < 0,05$  (označeno symbolem \*) a  $p < 0,01$  (označeno symbolem \*\*). Políčka označena symbolem --- mají hodnotu  $p > 0,05$  a políčka NA označují dvojice vzorků, které nebyly t-testem analyzovány.

<b>vzorek</b>	blank KCl				
KCl bez ATP	---	KCl bez ATP			
KCl + ATP	*	*	KCl + ATP		
KCl + ATP + Mg	---	---	**	KCl + ATP + Mg	
nízká koncentrace ATP +KCl	---	**	**	*	nízká koncentrace ATP +KCl
nízká koncentrace ATP + Mg + KCl	---	---	*	---	*

**Tabulka 10: Signifikance rozdílu pro vzorky s celým proteinem v KCl pufru**

<b>vzorek</b>	blank NaCl				
NaCl bez ATP	---	NaCl bez ATP			
NaCl + ATP	---	---	NaCl + ATP		
NaCl + ATP + Mg	---	**	**	NaCl +ATP + Mg	
nízká koncentrace ATP +NaCl	---	*	*	*	nízká koncentrace ATP +NaCl
nízká koncentrace ATP + Mg + NaCl	---	---	---	---	---

**Tabulka 11: Signifikance rozdílu pro vzorky s celým proteinem v NaCl pufru**

<b>vzorek</b>	blank KCl				
KCl bez ATP	---	KCl bez ATP			
KCl + ATP	NA	NA	KCl + ATP		
KCl + ATP + Mg	---	---	NA	KCl + ATP + Mg	
nízká koncentrace ATP +KCl	NA	NA	---	NA	nízká koncentrace ATP +KCl
nízká koncentrace ATP + Mg + KCl	NA	NA	NA	NA	NA

**Tabulka 12: Signifikance rozdílu pro vzorky s kličkou C45 v KCl pufru**

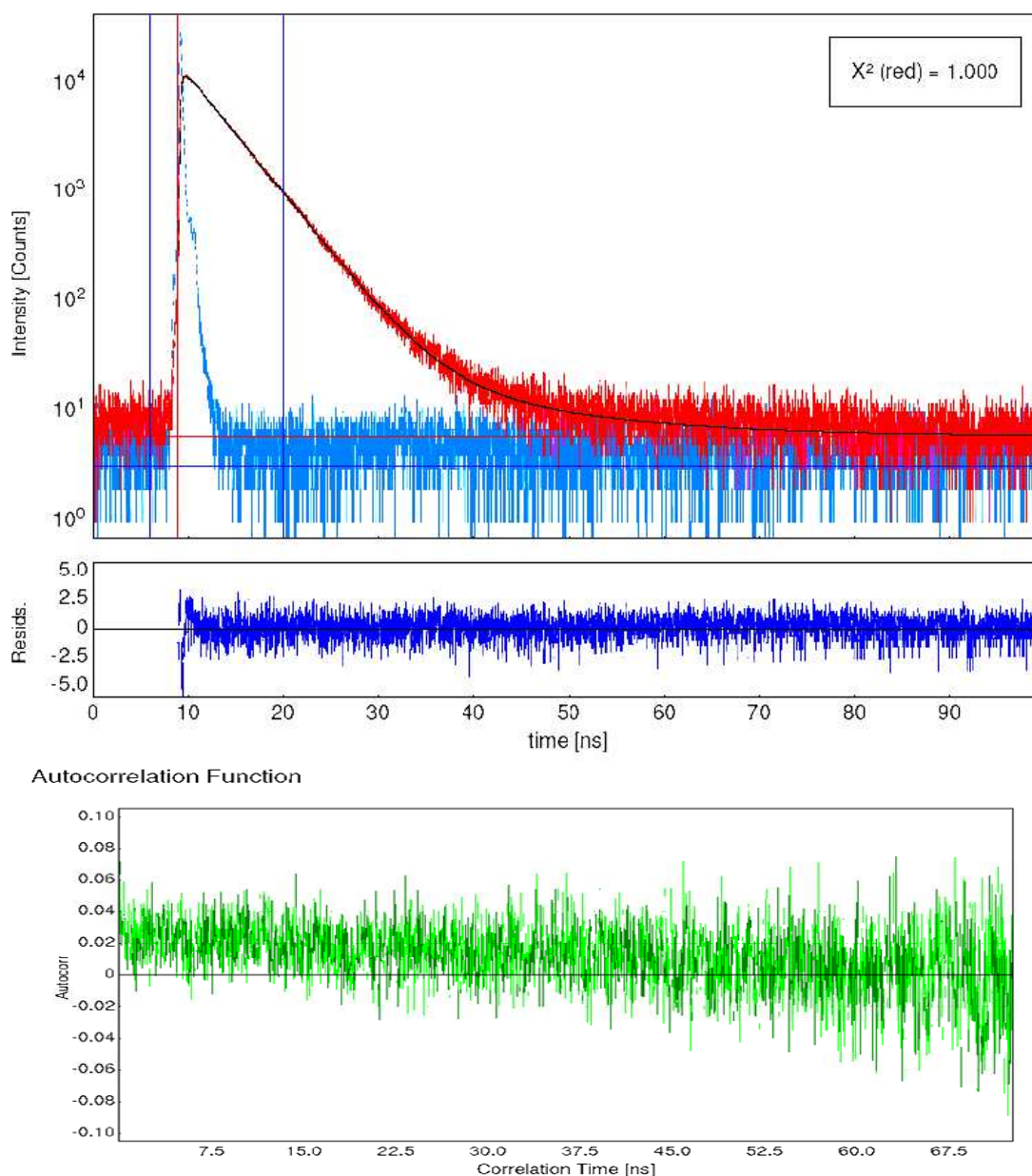
<b>vzorek</b>	blank NaCl				
NaCl bez ATP	---	NaCl bez ATP			
NaCl + ATP	*	*	NaCl + ATP		
NaCl + ATP + Mg	NA	NA	NA	NaCl +ATP + Mg	
nízká koncentrace ATP +NaCl	---	*	---	NA	nízká koncentrace ATP +NaCl
nízká koncentrace ATP + Mg + NaCl	NA	NA	NA	NA	NA

**Tabulka 13: Signifikance rozdílu pro vzorky s kličkou C45 v NaCl pufru**

### 4.3 Měření kinetiky dohasínání fluorescence

Pro všechny vzorky (v nepřítomnosti zhášedla) byla změřena kinetika dohasínání fluorescence po excitaci krátkým pulzem. Pro všechny vzorky jsme byli schopni nalézt fit podle rovnice (1) (obvykle 3-exponenciální) s  $\chi_R^2$  blízke 1,00 a náhodnou distribucí reziduálů i autokorelační funkce.

Pro ilustraci je zde uveden záznam z měření dohasínání fluorescence vzorku obsahujícího kličku C45 v NaCl pufru s koncentrací 10  $\mu\text{M}$  ATP.



Obr. 35: Záznam z měření kinetiky dohasínání fluorescence pořízený programem FluoFit 4.2.1. Červeně je znázorněno dohasínání fluorescence vzorku, světle modrý graf je funkce přístrojové odezvy a v následujících dvou grafech jsou tmavě modře vážené odchylky experimentálních dat od fitu (residuals) a zeleně autokorelační funkce.

Na základě tohoto fitu byla pak spočítána střední doba života excitovaného stavu  $\tau_{AV}$  podle rovnice (2). Ostatní výsledky jsou pro jednoduchost sepsány pouze v následujících dvou tabulkách, které udávají už jen přímo hodnotu  $\tau_{av}$  (pravý sloupec). V první tabulce jsou měření pro celý protein, v druhé pak pro velkou cytoplasmatickou kličku. Roztok fluoresceinu v pufru bez proteinu (blank) byl měřen pouze jednou a hodnoty  $\tau_{av}$  jsou proto uvedeny pouze v první tabulce.

	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$\tau_3$ (ns)	$\tau_{av}$ (ns)
<b>KCl blank</b>	21706	-6106	67,98	3,91	0,15	16,83	4,13
<b>KCl bez ATP</b>	21608	-321,8	258,6	4,01	13,87	10,91	4,14
<b>KCl + 10 mM ATP</b>	23537	-6640	87,6	3,92	0,14	15,43	4,12
<b>KCl +10 mM ATP + 10 mM MgCl<sub>2</sub></b>	22760	-6066	78,7	3,91	0,15	14,89	4,12
<b>KCl + 10 <math>\mu</math>M ATP</b>	24601	-6659	81,1	3,92	0,16	15,97	4,13
<b>KCl + 10 <math>\mu</math>M ATP+ 10 <math>\mu</math>M MgCl<sub>2</sub></b>	24905	-7100	323,3	3,86	0,16	9,32	4,07
<b>NaCl blank</b>	26879	-361,9	423,3	3,95	23,25	23,96	4,10
<b>NaCl bez ATP</b>	24592	-6852	87,9	3,90	0,16	14,98	4,10
<b>NaCl + 10 mM ATP</b>	25704	-6430	87,7	3,90	0,16	16,21	4,13
<b>NaCl + 10 mM ATP + 10 mM MgCl<sub>2</sub></b>	22606	60,05	962	3,98	4,02	18,56	4,15
<b>NaCl+ 10 <math>\mu</math>M ATP</b>	25776	-7530	72,77	3,92	0,15	17,57	4,14
<b>NaCl + 10 <math>\mu</math>M ATP+ 10 <math>\mu</math>M MgCl<sub>2</sub></b>	23829	-6462	81,8	3,90	0,15	15,8	4,11

**Tab.14: Parametry kinetiky dohasínání fluorescence fluoresceinu pro vzorky s celým proteinem**

	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\tau_1(\text{ns})$	$\tau_2(\text{ns})$	$\tau_3(\text{ns})$	$\tau_{\text{av}}(\text{ns})$
<b>KCl bez ATP</b>	23946	-37886	42,13	3,95	0,10	19,41	4,24
<b>KCl + 10 mM ATP</b>	16499	-27603	30,54	3,98	0,08	21,16	4,29
<b>KCl +10 mM ATP + 10 mM MgCl<sub>2</sub></b>	16743	-30068	52,70	3,98	0,07	15,38	4,24
<b>KCl + 10 <math>\mu</math>M ATP</b>	17643	-30390	26,87	3,96	0,08	24,40	4,29
<b>KCl + 10 <math>\mu</math>M ATP+ 10 <math>\mu</math>M MgCl<sub>2</sub></b>	14954	-26301	39,30	3,97	0,07	17,09	4,25
<b>NaCl bez ATP</b>	12909	-20523	26,58	3,94	0,09	18,68	4,23
<b>NaCl + 10 mM ATP</b>	14167	-26850	57,80	3,93	0,06	13,98	4,20
<b>NaCl + 10 mM ATP + 10 mM MgCl<sub>2</sub></b>	14796	-25929	34,64	3,97	0,07	18,34	4,26
<b>NaCl+ 10 <math>\mu</math>M ATP</b>	17248	-2140	55,00	3,83	2,68	15,27	4,09
<b>NaCl + 10 <math>\mu</math>M ATP+ 10 <math>\mu</math>M MgCl<sub>2</sub></b>	12474	-1655	111	3,72	2,18	10,75	4,03

**Tab.15: Parametry kinetiky dohasínání fluorescence fluoresceinu pro vzorky s kličkou C45**

Na soubor dat získaných měřením středních dob života byl následně aplikován Kolmogorovův – Smirnovův test pro dva nezávislé výběry s velkými rozsahy [Reisenauer 1970]. Byly porovnávány dvojice vzorků a hodnotila se shoda rozdělení četností na hladině významnosti  $p < 0,05$  (\*) a  $p < 0,01$  (\*\*). V následujících dvou tabulkách 16 a 17 jsou uvedeny výsledky pro celý protein v obou pufrch. Pro kličku C45 vyšla pravděpodobnost shody ve všech případech v NaCl i KCl pufru  $p < 0,01$ , čili žádné dva soubory dat nebyly shodné. Tabulka výsledků se proto zde již dále neuvádí.

<b>vzorek</b>	blank KCl				
KCl bez ATP	---	KCl bez ATP			
KCl + ATP	**	---	KCl + ATP		
KCl + ATP + Mg	**	**	**	KCl + ATP + Mg	
nízká koncentrace ATP +KCl	**	**	**	---	nízká koncentrace ATP +KCl
nízká koncentrace ATP + Mg + KCl	**	**	*	**	**

**Tabulka 16: Kolmogorovův-Smirnovův test pro vzorky s celým proteinem v KCl pufru**

<b>vzorek</b>	blank NaCl				
NaCl bez ATP	**	NaCl bez ATP			
NaCl + ATP	**	---	NaCl + ATP		
NaCl + ATP + Mg	**	---	---	NaCl +ATP + Mg	
nízká koncentrace ATP +NaCl	**	*	**	**	nízká koncentrace ATP +NaCl
nízká koncentrace ATP + Mg + NaCl	**	*(1)	---	---	**

**Tabulka 17: Kolmogorovův-Smirnovův test pro vzorky s celým proteinem v NaCl pufru**

(1) odchylka způsobena jedním bodem

V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty bimolekulární zhasací konstanty  $k_q$  pro celý protein a pro kličku C45, spočítané jako  $k_q = K_{sv} / \tau_{av}$

<b>vzorek</b>	<b>klička C45</b>	<b>celý protein</b>
blank KCl	3,22± 0,32	2,57± 0,22
KCl	3,52± 0,71	2,47± 0,14
KCl + ATP	4,08± 0,37	2,24± 0,15
KCl +ATP + Mg	3,21± 0,47	2,63± 0,15
nízké ATP +KCl	3,76± 0,12	2,72± 0,09
nízké ATP + KCl + Mg	2,80± 0,32	2,58± 0,10

**Tabulka18: Hodnoty bimolekulární zhasací konstanty v KCl pufru**

<b>vzorek</b>	<b>klička C45</b>	<b>celý protein</b>
blank NaCl	3,09± 0,03	2,28± 0,21
NaCl	3,62± 0,20	2,21± 0,09
NaCl + ATP	3,22± 0,32	2,14± 0,09
NaCl + ATP + Mg	2,45± 0,13	2,18± 0,11
nízké ATP + NaCl	3,09± 0,39	2,33± 0,10
nízké ATP+ NaCl + Mg	4,21± 0,33	2,32± 0,21

**Tabulka19: Hodnoty bimolekulární zhasací konstanty v NaCl pufru**

Hodnoty  $K_q$  v těchto dvou tabulkách jsou spočítány jako výsledná hodnota  $K_{sv}/\tau_{av}$ . Tyto bimolekulární zhasací konstanty byly však spočítány také pro každou jednotlivou hodnotu  $K_{sv}$  a poté byl mezi jednotlivými vzorky opět proveden t-test. V následujících dvou tabulkách jsou proto opět znázorněny signifikance rozdílů, spočítané pomocí t-testu (oboustranný test pro dva nepárované výběry s různým rozptylem), pro jednotlivé vzorky s celým proteinem v KCl i NaCl pufru na hladině významnosti  $p < 0,05$  (\*) a  $p < 0,01$  (\*\*). Políčka označená symbolem --- mají hodnotu  $p > 0,05$ .



<b>vzorek</b>	blank KCl				
KCl (bez ATP)	---	KCl (bez ATP)			
KCl + ATP	*	*	KCl + ATP		
KCl + ATP + Mg	---	---	**	KCl + ATP + Mg	
nížká koncentrace ATP +KCl	---	**	**	*	nížká koncentrace ATP +KCl
nížká koncentrace ATP + Mg + KCl	---	---	**	---	*

**Tabulka 20: Test signifikance hodnot  $K_q$  pro vzorky s celým proteinem v KCl pufru**

<b>vzorek</b>	blank NaCl				
NaCl bez ATP	---	NaCl bez ATP			
NaCl + ATP	---	---	NaCl + ATP		
NaCl + ATP + Mg	---	---	---	NaCl +ATP + Mg	
nížká koncentrace ATP +NaCl	---	---	*	*	nížká koncentrace ATP +NaCl
nížká koncentrace ATP + Mg + NaCl	---	---	---	*	---

**Tabulka 21: Test signifikance hodnot  $K_q$  pro vzorky s celým proteinem v NaCl pufru**

## 5. Diskuze

Jak již bylo uvedeno v teoretické části,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza je enzym, který hraje důležitou úlohu v metabolismu všech živočišných buněk a v této práci byla zkoumána možnost ovlivnění jeho funkce fluoresceinem. Ten je běžně používán v klinické praxi, nicméně jeho užívání může být spojeno s nežádoucími účinky (viz. kap. 2.3). Albers-Postův model, který je standardně používán k popisu fungování  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy postuluje, že enzym během katalytického cyklu zaujímá dvě konformace, tradičně označované jako  $E_1$  a  $E_2$ . V konformaci  $E_1$  má enzym vysokou afinitu k sodným iontům a ATP ( $K_d \sim 0,5 \mu\text{M}$ ) a v konformaci  $E_2$  má vysokou afinitu k draselným iontům a nízkou afinitu k ATP ( $K_d \sim 100 \mu\text{M}$ ) [Clarke a kol. 2007], přičemž se předpokládá, že konformace  $E_1$  a  $E_2$  lze vyvolat vysokou koncentrací sodných, resp. draselných iontů. Dále je známo, že pumpa potřebuje ke svému fungování  $\text{Mg}^{2+}$  [Skou, 1960]. Nedávno však bylo ukázáno, že cytoplazmatické ligandy (tedy  $\text{Mg}^{2+}$  a/nebo ATP) jsou schopny samy o sobě vyvolávat změny konformace velké cytoplazmatické kličky enzymu [Gryčová a kol. 2009]. Přítomnost různých ligandů tedy určuje konformaci, kterou enzym zaujímá a vzhledem k tomu, že správná konformace enzymu může být zásadní pro možnou interakci s fluoresceinem, prováděli jsme měření v přítomnosti různých ligandů. Při pokusu o bližší lokalizaci vazebného místa jsme tytéž experimenty provedli i s izolovanou velkou cytoplazmatickou kličkou (C45).

Při zkoumání molekulárních interakcí  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy s fluoresceinem jsme využili toho, že fluorescein emituje fluorescenci s vysokým kvantovým výtěžkem. Fluorescenční spektroskopie nabízí pestrout škálu technik a díky její citlivosti a neinvazivnosti je velmi vhodná pro studium biomolekul. V našich experimentech jsme využili dvě techniky. Za prvé to bylo měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou korelovaného čítání fotonů (TCSPC) a za druhé pak měření zhášení steady-state fluorescence.

Kinetika dohasínání fluorescence je velmi citlivá na interakce fluoroforu s mikrookolím. Přestože obecně interpretace jednotlivých parametrů dohasínacích křivek je poměrně obtížná (a tato práce se tímto tématem nezabývá), dá se očekávat, že změny v kinetice dohasínání fluorescence budou odrážet vazbu na protein a interakci s různými funkčními skupinami. Vzhledem k tomu, že v tomto druhu experimentu pracujeme s velmi rozsáhlou statistikou (typicky několik milionů fotonů), jsme schopni detekovat i velmi jemné změny. Další výhodou této metody je to, že kinetika

dohasínání nezávisí na koncentraci fluoroforu a měření tedy nemůže být znehodnoceno drobnými chybami, kterých se dopouštíme při přípravě vzorků.

Stern-Volmerova zhášecí konstanta ( $K_{sv}$ ) charakterizující účinnost zhášení fluorescence je (mimo jiné) citlivá na prostorovou přístupnost fluoroforu ze solventu a může tedy ukázat rozdíly v konformacích proteinu (na rozdíl od výše uvedeného měření kinetiky dohasínání fluorescence, zde se bude jednat změny širšího okolí fluoroforu). Vzhledem k tomu, že při dynamickém zhášení určuje střední doba života excitovaného stavu ( $\tau_{av}$ ) čas, ve kterém může efektivně dojít ke zhášecímu procesu, je korektnější posuzovat prostorovou přístupnost podle bimolekulární zhášecí konstanty ( $k_q = K_{sv} / \tau_{av}$ ).

Při vyhodnocování zhášecích experimentů jsme však narazili na neočekávané problémy, které podle všeho souvisí s přípravou roztoku jodidů. Jeden problém souvisí s tím, že jsme pro různé zásobní roztoky jodidu pozorovali odlišné hodnoty  $K_{sv}$  i při zhášení samotného fluoresceinu, a např. při měření zhášení fluoresceinu v přítomnosti celého proteinu pozorujeme, že měření za všech podmínek dává menší hodnoty pro  $K_{sv}$  při zhášení NaI, než při zhášení KI. Toto pozorování se dá vysvětlit drobnými chybami při přípravě roztoku (např. chyba automatické pipety se podle manuálu výrobce pohybuje v řádu procent v závislosti na použitém typu, množství pipetované kapaliny a také šikovnosti experimentátora). Dalším problémem však bylo, že roztoky jodidu (ať sodného či draselného) vykazovaly po namíchání (či naředění zásobního roztoku) velkou nestabilitu. Bylo zjištěno, že rozdíl mezi  $K_{sv}$  naměřenou ihned po namíchání a 4 hodiny poté činil až 40%. Druhý den a dny následující se však již hodnota neměnila. Pro toto pozorování zatím nemáme žádné uspokojivé vysvětlení.

Vzhledem k těmto problémům jsme při statistickém vyhodnocování porovnávali jen vzorky, ve kterých byl fluorescein zhášen stejným zásobním roztokem jodidu a to alespoň 24 h po namíchání roztoku. To bohužel znehodnocuje většinu zhášecích experimentů s izolovanou velkou cytoplazmatickou kličkou. V experimentech s celým proteinem jsme však pracovali s jedním zásobním roztokem NaI a jedním KI a z toho důvodu nemůžeme posuzovat vliv sodných či draselných iontů, ostatní srovnání jsou možná. Pro budoucí měření by bylo tedy vhodné namíchat pouze jeden zásobní roztok jodidu v takovém množství, aby byl pro všechny pokusy použit stejný. Je také nutné nechat ho alespoň 24 hodin v lednici ustát.

## Vazba fluoresceinu na protein

První otázkou bylo, zda fluorescein vůbec s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou interaguje. V tabulce 16, která ukazuje porovnání kinetik dohasínání fluorescence fluoresceinu je statisticky významný ( $p < 0,05$ ) rozdíl vzorků „blank“ od všech ostatních (kromě měření se samotným proteinem v pufru KCl) a toto pozorování indikuje, že k interakci fluoresceinu s proteinem dochází.

Ve zhášecích experimentech jsme očekávali, že u vzorků se samotným fluoresceinem v pufru (blank) budou hodnoty  $K_{sv}$  dosahovat výrazně vyšších hodnot a to z toho důvodu, že je zde fluorescein maximálně přístupný zhášedlu, zatímco při interakci s proteinem by se přístupnost fluoresceinu měla snížit a hodnoty  $K_{sv}$  by tak měly oproti blanku vykazovat nižší hodnoty. Výsledky z měření zhášení fluorescence pro celý protein (tabulka 6 a 7) však tomu nenasvědčují, neboť hodnoty  $K_{sv}$  u vzorku blank se signifikantně neliší na hladině  $p < 0,05$  od zbylých vzorků a to ani v NaCl, ani v KCl pufru, což je patrné i z tabulky 10 a 11, kde bylo provedeno srovnání t-testem (přesto se však domníváme, že k interakci fluoresceinu s proteinem dochází, neboť pozorujeme signifikantní rozdíly ve zhášení fluoresceinu mezi vzorky s různou konformací proteinu). Toto pozorování si vysvětlujeme tím, že do hry vstupuje další efekt, který pravděpodobně kompenzuje efekt prostorové přístupnosti a sice elektrostatická repulze. Při pH 7,5 je fluorescein převážně ve formě dianiontu a záporně nabitý jodid tedy odpuzuje. Při navázání na protein však jeho náboj může být zeslaben (či neutralizován) a elektrostatická repulze je tedy slabší. Tuto hypotézu by bylo možné ověřit použitím zhášedla s jiným nábojem. Bohužel experiment, kdy byl jako zhášedlo vyzkoušen neutrální akrylamid, ukázal, že pro zhášení fluorescence fluoresceinu je akrylamid neúčinný (výsledky neukázány) a bude tedy třeba nalézt jiné účinné zhášedlo.

Výsledky pro kličku C45 jsou podobné jako pro celý protein. Pro kinetiky dohasínání fluorescence pozorujeme signifikantní rozdíl blanku od všech ostatních vzorků, což naznačuje interakci fluoresceinu s proteinem. Vzhledem k potížím popsaným výše jsme mohli provést jen omezené porovnávání dat ze zhášecích experimentů. Ukazuje se však, že minimálně v pufru NaCl a v přítomnosti 10 mM ATP bez hořčičku je  $K_{sv}$  signifikantně nižší než pro blank.

## Konformační stavy enzymu

Výsledky ukazují, že jak měření kinetiky dohasínání, tak zhášení fluorescence umožňuje rozlišit jednotlivé konformační stavy jak celého enzymu, tak izolované velké cytoplazmatické kličky. Měření s celým proteinem v NaCl pufru ukazují, že od ostatních konformací se výrazně liší konformace v přítomnosti 10  $\mu\text{M}$  ATP (bez  $\text{Mg}^{2+}$ ), což ukazuje jak porovnání kinetik dohasínání, tak zhášecí experimenty. Konformace v přítomnosti samotného ATP bez  $\text{Mg}^{2+}$  se výrazně odlišuje i v pufru KCl, což ukazují především zhášecí experimenty (v pufru KCl se kinetiky dohasínání lišily téměř pro každé dva vzorky).

V případě izolované C45 porovnání kinetiky dohasínání fluorescence ukázalo, že žádné dvě konformace nejsou stejné a to jak v pufru NaCl, tak pufru KCl. Vzhledem k výše uvedeným metodickým problémům, jsme měli jen omezenou možnost porovnávání zhášecích experimentů a jediný signifikantní rozdíl jsme pozorovali mezi C45 bez ligandu a C45 v přítomnosti samotného ATP (bez  $\text{Mg}^{2+}$ ) v pufru NaCl.

Naše výsledky potvrzují experimenty [Gryčová a kol. 2009] s izolovanou C45. V tomto článku bylo ukázáno, že C45 zaujímá zavřenou konformaci v nepřítomnosti jakéhokoli ligandu, v přítomnosti samotného  $\text{Mg}^{2+}$  nebo v přítomnosti ATP současně s  $\text{Mg}^{2+}$  a otevřenou konformaci pouze za přítomnosti samotného ATP. Tato práce ukazuje, že konformace v přítomnosti samotného ATP bez  $\text{Mg}^{2+}$  je odlišná i pro celý protein a to nezávisle na tom, zda-li v pufru s vysokou koncentrací NaCl či KCl. Na rozdíl od zmíněné práce s izolovanou kličkou, která má zanedbatelnou ATPázovou aktivitu [Krumnscheid a kol. 2004] důvod, proč nepozorujeme jinou konformaci celého enzymu v přítomnosti ATP i  $\text{Mg}^{2+}$  např. od konformace bez ligandů může být ten, že ATP je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázou v průběhu experimentu rozloženo na ADP a fosfát (což může být problém zvláště v experimentech s nízkou koncentrací ATP).

## 6. Závěr

V této diplomové práci byla zkoumána interakce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy s fluoresceinem. Fluorescein je fluorescenční látka běžně používaná v klinické praxi, nicméně její užívání může být spojeno s nežádoucími účinky, z nichž některé jsou shodné právě s těmi, za které je zodpovědná dysfunkce sodno-draselné pumpy.

Metodami zhášení fluorescence a korelovaného čítání fotonů (TCSPC) bylo ukázáno, že k interakci pravděpodobně dochází a to jak pro celý protein, tak pro izolovanou kličku C45. Současně jsme byli schopni identifikovat jednotlivé konformace vyvolané vazbou přirozených ligandů  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Ukazuje se, že konformace v přítomnosti ATP bez  $\text{Mg}^{2+}$  je odlišná od ostatních.

V průběhu zpracování dat jsme však narazili na nepředvídané metodické problémy, které zabránily kompletnímu vyhodnocení naměřených dat. Pro vyslovení definitivních závěrů bude tedy třeba provést ještě další doplňující experimenty.

## 7. Seznam literatury

- [1] **Albani J.R. (2007):** Principles and applications of fluorescence spectroscopy. Blackwell, Oxford; 124-127
- [2] **Albers R.W. (1969):** Biochemical aspects of active transport, *Annu Rev. Biochem.* 36; 727-756
- [3] **Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Walter P. (1998):** Základy buněčné biologie. Espero publishing, Ústí nad Labem; 371-406
- [4] **Bers D.M., Barry W.H., Despa S. (2003):** Intracellular Na<sup>+</sup> regulation in cardiac myocytes. *Cardiovas.Res.*57; 897-912
- [5] **Boiko N.M., Tselevych M.V., Sanahurs'kyi D.I. (2004):** Effect of heavy metal cations on the activity of membrane Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in embryos of loach (*Misgurnus fossilis* L.) *Biokhim Zh* 77(3); 44-48
- [6] **Bossuyt J., Despa S., Martin J.L., Bers D.M. (2006):** Phospholeman phosphorylation alter its fluorescence resonance energy with the Na/K-ATPase pump. *J. Biol. Chem.* 281(43); 32765-32773
- [7] **Camfield P.R., Camfield C.S., Dooley J.M., Gordon K., Jollymore S., Weaver D.F. (1992):** Aspartame exacerbates EEG spike-wave discharge in children with general absence epilepsy. *Neurology* 42; 1000-1003
- [8] **Clarke R.J., Kane D.J. (2007):** Two gears of pumping by the sodium pump. *Biophys.J.* 93; 4187-4196
- [9] **Clarke R.J., Apell J.H., Kong B.Y. (2007):** Allosteric effect of ATP on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase conformational kinetics. *Biochemistry* 46(23); 7034-7044
- [10] **Dandlike W. and Alonso R. (1967):** Purification of Fluorescein and Fluorescein derivatives by cellulose ion exchange chromatography, *Immunochemistry* 4.
- [11] **DeWeer P., Seldin D.W., Giebisch G.(1985):** Na,K-ATPase in the renal kidney. Raven Publishing, New York, *Physiology and Patophysiology*, 31-55
- [12] **Diehl H., Markuszewski R. (1989):** Studies on Fluorescein. The Fluorescence of Fluorescein as a Function of pH. *Talanta* 36; 416-418.
- [13] **Ewart H.S., Klip A. (1995):** Hormonal regulation of the Na, K-ATPase: mechanism underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am.J.Physiol* 269; C295-311

- [14] **Farley R.A., Tran C.M., Carilli C.T., Hawke D., Shively J.E., (1984):** The amino acid sequence of a fluorescein-labeled peptide from the active site of (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 259; 9532-9535
- [15] **Freel J.W., Goldner A.M. (1981):** Sodium-coupled nonelectrolyte transport across epithelia: emerging concepts and directions. *Am.J.Physiol* 241; G451-G460
- [16] **Gatto C., Wang A.X., Kaplan J.H. (1998):** The M4M5 cytoplasmic loop of the Na,K-ATPase, overexpressed in *Escherichia coli*, binds nucleoside triphosphates with the same selectivity as the intact native protein. *J.Biol.Chem*273; 10578-10585
- [17] **Gryčová L., Sklenovský P., Lánský Z., Janovská M., Otyepka M., Amler E., Tiesinger J., Kubala M.(2008):** ATP and magnesium drive conformational changes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase cytoplasmic headpiece. *Bioch.at biophys. acta* 1788; 1081-1091
- [18] **Hilgenberg L.G.W., Su H., Gu H., O'Down D.K., Smith M.A.(2006):**  $\alpha 3$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a neuronal receptor for agrin. *Cell* 125; 359-369
- [19] **Horák M. (2007):**Využití moderních metod analytické chemie v oblasti stopovačů podzemních vod. (*Diplomová práce*), Brno
- [20] **Chen Z., Krmar R.T., Dada L., Efendief R.,Leibiger I.B., Pedemonte C.H., Katz A.I.,Sznajder J.I., Bertorello A.M. (2006):** Phosphorylation of adaptor protein2 is essential for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase endocytosis in response to ether G protein coupled receptor or reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35; 127-132
- [21] **Karlish S.J D. (1980):** Characterization of conformational changes in (Na, K)ATPase labeled with fluorescein at the active site. *J.Bioenerg. Biomembr.* 12;111-136
- [22] **Kim Ch.-R., Sadowska G.B., Petersson K.H., Merino M. Sysyn G.D., Padnuty J.F., Stonestreet B.S. (2006):** Effect of postnatal steroids on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and  $\alpha_1$ - and  $\beta_1$ - subunit protein expression in the cerebral cortex and renal cortex of newborn lambs. *Fertility and development* 18; 413-423
- [23] **Kotova O. (2006):** Signaling to and from the sodium pump: Effect of insulin and cardiotonic steroids (*Doctoral thesis*), Stockholm



- [24] **Krumscheid R, Ettrich R, Sovová Z, Susánková K, Lánský Z, Hofbauerová K, Linnertz H, Teisinger J, Amler E, Schoner W. (2004):** The phosphatase activity of the isolated H4-H5 loop of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase resides outside its ATP binding site. *Eur J Biochem.* 271(19); 3923-36.
- [25] **Kubala M., Hofbauerová K., Ettrich R., Kopecký V., Krumscheid R., Plasek J., Teisinger J., Schoner W., Amler E. (2002):** Phe (475) and Glu (446) but not Ser (445) participate in ATP-binding to the alpha-subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297; 154-159
- [26] **Kubala M. (2003):** Determination of ATP binding site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (*Doctoral thesis*), Praha
- [27] **Kubala M., Teisinger R., Ettrich R., Hofbauerová K., Kopecký V., Baumruk V., Krumcheid R., Plasek J., Schoner W., Amler E. (2003):** Eight amino acids form the ATP recognition site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemistry* 42; 6446-6452
- [28] **Kubala M (2006):** ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic and crystallographic experiments. *Proteins* 64; 1-12
- [29] **Kuhlbrandt W. (2004):** Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Molecular Cell Biology* 5; 282-295
- [30] **La Marca H.L., Morris C.A., Pettit G.R., Nagowa T., Puschett J.B. (2005):** Marinobufagenin impairs first trimester cytotrophoblast differentiation. *Placenta* 27; 984-988
- [31] **Lánský Z., Kubala M., Ettrich R., Kutý M., Plasek J., Teisinger J., Schoner W., Amler E. (2004):** The hydrogen bonds between Arg (423) and Glu (472) and other key residues, Asp (443), Ser (477), and Pro (489), are responsible for the formation and a different positioning of TNP-ATP and ATP within the nucleotide-binding site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemistry* 43; 8303-8311
- [32] **Mantha A.K., Moorthy K., Cowsik S.M., Bequer N.Z. (2005):** Membrane associated functions of nerokinin B (NKB) on A $\beta$  (25-35) induced toxicity in aging rat brain synaptosomes. *Biogerontology* 7; 19-33
- [33] **Moller J.V., Juul B., le Maire M. (1996):** Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochem. Biophys. Acta-rev. Biomembr.* 1286; 1-51

- [34] **Morth J.P., Pedersen P.B., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T.L.M., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nissen P. (2007):** Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450; 1043-1046
- [35] **Ogan J.T., Reifenberger M.S., Milanick M.A., Gatto C. (2007):** Kinetic characterization of Na,K-ATPase inhibition by Eosin. *Blood cells, molecules and diseases* 38; 229-237
- [36] **Post R.L., Kume S., Tobin T., Orcutt B., Sen A.K. (1969):** Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase, *J.Gen.Physiol* 54; 306-326
- [37] **Post R.L., Kume S., Hegyvary C., (1972):** Activation by adenosine-triphosphate in phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine-triphosphatase, *J.Biol.Chem.*247; 6530-6540
- [38] **Reisenauer R. (1970):** Metody matematiké statistiky a jejich aplikace, 2.revidované a doplněné vydání, *Polytechnická knižnice, Praha*
- [39] **Smith S.A., Pretorius W.A. (2002):** Spectrophotometric determination of pKa values for fluorescein using activity coefficient corrections (<http://www.wrc.org.za>; (12.2.2009))
- [40] **Schulpis K.H., Papassotiriou I. Tsakiris T., Tsakiris S. (2005):** The effect of L-cysteine and glutathione on inhibition of Na/K-ATPase activity by aspartame metabolites in human erythrocyte membrane. *Europen Journal of Clinical Nutrition* 60; 593-597
- [41] **Schulpis K.H., Karantana A.G., Papaconstantinou E.D., Partimos T., Tjamouranis I., Tsakiris S. (2006):** Erythrocyte membrane Na,K-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities in subject with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)677 C→T genotype and moderate hyperhomocysteinemia. The role of L-phenylalanin and L-alanine. *Clin Chem Lab Med* 44(4); 423-427
- [42] **Sweadner K.J., Donnet C. (2001):** Struktural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J.*356; 685-704
- [43] **Stimac R., Kerek F., Apell H.J. (2005):** Mechanism of the Na, K-ATPase inhibition by MCS derivates. *J.Membrane Biol* 205; 89-101
- [44] **Tanoue K., Kaya S., Hayashi Y., Abe K., Imagawa T., Taniguchi K., Sakaguchil K., (2006):** New evidence for ATP binding induced catalytic subunit interactions in pig kidney Na/K-ATPase. *J. Biochem.*140; 599-607

- [45] **Taylor W.R., Green N.M. (1989):** The predicted secondary structure of the nucleotide-binding site of six cation-transporting ATPase lead to a probable tertiary fold. *Eur. J. Biochem.* 179; 241-248
- [46] **Thoenges D., Amler E., Eckert T., Schonher W. (1999):** Tight binding of bulky fluorescent derivatives of adenosine to the low affinity E(2)ATP site leads to inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase – Analysis of structural requirements of fluorescent ATP derivatives with a Koshland-Nemethy-Filmer model of two interacting ATP sites. *J.Biol.Chem.*274; 1971-1978
- [47] **Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. (2000):** Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2,6 Å resolution. *Nature* 8;405(6787); 647-655
- [48] **Toyoshima C., Nomura H. (2002):** Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 8;418(6898): 605-611
- [49] **Tran C.M., Farley R.A. (1999):** Catalytic activity of an isolated domain of Na,K-ATPase expressed in *Escherichia coli*. *Biophys.J.*77; 258-266
- [50] **Van den Eeden S.K., Koepsell T.D., Longstreth Jr. W.T., Van Belle G., Dalling J.R., McKnight B. (1994):** Aspartame ingestion and headaches. *Neurology* 44;1787-1793
- [51] **Vu H., Ianosi-Irime M., Danchuk S., Rabon E., Nogawa T., Kamano Y., Pettit G.R., Wiese T., Puschett J.B. (2005):** Resibufogenin corrects hypertension in a rat model of human preeclampsia. *Exp Biol Med* 231; 215-220
- [52] **Wikipedia:** <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>
- [53] **Yoon T., Kim M., Lee K. (2005):** Inhibition of Na,K-ATPase-suppressive activity of translationally controlled tumor protein by sortin nexin 6. *FEBS letters* 580; 3558-3564
- [54] **Zugno A.I., Scherer E.B.S., Schuck P.F., Oliviera D.L., Wofchuk S., Wannmacher C.M.D., Wajner M., Wyse A.T.S. (2006):** Intrastriatal administration of guanidinoacetate inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis* 21;41-50