

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**STUDIUM INTERAKCÍ ENZYMU DHRS7 S PROTEINY METODOU
PULL-DOWN**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Kateřina Káchová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15.5.2018

.....

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří RNDr. Evě Novotné, Ph.D., RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D. a Mgr. Dominice Fassmannové za odborné vedení, ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovaly.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Káchová

Školitel: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium interakcí enzymu DHRS7 s proteiny
metodou pull-down

Dehydrogenáza/reduktáza nadrodiny SDR 7 (DHRS7) patří mezi méně probádané enzymy této nadrodiny. Bylo prokázáno, že se tento enzym *in vitro* zapojuje do redukčního metabolismu celé řady sloučenin, jako například steroidů, retinoidů a xenobiotik. V poslední době se také objevují výsledky poukazující na možnou roli tohoto enzymu v patogenezi nádoru prostaty či jiných onemocnění. Proto by bylo vhodné tento enzym podrobněji charakterizovat s cílem objasnit jeho pato/fyziologickou funkci v organismu.

Jelikož se v poslední době poukazuje na důležitost protein-protein interakcí pro funkci proteinů, bylo cílem této práce popsat interakční partnery enzymu DHRS7 a tím přispět k prohloubení znalostí o tomto enzymu. K tomu byla použita *in vitro* metoda pull-down. V prvním kroku byl enzym DHRS7 (návnadový protein) imobilizován na vhodný nosič (magnetické partikule His Mag Sepharose Ni a nemagnetické Protino Ni-IDA partikule). Poté byl nosič s DHRS7 enzymem inkubován s lyzátem buněk Hep G2, zdrojem možných interakčních partnerů. SDS-PAGE elektroforéza vzorků po eluci obsahovala několik proužků, které mohly obsahovat interakční partnery DHRS7 enzymu. K jejich identifikaci byla využita MS analýza.

V této práci byla zavedena a zoptimalizována pull-down metoda, *in vitro* metoda pro studium protein-protein interakcí, která může být využívána pro další experimenty na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

ABSTRACT

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Káčová
Supervisor: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.
Title of diploma thesis: Study of protein-protein interaction of DHRS7 enzyme by pull-down assay

Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7 (DHRS7) is one of the less studied enzymes of SDR superfamily. It has been proven that this enzyme is *in vitro* involved in reductive metabolism of various compounds, such as steroids, retinoids and xenobiotics. Recently results pointing out to possible role of this enzyme in the pathogenesis of prostate cancer or other diseases has been published. It would be suitable to better characterize this enzyme to clarifying its patho/physiological role in the organism.

Because protein-protein interactions seem to be important for the function of proteins, the aim of this study was to identify interaction partners of the DHRS7, and thus contribute to the improvement of understanding of this enzyme. For our experiments, pull-down assay, *in vitro* method was utilized. The first step was immobilization of DHRS7 enzyme (bait protein) to suitable carrier (His Mag Sepharose Ni particles and nonmagnetic Protino Ni-IDA particles). Subsequently, the carrier with immobilized DHRS7 was incubated with the lysate of Hep G2 cells – the source of possible interacting proteins. The SDS-PAGE electrophoresis of sample after elution consist of several bands containing potential interacting partners of DHRS7. The MS analysis was used to identify these proteins.

The pull-down assay, *in vitro* method for study of protein-protein interaction, was implemented and optimized that could be used for further experiments at the Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove.

OBSAH

1	ÚVOD	4
2	TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1	SDR NADRODINA ENZYMŮ	5
2.1.1	<i>Rozdělení SDR nadrodiny.....</i>	<i>6</i>
2.1.2	<i>DHRS7.....</i>	<i>8</i>
2.2	PROTEIN-PROTEIN INTERAKCE	10
2.2.1	<i>Definice protein-protein interakcí.....</i>	<i>10</i>
2.2.2	<i>Typy protein-protein interakcí.....</i>	<i>11</i>
2.2.3	<i>Protein-protein interakce zástupců SDR nadrodiny.....</i>	<i>12</i>
2.2.3.1	<i>Protein-protein interakce s 11β-HSD1</i>	<i>12</i>
2.2.3.2	<i>Protein-protein interakce s DHRS3.....</i>	<i>13</i>
2.3	METODY VÝZKUMU PROTEIN-PROTEIN INTERAKCÍ.....	14
2.3.1	<i>In vivo metody.....</i>	<i>14</i>
2.3.2	<i>In silico metody.....</i>	<i>14</i>
2.3.3	<i>In vitro metody.....</i>	<i>14</i>
2.4	PULL-DOWN METODA	16
2.4.1	<i>Obecný postup</i>	<i>16</i>
2.4.2	<i>Návnadové proteiny a jejich značky, afinitní partneři a nosiče</i>	<i>17</i>
2.4.2.1	<i>Glutation-S-transferáza a glutation</i>	<i>17</i>
2.4.2.2	<i>Polyhistidinová značka a ionty kovů.....</i>	<i>18</i>
2.4.2.3	<i>Biotin a avidin či streptavidin</i>	<i>19</i>
2.4.2.4	<i>Nosiče.....</i>	<i>19</i>
2.4.3	<i>Parametry optimalizace vazby</i>	<i>20</i>
2.4.4	<i>Eluce a identifikace</i>	<i>20</i>
3	CÍL PRÁCE	21
4	MATERIÁLY A METODY	22
4.1	MATERIÁLY	22
4.1.1	<i>Nosiče</i>	<i>22</i>
4.1.2	<i>Protilátky.....</i>	<i>22</i>
4.1.3	<i>Enzymy.....</i>	<i>22</i>
4.1.4	<i>Chemikálie.....</i>	<i>22</i>

4.1.5	<i>Přístroje a pomůcky</i>	23
4.1.6	<i>Zásobní roztoky</i>	24
4.1.6.1	Pull-down metoda	24
4.1.6.2	Elektroforéza	24
4.1.6.3	Western blotting	25
4.1.6.4	Příprava vzorků pro MS	25
4.1.7	<i>Gely na SDS-PAGE elektroforézu</i>	26
4.1.8	<i>Pomůcky na vizualizaci Dot Blotu a Western Blottingu</i>	26
4.2	METODY.....	27
4.2.1	<i>Imobilizace DHRS7 na magnetické partikule</i>	27
4.2.1.1	Příprava magnetických partikulí	27
4.2.1.2	Příprava vzorku s DHRS7	27
4.2.1.3	Vazba DHRS7 na magnetické partikule a příprava vzorků na SDS-PAGE elektroforézu	27
4.2.1.4	SDS PAGE Elektroforéza	28
4.2.1.5	Barvení gelu pomocí barviva Blue Silver	28
4.2.1.6	Vizualizace gelu	29
4.2.2	<i>Imobilizace DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule</i>	29
4.2.2.1	Příprava Protino Ni-IDA partikulí	29
4.2.2.2	Solubilizace Sf9 mikrozomů s rekombinantní lidskou DHRS7	29
4.2.2.3	Vazba na Protino Ni-IDA partikule	29
4.2.2.4	Uvolnění z vazby a vizualizace pomocí SDS-PAGE elektroforézy	30
4.2.2.5	Kontrolní partikule	30
4.2.2.6	Finální postup pro MS analýzu	31
4.2.3	<i>Western Blotting</i>	33
4.2.3.1	Příprava blotovací kazety	33
4.2.3.2	Blotování	33
4.2.3.3	Kontrola přenosu proteinů.....	33
4.2.3.4	Vazba primární protilátky	33
4.2.3.5	Vazba sekundární protilátky	33
4.2.3.6	Vizualizace (v temné komoře)	34
4.2.4	<i>Příprava vzorků na MS analýzu</i>	34
4.2.4.1	Štěpení trypsinem.....	34
4.2.4.2	Odsolení vzorků	35

4.2.4.3	Nanesení na destičku pro MALDI MS analýzu	35
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	36
5.1	MAGNETICKÉ PARTIKULE	36
5.2	PROTINO NI-IDA PARTIKULE	42
5.3	KONTROLNÍ PARTIKULE	48
5.4	FINÁLNÍ PULL-DOWN METODA	50
6	ZÁVĚR	52
7	SEZNAM ZKRATEK	53
8	SEZNAM TABULEK	55
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
10	POUŽITÁ LITERATURA	59

1 ÚVOD

Lidský enzym dehydrogenáza/reduktáza SDR nadrodiny číslo 7 (DHRS7) patří mezi méně probádané členy nadrodiny SDR. Tento enzym se účastní *in vitro* redukčních přeměn některých steroidních sloučenin, retinoidů či xenobiotik. V poslední době se objevily také práce, které poukazují na jeho možnou roli u některých onemocnění, jako je například nádor prostaty. Z toho důvodu je zapotřebí enzym podrobněji popsat a zjistit jeho pato/fyziologickou funkci v organismu.

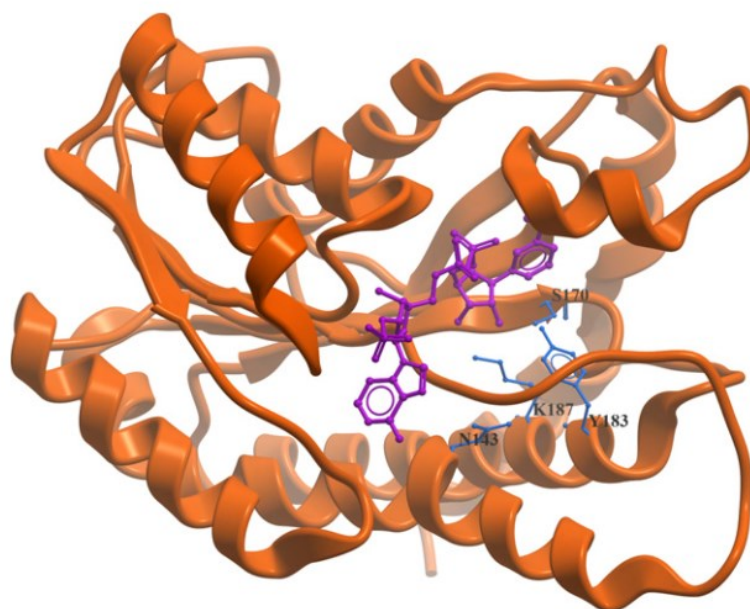
Tato práce se zaměřuje na studium protein-protein interakcí enzymu DHRS7 pomocí metody pull-down. Výzkum protein-protein interakcí obecně nabývá v poslední době na velké intenzitě, jelikož se ukazuje, že většina proteinů v lidském organismu nepracuje samostatně, ale v kooperaci s dalšími. Je tedy důležité tyto interakční partnery popsat a přispět tak k prohlubování znalostí o zkoumaném proteinu. Tyto znalosti mohou pomoci k zjištění role enzymu v buňce nebo způsobu jeho regulace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 SDR NADRODINA ENZYMŮ

Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR) patří mezi jednu z největších skupin enzymů. Podle databáze UniProtKB čítá tato nadrodina přes 630 000 členů (Internet 1), nacházejících se napříč všemi říšemi. První člen byl objeven a charakterizován již v 70. letech 20. století (Jörnvall et al. 1981). Od té doby bylo v lidském organismu identifikováno 73 členů (Bray et al. 2009).

SDR proteiny jsou většinou tvořeny 250 aminokyselinami, ale v nadrodině můžeme nalézt i zástupce mnohem větší, a to například o velikosti 350 aminokyselin (Filling et al. 2002). Struktura charakteristická pro tuto nadrodinu obsahuje jednu doménu, tzv. Rossmannův záhyb s centrálním β -listem sendvičově vloženým mezi tři α -šroubovice na každé straně (Obr. 1) (Persson & Kallberg 2013). N-terminální oblast molekuly vážící NAD(H) nebo NADP(H) obsahuje charakteristickou sekvenci bohatou na aminokyselinu glycin (TGxxxGxG). C-terminální oblast je strukturně variabilní a slouží k vazbě substrátu. Další vysoce konzervativní částí je místo tvořené katalytickou tetrádou z aminokyselin tyrosinu, lysinu, serinu a asparaginu katalyzující oxidoredukční reakce (Oppermann et al. 2003). Napříč nadrodinou je typická nízká sekvenční podobnost cca 20–30 % (Persson & Kallberg 2013).

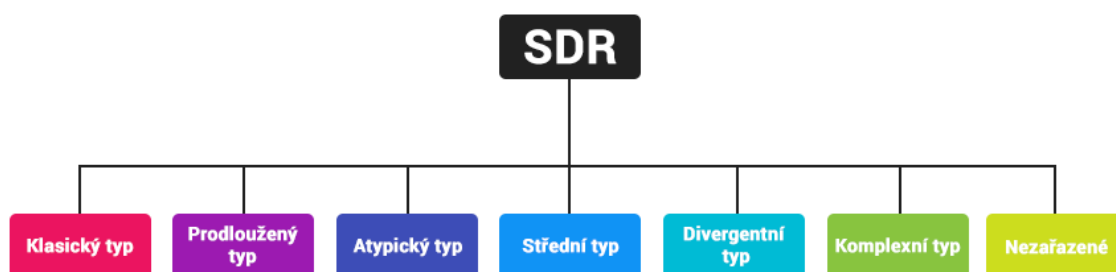


Obr. 1: Struktura zástupce SDR nadrodiny – β -list sendvičově vložený mezi tři α -šroubovice na každé straně, fialově znázorněn koenzym a modře konzervované aminokyseliny v aktivním místě, tzv. katalytická tetráda (Persson & Kallberg 2013).

Enzymy SDR nadrodiny katalyzují v organismu reakce převážně oxidoredukčního typu, minoritně také reakce isomerázové nebo lyázové. Substráty těchto enzymů jsou poměrně různorodé a patří sem sloučeniny jako například steroidy, prostaglandiny, alifatické alkoholy a také xenobiotika (Oppermann et al. 2003).

2.1.1 Rozdělení SDR nadrodiny

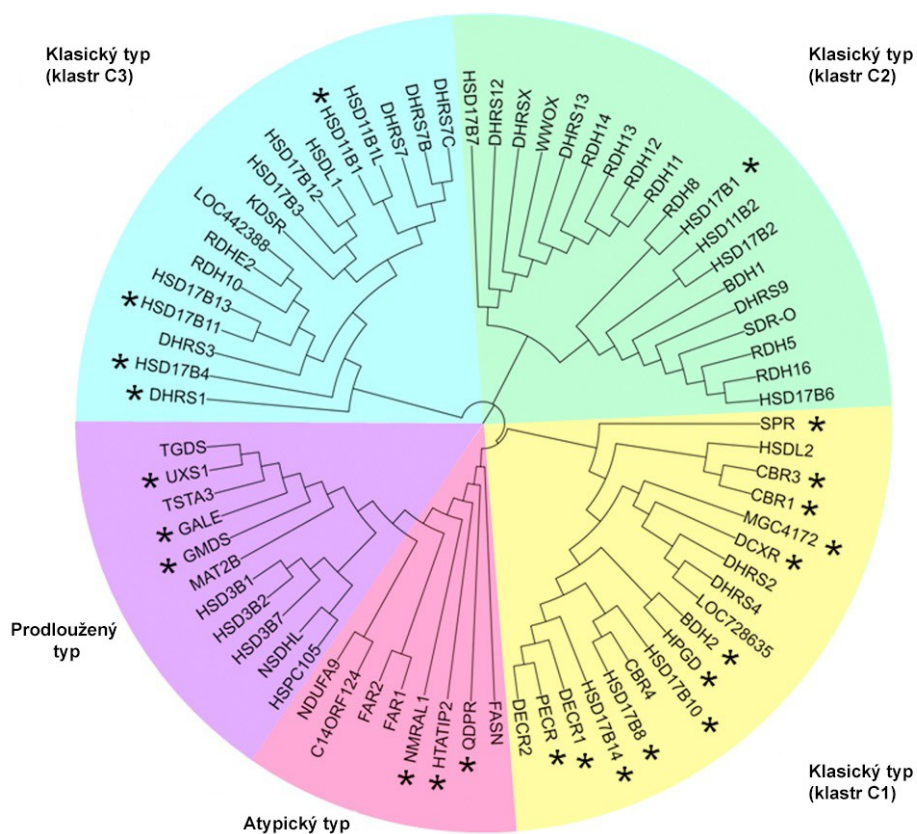
Nadrodina SDR enzymů je rozdělena do 464 rodin a následně do několika menších skupin. Tyto skupiny jsou pak pojmenovány jako typ klasický, prodloužený, atypický, komplexní, divergentní a střední (Obr. 2). Nejvíce zástupců zahrnuje typ klasický a typ prodloužený (Persson & Kallberg 2009). Do klasického typu bylo zatím přiřazeno kolem 68 000 členů, do prodlouženého přes 38 000 členů (Persson & Kallberg 2013).



Obr. 2: Diagram rozdělení nadrodiny SDR do 7 typů (Persson & Kallberg 2013).

SDR enzymy lidského organismu klasického typu jsou dále děleny do klastrů C1–C3 podle jejich vazby na membránu a podle substrátů (Obr. 3). Enzymy klastru C1 nejsou většinou vázány na membránu a substrátem těchto enzymů jsou sloučeniny typu prostaglandinů nebo chinonů. Klastry C2 a C3 obsahují enzymy vázané na membránu a jejich substrátem jsou často retinoidy a steroidy.

Prodloužený typ je také rozdělen na dvě menší podjednotky. Epimerázy, které nejsou vázány na membránu a jejich substrátem jsou cukry nukleotidů. Druhou skupinku tvoří 3 β -hydroxysteroiddehydrogenázy (3 β -HSD), jejíž členové jsou vázáni na membrány a ovlivňují metabolismus steroidů (Bray et al. 2009).



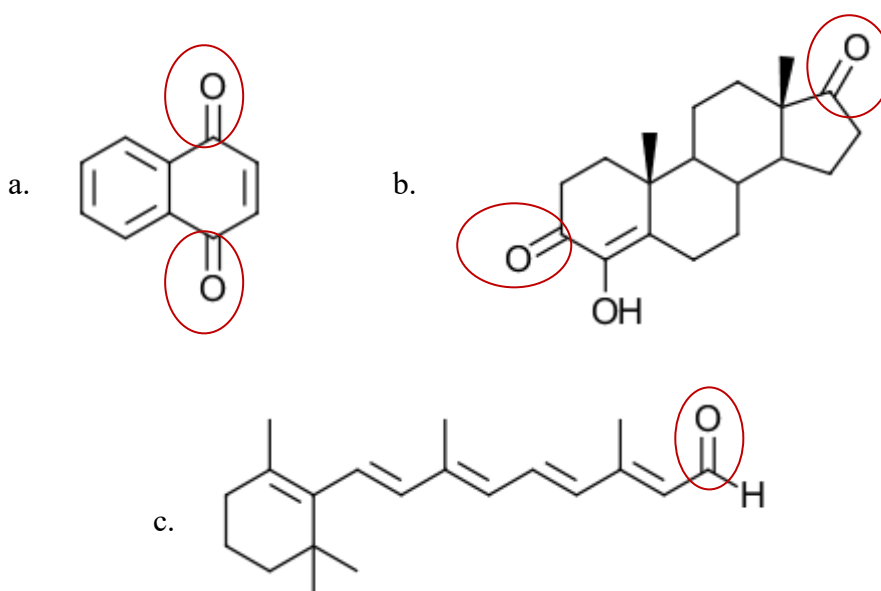
Obr. 3: Schematický diagram zástupců SDR nadrodiny nalezených v lidském organismu se zaměřením na sekvenční vztahy mezi vybranými třemi typy – klasický, prodloužený a atypický. Krátká větev ukazuje na blízké homology, zatímco delší větev na vzdálenější evoluční vztah (upraveno dle Bray et al. 2009).

Co se týče preference NAD(H) či NADP(H), záleží na struktuře enzymu. Většina enzymů vážící NAD(H) obsahuje ve své struktuře na C-terminálním konci druhého β -listu kyselý zbytek, kdežto enzymy vážící NADP(H) obsahují za touto C-terminální sekvencí bazický zbytek (Kallberg et al. 2002).

2.1.2 DHRS7

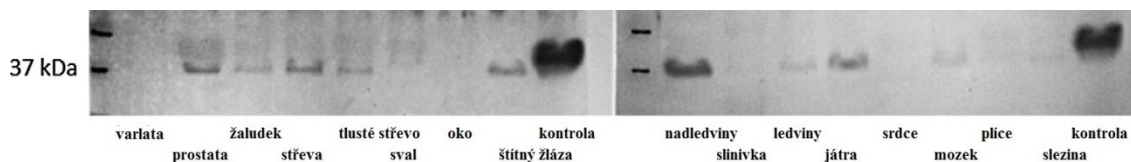
Enzym dehydrogenáza/reduktáza SDR nadrodiny člen 7 (DHRS7) isoforma 1 byl objeven v roce 2000 jako nový člen klastru C3 klasického typu (Haeseleer & Palczewski 2000). Jeho molekulová hmotnost činí 38 kDa a jeho řetězec se skládá z 339 aminokyselin (Internet 1). Tento enzym se kromě u lidského organismu nachází i u jiných forem života. Největší sekvenční podobnost (79–95 %) nacházíme například s myší, hovězí a prasečí formou DHRS7 enzymu (Štambergová et al. 2016).

DHRS7 se nachází jako integrální membránový enzym v endoplazmatickém retikulu. Dle Štambergové et al. (2016) a experimentech provedených na subcelulárních frakcích směřuje DHRS7 do lumen kompartmentu. Araya et al. (2017) ve své práci prováděné na buněčných liniích uvádí naopak orientaci do cytoplasmy. Preferenčně DHRS7 využívá pro katalýzu reakcí jako kofaktor NADP(H). Enzym metabolizuje především látky s karbonylovou skupinou ve struktuře, kterou redukuje na hydroxylovou skupinu. Mezi dosud popsané substráty *in vitro* patří jak látky tělu vlastní typu steroidů nebo retinoidů (např. estron, kortizon, androsten-3,17-dion, all-trans-retinal), tak i látky typu xenobiotik (Obr. 4). Příkladem exogenních substrátů jsou 9,10-fenantrenchinon a 1,2-naftochinon, potenciálně škodlivé látky nacházející se ve výfukových plynech či oxkarbazepin, isatin a metyrapon (Štambergová et al. 2014, Štambergová et al. 2016).



Obr. 4: Příklady struktur s červeně vyznačenou karbonylovou skupinou, metabolizovaných lidskou DHRS7 (a. 1,2-naftochinon, b. androsten-3,17-dion a c. all-trans-retinal).

Co se týče orgánové exprese, nejvíce je DHRS7 exprimována na úrovni mRNA u lidí v prostatě, ledvinách a štítné žláze. Na úrovni proteinu je situace poněkud rozdílná. DHRS7 ve zvýšeném množství byla detekována v nadledvinách, játrech, štítné žláze, prostatě, střevech, žaludku, ledvinách i mozku (Obr. 5) (Štambergová et al. 2016).



Obr. 5: Analýza exprese DHRS7 na úrovni proteinu v lidských tkáních (upraveno dle Štambergová et al. 2016).

Fyziologická role enzymu DHRS7 je dosud neznámá. V posledních letech se objevují různé úvahy, jako například spojitost s metabolismem lipidů. Zvýšená exprese byla pozorována ve svalech pacientů s diabetes mellitus typ 2 (Keildson et al. 2014) nebo u myši s dietou s vysokým obsahem tuků (Liao et al. 2014). Naopak snížená exprese byla popsána u myši s indukovanou dyslipidémií (Sato et al. 2014). Pozměněná exprese enzymu byla nalezena i u některých typů novotvarů, například prostaty (Jiao et al. 2014) nebo plic (Landi et al. 2008).

Bližší se studiu vlivu DHRS7 u nádoru prostaty věnoval Seibert et al. (2015). Byla pozorována snížená exprese enzymu DHRS7 u pacientů s tímto typem nádoru a se zvyšující se diferencovaností nádoru se dále exprese snižovala. Při úplné nepřítomnosti DHRS7 se zvýšila migrace nádorových buněk a snížila jejich adheze, což naznačuje možnou roli DHRS7 jako tumor-supresorového proteinu (Seibert et al. 2015).

Fylogeneticky nejbližší příbuzné enzymy DHRS7B a DHRS7C jsou ještě méně probádány (Landi et al. 2008). U myši je DHRS7B zapojena do redukční reakce syntézy etherových lipidů, u nichž se předpokládá, že slouží jako ligandy pro receptor PPAR γ (Lodhi et al. 2013). Funkce lidského enzymu DHRS7B je zatím neznámá. Enzym DHRS7C je prozkoumán pouze u myši. Tento integrální protein zanořený do membrány sarkoplazmatického retikula plní funkci katalyzátoru NAD⁺-dependentní konverze all-trans-retinolu na retinal (Treves et al. 2012). Dalšími příbuznými enzymy jsou 11 β -HSD1 a 11 β -HSD1L. Enzym 11 β -HSD1 je blíže popsán v podkapitole protein-protein interakce 2.2.3.1.

2.2 PROTEIN-PROTEIN INTERAKCE

Lidský genom se skládá z 20 000–25 000 genů kódující přes půl milionu různých proteinů. Ty se následně v organismu zapojují do celé řady procesů, jako například genová exprese, buněčný růst, proliferace či mezibuněčná komunikace. Produkce proteinů v organismu je proces dynamický, reagující na nesčetné podněty. Dochází pak k tomu, že různé buňky v organismu tvoří zcela rozdílné proteiny ve stejnou chvíli. Navíc je tvorba některých proteinů závislá na konkrétním typu buněk.

Dřívější výzkumy se zaměřovaly na každý protein jako na samostatnou jednotku. Odhaduje se však, že více než 80 % proteinů nefunguje v organismu samostatně, ale v kooperaci s dalšími proteiny. Tyto interakce jsou následně součástí rozsáhlé buněčné sítě protein-protein interakcí, která se také někdy nazývá interaktom (Internet 6, Jeong et al. 2001).

2.2.1 Definice protein-protein interakcí

Protein-protein interakce je obvykle chápána jako fyzický kontakt mezi proteiny buňky nebo živého organismu. Je důležité nezaměňovat tento fyzický kontakt s funkčním kontaktem, ke kterému v organismu také často dochází. Příkladem funkčního kontaktu je například vazba protein-kofaktor, protein-ligand nebo komplex proteinů v aparátu pro transkripci. Mezi protein-protein interakce se dále neřadí tzv. produktivní interakce související s produkcí proteinů či jejich degradací. Příkladem je kontakt vznikajících proteinů s ribozomy či chaperony.

Důležitým aspektem vazby je také její specifita, tedy nemělo by jít o náhodně vzniklé vazby mezi různými proteiny, ale o úmyslné spojení. Že se jedná o fyzický kontakt, neznamená, že tento kontakt bude stálý či permanentní. Některé proteiny v organismu jsou tvořeny pouze pro provedení přechodné akce a po interakci se vazba rozpadá (typické u signálních drah). Vznik protein-protein interakcí je v každé buňce ovlivněn řadou činitelů, jako například typem buňky, fází buněčného cyklu, vývojovým stádiem, prostředím, fosforylací atd. (de Las Rivas & Fontanillo 2010).

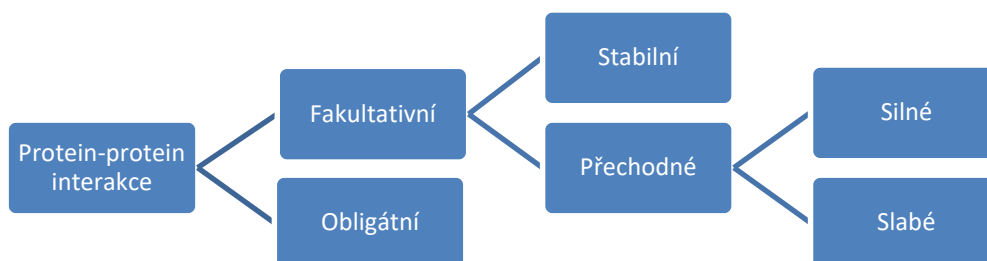
Interakce mezi proteiny mohou vznikat obvykle kombinací hydrofobních vazeb, van der Waalových sil a solných můstků (Internet 6).

2.2.2 Typy protein-protein interakcí

Protein-protein interakce se dělí na dvě velké skupiny – stabilní a přechodné. Stabilní interakce vytvoří pevný komplex s vazebným partnerem, který je ireverzibilní. Přechodné interakce jsou interakce dočasné povahy a většinou vyžadují speciální podmínky pro vznik interakce jako je fosforylace nebo konformační změna. Vzniklé komplexy se v průběhu času rozpadají a zase opět vznikají. Přechodné typy interakcí se dále dělí na silné a slabé interakce. Tento typ interakcí je v organismu zcela zásadní. Podílí se jednak na regulačních mechanismech biochemických cest, ale i jako součást signalizační kaskády v buňkách (Acuner Ozbabacan et al. 2011).

Dle podobnosti mezi interagujícími podjednotkami proteinů rozlišujeme další dva typy, homooligomery a heterooligomery. Pokud dojde ke spojení identických proteinových řetězců, vzniká tzv. homooligomerní komplex. Heterooligomerní komplex vzniká spojením různých, tedy neidentických řetězců proteinů (Shoemaker & Panchenko 2007). Příkladem může být stavba chaperonu, který se skládá ze sedmi proteinů tvořící homooligomerní komplex. Součástí chaperonu je čepička tvořena sedmi proteiny a také tvořící homooligomerní komplex. Tyto dva komplexy jsou však tvořeny dvěma typy proteinů, a proto jako celek tvoří heterooligomerní komplex.

Dále je uváděno dělení na obligátní a fakultativní typ. Pokud jednotlivé komponenty interakce jsou samy o sobě nestabilní *in vivo*, jedná se o obligátní typ. U fakultativního typu mohou součásti interakce existovat nezávisle (Obr. 6). Vhodným příkladem rozlišujícím tyto dva typy je stavba mikrotubulů dělicího vřeténka. Dimer α a β tubulinu je příkladem obligátního a stabilního komplexu. Po spojení tohoto diméru do dimérů vzniká fakultativní a přechodný komplex (Acuner Ozbabacan et al. 2011, Hyams & Lloyd 1993).



Obr. 6: Diagram základního dělení protein-protein interakcí (upraveno dle Acuner Ozbabacan et al. 2011).

Identifikace protein-protein interakcí je velmi důležitá a pomáhá porozumět komplexnosti proteinové sítě v buňkách. Zmapování interaktomu se tak stalo jedním z hlavních cílů současného výzkumu.

2.2.3 Protein-protein interakce zástupců SDR nadrodiny

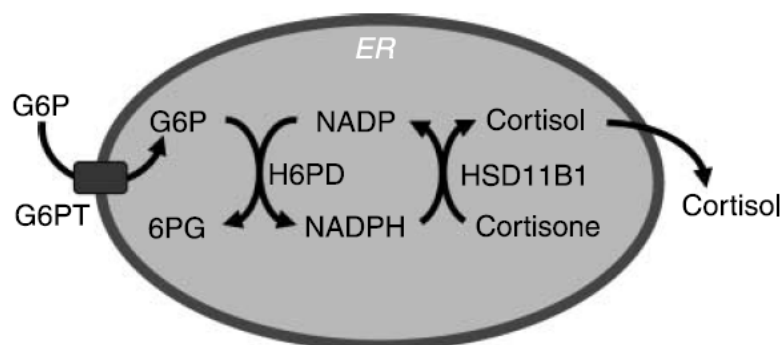
Výzkum protein-protein interakcí u nadrodiny SDR je teprve v začátcích. Jen u pár členů této nadrodiny byly popsány protein-protein interakce, a to pouze metodami *in vitro*. Dvě níže zmíněné interakce poukazují na důležitost výzkumu protein-protein interakcí pro SDR enzymy, i když pro celkové pochopení je zapotřebí další, hlubší výzkum.

2.2.3.1 Protein-protein interakce s 11 β -HSD1

Protein 11 β -HSD1 je zařazen dle svých vlastností do klastru C3 klasického typu nadrodiny SDR. Nachází se v endoplazmatickém retikulu a jeho katalytické místo směřuje do lumen kompartmentu. Tento protein hraje důležitou roli v metabolismu steroidů, a to konkrétně v přeměně neaktivního hormonu kortizonu na aktivní formu kortizol. Jelikož metabolismus kortikoidů hraje podstatnou roli v patogenezi některých onemocnění, jako je například obezita, diabetes mellitus typ 2, ateroskleróza či hypertenze, je důležité přesné porozumění aktivitě enzymu 11 β -HSD1.

V buňce enzym využívá jako kofaktor NADP(H). Jelikož je endoplazmatické retikulum (ER) téměř nepropustné pro NADP(H), předpokládá se, že bude aktivita dehydrogenázy záviset především na jeho dostupnosti. NADP(H) je v ER tvořena pomocí enzymu hexosa-6-fosfát dehydrogenázy (H6PDH) (Obr. 7). Společná koexprese proteinu 11 β -HSD1 a enzymu H6PDH dokázala dvacetinásobně zvýšit aktivitu enzymu, a to ve směru redukce steroidů. Tedy přítomnost H6PDH přes protein-protein interakci stimuluje 11 β -HSD1 reduktázovou aktivitu.

Pomocí metody koimunoprecipitace byla potvrzena protein-protein interakce mezi 11 β -HSD1 a H6PDH, která způsobila zvýšenou produkci kortizolu (Atanasov et al. 2008). Zhang et al. (2009) potvrdil tuto interakci rovněž metodou koimunoprecipitace.

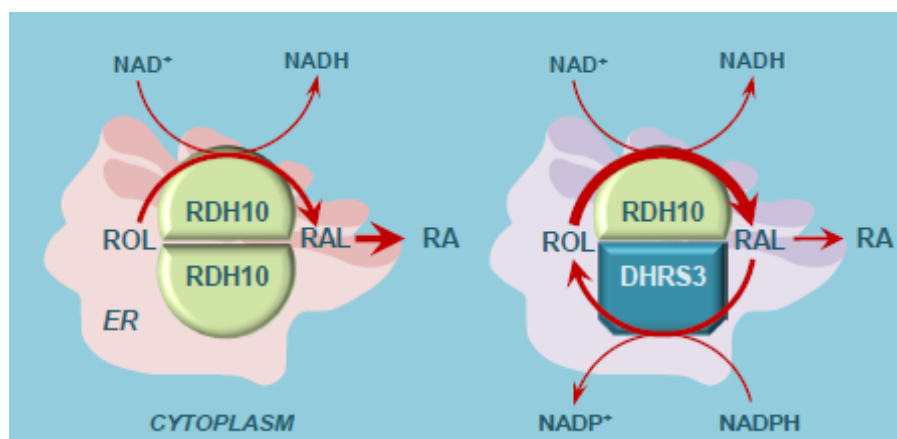


Obr. 7: Schéma procesu v ER. Glukóza-6-fosfát (G6P) je transportován do ER a přeměněn pomocí H6PDH na fosfoglukonát (6PG). Současně se tvoří NADPH, kofaktor, který využívá 11 β -HSD1 pro katalýzu přeměny kortizonu na kortizol (Bánhegyi et al. 2009).

2.2.3.2 Protein-protein interakce s DHRS3

Další zástupce klastru C3 nadrodiny SDR je enzym DHRS3. Jeho funkcí v organismu je redukce all-trans-retinaldehydu na all-trans-retinol. Tato reakce brání přeměně retinaldehydu na aktivní all-trans-retinovou kyselinu, jejíž přítomnost je důležitá v mnoha fyziologických procesech jako je diferenciací buněk.

Samotný enzym DHRS3 připravený v rekombinantní formě má pouze slabou retinaldehyd reduktázovou aktivitu. Ve spojení s retinol dehydrogenázou 10 (RDH 10) dochází k posílení reduktázové aktivity (Obr. 8). Při koexpresi DHRS3 a RDH10 bylo zjištěno dvojnásobné snížení produkce all-trans-retinové kyseliny oproti buňkám se samotnou RDH10. Naopak byl zjištěn přírůstek tvorby retinolu z retinaldehydu, a to pouze v přítomnosti DHRS3 a RDH10. I když nebyla přímo potvrzena protein-protein interakce předpokládá se, že díky kolokalizaci obou enzymů je přítomnost protein-protein interakce pravděpodobná (Adams et al. 2014).



Obr. 8: Schéma přeměny retinolu (ROL) na retinaldehyd (RAL) pomocí retinol dehydrogenázy 10 (RDH10) a její ovlivnění přítomností enzymu DHRS3 (Adams et al. 2014).

2.3 METODY VÝZKUMU PROTEIN-PROTEIN INTERAKCÍ

Existuje velké množství metod, které lze využít pro studium protein-protein interakcí. Tyto metody lze rozdělit do třech velkých kategorií – metody *in vivo*, *in vitro* a *in silico*.

2.3.1 *In vivo* metody

Metody *in vivo* jsou prováděny na celých živých organismech. Výhodou těchto metod oproti metodám *in vitro* je možnost pozorování vztahů v komplexním systému a ne pouze na jeho části (buňce) (Internet 5). Nevýhodou zůstává velká finanční náročnost a značné mezidruhové rozdíly mezi použitými subjekty. Řadí se sem metoda kvasničného dvouhybridního systému a metoda syntetické letality.

2.3.2 *In silico* metody

In silico metody jsou prováděny na počítači nebo simulovány počítačem. Velkou výhodou těchto metod je schopnost testovat velké objemy dat. Nevýhodou je získání velkého množství výsledků, které jsou však z velké části falešně pozitivní. Mezi tyto metody patří:

- přístupy založené na sekvenci
- přístupy založené na struktuře
- blízkost chromozomů
- genová fúze
- *in silico* dvouhybridní systém
- zrcadlový strom
- fylogenetický strom
- přístupy založené na genové expresi

2.3.3 *In vitro* metody

Nejrozsáhlejší, co do počtu metod, jsou metody prováděné *in vitro* neboli ve zkumavce. Takové testy se provádí za kontrolovaných podmínek mimo živý organismus (Rao et al. 2014). Velkou výhodou těchto metod je jejich jednoduchost a finanční nenáročnost oproti metodám *in vivo*. Výsledky těchto metod ale nemusí vždy platit při aplikaci na celý živý organismus. Jsou proto vhodné k predikci protein-protein interakcí, které je třeba následně potvrdit pomocí *in vivo* metod (Internet 5). Řadíme sem následující metody:

- tandemová afinitní purifikace

- separace pomocí afinitních ligandů
- koimunoprecipitace
- metoda pull-down
- proteinový čip
- prezentace proteinu pomocí fágů
- rentgenová krystalografie
- NMR spektroskopie
- otisk proteinu
- chemické síťování bifunkčními činidly
- detekce interakcí s proteiny imobilizovanými na membráně
- přenos rezonance fluorescenční energie

Výběr konkrétní metody pak záleží na předmětu zkoumání, očekávaných výsledcích (prvotní screening, ověření popsaných interakcí či prohloubení znalostí o konkrétní protein-protein interakci), možnostech konkrétní laboratoře a samozřejmě také finančních možnostech.

2.4 PULL-DOWN METODA

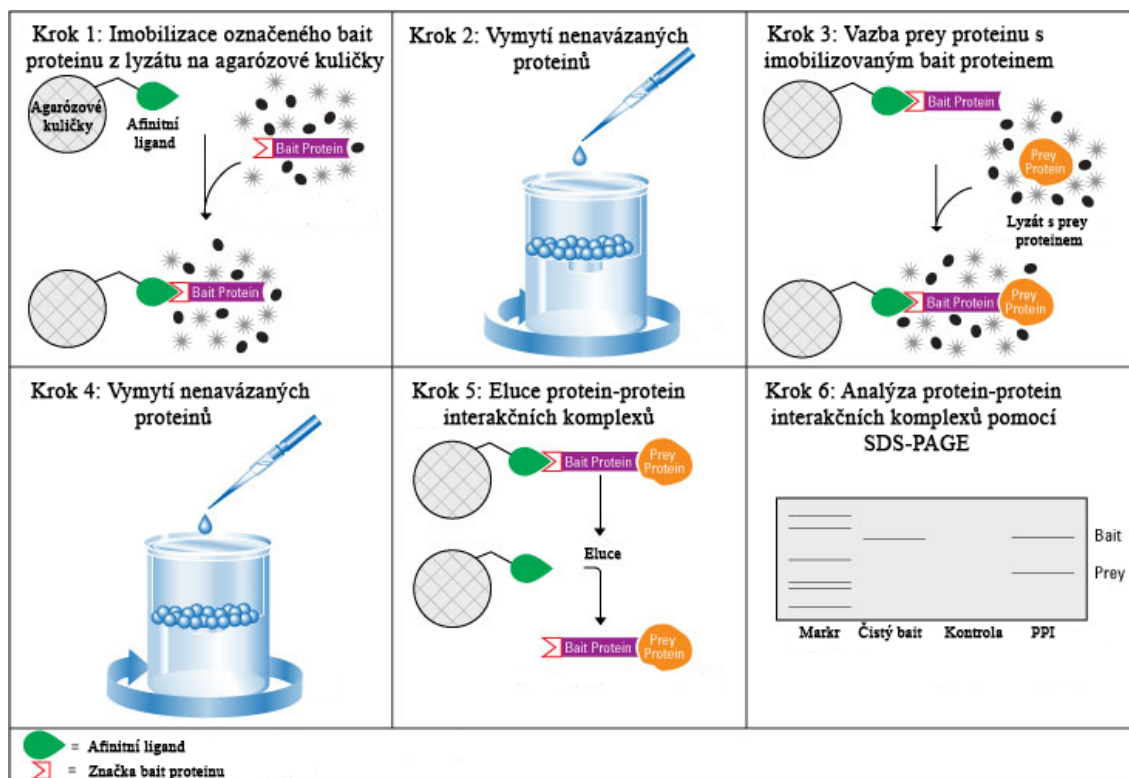
Metoda pull-down patří mezi jednu z mnoha *in vitro* metod, sloužících ke studiu protein-protein interakcí. Zkoumá fyzikální interakce mezi dvěma i více proteiny. Může být využita k potvrzení proteinové interakce zjištěné jinou *in vitro* metodou (např. koimunoprecipitací) nebo ke screeningu potenciálních a doposud neznámých proteinových interakcí. Největší předností této metody je její rychlost a účinnost.

2.4.1 Obecný postup

Spolu s koimunoprecipitací patří tato metoda mezi tzv. afinitní purifikace. Protein, který je objektem výzkumu slouží jako tzv. návnada (bait protein). Takový protein je obvykle připraven ve formě rekombinantního fúzního proteinu s vhodnou specifickou značkou, která umožní jeho navázání na vhodný nosič. Značení návnady podrobněji popisuje kapitola 2.4.2.

Označená návnada je následně ukotvena na nosič (magnetické partikule či agarózové kuličky) pomocí specifické vazby mezi značkou návnady a afinitním partnerem nosiče (viz krok 1, Obr. 9). Konkrétní párování shrnuje kapitola 2.4.2. Po navázání označené návnady na afinitního partnera nosiče je vzorek inkubován s roztokem proteinů, který obsahuje možné interakční partnery, tzv. prey proteiny. Pro tuto interakci se využívá převážně lyzát buněk, obsahující značné množství proteinů (viz krok 3, Obr. 9).

Po inkubaci jsou vzniklé protein-protein komplexy eluovány snížením hodnoty pH nebo použitím redukčních pufrů (viz krok 5, Obr. 9) a dále detekovány pomocí SDS-PAGE a Western Blottingu (viz krok 6, Obr. 9) (Internet 2).



Obr. 9: Obecné schéma pull-down metody (Internet 2).

2.4.2 Návnadové proteiny a jejich značky, afinitní partneři a nosiče

Návnadové proteiny pro pull-down metodu se získávají dvěma způsoby. Nejčastěji pomocí exprese rekombinantních již značených proteinů. Zřídka se používá také přímé navázání značky na purifikovaný protein. Značka návnady se následně váže na afinitního partnera nosiče. Konkrétní párování shrnuje tabulka 1, kde jsou uvedeny nejčastěji používané značky a jejich interakční protějšky.

Tabulka 1: Přehled párování označené návnady a afinitního partnera nosiče (Internet 2).

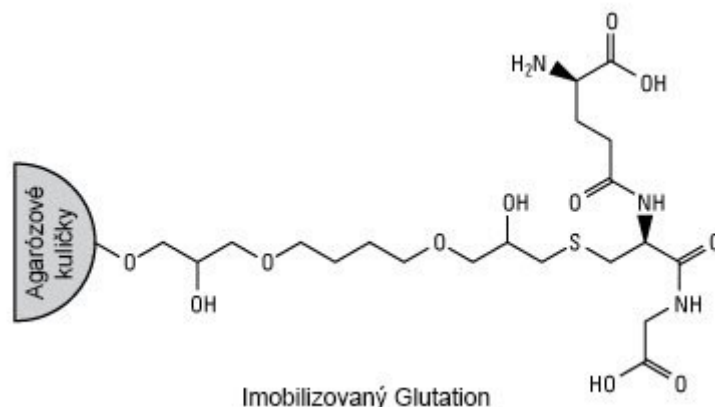
Značka návnady	Afinitní partner
Glutation-S-transferáza	Glutation
Poly-histidin (polyHis nebo 6×His)	Chelátový komplex kobaltu nebo niklu
Biotin	Streptavidin, Avidin

2.4.2.1 Glutation-S-transferáza a glutation

Glutation-S-transferáza (GST) je protein složený z 211 aminokyselin. Jeho DNA sekvence je snadno a často integrována do vektoru a následně využita k produkci rekombinantních proteinů. Výsledkem je protein označen GST tzv. GST-tag protein. Vazba na nosič GST-tag proteinu probíhá pomocí schopnosti transferázy, tedy enzymu, vázat se na jeho substrát glutation (GSH).

GSH je tripeptid složený z aminokyselin cysteinu, glycinu a kyseliny glutamové (Glu-Cys-Gly). Pomocí SH skupiny cysteinu je vázán na nosič (Obr. 10).

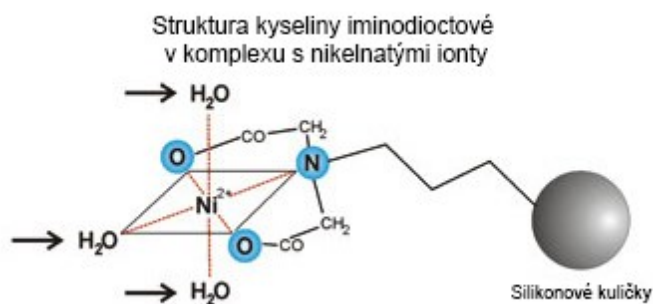
Jelikož aktivita závisí na zachování základní struktury a enzymatické funkce GST, denaturační látky nejsou kompatibilní s touto interakcí.



Obr. 10: Vazba glutathionu na agarózové kuličky (Internet 2).

2.4.2.2 Polyhistidinová značka a ionty kovů

Polyhistidinová značka obsahuje sekvenci 6–10 aminokyselin histidinu v řadě za sebou, které jsou vázány na N- nebo C-konci proteinu. Tento přívěsek je pak velice jednoduše imobilizovatelný na ionty kovů jako je nikl, kobalt nebo měď. Z těchto jmenovaných kovových iontů je právě nikl tou nejlepší volbou poskytující největší kapacitu pro histidinem značené proteiny. Jako chelatační skupina pro ionty kovu se používá nitrilotrioctová kyselina nebo iminodioctová kyselina. Toto celé je v komplexu s nosičem připraveno pro navázání návnady (Obr. 11) (Internet 2).



Obr. 11: Vznik komplexu pro vazbu His-tag proteinu (Internet 4).

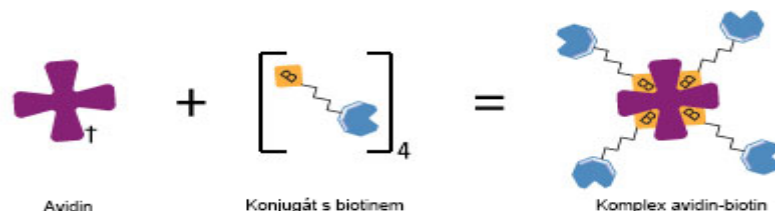
K udržení, promývání a provedení vazby se obvykle používá Tris pufr o pH 7,2 obsahující malou koncentraci imidazolu, která pomáhá předcházet nespecifickým interakcím s endogenními proteiny, které obsahují přirozeně opakující se histidin.

Nekompatibilní s touto interakcí jsou například redukční a oxidační činidla nebo chelátory typu EDTA. Naopak denaturační činidla nevhodná nejsou, a proto pro proteiny, které je nutné použít v denaturované formě, je vhodnější užít polyhistidinovou značku než GST-tag (Internet 2).

2.4.2.3 Biotin a avidin či streptavidin

Interakce mezi biotinem a avidinem nebo streptavidinem je využívána pro detekci a purifikaci jak proteinů, tak nukleových kyselin. Jelikož je označení biotinem stabilní a velikostně malé, jen zřídka narušuje funkci značených molekul. Tato interakce se tím řadí mezi vysoce citlivé a spolehlivé. Výhodou avidin-biotin systému je síla této nekovalentní interakce mezi proteinem a ligandem. Tvorba vazby je velmi rychlá, odolná proti působení extrémních hodnot pH, teplot, organických rozpouštědel nebo jiných denaturačních činidel.

Avidin je protein nacházející se ve vejcích ptáků nebo obojživelníků (Internet 2, 3). Tato látka spolu se streptavidinem nebo neutravidinem má schopnost vázat se na čtyři molekuly biotinu a tím vytvářet interakční komplex vhodný k purifikaci a detekci (Obr. 12).



Obr. 12: Vazba biotinu a avidinu (Internet 2).

2.4.2.4 Nosiče

K imobilizaci návnady jsou používány nosiče jako magnetické partikule, agarózové kuličky a další. Liší se od sebe především náročností manipulace se vzorkem. U magnetických partikulí dojde působením magnetického pole k oddělení partikulí s navázaným interakčním komplexem od zbytku roztoku. Výhodou je tedy velká rychlost separace a nenáročnost. U agarózových kuliček dochází k separaci pomocí sedimentace. Některé typy kuliček dobře sedimentují a práce s nimi je jednoduchá. Jiné mají horší sedimentační schopnosti, je zapotřebí opakovaná centrifugace a tím se práce s nimi značně časově prodlužuje a ztěžuje.

2.4.3 Parametry optimalizace vazby

Po imobilizaci návnady je vzorek inkubován se směsí proteinů, nejčastěji buněčným lyzátem. Doba inkubace je důležitý parametr, který následně ovlivňuje výsledek experimentu. Pokud je zvolena příliš krátká doba inkubace, vznikne malé množství interakčních komplexů, které méně citlivé zobrazovací metody nemusí zachytit. Na druhé straně dlouhá doba inkubace může vést k rozpadu vzniklých interakčních komplexů či k zvýšené tvorbě nežádoucích nesespecifických interakcí. Délka interakce je tedy jedním z parametrů, který je nutné optimalizovat a opakovanými zkouškami docílit vhodné délky inkubační doby.

Dalšími parametry ovlivňujícími kvalitu vzniklých komplexů jsou okolní podmínky jako hodnota pH, přítomnost solí či jejich koncentrace. Během reakce může vznikat řada nesespecifických interakcí. Odstranit je můžeme jednak pomocí několikanásobného promývání vzorků pomocí pufrů a dále také pomocí vhodné zvolené kontroly experimentu. Analyzováno by mělo být každé promytí k pozorování jakéhokoliv uvolněného proteinu (Internet 2).

2.4.4 Eluce a identifikace

Výběr metody eluce se odvíjí od použité návnady. U návnady označené GST je eluce prováděna přidáním redukovaného glutationu, který kompetitivně nahradí imobilizovaný glutation. Biotinová značka s návnadou je eluována kombinací zvýšené teploty za použití etylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA), 95% formamidu, zvýšeného pH či octanu sodného. U polyhistidinové značky s návnadou je nejčastěji prováděna eluce pomocí zvýšené koncentrace imidazolu (nejméně 200 mM). Důležité je vhodné načasování eluce. U přechodných interakcí dochází během reakce k disociaci komplexu a zachycení momentu vazby je velmi náročné. (Internet 2).

K identifikaci vzniklých protein-protein komplexů se nejčastěji používá zobrazovací metoda SDS-PAGE, tedy denaturační elektroforéza za využití polyakrylamidového gelu. K vizualizaci komplexu se používá barvení jako Coomassie blue či stříbření. Pomocí této metody ale neurčíme, zda vzniklé proužky na gelu jsou námi hledané interakce, či jiné nesespecifické interakce. Je proto vždy nutné používat vhodné kontrolní experimenty. K přesnému chemickému určení protein-protein komplexu následuje metoda hmotnostní spektrometrie (MS) (Schechtman et al. 2003).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zavedení *in vitro* metody pull-down pro studium protein-protein interakcí a následně její využití pro studium protein-protein interakcí enzymu DHRS7. Zároveň bylo cílem optimalizovat tuto metodu, aby mohla být využita při dalších experimentech. Tato práce je součástí širšího projektu zabývající se podrobnějším zkoumáním člena nadrodiny SDR – DHRS7.

Cíle práce lze rozdělit:

- Vazba čistého fúzního proteinu DHRS7 označeného polyhistidinovou značkou na vhodný nosič (magnetické partikule, Ni-IDA Protino partikule)
- Optimalizace této vazby
- Vazba DHRS7 z *Sf9* mikrozomů, obsahujících rekombinantní formu proteinu, na nosič
- Potvrzení vazby DHRS7 na nosič pomocí metody Western Blotting
- Inkubace navázaného enzymu DHRS7 (návnady) s buněčným lyzátem Hep G2
- Identifikace elektroforetických pruhů vhodných pro analýzu protein-protein interakcí DHRS7
- Příprava vzorků a identifikace interakčních proteinových partnerů DHRS7 pomocí MS analýzy

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 MATERIÁLY

4.1.1 Nosiče

- His Mag Sepharose Ni (GE Healthcare, USA)
- Protino Ni-IDA Resin (Machery-Nagel, USA)

4.1.2 Protilátky

- Králičí Anti-FLAG protilátka (F7425, Sigma-Aldrich, Německo)
- Prasečí sekundární anti-rabbit protilátka (P0217, Dako, Dánsko)

4.1.3 Enzymy

- Dehydrogenáza/reduktáza člen 7 (DHRS7) (SDR nadrodina)
- Karbonyl-reduktáza člen 1 (CBR1)
- 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenáza 3 (HSD17 β 3)
- *Sf9* mikrozomy s DHRS7
- *Sf9* mikrozomy bez DHRS7

Připraveny na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové

4.1.4 Chemikálie

- 2-merkptoethanol (Dr. Kulich Pharma, Česká Republika)
- Acetonitril (ACN) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Blotovací mléko (Bio-Rad, USA)
- Bromfenolová modř (BFB) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Merck, USA)
- Fomadon LQN (Foma, Česká Republika)
- Fomafix (Foma, Česká Republika)
- Glycerol 85% (Dr. Kulich Pharma, Česká Republika)
- Glycin (Dr. Kulich Pharma, Česká Republika)
- Hydrogenuhlíčan amonný (Penta, Česká Republika)

- Chlorid sodný (Penta, Česká Republika)
- Chlorid vápenatý (Penta, Česká Republika)
- Imidazol(Sigma-Aldrich, Německo)
- Isobutanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Jodoacetamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká Republika)
- Kyselina octová 99% (Penta, Česká Republika)
- Lihomethanol (Penta, Česká Republika)
- Marker molekulových hmotností Protein Precision Plus (Bio-Rad,USA)
- Methanol (Penta, Česká Republika)
- N,N,N',N'- tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Octaethylen glycol monododecyl ether (C12E8) (Fluka, Německo)
- Persíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ponceau S (Fluka, Německo)
- Trifluorooctová kyselina (TFA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Penta, Česká Republika)
- Trypsin pro sekvenování (Promega, USA)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Německo)
- α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)

4.1.5 Přístroje a pomůcky

- Automatické pipety a špičky (Bio-Hit, Německo)
- Blotovací papíry (VWR, USA)
- Centrifuga Mini spin plus (Eppendorf, Německo)
- Elektroforéza Mini-Protean (Bio-Rad, USA)
- Mikrozkušavky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Centrifugační zkumavky, typ Falcon (P-lab, Česká Republika)
- Gel Doc XR (Bio-Rad, USA)
- Kolonky Empore™ C18-SD SPE Cartridges (Supelco, USA)
- Koncentrátor Plus (Eppendorf, Německo)
- Magnetický stojánek
- MALDI destička (AB Sciex, USA)
- Nitrocelulósová blotovací membrána (GE Healthcare, USA)
- Orbitální třepačka (Biosan, Litva)

- Předvážky (Kern, Německo)
- Rotátor (Biosan, Lotyšsko)
- Termomixér Eppendorf Comfort (Eppendorf, Německo)
- Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA)
- Třepačka IKA MS 3 basic (IKA, Německo)
- Ultrazvuková vana UC 005 AJ1 (Tesla, Česká republika)

4.1.6 Zásobní roztoky

4.1.6.1 Pull-down metoda

- 1 M CaCl₂: 0,11 g chloridu vápenatého do 1 ml ultračisté vody
- Ekvilibrační pufr: 0,076 g Tris, 0,183 g NaCl a 0,0085 g imidazolu do 25 ml ultračisté vody, pH 7,4 (HCl)
- Eluční pufr: 0,076 g Tris, 0,183 g NaCl a 0,851 g imidazolu do 25 ml ultračisté vody, pH 7,4 (HCl)
- 1 M imidazol: 0,068 g imidazolu do 1 ml ultračisté vody
- Lyzační pufr: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X, před použitím přidán 1 mM DTT, inhibitory proteas 1:1000, inhibitory fosfatas 50× a 0,5 mM PMSF
- Resuspendační pufr: 0,1 M K-fosfátový pufr, 50 mM KCl, 20% glycerol, pH 7,5 (HCl)
- Solubilizační pufr: 0,127 g Tris, 0,365 g NaCl a 8,25 ml glycerolu do 25 ml ultračisté vody, pH 7,4 (HCl), před použitím byl přidán detergent C12E8
- Promývací pufr: 0,076 g Tris, 0,183 g NaCl a 0,0085 g imidazolu do 25 ml ultračisté vody , pH 7,4 (HCl)

4.1.6.2 Elektroforéza

- 0,5 M Tris-HCl : 6,0 g Tris, pH 6,8 (HCl)
- 1,5 M Tris-HCl: 18,5 g Tris, pH 8,8 (HCl)
- 10% APS: 0,01 g persíranu amonného do 100 µl ultračisté vody
- 10% SDS: 10 g SDS do 80 ml ultračisté vody, bylo doplněno do 100 ml
- 30% roztok akrylamidu: 30,0 g akrylamidu, 0,8 g bis-akrylamidu do 100 ml ultračisté vody
- Elektrodotový pufr (5× koncentrovaný): 15,1 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS, bylo přidáno do 900 ml ultračisté vody, pH 8,3 (HCl), bylo doplněno do 1000 ml

- Fixační roztok: 10 ml koncentrované kyseliny octové, 40 ml methanolu a 50 ml ultračisté vody
- Vzorový pufr (5× koncentrovaný): 1,2 ml ultračisté vody, 5 ml 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, 3,4 ml glycerolu, 1 g SDS, 0,4 ml 0,5% BFB, bylo přidáno 10 µl 2-merkptoethanolu

4.1.6.3 Western blotting

- 0,1% Ponceau S: 0,1 g Ponceau S bylo rozpuštěno ve 100 ml ultračisté vody
- 10% kyselina octová: 10,1 ml kyseliny octové bylo doplněno na 100 ml ultračistou vodou
- 10× koncentrovaný TBS pufr: 24 g Tris a 88 g NaCl bylo rozpuštěno v 900 ml ultračisté vody, pH 7,6 (HCl), roztok byl doplněn do 1000 ml
- 1× koncentrovaný TBS-T pufr : 100 ml 10× koncentrovaného TBS pufru bylo doplněno na 1000 ml ultračistou vodou, byl přidán 1 ml TWEEN 20
- 3% blokovací mléko: 3 g blokovacího mléka bylo rozpuštěno ve 100 ml 1 krát koncentrovaného TBS-T pufru
- 5% blokovací mléko: 5 g blokovacího mléka bylo rozpuštěno ve 100 ml 1 krát koncentrovaného TBS-T pufru
- Blotovací pufr: 1,51 g 25 mM Tris, 7,21 g 192 mM glycinu a 100 ml 20% methanolu bylo doplněno ultračistou vodou na 500 ml (lednice)
- Detekční systém: Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, roztok A byl smíchán s roztokem B v poměru 1:1
- Ustalovač: 15 ml Fomafixu bylo smícháno se 75 ml ultračisté vody
- Vývojka: 6 ml Fomadonu LQN bylo smícháno s 84 ml ultračisté vody

4.1.6.4 Příprava vzorků pro MS

- 10 mM dithiotreitol (DTT): 0,154 mg DTT bylo rozpuštěno ve 100 µl ultračisté vody
- 50 mM hydrogenuhličitan amonný: 39,53 mg hydrogenuhličitanu amonného bylo rozpuštěno v 10 ml ultračisté vody
- 55 mM jodoacetamid: 1,017 mg jodoacetamidu bylo rozpuštěno ve 100 µl ultračisté vody
- Pufr A: 5 ml ACN, 0,1 ml TFA a 94,9 ml ultračisté vody
- Pufr B: 8 ml ACN, 0,01 ml TFA a 1,99 ml ultračisté vody

4.1.7 Gely na SDS-PAGE elektroforézu

- Gradientový gel 0% roztok: 7,5 ml ultračisté vody, 100 μ l 10% SDS, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8, 100 μ l 10% APS a 5 μ l TEMED
- Gradientový gel 20% roztok: 0,73 ml ultračisté vody, 100 μ l 10% SDS, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8, 6,67 ml 30% roztoku akrylamidu, 100 μ l 10% APS a 5 μ l TEMED
- Separační gel 12,5% (1,5 mm): 3,2 ml ultračisté vody, 100 μ l 10% SDS, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8, 4,2 ml 30% roztoku akrylamidu, 100 μ l 10% APS a 5 μ l TEMED
- Zaostřovací gel 4% (1,5 mm): 1,91 ml ultračisté vody, 32 μ l 10% SDS, 782 μ l 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, 406 μ l 30% roztoku akrylamidu, 64 μ l 10% APS a 3,2 μ l TEMED

4.1.8 Pomůcky na vizualizaci Dot Blotu a Western Blottingu

- nitrilové rukavice, nádobka s membránou, 3 nádobky na ultračistou vodu, ustalovač a vývojka, karton potažený folií, pinzeta, papírový ručník, detekční systém s kádinkou, pipeta se 2 špičkami, stopky, folie, osvitová kazeta, červená žárovka, fotofilm, nůžky, vývojka a ustalovač

4.2 METODY

4.2.1 Imobilizace DHRS7 na magnetické partikule

4.2.1.1 Příprava magnetických partikulí

Byla připravena 5% suspenze magnetických partikulí His Mag Sepharose Ni odebráním 20 μl ze zásobní suspenze. Suspenze byla dvakrát promyta 1 ml ekvilibračního pufru. Směs s pufrem byla třepána 1 minutu na rotátoru a umístěním do magnetického stojánku byly následně spolehlivě odděleny partikule od roztoku, který byl odstraněn.

4.2.1.2 Příprava vzorku s DHRS7

Ze zásobního roztoku enzymu DHRS7 o koncentraci 412 $\mu\text{g/ml}$ bylo odebráno 72,8 μl (30 μg). Bylo přidáno 76 μl solubilizačního pufru s 1,2 μl 5% detergentu C12E8 (poměr protein : detergent 1:2). Dále bylo přidáno 150 μl promývacího pufru 1 a 0,75 μl 1 M imidazolu (tabulka 2). Nakonec bylo odebráno z celé vzniklé směsi 10 μl na elektroforézu (SM).

Tabulka 2: Přehled pipetovaných objemů směsi přidávané k magnetickým partikulím His Mag Sepharose Ni.

Složení směsi	Objem (μl)
Enzym DHRS7	72,8
Solubilizační pufre	76
5% detergent C12E8	1,2
Promývací pufre	150
1 M imidazol	0,75

4.2.1.3 Vazba DHRS7 na magnetické partikule a příprava vzorků na SDS-PAGE elektroforézu

Připravené partikule byly smíseny se vzorkem s DHRS7 (4.2.1.2) a nechaly se otáčet v rotátoru v chladicí místnosti o teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny. Po této době byl vzorek umístěn do magnetického stojánku a bylo odebráno 300 μl roztoku tzv. povazebná frakce (PVZ). Partikule byly následně promyty třikrát 1 ml promývacího pufru 1 a po každém promytí byl opět 1 ml odebrán (W1–W3).

Byly připraveny vzorky na elektroforézu odebráním 10 μl PVZ a 35 μl z každého promytí promývacím pufrem 1 (W1, W2 a W3). Do zbylých samotných partikulí bylo

přidáno 50 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru (VP) (40 µl vody a 10 µl VP), vzorek byl ponechán v inkubátoru 5 minut na 95 °C a byl odebrán vzorek na elektroforézu ELU (1,6 µl). Byly připraveny všechny vzorky, tedy SM, PVZ, W1–W3 (tabulka 3), do kterých byl přidán 5× koncentrovaný vzorkový pufr (VP) v poměru 4:1 a všechny vzorky byly ponechány v inkubátoru 5 minut na 95 °C.

Tabulka 3: Objemy vzorků odebíraných k elektroforéze (magnetické partikule).

Vzorky k elektroforéze	Objem (µl)
SM	10
PVZ	10
W1, W2 a W3	35
ELU	1,6

4.2.1.4 SDS PAGE Elektroforéza

Byl připraven 12,5% roztok separačního gelu, který byl nalit mezi dvě speciální skla pro elektroforézu. Po 45 minutové polymeraci byl na separační gel nalit 4% roztok separačního gelu, který byl nechán polymerovat 90 minut. Byla připravena nádoba na elektroforézu, do které byla vložena skla s připraveným gelem, do jehož jamek byly postupně nanášeny vzorky. Nádoba byla naplněna elektrodovým pufrem zředěným 1:5 a vložena do nádoby s ledem. Do první jamky bylo nanášeno 5 µl markeru molekulových hmotností. Postupně do dalších jamek byla nanášena SM, PVZ, W1–W3 a ELU. Všechny jamky byly převrstveny elektrodovým pufrem, kterým byla zaplněna celá nádoba až po značku. Následně byla nádoba uzavřena víkem a na zdroji napětí bylo nastaveno 100 V po dobu 20 minut a následně 170 V po dobu asi 60 minut. Po ukončení elektroforézy byla skla rozevřena a ze získaného gelu odstraněna zaostřovací část.

4.2.1.5 Barvení gelu pomocí barviva Blue Silver

Gel byl přemístěn do krabičky a zalit fixačním roztokem, který byl následně třepán na orbitální třepačce po dobu 30 minut. Roztok byl slit a gel promyt třikrát vodou po dobu 10 sekund a třikrát po dobu 10 minut. Gel byl přelit roztokem Blue Silver a ponechán na orbitální třepačce přes noc. Nakonec byl gel několikrát třepán s vodou do odbarvení gelu a zvýraznění proužků.

4.2.1.6 Vizualizace gelu

Gel byl vložen na desku přístroje Gel Doc XR a pomocí programu Quantity one vizualizován.

4.2.2 Imobilizace DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule

4.2.2.1 Příprava Protino Ni-IDA partikulí

Protino Ni-IDA partikule (200 μ l) byly třikrát promyty 1 ml promývacího pufru 1. Do posledního promytí bylo přidáno 1,5 μ l 5% detergentu C12E8.

4.2.2.2 Solubilizace *Sf9* mikrozomů s rekombinantní lidskou DHRS7

Do jedné kádinky umístěné v ledu bylo dáno 225 μ l *Sf9* mikrozomů s DHRS7 (1,395 mg proteinu), 275 μ l resuspendačního pufru, 71,8 μ l 5% detergentu C12E8 a 428,18 μ l solubilizačního pufru (tabulka 4). Celá směs byla míchána po dobu 45 minut. Byly odebrány vzorky na elektroforézu jak čistých *Sf9* mikrozomů (5 μ l), tak i ze směsi vzniklé po solubilizaci (10 μ l).

Tabulka 4: Složení vzorku k solubilizaci mikrozomů (Protino Ni-IDA partikule).

Složení solubilizace	Objem (μ l)
<i>Sf9</i> mikrozomy s DHRS7	225
Resuspendační pufr	275
5% detergent C12E8	71,8
Solubilizační pufr	428,18

4.2.2.3 Vazba na Protino Ni-IDA partikule

Po solubilizaci bylo přidáno 5 μ l 1 M imidazolu, 3 μ l 3 mM CaCl₂ a promyté Protino Ni-IDA partikule. Směs byla inkubována po dobu 2 hodin v chladícím boxu o teplotě 4 °C a míchána na rotátoru.

Po inkubaci byla odebrána tzv. povazebná frakce (PVZ) a z ní bylo odebráno 10 μ l na elektroforézu. Partikule byly šestkrát promyty promývacím pufr 1, centrifugovány 1 minutu při rychlosti 1000 rpm a následně byly odebrány roztoky nad partikullemi W1–W6. K elektroforéze bylo odebráno 10 μ l W1–W6.

4.2.2.4 Uvolnění z vazby a vizualizace pomocí SDS-PAGE elektroforézy

K partikulím bylo přidáno 300 μl elučního pufru a směs byla míchána 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po promíchání byla směs krátce centrifugována a byly odebrány dva vzorky na elektroforézu E1 (3 μl) a E1' (9 μl).

Dále bylo k partikulím přidáno 100 μl 1 \times koncentrovaného vzorkového pufru. Směs byla 5 minut třepána v termomixéru o teplotě 95 °C. Na elektroforézu byly odebrány partikule E2 (1 μl) a E2' (3 μl).

Všechny vzorky na elektroforézu (tabulka 5) byly doplněny do objemu 10 μl , bylo přidáno 2,5 μl 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru a byly zahřívány v termomixéru po dobu 5 minut o teplotě 95 °C. Nakonec byla provedena SDS-PAGE elektroforéza viz podkapitola 4.2.1.4 až 4.2.1.6.

Tabulka 5: Objemy vzorků odebíraných k elektroforéze (Protino Ni-IDA partikule).

Vzorky k elektroforéze	Objem (μl)
<i>Sf9</i> mikrozomy s DHRS7	5
Směs po solubilizaci	10
PVZ	10
W1–W6	10
E1 a E1'	3 a 9
E2 a E2'	1 a 3

4.2.2.5 Kontrolní partikule

Pro kontrolu byly použity *Sf9* mikrozomy bez DHRS7 a kontrolní partikule s návadou HIS-FLAG peptidem. Bylo smícháno 50 μl *Sf9* mikrozomů bez DHRS7 o koncentraci 36,98 mg/ml (1,85 mg proteinu) s 9,28 μl HIS-FLAG peptidu (92,8 μg). Z této směsi bylo do kádinky odebráno 37,7 μl k solubilizaci. Do kádinky bylo následně přidáno 462,3 μl resuspendačního pufru, 71,8 μl 5% detergentu C12E8 a 428,18 μl solubilizačního pufru. Celá směs byla míchána na ledu po dobu 45 minut. K elektroforéze bylo odebráno 0,54 μl prázdných *Sf9* mikrozomů s peptidem a 0,1 μl samotného peptidu. Dále bylo k elektroforéze odebráno 14,3 μl z roztoku po solubilizaci.

Ke směsi byly přidány 3 μl CaCl_2 a 500 μl promytých protino Ni-IDA partikulí (promývání promývacím pufrem 1 bez imidazolu). Směs byla inkubována v rotátoru 4 hodiny při teplotě 4 °C. Po inkubaci byla odebrána povazebná frakce 14,3 μl .

Partikule byly následně promývány šestkrát po dobu 5 minut promývacím pufrem 1 s 30 mM imidazolem. Po promytí byly partikule krátce centrifugovány (1 minuta a 1000 rpm) a byly odebrány roztoky nad partikulemi W1–W6. Na elektroforézu bylo z těchto roztoků odebráno 14,3 μ l.

Vzorky byly eluovány po dobu 1 hodiny 300 μ l elučního pufrem. Opět byly vzorky krátce centrifugovány a byly odebrány roztoky nad partikulemi. K elektroforéze bylo odebráno E1 4,3 μ l a E1' 13 μ l. Nakonec bylo k partikulím přidáno 100 μ l 1 \times koncentrovaného VP a směs byla třepána v termomixéru 15 minut při teplotě 95 $^{\circ}$ C. K elektroforéze byly odebrány vzorky partikulí E2 1,4 μ l a E2' 4,3 μ l. Ke všem vzorkům pro elektroforézu byl přidán 5 \times koncentrovaný VP a byly ponechány v termomixéru 5 minut při teplotě 95 $^{\circ}$ C.

Na závěr byla provedena elektroforéza s gradientovým gelem a vizualizace dle kapitoly 4.2.1.6.

4.2.2.6 Finální postup pro MS analýzu

Za stejných podmínek byly solubilizovány *Sf9* mikrozomy bez DHRS7 s HIS-FLAG peptidem (kontrolní partikule) a *Sf9* mikrozomy s DHRS7. K elektroforéze byl odebrán vzorek čistých *Sf9* mikrozomů (3,2 μ l) a vzorek *Sf9* mikrozomů bez DHRS7 s HIS-FLAG peptidem (54 μ l mikrozomů smícháno s 4,25 μ l HIS-FLAGU, z toho odebráno 0,58 μ l).

Do jedné kádinky bylo pipetováno 50,2 μ l *Sf9* mikrozomů bez DHRS7 s HIS-FLAG peptidem, 449,8 μ l resuspendačního pufrem, 62,8 μ l 5% detergentu C12E8 a 437,2 μ l solubilizačního pufrem. Do druhé kádinky bylo pipetováno 250 μ l *Sf9* mikrozomů s DHRS7, 250 μ l resuspendačního pufrem, 62,8 μ l 5% detergentu C12E8 a 437,2 μ l solubilizačního pufrem (tabulka 6). Solubilizace byla prováděna po dobu 60 minut na ledu za stálého míchání. Po solubilizaci byly odebrány vzorky na elektroforézu (12,7 μ l).

Tabulka 6: Složení roztoků k solubilizaci mikrozomů (vzorek a kontrola).

Složky solubilizace	Vzorek (μl)	Kontrola (μl)
<i>Sf9</i> mikrozomy	250	50,2
Resuspendační pufr	250	449,8
5% detergent C12E8	62,8	62,8
Solubilizační pufr	437,2	437,2

K obou roztokům byly přidány 3 μl CaCl₂ a 500 μl promytých protino Ni-IDA partikulí (promývání promývacím pufrem 1 bez imidazolu). Směsi byly inkubovány v rotátoru 2 hodiny při teplotě 4 °C. Po solubilizaci byly odebrány povazebné frakce (12,8 μl) a následně byly oba vzorky promývány promývacím pufrem 1 s 30 mM imidazolem. Po každém pětiminutovém promytí byly vzorky krátce centrifugovány a byly odebrány roztoky nad partikulemi. Z těchto roztoků bylo odebráno 12,7 μl W1–W6 k elektroforéze.

Kontrolní partikule i partikule s DHRS7 byly smíseny s 45,7 μl Hep G2 buněk o koncentraci 10921,3 μg/ml (500 μg), 204,3 μl lyzačního pufru a 250 μl promývacího pufru 1 bez imidazolu. Z této směsi byly odebrány vzorky na elektroforézu (20 μl před přidáním partikulí a 20 μl po přidání partikulí). Směs byla následně inkubována v rotátoru po dobu 16 hodin při teplotě 4 °C. Po inkubaci byly partikule promyty 6krát promývacím pufrem 1 bez imidazolu, po každém promytí byly roztoky na partikulemi odebrány a z nich bylo odebráno 40 μl na elektroforézu.

Na závěr byla provedena eluce 300 μl elučního pufru o koncentraci imidazolu 250 mM. Směs byla míchána po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě, vzorky byly krátce centrifugovány a byly odebrány roztoky nad partikulemi. K elektroforéze bylo odebráno 50 μl. Následně bylo k partikulím přidáno 100 μl 1× koncentrovaného VP a směs byla třepána v termomixéru 15 minut při teplotě 95 °C. K elektroforéze bylo odebráno 16,6 μl partikulí. Ke všem vzorkům pro elektroforézu byl přidán 5× koncentrovaný VP a byly ponechány v termomixéru 5 minut při teplotě 95 °C.

4.2.3 Western Blotting

4.2.3.1 Příprava blotovací kazety

Gel získaný po elektroforéze viz 4.2.2.4 byl místo vložení do fixačního roztoku umístěn do nádobky s blotovacím pufrem na dobu 15 minut. Do druhé nádobky byla umístěna blotovací nitrocelulózová membrána podobné velikosti jako gel a do třetí nádobky dva kusy blotovacích papírů také podobné velikosti jako gel.

Po 15 minutách byl na blotovací kazetu vložen jeden blotovací papír a na něj blotovací membrána. Na membránu byl umístěn gel, který byl překryt druhým blotovacím papírem. Takto kompletně připravená kazeta byla vložena do blotovacího přístroje.

4.2.3.2 Blotování

Na blotovacím přístroji Trans-Blot Turbo byl vybrán List, Bio-Rad a 1 mini gel. Byl zvolen Standard SD a Run dle pozice kazety. Blotování probíhalo při napětí 25 V a bylo ukončeno po 30 minutách.

4.2.3.3 Kontrola přenosu proteinů

Membrána byla vložena do nádobky s roztokem 0,1% Ponceau S a barvena po dobu jedné minuty do objevení proužků. Roztok byl následně slit a membrána byla odbarvena 10% kyselinou octovou. Nakonec byla membrána opláchnuta 1× koncentrovaným TBS-T pufrem do odbarvení membrány.

4.2.3.4 Vazba primární protilátky

Membrána byla vložena do centrifugační zkumavky typu Falcon a ponechána hodinu a půl v rotátoru s 2 ml 5% blokovacího mléka. Následně byla membrána promyta třikrát po pěti minutách 5 ml 1× koncentrovaným TBS-T pufrem. Na membránu byly naneseny 2 ml králičí Anti-FLAG protilátky (1:16000 tj. 0,125 µl protilátky a 2 ml 3% blokovacího mléka). Zkumavka s membránou a protilátkou byla umístěna do rotátoru na 16 hodin při teplotě 4 °C. Následně byla membrána promyta třikrát 5 ml 1× koncentrovaným TBS-T pufrem.

4.2.3.5 Vazba sekundární protilátky

Na membránu byla aplikována sekundární prasečí anti-králičí protilátka (1:20000 tj. 0,1 µl protilátky a 2 ml 3% blokovacího mléka). Vše bylo ponecháno rotovat při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hodiny. Membrána byla poté opět promyta třikrát 5 ml 1× koncentrovaným TBS-T pufrem.

4.2.3.6 Vizualizace (v temné komoře)

Byl namíchán detekční systém – roztok A a roztok B v poměru 1:1 (objem vypočítán šířka × výška membrány × 0,05). Membrána byla přenesena na papírový karton a na ni byl nakapán detekční systém. Po 5 minutách inkubace byla membrána zbavena detekčního systému, byla umístěna do fólie a byla vložena do osvitové kazety s filmem.

Fotofilm byl exponován po dobu přibližně 2 minut (dle intenzity skvrn). Následně byla membrána přesunuta do nádoby s vývojkou. Po objevení proužků byla membrána přenesena do nádoby ultračisté vody. Nakonec byla membrána vložena do nádoby s ustalovačem do odbarvení pozadí a poté zpět do nádoby s ultračistou vodou.

4.2.4 Příprava vzorků na MS analýzu

Podmínky – nitrilové rukavice, pracovní deska i laboratorní sklo očištěno lihomethanolem.

4.2.4.1 Štěpení trypsinem

Proužky na elektroforéze, které byly určeny pro MS analýzu, byly vyříznuty z gelu, rozkrájeny na co nejmenší části a vloženy do mikrozkuřavek.

Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l směsi 50 mM hydrogenuhličitanu amonného (60 μ l) s 40% ACN (40 μ l). Směs byla míchána v termomixéru při teplotě 30 °C po dobu 30 minut a poté byl roztok nad gelem odstraněn. Do mikrozkuřavky bylo ke gelu přidáno 100 μ l acetonitrilu, vše bylo mícháno při teplotě 25 °C po dobu 5 minut a při rychlosti 1500 rpm. Opět byl roztok nad gelem odstraněn.

Pro redukcí cysteinů bylo přidáno 100 μ l 10 mM DTT v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném a vše bylo mícháno v termomixéru rychlostí 400 rpm při teplotě 57 °C a po dobu 45 minut. Roztok byl opět odstraněn.

Pro blokování cysteinů bylo přidáno 100 μ l 55 mM jodoacetamidu v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném a znovu bylo vše mícháno v termomixéru po dobu 25 minut a při teplotě 25 °C. Roztok byl následně odstraněn.

Dále bylo ke vzorkům dvakrát přidáno 100 μ l 50 mM hydrogenuhličitanu amonného. Vzorky byly míchány 15 minut při pokojové teplotě v termomixéru a poté byl odstraněn roztok. Ke vzorkům bylo ještě přidáno 100 μ l acetonitrilu, byly 5 minut vortexovány a byl znovu odstraněn roztok.

Nakonec bylo ke vzorku přidáno 10 μ l štěpicího enzymu trypsinu (směs 1 μ l trypsinu a 9 μ l ultračisté vody). Gel byl převrstven 30 μ l 50 mM hydrogenuhličitanu

amonného. Gel byl ponechán přes noc při teplotě 37 °C za občasného promíchání v termomixéru.

Vzorky byly poté centrifugovány a extrahovány na tři výtřepky (40% ACN s 1% TFA, 60% ACN s 1% TFA a 80% ACN s 1% TFA). Extrakce byla prováděna v termomixéru při laboratorní teplotě po dobu 15 minut a rychlostí 1100 rpm. Spojené výtřepky byly odpařeny do sucha.

4.2.4.2 Odsolení vzorků

Odparek byl rozpuštěn v 500 µl pufru A. Kolonky EmporeTM C18-SD SPE Cartridges byly promyty 500 µl methanolu a 500 µl pufru A (5% ACN s 0,1% TFA). Po odkapání byly na kolonky nanесeny vzorky a následně byly kolonky doplněny pufrem A pro spláchnutí vzorků. Odsolený vzorek byl eluován 300 µl pufru B (80% ACN s 0,1% TFA) a eluát byl odpařen do sucha.

4.2.4.3 Nanesení na destičku pro MALDI MS analýzu

Odparek byl rozpuštěn ve 25 µl pufru A. Vzorek (2,5 µl) byl smíchán v poměru 1:1 s matricí (5 mg/ml α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny v 50% ACN s 0,1% TFA). Tato směs byla nanášena na destičku pro MALDI MS analýzu po 0,8 µl.

Vlastní analýza byla provedena PharmDr. Jurajem Lenčem, Ph.D., na Ústavu molekulární patologie a biologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové Univerzity obrany v Brně.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

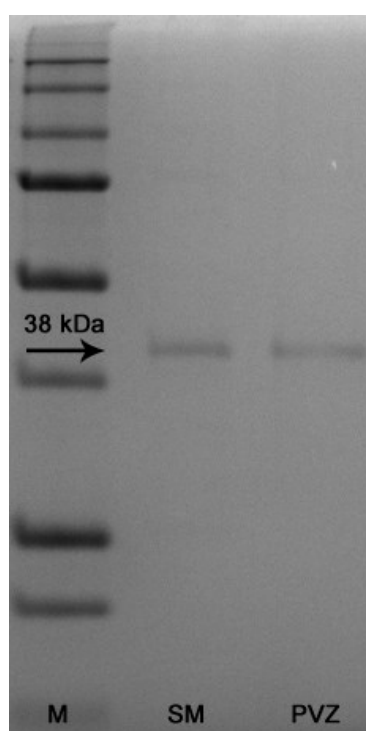
V praxi existuje mnoho metod, kterými lze experimentálně zkoumat protein-protein interakce. Pro tuto práci byla zvolena metoda pull-down. Tato *in vitro* metoda může sloužit jednak k nalezení nových interakčních partnerů, ale také k potvrzení již nalezených partnerů jinou vhodnou metodou. Interakční proteiny enzymu DHRS7 byly na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové již zkoumány metodou koimunoprecipitace. V diplomové práci Mgr. Dominiky Fassmannové bylo objeveno několik potenciálních interakčních partnerů, jako například protein FXR1 ovlivňující vývoj svalové tkáně, protein se zinkovými prsty ZN703 regulující protein p53 nebo 40S ribozomální protein RS12, strukturální složka ribozomů (Fassmannová 2016, str. 64). Vzhledem k tomu, že výsledky takové *in vitro* metody je vždy třeba, kvůli častým falešně pozitivním výsledkům, ověřit jinou metodou, bylo cílem této práce potvrzení těchto již popsanych interakčních partnerů a nebo získání nových pomocí jiné *in vitro* metody – pull-down.

Při zavedení pull-down metody je prvním krokem navázání návnadového proteinu na vybraný nosič. Předmětem našeho výzkumu byl lidský enzym DHRS7 připravený v rekombinantní formě. Součástí tohoto proteinu byly dvě fúzní značky – flag-tag a his-tag. Obě tyto značky byly umístěny za sebou na C-konci molekuly DHRS7. Pro pull-down metodu jsme si tedy mohli vybrat, kterou z těchto značek pro vazbu využijeme. Vzhledem k tomu, že proteiny obsahující his-tag se eluují zvýšenou koncentrací imidazolu (500 mM) (Skarka et al. 2014), bylo vhodné použít tuto značku. Při využití flag-tagu se používá eluce pomocí FLAG peptidu (Internet 9) nebo 3× FLAG peptidu. Použití flag-peptidu přináší následně problémy pro MS analýzu, která je důležitá pro získání výsledků z pull-down metody.

5.1 Magnetické partikule

Pro studium protein-protein interakcí enzymu DHRS7 pomocí pull-down metody jsme zvolili jako nosič magnetické partikule vhodné k vazbě proteinů s histidinovou značkou (His Mag Sepharose Ni), a to především pro jejich snadnou manipulaci. Vzorky s magnetickými partikulami se jednoduše vkládají do magnetického stojánu, pohodlně během chvíle se partikule oddělí od zbylého roztoku, který pak může být odebrán.

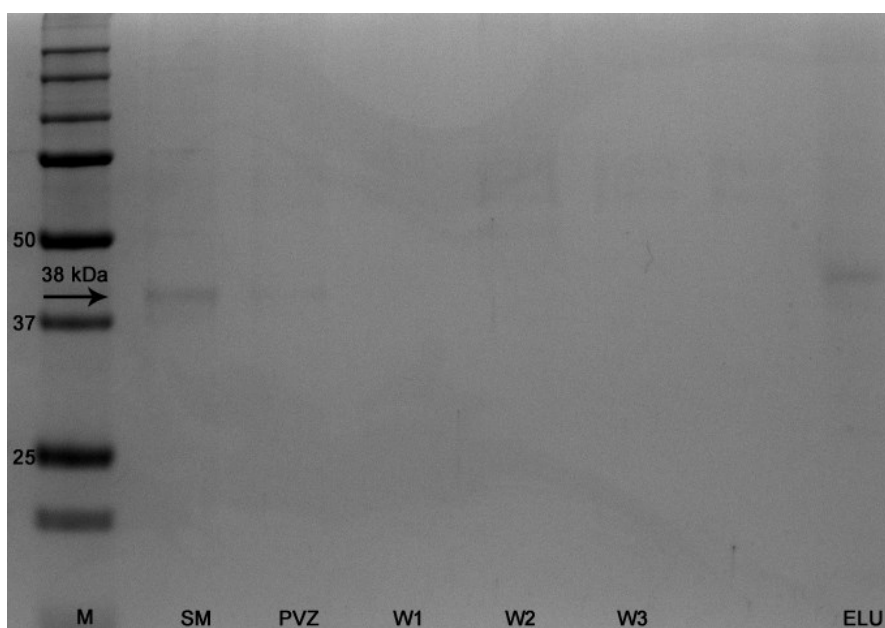
Prvním krokem v pull-down metodě je vazba studovaného tzv. návnadovaného proteinu na nosič. Pro úvodní experimenty byla použita čistá DHRS7 s cílem navázat dostatečné množství proteinu. Použití čistého proteinu umožnilo jednoduchou evaluaci vazby za použití SDS elektroforézy. Úvodní experimenty byly provedeny s 30 μg purifikovaného enzymu DHRS7 a složení vzorku bylo upraveno, aby odpovídalo budoucímu složení vzorku za použití *Sf9* mikrozomů s DHRS7 (přídavek 5% detergentu C12E8). Výchozí podmínky pro prvotní experimenty byly zvoleny podle doporučení výrobce (Internet 7) týkající se koncentrace imidazolu pro vazbu (5 mM), délky inkubace (1 hodina) a množství partikulí (20 μl) dle vazebné kapacity.



Obr. 13: Vazba enzymu DHRS7 na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni, inkubační doba 1 hodina. Legenda: M = marker molekulových hmotností, SM = směs před inkubací s partikulemi, PVZ = povazebná frakce

Z obrázku (Obr. 13) je patrné, že v povazebné frakci zůstává poměrně velké množství enzymu DHRS7 (38 kDa) ze vzorku, což ukazuje na neefektivní vazbu enzymu na partikule. V experimentu bylo použito 20 μl His Mag Sepharose Ni partikulí, které by měly být dle výrobce schopné vázat cca 1 mg proteinu s histidinovou značkou. Ačkoliv toto množství závisí na konkrétním proteinu, v našem případě byla tato teoretická kapacita překročena 30x. Nedostačující vazebná kapacita by tedy neměla být zodpovědná za navázání malého množství enzymu DHRS7 na magnetické partikule.

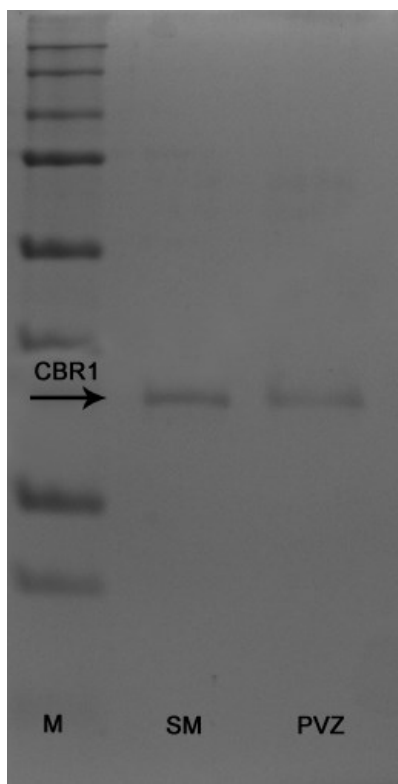
Jedním z parametrů, které je možné změnit, aby bylo dosaženo efektivnější vazby, je čas. Zkoušeli jsme prodloužit dobu inkubace z 1 hodiny na 2 hodiny nebo 16 hodin. Ukázalo se, že prodloužení inkubace partikulí s DHRS7 enzymem nepřineslo výrazné zlepšení vazby. Až po 16 hodinách dochází k navázání téměř celých 30 μg DHRS7 na partikule (v povazebné frakci pozorován jen minimální pruh). Protože 16h vazba by neúměrně prodlužovala dobu celého experimentu, rozhodli jsme se ponechat dvouhodinovou inkubaci a zabývat se optimalizací jiných parametrů (Obr. 14).



Obr. 14: Vazba enzymu DHRS7 na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni, inkubační doba 16 hodin. Legenda: M = marker molekulových hmotností, SM = směs před inkubací s partikulemi, PVZ = povazebná frakce, W1–W3 = promývací frakce, ELU = eluce z partikulí pomocí VP

Pro další experimenty jsme snížili množství enzymu DHRS7 z 30 μg na 20 μg a bylo tedy upraveno složení vzorku, aby byly zachovány poměry jednotlivých složek.

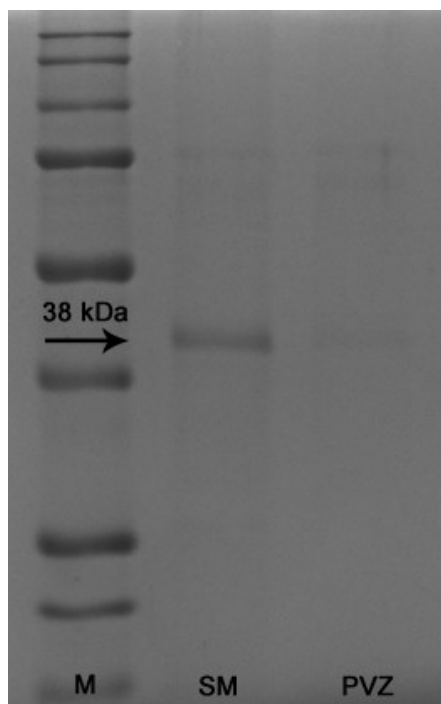
Protože enzym DHRS7 je membránový protein, který vyžaduje pro solubilizaci a purifikaci přítomnost detergentu (Skarka et al. 2014), zajímalo nás, zda jeho přítomnost nemůže negativně ovlivňovat efektivitu vazby. Výrobce His Mag Sepharose Ni žádné informace o interferenci detergentu neuvádí (Internet 7) a pro naše budoucí experimenty s *Sf9* mikrozomy s rekombinantní DHRS7 je jeho přítomnost nezbytná. Proto jsme provedli experiment s použitím cytosolického enzymu ze stejné proteinové nadrodiny, s rekombinantní karbonylreduktasou 1 (CBR1) s his-tagem. Jde o enzym podobné struktury, ale jelikož je jeho buněčná lokalizace v cytosolu, nepotřebuje tento enzym přítomnost detergentu.



Obr. 15: Vazba enzymu CBR1 s his-tagem na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni. Legenda: M = marker molekulových hmotností, SM = směs před inkubací s partikulemi, PVZ = povazebná frakce.

Na obrázku (Obr. 15) je opět vidět silný pruh v povazebné frakci, zdá se tedy, že úplná nepřítomnost detergentu nijak zvlášť neovlivňuje interakci mezi partikulemi a enzymem obsahujícím histidinovou značku.

V rámci optimalizace jsme dále zkoušeli navýšit množství magnetických partikulí z 20 μ l na 100 μ l. Navýšením množství partikulí jsme již dosáhli efektivní vazby čistého enzymu DHRS7 na His Mag Sepharose Ni partikule. V povazebné frakci bylo zcela minimální množství DHRS7 (Obr. 16). Proto jsme přistoupili k vazbě takové, jaká by měla být pro provedení kompletní pull-down metody, tedy s použitím solubilizovaných *Sf9* mikrozomů s DHRS7. Z takového vzorku se nám ale nepodařilo DHRS7 na His Mag Sepharose Ni partikule navázat.



Obr. 16: Vazba enzymu DHR7 na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni (100 μ l partikulí).
Legenda: M = marker molekulových hmotností, SM = směs před inkubací s partikulemi,
 PVZ = povazebná frakce

I přes řadu optimalizací se nám později nepovedlo opakovaně navázat dostatečné množství čistého enzymu DHR7 za daných podmínek. Důvody se nám nepodařilo odhalit. Pravděpodobně byl průběh interakce ovlivněn jinými faktory a navýšení množství magnetických partikulí, a tedy vazebné kapacity, jejich efekt pouze překrylo.

Jedním z faktorů, který by mohl ovlivňovat vazbu na partikule His Mag Sepharose, by mohla být velikost návnadového proteinu. Lidský enzym DHR7 má molekulovou hmotnost 38 kDa. Hara et al. (2017) ve svém výzkumu protein-protein interakcí provedl pull-down metodu s totožnými partikulemi His Mag Sepharose Ni. Jako návnadový protein použil proteoglykan biglycan o molekulové hmotnosti 42 kDa (dle UniProtKB databáze), tedy o podobné molekulové hmotnosti jako enzym DHR7. Tento typ partikulí (His Mag Sepharose Ni) byl úspěšně použit i při jiných experimentech, jako například při purifikaci proteinu vinkulinu (Hagiwara et al. 2014). Tento protein má molekulovou hmotnost 116 kDa, tedy molekulovou hmotnost podstatně větší než DHR7 a i přesto byl protein na partikule úspěšně navázán. Zdá se tedy, že velikost molekuly návnadového proteinu nehraje dominantní roli v efektivitě vazby.

Dalším faktorem hrajícím roli v efektivitě vazby mezi proteinem a partikulemi His Mag Sepharose Ni by mohla být velikost samotných partikulí. Výrobce udává

velikost partikulí v rozmezí 37–100 μm (Internet 7). Větší partikule by tedy mohly stericky bránit menším partikulím v tvorbě vazby s proteiny. Důsledkem tohoto efektu by mohla být snížená vazebná kapacita partikulí a nutnost navýšení výchozího množství partikulí pro docílení efektivní vazby mezi proteinem a nosičem. Tento sterický efekt by mohl vysvětlit úspěšnost námi provedeného experimentu s použitím 100 μl partikulí namísto doporučených 20 μl .

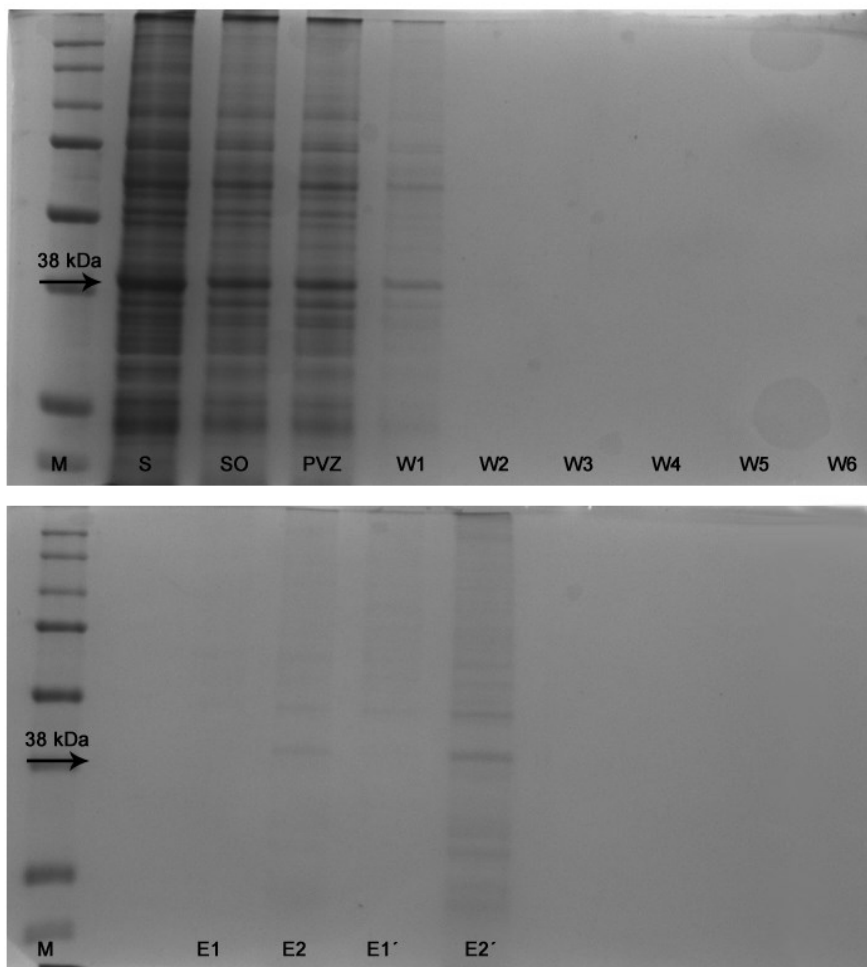
Jelikož je navázání enzymu DHRS7 na partikule nezbytné pro provedení celé pull-down metody, rozhodli jsme se využít jiný nosič a vyzkoušet nemagnetické Protino Ni-IDA partikule. Výhodou těchto partikulí je jejich jednotná velikost (90 μm , Internet 8), pomocí které bychom se mohli vyvarovat možnému sterickému ovlivnění. Také jsou tyto partikule rozměrově větší, proto by mohly lépe tvořit vazbu s enzymem DHRS7. Tyto partikule ale již nejsou magnetické a tedy i práce s nimi je náročnější. Naštěstí tento typ partikulí dobře sedimentuje a k oddělení od roztoku stačí krátké centrifugování (1 minutu při rychlosti 1000 rpm).

5.2 Protino Ni-IDA partikule

V prvotních experimentech jsme opět vycházeli z pokynů výrobce (Internet 8). Pro experimenty jsme již od začátku používali *Sf9* mikrozomy s DHRS7 namísto čistého enzymu DHRS7 (na rozdíl od magnetický His Mag Sepharose Ni). Pipetovali jsme 200 μ l Protino Ni-IDA partikulí, jejichž vazebná kapacita dle výrobce činila 400 μ g proteinu. Jelikož *Sf9* mikrozomy s DHRS7 obsahovali přibližně 200 μ g celkového proteinu, kapacita použitých partikulí pro vazbu his-tag proteinů byla dostačující.

Nejprve byly mikrozomy solubilizovány (Skarka et al. 2014) a následně inkubovány s partikulemi po dobu 2 hodin. Výrobce dobu inkubace uvádí v rozmezí 5–15 minut s poznámkou, že se doba inkubace může lišit protein od proteinu (Internet 8). Tento čas inkubace se nám zdál poněkud krátký, a proto jsme v prvotních experimentech zvolili dobu 2 hodin a tento parametr v dalších experimentech optimalizovali dle získaných výsledků. Po inkubaci jsme promývali partikule pomocí promývacího pufru 1 s imidazolem o koncentraci 5 mM a 30 mM. Vyšší koncentrace imidazolu měla zajistit odstranění případných nespecifických interakcí.

Nakonec jsme provedli eluci elučním puftrem o koncentraci imidazolu 500 mM. Působením dostatečně vysoké koncentrace imidazolu by se měly navázané proteiny s histidinovou značkou uvolnit z partikulí, což by se mělo projevit jako silný pruh v eluci E1. Mechanismus tohoto uvolnění je na principu kompetice vysoké koncentrace imidazolu s nikelnatými ionty partikulí (Internet 8). Tento typ eluce byl uvažován pro finální pull-down experimenty, protože by měl poskytovat méně nespecifických / falešně pozitivních výsledků ve srovnání s elucí elektroforetickým vzorkovým puftrem. I přesto jsme po eluci pomocí imidazolu provedli ještě druhou eluci 1x koncentrovaným vzorkovým puftrem za zvýšené teploty, který by měl všechny i nespecificky navázané proteiny z partikulí odvázat a ukázat, jak je eluce imidazolem specifická. Tento vzorkový pufr obsahuje sloučeninu dodecylsulfát sodný (SDS) – detergent schopný účinně denaturovat proteiny v roztoku (Farell, 2010). Pro zvýšení efektivity denaturace pomocí SDS byla denaturace prováděna za zvýšené teploty 95 °C. Po eluci vzorkovým puftrem jsme k elektroforéze odebírali vzorek partikulí, který by měl ukázat, co všechno zůstalo na partikulích ještě navázáno.



Obr. 17: Vazba *Sf9* mikrozmů s DHRs7 na Protino Ni-IDA partikule s použitím promývacího pufru s 30 mM imidazolem. Legenda: M = marker molekulových hmotností, S = *Sf9* mikrozozy, SO = solubilizované *Sf9* mikrozozy, PVZ = povazebná frakce, W1–W6 = promývací frakce, E1 = eluce z partikulí elučním pufr (3 μ l), E2 = partikule po eluci VP (1 μ l), E1' (9 μ l) a E2' (3 μ l)

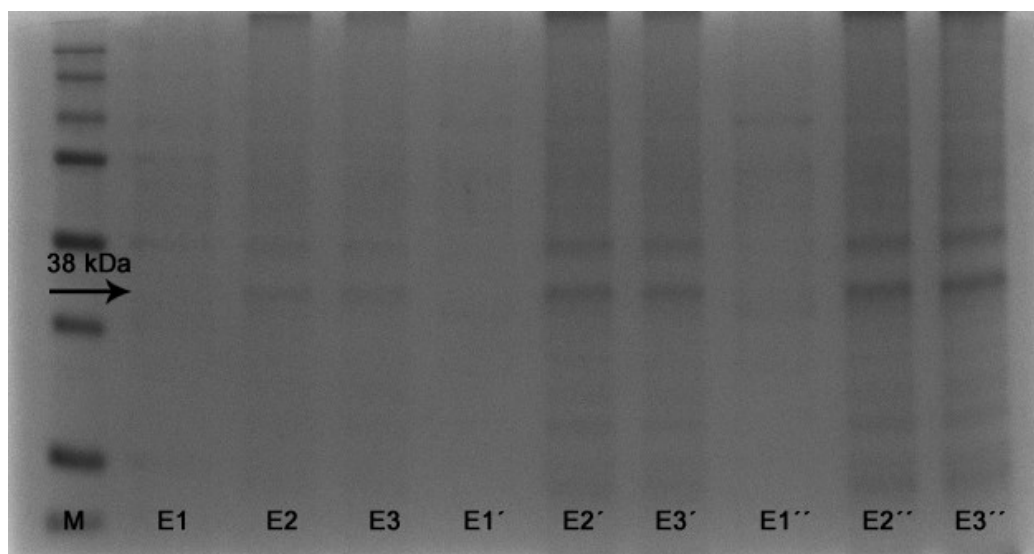
Z obrázku (Obr. 17) je vidět, že v povazebné frakci i v promývací frakci W1 zůstává mnoho nenasázaného enzymu DHRs7. To ukazuje, že se enzym váže na partikule jen v malém množství a zůstává tedy volně v roztoku. Použitím 30 mM imidazolu v promývacím pufru jsme docílili zřetelnějších pruhů v elucích a méně nespecifických interakcí díky jejich odstranění promývacím pufr. V eluci E1 pomocí 500 mM imidazolu nejsou patrné téměř žádné pruhy. V eluci 1 \times koncentrovaným vzorkovým pufr E2 je sice zřetelný pruh odpovídající DHRs7, ale naším cílem bylo získat co nejsilnější pruh v eluci E1, která by zaručovala specifitější eluci a která byla v tomto experimentu ale neefektivní.

Muselo tedy dojít k optimalizaci směrem ke zlepšení eluce elučním pufr s imidazolem. Domnívali jsme se, že navýšením koncentrace imidazolu v elučním pufru

z 500 mM na 1 M eluujeme více proteinů navázaných na partikule a to se projeví jako silnější pruh v eluci E1. Pro zvýšení efektivity eluce jsme ještě prodloužili dobu eluce imidazolem z původních 15 minut na 1 hodinu. Tímto zvýšením koncentrace imidazolu v elučním pufru však nebylo pozorováno zvýšené množství proteinu v eluci E1. Pro lepší vizualizaci jsme vyzkoušeli zvětšit objemy odebrané na elektroforézu, viz tabulka č. 7, abychom předešli problémům s citlivostí metody barvení. Navíc jsme přidali ještě jednu frakci – eluci E3 pomocí 1× koncentrovaného vzorkového pufru a k elektroforéze jsme pipetovali roztok nad partikulemi, tedy stržené proteiny vzorkovým pufrům.

Tabulka 7 : Přehled odebraných objemů k elektroforéze (Protino Ni-IDA partikule).

Rostoucí řada objemů elucí pipetovaných k elektroforéze			
Eluce E1	10 μ l	20 μ l	30 μ l
Eluce E2	2 μ l	5 μ l	10 μ l
Eluce E3	2 μ l	5 μ l	10 μ l

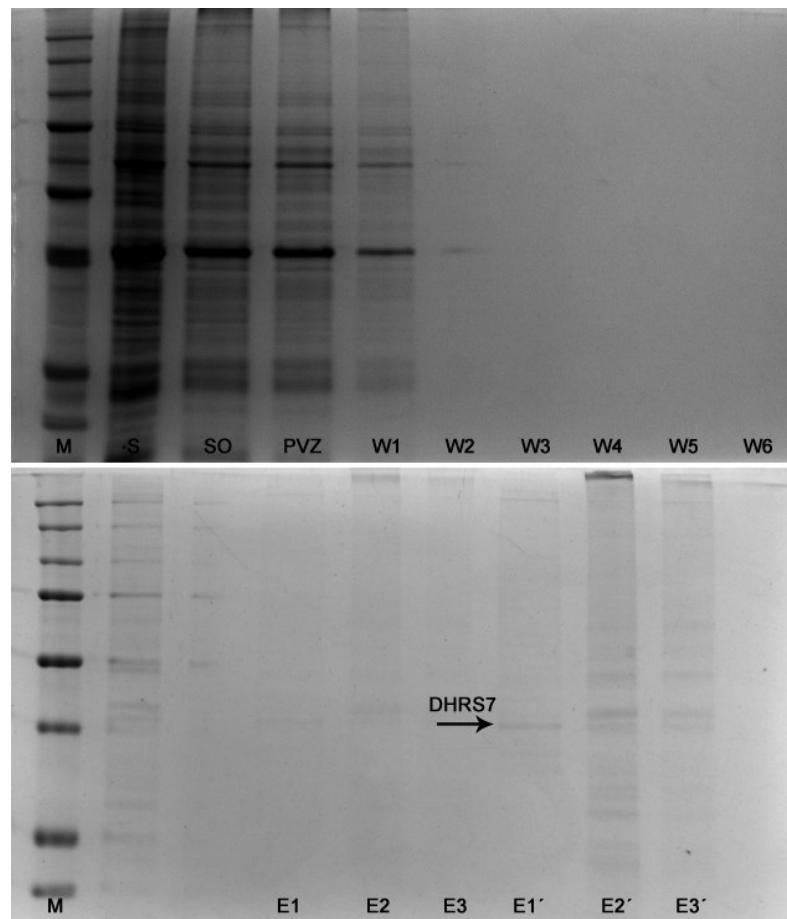


Obr. 18: Násobné objemy elucí pipetované k elektroforéze s použitím elučního pufru s 1 M imidazolem. Legenda: M = marker molekulových hmotností, E1 = eluce z partikulí elučním pufrům (10 μ l), E2 = partikule po eluci VP (2 μ l), E3 = roztok nad partikulemi po eluci VP (2 μ l), E1' (20 μ l), E2' (5 μ l), E3' (5 μ l), E1'' (30 μ l), E2'' (10 μ l), E3'' (10 μ l)

Ani zvýšené množství odebírané k elektroforéze neukázalo výrazný pruh v eluci E1 (Obr. 18). Ukázalo se, že zvýšená koncentrace imidazolu tedy nezlepšuje eluci proteinů s histidinovou značkou, v našem případě tedy DHRS7.

Jelikož vazba enzymu DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule nebyla prozatím dostatečně efektivní (Obr. 17), snažili jsem se tuto vazbu ještě zlepšit. Jedním z potenciálních problémů v efektivitě tvorby vazby mohl být promývací pufr, který jsme v experimentech používali. Výrobce u námi používaného Tris pufru uvádí možnou interferenci s Protino Ni-IDA partikulemi (Internet 8). V rámci jednoho experimentu jsme tedy vyzkoušeli použití fosfátového pufru, který výrobce doporučuje. Výsledky tohoto experimentu ale nepřinesli nic nového, naopak bylo eluováno ještě méně proteinů, a proto jsme se vrátili zpět k Tris pufru.

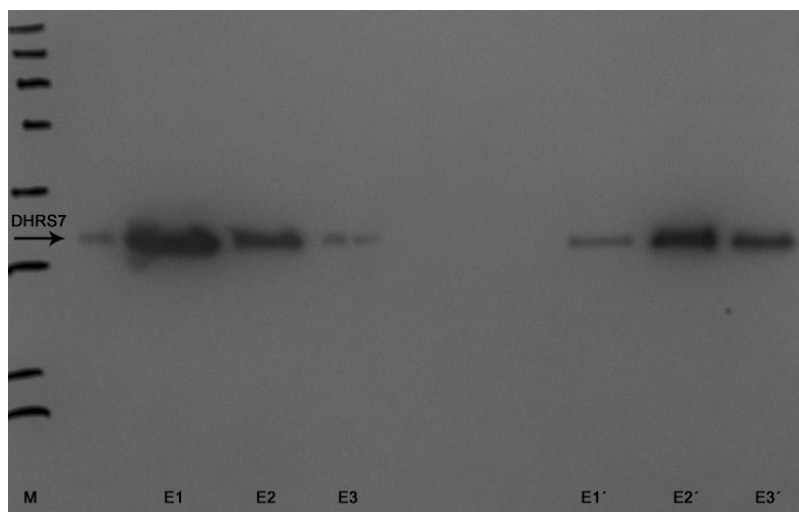
V rámci optimalizace vazby jsme dále zkoušeli vynechat přidání 5 mM imidazolu do promývacím pufru 1, kterým byly prvotně partikule promývány před přidáním k solubilizovaným mikrozomům. Také bylo vynecháno přidání 5 mM imidazolu před přidáním partikulí k solubilizovaným mikrozomům. Výrobce uvádí, že by přítomnost malého množství imidazolu v roztoku s partikulemi mohla interferovat s tvorbou vazby mezi partikulemi a proteiny. Ve výsledku by pak mohlo docházet k zhoršení tvorby této vazby a následné nižší eluci proteinů (Internet 8).



Obr. 19: Vazba *Sf9* mikrozomů s DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule s vynecháním imidazolu před přidáním partikulí k solubilizovaným mikrozomům. Legenda: M = marker molekulových hmotností, S = *Sf9* mikrozomy, SO = solubilizované *Sf9* mikrozomy, PVZ = povazebná frakce, W1–W6 = promývací frakce E1 = eluce z partikulí elučním pufrem (3 μ l), E2 = partikule po eluci VP (1 μ l), E3 = roztok nad partikulemi po eluci VP (1 μ l), E1' (9 μ l), E2' (3 μ l), E3' (3 μ l)

Za těchto podmínek, tedy za vynechání imidazolu před přidáním partikulí k solubilizovaným mikrozomům, se nám již podařilo navázat větší množství enzymu DHRS7 z *Sf9* mikrozomů na Protino Ni-IDA partikule a díky tomu získat v eluci E1 za použití 500 mM imidazolu slabý proužek (Obr. 19). Tím jsme získali pruh v té eluci, která obsahuje méně nespecifických / falešně pozitivních výsledků (E1) a která je pro naše budoucí experimenty výhodnější než eluce 1 \times koncentrovaným vzorkovým pufrem E2.

Přítomnost enzymu DHRS7 v eluci E1 500 mM imidazolem byla následně ověřena metodou Western Blotting. Na nitrocelulózovou membránu s přenesenými proteiny z gelu byla nanášena primární králičí Anti-FLAG protilátka, která se specificky navázala jen na proteiny označené flag-tagem, tedy na DHRS7.



Obr. 20: Western Blotting. Legenda: M = marker molekulových hmotností, E1 = eluce z partikulí elučním pufrem, E2 = partikule po eluci VP, E3 = roztok nad partikulemi po eluci VP

Western Blotting potvrdil vazbu enzymu DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule a přítomnost DHRS7 v eluci elučním pufrem s 500 mM imidazolem E1 (Obr. 20). Nicméně se nám nepodařilo tento experiment s pruhem v eluci E1 zopakovat, i přesto, že jsme zachovaly shodné podmínky. Proto jsme pro další část experimentu využili eluci 1× koncentrovaným vzorkovým pufrem E2. I když jsme v této eluci E2 měli dostatečné množství eluovaného enzymu DHRS7, obsahovala tato eluce velké množství nespecifických interakcí, což nám do budoucna ztěžovalo následnou identifikaci interakčních proteinových partnerů enzymu DHRS7.

5.3 Kontrolní partikule

Vhodně zvolená kontrola experimentu je velmi důležitá s cílem eliminace nescifických/falešně pozitivních výsledků (Internet 2). V rámci kontrolního experimentu jsme použili jiné *Sf9* mikrozomy, a to konkrétně *Sf9* mikrozomy bez DHRS7. Namísto enzymu DHRS7 byl použit HIS-FLAG peptid, který má stejně jako DHRS7 schopnost vázat se na nosič Protino Ni-IDA partikule pomocí polyhistidinové značky.

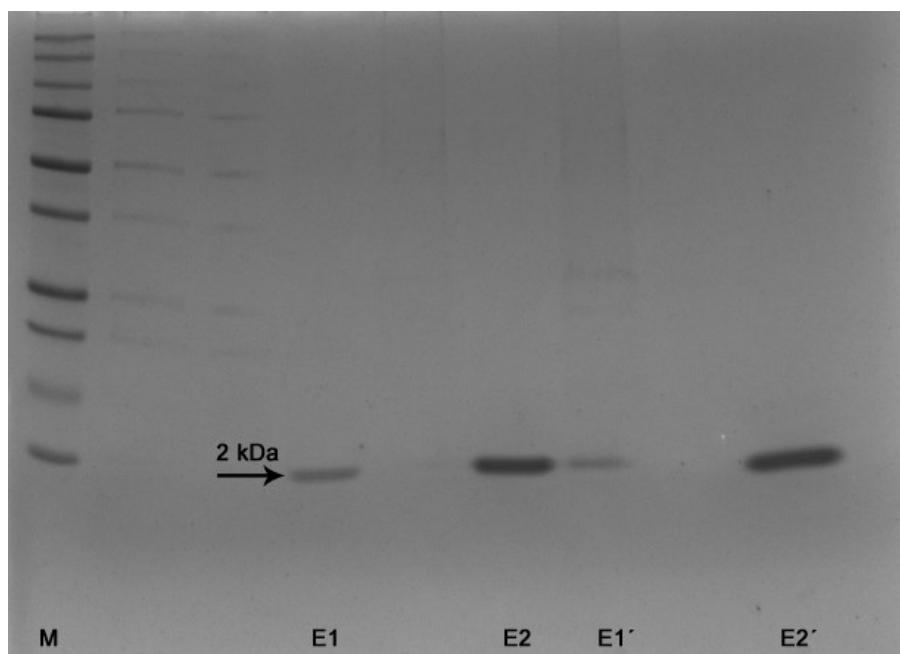
Enzym DHRS7 označený his-tagem a flag-tagem může tvořit jednak specifické interakce přímo mezi DHRS7 a proteinem (námi hledaní interakční partneri), ale i interakce mezi jeho značkou his-tagem (flag-tagem) a proteiny. Tyto interakce mezi tagem a proteiny jsou nescifické a mohly by být považovány za interakční partnery enzymu DHRS7, což nejsou. Proto je potřebné zvolit vhodnou kontrolu, a to konkrétně zjistit, jaké proteiny bude vázat samotný his a flag-tag. V elucích poté pozorujeme rozdíly mezi elucí s enzymem DHRS7 a elucí s HIS-FLAG peptidem a tyto rozdíly se snažíme identifikovat.

Pro tento experiment jsme zvolily stejné podmínky jako pro experiment s *Sf9* mikrozomy s DHRS7, aby mohly být výsledky porovnatelné (oba experimenty prováděny ve stejný čas). Množství pipetovaných mikrozomů bez DHRS7 i HIS-FLAG peptidu byla upravena, aby odpovídala poměrově množství *Sf9* mikrozomů s DHRS7. V experimentu s *Sf9* mikrozomy s DHRS7 jsme pipetovali 225 μ l mikrozomů které obsahují 1,395 mg proteinu. Z tohoto množství je přibližně 5 % enzymu DHRS7 (69,75 μ g). Bylo tedy smícháno 50 μ l *Sf9* mikrozomů bez DHRS7 o koncentraci 36,98 mg/ml (1,85 mg proteinu) s 9,28 μ l HIS-FLAG peptidu (92,8 μ g), což je námi požadovaných 5 %. Dále byly poměrově opraveny objemy roztoků k solubilizaci *Sf9* mikrozomů bez DHRS7, aby odpovídali experimentu s DHRS7 (4.2.2.5).

Použili jsme podmínky získané v rámci optimalizace vazby DHRS7 z *Sf9* mikrozomů na Protino Ni-IDA partikule, tedy:

- promývání čistých Protino Ni-IDA partikulí promývacím pufrem bez imidazolu
- vazba DHRS7 (nyní HIS-FLAG peptidu) bez přítomnosti imidazolu
- promývání partikulí po vazbě promývacím pufrem s 30 mM imidazolem

Pro tento kontrolní experiment jsme prodloužili delší dobu inkubace – 4 hodiny. Po inkubaci vše probíhalo totožně jako u *Sf9* mikrozomů s DHRS7, tedy eluce E1 elučním puforem s 500 mM imidazolem (1 hodina) a eluce E2 1× koncentrovaným vzorkovým puforem (15 minut) (Obr. 21).



Obr. 21: Vazba *Sf9* mikrozomů bez DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule. Legenda: M = marker molekulových hmotností, E1 = eluce z partikulí elučním puforem, E2 = partikule po eluci VP

Z obrázku je patrné, že jsem dosáhl silného pruhu v eluci E2, tedy úspěšné vazby HIS-FLAG peptidu na Protino-Ni IDA partikule. Jelikož má tento peptid nižší molekulovou hmotnost (2 kDa), nachází se pruh v eluci ve spodní části gelu.

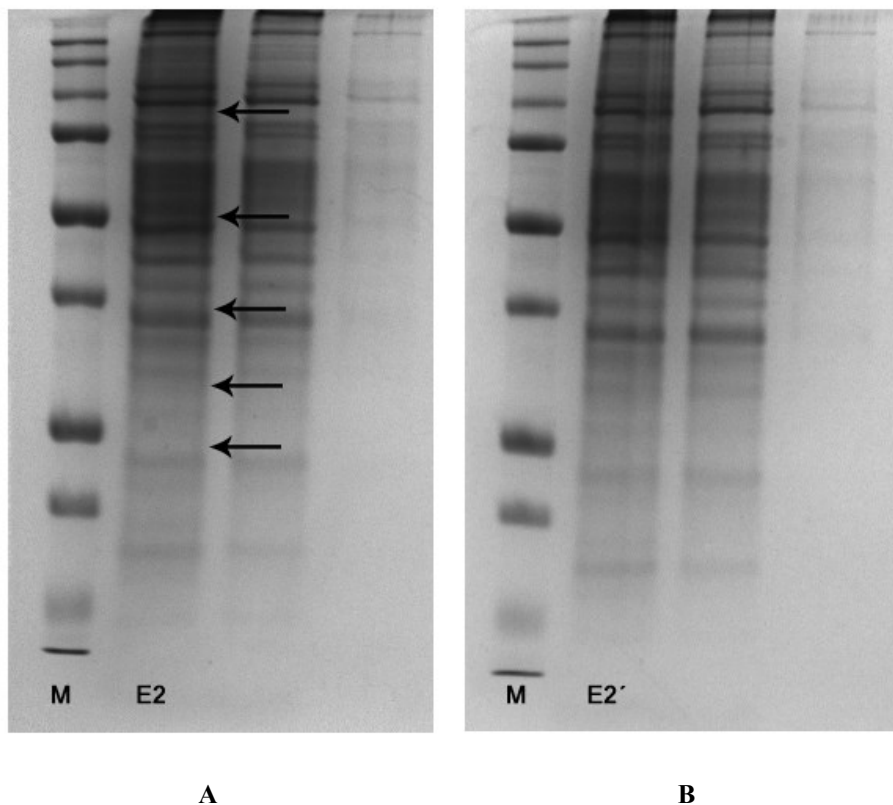
Tento kontrolní experiment byl následně využit k porovnání pruhů v eluci E2 1× koncentrovaným vzorkovým puforem u *Sf9* mikrozomů bez DHRS7 s elucí E2 1× koncentrovaným vzorkovým puforem u *Sf9* mikrozomy s DHRS7 v rámci finální pull-down metody.

5.4 Finální pull-down metoda

V rámci předchozích experimentů se nám podařilo úspěšně navázat enzym DHRS7 z *Sf9* mikrozomů na Protino Ni-IDA partikule. V rámci řady optimalizací se nám také podařilo eluovat dostatečné množství tohoto enzymu elucí 1× koncentrovaným vzorkovým pufrem E2. Dále byly podobným způsobem připraveny vhodné kontrolní partikule nesoucí HIS-FLAG peptid. Kontrolní experiment nám umožňuje porovnat eluční frakce a identifikovat potenciální interakční partnery enzymu DHRS7.

Po celé sérii příprav a optimalizačních kroků jsme tedy mohli přistoupit k finální a kompletní pull-down metodě. Protino Ni-IDA partikule s navázaným proteinem DHRS7 a kontrolní partikule byly inkubovány s lyzátem buněk Hep G2. Tato buněčná linie přirozeně exprimuje enzym DHRS7 a obsahuje tedy jeho potenciální interakční partnery. Inkubace s buněčným lyzátem probíhala 16 hodin a následně byla provedena eluce E2 1× koncentrovaným vzorkovým pufrem. Eluce E2 1× koncentrovaným vzorkovým pufrem obsahuje mimo jiné námi hledané potenciální protein-protein interakce enzymu DHRS7. Je zřejmé (Obr. 22), že eluce obsahuje velké množství proteinů. Aby se dalo určit, které proužky obsahují potenciální proteinové vazebné partnery enzymu DHRS7, byly získané eluce E2 a E2' (kontrolní partikule), připravované za stejných podmínek, porovnány.

Jak ukazuje obrázek 22, našli jsme 5 míst, které se lišili v eluci E2 a E2', tedy obsahovali proužek v eluci E2 (partikule s DHRS7) a nikoliv v eluci E2' (kontrolní partikule).



Obr. 22: Finální pull-down metoda – inkubace s lyzátem buněk Hep G2 (A: *Sf9* mikrozomy s DHRS7 a B: kontrolní partikule s *Sf9* mikrozomy bez DHRS7). Legenda: M = marker molekulových hmotností, E2 = partikule po eluci VP, E2' – kontrolní partikule po eluci VP

Těchto 5 nalezených pruhů nám tedy ukazuje potenciální protein-protein interakce enzymu DHRS7 získané pomocí metody pull-down. K jejich identifikaci je zapotřebí následná hmotností spektrometrie (MS), která umožní identifikaci obsažených proteinů. Proužky jsme tedy z gelu vyřezali a připravili vzorky pro MS analýzu dle postupu 4.2.4.

Bohužel MS analýza neidentifikovala ani v jednom vzorku žádné proteiny. Vzhledem k tomu, že nebyly přítomny ani keratiny, které se ve vzorcích často vyskytují jako kontaminanty, dá se uvažovat o chybě v přípravě vzorků na MS analýzu. Vzhledem k časovým možnostem se již nepodařilo experiment zopakovat. Tudiž se nám nepodařilo potvrdit potenciální interakční partnery lidského enzymu DHRS7 popsané pomocí jiné *in vitro* metody – koimunoprecipitace a ani nalézt případné další interakční partnery. Nicméně byla metoda pull-down pro enzym DHRS7 optimalizována a zavedena na Katedru biochemických věd, kde bude moci být dále využívána.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zavedení *in vitro* metody pro studium interakčních partnerů enzymu DHRS7 – metody pull-down. Podařilo se nám navázat rekombinantní enzym DHRS7 z *Sf9* mikrozomů na námi vybraný nosič Protino Ni-IDA partikule. Tato vazba byla potvrzena metodou Western Blotting. Uskutečnili jsme i kontrolní experiment za použití HIS-FLAG peptidu jako návnadového proteinu. Dále jsme provedli kompletní pull-down metodu inkubací navázaného enzymu na nosič s lyzátem buněk Hep G2. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy jsme získali pět proužků obsahující možné interakční partnery enzymu DHRS7. Bohužel se nám nepodařilo tyto interakční partnery přesně identifikovat pomocí MS analýzy.

Dokázali jsme ale zoptimalizovat nově zaváděnou metodu pull-down s využitím Protino Ni-IDA partikulí pro studium protein-protein interakcí, která může být dále využita při dalších experimentech na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

7 SEZNAM ZKRATEK

11 β -HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy
3 β -HSD	3 β -hydroxysteroiddehydrogenázy
6PG	6-fosfoglukonát
ACN	acetonitril
APS	persíran amonný
BFB	bromfenolová modř
C12E8	octaethylen glycol monododecyl ether
CaCl ₂	chlorid vápenatý
CBR	karbonyl-reduktázy
Cys	cystein
DHRS	dehydrogenázy/reduktázy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELU (E)	eluce
ER	endoplazmatické retikulum
FLAG	octapeptidová sekvence
G6P	glukóza-6-fosfát
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
GSH	glutation
GST	glutation-S-transferáza
H6PDH	hexosa-6-fosfát dehydrogenáza
HCl	chlorovodíková kyselina
Hep G2	buněčná linie lidských hepatocytů
KCl	chlorid draselný
kDa	kilodalton
M	marker molekulových hmotností
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	hmotnostní spektrometrie
NaCl	chlorid vápenatý
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid

NADP(H)	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PPAR γ	receptor gama aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
PVZ	povazebná frakce
RAL	retinaldehyd
RDH 10	retinol-dehydrogenáza 10
ROL	retinol
S	<i>Sf9</i> mikrozomy s DHRS7
S2	<i>Sf9</i> mikrozomy bez DHRS7
SDR	dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
<i>Sf9</i>	hmyzí buněčná linie z ovariálních buněk <i>Spodoptera frugiperda</i>
SM	směs před inkubací s partikulami
SO	solubilizované <i>Sf9</i> mikrozomy
TBS-T	tris-buffered saline wash buffer with Tween 20
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VP	vzorkový pufr
W	promývací frakce

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	
Přehled párování označené návnady a afinitního partnera nosiče	17
Tabulka 2	
Přehled pipetovaných objemů směsi přidávané k magnetickým partikulím His Mag Sepharose Ni	27
Tabulka 3	
Objemy vzorků odebíraných k elektroforéze (magnetické partikule)	28
Tabulka 4	
Složení vzorku k solubilizaci mikrozomů (Protino Ni-IDA partikule)	29
Tabulka 5	
Objemy vzorků odebíraných k elektroforéze (Protino Ni-IDA partikule)	30
Tabulka 6	
Složení roztoků k solubilizaci mikrozomů (vzorek a kontrola)	32
Tabulka 7	
Přehled odebraných objemů k elektroforéze (Protino Ni-IDA partikule)	44

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1

Struktura zástupce SDR nadrodiny – β -list sendvičově vložený mezi tři α -šroubovice na každé straně, fialově znázorněn koenzym a modře konzervované aminokyseliny v aktivním místě, tzv. katalytická tetráda 5

Obrázek 2

Diagram rozdělení nadrodiny SDR do 7 typů 6

Obrázek 3

Schematický diagram zástupců SDR nadrodiny nalezených v lidském organismu se zaměřením na sekvenční vztahy mezi vybranými třemi typy – klasický, prodloužený a atypický. Krátká větev ukazuje na blízké homology, zatímco delší větev na vzdálenější evoluční vztah 7

Obrázek 4

Příklady struktur s červeně vyznačenou karbonylovou skupinou, metabolizovaných lidskou DHRS7 (a. 1,2-naftochinon, b. androsten-3,17-dion a c. all-trans retinal) 8

Obrázek 5

Analýza exprese DHRS7 na úrovni proteinu v lidských tkáních 9

Obrázek 6

Diagram základního dělení protein-protein interakcí 11

Obrázek 7

Schéma procesu v ER. Glukóza-6-fosfát (G6P) je transportován do ER a přeměněn pomocí H6PDH na fosfoglukonát (6PG). Současně se tvoří NADPH, kofaktor, který využívá 11 β -HSD1 pro katalýzu přeměny kortizonu na kortizol 13

Obrázek 8

Schéma přeměny retinolu (ROL) na retinaldehyd (RAL) pomocí retinol dehydrogenázy 10 (RDH 10) a její ovlivnění přítomností enzymu DHRS3 13

Obrázek 9

Obecné schéma pull-down metody 17

Obrázek 10	
Vazba glutationu na agarózové kuličky	18
Obrázek 11	
Vznik komplexu pro vazbu His-tag proteinu	18
Obrázek 12	
Vazba biotinu a avidinu	19
Obrázek 13	
Vazba enzymu DHRS7 na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni, inkubační doba 1 hodina	37
Obrázek 14	
Vazba enzymu DHRS7 na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni, inkubační doba 16 hodin	38
Obrázek 15	
Vazba enzymu CBR1 s his-tagem na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni	39
Obrázek 16	
Vazba enzymu DHRS7 na magnetické partikule His Mag Sepharose Ni (100 μ l partikulí)	40
Obrázek 17	
Vazba <i>Sf9</i> mikrozomů na Protino Ni-IDA partikule s použitím promývacího pufru s 30 mM imidazolem.....	43
Obrázek 18	
Násobné objemy elucí pipetované k elektroforéze s použitím elučního pufru s 1 M imidazolem	44
Obrázek 19	
Vazba <i>Sf9</i> mikrozomů na Protino Ni-IDA partikule s vynechání imidazolu před přidáním partikulí k solubilizovaným mikrozomům	46
Obrázek 20	
Western Blotting	47

Obrázek 21

Vazba *Sf9* mikrozmů bez DHRS7 na Protino Ni-IDA partikule 49

Obrázek 22

Finální pull-down metoda – inkubace s lyzátem buněk Hep G2 (A: *Sf9* mikrozozy s DHRS7 a B: kontrolní partikule s *Sf9* mikrozozy bez DHRS7) 51

10 POUŽITÁ LITERATURA

- Acuner Ozbabacan, S. E., Engin, H. B., Gursoy, A., & Keskin, O. (2011). Transient proteinprotein interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(9), 635–648.
- Adams, M. K., Belyaeva, O. V., Wu, L., & Kedishvili, N. Y. (2014). The retinaldehyde reductase activity of dhars3 is reciprocally activated by retinol dehydrogenase 10 to control retinoid homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14868–14880.
- Araya, S., Kratschmar, D. V., Tsachaki, M., Stücheli, S., Beck, K. R., & Odermatt, A. (2017). DHRS7 (SDR34C1) – A new player in the regulation of androgen receptor function by inactivation of 5 α -dihydrotestosterone? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 171(March), 288–295.
- Atanasov, A. G., Nashev, L. G., Gelman, L., Legeza, B., Sack, R., Portmann, R., & Odermatt, A. (2008). Direct protein-protein interaction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(8), 1536–1543.
- Bánhegyi, G., Csala, M., & Benedetti, A. (2009). Hexose-6-phosphate dehydrogenase: Linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(4), 283–289.
- Bray, J. E., Marsden, B. D., & Oppermann, U. (2009). The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), 99–109.
- De Las Rivas, J., & Fontanillo, C. (2010). Protein-protein interactions essentials: Key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Computational Biology*, 6(6), 1–8.
- Farrell, R. E. (2010). Resilient Ribonucleases. *RNA Methodologies*, 155–172.
- Fassmannová Dominika (2016): Koimunoprecipitace jako nástroj pro studium interakcí enzymu DHRS7 s proteiny, str. 64.

- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., ... Oppermann, U. (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25677–25684.
- Haeseleer F. Palczewski K. Short-chain dehydrogenases/reductases in retina. *Methods Enzymol.* 2000;316:372–383.
- Hagiwara, M., Kokubu, E., Sugiura, S., Komatsu, T., Tada, H., Isoda, R., ... Matsushita, K. (2014). Vinculin and Rab5 complex is required for uptake of *Staphyrococcus aureus* and interleukin-6 expression. *PLoS ONE*, 9(1), 1–13.
- Hara, T., Yoshida, E., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Kumagai, Y., & Kaji, T. (2017). Biglycan Intensifies ALK5–Smad2/3 Signaling by TGF- β 1 and Downregulates Syndecan-4 in Cultured Vascular Endothelial Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(5), 1087–1096.
- Hyams, J.S. and Lloyd, C.W. (1993) *Microtubules, Modern Cell Biology*. Wiley-Liss, New York.
- Jeong, H., Mason, S. P., Barabasi, A. L., Oltvai, Z. N., *Nature* 2001, 411, 41–42.
- Jiao, Li, Zhen Deng, Chuanliang Xu, et al. (2014). MiR-663 Induces Castration-Resistant Prostate Cancer Transformation and Predicts Clinical Recurrence. *Journal of Cellular Physiology*, 229(7), 834–844.
- Jörnvall, H., Persson, M., & Jeffery, J. (1981). Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), 4226–4230.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., & Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *European Journal of Biochemistry*, 269(18), 4409–4417.
- Keildson, S., J. Fadista, C. Ladenvall, et al. (2014). Expression of Phosphofructokinase in Skeletal Muscle Is Influenced by Genetic Variation and Associated With Insulin Sensitivity. *Diabetes*, 63(3), 1154–1165.

- Landi, M. T., Dracheva, T., Rotunno, M., Figueroa, J. D., Liu, H., Dasgupta, A., ... Jen, J. (2008). Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PLoS ONE*, 3(2).
- Liao, Bing M., Katy Raddatz, Ling Zhong, Benjamin L. Parker, Mark J. Raftery a Carsten Schmitz-Peiffer. Proteomic analysis of livers from fat-fed mice deficient in either PKC δ or PKC ϵ identifies Htip2 as a regulator of lipid metabolism (2014). *PROTEOMICS*, 14(21-22), 2578–2587.
- Lodhi, I. J., Yin, L., Jensen-urstad, A. P. L., Funai, K., Coleman, T., Baird, H., ... Semenkovich, C. F. (2013). *NIH Public Access*, 16(2), 189–201.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., ... Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): The 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 143–144, pp. 247–253).
- Persson, B., & Kallberg, Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions*, 202(1-3), 111–115.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J. E., Bruford, E., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., ... Oppermann, U. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), 94–98.
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014(ii), 1–12.
- Sato, Y., Koshioka, S., Kirino, Y., Kamimoto, T., Kawazoe, K., Abe, S., ... Nakahori, Y. (2011). Role of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) in the development of dyslipidemia: DPP4 contributes to the steroid metabolism pathway. *Life Sciences*, 88(1–2), 43–49.
- Seibert, J. K., Quagliata, L., Quintavalle, C., Hammond, T. G., Terracciano, L., & Odermatt, A. (2015). A role for the dehydrogenase DHRS7 (SDR34C1) in prostate cancer. *Cancer Medicine*, 4(11), 1717–1729.

- Shoemaker, B. A., & Panchenko, A. R. (2007). Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. *PLoS Computational Biology*, 3(3), 0337–0344.
- Schechtman D., Mochly-Rosen D., Ron D. (2003) Glutathione S-Transferase Pull-Down Assay. In: Newton A.C. (eds) Protein Kinase C Protocols. *Methods in Molecular Biology™*, vol 233. Humana Press
- Skarka, A., Škarydová, L., Štambergová, H., & Wsól, V. (2014). Purification and reconstitution of human membrane-bound DHRS7 (SDR34C1) from Sf9 cells. *Protein Expression and Purification*, 95, 44–49.
- Stambergova, H., Skarydova, L., Dunford, J. E., & Wsol, V. (2014). Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chemico-Biological Interactions*, 207(1), 52–57.
- Štambergová, H., Zemanová, L., Lundová, T., Malčková, B., Skarka, A., Šafr, M., & Wsól, V. (2016). Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 112–119.
- Treves, S., Thurnheer, R., Mosca, B., Vukcevic, M., Bergamelli, L., Voltan, R., ... Zorzato, F. (2012). SRP-35, a newly identified protein of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a retinol dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 441(2), 731–741.
- Zhang, Y. ling, Zhong, X., Gjoka, Z., Li, Y., Stochaj, W., Stahl, M., ... Suri, V. (2009). H6PDH interacts directly with 11 β -HSD1: Implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(1), 45–54.

INTERNETOVÉ ZDROJE

Internet 1: Databáze objevených zástupců SDR nadrodiny

<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=SDR&sort=score>

Internet 2: Pull-down metoda

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/pull-down-assays.html>

Internet 3: Avidin

<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/antibody-products.html?TablePage=9674538>

Internet 4: Vznik komplexu nikelnatých iontů, kyseliny iminodioxtové a silikonových kuliček

<https://www.bioke.com/blobs/Plaatjes/MN/Protino/Structure-of-IDA.jpg>

Internet 5: Metody *in vivo*, *in vitro* a *in silico*

https://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies

Internet 6: Protein-protein interakce

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-protein-interaction-analysis.html>

Internet 7: His Mag Sepharose Ni - příbalový leták

https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/magsepharose_ni.pdf

Internet 8: Protino Ni-IDA partikule - příbalový leták

http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Protino/UM_ProtinoNi-IDA.pdf

Internet 9: Flag peptid

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f3290?lang=en®ion=CZ>