UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

KOIMUNOPRECIPITACE JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM INTERAKCÍ ENZYMU DHRS7 S PROTEINY

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Dominika Fassmannová

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.“

V Hradci Králové dne 15.5.2016 …….

PODĚKOVÁNÍ

„Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D. za mnoho odborných a cenných rad, ochotu, trpělivost a drahocenný čas v průběhu vypracování diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Dominika Fassmannová

Školitel: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Název diplomové práce: Koimunoprecipitace jako nástroj pro studium interakcí enzymu DHRS7 s proteiny

DHRS7 enzym je člen nadrodiny enzymů dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem. Enzym se *in vitro* chová jako NADPH-dependentní reduktáza s katalytickou aktivitu pro některé endogenní sloučeniny obsahující karbonylovou skupinu, zahrnující androstendion nebo trans-retinal. Vykazuje také úzkou homologii s enzymem 11β-hydroxysteroiddehydrogenáza 1. Fyziologická funkce DHRS7 je zatím neznámá a úroveň poznání enzymu velmi nízká. V poslední době se objevují informace o roli DHRS7 v některých onemocnění, např. v rakovině prostaty nebo v inzulínové rezistenci. Role málo charakterizovaného enzymu DHRS7 může být poodhalena na základě znalosti jeho interakčních partnerů, protože proteiny v buňce obvykle nepracují samy, ale jsou součástí obrovského proteinového komplexu, označeného jako „interactome“. Poznání takových interakcí nám pomáhá porozumět funkci a regulaci proteinů uvnitř buněk nebo organismu.

Cílem této studie je výzkum proteinů interagujících s DHRS7 pomocí metody koimunoprecipice. Imunoprecipitace byla zavedena s využitím dostupné protilátky proti DHRS7 a čistého enzymu DHRS7 a následně optimalizovaná. Pro koimunoprecipitaci byl použit předčištěný buněčný lyzát HeLa, ve kterém dochází k expresi zkoumaného enzymu. Imuoprecipitovaný DHRS7 s potenciálním interakčním partnerem byl eluován pomocí 8 M močoviny z partikulí s proteinem G. Proteiny byly analyzovány pomocí LC-MS. Identifikováno bylo několik poteinciálních interakčních partnerů enzymu DHRS7, tyto výsledky je ovšem nutné potvrdit dalším výzkumem.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Dominika Fassmannová

Supervisor: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Co-immunoprecipitace as a tool for the study of protein-protein interactions of DHRS7 enzyme

DHRS7 enzyme is a member of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. The enzyme is at least *in vitro* NADPH-dependent reductase of some substance bearing carbonyl group, including androstenedione or all-trans retinal. DHRS7 is close homolog of well-known 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1. Physiological function of DHRS7 is unknown, the level of the knowledge is quite low. Recently, information about some role of DHRS7 in diseases as prostate cancer or insulin resistance was published. A role of poorly characterized proteins as DHRS7 can be predicted based on evidence of their interaction with a protein with revealed function, because proteins inside cells do not usually work alone, they are part of a huge protein complex known as interactome. Knowledge of such protein-protein interactions help us to understand the function and regulation of the protein inside a cell or organism.

The aim of the study is initial investigation of proteins interacting with DHRS7 by co-immunoprecipitation, a basic method for study of protein-protein interactions. Immunoprecipitation procedure with available anti-DHRS7 antibody and pure DHRS7 was introduced to our workplace and optimised. Precleared HeLa cell lysate, where DHRS7 is naturally expressed, was used for study of protein-protein interactions of the enzyme. Imunoprecipitated DHRS7 with potential interaction partners was eluted form protein G particles by 8 M urea and proteins were analyzed by LC-MS. Several proteins were identified as potential interacting partners of DHRS7, the results are necessary to confirm by diverse methods.

OBSAH

A. Úvod **4**

B. Teoretická část **5**

1. Protein-protein interakce **5**

1.1 Typy interakcí proteinů 6

1.1.1. Stabilní a přechodné protein-protein interakce 6

1.1.2. Obligatorní a fakultativní interakce proteinů 7

1.2. Metody detekce protein proteinových interakcí 8

1.2.1. Koimunoprecipitace 8

1.2.1.1. Antigen 9

1.2.1.2. Protilátka 10

1.2.1.3. Faktory ovlivňující úspešnost koimunoprecipitace 11

1.2.1.4. Metody používané pro vyhodnocení koimunoprecipitace 12

2. DHRS7 ..... **19**

2.1. Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) 19

2.2. Vlastnosti DHRS7 20

2.3. Role DHRS7 v organismu 21

C. Cíl **23**

D. Experimentální část **24**

3. Materiál **24**

3.1. Pomůcky a přístroje **24**

3.2. Chemikálie 25

3.3 Standard molekulových hmotností 26

3.4. Protilátky a Proteiny 27

3.5. Lyzáty buněčných linií 27

4. Metodika **27**

4.1. Zásobní roztoky 27

4.2. Příprava buněčných lyzátů 34

4.3. Stanovení koncentrace ve vzorcích pomocí metody dle Bradfordové 34

4.4. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) 35

4.4.1. Příprava polyakrylamidového gelu 35

4.4.2. Příprava vzorků a elektroforéza 36

4.4.3. Barvení gelu pomocí Blue Silver 37
4.5. Western blotting 37
4.5.1. Barvení gelu pomocí Briliant Blue po přenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu 38
4.5.2. Barvení nitrocelulosové membrány pomocí Ponceau S 38
4.5.3. Blokace membrány 38
4.5.4. Aplikace protilátek 38
4.5.4.1. Aplikace primární protilátky 38
4.5.4.2. Aplikace sekundární protilátky 39
4.5.5. Vizualizace a vyhodnocení 39
4.6. Stanovení exprese DHRS7 v buněčných linií 39
4.7. Test funkčnosti imunoprecipitace 40
4.7.1. Optimalizace elučního pufru 41
4.7.1.1.. Glycinový pufru jako eluční činidlo 41
4.7.1.2. 8 M močovina jako eluční pufr 42
4.8. Test funkčnosti imunoprecipitace s buněčnými lyzáty 42
4.8.1. Glycinový pufr jako eluční činidlo 42
4.8.2. 8 M močovina jako eluční činidlo 43
4.9. Optimalizace imunoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu 43
4.9.1. Optimalizovaná koimunoprecipitace a příprava vzorku na MS – štěpení trypsinem z gelu 44
4.9.1.1. Štěpení trypsinem 44
4.9.1.2. Odsolení vzorku 45
4.9.1.3. Nanesení na destičku 45
4.9.2. Optimalizovaná koimunoprecipitace a příprava vzorku na MS – štěpení trypsinem v roztoku 45
4.9.2.1. Příprava vzorku na MS analýzu - štěpení v roztoku 46

E. Výsledky 48
5. Souhrn výsledků koimunoprecipitace a přípravy vzorků na MS 48
5.1. Stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích 48
5.2. Stanovení exprese DHRS7 49
5.3. Test funkčnosti imunoprecipitace DHRS7 50
5.4. Optimalizace elučního pufru 52

5.4.1. Glycinový pufr jako eluční činidlo 52
5.4.2. 8M močovina jako eluční pufr 53
5.5. Test funkčnosti koimunoprecipitace s buněčnými lyzáty 53
5.6. Ověření funkčnosti koimunoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu 55
5.7. Koimunoprecipitace a MS analýza vzorků připravených štěpením z gelu 56
5.8. Ověření funkčnosti koimunoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu pomocí 8 M močoviny 57
5.9. Koimunoprecipitace a MS analýza vzorků připravených štěpením v roztoku. 58

F. Diskuze 61

G. Závěr 64

H. Seznam obrázků 65

J. Seznam zkratek 68

K. Seznam použité literatury 72

A. Úvod

Proteiny jsou biomakromolekuly složené z aminokyselin vázaných pomocí peptidové vazby, která spojuje aminoskupinu jedné aminokyseliny s karbonylovou skupinou druhé aminokyseliny. Bílkoviny mají v buňkách celou řadu funkcí. Jako enzymy se svou biokatalytickou funkcí se podílejí na látkové přeměně v organismu a slouží jako nástroj genové exprese. Strukturní proteiny, kolagen a kreatin, zajišťují oporu tkání a buněk celého těla. Aktin a myozin umožňují svalům jejich kontrakci a relaxaci, a transportní proteiny se podílejí na pohybu látek krevním oběhem, přes buněčné membrány a regulují rychlost biochemických procesů v lidském těle. Důležité jsou také peptidy ve funkci hormonů, produkované žlázami s vnitřní sekrecí, mezi které patří například inzulin, somatostatin a růstový hormon.

Studium interakcí proteinů je důležitá z hlediska rozpoznání celé řady procesů uvnitř buňky i organismu. Tyto procesy zahrnují regulační děje, genovou expresi, katalytickou funkci k endogenním sloučeninám a spousty další. Detekce těchto protein – protein interakcí probíhá pomocí metod *in vivo, in vitro a in silico*. Interakce proteinů nám umožňují lépe pochopit jak funkci studovaného proteinu, tak i jejich interakčních partnerů a dovoluje nám lépe poznat jejich úlohu v rámci organismu.

B. Teoretická část

1. Protein-protein interakce

Proteiny svou funkci *in vivo* mohou stěží provádět samostatně, proto více jak 80 % proteinů interaguje a vytváří komplexy, které jsou velmi důležité k udržení homeostázy v organismu (Berggard et al. 2007). Předpokládá se, že proteiny v buňce jsou součástí obrovského proteinového komplexu, označeného jako „interactome“ (Cox a Phillips 2008). Pod pojmem „interactome“ rozumíme soubor molekulárních interakcí v určité buňce, který nám umožňuje lépe pochopit funkci a regulaci genu v rámci organismu. Termín byl poprvé použit v roce 1999 skupinou vědců v čele s Bernardem Jacqem (Sanchez et al. 1999).

Většina proteinů se v jejich přirozeném stavu skládá z více než jednoho polypeptidového řetězce, což vede k formulaci oligomerů. Oligomer představuje molekulu složenou ze dvou až desíti podjednotek, tzv. monomerů. Oligomery, které obsahují více kopií jednoho polypeptidu, označujeme jako homooligomerní komplexy neboli makromolekulární komplexy. Ty jsou tvořené pouze jedním typem proteinové podjednotky, které jsou spojené nekovalentními interakcemi (např. cytochrom c). Mezi heterooligomerní komplexy řadíme proteiny, které se skládají s rozdílných polypeptidových řetězců. Příklady hetero-komplexů zahrnují signální transdukční proteiny, proteázové komplexy, enzymy a G-vázané proteiny (Cox a Phillips 2008).

Nekovalentní vazby mezi polypetidovými řetězci jsou základem pro stavbu a agregaci proteinů, ale také pro tvorbu proteinových interakcí. Proteiny jsou těmito vazbami asociovány s proteiny, ale také ligandy, nukleovými kyselinami, substráty a dalšími. Odhaduje se, že na každý protein připadá pět interakčních partnerů. Funkci neznámého proteinu můžeme předpovídat díky jeho interakci s proteinem se známou funkcí (Wildová a Rumlová 2008).

Interakce proteinů jsou tedy důležité nejen pro správnou regulaci jejich funkce, ale také pro jejich vnitrobuněčnou lokalizaci a hrají klíčovou roli také v mnoha buněčných procesech. Například, interakce proteinů s proteiny se podílí na změně kinetických vlastností enzymů, slouží jako hlavní mechanismus umožňující „substrate channeling“, napomáhají vytvářet vazebné místo pro malé efektorové molekuly,

inaktivují nebo snižují expresi proteinů a mění specifitu proteinu pro jeho substrát prostřednictvím interakcí s různými vazebnými partnery (Srinivasa Rao et al. 2014). Identifikace a charakterizace proteinových interakcí vytvářejících prostorové sítě přispěly k rozpoznání řady procesů v organismu.

1.1 Typy interakcí proteinů

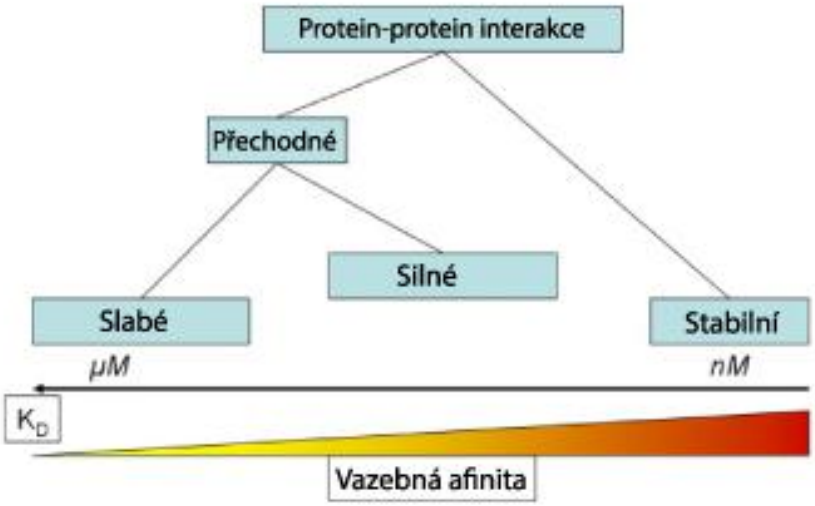
Protein-proteinové interakce můžeme dělit podle dvou hledisek, podle jejich stability na obligatorní a fakultativní, a podle délky jejich trvání na stabilní a přechodné interakce (Obr. 1).

1.1.1. Stabilní a přechodné protein-protein interakce

Proteinové interakce mohou být na základě délky trvání vytvořených proteinových komplexů rozděleny na přechodné a stabilní. Stabilní interakce jsou velmi silné a ireversibilní, obsahují více hydrofobních vazeb oproti přechodným interakcím, v nichž převládají vazby polární. Stabilní interakce proteinů se vyskytují v multipodjednotkových komplexech, které při purifikaci zůstávají zachovány. Jako příklad takovýchto interakcí lze uvést krevní barvivo hemoglobin, jež se skládá ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka obsahuje globin, jako její bílkovinnou část a hem, jako její nebílkovinnou část. Dalším příkladem, který můžeme uvést, je interakce antigen-protilátka. Stabilní interakce jsou nejlépe detekovatelné metodou koimunoprecipitace a metodou separace pomocí afinitních ligandů (La et al. 2013, Perkins et al. 2010).

Přechodný typ proteinových interakcí označujeme jako interakce ovládající většinu buněčných procesů. Jsou to interakce, které se snadno tvoří a stejně dobře i zanikají. Přechodné komplexy dále dělíme na slabé a silné. Slabé přechodné komplexy jsou velmi nestabilní s velmi krátkou životností, ukazující *in vivo* různé oligomerní stavy proteinových komplexů. Silné přechodné komplexy mění svou kvartérní strukturu prostřednictvím navázání ligandu a vyžadují specifické podmínky umožňující interakci (Perkins et al. 2010). Příkladem může být uveden heterotrimerní protein G, ve kterém je na Gα navázán guanosindifosfát (GDP), v této podobě interaguje s receptorem. Po aktivaci receptoru dochází ke změně konformace a na

Gα podjednotku se váže guanosintrifosfát (GTP), díky kterému se G protein aktivuje (Acuner Ozbabacan et al. 2011). Jakmile jsou proteiny v kontaktu se svými vazebnými partnery, účastní buněčných procesů, zahrnující modifikaci proteinů, signalizaci, transport atd. (Pierce, 2010)



Obrázek 1: Rozdělení protein-proteinových interakcí v závislosti na délce jejich trvání (Perkins et al. 2010).

1.1.2. Obligatorní a fakultativní interakce proteinů

Podstatou k rozlišení těchto dvou skupin interakcí je stabilita. V případě, že složky komplexu proteinů jsou samy o sobě nestabilní *in vivo*, pak je označujeme jako obligatorní. Jinými slovy, některé proteiny samy netvoří stabilní strukturu, ale jsou součástí komplexu proteinů, který pak jako celek tvoří stabilní strukturu. Obligatorní interakce mezi proteiny jsou obvykle interakce trvalé. Jako příklad můžeme uvést obligatorní interakci mezi β a γ podjednotkou G proteinu. Opakem jsou pak interakce fakultativní, kdy všechny proteiny mohou existovat nezávisle na sobě. Daný protein tedy vytváří stabilní strukturu *in vivo* sám (např. cytochrom c a interakce mezi α a β podjednotkou G-proteinu). Fakultativní interakce jsou převážné přechodné s několika výjimkami. (Acuner Ozbabacan et al. 2011).

1.2. Metody detekce protein proteinových interakcí

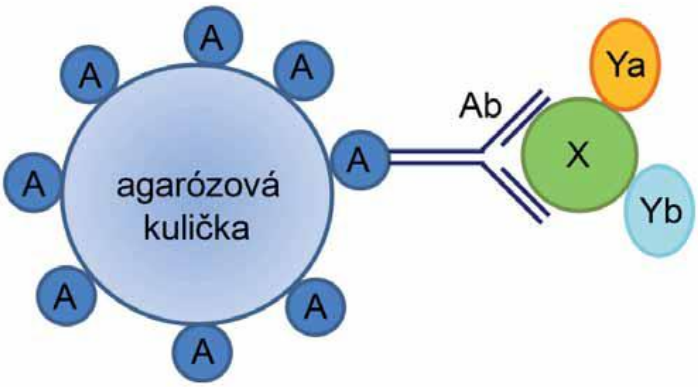
Metody detekce interakcí proteinů klasifikujeme do tří typů, *in vitro, in vivo a in silico*. Pro metody *in vitro* je charakteristické, že se provádí mimo živý organismus, v definovaném prostředí. U těchto metod dochází k získání čistých proteinových komplexů, které jsou pak dále analyzovány, proto je třeba zvolit takové podmínky, aby nedošlo k rozrušení proteinových komplexů. Mezi *in vitro* postupy řadíme tandemovou afinitní purifikaci (TAP), afinitní chromatografii, koimunoprecipitaci, metodu separace pomocí afinitních ligandů, far western, rentgenovou krystalografii a NMR spektroskopii.

Metody *in vivo* se na rozdíl od *in vitro* provádí v živém organismu. Především v poslední době se dostávají do popředí zájmu z hlediska objasnění již známých proteinových interakcí a upřesnění jejich funkce v rámci buněk. Patří mezi ně metody jako kvasničný dvouhybridní systém, fluorescenční resonanční přenos energie (FRET), bioluminiscenční resonanční přenos energie (BRET) a syntetická letalita.

Metody *in silico* jsou založené na počítačové simulaci. Patří sem mnoho metod, které se dnes silně rozvíjejí. Jsou to metody založené na analýze a predikci sekvencí, domén, struktur proteinů. Patří sem např. metoda genové fúze, „in silico 2 hybrid“, chromozomové blízkosti a další (Srinivasa Rao et al. 2014).

1.2.1. Koimunoprecipitace

Koimunoprecipitace je imunochemická metoda, která spolu s tandemovou afinitní purifikaci a metodou separace pomocí afinitních ligandů patří k metodám využívající vazby na nosič. U koimunoprecipitace se jedná o schopnosti protilátek specificky vázat požadovaný protein spolu s jeho interakčními partnery. Po předčištění buněčného lyzátu je přidána protilátka proti studovanému proteinu a dochází vytvoření specifického komplexu antigen-protilátka. Po vytvoření komplexu jsou do buněčného lyzátu přidány sefarózové nebo agarózové kuličky s kovalentně navázaným proteinem A nebo proteinem G (Obr. 2). Po navázání protilátky na protein A či G, dojde k imobilizaci celého proteinového komplexu, který je následně eluován a detekován pomocí metody SDS elektroforézy a Western blottingu, pokud známe interakčního partnera. Pokud je interakční partner neznámy, použije se metoda hmotnostní spektrometrie (Masters 2004).



Obrázek 2: Princip koimunoprecipitace, vychytávání komplexu antigen-protilátka pomocí agarózových kuliček. Cílový Protein X spolu s jeho interakčními partnery (proteiny Ya a Yb) je navázán na specifickou protilátku (Ab). Vzniklý imunokomplex je ze směsi vychytán pomocí nosiče (např. agarózových kuliček) s imobilizovaným proteinem A, který rozeznává Fc fragment protilátek (Ďurech et al. 2014).

Koimunoprecipitace se používá k potvrzení interakce dvou proteinů, ale lze ji použít také ve vyhledání interakcí neznámých. Pro úspěšnou imunoprecipitaci je důležité množství antigenu a jeho afinita k protilátce.

1.2.1.1. Antigen

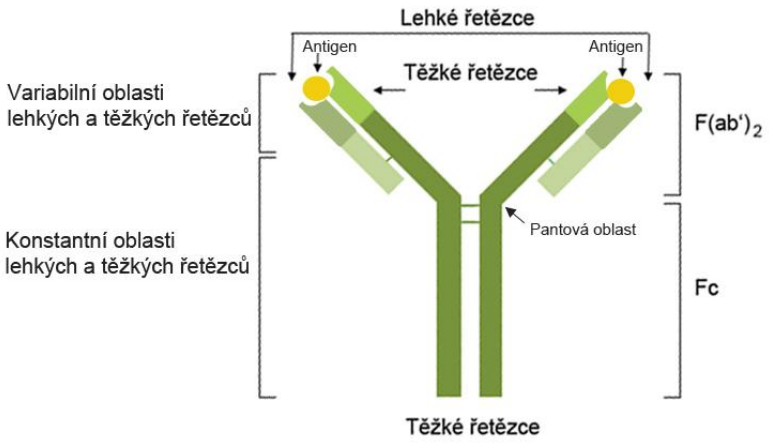
Základním principem každé imunochemické metody je spojení specifické protilátky s antigenem, čímž se získá komplex protilátka-antigen. Jako antigen označujeme jakoukoliv cizí látku vyvolávající imunitní odpověď. Antigeny mají vysokou molekulovou hmotnost, řadíme mezi ně proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny nebo lipoproteiny (Bartůňková a Hořejší 2009).

Imunitní reakce mohou být generovány i proti menším substancím, nazývaným hapteny. Jedná se o nízkomolekulární látky postrádající imunogenní vlastnosti. Tato vlastnost se ovšem změní, dojde-li k navázání haptenu na látku s vyšší molekulovou hmotností. Malé místo na antigenu, na které se komplementárně váže protilátka, označujeme jako epitop. Pojmem epitop se rozumí obvykle jeden až šest monosacharidů nebo 5-8 aminokyselinových zbytků na povrchu antigenu. Aby došlo k interakci mezi protilátkou a antigenem, musí být epitop snadno přístupný pro navázání protilátky.

Pokud dojde k denaturaci, například prostřednictvím změny pH, na epitopu dochází ke změně, což může mít vliv na interakci protilátka-antigen (Internet 1).

1.2.1.2. Protilátka

Protilátky jsou produkovány jako odpověď na invazi cizích molekul v těle. Jako protilátku označujeme imunoglobulin schopný specifické interakce s antigenem. Protilátka se nachází v jedné nebo více kopií, její struktura připomíná tvar písmene „Y“ a je složena ze čtyř polypeptidových řetězců. Každý „Y“ obsahuje dvě totožné kopie těžkého řetězce, a dva identické kopie lehkého řetězce, pojmenované podle jejich relativní molekulové hmotnosti.



Obrázek 3: Schéma struktury protilátky - tvar písmene „Y“ složeného ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců (Internet 2).

Klasický tvar „Y“ IgG se skládá ze dvou ramen, antigen-specifického Fab ramena, které jsou rozhodující pro skutečnou vazbu antigenu, a Fc fragmentu, který se váže pomocí Fc receptorů na povrch leukocytů (Obr. 3). Počet Fab regionů protilátky, koresponduje s jeho podtřídou. Přímo konjugované protilátky jsou značené enzymem nebo fluoroforem v oblasti Fc. Fc region se také využívá k upevnění protilátky k desce pro ELISA postupy. Protilátka může být štěpena na dva Fab a jeden Fc fragment proteolytickým enzymem papainem, nebo na dvě části: jeden F $(ab')_2$ a jeden Fc ve spojovací oblasti proteolytický enzym pepsinem (Internet 1).

Protilátky dělíme do pěti tříd: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE na základě počtu jednotek „Y“ a typu těžkého řetězce. Těžké řetězce IgG, IgM, IgA, IgD, a IgE jsou

známé jako *γ, μ, α, δ* a *ε* v daném pořadí. Lehké řetězce jakékoliv protilátky mohou být klasifikovány buď jako typ κ nebo λ (na základě malého rozdílu polypeptidových struktur). Nicméně, těžké řetězce určují podtřídu každé protilátky. Podtřídy protilátek se liší v počtu disulfidových vazeb a v délce pantové oblasti mezi Fab a Fc fragmenty protilátky. Nejčastěji používané protilátky v imunochemických postupech jsou ze třídy IgG (Jílek, 2014).

Všechny druhy imunoprecipitace jsou založeny na interakci mezi antigenem a protilátkou a mezi protilátkou a partikulemi. K imunoprecipitaci cílového proteinu a jeho interakčních partnerů jsou využívány protilátky imobilizované na sefarózovou nebo agarózovou matrici prostřednictvím proteinu A nebo G, které váží Fc fragment protilátky (Obrázek 3). Velmi důležité je odstranění nespecifických vázaných interagujících proteinů, které by mohly kontaminovat získané komplexy. Tomu můžeme zabránit předčištěním buněčných lyzátů pomocí adsorbentu. Následně je provedena koimunopreciptace. Získané komplexy protilátka-antigen s dalšími interagujícími proteiny jsou následně uvolněny z adsorbentu pomocí elučního pufru. Interakce antigenu a protilátky při vazbě na partikule může být provedena v libovolném pořadí, ale často dostaneme jasnější výsledek, když je komplex antigen-protilátka (Ďurech et al. 2014).

1.2.1.3. Faktory ovlivňující úspešnost koimunoprecipitace

Velmi důležitým aspektem je volba lyzačního pufru. Iontová síla (koncentrace soli), volba detergentu a pH lyzačního pufru mohou významně ovlivnit účinnost extrakce a integritu antigenu. Mírně zásadité pH a nízká iontová síla jsou výborné pro solubilizaci, zatímco vysoká koncentrace soli a nízké pH může způsobit, že dojde k denaturaci antigenu a jeho vysrážení z roztoku. Obecně, neionogenní (např. Triton X-100, NP40), nebo obojetné (např. 3-[(chloramidopropyl) dimethylammonio)]1-propansulfát - CHAPS) detergenty mají sklon k zachování nekovalentní protein-protein interakcí, zatímco iontové detergenty, dodecylsíran sodný (SDS) nebo deoxycholát sodný, mají tendenci k větší denaturaci protein-protein interakcí a také mohou nepříznivě ovlivnit schopnost protilátky rozpoznat cílový antigen. Lyzační pufr by měl vždy obsahovat inhibitory proteáz, sloužící jako ochrana před proteolýzou cílových proteinů. Dalším důležitým aspektem je doba inkubace

antigen – protilátka, pokud není inkubace dostatečně dlouhá, nedojde k jejich interakci, a tudíž nevznikne komplex antigen – protilátka s navázanými cílovými interakčními partnery (Internet 1).

1.2.1.4. Metody používané pro vyhodnocení koimunoprecipitace

- *Elektroforéza*

Jedná se o metodu založenou na pohybu nabitých částic působením elektrického pole. Pohyblivost částic závisí na velikosti náboje, tvaru, velikosti molekuly, relativní molekulové hmotnosti dělené molekuly, na pH, iontové síle, napětí a proudu prostředí. Nejčastěji používaným typem elektroforézy je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE), při které dochází k dělení proteinů podle jejich velikosti, proteiny se pohybují gelem různou rychlostí. Menší proteiny gelem postupují rychleji než větší. S použitím vhodných standardů lze touto technikou zjistit molekulovou hmotnost studovaného proteinu (Pláteník 2008).

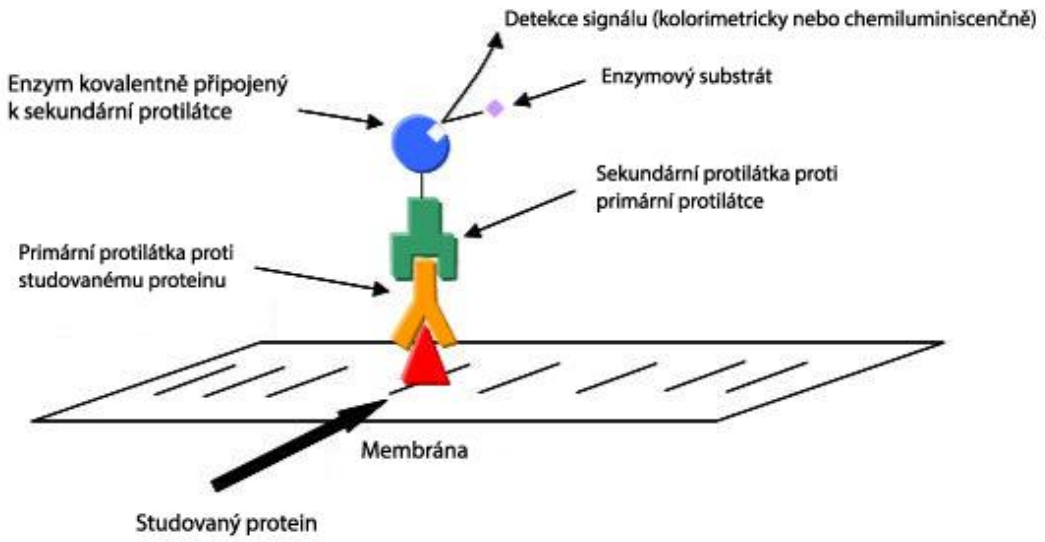
Před nanesením vzorku na SDS-PAGE je protein denaturován zahříváním vzorku při teplotě 95-98 °C po dobu 3-5 minut v přítomnosti SDS a merkaptoetanolu (ME), tím dojde k rozrušení disulfidových můstků a SDS proteiny obalí a udělí jim záporný náboj. Dochází k narušení intermolekulárních a intramolekulárních interakcí a daný protein ztrácí svojí terciální a sekundární strukturu.

SDS-PAGE řadíme mezi metody diskontinuální, kdy se polyakrylamidový gel odlévá ve dvou vrstvách. Vzorek nejprve projde do vrstvy zaostřovací, kde se proteiny seskupí do tenké linie a dále pak pokračují do separačního gelu, kde se dělí podle velikosti. Po skončení elektroforézy můžeme podrobit gel barvení pomocí Coomassie briliantovou modří, anebo pokračovat metodou Western blotting (Internet 1). Elektroforézu používáme pro detekci proteinů o známé molekulové hmotnosti a pro potvrzení předem známé interakce.

- *Western blotting*

Metoda označuje přenos proteinů z elektroforetického gelu na povrch blotovací membrány. Použitím této metody jsme schopni identifikovat specifické proteiny ze směsi proteinů. Nejčastější používané blotovací membrány jsou z nitrocelulózy

a polyvinylidenfluoridu (PVDF). Přenos se provádí pomocí elektrického pole, orientovaného kolmo k povrchu gelu, což způsobuje, že se proteiny pohybují z gelu a na membránu. Membrána spolu s gelem a filtračními papíry vytváří tzv. „sendvič“ (Yang et al. 2014). Po blokaci nespecifických vazeb se přidá primární protilátka a molekuly imunoglobulinu hledají svůj specifický epitop na antigenech. Po odstranění primární protilátky se membrána omyje promývacím pufrem a přidá se sekundární protilátka (Mahmood a Yang 2012). Sekundární protilátkou se rozumí protilátka proti primární protilátce (Obr. 4).



Obrázek 4: Označení cílového proteinu pomocí protilátek v metodě Western blotting. Na cílový protein se po inkubaci naváže specifická primární protilátka zaměřená proti cílovému proteinu a na primární protilátku se po inkubaci naváže sekundární protilátka, která je zaměřena proti Fc fragmentu primární protilátky – sekundární protilátka je konjugována s enzymem (např. s křenovou peroxidázou), která se používá pro detekci celého komplexu a tedy i cílového proteinu (Internet 6).

Vytvořený imunokomplex detekujeme za použití značky na sekundární protilátce s enzymem, například křenovou peroxidázou (HRP) nebo alkalickou fosfatázou, který může být detekován vizuálně (kolorimetricky) nebo pomocí chemiluminiscenční metody. Metoda Western blotting nám umožňuje detekovat po

koimunoprecipitaci náš cílový protein i ze složitějších směsí proteinů (Mahmood a Yang 2012, Thermo fisher, 2014).

- *Hmotnostní spektrometrie (MS)*

MS je další metodou pro analýzu výsledků z metod pro studium protein-proteinových interakcí. Hmotnostní spektroskopie je fyzikálně-chemická metoda stanovující hmotnost molekul a atomů po převedení na ionty. K produkci iontů neboli k ionizaci, se užívá ionizace elektronovým paprskem, chemická ionizace, ionizace rychlými atomy a ionty, působením elektrostatického pole, ionizace elektrosprejem a desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI – „matrix-assisted laser desorption/ionization) a další. Metoda se užívá jak k určení hmotnosti částic, tak ke stanovení složení vzorku a k objasnění chemické struktury. Přístroj pro hmotnostní spektroskopii je složen z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a z řídící paměti. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které graficky znázorňuje závislost četnosti iontů na hodnotě m/Z, kdy „m“ znázorňuje hmotnost a „Z“ náboj iontů (Internet 3).

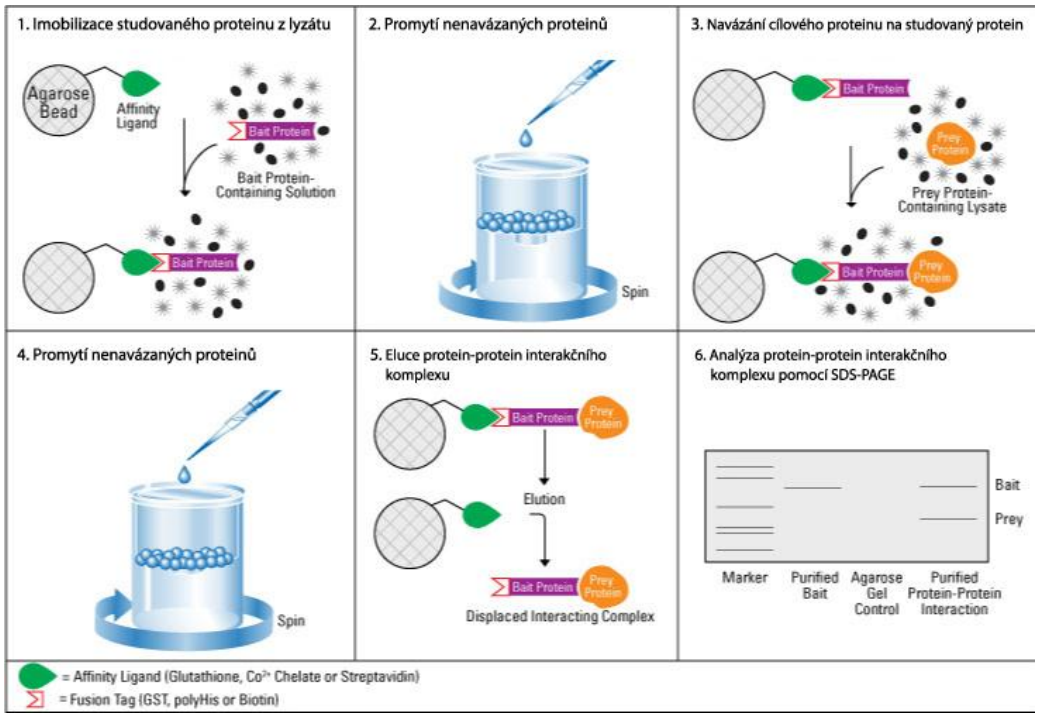
Pro studium peptidů a proteinů se nejčastěji používá MALDI ionizační technika, Tato technika je charakterizována tvorbou stabilních iontů a absencí fragmentů. Pro MALDI se nejčastěji užívá detektor doby letu (TOF) hmotnostní spektrometr nebo spektrometry, umožňující rozdělení iontů o různých hmotnostech. Základním principem TOF analyzátoru je extrakce iontů a měření doby letu. Ionty se pomocí napětí vloženého na extrakční mřížku urychlí elektrickým polem a získají rychlost v závislosti na jejich hmotnosti „m“ a velikosti náboje „Z“. Získaná kinetická energie je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Výsledkem je rozdílná rychlost iontů s různým poměrem m/Z, a proto takto urychlené ionty dopadnou na detektor v různém čase, pokud urazí stejnou vzdálenost (Hoffmann a Stroobant 2007, Thanh Huonga et al. 2014).

Pro přípravu vzorků na MS je důležité rozštěpení proteinů na jednotlivé peptidy, které jsou následně analyzovány MS. Pro přípravu vzorků na MS se využívá, buď štěpení rozdělených proteinů z elektroforetického gelu, nebo štěpení přímo z roztoku.

1.2.2. Další metody pro studium protein-protein interakcí

1.2.2.1. Separace pomocí afinitních ligandů (Pull-down analýza)

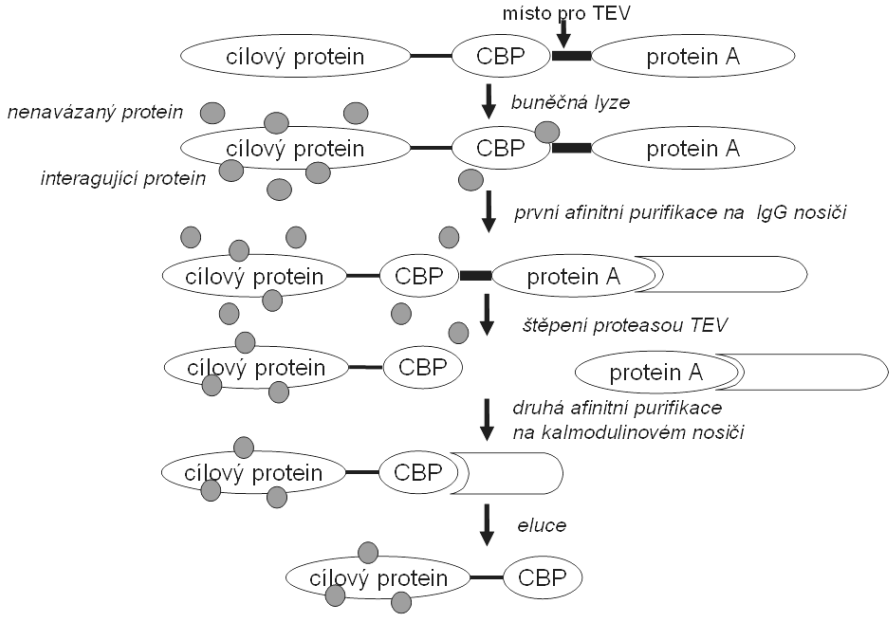
Separace pomocí afinitních ligandů patří spolu s imunoprecipitací k metodám afinitní purifikace. Studovaný proteiny je imobilizován na aktivní nosič. Nejčastěji využívanými afinitními kotvami pro uchycení cílového proteinu jsou hexahistidinová kotva (6xHis), gluthation S-transferáza (GST), hemaglutinin (HA) a 8 aminokyselinový epitop FLAG, které se vyskytují na rekombinantních proteinech. Cílový protein je purifikován pomocí afinitních nosičů a slouží jako „návnada“ pro proteiny v buněčném lyzátu. Nosič obsahující navázaný studovaný protein je inkubován s buněčným lyzátem. Interagující proteiny se naváží na cílový protein, komplex je promyt pro snížení nespecifických interakcí a následně dochází k eluci vhodným pufrem (Obr. 5). Analýza interagujících proteinů probíhá prostřednictvím SDS-PAGE s následnou analýzou pomocí Western blottingu nebo MS (Pierce 2010).



Obrázek 5: Princip metody separace pomocí afinitních ligandů. Proteiny jsou imobilizovány silnou afinitní interakcí na aktivní nosič. Lyzát je inkubován s nosičem nesoucím studovaný protein, dojde k vazbě interagujícího proteinu. Vytvořený komplex je pak eluován a analyzován (Internet 7).

1.2.2.2. TAP

Metoda pro detekci protein-proteinových interakcí a izolaci proteinových komplexů, kdy jsou k N-konci nebo k C-konci cílového rekombinantního proteinu připojeny dvě nebo více fúzních značek. Studovaný protein je purifikován spolu s interakčními partnery pomocí jedné fúzní značky, která je odstraněna pomocí proteolytického štěpení, následně dojde k odhalení druhé fúzní sekvence, která je pak využita v další purifikaci (Obr. 6). Díky tomu má metoda TAP méně falešně pozitivních výsledků na rozdíl od metody separace pomocí afinitních ligandů (Srinivasa Rao et al. 2014).



Obrázek 6: Princip metody TAP. Cílový protein ve fúzi se dvěma fúzními sekvencemi, kalmodulin vázajícím proteinem (CBP) a proteinu A, navzájem spojených sekvencí obsahující vazebné místo pro TEV proteázu. Komplexy fúzních proteinů jsou izolovány s interakčními partnery z buněčného lyzátu pomocí IgG nosiče. Sekvence proteinu A je odstraněna TEV proteázou. Následuje druhá purifikace využívající kalmodulinové nosiče. (Wildová a Rumlová 2008).

1.2.2.3. Metoda BRET a FRET

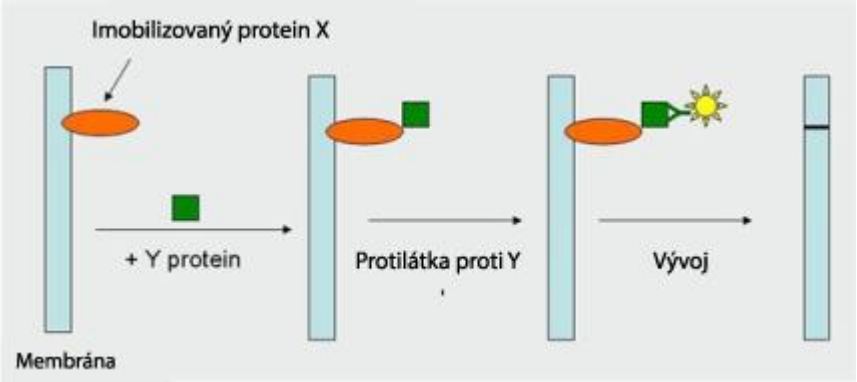
Metody FRET a BRET slouží k identifikaci protein-proteinových interakcí na buněčných linií a jsou založené na jejich zviditelnění pomocí excitace fluorescenčních proteinů, světelně nebo enzymaticky. Základem metody FRET je přenos energie mezi dvěma fluorescenčními molekulami (fluorofory), což znamená z donoru na akceptor. Fluorofory se liší rozmezím vlnových délek svých emisních a excitačních spekter. Cílový protein je ve formě fúzního proteinu s jedním fluoroforem, zatímco vytipovaný interakční partner je fúzován s druhým fluoroforem. Po přiblížení fluoroforů, tedy při interakci proteinů a po excitaci donorové molekuly dojde k emisi světla o vlnové délce. Tato uvolněná energie ve formě světla je zachycena akceptorem, dochází k její excitaci a následně emisi světla o jiné vlnové délce než emise donoru. Světlo emitované z akceptoru je zachyceno a jeho intenzita je měřena detektorem (Matoulková a Vojtěšek 2014). Jedná se o velmi účinnou metodu pro zjištění konformace, asociace nebo disociace molekul a pro zachycení inter- nebo intramolekulárních interakcí. Pro analýzu FRET můžeme použít proteiny jako je zelený fluorescenční protein (GFP - green fluorescent protein) nebo jeho varianty, modrozelený fluorescenční protein (CFP - cyan fluorescent protein), žlutozelený fluorescenční protein (YFP - yellow fluorescent protein) nebo chemicky modifikované proteiny pomocí kovalentního připojení k syntetickým fluoroforům (např. k fluorescein isothiokyanatu – FITC) (Wildová a Rumlová 2008).

Metoda BRET je na rozdíl od metody FRET zahájena enzymatickou reakcí katalyzovanou donorovou molekulou. Díky tomu umožňuje detekci až 40x menšího množství proteinu při dosažení stejné intenzity signálu. Jako donor se nejčastěji používá luciferáza indukující fluorescenci luciferinu v přítomnosti ATP (adenosintrifosfát), jako akceptory používáme GFP nebo YFP (Matoulková a Vojtěšek 2014).

Obě tyto metody slouží k potvrzení protein-proteinových interakcí, které jsou předem určeny jinou metodou, tedy musí být předem dané, které proteiny je třeba transfekovat do buněk.

1.2.2.4. Detekce interakcí s proteiny imobilizovanými na membráně (Far western)

Far western analýza je alternativní metoda pro analýzu protein-protein interakcí, která je založena na testování vazby na proteiny imobilizované po elektroforetickém rozdělení na membráně (Wildová, Rumlová 2008). Cílový protein na membráně necháme interagovat s buněčným lyzátem. Potenciální interakční partner studovaného proteinu musím být předen stanoven nebo vytipován jinou metodou pro detekci proteinových interakcí. Na cílový protein, který je imobilizovaný na membráně, se naváže interagující partner (Obr. 7). Interagující proteiny jsou následně detekovány pomocí různých metod. S touto metodou analýzy, je možné studovat vliv posttranslačních modifikací na protein proteinové interakce, zkoumá interakční sekvence za použití syntetických peptidů jako sondy a identifikuje interakce proteinů bez použití protilátek specifických pro antigen (Internet 4).



Obrázek 7: Popis metody Far western. Studovaný protein se imobilizuje na membránu, která se pak nechá interagovat s interakčním partnerem. Interakční partner je identifikován např. pomocí protilátky proti interakčnímu partnerovi a následuje detekce proteinových komplexů (Internet 8).

2. DHRS7

DHRS7, neboli dehydrogenáza/reduktáza (SDR rodina) člen 7 (retSDR4, SDR34C1), je lidský enzym z proteinové nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR). Úroveň poznání tohoto enzymu je dosud poměrně nízká, i když v poslední době se objevuje řada nových informací, tak její fyziologická role v organismu nebyla doposud popsána.

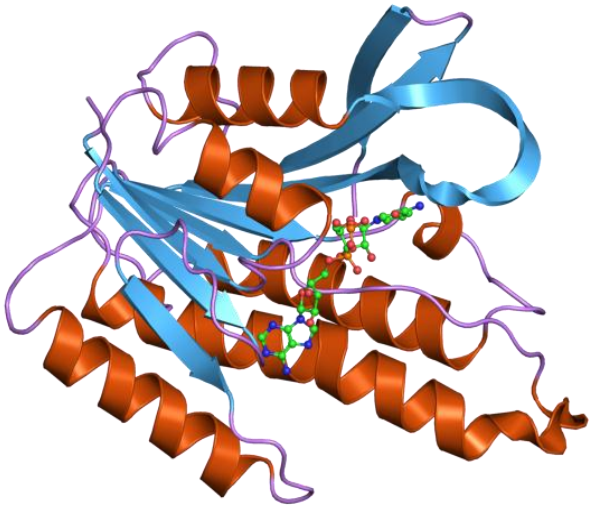
2.1. Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR)

SDR nadrodina obsahuje více než 679 520 členů a představuje jednu z největších a nejstarších rodin ze všech (Jörnvall et al. 2014). Tyto enzymy byly zařazené do samostatné skupiny oxidoreduktáz v 80. letech 20. století a název SDR byl vytvořen v roce 1991. Zatím bylo popsáno 464 rodin a charakterizováno šest skupin.

Členové SDR skupiny mají nízkou sekvenční identitu, kolem 20-30 %, ale sdílejí několik společných vlastností, jako je délka proteinového řetězce (250-350 aminokyselinových zbytků), Rossmannův záhyb obsahující 6 - 7 centrálně paralelně složených β listů, které jsou obklopené dvěma α-helix (Obr. 8), aminokyselinovou sekvenci důležitou pro vazbu kofaktoru (Thy-Gly-x-x-x-Gly-x-Gly) a aktivní místo, které je formováno katalytickou tetrádou ze zbytků obsahujících Thy, Lys, Ser a Asp (Štambergová et al. 2014, Bhatia et al. 2015).

Charakterizováno bylo celkem šest typů SDR enzymů, označovaných písmeny „A“ (atypical), „C“ (classical), „D“ (divergent), „E“ (extended), „I“ (intermediate) a „X“ (complex), (Skálová et al. 2011).

Většina členů SDR nadrodiny katalyzuje NAD(P)(H)-dependentní oxidaci/redukci široké řady substrátů, zahrnující především steroidy a retinoidy, a někteří členové se zapojují do biotransformace cizorodých látek jako je doxorubicin, daunorubicin, ketoprofen, nabumeton, a dalších. SDR nadrodina obsahuje jak cytosolické, tak i zástupce vázané na membrány mitochondrií, endoplasmatického retikula a lysosomů. (Heaseleer a Palczewski 2000).



Obrázek 8: Struktura zástupce SDR nadrodiny. β - skládané listy jsou označeny modrou barvou, α-šroubovice červenou (Internet 5).

2.2. Vlastnosti DHRS7

Gen pro lidský enzym DHRS7 je kódován na chromozomu 14 a kóduje dvě izoformy. Izoforma 1 se skládá z 339 aminokyselin (38 kDa) a izoforma 2 obsahuje 289 aminokyselin (32 kDa). DHRS7 enzym je svou sekvencí příbuzný s enzymy DHRS7B a DHRS7C, a vykazuje úzkou homologii také s 11β-hydroxysteroiddehydrogenázou 1 (11β-HSD1) účastnící se redukce kortizonu na aktivní kortizol, který pak aktivuje glukokortikoidní receptor. Zatím byla mRNA DHRS7 prokázána ve tkáních prostaty, ve žlázách nadledvinek, v játrech, v kosterním svalstvu, v sítnici a ve střevě. Enzym DHRS7 je membránově vázaný protein endoplazmatického retikula směřující do lumen. (Štambergová et al. 2016).

Enzym byl připraven v rekombinantní formě, *in vitro* se chová jako NADPH-dependentní reduktáza s katalytickou aktivitou pro některé endogenní složky obsahující karbonylovou skupinu, zahrnující steroidní hormony (androstendion, kortison) a retionoidy (all-trans-retinal) (Heaseleer a Palczewski 2000, Kavanagh et al. 2008).

2.3. Role DHRS7 v organismu

SDR enzymy se účastní řady funkcí v organismu. Například, enzym DHRS2 se podílí na chronických onemocnění, mezi které řadíme aterosklerózu nebo diabetes melitus (Gabrielli a Tofanelli 2012) dále pak enzym DHRS6 se účastní na utilizaci ketolátek v organismu (Guo et al. 2006). Role DHRS7 enzymu v lidském organismu je doposud neznámá, ale předpokládá se, že se účastní v onemocnění, mezi které řadíme karcinom prostaty nebo inzulínová rezistence (Seibert et al. 2015, de Wit et al. 2008). Mnoho SDR enzymů hraje důležitou roli v konverzi aktivních nebo neaktivních forem steroidů a retinoidů. Steroidy a retinoidy řadíme mezi základní endogenní substráty účastnící se regulace fyziologických funkcí včetně energetického metabolismu, dělení buněk, diferenciace (Štambergova et al. 2016).

DHRS7 enzym má katalytickou aktivitu pro složky obsahující karbonylovou skupinu, androstendion, kortizon nebo all-trans-retinal. Byla také pozorována významná katalytická aktivita DHRS7 k 1,2-naftochinonu, reaktivní metabolit naftalenu, který je součásti látek znečišťující ovzduší ze spalování nafty a z tabákového kouře, a 9,10-fenantrenchinonu, další sloučeniny škodlivé pro lidské zdraví. Zvýšená exprese tohoto enzymu byla nalezena také u pacientů s onemocněním diabetes melitus druhého typu, kde má určitou úlohu v inzulínové rezistenci, hraje určitou úlohu v metabolismu lipidů a podílí se na jaterní steatóze (Štambergová et al., 2016).

Další úloha DHRS7 je zaznamenána v rakovině prostaty. Rakovina prostaty je jednou z největších malignit u mužů na celém světě. Klinicky se rakovina prostaty projevuje jako multifokální a heterogenní onemocnění. Zpočátku vznikají premaligní léze, které jsou přičítány genetickým změnám v jedné nebo více buňkách. Následně se genetická změna může vyskytnout v dalších buňkách, což má za následek změny signální dráhy, maligní růst a vytvoření primárního nádoru.

Androgenní receptor (AR) je ligand-dependentní transkripční faktor, potřebný pro normální samčí reprodukci. AR váže testosteron a dihydrotestosteron (DHT) s vysokou afinitou zprostředkovanou androgen-dependentní transkripci genů (Askew et al. 2007). AR je exprimován během všech fází rakoviny prostaty a zvýšení jeho transkripční aktivity je charakteristickým znakem nemoci. Předpokládá se, že AR signální dráhy podporuje včasný rozvoj rakoviny prostaty, což má důležitou roli

v rozvoji kastraci rezistentní rakoviny prostaty (CRPC), která nereaguje na hormonální terapii. Ve svých počátečních fázích je rakovina prostaty léčitelná, ale i přesto u mnoha pacientů dochází k relapsu onemocnění. Dnešní léčba rakoviny prostaty je léková nebo chirurgická kastrace. Bez ohledu na to, po kastraci může rakovina přejít na CRPC a u pacienta se mohou vyvinout metastáze v různých orgánech, především v lymfatických uzlinách a v játrech (Seibert et al. 2015).

Údaje za tří nezávislých studií týkajících se rakoviny prostaty ukázaly, že hladina SDR enzymu DHRS7 se v nádoru často mění. Z analyzovaných vzorků je DHRS7 exprimována asi v 81 % normálních prostatických buňkách. Při karcinomu prostaty dochází k poklesu koncentrace tohoto proteinu, až je jeho hladina v některých případech zcela mizivá. DHRS7 má pravděpodobně významnou tumor-supresorovou funkci, ovšem mechanismus jeho regulace je zatím neznámý (Seibert et al. 2015).

C. Cíl

Cílem této práce bylo provést pilotní studii proteinů interagujících s lidským enzymem DHRS7 pomocí metody koimunoprecipitace. Cíle práce lze rozdělit do několika dílčích cílů:

- Testovat funkčnost imunoprecipitace DHRS7 pomocí dostupní specifické protilátky
- Testovat funkčnost imunoprecipitace DHRS7 z biologického materiálu
- Optimalizovat imunoprecipitační postup pro dané účely
- Provést samotnou koimunoprecipitaci za optimalizovaných podmínek
- Vyhodnotit MS analýzu elučních frakcí, vytipovat potenciální interakční partnery DHRS7

D. Experimentální část

3. Materiál

3.1. Pomůcky a přístroje

Pomůcka	Výrobce
Automatické pipety, špičky (0,5µm-5ml)	Biohit
Kazeta na vyvolání fotografického filmu	Amersham Biosciences
Skla pro elektroforézu	Bio-Rad
Fotofilm Thermo Scientific CL-X	Thermo Fisher Scientific
Nitrocelulosová membrána (0,45µm)	GE Healthcare

Přístroj	Model	Výrobce
Analytické váhy	Scaltec SBC22	Sartorius
Blotovací systém	Trans-Blot Turbo Transfer Systém	Bio-Rad
Centrifuga	miniSpin plus	Eppendorf
Dokumentační systém	GelDoc	Bio-Rad
Destička OPTI-TOF 384 well	OPTI-TOF 384 well	Applied Biosystems
Hlubokomrazící box	Herafreeze	Herabus
Koncentátor	Concentrator 5301	Eppendorf
Kývačka	Unimax 1010	Heidolph
Magnetická míchačka	Color Squid	IKA
pH metr	Orion 410A	Thermo

Předvážka	PT310	Sartorius
Thermomixer	Compact	Eppendorf
Elektroforéza	MiniProtean	Bio-Rad
Vortex	MS 3 basic	IKA
Výrobník ledové tříště	AF 80	Scotsman
Zdroj pro elektroforézu	PowerPac Universal	Bio-Rad

3.2. Chemikálie

Název	**Výrobce**
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acetonitril	Merck
Akrylamid	Sigma- Aldrich
Blokovací mléko pro Western blotting	Bio-Rad
Chlorid draselný	Penta
Chlorid sodný	Penta
Chlorovodíková kyselina	Penta
Commassie Briliant Blue G-250	Sigma- Aldrich
Dodecylhydrogensulfát sodný (SDS)	Merck
Glycin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Kulich Pharma,s.r.o.
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan didraselný bezvodý, p.a.	Penta
Hydrogenfosforečnan sodný dodecylhydrát, p.a.	Penta

Hydrogenuhličitan amonný	Merck
Isobutanol, p.a.	Penta
Jodacetamid	Sigma-Aldrich
Magnetic Bead Protein G	NEB
Methanol, p.a.	Penta
Močovina, p.a.	Penta
Persíran amonný	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma- Aldrich
SiMAG partikule	SiMAG
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), p.a.	Penta
Tween 20 pro molekulární biologii	Sigma-Aldrick
Trifluoroctová kyselina	Sigma-Aldrich
Trypsin	Promega
Univerzální rychloustalovač, FOMAFIX	Foma Bohemia
Vývojka, Fomadon LQN	Foma Bohemia

3.3 Standard molekulových hmotností

Název	**Výrobce**
Precision Plus Protein Standards, All Blue	Bio-Rad

3.4. Protilátky a Proteiny

Název	**Výrobce**
Myší protilátka proti DHRS7 (ab69348)	Abcam
Králičí protilátka proti myší protilátce (Dako P0217)	Dako
Normální myší protilátka (SC-2027)	SantaCruz Biotechnology
Čistý DHRS7 enzym (c = 104,3 µg/ml), (c = 100,8 µg/ml)	KBV FaFUK
Mikrosomální frakce s DHRS7 (c = 15mg/ml)	KBV FaFUK

3.5. Lyzáty buněčných linií

Naše testování jsme uskutečnili na osmi buněčných liniích. Trypsinizované buňky byly připraveny na katedře Biochemických věd, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

4. Metodika

4.1. Zásobní roztoky

- **<u>30 % akrylamid (AA) + 0,8 % bis-akrylamid (bis-AA)</u>**

Akrylamid	30,0 g
Bis-akrylamid	0,8 g
Destilovaná voda	100 ml

- **1,5 M Tris-HCl, pH 8,8**

Tris	18,5 g
Destilovaná voda	100 ml
Hodnota pH upravena konc.HCl na hodnotu 8,8	

- **0,5 M Tris-HCl, pH 6,8**

Tris	6,0 g
Destilovaná voda	100 ml
Hodnota pH upravena konc. HCl na hodnotu 6,8	

- **10 % SDS**

SDS	10,0 g
Destilovaná voda	100 ml

- **0,5 % bromfenolová modř**

Bromfenolová modř	5,0 g
Destilovaná voda	10 ml

- **5x zásobní elektrodový pufr**

Tris	15,1 g
Glycin	72,0 g
SDS	5,0 g
Destilovaná voda	1000 ml
Hodnota pH upravena konc. HCl na hodnotu 8,3	

- **1x koncentrovaný elektrodový pufr**

5x konc. elektrodový pufr, pH 8,3	70 ml
Destilovaná voda	230 ml

- **Vzorkový pufr**

Destilovaná voda	1,2 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	5,0 ml
Glycerol	3,4 ml
SDS	1,0 g
0,5 % BFB	0,4 ml

- **Vzorkový pufr s 2-merkaptoethanolem**

10 µl 2-merkaptoetanolu na 200 µl zásobního vzorkového pufru

- **0,1 M sodno-fosfátový pufr, pH 7,4**

0,1 M $Na_2HPO_3 . 12H_2O$	100 ml
0,1 M $NaH_2PO_3 . 2 H_2O$	25 ml

- **10 % kyselina octová**

Kyselina octová	10,1 ml
Destilovaná voda	100 ml

- **Fixační roztok**

Konc. kyselina octová	10 ml
Metanol	40 ml
Destilovaná voda	50 ml

- **Barvící roztok Blue Silver**

Destilovaná voda	10 ml
85 % kyselina fosforečná	8 ml
Síran amonný	10,0 g
Coomassie Briliant Blue G	0,12 g
Doplnit 80 ml destilované vody	
Metanol	20 ml

- **10 % Persíran amonný (APS)**

APS	0,01 g
Destilovaná voda	100 µl

- **Isobutanol nasycený vodou**

Isobutanol	libovolně
Destilovaná voda	libovolně

- **Lyzační pufr**

50 mM Tris

150 mM NaCl

10% glycerol,

1 mM DTT

1 % Triton X-100

před použitím přidané inhibitory proteáz (1:1000), inhibitory fosfatáz (1:50) a 50 mM PMSF

- **PBS pufr**

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_3 . 12H_2O$	3,58 g
KH_2PO_3	0,2 g
Destilovaná voda	1000 ml

- **TBS pufr**

Tris	24,0 g
NaCl	88,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

pH upravena konc. HCl na hodnotu 7,6

- **Blotovací pufr**

25 mM Tris	1,51 g
192 mM Glycin	7,21 g
20 % metanol	100 ml
Destilovaná voda	500 ml

- **Promývací pufr 0,1 % PBS-T (TBS-T)**

PBS (TBS) pufr	1000 ml
Tween 20	1 ml

- **Promývací pufr pro koimunoprecipitaci**

25 mM Tris	0,3027 g
75 mM NaCl	0,4383 g
5 % glycerol	5,75 ml
0,5 % Triton X-100	
Destilovaná voda	100 ml

Hodnota pH upraveno konc. HCl na 7,4

- **Promývací pufr pro koimunoprecipitaci bez Tritonu**

25 mM Tris	0,3029 g
75 mM NaCl	0,4383 g
Destilovaná voda	100 ml

Hodnota pH upraveno konc, HCl na 7,4

- **0,2 M Glycinový pufr**

0,2 M Glycin	0,3754 g
Destilovaná voda	25 ml

Hodnota pH upravena konc. HCl na hodnotu 2,5

- **Barvící roztok 0,1 % Ponceau S**

Ponceau S	0,1 g
Destilovaná voda	100 ml

- **Blokovací pufr 5 % mléko v TBS-T**

Sušené odtučněné mléko nebo BSA	5,0 g
PBS-T (TBS-T)	100 ml

- **3 % roztok sušeného mléka nebo BSA v TBS-T**

Sušené odtučněné mléko nebo BSA	3,0 g
PBS-T (TBS-T)	100 ml

- **8 M močovina**

Močovina	8,8048 g
Destilovaná voda	10ml

- **Vývojka**

Fomadon LQN	6 ml
Destilovaná voda	84 ml

- **Ustalovač**

Fomafix	15 ml
Destilovaná voda	75 ml

- **Detekční systém (připravit v čas potřeby)**

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

Roztok A smíchán s roztokem B v poměru 1:1

- **Roztok 50 mM hydrogenuhličitanu amonného**

Hydrogenuhličitan amonný	39,53 mg
Ultračistá voda	10 ml

- **Roztok 10 mM dithiotreitolu (DTT)**

Dithiotreitol (DTT)	0,154 mg
Ultračistá voda	100 µl

- **<u>Roztok 55 mM jodacetamidu</u>**

Jodacetamid	1,017 mg
Ultračistá voda	100 µl

- **<u>Pufr A – 5 % Acetonitril (ACN) + 0,1 % trifluoroctová kyselina (TFA)</u>**

ACN	5 ml
TFA	0,1 ml
Ultračistá voda	94,9 ml

- **<u>Pufr B – 80 % ACN + 0,1 % TFA</u>**

ACN	8 ml
TFA	0,1 ml
Ultračistá voda	1,99 ml

4.2. Příprava buněčných lyzátů

Trypsinizované buňky byly dvakrát opláchnuty 10 ml PBS pufru a centrifugovány při 1000 rpm po dobu pěti minut. PBS pufr byl odstraněn a k peletě buněk byl přidán lyzační pufr v objemu 300 µl až 1000 µl dle velikosti pelety. Buňky byly s lyzačním pufrem inkubovány po dobu 30 minut na ledu, za občasného protřepání. Poté byla směs centrifugována při 12 000 rpm po dobu 20 minut při 4 °C.

4.3. Stanovení koncentrace ve vzorcích pomocí metody dle Bradfordové

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou dle Bradfordové za použití BSA jako standardu. Stanovení bylo prováděno v 96-jamkové mikrotitrační destičce a absorbance byla měřena při 596 nm.

Nejdříve byla připravena kalibrační řada BSA (Tab. 1). Pro vytvoření kalibrační řady byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1mg/ml rozpuštěním 1,5 mg BSA v 1,5 ml 10x zředěném lyzačním pufru.

Tab. 1: Koncentrace roztoků BSA použitých pro vytvoření kalibrační řady pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích.

Koncentrace (µg/ml)	Objem BSA (µl)	Objem lyzačního pufru (µl)
100	25	225
200	50	200
400	100	150
600	150	100
800	200	50
1000	250	0

Vzorky v objemu 5 µl byly naředěny 45 µl vody na konečný objem 50 µl. Na mikrotitrační destičku bylo naneseno vždy 5 µl každého vzorku do tripletu (kalibrační i stanovovaný). Jako slepý vzorek bylo použito 5µl 10x zředěného lyzačního pufru.

Ke každému vzorku v jamkách bylo přidáno 235 µl Bradfordova činidla. Vzorky byly inkubovány po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Absorbance se měřila pomocí spektrofotometru v absorbčním maximu 596 nm. Ze získaných naměřených hodnot byla

sestavena kalibrační křivka a rovnice regrese, díky níž se stanovila koncentrace proteinu ve vzorcích.

4.4. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

4.4.1. Příprava polyakrylamidového gelu

Na přípravu polyakrylamidového gelu byla použita elektroforetická skla pro přípravu 0,75 mm silného gelu a krycí sklo. Skla se nejdříve omyla vodou a jarem, následně destilovanou vodou, lihomethanolem a umístila se do nalévacího stojanu. Na separaci proteinů byl použit 12% separační gel a 4% zaostřovací gel (Tab. 2, 3). Tetramethylethylendiamin (TEMED) a 10% persíran amonný (APS) byly přidány pro zahájení polymerace a roztok byl následně dobře promíchán.

Tabulka 2: Složení separačního gelu o koncentraci 12%.

Složky	Objem
Ultračistá voda	1,6 ml
1,5M Tris-HCl, ph 8,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
30% roztok akrylamidu	2,1 ml
10% APS	50 µl
TEMED	2,5 µl

Tabulka 3: Složení zaostřovacího gelu o koncentraci 4%.

Složky	Objem
Ultračistá voda	953 µl
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	391 µl
10% SDS	16 µl
30% roztok akrylamidu	203 µl
10% APS	32 µl
TEMED	1,6 µl

Roztok na separační gel se po jeho připravení ihned nalil mezi skla, do ¾ výšky a převrstvil se 300 µl nasyceného isobutanolu. Po čtyřiceti minutách polymerace, se slil isobutanol a připravil se roztok pro zaostřovací gel. Roztok byl opět promíchán a ihned se nalil mezi skla, dokud hladina nedosáhla horní části krycího skla. Posledním krokem bylo vložení hřebínku a gel se nechal polymerovat devadesát minut při pokojové teplotě. Po ztuhnutí byl vyjmut hřebínek a jamky propláchnuty destilovanou vodou.

4.4.2. Příprava vzorků a elektroforéza

Vzorky byly doplněny destilovanou vodou na stejný objem a přidal se vzorkový pufr s ME (10 µl ME na 200 µl vzorkového pufru) v poměru 1:4. Vzorky byly inkubovány na teplotu 95 °C po dobu 3 minut.

Skla s gelem byla vyjmuta z držáku a vložena do elektroforetické cely. Namísto druhého gelu byla vložena plastová náhrada. Vnitřní část cely se naplnila zředěným elektrodovým pufrem, tak aby hladina pufru byla výše než krycí sklo. Dále jsme nanesli jednotlivé vzorky do jamek, jako první bylo naneseno 5 µl markeru. Prázdné jamky byly doplněny vzorkovým pufrem. Cela se vložila do elektroforetické nádoby a dolil se vzorkový pufr po značku na nádobě. Aparatura byla překryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Pro separaci proteinů v zaostřovacím gelu bylo nastaveno napětí 100 V po dobu 20 minut, a pro separaci proteinů v separačním gelu 150 V po

dobu 75 minut. Elektroforéza skončila, jakmile pás bromfenolové modři doputoval ke spodní části gelu.

4.4.3. Barvení gelu pomocí Blue Silver

Po proběhnutí gelové elektroforézy a odstranění zaostřovacího gelu, byl gel ponořen do fixačního roztoku na dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byl několikrát promyt destilovanou vodou a ponořen do barviva Blue Silver. Gel byl barven přes noc za laboratorní teploty a poté byl odbarvován destilovanou vodou do čirého pozadí.

4.5. Western blotting

Elektroforetický gel byl vložen do nádoby s blotovacím pufrem. Do elektroforetického pufru byla vložena také nitrocelulosová membrána a dva silné filtrační papíry stejných rozměrů jako gel. Všechny komponenty byly ponechány v pufru po dobu alespoň 15 minut.

Prvním krokem je přenos proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou membránu. Do blotovací kazety se postupně naskládaly filtrační papír, membrána, elektroforetický gel a nakonec filtrační papír, došlo k vytvoření tzv. „sendviče“. Vzniklé bubliny se odstranily pomocí válečku. Přebytek blotovacího pufru se odsál buničinou. Blotovací kazeta se přiklopila víkem a byla vložena do blotovacího přístroje. Přenos proteinů z gelu na membránu trval 20 minut při konstantním napětí 10 V. Po dokončení procesu byla provedena kontrola přenosu proteinů a blokace membrány.

4.5.1. Barvení gelu pomocí Briliant Blue po přenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu

Barvení gelu se uskutečnilo po procesu přenosu proteinů z gelu na nitocelulosovou membránu, z důvodu kontroly elektroforetické proteinové separace a účinnosti přenosu (viz kap. 4.4.3).

4.5.2. Barvení nitrocelulosové membrány pomocí Ponceau S

Barvení se uskutečnilo po procesu přenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu, jako kontrola přenosu separovaných proteinů. Do nádoby s membránou bylo přidáno barvivo 0,1 % Ponceau S a barvilo se do objevení proužku, zhruba 1 minutu. Barvící roztok se slil zpět do láhve a membrána se odbarvovala 10 % kyselinou octovou. Po odbarvení se membrána propláchla TBS-T. Následoval krok blokace membrány.

4.5.3. Blokace membrány

Po opláchnutí membrány TBS-T, se membrána ponořila do 5 % blokovacího pufru po dobu 90 minut. Nádoba s membránou byla umístěna na orbitální třepačku na cca 80 rpm. Po ukončení procesu následovalo propláchnutí membrány TBS-T a proces aplikace protilátek.

4.5.4. Aplikace protilátek

4.5.4.1. Aplikace primární protilátky

K membráně byla přidána myší protilátka proti DHRS7 zředěna v poměru 1:1000 v 15 ml 3 % BSA. Nádoba s membránou a přidanou protilátkou se nechala přes noc na orbitální třepačce (80 rpm) v chladící místnosti.

4.5.4.2. Aplikace sekundární protilátky

Po několika opláchnutí membrány TBS-T byla aplikována králičí sekundární protilátka proti myší protilátce zředěna v poměru 1:20000 v 15 ml 3 % BSA, a nádoba byla ponechána na orbitální třepačce při laboratorní teplotě po dobu 90 minut.

Membrána byla několikrát promyta TBS-T, poté byla ponechána v TBS-T a následoval krok vizualizace.

4.5.5. Vizualizace a vyhodnocení

Vizualizace byla provedena v temné komoře. Membrána byla vyjmuta z TBS-T a poté se aplikoval detekční systém, kompatibilní k sekundární protilátce konjugované s HRP. Detekční systém byl připraven smísením roztoku A a roztoku B v poměru 1:1, tak aby na 1cm^2 membrány připadalo 0,05 ml roztoku. Membrána byla inkubována dle potřeby, od 3 minut až po dobu 15 minut, poté se nechala okapat a vložila se do folie. Folie s membránou byla vložena do osvitové kazety a přiložil se fotofilm. Fotofilm se exponoval po dobu 5 až 15 minut. Vyvolání filmu proběhlo pomocí vývojky a ustalovače.

4.6. Stanovení exprese DHRS7 v buněčných linií

Jako výchozí množství pro každý vzorek bylo zvoleno 25 µg proteinu a 100 ng pro mikrozomy *Sf9* s DHRS7 (Tab. 4). Vzorky byly smíchány s SDS vzorkovým pufrem s ME. Následovala SDS elektroforéza (viz kap. 4.4.) a metoda Western blotting (viz kap. 4.5.).

Tabulka 4: Přepočet vzorků pro elektroforézu s ohledem na koncentraci proteinů.

Vzorek	Koncentrace	Objem vzorku (µl)
HeLa	5206,7 µg/ml	4,80
T-47D	2692,5 µg/ml	9,29
MDA-MB-231	1344,2 µg/ml	18,59
MCF 7	2829,2 µg/ml	8,83
HCT 116	3090,0 µg/ml	8,09
Ea.hy926	2220,83 µg/ml	11,26
DHRS7	104,3 µg/ml	0,90
Mikrosomy *Sf9* s DHRS7	15 mg/ml	1,67

4.7. Test funkčnosti imunoprecipitace

Pro ověření funkčnosti imunopreciptace bylo použito 500 ng protilátky proti DHRS7, resp. 750 ng a 1 µg, a 500 ng DHRS7 enzymu, resp. 750 ng a 1 µg. Partikule SiMAG Protein G (20 µl) se promyly třikrát 1 ml 0,1 M sodno-fosfátovým pufrem, pH 7,4. Do mikrozkumavky byla napipetována směs dle tabulky č. 6. Mikrozkumavka se umístila po dobu dvou hodin do chladící místnosti a nechala se rotovat. Po dvou hodinách bylo odebráno 20 µl původního vzorku (PVZ) a přidalo se 20 µl SiMAG Protein G partikulí, které byly předem promyty 3x 1 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru, pH 7,4. Vzorek s partikulemi byl ponechán další hodinu na rotátoru v chladící místnosti. Následovala odebrání 20 µl povazebné frakce (PV) a vzorek se promyl třikrát 500 µl promývacího pufru (W1,W2 a W3). Jako poslední krok bylo promytí partikulí 50 µl elučního pufru (vzorkový SDS pufr). Po protřepání byla odebrána E1, přidáno dalších 50 µl elučního pufru a mikrozkumavka byla vložena na tři minuty na termostatu při 96 °C a došlo k debrání E2. Následně byla provedena SDS elektroforéza a barvení gelu pomocí Briliant Blue (viz kap. 4.4.3.).

Tabulka 5: Složení směsi pro imunoprecipitace pro 500 ng, 750 ng a 1 µg.

	DHRS7 (c = 104,3 µg/ml)	**Protilátka proti DHRS7 (c = 0,5 mg/ml)**	**Lyzační pufr**	**Destilovaná voda**
500 ng	4,80 µl	1,0 µl	295,2 µl	299,0 µl
750 ng	7,20 µl	1,5 µl	142,8 µl	148,5 µl
1 µg	9,59 µl	2,0 µl	140,4 µl	148,0 µl

4.7.1. Optimalizace elučního pufru

Na začátku procesu se používal jako eluční činidlo SDS vzorkový pufr s ME. Poté bylo zkoušeno použití šetrnějšího způsobu eluce, a sice glycinový pufr. V průběhu experimentů se ukázala potřeba eluce 8 M močovinou, tak i tento způsob eluce byl testován.

4.7.1.1.. Glycinový pufru jako eluční činidlo

Celý proces koimunoprecipitace byl zopakován stejně jako v kapitole 4.7. Celkové množství proteinu a protilátky bylo přepočítáno na 1 µg a došlo ke změně partikulí. Bylo použito 15 µl partikulí Magnetic Bead Protein a byl zvolen promývací PBS-pufr. Po promytí partikulí a odebrání W1,W2,W3, bylo přidáno 100 µl glycinového pufru, vzorky byly protřepány po dobu 1 minuty a došlo k odebrání elucí (E1, E2), poté bylo přidáno 20 µl Tris pro úpravu pH. K partikulím bylo napipetováno 100 µl vzorkového SDS pufru s ME, odebrali jsme E3. Tyto vzorky se použily pro SDS elektroforézu (viz kap. 3.4.).

4.7.1.2. 8 M močovina jako eluční pufr

Výchozí množství DHRS7 enzymu a protilátky byl 1 µg. Do první zkumavky bylo vloženo 9,9 µl čistého DHRS7, 2 µl myší protilátky proti DHRS7, 138,1 µl destilované vody a 150 µl lyzačního pufru. Do druhé zkumavky se přidalo 9,9 µl DHRS7, 2,5 µl kontrolní protilátky, 137 µl destilované vody a 150 µl lyzačního pufru. Celý proces byl zopakován (viz kap. 4.7.). Jako eluční činidlo bylo zvoleno 50 µl 8 M močoviny (Evz1, Ek1) a poté 50 µl SDS vzorkového pufru. Poté byla provedena SDS elektroforéza (viz kap. 4.4.).

4.8. Test funkčnosti imunoprecipitace s buněčnými lyzáty

4.8.1. Glycinový pufr jako eluční činidlo

Pro imunoprecipitaci s buněčnými lyzáty byl zařazen krok předčištění lyzátu, který byl proveden pomocí partikulí. Bylo odebráno dvakrát po 15 µl partikulí Magnetic Bead Protein G do 2 mililitrové mikrozkumavky a byl přidán 1 ml PBS pufru. Partikule byla následně umístěny na rotátor po dobu 5 minut, pufr byl poté odebrán, promývání bylo třikrát zopakováno. Do obou mikrozkumavek s promytými partikulemi bylo přidáno 1000 µg HeLa lyzátu (odpovídá 150 µl) a 150 µl destilované vody. Odebral se původní vzorek (PV1). Mikrozkumavky se umístily na rotátor do chladící místnosti po dobu 1 hodiny a tak bylo provedeno předčištění.

Mikrozkumavky se umístily na magnetický stojan, odebralo se 5 µl původního vzorku předčištěného lyzátu (PV2), a lyzát se vložil do nových mikrozkumavek. Do mikrozkumavky označené vzorek bylo přidáno 2 µl myší protilátky proti DHRS7 a do kontrolní mikrozkumavky 2,5 µl kontrolní myší protilátky. Mikrozkumavky byly umístěny na dvě hodiny na rotátor do chladící místnosti. K partikulím použitých pro přečištění lyzátu bylo přidáno 50 ul SDS-pufru s ME (Evz1 a Ek1).

Byly promyty nové partikule stejným principem jako v prvním kroku. Z mikrozkumavek umístěných na rotátoru jsme po dvou hodinách odebrali 20 µl původního vzorku (PVvz3, PVk3). Vzorek i kontrola se přidala k novým partikulím a obě mikrozkumavky byly umístěny na dvě hodiny na rotátor do chladící místnosti.

Po dvou hodinách a umístění na magnetický stojan se odebrala povazebná frakce (PVZvz, PVZk) a vzorek i kontrola se šestkrát promyly 300 µl PBS pufru (Wvz1-Wvz6, Wk1-Wk6). Eluci byla získána přidáním 100 µl glycinového pufru a pH se upravilo 20 µl Tris, odebrána eluční frakce (Evz2, Ek2).

Poté byla provedena SDS elektroforéza (viz kap. 4.4.) a Western blotting (viz kap. 4.5.). Jako primární protilátka pro western blotting byla použita myší protilátka proti DHRS7 zředěna 1:4000 v 3 % BSA v objemu 20 ml a jako sekundární protilátka králičí proti myší protilátce zředěná 1:20 000 v 3 % BSA.

4.8.2. 8 M močovina jako eluční činidlo

Celý postup zopakován (viz kap. 3.7.1.2.) za použití buněčného lyzátu HeLa o c = 6825,85 µg /ml. Do první zkumavky se přidalo 146,5 µl buněčného lyzátu, 3,5 µl lyzačního pufru, 148 µl destilované vody a 2 µl protilátky proti DHRS7 a do druhé zkumavky 146,5 µl buněčného lyzátu, 3,5 µl lyzačního pufru, 2,5 µl králičí protilátky a 147,5 µl destilované vody. Byla provedena SDS elektroforéza a následně Western blotting (viz kap. 4.4. a 4.5.).

4.9. Optimalizace imunoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu

Proběhla koimunoprecipitace s předčistěním buněčného lyzátu HeLa. Do dvou mikrozkumavek bylo napipetováno 150 µl buněčného lyzátu a 150 µl destilované vody. Postup byl proveden dle kapitoly 3.2.8. s tím rozdílem, že inkubace buněčného lyzátu a protilátky proti DHRS7 byla přes noc (16 hodin) a jako eluční činidlo bylo použito 50 µl vzorkového SDS pufru s ME. Detekce byla provedena pomocí metody Western blotting.

Primární myší protilátka proti DHRS7 pro metodu Western blotting byla připravena v poměru 1:2000 v 20 ml 3 % BSA a sekundární králičí protilátka proti primární protilátce v poměru 1:1000 v 20 ml 3 % BSA.

4.9.1. Optimalizovaná koimunoprecipitace a příprava vzorku na MS – štěpení trypsinem z gelu

Byla provedena optimalizovaná koimunoprecipitace s modifikací času inkubace a eluce (viz kap. 4.9). Inkubace buněčného lyzátu HeLa s protilátkou proti DHRS7 trvala 16 hodin a jako eluční pufr bylo zvoleno 50 µl 5x zředěného SDS pufr. Následná SDS elektroforéza byla provedena za čistých podmínek, tak aby vzorky byly vhodné pro následnou MS analýzu.

Po proběhnutí elektroforézy byl gel rozřezán v oblasti eluce vzorku a eluce kontroly. Dohromady bylo získáno šest mikrozkumavek vzorku a šest mikrozkumavek kontroly. Při přípravě vzorků na MS je potřeba dbát zvýšené čistoty, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků keratiny.

4.9.1.1. Štěpení trypsinem

Části elektroforetického gelu se rozřezaly na kostičky (cca 1 mm^3). Do mikrozkumavek se přidalo 60 µl 50 mM hydrogenuhličitanu amonného a 40 µl 40 % acetonitrilu. Vzorky se nechaly míchat při 30 °C v termomixéru po dobu 30 minut a poté se roztok odstranil. Celý krok se zopakoval, dokud nedošlo k úplnému odbarvení. Poté se přidalo 100 µl ACN a vzorky se pořádně promíchaly v termomixéru. ACN byl po promíchání odebrán. Pro redukci cysteinů bylo přidáno 100 µl 10 mM DTT v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném a vzorky se nechaly míchat v termomixéru 45 minut při 57 °C. Roztok se odstranil a pro blokaci cysteinů bylo přidáno 100 µl 55 mM jodacetamidu v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném, vzorky byly umístěny do termomixéru po dobu 25 minut při teplotě 25 °C ve tmě a následně byl roztok opět odstraněn. Poté bylo přidáno 100 µl hydrogenuhličitanu amonného a mikrozkumavky byly umístěno do termomixéru po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Celý krok se třikrát zopakoval. Posledním krokem před přidáním štěpícího enzymu byl přídavek 100 µl ACN, po 5 minutách vortexování byl roztok odstraněn. Proces štěpení byl zahájen přidáním 10 µl roztoku trypsinu (1,0 µl trypsinu a 9,0 µl štěpícího pufr). Vzorky byly převrstveny 20 µl 50 mM hydrogenuhličitanu amonného, aby kostičky gelu během štěpení nevyschly. Vzorky se nechaly štěpit přes noc při 37 °C za

občasného míchání v termomixéru. Druhý se vzorky vložily krátce na cetrifúgu a extrahovaly se na tři výtřepky. Nejdříve s 40 µl ACN + 1 µl TFA, pak s 60 µl ACN + 1 µl TFA a nakonec s 80 µl ACN + 1 µl TFA. Výtřepky se spojily a byly odpařeny při 45 °C dosucha.

4.9.1.2. Odsolení vzorku

Odsolení vzorku bylo provedeno pomocí kolonek Empore C18-SD SPE Cartriges. Kolonky byly promyty pomocí 500 µl metanolu. Po jeho odkapání byly promyty 500 µl pufrem A (5 % ACN + 0,1 % TFA). Dále se nanesly vzorky a kolonky se doplnily pufrem A až po okraj. Po odkapání se kolonka znovu naplnila pufem A až po okraj pro lepší odsolení. Odsolený vzorek se následně eluoval 300 µl pufru B (80 % ACN + 0,1 % TFA). Eluát byl jímán do nové zkumavky a nechal se odpařit na odparce do sucha.

4.9.1.3. Nanesení na destičku

Odparek byl rozpuštěn v 25 µl pufru A a bylo odebráno 5 µl, který byl následně smíchán v poměru 1:1 s matricí (α-kyano-hydroxyskořicová kyselina 5 mg/ml v 50 % ACN + 0,1 % TFA). Tato se směs byla nanesena po 0,8 µl na destičku OPTI-TOF 384 well a destička byla odevzdána na MS analýzu, která byla provedena PharmDr. Jurajem Lenčem, Ph.D., FVZ HK Ústav molekulární patologie.

4.9.2. Optimalizovaná koimunoprecipitace a příprava vzorku na MS – štěpení trypsinem v roztoku

Pro tento proces byla využívána buněčná linie HeLa v koncentraci 14095 µg/ml. K promytým partikulím se přidalo 150 µl lyzačního pufru, 70,94 µl buněčného lyzátu HeLa (1000 µg), objem byl doplněn lyzačním pufrem do 150 µl (viz kap. 4.9.). K odebranému předčištěnému lyzátu byly přidány protilátky, 2 µl myší protilátky proti

DHRS7 (c = 0,5 mg/ml) ke vzorku a 2,5 µl kontrolní králičí protilátky (c = 200 µg/0,5 ml).

Tabulka 6: Složení vzorku a kontroly pro optimalizovanou koimunoprecipitaci a příprava vzorku na MS – štěpení trypsinem v roztoku.

Složení	Vzorek	Kontrola
HeLa	70,94 µl	70,94 µl
H_2O	77,06 µl	76,56 µl
Protilátka anti-DHRS7	2 µl	-
Kontrolní protilátka	-	2,5 µl
Lyzační puf	150 µl	150 µl

Po odebrání promývacích frakcí bylo ke vzorku a kontrole přidáno 50 µl 8 M močoviny. Mikrozkumavky jsme 5 minut nechaly rotovat, poté jsme umístili na magnetický stojan za laboratorní teploty a odebrali eluční frakci (Evz2, Ek2). Eluce (50 µl) se připravily na MS analýzu štěpením v roztoku.

4.9.2.1. Příprava vzorku na MS analýzu - štěpení v roztoku

Při přípravě vzorků na MS je potřeba dbát zvýšené čistoty. Je proto nutno pracovat v rukavicích a používat během práce na pracovní plochu lihometanol tak, aby byla omezena kontaminace keratiny.

- *Štěpení trypsinem*

Bylo odebráno 50 µl eluce ze vzorku a z kontroly. Ke vzorku bylo přidáno 1,2 µl 10 mM DTT v hydrogenuhličitanovém pufru připraveného včas potřeby a vzorky byly umístěny do termomixeru na jednu hodinu při 37 °C. Dále bylo přidáno 6,4 µl 40 mM IAA připraveného včas potřeby. Vzorky byly inkubovány třicet minut za laboratorní teploty bez přístupu světla. Po inkubaci byl přidán 8 µl 40 mM DTT a vzorky byly inkubovány za laboratorní teploty za nepřístupu světla po dobu jedné hodiny. Před začátkem štěpení byl ke vzorkům přidán 210 µl 25 mM hydrogenuhličitanu sodného. Po přidání těchto surovin klesla výsledná

koncentrace močoviny na 0,8 M. Ke vzorku se přidalo 10 µl trypsinu (koncentrace 0,2 µg/µl) a mikrozkumavky se inkubovaly přes noc (16 hodin) při teplotě 37 °C za občasného míchání. Po inkubaci byly vzorky krátce stočeny a bylo přidáno 2,5 µl TFA a vzorky se odpařily dosucha při 45 °C na odparce.

- *Odsolení vzorků*

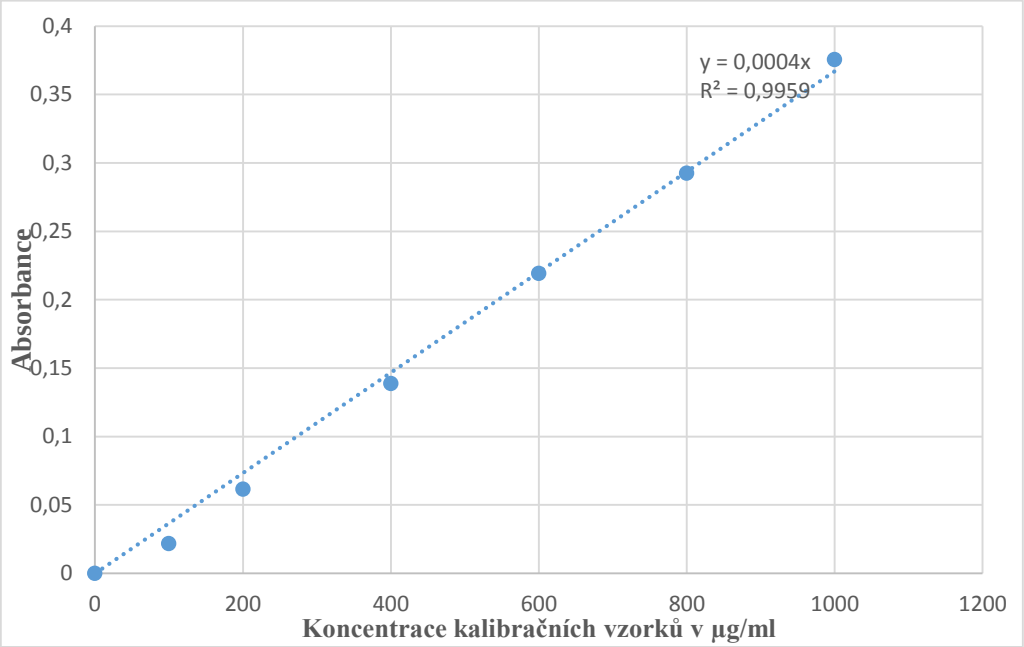
Odsolení vzorku bylo provedeno pomocí kolonek Empore C18-SD SPE Cartriges (viz kap. 3.2.9.3.), poté bylo předáno k analýze na LC-MS ve FNHK, která byla provedena PhamDr. Jurajem Lenčem, Ph.D.

E. Výsledky

5. Souhrn výsledků koimunoprecipitace a přípravy vzorků na MS

5.1. Stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích

Koncentrace proteinu byla stanovena ve vzorcích buněčných lyzátů HeLa., T-47D, MCF-7, MDA-MB-231, HCT116, Ea-hy926 a HL-60 pomocí metody podle Bradfordové. Vypočítal se průměr kalibračních vzorků v tripletech, byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 9) a rovnice regrese, díky které byly vypočítány koncentrace proteinů v jednotlivých buněčných lyzátech (Tab. 7).



Obrázek 9: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinu pomocí BSA v buněčných lyzátech linii HeLa, T-47D, MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HCT116, Ea.hy926 a HL-60.

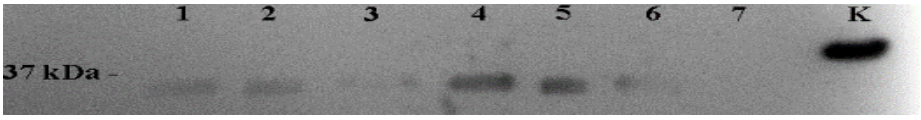
Tabulka 7: Stanovení koncentrace proteinu v lyzátech buněčných linií.

Vzorek	Koncentrace (µg/ml)
HeLa	5206,70
T-47D	2692,50
MDA-MB-231	1344,20
MCF 7	2829,20
HCT 116	3090,00
Ea.hy926	2220,83
SK-MEL-28	1010,83
HL-60	1345,83
HeLa 1	4741,94
HeLa 2	6442,94
HeLa 3	14 095,00

Tyto buněčné lyzáty byly využity pro další experimenty.

5.2. Stanovení exprese DHRS7

Stanovení exprese DHRS7 bylo provedeno v lyzátech buněčných linií HeLa, T-47D, MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HCT116, Ea.hy926 a HL-60, které byly dostupné na Katedře biochemických věd. Bylo dávkováno 25 µg proteinu, jednotlivých buněčných lyzátů.

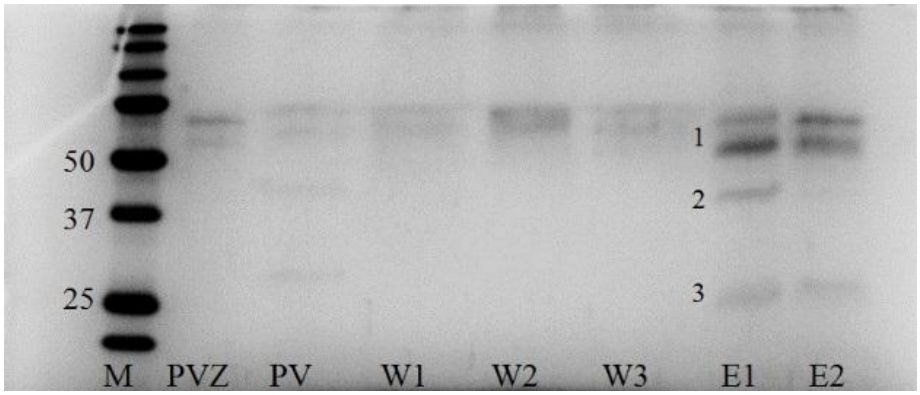


Obrázek 10: Stanovení exprese enzymu DHRS7 v lyzátech buněčných linií. Legenda: 1 - MCF7, 2 - HCT116, 3 - MDA-MB-231, 4 -T47D, 5 - HeLa, 6 – Ea.hy926, 7 - HL-60, K - *Sf9* mikrozomy obsahující rekombinantní lidskou DHRS7.

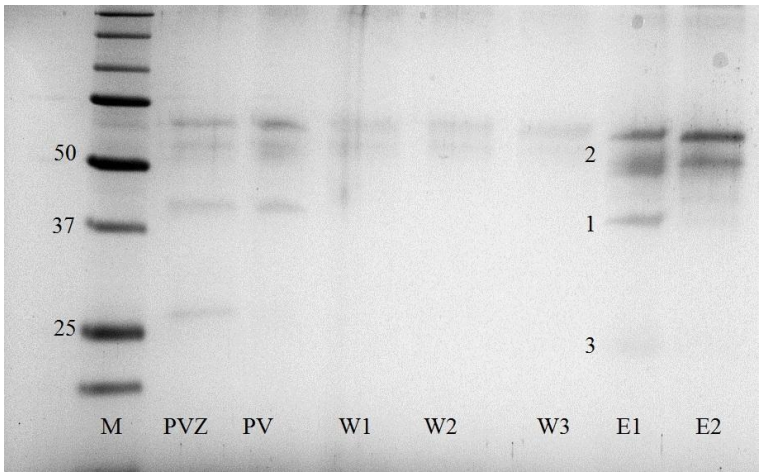
Jako kontrola byly použity mikrozomy *Sf9* buněk obsahující rekombinantní formu lidské DHRS7. Ta byla připravena ve formě fúzního proteinu s His a FLAG značkou, tudíž její molekulová hmotnost je vyšší než u nativní formy. Enzym DHRS7 je exprimován ve všech použitých buněčných liniích mimo HL-60 (Obr. 10). Nejsilnější exprese enzymu DHRS7 byla v buněčných liniích odvozených z nádoru prsu, tedy linie MCF-7, T-47D a MDA-MB-231, je nejsilnější exprese v T-47D. Exprese DHRS7 byla prokázána také v buněčné linií odvozené od nádoru děložního čípku HeLa, lyzáty této linie byly vybrány pro další studium protein-protein interakcí enzymu DHRS7.

5.3. Test funkčnosti imunoprecipitace DHRS7

Na začátku práce bylo třeba zjistit, zda je zvolená metoda imunoprecipitace funkční s dostupnou protilátkou. Na trhu v době experimentů nebyla protilátka, která by byla výrobcem garantovaná pro imunoprecipitaci. Pro test funkčnosti byl zvolen co možná nejjednodušší systém – čistý protein DHRS7 a anti-DHRS7 protilátka. Pro úvodní experiment bylo použito 500 µg DHRS7 a 500 µg protilátky (viz kap. 4.7.)



Obrázek 11: Test funkčnosti procesu imunoprecipitace enzymu DHRS7 pomocí 500 ng čistého proteinu a 500 ng protilátky proti DHRS7. Legenda: M - standard molekulových hmotností, PVZ - původní vzorek, PV - povazebná frakce, W1,W2,W3 - promývací frakce, E1, E2 - eluční frakce, 1 - exprese DHRS7 (cca 37 kDa), 2 - těžký řetězec protilátky proti DHRS7, 3 - lehký řetězec protilátky proti DHRS7.



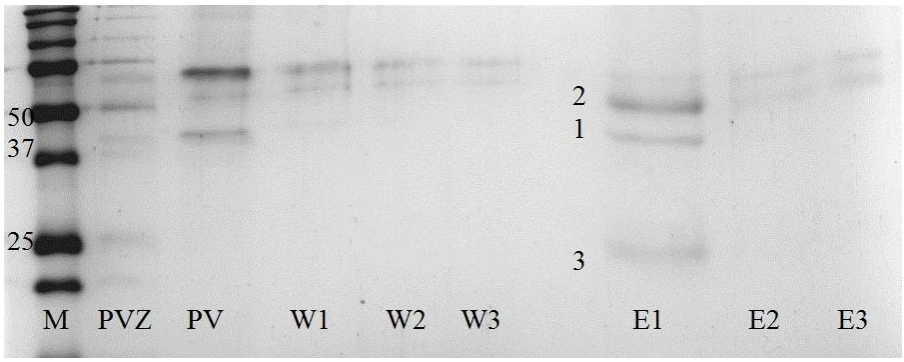
Obrázek 12: Test funkčnosti procesu imunoprecipitace enzymu DHRS7 pomocí 750 ng čistého proteinu a 750 ng protilátky proti DHRS7. Legenda: M - standard molekulových hmotností, PVZ - původní vzorek, PV - povazebná frakce, W1,W2,W3 - promývací frakce, E1, E2 - eluční frakce, 1 – exprese DHRS7 (cca 37 kDa), 2 - těžký řetězec protilátky proti DHRS7, 3 - lehký řetězec protilátky proti DHRS7.

Eluce byla provedena nespecificky, pomocí 5x zředěného vzorkového pufru na SDS elektroforézu (Obr. 11, 12). Došlo k denaturaci a eluci všech proteinů zachycených na partikulích, tedy jak DHRS7 (cca 37 kDa), tak protilátky, která po denaturaci tvoří těžké (cca 50 kDa) a lehké řetězce (cca 25 kDa). K eluci DHRS7 stačilo 50 µl vzorkového pufru (E1), v druhé eluci (E2 - 50 µl vzorkového pufru, inkubace 3 min na 95 °C) došlo k uvolnění jen zbytku protilátky. V povazebné frakci (PV) je také přítomná DHRS7 a těžké a lehké řetězce protilátky, tudíž se zdá, že inkubace vytvořeného komplexu antigen-protilátka s protein G SiMAG partikulemi po dobu jedné hodiny není dostatečná. Experimenty byly provedeny s různým množstvím čistého DHRS7 proteinu (0,5 µg - 1 µg) a protilátky (0,5 µg - 1 µg) a výsledky byly obdobné. Bylo prokázáno, že dostupná protilátka je použitelná pro imunoprecipitaci a bude možné ji použít v dalších experimentech.

5.4. Optimalizace elučního pufru

5.4.1. Glycinový pufr jako eluční činidlo

Bylo prokázáno, že eluce vytvořeného komplexu antigen-protilátka ze SiMAG protein G partikulí je možný pomocí vzorkového SDS pufru pro elektroforézu (viz kap. 4.7.1.1.). Nicméně tento postup denaturuje také Protein G na partikulích a partikule není možné použít opakovaně. Proto byl testován jemnější způsob eluce, a sice 100 µl glycinového pufru pH 2,5 po dobu 1 minuty.

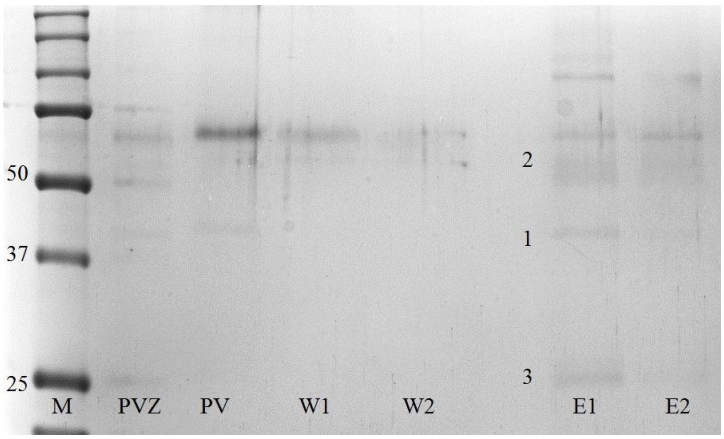


Obrázek 13: Imunoprecipitace čistého DHRS7 a protilátky proti DHRS7 s použitím glycinového pufru jako elučního činidla. Legenda: M - standard molekulových hmotností, PVZ - původní vzorek, PV - povazebná frakce, W1,W1,W3 - promývací frakce, E1 - eluce glycinovým pufrem, E2 -eluce glycinovým pufrem, E3 - eluce SDS-pufrem s ME, 1 – exprese DHRS7 (cca 37 kDa), 2 - těžký řetězec protilátky proti DHRS7, 3 - lehký řetězec protilátky proti DHRS7.

Eluce glycinovým pufrem pH 2,5 je také použitelná. Došlo k eluci jak antigenu (DHRS7), tak protilátky (lehkého a těžkého řetězce) už při první eluci (E1). V druhé eluci glycinovým pufrem (E2) a finální eluci pomocí 5x zředěného vzorkového pufru není přítomna ani protilátka, ani DHRS7. Glycinový pufr je tedy účinné eluční činidlo, daná metoda i postup funguje a není třeba ani vícenásobné eluce (Obr. 13).

5.4.2. 8M močovina jako eluční pufr

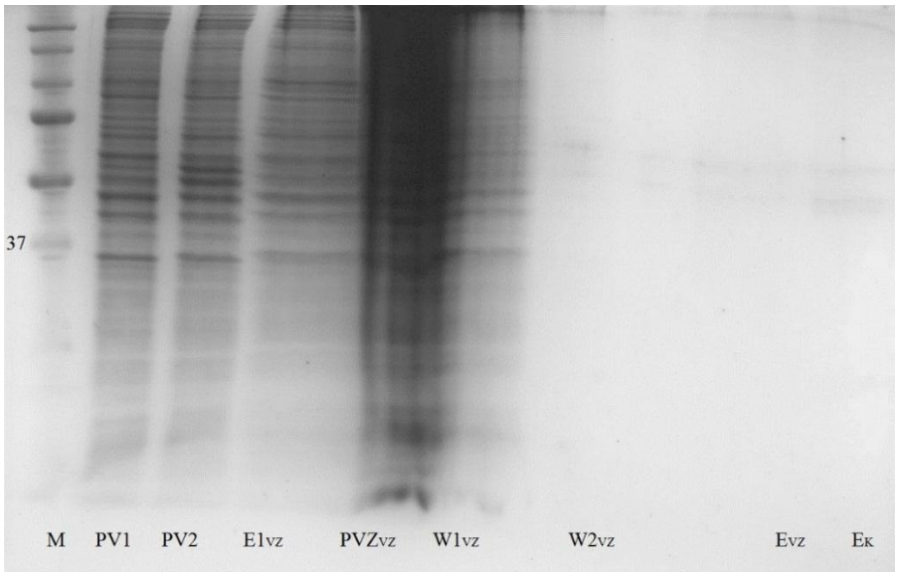
V průběhu práce nastala ještě potřeba eluce pomocím 8 M močoviny (viz kap. 4.7.1.2.). Tento způsob eluce byl opět testován na systému čistý DHRS7 enzym a protilátka proti DHRS7 (Obr. 14). V eluci je přítomna jak protilátka proti DHRS7, tak i enzym.



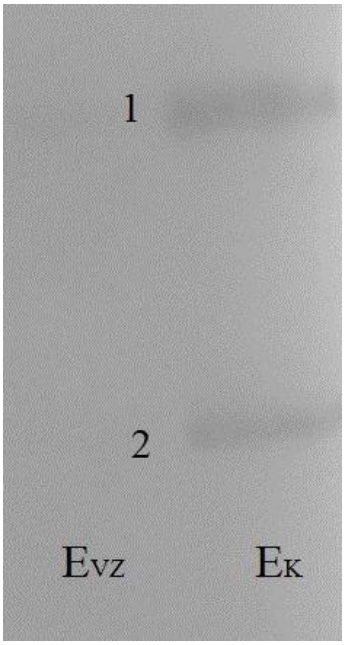
Obrázek 14: Imunoprecipitace čistého DHRS7 a protilátky proti DHRS7 s použití 8 M močoviny jako elučního činidla. Legenda: M - standard molekulových hmotností, PVZ - původní vzorek, PV - povazebná frakce, E1 - eluce vzorku 8 M močovinou, E2 - eluce vzorku 1x konc.SDS pufrem, 1 – exprese DHRS7 (cca 37 kDa), 2 - těžký řetězec protilátky proti DHRS7, 3 - lehký řetězec protilátky proti DHRS7.

5.5. Test funkčnosti koimunoprecipitace s buněčnými lyzáty

Z předchozích výsledků je zřejmé, že v jednoduchém modelovém systému imunoprecipitace DHRS7 funguje. Bylo ale třeba vyzkoušet, zda se enzym DHRS7 bude vázat se specifickou protilátkou také z biologického materiálu, tedy z buněčného lyzátu HeLa, kde je DHRS7 přirozeně exprimován v nativní formě.



Obrázek 15: Koimunuprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu HeLa s použitím 100 µl glycinového pufru jako elučního činidla. Legenda: M- standard molekulových hmotností, PV1- původní vzorek, PV2- čistý lyzát, E1vz- eluce vzorku SDS-pufrem, PVZvz - povazebná frakce vzorku, W1vz,W2vz- promývací frakce vzorku, Evz- eluce vzorku glycinovým pufrem, Ek- eluce kontroly glycinovým pufrem.

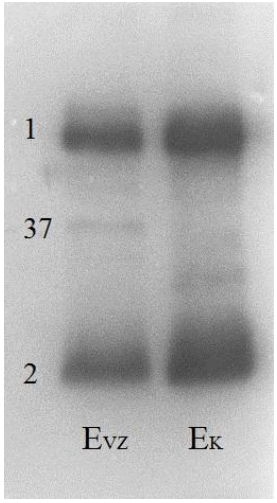


Obrázek 16: Koimunuprecipitace DHRS7 buněčného lyzátu HeLa s použitím 100 µl glycinového pufru jako elučního činidla (WB). Legenda: Evz - eluce vzorku glycinovým pufrem, Ek - eluce kontroly glycinovým pufrem, 1 – těžký řetězec protilátky, 3 - lehký řetězec protilátky.

Podle expozice fotofilmu nedošlo k výskytu enzymu DHRS7, objevily se pouze lehké a těžké řetězce protilátek. (Obr. 16). Zdá se, že doba inkubace enzymu a protilátky (2 hodiny) nebyla dostatečná a nedošlo k vytvoření komplexu antigen – protilátky (Obr. 15, 16).

5.6. Ověření funkčnosti koimunoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu

Po předchozích výsledcích, kdy doba inkubace buněčného lyzátu HeLa a myší protilátky proti DHRS7 nebyla dostatečná, došlo k prodloužení doby inkubace antigenu a protilátky, a jako eluční činidlo byl použit opět denaturační vzorkový SDS pufr (Obr. 17).



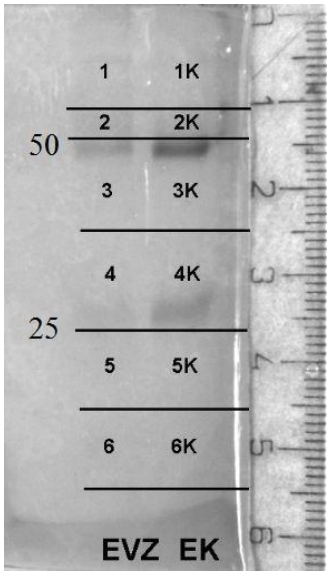
Obrázek 17: Ověření funkčnosti koimunoprecipitace DHRS7 z buněčných lyzátů. Legenda: Evz - eluce vzorku SDS pufrem, Ek - eluce kontroly SDS pufrem, 37 - exprese enzymu DHRS7, 1 - těžký řetězec protilátky proti DHRS7, 2 - lehký řetězec protilátky proti DHRS7.

Díky metodě Western blotting jsme prokázali, že protilátka je schopna po inkubaci přes noc vázat a precipitovat cílový protein DHRS7 z buněčného lyzátu HeLa. Vytvořený komplex je pak možné vázat na partikule s proteinem G a následně eluovat (Obr. 18). V eluci vzorku přítomný DHRS7 (37 kDa) a řetězce protilátky, zatímco v kontrole se DHRS7 nevyskytuje. Optimalizovaný postup bude použit dál pro

identifikaci proteinů, které interagují s enzymem DHRS7 a mohou být koprecipitovány pomocí specifické protilátky.

5.7. Koimunoprecipitace a MS analýza vzorků připravených štěpením z gelu

Po optimalizaci a ověření funkčnosti dané metody (viz kap. 5.6.) byl celý postup zopakován za použití buněčného lyzátu HeLa, ale tentokrát za podmínek, kdy je omezena kontaminace vzorků keratiny kvůli následné analýze vzorku pomocí MS. Pro MS analýzu byly použity dva poslední proužky elektroforetického gelu, eluce vzorku a eluce kontroly. Každý byl rozřezán na šest dílů (Obr. 18) a ty byly připraveny k analýze MS štěpením proteinu trypsinem v gelu dle postupu v kapitole 4.9.1.



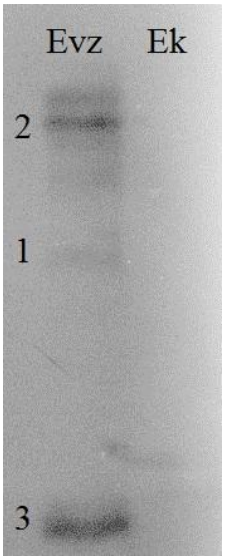
Obrázek 18: Optimalizovaná koimunoprecipitace DHRS7 buněčného lyzátu HeLa a příprava vzorků na MS štěpením gelu. Štěpení proteinů přítomných v gelu pomocí trypsinu. Legenda: Evz- eluce vzorku, Ek-eluce kontroly.

I přesto, že byl celý postup přípravy vzorků proveden za podmínek, které omezují kontaminaci vzorků keratiny či jinými nečistotami, byly vzorky znečištěny látkou polymerního charakteru. Díky tomu byla snížena citlivost a vypovídající hodnota MALDI-TOF analýzy, ze které nebylo možné udělat žádné závěry týkající se interakčních partnerů DHRS7. Nebylo možní identifikovat ani samotnou DHRS7 v části

třetí. Navíc využití MALDI-TOF analýzy v tomto uspořádání (rozřezání gelu na větší úseky s následným štěpením v gelu) bylo vyhodnoceno jako ne zcela vhodné. Vhodnější by byla analýza pomocí LC-MS, kdy jsou získané peptidy chromatograficky rozděleny a pak teprve analyzovány. Pro takovou analýzu bude třeba připravit vzorky pomocí štěpení v roztoku.

5.8. Ověření funkčnosti koimunoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu pomocí 8 M močoviny

Vzhledem k závěrům z předchozí analýzy a nutnosti případného štěpení proteinů trypsinem v roztoku, je třeba vyzkoušet funkčnost jiné eluce, a sice eluce 8 M močovinou, protože SDS pufr není kompatibilní s LC-MS. Funkčnost byla provedena na systému čistý enzym a protilátka (viz kap. 4.7.1.2.).



Obrázek 19: Koiminoprecipitace DHRS7 z buněčného lyzátu HeLa s použití 8 M močoviny jako elučního činidla. Legenda: Evz- eluce vzorku glycinovým pufrem, Ek- eluce kontroly glycinovým pufrem, 1- exprese DHRS7 v poloze 37 kDa, 2 - těžký řetězec protilátky proti DHRS7, 3 - lehký řetězec protilátky proti DHRS7.

Z obrázku 19 bylo zjištěno, že i 8M močovina je schopná eluovat komplex antigen-protilátka z protein G partikulí. Je tedy možné použít i tento způsob eluce.

5.9. Koimunoprecipitace a MS analýza vzorků připravených štěpením v roztoku

Pro zisk relevantních výsledků po MS analýze bylo třeba provést štěpení elucí po koimunoprecipitaci v roztoku a analyzovat je pomocí LC-MS, tudíž bylo třeba z eluce vyřadit SDS, které s LC-MS stanovením interferuje. Byl tedy proveden postup koimunoprecipitace (viz kap. 4.9.) a eluce byla provedena pomocí 8 M močoviny. Její účinnost a vhodnost pro eluci byla předem testována (viz kap. 4.8.2.). Proteiny eluční frakce ze vzorku i kontroly byly štěpeny v roztoku (viz kap. 4.9.2.1.) a analyzovány pomocí LC-MS. Získané výsledky pro vzorek a kontrolu byly vzájemně porovnány, proteiny, které se nachází pouze ve vzorku, mohou být potenciální interakční partneři DHRS7. Ve vzorku byl samozřejmě identifikován studovaný protein DHRS7. Vyhodnocení komplikuje fakt, že díky přítomnosti myších protilátek v eluci vzorku i kontroly, musela být mimo databáze lidských proteinů použita pro vyhodnocení výsledků z hmotnostního spektrometru i databáze myších proteinů a ve výsledcích byly identifikovány myší proteiny, které mají v některých případech vysokou sekvenční shodu s lidskými proteiny, a není tedy jisté, zda jde ve skutečnosti o lidský nebo myší protein.

Tabulka 8: Potenciální interakční partneři lidského enzymu DHRS7.

Číslo	Název	Funkce
P51114	Protein související s mentální retardací způsobenou se syndromem fragilního X (FXR1)	Embryonální a postnatální vývoj svalové tkáně.
Q9NVA2	Septin-11 (SEP11)	Tvorba cytoskeletální GTPázy, role v cytokinezi.
O60341	Lysin-specifická histondemetyláza (KDM1A)	Regulace proteinu p53, koaktivátor androgenního receptoru.
Q9H7S9	Protein se zinkovými prsty 703 (ZN703)	Regulace buněčné adheze, migrace a proliferace.
O43251	RNA vázající fox 1 protein, homolog 2 (RFOX2)	Regulace v erytropoéze.
P11310	Acyl-CoA dehydrogenáza specifická pro středně dlouhé mastné kyseliny (ACADM)	Katalyzuje první krok β-oxidace MK.
P25398	40S ribozomální protein S12 (RS12)	Strukturální složka ribozomů, účast na genové expresi, iniciaci, elongaci a terminaci translace
P25786	Proteazomová podjednotka typu alpha 1 (PSA1)	ATP-dependentní proteolytická aktivita.

Protein FXR1 se kromě úlohy v embryonálním vývoji svalové tkáně podílí na vzniku syndromu fragilního X díky genu FMR1. Mutace v tomto genu způsobí mentální

retardaci narozeného dítěte. Role tohoto proteinu se nadále zkoumá a zdá se, že se vyskytuje nejenom ve svalové tkáni a v mozku. (Internet 9, Siomi et al. 1995). SEP11 vykazuje také určitou podobnost s γ-aminomáselnou kyselinou (GABA) a předpokládá se jeho role ve stavbě neuronů (Hanai et al. 2004). KDM1A řadíme mezi enzym zodpovědných za koaktivaci androgenního receptoru a mimo to, způsobí stabilizaci DNA-metylázy DNMT1, která je zodpovědná za tvorbu gastruly v průběhu embryogeneze (Metzger et al. 2005). U ZN703 a RFOX2 byly publikovány práce, popisující jich úlohu v karcinomu prsu, kdy RFOX2 se podílí na negativní regulaci ER-apha, zodpovědnou za správnou buněčnou regulaci a diferenciaci (Holland et al. 2011, Norris et al. 2002). ACADM se účastní v β-oxidaci mastných kyselin, při které vzniká acetylkoenzym A podílející se na metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin. RS12 a PSA1 se účastní translace bílkovin a regulace genové exprese.

F. Diskuze

Imunoprecipitace je metoda založená na interakci antigenu a protilátky, při níž dochází ke vzniku detekovatelných komplexů. Princip imunoprecipitace se využívá v řadě metod, jak k diagnostickým (např. imunodifúze), tak i k výzkumných. (např. chromatinová imunoprecipitace – ChIP). Metoda imunoprecipitace se dá také využít pro identifikaci vazebných partnerů proteinů, pak se nazývá koimunoprecipitace. Jde o jednoduchou metodu a především kvůli tomu, že prostřednictvím této metody můžeme vytipovat některé interakční partnery, i když přesně nevíme, které hledáme. Můžeme tedy tvrdit, že metoda imunoprecipitace je univerzální a antigeny interagují s protilátkou ve svém nativním stavu, který je důležitý pro jejich následnou separaci.(Internet 10). Jejím problémem je delší doba zpracování a také musíme dbát na výběru vhodné protilátky, aby byl výsledek pozitivní (Kaboord a Perr 2008).

Velmi důležitým krokem celé koimunoprecipitace, byl výběr vhodných partikulí. V této práci byly zvoleny magnetické partikule, u nichž se předpokládá schopnost navázat velké proteinové komplexy. Agarózové partikule mají sice větší vazebnou kapacitu, ale mají problém s vázáním větších komplexů. Větší vazebná kapacita může vést k vyšší pravděpodobnosti výskytu nespecifických interakcí. (Alber et al. 2007).

Nevýhodou metody koimunoprecipitace jsou nespecifické interakce doprovázené falešně pozitivními výsledky. Pro jejich odstranění je třeba zařadit krok předčištění buněčného lyzátu (Moser et al. 2010), kdy se biologický vzorek inkubuje s partikulemi, které se později používají k vychytávání komplexu antigen – protilátka. Další možností je použití kontrolní protilátky, protože musíme počítat s tím, že i na samotnou protilátku se mohou vázat interakční partneři. Předčištění buněčného lyzátu se uskutečnilo před vlastním provedení procesu koimunoprecipitace s cílem snížit počet nespecifických interakcí (Harlow, Lane 2006). Buněčný lyzát je směs různých proteinů, nukleových kyselin a cukrů, a proto výskyt nespecifických interakcí musíme předpokládat. Tento krok je důležitý především při použití agarózových partikulí, které mají velkou vazebnou kapacitu a tedy větší pravděpodobnost nespecifických interakcí. V této studii byl proces předčištění zařazen z důvodu odstranění proteinů, které se nespecificky vážou na partikule. Následně na partikulích zůstalo více volných proteinů G vychytání komplexu antigen-protilátka (Internet 11).

Po eluci vytvořených komplexů z částic je možné použít SDS pufr nebo glycinový pufr. Na systému čistý enzym DHRS7 a protilátka proti tomuto enzymu byl nejdříve používán vzorkový SDS pufr. Tento pufr je považován za silně denaturující a je velmi účinný a efektivní (Pirici et al. 2009). Dále lze použít glycinový pufr jako eluční činidlo, jedná se o nedenaturující pufr, takže oproti vzorkovému SDS pufru jde o jemnější způsob eluce. Problém toho pufru ale je, že má příliš nízké pH, takže v některých případech nedojde k disociaci protilátky a antigenu (Internet 12).

Detekce komplexů probíhá SDS elektroforézou, která slouží k separaci proteinů na základě velikosti s detekci pomocí molekulového standardu, díky kterému můžeme určit velikost detekovaného proteinu. Další metodou detekce v tomto výzkumu byla metoda Western blotting. U této metody používáme protilátky namířené proti konkrétnímu proteinu, což je velmi důležité, bez vhodné protilátky nemá Western blotting využití. Po první analýze potenciálních interakčních partnerů pomocí MALDI-TOF byl pro získání elucí používán vzorkový SDS pufr a příprava vzorků po koimunoprecipitaci proběhla pomocí štěpení trypsinem z gelu. Bohužel, štěpení trypsinem z gelu a analýza vzorků pomocí MALDI-TOF byla pro naše studium nevhodná, z důvodu velkých kusů gelu obsahující velké množství proteinů, proto byla pro následnou analýzu využita LC-MS. V tomto případě bylo ale potřeba použít jako eluční pufr 8 M močovinu, jelikož vzorkový SDS pufr s LC-MS interferuje (ten Have et al. 2011). Použití 8 M močoviny bylo vhodné, jelikož vzorek může být štěpen proteolytickými enzymy. LC-MS je velice nákladná a drahá metoda, proto byla volena jako druhá možnost, je ale více citlivá a schopna na rozdíl od MALDI-TOF nejdříve chromatograficky rozdělit peptidy a následně je analyzovat (Berna et al. 2007).

Výzkum interakčních partnerů enzymu DHRS7 nebyl doposud proveden. Tento enzym byl pouze prokázán jako interakční partner transkripčního faktoru c-myc (Cheng et al. 2010). V databázích BioGRID nebo STRING jsou přítomny různé výsledky týkajících se proteinů interagujících s DHRS7 (Internet 13, Internet 14). Tyto databáze zobrazují zejména výsledky velkých interaktomických nebo bioinformatických studií bez ověřování jednotlivých interakcí. Žádný s námi identifikovatelných proteinů se v uvedených databázích nenachází jako potencionální interakční partner DHRS7. Nicméně podobně jako v našich výsledcích lze nalézt v databázi STRING jako možné interakční partnery DHRS7 enzymy, které se účastní metabolismu mastných kyselin

(např. trans-2,3-enoyl-CoA reduktáza). U strukturně blízkého enzymu DHRS7, enzymu 11β-HSD1 účastnící se přeměny kortizonu na aktivní kortizol, byl jako interakční partner prokázána glukózo-6-fosfátdehydrogenáza, která tomuto enzymu dodává NADPH (Walker et al. 2007). Analýza potenciálních interakčních partnerů enzymu DHRS7 nám může pomoct popsat jeho funkci *in vivo*. Výsledky získané v této pilotní studii je nutné ověřit i jinou metodou pro studium protein-protein interakcí. Vhodnou volbou by mohla být metoda separace pomocí afinitních ligandů, na které se jíž v rámci této diplomové práce částečně pracovalo, ale proces zavedení a optimalizace postupu nebyl zatím dokončen.

G. Závěr

V rámci studia této práce došlo k optimalizaci metody koimunoprecipitace pro studium interakcí lidského DHRS7 enzymu v buněčném lyzátu HeLa. Byly stanoveny podmínky i doba inkubace daného enzymu s protilátkou a došlo pomocí metody LC–MS elučních frakcí k nalezení potenciálních interakčních partnerů enzymu DHRS7, kteří nám mohou objasnit jeho funkci v organismu. Výsledky v této práci jsou pouze prvotní, proto by bylo vhodné při dalších studiích potvrdit tyto výsledky jinou metodou pro studium protein-protein interakcí.

H. Seznam obrázků

Obrázek 1: Rozdělení protein-proteinových interakcí v závislosti na délce jejich trvání.....7

Obrázek 2: Princip koimunoprecipitace, vychytávání komplexu antigen-protilátka pomocí agarózových kuliček……..9

Obrázek 3: Schéma struktury protilátky - tvar písmene „Y“ složeného ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců……..... 10

Obrázek 4: Označení cílového proteinu pomocí protilátek v metodě Western blotting…….....13

Obrázek 5: Princip metody Separace pomocí afinitních ligandů……..... 15

Obrázek 6: Princip metody TAP. Cílový protein ve fúzi ke dvěma fúzním sekvencím, CBP a proteinu A, navzájem spojených sekvencí obsahující vazebné místo pro TEV proteázu……..16

Obrázek 7: Popis metody Far western…….. 18

Obrázek 8: Struktura zástupce SDR nadrodiny…… 20

Obrázek 9: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinu v buněčných lyzátech linii HeLa, T-47D, MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HCT116, Ea.hy926 a HL-60…….. 48

Obrázek 10: Stanovení exprese enzymu DHRS7 v lyzátech buněčných linií…… 49

Obrázek 11: Test funkčnosti procesu imunoprecipitace enzymu DHRS7 pomocí 500 ng čistého proteinu a 500 ng protilátky proti DHRS7…….....50

Obrázek 12: Test funkčnosti procesu imunoprecipitace enzymu DHRS7 pomocí 750 ng čistého proteinu a 750 ng protilátky proti DHRS7……..…51

Obrázek 13: Imunoprecipitace čistého DHRS7 a protilátky proti DHRS7 s použitím glycinového pufru jako elučního činidla……....52

Obrázek 14: Imunoprecipitace čistého DHRS7 a protilátky proti DHRS7 s použití 8 M močoviny jako elučního činidla……..... 53

Obrázek 15: Koimunoprecipitace buněčného lyzátu HeLa s použití 100 µl glycinového pufru jako elučního činidla……54

Obrázek 16: Koiminoprecipitace buněčného lyzátu HeLa s použití 100 µl glycinového pufru (WB) jako elučního činidla……...…54

Obrázek 17: Ověření funkčnosti koimunoprecipitace DHRS7 z buněčných lyzátů……... 55

Obrázek 18: Optimalizovaná koimunoprecipitace buněčného lyzátu HeLa a příprava vzorků na MS štěpením z gelu……... 56

Obrázek 19: Koimunoprecipitace buněčného lyzátu HeLa s použitím 8 M močoviny jako elučního činidla…….. 57

I. Seznam tabulek

Tabulka 1: Koncentrace roztoků BSA použitých pro vytvoření kalibrační řady pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích…….. 34

Tabulka 2: Složení separačního gelu o koncentraci 12%.....35

Tabulka 3: Složení zaostřovacího gelu o koncentraci 4%.....36

Tabulka 4: Přepočet vzorků pro elektroforézu s ohledem na koncentraci proteinů……. 40

Tabulka 5: Složení směsi pro imunoprecipitace pro 500 ng, 750 ng a 1 µg……... 41

Tabulka 6: Složení vzorku a kontroly pro optimalizovanou koimunoprecipitaci a příprava vzorku na MS – štěpením z roztoku……..…46

Tabulka 7: Stanovení koncentrace proteinu v lyzátech buněčných linií dle metody Bradfordové……....49

Tabulka 8: Potenciální interakční partneři lidského enzymu DHRS7……...…… 59

J. Seznam zkratek

6xHis	hexahistidinová kotva
11β-HSD1	11β-hydroxysteroiddehxdrogenáza 1
AA	Akrylamid
ACADM	Acyl-CoA dehydrogenáza specifická pro středně dlouhé mastné kyseliny
ACN	Acetonitril
APS	Persíran amonný
AR	Androgenní receptor
Asp	Aspartam
ATP	Adenosintrifosfát
BRET	Bioluminiscenční resonanční přenos energie
BSA	Bovinní sérový albumin
CBP	Protein vázající kalmodulin
CHAPS	3-((3-chloramidopropyl)dimethylamonnio)-1-propansulfát
CFP	Žlutozelený fluorescenční protein
CPPC	Kastraci rezistentní rakovina prostaty
DHRS7	Dehydrogenáza/reduktáza s krátkým řetězcem 7
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein isothiokyanát

FLAG	8 aminokyselinnový epitop
FXR1	Protein související s mentální retardací způsobenou se syndromem fragilního X
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GDP	Guanosindifosfát
GFP	Zelený fluorescenční protein
Gly	Glycin
GST	Gluthation-S-transferáza
GTP	Guanosintrifosfát
HA	Hemaglutinin
HCl	Kyselina chlorovodíková
HRP	Křenová peroxidáza
KCl	Chlorid draselný
KDM1A	Lysin-specifická histondemetyláza
KH_2PO_3	Dihydrogenfosforečnan draselný
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
Lys	Lysin
MALDI	Matrix-assisted laser ionization
ME	Merkaptoethanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
NaCl	Chlorid sodný

NADPH	Nikotinadenindinukleotidfosfát
Na_2HPO_3	Hydrogenfosforečnan disodný
NaH_2PO_3	Dihydrogenfosforečnan sodný
PBS	Phosphatase Buffered Saline
PSA1	Proteazomová podjednotka typu alpha 1
PVDF	Polyvinyliden fluorid
RFOX2	RNA vázající fox 1 protein, homolog 2
Rpm	Počet otáček za minutu
RS12	40S ribozomální protein S12
SDR	Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem
SDS	Dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gely v přítomnosti SDS
SEP11	Septin-11
Ser	Serin
TAP	Tandemová afinitní purufukace
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	Virus tabákové mozaiky
TFA	Trifluoroctová kyselina
TOF	Detektor doby letu

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
YFL	Žlutý fluorescenční protein
Thy	Tyrosin
ZN703	Protein se zinkovými prsty 703

K. Seznam použité literatury

Acuner Ozbabacan S.E., Engin H.B., Gursoy A., Keskin O. (2011) Transient protein–protein interactions. *Protein engeneering, design and selection: PEDS*, 24, 635-648.

Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprapto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B.T., Rout M.P., Sali A. (2007). Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* , 450, 683–94.

Askew E.B., Gampe R.T., Stanley T.B., Faggart J.L., Wilson E.M. (2007) Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone. *Journal of Biochemical method*, 35, 25801-16.

Bartůňková J., Hořejší V. (2009). Základy imunologie. 316 stran, ISBN 978-80-7387-280-9.

Berggård T., Linse S., James P. (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteiomics*, 16, 2833-2842.

Berna M.J., Zhen Y., Watson D.E., Hale J.E., Ackermann B.L. (2007) Strategic use of immunoprecipitation and LC/MS/MS for trace-level protein quantification: myosin light chain 1, a biomarker of cardiac necrosis. *Analytical chemistry*, 9, 4199-4205.

Bhatia C., Oerum S., Bray J., Kavanagh K. L., Shafqat N., Yue W., Oppermann U. (2015) Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships. *Chemico-biological interactions*, 234, 114-125.

Brychtová V., Vojtěšek B. (2014) Detekce proteinů, proteinových interakcí a modifikací s využitím „proximity ligation assay“ in situ. *Klinická onkologie*, 27, S87 – S91.

Cox M.M., Phillips G. (2008) Handbook of Proteins: Structure, Function and Methods. 2 Volume Set, 1378 stran, ISBN: 978-0-470-06098-8.

Cheng P.C., Chang H.K., Chen S.H. (2010) Quantitative Nanoproteomics for Protein Complexes (QNanoPX) Related to Estrogen Transcriptional Action. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9, 209–224.

de Wit N.J., Bosch-Vermeulen H., de Groot P.J., Hooiveld G.J., Bromhaar M.M., Jansen J., Müller M., van der Meer R. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC medical genomics*, 6, 14.

Ďurech M., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P. (2014) Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí. *Klinická onkologie*, 27, S75 – S81.

Gabrielli F., Tofanelli S. (2012) Molecular and functional evolution of human DHRS2 and DHRS4 duplicated genes. *Gene*, 511, 461-469.

Guo K., Lukacik P., Papagrigoriou E., Meier M., Lee W.H., Adamski J., Oppermann U. (2006) Characterization of human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme: a novel, cytosolic type 2 R-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 281, 10291-10297.

Haeseleer F., Palczewski K. (2000) Short-chain dehydrogenases/reductases in retina, *Methods in enzymology*. 316, 372-383.

Hanai N., Nagata K., Kawajiri A., Shiromizu T., Saitoh N., Hasegawa Y., Murakami S, Inagaki M. (2004) Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11, *FEBS letters*. 568, 83-88.

Harlow E., Lane D. (2006) Immunoprecipitation: preclearing the lysate, *CSH protocols*. 4.

Hoffmann E., Stroobant V. (2007) Mass spectrometry, Principles and Apllications, 3. Edition. 502 stran, ISBN: 978-0-470-03310-4.

Holland D.G., Burleigh A., Git A., Goldgraben M.A., Perez-Mancera P.A., Chin S.F., Hurtado A., Bruna A., Ali H.R., Greenwood W., Dunning M.J., Samarajiwa S., Menon S.,Rueda O.M., Lynch A.G., McKinney S., Ellis I.O., Eaves C.J., Carroll J.S., Curtis C., Aparicio S., Caldas C. (2011) ZNF703 is a common Luminal B breast cancer oncogene that differentially regulates luminal and basal progenitors in human mammary epithelium. *EMBO molecular medicine*, 3, 167-180.

Jílek, P. (2014) Imunologie. 96 stran, ISBN 978-80-247-4822-1.

Jörnvall H., Landreh M., Östberg L.J. (2015) Alcohol dehydrogenase,SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chemico-biological interactions*, 234, 75-79.

Kaboord B., Perr M. (2008) Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation, *Methods in molecular biology*. 424, 349-364.

Kavanagh K.L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Celullar and molecular life scineces:CMLS*, 65, 3895-3906.

Keskin O., Gursoy A., Ma B., Nussinov R. (2008) Principles of Protein-Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact? *Chemical reviews*, 108, 1225-1244

Kovářová H. (2005) Proteiomika v postgenomové době. *Chemické listy*, 99, 886 – 889.

La D., Kong M., Hoffman W., Choi Y.I., Kihara D. (2013) Predicting Permanent and Transient Protein-Protein Interfaces. *Proteins*, 81, 805-18.

Liu Z.Q., Mahmood T., Yang P.C. (2014) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American journal of medical sciences*, 6, 160.

Mahmood T., Yang P.C. (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American journal of medical sciences*, 4, 429-434.

Master S.C. (2004). Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods in molecular biology*, 261, 337-350.

Matoulková E., Vojtěšek B. (2014) Detekce protein-proteinových interakcí metodami FRET a BRET. *Klinická onkologie*, 27, S82 – S86.

Metzger E., Wissmann M., Yin N., Müller J.M., Schneider R., Peters A.H., Günther T., Buettner R., Schüle R. (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 437, 436-439.

Mohler J.L., Titus M.A., Bai S., Kennerley B.J., Lih F.B., Tomer K.B., Wilson E.M. (2011) Activation of the androgen receptor by intratumoral bioconversion of androstanediol to dihydrotestosterone in prostate cancer. *Cancer research*, 71, 1486-1496.

Moser J.J., Edward K.L.Chan, Fritzler M.J. (2010) Optimization of immunoprecipitation–western blot analysis in detecting GW182-associated components of GW/P bodies. *Nature Protocols*, 4, 674 – 685.

Norris J.D., Fan D., Sherk A., McDonnell D.P. (2002) A negative coregulator for the human ER. *Molecular endokrinology (Baltimore, Md.)*, 16, 459-468.

Perkins J.R., Diboun I., Dessailly B.H., Lees J.G., Orengo C. (2010) Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure*, 18, 1233-1243.

Persson B, Kallberg Y., Bray J.E., Bruford E., Dellaporta S.L., Favia A.D., Duarte R.G., Jörnvall H., Kavanagh K.L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R.,Orchard S., Penning T.M., Thornton J.M., Adamski J., Oppermann U. (2009) The SDR (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase and Related) nomenclature initiative. *Chemico-biological interactions*, 178, 94-98.

Pirici D., Mogoanta L., Kumar-Singh S., Pirici I., Margaritescu C., Simionescu C., R. (2009) Antibody Elution Method for Multiple Immunohistochemistry on Primary Antibodies Raised in the Same Species and of the Same Subtype. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57, 567–575.

Pláteník, J. (2008). Elektroforéza v biochemii. Ústav lékařské biochemie 1.LF UK, 7 stran.

Romanuik T.L., Wang G., Morozova O., Delaney A., Marra M.A., Sadar M.D. (2010) LNCaP Atlas: gene expression associated with in vivo progression to castration-recurrent. *BMC medical Genomics*, 3, 43.

Sanchez C., Lachaize C., Janody F., Bellon B., Röder L., Euzenat J., Rechenmann F., Jacq B. (1999). Grasping at molecular interactions and genetic networks in Drosophila melanogaster using FlyNets, an Internet database. *Nucleic acids research*, 27, 89-94.

Seibert J.K., Quagliata L., Quintavalle C., Hammond T.G., Terracciano L., Odermatt A. Julia K. (2015). A role for the dehydrogenase DHRS7 (SDR34C1) in prostate. *Cancer medicine*, 4, 1717-1729.

Siomi M.C., Siomi H., Sauer W.H., Srinivasan S., Nussbaum R.L., Dreyfuss G. (1995). FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *The EMBO journal*, 4, 2401-2408.

Skálová L., Boušová I. a kol. (2011) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. 162 stran, ISBN 9788024619170.

Srinivasa Rao V., Srinivas K.,Sujini G.N., G.N. (2014) Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 147648.

Štambergová, H. (2013) Lidské membránově vázané karbonylreduktasy. Disertační práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 120 stran.

Štambergova H., Škarydova L., Dunford J.E., Wsól V. (2014) Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chemico-biological interactions*, 207, 52-57.

Štambergová H., Zemanová L., Lundová T., Malčeková B., Skarka A., Šafr M., Wsól V. (2016) Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids? *The Journal of steroid biochemistry and molecular byiology*, 155, 112-119.

Thermo Fisher Pierce (2010) Protein interaction, Technical Handbook. Version 2, 76 stran.

ten Have S., Boulon S., Ahmad Y., Lamond A.I. (2011) Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics*, 11, 1153-1159.

Tomášek J., Berkovcová J. (2013) Onkogeny Ras-prediktivní molekulární marker u kolorektálního karcinomu. *Klinická Onkologie*, 26, 366–367.

Tomlins S.A., Mehra R., Rhodes D.R., Cao X., Wang L., Dhanasekaran S.M., Kalyana-Sundaram S., Wei J.T., Rubin M.A., Pienta K.J., Shah R.B., Chinnaiyan A.M. (2007) Integrative molecular concept modeling of prostate cancer. *Nature genetics*, 39, 41-51.

Thanh Huonga T., Komínková M., Guráň R., Ruttkay-Nedecký B., Kopel P., Trnková L, Zítka O., Adam V., Kizeka R. (2014). Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 1, 64—66.

Walker E.A., Ahmed A, Lavery G.G., Tomlinson J.W., Kim S.Y., Cooper M.S., Ride J.P., Hughes B.A., Shackleton C.H., McKiernan P., Elias E., Chou J.Y., Stewart P.M. (2007) 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Regulation by Intracellular Glucose 6-Phosphate Provides Evidence for a Novel Link between Glucose Metabolism and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Function. *The Journal of biological chemistry*, 282, 27030-27036.

Wildová M., Rumlová M. (2008) Metody studia vzájemných interakcí proteinů. *Chemické listy*, 102, 28−34

Internet:

Internet 1. *Introduction to antibody*. Online [cit. 2016-2-13]. Dostupné z: <http://www.tau.ac.il/~karena/protocols/IHC_intro%20to%20antibodies.pdf>

Internet 2. *Protilátky – LabGuide.cz.* Online [cit. 2016-3-20]. Dostupné z: <http://labguide.cz/protilatky/>

Internet 3. *Mass Spectrometry – MSU Chemistry.* Online [cit. 2016-4-13]. Dostupné z:<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.html.>

Internet 4. *Far-Western Blot Analysis - Thermo Fisher Scientific.* Online [cit. 2016-4-11]. Dostupné z: < https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/far-western-blot-analysis.html>

Internet 5. *SDR (short-chain dehydrogenase/reductase).* Online [cit. 2016-4-11]. Dostupné z: <http://www.sdr-enzymes.org/>

Internet 6. *Techniques:Elekctrophoresis.* Online [cit. 2016-4-11]. Dostupné z: <https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>

Internet 7. *Pull-Down Assay – Thermo Fisher Scientific.* Online [cit. 2016-4-11]. Dostupné z: < 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 8. *Protein Biotechnology - Digitális Tankönyvtár.* Online [cit. 2016-4-11]. Dostupné z: <http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Proteinbiotech_en_book/ch07.html>

Internet 9. *Fragile X syndrome - Genetics Home Reference*. Online [cit. 2016-5-2]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/fragile-x-syndrome>

Internet 10. *A Universal Method for Peptide Identification*. Online [cit. 2016-5-4]. Dostupné z: <https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/cmd-

documents/sci-res/posters/ms/events/hupo15/PN-64608-LC-MS-Universal-Method-Peptide-Identification-HUPO2015-PN64608-EN.pdf>

Internet 11. *Overview of the Immunoprecipitation Technique – Thermo Fisher Scientifics*.
Online [cit. 2016-5-3]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/immunoprecipitation-ip.html>

Internet 12. *Immunoprecipitation - Thermo Fisher Scientific*. Online [cit. 2016-5-4]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0064-Immunoprecipitation-guide.pdf>

Internet 13. *BioGRID - Database of Protein, Chemical, and Genetic Interactions***.** Online [cit. 2016-5-9]. Dostupné z: <http://thebiogrid.org/>

Internet 14. *STRING: functional protein association networks.* Online [cit. 2016-5-9]. Dostupné z: <http://string-db.org/>