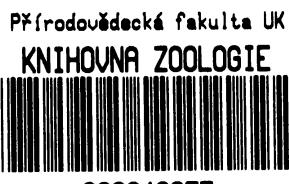


Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze  
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Nalezení podmínek pro separaci a identifikaci  
proteinových komplexů pomocí metod  
“Blue native PAGE”  
a “Photo-induced cross-linking of unmodified proteins”**

Diplomová práce



DP 2610  
KNIHOVNA KATEDER ZOOLOGIE  
přírodovědecké fakulty University Karlovy  
128 44 Praha 2, Viničná 7

2758/02

**Zora Nováková**

Vedoucí diplomové práce:  
MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.  
Mgr. Jan Černý, PhD.

Praha 2002

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů MUDr. Zdeňka Hodného, CSc. a Mgr. Jana Černého, PhD. v Laboratoři buněčné ultrastruktury a molekulární biologie ÚEM AV ČR za použití uvedených literárních pramenů.

Praha duben 2002 .....

Tímto bych chtěla poděkovat především svému školiteli MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc. za odborné vedení a obětavou pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout, a dále za trpělivost, se kterou mě učil praktickým laboratorním dovednostem. Stejně tak bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Janovi Černému, PhD. za cenné rady a připomínky a za uvedení do laboratorního prostředí. Ráda bych také poděkovala RNDr. Pavlu Hozákovi, DrSc. a jeho pracovnímu kolektivu za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Stejné díky patří všem členům Oddělení leukocytárních antigenů za praktickou pomoc.

# **Obsah**

<b>SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>10</b>
2.1. PROTEINOVÉ KOMPLEXY .....	10
2.1.1. Membránové proteinové komplexy - <i>T buněčný receptor (TCR)</i> .....	10
2.1.2. Jaderné proteinové komplexy - <i>DNA dependentní RNA polymerázy</i> .....	11
2.1.3. Cytosolické proteinové komplexy - <i>ribosom</i> .....	12
2.1.4. Izolace proteinových komplexů.....	13
2.2. BIOCHEMICKÉ METODY .....	13
2.2.1. Chromatografie.....	13
2.2.2. Příčně vazebné reakce .....	16
2.2.3. Elektroforetické separace .....	20
2.3. GENETICKÉ METODY .....	24
2.3.1. Dvojhybridní systém.....	24
2.4. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	27
2.4.1. Hmotnostně spektrometrická analýza.....	27
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>33</b>
3.1. MATERIÁL.....	33
3.1.1. Chemikálie .....	33
3.1.2. Materiál.....	34
3.1.3. Přístroje .....	34
3.1.4. Protilátky.....	35
3.1.5. Roztoky.....	35
3.2. METODY.....	39
3.2.1. Kultivace buněčných linií.....	39
3.2.2. Izolace buněčných membrán.....	40
3.2.3. Reakce PICUP .....	40
3.2.4. Izolace jader z HeLa buněk.....	41
3.2.5. Izolace jader z krysích jater.....	41
3.2.6. Příprava jaderného extraktu z jader krysích jater.....	42
3.2.7. Příprava cytosolických a membránových proteinových komplexů pro BN-PAGE.....	42
3.2.8. Stanovení koncentrace proteinů.....	42
3.2.9. Příprava nativních gradientových gelů .....	43
3.2.10. Příprava nativního vzorku pro BN-PAGE .....	43
3.2.11. BN-PAGE .....	43
3.2.12. Druhý rozměr – SDS-PAGE .....	43
3.2.13. Příprava SDS gradientových gelů .....	44
3.2.14. SDS-PAGE .....	44
3.2.15. Přenos proteinů z gelu na membránu ( <i>Western blot</i> ) .....	44
3.2.16. Detekce protilátkami.....	44
3.2.17. Barvení stříbrem .....	45
3.2.18. Barvení CBB R .....	45

3.2.19. Příprava vzorku na hmotnostní spektrometrii .....	45
<b>4. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>46</b>
4.1. KONKRÉTNÍ CÍLE PRÁCE .....	46
4.2. PŘEDPOKLÁDANÉ VÝSLEDKY .....	46
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>48</b>
5.1. JADERNÉ PROTEINOVÉ KOMPLEXY LZE SEPAROVAT METODOU BN-PAGE.....	48
5.2. SLEDOVÁNÍ PODJEDNOTKOVÝCH INTERAKCÍ PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ POMOCÍ REAKCE PICUP .....	59
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>66</b>
6.1. Využití BN-PAGE pro separaci jaderných komplexů dále analyzovaných hmotnostní spektrometrií .....	66
6.2. Studium proteinových interakcí membránových komplexů metodou PICUP .....	69
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>73</b>

## Seznam zkrátek a symbolů

ACR/Bis	roztok akrylamidu a bisakrylamidu
APS	"ammonium persulphate", persíran amonný
Bis-Tris	bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan
BN-PAGE	"blue native PAGE", polyakrylamidová nativní elektroforesa v přítomnosti CBB G 250
BSA	hovězí serum albumin
%C	poměr bisakrylamidu v roztoku (hmotnostní %)
CBB G	Coomassie Brilliant Blue G-250
CD	"cluster of differentiation" - označení příslušné povrchové molekuly lymfocytů
Co(III)(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> Cl <sup>2+</sup>	pentaaminochlorid kobaltitý
CTD	"C-terminal domain", C-terminální doména
Da	"Dalton", jednotka molekulové hmotnosti
DETAPAC	kyselina diethylentriamin-pentaoctová
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECL	"enhanced chemiluminiscence"
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	"electrospray ionization", ionizace elektrosprejem
GAL1-Lac Z	bakteriální fúzní gen
GAM-HRP	kozí protilátku proti myšímu imonoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
GAR-HRP	kozí protilátku proti králičímu imonoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
GB	"gel buffer", nativní gelový pufr
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonát
IEF	isoelektrická fokusace
Ig	imunoglobulin
LM	a-dodecyl-b-D-maltosid, laurylmaltosid
$\lambda_{MAX}$	maximální vlnová délka
<i>m/z</i>	hodnota hmotnost/náboj
MALDI	"matrix assisted laser desorption ionization"

mRNA	messenger RNA
MS/MS	tandemový hmotnostní spektrometr
NDH II	nukleární DNA helikáza II
NP-40	Nonidet P-40
PBS	"phosphate buffered saline", fyziologický roztok
pI	izoelektrický bod
PICUP	"photo-induced cross-linking of unmodified proteins"
PMSF	"phenylmethylsulfonyl fluoride"
PVDF	polyvinylidendifluorid
RNA	ribonukleová kyselina
RNA pol I	RNA polymeráza I
RNA pol II	RNA polymeráza II
rRNA	ribosomální RNA
Ru(II)(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium(II) hexahydrát
S	Swedbergova konstanta sedimentace
SDS	"sodium dodecyl sulphate", n-dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforesa v přítomnosti SDS
%T	koncentrace akrylamidu v roztoku (hmotnostní %)
TCR	T buněčný receptor
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethylenediamin
TOF	"time of flight", doba doletu částic
Tricin	N-tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transferová RNA
UAS <sub>G</sub>	specifická sekvence DNA

## 1. Úvod

Mnoho důležitých biologických procesů je zajišťováno složitými nadmolekulárními strukturami. Proteinové komplexy se podílejí na mnoha buněčných funkcích, jako příklad lze uvést replikaci DNA, transkripci a translaci, přenos signálu přes membránu, účast v metabolických drahách, proteolytické odbourávání proteinů a mnoho dalších.

Studium architektury multiproteinových komplexů je dnes tedy důležitou součástí řešení mnoha klíčových otázek biologie. Hlavním úkolem studia proteinových komplexů je charakterizace jejich podjednotkového složení, pochopení jejich vzájemných interakcí, případně změny organizace komplexových podjednotek v souvislosti s aktivitou komplexu.

Detailní studium těchto velkých agregátů je však obtížné. Často se k tomuto účelu používají genetické eseje [dvojhybridní systém; (Fields a Song, 1989)], ale蛋白 se při těchto pokusech nenachází v místě své přirozené lokalizace, což může vést k arteficiální interpretaci výsledků. Biochemické eseje pracující s rekombinantními proteiny mají podobnou nevýhodu. Proto se vyvíjejí nové metody umožňující studovat intaktní proteinové komplexy *in situ* a izolovat je v jejich nativní formě z malých množství biologického materiálu.

Především jsou to metody zabývající se separací proteinových komplexů ze složitých směsí (buněčné lyzaty či jednotlivé buněčné frakce). Z historického hlediska jsou nejstarší z těchto metod chromatografické techniky. V současné době má velký význam imunoafinitní chromatografie a imunoprecipitace, tyto postupy nevyžadují složité přístrojové vybavení a k izolaci stačí poměrně malé množství vstupního materiálu. Další přístup spočívá v metodách elektroforetické separace proteinových komplexů za nativních podmínek, které umožňují zachovat komplexy v nezměněném stavu. Jako poměrně nenáročná nová technika tohoto typu se v poslední době stále více používá nativní elektroforetická separace proteinových komplexů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti Coomassie Brilliant Blue G 250 (Schagger a von Jagow, 1991).

Metody umožňující separaci jednotlivých proteinů se používají ke studiu podjednotkového složení proteinových komplexů. Elektroforetické techniky separují proteiny disociovaných komplexů za denaturačních podmínek podle molekulové hmotnosti (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) nebo podle vlastního náboje (isoelektrická fokusace) (O'Farrell, 1975). V současnosti nejběžněji používaný je Laemmliho systém separace proteinů v přítomnosti silného detergentu – SDS.

Další skupina metod se zabývá studiem proteinových interakcí a kontaktů uvnitř proteinových komplexů. Patří mezi ně i techniky zavádění umělých příčných kovalentních vazeb mezi podjednotkami proteinových komplexů. Tyto vazby vznikají buď přímo mezi postranními řetězci aminokyselin nebo jsou použity chemické spojky (crosslinkery). Spojky jsou často používány pro analýzu interakcí mezi několika proteiny; analýza větších komplexů tímto postupem je však již obtížná. Vznik příčných vazeb je vyvoláván různým typem reakčních činidel. V předchozích letech se používala činidla tvořící kovalentní vazby mezi různými proteiny s nízkou specifitou. To vedlo ke snaze vyvinout specifické postupy pro spojení asociovaných proteinů; podrobněji jsou zmíněny v následujících kapitolách. Tyto metody jsou rychlé, účinné a specifické, při jejich použití nedochází k modifikacím proteinů znesnadňujícím jejich další identifikaci.

K identifikaci složení proteinových komplexů se stále častěji používá hmotnostní spektrometrie (Brown *a kol.*, 1995). Pomocí této metody je možné určit přesné složení proteinových komplexů, velikost a aminokyselinovou sekvenci jednotlivých podjednotek. Zavedení této techniky v biologii podstatně zjednodušilo a urychlilo identifikaci neznámých proteinů.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Proteinové komplexy

Proteinové komplexy jsou struktury skládající se ze dvou a více samostatných proteinů. Tyto proteiny se nazývají podjednotky a mohou být identické nebo rozdílné. V současné době se pojmem proteinový komplex rozumí agregát většinou nekovalentně spojených proteinů (výjimku tvoří např. disulfidické a koordinační vazby).

Proteiny jsou syntetizovány v denaturovaném stavu ribosomem. Po ukončení syntézy se sbalí do nativní konformace, což je fyziologický stav, ve kterém se protein nachází v buňce, a je schopen plnit svou funkci. Následně dochází k postranslačním modifikacím proteinů a ty tak získají konečnou - nativní - strukturu. Proteiny se dále mohou seskupovat do komplexů, většina těchto nadmolekulárních struktur se sestavuje sama spontánně. Na správný průběh dohlížejí chaperony, které také zabraňují vzniku nefunkčních agregátů (Kyte, 1995).

Nekovalentní vazby zajišťují především vodíkové můstky, hydrofobní interakce a van der Waalsovy síly. Tyto interakce jsou podstatně slabší než kovalentní vazby a nejsou stabilní za nefyziologických podmínek; uplatňují se v dynamických systémech, kde interakce mezi proteiny trvají velice krátkou dobu. Tyto interakce jsou často označovány jako asociace proteinů. Za denaturujících podmínek jsou nekovalentní interakce rušeny a proteinové komplexy se rozpadají na jednotlivé podjednotky. V současnosti jsou tyto interakce intenzivně studovány. Paralelně s tím se rozvíjejí metody umožňující separaci komplexů v jejich přirozeném stavu.

V následujícím textu je ve stručnosti popsáno několik příkladů proteinových komplexů, u kterých jsou nekovalentní proteinové interakce důležité pro jejich správnou funkci a jsou předmětem intenzivního studia.

#### 2.1.1. Membránové proteinové komplexy - T buněčný receptor (TCR)

Tento proteinový komplex funguje jako antigenně specifický receptor T lymfocytů, je ukotven v plasmatické membráně. Skládá se z modulu rozeznávajícího antigen a z asociovaného komplexu několika proteinů označovaného CD 3, který přenáší signál dále do buňky. Antigenně specifická část komplexu sestává ze dvou transmembránových řetězců ( $\alpha$  a  $\beta$  nebo  $\gamma$  a  $\delta$ ). Řetězce CD 3 komplexu ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  a  $\eta$ ) jsou transmembránové proteiny asociující s protein-tyrosin-kinasami skupiny Src. TCR proteinový komplex je dynamická struktura. Proteinové interakce zde zajišťují přenos informace z vnějšího prostředí dovnitř buňky. Na úspěšném

rozpoznání a přenosu signálu se podílí řada dalších molekul. Tyto asociace jsou velmi rychlé a jejich studium je obtížné (Bartůňková a Hořejší, 1998).

### **2.1.2. Jaderné proteinové komplexy - DNA dependentní RNA polymerázy**

Tyto enzymy syntetizují RNA podle templátu DNA. Vyskytuje se ve všech buňkách, a to v několika typech. Eukaryotní jádro obsahuje tři typy RNA polymeráz, které syntetizují různé typy RNA. Typ II syntetizuje prekursorsy mRNA, typ III syntetizuje prekursorsy tRNA; oba typy se nacházejí v jaderné plasmě. Typ I syntetizuje prekursorsy rRNA a je lokalizován v jadérku. Tyto enzymy jsou poměrně velké a složité proteinové komplexy, molekulová hmotnost holoenzymů se pohybuje mezi 500 - 700 kDa. Holoenzymy zastupují solubilní frakci polymerázového komplexu, všechny typy holoenzymů se skládají ze dvou odlišných "velkých" podjednotek (více než 100 kDa) a z několika (až 12) "malých" podjednotek menších než 50 kDa. Některé z těchto podjednotek jsou společné pro všechny typy RNA polymeráz. Jejich funkce a vzájemné interakce nejsou dosud plně objasněny. V buňkách se vyskytují polymerázy ve formě holoenzymů, které jsou solubilní a složením homogenní, a také jako velké transkripčně aktivní komplexy, které jsou vázány na jaderné struktury a jejich podjednotkové složení je velmi variabilní v závislosti na přepisovaném genu, jeho regulační oblasti a na stavu (průběhu) transkripce (Voet a Voet, 1995).

#### **2.1.2.1. Holoenzym RNA polymerázy II**

Holoenzym RNA polymerázy II je složen z 11 podjednotek a jeho molekulová hmotnost je 550 kDa. Tři největší podjednotky tvoří strukturní a funkční jádro – vážou volné ribonukleotidy a DNA, další tři podjednotky jsou shodné se složkami RNA polymerázy I a III. Zbývající podjednotky zřejmě slouží k optimalizaci transkripčního aparátu jako celku. Největší podjednotka enzymu obsahuje jedinečnou repetitivní doménu CTD, která je nezbytně nutná pro transkripci.

Podle tradičního konceptu se při transkripcí komplex polymerázy II pohybuje po DNA. Bylo prokázáno, že v tomto komplexu je přítomen  $\beta$ -aktin (Stojilkovic a kol., v tisku), který interaguje s velkou podjednotkou RNA polymerázy II, a je důležitý pro průběh transkripce (Egly a kol., 1984; Rando a kol., 2000; Rungger a kol., 1979; Scheer a kol., 1984).

#### **2.1.2.2. Holoenzym RNA polymerázy I**

Holoenzym RNA polymerázy I má velikost 500-600 kDa, jeho podjednotkové složení zatím není přesně určeno. V závislosti na způsobu izolace se jednotlivé studie rozcházejí v počtu

podjednotek enzymu. Ze současných studií vyplývá, že se enzym skládá přibližně z 12 podjednotek a 3 asociačních faktorů, některé z těchto podjednotek jsou společné pro všechny tři typy polymeráz (Hannan *a kol.*, 1998).

#### **2.1.2.3. Polymerázové komplexy**

Pro zahájení transkripce je nezbytná přítomnost transkripčních faktorů. Tyto regulační proteiny se vážou na určité oblasti promotoru a na ně se následně váže holoenzym RNA polymerázy. Teprve tehdy je komplex aktivní a transkripce je aktivována. Tato složitá proteinová struktura se nazývá transkripční iniciační komplex. Transkripční faktory se rozdělují do dvou skupin: (i) obecné transkripční faktory vyskytující se ve většině eukaryotických buněk jsou nezbytné pro zahájení transkripce a jsou více méně konstantní součástí transkripčního iniciačního komplexu a (ii) genově specifické transkripční faktory, které se mohou vyskytovat jen v buňkách určitých tkání v určité době, jsou nezbytné pro transkripci specifických genů (Rosypal, 1999).

Určité transkripční faktory jsou zodpovědné za iniciaci a aktivaci transkripce, jiné transkripcí inhibují, obecně mají tyto proteiny modulační funkci a určují průběh (efektivitu) transkripce. Všechny proteiny jsou vzájemně propojeny nekovalentními vazbami, komplex polymerázy se vytváří postupným seskupováním proteinů na určitém promotoru. V současnosti se také uvažuje spíše o možnosti, že holoenzym existuje jako komplex samostatně a přisedá vcelku na promotor (Brown *a kol.*, 1995).

Během iniciace transkripce se polymerázový komplex mění, dochází k asociaci a disociaci určitých kofaktorů komplexu. Celý komplex RNA polymerázy II je tedy dynamická složitá struktura o velikosti až téměř 2 MDa a je pravděpodobně fixován k jadernému skeletu (Hozak *a kol.*, 1994). Tento komplex byl izolován pomocí afinitní chromatografie a gelové filtrace (Bitter, 1983; Chao *a kol.*, 1996; Maldonado *a kol.*, 1996).

#### **2.1.3. Cytosolické proteinové komplexy - ribosom**

Cytosolický eukaryotický ribosom je dalším příkladem mnohapodjednotkového proteinového komplexu. Skládá se ze dvou podjednotek, menší podjednotka (sedimentační konstanta 40S) obsahuje 33 proteinů a 18S-rRNA. Větší podjednotka (60S) se skládá ze 49 proteinů a z několika typů rRNA. Tyto podjednotky se v buňce skládají z jednotlivých proteinů, které se na sebe postupně nabalují. Struktura ribosomu je složitá a celý komplex je obrovský, takže analýza jednotlivých složek je velmi obtížná. Ribosom zajišťuje syntézu proteinů v buňkách. Pomocí tRNA jsou k němu dopraveny jednotlivé aminokyseliny, které ribosom spojí

do peptidického řetězce. Eukaryotický ribosom má molekulovou hmotnost 3,9-4,5 MDa (Voet a Voet, 1995).

#### **2.1.4. Izolace proteinových komplexů**

Proteinové komplexy se nacházejí ve všech kompartmentech buňky. Pokud chceme zkoumat proteinový komplex nacházející se v určité buněčné organele či kompartmentu, často se snažíme o jejich izolaci. To lze provést různými způsoby, nejčastěji diferenční centrifugací. Proteinové komplexy je možné z izolovaných organel získat pomocí různých přístupů v závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech proteinových komplexů, např. extrakcí vysokou koncentrací soli, působením detergentů, homogenizací, sonifikací či kombinací těchto postupů. Proteinové komplexy vázané na určitou velkou buněčnou strukturu (např. polymerázy v chromatinu) musíme nejprve oddělit od této struktury - solubilizovat je. Nejsnadněji se izolují cytosolické komplexy, které mají hydrofilní povrch a nebývají silně vázány na žádné velké buněčné struktury. Membránové proteiny jsou zakotveny v lipidické vrstvě a izolují se z nich pomocí detergentů, které lipidickou část membrány rozpouštějí.

Izolované proteiny jsou náchylné k degradaci, především vlivem změny pH a zvýšené teploty. Proto se používají pufrované roztoky a vzorky se zpracovávají při teplotě 0-4°C. K zamezení degradace proteázami se používají specifické inhibitory.

### **2.2. Biochemické metody**

Abychom mohli charakterizovat a studovat určitý proteinový komplex, často je nutné jej izolovat v relativně čistém stavu. To je v některých případech dost složité, pokud je daný komplex nestabilní nebo se nachází v buňce ve velmi malém množství. Proto se používají izolační a čistící procedury, které vedou ke zvýšení koncentrace proteinového komplexu ve vzorku, případně k získání samotného purifikovaného komplexu. Nejpoužívanější z nich jsou uvedeny a popsány v následujících kapitolách.

#### **2.2.1. Chromatografie**

Chromatografie slouží k analytickému i preparativnímu dělení složitých směsí. Je to fyzikální metoda, při které se proteiny dělí mezi dvě fáze, jedna je nepohyblivá (stacionární), druhá je pohyblivá (mobilní). Vzorek je rozpuštěn v mobilní fázi (kapalina nebo plyn), která proniká sloupcem pevné fáze (pórovitý materiál, kapalina). Při průchodu reagují jednotlivé látky vzorku s pevnou fází různě, takže rychlosť průniku jednotlivých složek povnou fází je rozdílná.

Jeden izolační krok má malou účinnost, ale při opakování postupu se nakonec jednotlivé složky směsi od sebe oddělí.

Chromatografie se rozlišují podle typu svých pohyblivých a pevných fází a dále podle interakcí mezi separovanou látkou a pevnou fází. Na základě iontové síly se separují jednotlivé složky vzorku v ionexové chromatografii, zatímco v adsorpční chromatografii je separace založena na různé míře adsorpce materiálu na matrici. Pro zvýšení čistoty izolované látky se používá více různých chromatografických postupů za sebou (Voet a Voet, 1995). Na chromatografických kolonách je možno izolovat nejrůznější látky, zde jsou podrobněji uvedeny postupy zabývající se izolací proteinových komplexů.

#### ***2.2.1.1. Afinitní chromatografie***

Afinitní chromatografie využívá specifické interakce dvou vazebných partnerů, z nichž jeden (ligand, afinant) je pevně zakotven na póravité a chemicky inertní matrice kolony. Při průchodu vzorku kolonou se na imobilizovaný ligand zachytí jen protein se specifickým vazebným místem, ostatní proteiny jsou vymyty z kolony pufrem. Navázaný protein se vytěsní z kolony roztokem ligandu nebo změnou podmínek (pH, iontové síly) tak, aby se protein uvolnil z ligandu. Matice musí být schopna kovalentně vázat ligandy; nejčastěji se používá agarosa, protože má mnoho hydroxylových skupin. Aby mohlo dojít k vazbě ligandu, aktivuje se agarosa bromkyanem. V případě, že se proteiny nemohou vázat na ligandy ze sterických důvodů, používá se raménko (hexamethylendiamin) k oddálení ligandu od matrice. Pomocí afinitní chromatografie je možné izolovat velké množství vysoce čistého materiálu (Cuatrecasas, 1971).

#### ***2.2.1.2. Imunoafinitní chromatografie (imunoprecipitace)***

Imunoafinitní chromatografie (často nazývaná imunoprecipitace) je zvláštním typem afinitní chromatografie, kde se jako ligandy používají monoklonální protilátky. Tímto postupem lze dosáhnout v jednom kroku až desetitisícinásobného zvýšení čistoty izolovaného proteinu (Vodrážka, 1996). Tato metoda se používá k izolaci specifických protilátek pomocí imobilizovaného antigenu. Obráceným postupem je možno izolovat proteiny kovalentně vázanou protilátkou na matici (Muronetz a kol., 2001).

Imunoprecipitace proteinů za nedenaturujících podmínek je široce používaná metoda studia proteinových interakcí. Pomocí této metody jsou nalézány neznámé proteiny nacházející se v proteinových komplexech, z nichž alespoň jedna složka je známá a rozpoznávaná specifickou protilátkou. Je možné detektovat neznámé asociační partnery tak, že precipitujeme celý komplex protilátkou proti známému proteinu. Tato metoda zachovává komplexy v nativním

stavu, můžeme tak určit stechiometrii podjednotek izolovaného komplexu, ale i další vlastnosti jednotlivých proteinů (množství a stabilitu, potranslační modifikace).

Úspěch imunoprecipitace záleží především na kvalitě protilátky. Nejvýhodnější jsou monoklonální protilátky. Polyklonální séra se musí předem vysycovat a precipitace není tak specifická (Phizicky a Fields, 1995). Podmínky precipitace musí být nastaveny tak, aby vznikl specifický imunokomplex (komplex protilátky se specificky navázaným proteinem nebo proteinovým komplexem), ale aby přitom nedocházelo k disociaci ostatních nekovalentních interakcí.

Jako nosiče protilátky se používají kuličky ze Sepharosy s navázaným proteinem A nebo G. Tento protein je bakteriálního původu (produkuje ho *Staphylococcus aureus*) a reaguje s Fc částí imunoglobulinu, váže se na ni s vysokou afinitou. Pro tuto vlastnost se začal využívat nejprve k izolaci IgG (Cullen, 1984). Nyní se používá i k izolaci antigenu a to tak, že funguje jako spojka mezi kuličkami sepharosy a protilátkou. Protein A je vhodný pro všechny králičí protilátky a myši IgG<sub>2</sub> protilátky. Ostatní myši imunoglobuliny mají vysokou afinitu k proteinu G.

Kuličky s navázaným proteinem A jsou inkubovány s protilátkou, která se na ně váže tak, že její specifická vazebná místa směřují ven a mohou precipitovat určitý antigen. Po přidání lyzátu dojde k specifické vazbě proteinu s určitým epitopem na protilátku a jeho izolaci z lyzátu. Změnou podmínek (např. pH, iontová síla) je rozrušena vazba protilátky a antigenu a protein může být dále analyzován. Buňky je nutné lyzovat v pufru, který efektivně rozpustí proteiny, ale nezpůsobí disociaci komplexů. Tímto způsobem je možné izolovat celý proteinový komplex, pokud je protein se specifickým epitopem jeho podjednotkou (Celis, 1998). Nyní se jako nosiče protilátek také používají plastové jamkové destičky (Tamura *a kol.*, 1984).

#### **2.2.1.3. Gelová filtrace**

Gelovou filtrací se molekuly dělí na základě své velikosti a tvaru. Stacionární fázi tvoří kuličky hydratované porézní látky. Vzorek procházející kolonou obsahuje různě velké molekuly. Malé molekuly procházejí póry a vnikají s kapalinou do kuliček, procházejí tedy chromatografickým sloupcem pomaleji. Molekuly větší než póry pouze kuličky obtékají a procházejí kolonou nejrychleji. Molekuly procházející kuličkami se dělí podle velikosti; větší molekuly putují rychleji než menší. Je to dáno nejednotnou velikostí pórů, takže větší molekuly procházejí menším množstvím kuliček. Touto metodou je možno určit molekulovou hmotnost separovaných částic v případě, že celý systém okalibrujeme molekulami o známé molekulové hmotnosti.

Při přípravě chromatografických gelů se nejčastěji používá dextran, agarosa a polyakrylamid. Dextranové gely (Sephadex) mají vylučovací limit od 0,7 do 800 kDa, zatímco polyakrylamidové gely (Bio-Gel) od 0,2 do 400 kDa. Velké molekuly (až 25 000 kDa) se separují na agarosových gelech (Voet a Voet, 1995).

#### 2.2.1.4. HPLC

V současné době se pro separaci obtížně izolovatelných látek používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kde se vzorek separuje v kolonách s vysokými rozlišovacími vlastnostmi při zvýšeném tlaku (až 70 MPa). Vysoký tlak urychluje separaci. Metoda je vysoce citlivá, ale umožňuje izolaci většího množství látky (Voet a Voet, 1995).

### 2.2.2. Příčně vazebné reakce

Tato technika je určena ke studiu interakcí mezi proteiny. Umožňuje vytvoření nových kovalentních vazeb mezi proteinovými řetězci. Tato metoda má za sebou dlouhý vývoj. V minulosti běžně používané síťovací reagencie jako je glutaraldehyd nebo bis-sukcinimidové estery jsou dnes již opuštěny, protože reagují nespecificky s mnoha různými aminokyselinovými zbytky a dochází tak k masivní modifikaci komplexu a ke změně jeho struktury (Fancy a Kodadek, 1997).

#### 2.2.2.1. Klasické reagencie vytvářející kovalentní příčné vazby mezi proteiny

Vzhledem k těmto nevýhodám byly vyvíjeny nové reagencie a postupy. Běžně se používají syntetické spojky (crosslinkery). Jsou to dvě elektrofilní skupiny spojené raménkem. Tyto skupiny reagují s nukleofily jako je lysin nebo cystein a propojují vzájemně jednotlivé proteiny. Použití bifunkčních spojek má však několik nevýhod - jsou stále reaktivní, výtěžky reakce jsou malé a inkubační doby jsou dlouhé. Navíc připojení spojky k proteinu může změnit jeho vlastnosti, dochází k modifikacím nukleofilních postranních řetězců (acylace lysinů) a proteiny mohou denaturovat a agregovat. Tyto modifikace pak vedou k arteficiálním výsledkům (Fancy a kol., 2000; Fancy a Kodadek, 1999).

Další látky způsobující vznik kovalentních vazeb jsou fluorescenční nebo radioaktivní značky, které se specificky vážou na určitý epitop studovaného proteinu. Asociovaný partner tohoto proteinu je označen při fotolýze, kdy dojde k přenosu značky z jednoho proteinu na druhý. Tato metoda má však svou limitaci, inkorporace značky je většinou nízká a dochází ke kovalentní modifikaci proteinu. Nová modifikace metody umožňuje dopravit a připevnit značku pomocí nekovalentních spojů tak, že zkoumaný protein je na genetické úrovni fúzován

s peptidem schopným vázat nekovalentně značku. Modifikovaný protein by měl být schopen tvořit nativní komplex, ke kterému se přidá značka a po její aktivaci proběhne lokální propojení proteinů, které nezpůsobí žádné modifikace ostatních proteinů v komplexu (Fancy a Kodadek, 1998; Fancy *a kol.*, 1996). Tato technika se také používá při studiu interakcí proteinů s nukleovými kyselinami (Fancy a Kodadek, 1997).

#### **2.2.2.2. Novodobé síťovací reagencie**

V devadesátých letech byl objeven nový typ síťovacích reagencí. První z těchto látek byl Ni(II)-peptidový chelát (Ni(II)-NH<sub>2</sub>-Gly-Gly-His.COOH), který v přítomnosti peroxokyselin vyvolává propojení proteinů pomocí radikálové reakce. Tato látka nezpůsobuje nežádoucí modifikace jiných proteinů a díky krátké době trvání reakce nedojde k destabilizaci komplexu a k modifikacím jeho postranních řetězců (Brown *a kol.*, 1995).

Příčně vazebnou reakci vyvolávají i další koordinačně kovalentní sloučeniny kovů za přítomnosti peroxokyselin (např. Fe-protoporfyrin nebo MgIII-tetra(p-sulfanato)fenylporfyrin) (Campbell *a kol.*, 1998).

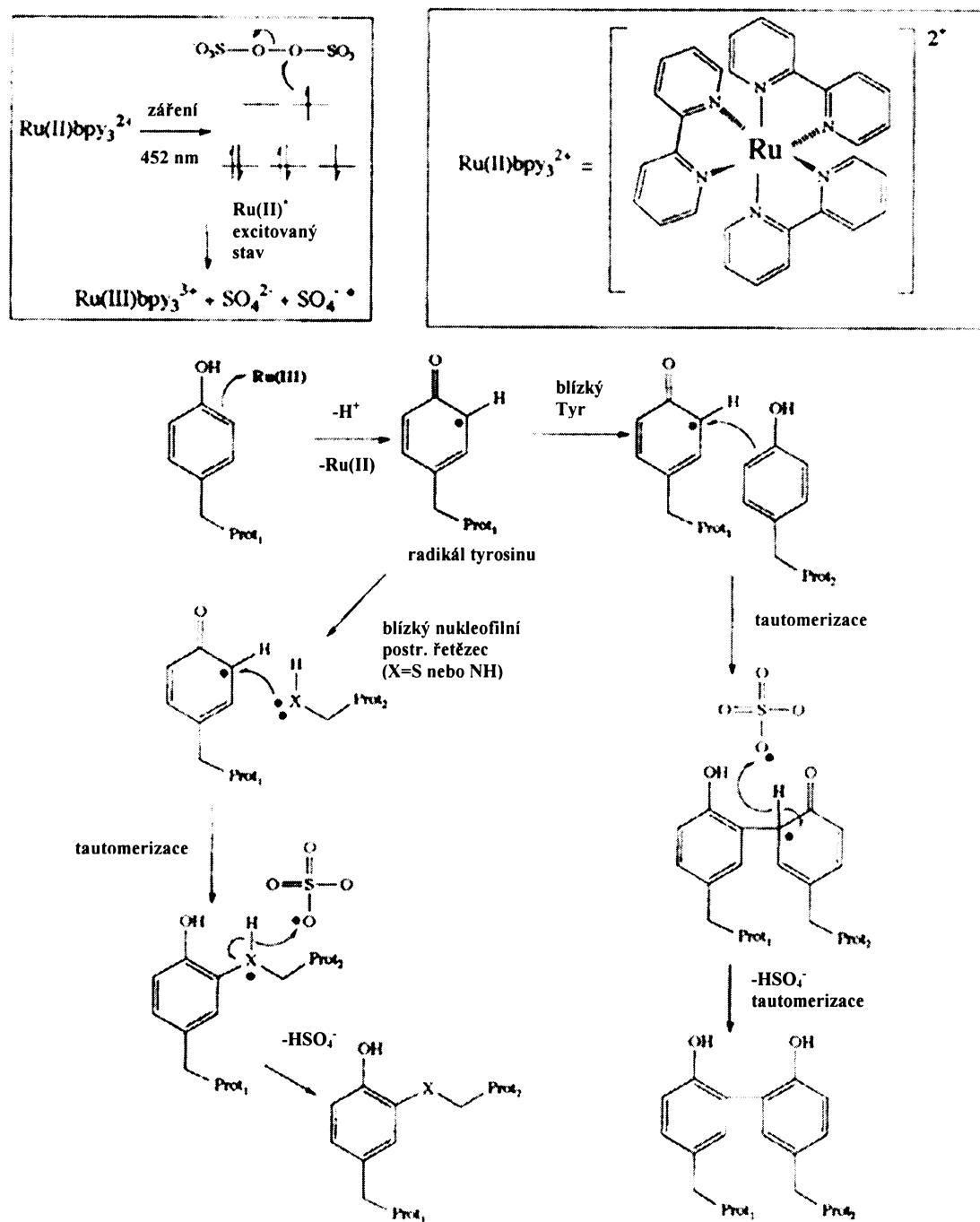
#### **2.2.2.3. Světlem indukované příčně vazebné reakce**

Nejzajímavější jsou reagencie, které jsou až do aktivace inertní. Pokud máme kontrolu nad reaktivitou této látky, můžeme vyvolat reakci v určitém okamžiku. Nejčastěji jsou používány arylazidy nebo benzofenony. Ale tyto látky vyžadují dlouhodobé působení UV záření (může poškozovat proteiny). Proto se hledají látky, které by byly účinně aktivovány viditelným zářením a umožnily by velmi rychlou reakci (Kim *a kol.*, 1999).

V současné době se používají reagencie, které oxidují aminokyselinové zbytky bohaté na elektrony (tyrosin) vyskytující se na 'povrchu' proteinů. D. A. Fancy a T. Kodadek popsali novou metodu příčného vazebného propojení nemodifikovaných proteinů aktivovaného světlem. V dalším textu budeme používat zkratku "PICUP" (z anglického „photo-induced cross-linking of unmodified proteins“). Jako reagens se zde používá organická sůl ruthenia (Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) aktivovatelná dlouhovlnným světelným zářením. Fotolýza Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> za přítomnosti akceptoru elektronů (persíran amonný) vede ke vzniku reaktivních intermediátů, které propojují asociované proteiny. Reakce probíhá rychle (řádově milisekundy až sekundy, v závislosti na intenzitě použitého světelného zdroje) a má vysoké výtěžky. Tato metoda by mohla tedy být vhodná pro studium dynamických interakcí a komplexů s velmi krátkou dobou života.

Předpokládaný mechanismus reakce

Obr. 1



Obr. 1 Předpokládaný mechanismus reakce PICUP. V levém horním rámečku je znázorněna aktivace  $\text{Ru(II)}(\text{bpy})_3^{2+}$  světlem a přenos elektronu na molekulu APS. Touto reakcí vzniká oxidované  $\text{Ru(III)}(\text{bpy})_3^{3+}$  a sulfátový radikál.  $\text{Ru(III)}(\text{bpy})_3^{3+}$  oxiduje určité aminokyselinové zbytky, nejčastěji tyrosin. Vzniklý tyrosinový radikál reaguje s dalšími blízkými aminokyselinovými zbytky (aromatickými –

*tyrosin nebo nukleofilními – lysin, cystein) za vzniku kovalentní vazby. Toto schéma reakce je pouze hypotetické. Skutečný mechanismus reakce je ještě nutné ověřit experimentálně (Fancy a Kodadek, 1999). V pravém horním rámečku je znázorněna struktura Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>.*

Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> absorbuje viditelnou složku záření ( $\lambda_{MAX}$  452 nm, mol. extinkční koeficient 14 700 M<sup>-1</sup>). Fotolýzou se molekula Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> excituje a předává svůj elektron molekule APS. Vzniká Ru(III)(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, sulfátový radikál a sulfátový aniont. Tyto intermediáty vedou ke vzniku tyrosinových radikálů, které reagují s nukleofilními skupinami ve své těsné blízkosti a vznikají tak nové C-C vazby mezi proteiny. Radikály se zházejí přidáním redukčního činidla, např.  $\beta$ -merkaptoethanolu. Na obr. 1 je znázorněn mechanismus reakce PICUP a vznik spojek mezi proteiny (Fancy, 1999).

Vlivem reakce dochází k propojení asociovaných proteinů a vznikají komplexy stabilizované kovalentními vazbami. Tyto produkty odpovídají složením nekovalentním komplexům přítomným před reakcí (Bitan a kol., 2001).

Reakce se aktivuje krátkým zábleskem viditelného světla. K expozici se používá silný světelny zdroj, např. 150 W xenonová lampa. Závěrka fotoaparátu umístěná mezi lampou a vzorkem umožní osvit na velmi krátkou a přesně určenou dobu. Světlo dále prochází vodou, která zachycuje infračervené záření, a filtrem, který nepropouští UV záření. Krátké osvity od 0,5 do 5 sekund postačují k 30-95% výtěžku kovalentně spojených produktů. Mnoho laboratoří nemá možnost použít silný světelny zdroj, proto byla metoda testována i pro dosažitelnější zdroje světla. Reakci vyvolá i záblesk fotografického blesku v případě, že jsou vzorky umístěny blízko zdroje. Výtěžky tohoto postupu jsou stále uspokojivé (Fancy a Kodadek, 1999).

Vytvoření kovalentní vazby probíhá na tyrosinu, tryptofanu, případně na dalších aminokyselinách bohatých na elektrony, proto může být reakce inhibována přidáním dostatečného množství určité volné aminokyseliny. Přidaná aminokyselina kompetuje s proteiny o Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> nebo o sulfátový radikál a navíc zháší radikály tyrosinu, takže nedochází k tak intensivní tvorbě vazeb. Nejsilnějšími inhibitory reakce jsou tyrosin, tryptofan a cystein, slabší efekt má methionin. Threonin a leucin mají naopak minimální efekt (Kim a kol., 1999). Reakce se dá částečně zbrzdit přidáním histidinu. Tímto postupem můžeme odlišit těsné kontakty proteinů od slabších asociací. Při reakci s histidinem se spojí jen proteiny silně spolu interagující (Fancy a Kodadek, 1999).

Metoda PICUP byla demonstrována na systému purifikovaných proteinů, které se vyskytují v nativním stavu jako oligomery. Například UvsY protein, který funguje jako hexamer při rekombinaci fágu T4, vytvářel po osvitu kovalentně spojené oligomery. Avšak některé

proteiny, např. avidin, při reakci žádné polymery nevytvářely, zřejmě pro nedostatek aromatických zbytků na povrchu proteinu (Fancy a Kodadek, 1999).

Koncentrace proteinů ve vzorku by neměla přesáhnout rozmezí 0,01-20  $\mu\text{M}$ . V případě, že roztoky purifikovaných proteinů byly koncentrované (více než 20  $\mu\text{M}$ ), při použití APS vznikaly v malé míře vlivem náhodných kolizí v roztoku arteficiální kovalentní vazby. Tento problém by však neměl nastat při práci s buněčným materiélem, kde se vyskytují komplexy v podstatně nižších koncentracích.

#### *Analogy reakčních činidel*

Při dlouhých inkubačních časech s APS dochází k oxidaci methioninu a cysteinu, což může vést k arteficiálním výsledkům. APS se tedy musí přidávat ke vzorku těsně před osvitem. Hledají se další možné elektronové akceptory. Jedním z nich je pentaaminochlorid kobaltitý ( $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$ ). Odebírá ireversibilně elektron molekule  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$  za vzniku amonného iontu a  $\text{Co(II)}$ . V jeho přítomnosti dochází také ke vzniku kovalentních vazeb, neprobíhá ovšem nežádoucí oxidace aminokyselin. Účinnost reakce v přítomnosti  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  je však nižší než v přítomnosti APS, proto se hledají další možnosti (Fancy a kol., 2000).

Podobné vlastnosti, jaké má sůl ruthenia, byly nalezeny i u porfyrinových sloučenin paladia (např.  $\text{Pd(II) 5,10,15,20-tetra(methylpyrimidium)porfyrin}$ ). Mnohé z nich mají své přirozené peptidové ligandy a mohou být synteticky modifikovány. Všechny tyto vlastnosti skýtají celou řadu možností využití těchto látek ke studiu proteinových interakcí (Fancy, 2000).

### **2.2.3. Elektroforetické separace**

Tyto techniky se používají k separaci komponent složitých směsí. Podle podmínek, za jakých je materiál separován, se tyto postupy dělí na nativní a denaturující. V systémech zajišťujících nativní podmínky dochází k separaci celých proteinových komplexů v jejich nativním stavu, zatímco za denaturujících podmínek jsou separovány jednotlivé proteiny. Na rozdíl od separačních postupů za denaturujících podmínek, techniky zabývající se elektromigrací nativních proteinových komplexů patří do relativně neprobádané oblasti. Elektroforetická separace je založena na různé pohyblivosti jednotlivých proteinů nebo proteinových komplexů v elektrickém poli. Tato mobilita je určena celkovým nábojem proteinu nebo proteinového komplexu.

### **2.2.3.1. Separace za denaturujících podmínek**

Rozlišujeme dva typy separace denaturowaných proteinů. V případě, že proteiny získají jednotný náboj navázáním nabitych částic, pak jsou separovány podle své molekulové hmotnosti. K získání jednotného náboje se používá SDS, které obalí proteiny, denaturuje je a dává jim záporný náboj. Navíc ruší všechny nekovalentní interakce, takže jsou separovány jednotlivé proteiny. Separace probíhá v polyakrylamidových gelech (Laemmli, 1970).

Druhým typem je separace proteinů denaturowaných látkou, která nemění jejich celkový náboj (močovina). Proteiny si tak ponechávají svůj náboj a jsou za daného pH podle něho separovány, tato metoda se nazývá isoelektrická fokusace (IEF) (O'Farrell, 1975).

V případě jednokrokové separace však za daných podmínek často migruje několik proteinů stejnou rychlostí a nejsou od sebe odděleny. Proto se používá kombinace výše zmíněných separačních technik. Nejprve je materiál separován podle vlastních nábojů proteinů (IEF), následně jsou proteiny separovány podle své molekulové hmotnosti (SDS-PAGE). Získáme tak dvouzměrnou proteinovou mapu, na které jsou jednotlivé proteiny od sebe jasně odděleny.

### **2.2.3.2. BN-PAGE**

Metody nativních elektrofores se dělí na dvě skupiny podle podmínek separace: (i) nativní komplexy jsou separovány za daného pH podle svého celkového náboje; (ii) komplexy získají jednotný náboj navázáním nabité látky na povrch proteinů (dříve se používal deoxycholát ve směsi s Tritonem X-100, nověji se používají mírné detergenty nebo Coomassie Brilliant Blue G 250), komplexy jsou pak separovány podle molekulové hmotnosti.

Velmi elegantní svou jednoduchostí je metoda Schäggera a kol. nazývaná "Blue Native PAGE" (Schagger a von Jagow, 1991). Tento diskontinuální elektroforetický systém byl původně vyvinut pro separaci mitochondriálních proteinových komplexů, separuje membránové i ve vodě rozpustné proteinové komplexy v jejich nativním stavu. Na rozdíl od SDS-PAGE se zde používají mírné detergenty, které nezpůsobují disociaci proteinových komplexů. Enzymatické komplexy separované touto technikou jsou stále aktivní i po extrakci z gelu (Grandier-Vazeille a Guerin, 1996; Schagger a Pfeiffer, 2000).

#### *Podmínky separace*

Separace probíhá při 4-7°C, při pracovním pH 7,5, které je blízké fyziologickému stavu, takže nedochází k disociaci proteinových komplexů. V tomto systému není možno použít k extrakci proteinů z buněk klasické soli (NaCl), vedlo by to k precipitaci proteinových

komplexů a CBB G. Proto byly soli nahrazeny kyselinou 6-aminokapronovou, která díky svým disociačním konstantám ( $pK_1=10,7$ ,  $pK_2=4,4$ ) dostatečně vzdáleným od pH 7,5 za těchto podmínek nedisociuje a nepohybuje se v elektrickém poli. Experimentálně bylo zjištěno, že v případě mitochondriálních membránových komplexů měla 750 mM aminokapronová kyselina stejné extrakční účinky jako 500 mM NaCl (Schagger a von Jagow, 1991).

Hrubé preparáty membrán musí být před vlastní elektroforetickou separací solubilizovány detergentem. Přítomnost detergentu by však mohla způsobit spontánní agregaci proteinů. Tento problém byl vyřešen použitím mírných neiontových detergentů v kombinaci s CBB G.

Tato barva má v systému několik funkcí: (i) CBB G je záporně nabité a váže se na povrch proteinů nepolárními interakcemi. Proteiny obalené barvou tak získávají záporný náboj, takže se v elektrickém poli pohybují k anodě a separují se podle svých molekulových hmotností podobně jako v denaturujícím elektroforetickém systému (SDS-PAGE); (ii) CBB G přispívá k solubilizaci komplexů, proteiny obalené CBB G nemají tendenci agregovat; (iii) CBB G zastupuje detergenty nepřítomné v gelu – váže se silně na proteiny, má hydrofobní charakter.

Vazba CBB G nevede k denaturaci proteinů, molekuly barvy se vážou na hydrofobní části proteinů v individuálním množství (neexistuje konstantní hmotnostní poměr CBB G ku proteinu jako je to v případě SDS – 1,4 g SDS/g proteinu). Detergenty nejsou přítomny v gelu, proto se CBB G přidává do vzorku i do katodového pufru, aby proteinové komplexy zůstaly v solubilním stavu i během separace.

Při solubilizaci proteinových komplexů pomocí detergentů by měly nekovalentní interakce zůstat zachovány a zároveň by nemělo docházet k arteficiálním agregacím. K tomuto účelu jsou nevhodnější mírné neiontové detergenty. Výběr detergentu záleží na charakteru studovaných komplexů.

Velmi dobré solubilizace dosahuje laurylmaltosid, ale lze použít i další detergenty – oktylglukosid, CHAPS, digitonin, Brij 58, Tween 20 – v případě, že nenaruší stabilitu komplexů. Detergenty se od sebe liší v zachování určitých typů asociací (hydrofilní nebo hydrofobní asociace, interakce protein-protein nebo protein-lipid, atd.). Účinnější detergenty (Triton X-100, Nonidet P-40) zachovávají jen pevnější nekovalentní interakce. Detergenty s nábojem (např. SDS) ruší většinu nekovalentních interakcí a denaturují proteiny, proto je v tomto separačním systému nelze použít. Solubilizace proteinových komplexů je také ovlivněna poměrem detergentu ku množství proteinů a dobou působení detergentu (Grandier-Vazeille a Guerin, 1996).

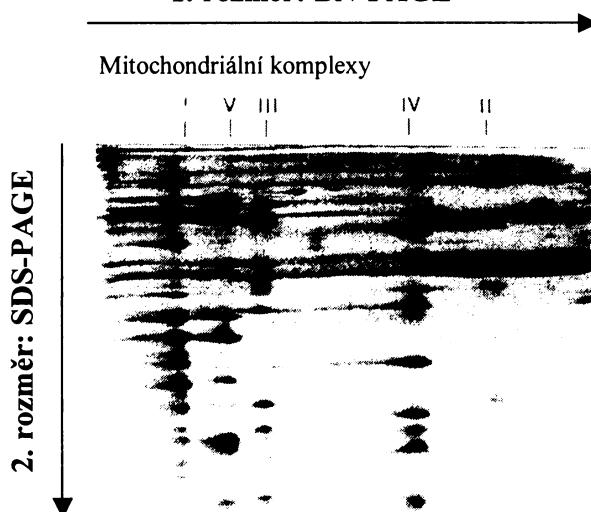
Separace probíhá v lineárním gradientovém polyakrylamidovém gelu. Proteinové komplexy jsou v něm separovány na principu molekulového síta. Gel má na začátku největší póry a ty se se směrem separace postupně zmenšují, což vede k soustavnému zpomalování průchodu větších proteinových komplexů gelem. Když proteinový komplex doputuje až do místa, kde je větší než jsou póry gelu, zastaví se a dál se nepohybuje. Gradient gelu je možné přizpůsobit velikosti separovaných komplexů, lze ho upravovat změnou koncentrace akrylamidu v roztoku nebo poměrem akrylamidu k síťovacímu reagens (bis-akrylamid). Často používaný 6-13% gel separuje proteinové komplexy o velikosti  $10^5$ - $10^6$  kDa. Gradient gelu BN-PAGE separuje proteinové komplexy jen do určité velikosti odpovídající pórům gelu. Větší komplexy do gelu neproniknou.

BN-PAGE je možné okalibrovat kyselými proteiny o známé molekulové hmotnosti, které vážou CBB G a vyskytují se za nativních podmínek v oligomerním stavu. Velikost studovaných proteinových komplexů pak můžeme určit pomocí těchto standardů. BN-PAGE však separuje shodně se standardy jen proteinové komplexy, které vážou CBB G a mají pI nižší než 8,6 nebo proteinové komplexy, které CBB G nevážou a jejich pI je nižší než 5,4. Ostatní proteinové komplexy se pohybují pomaleji nebo vůbec ne, a proto není možné tyto proteinové komplexy okalibrovat (Schagger *a kol.*, 1994).

Další analýza podjednotkového složení komplexů se provádí pomocí druhého rozměru (SDS-PAGE). Získáme tak dvourozměrnou mapu jednotlivých složek komplexů, z níž můžeme určit podjednotkové složení komplexů, molekulovou hmotnost podjednotek i celého komplexu a stupeň čistoty vzorku.

**Obr. 2**

**1. rozměr: BN-PAGE**



Obr. 2 Dvouozměrná proteinová mapa mitochondriálních membránových proteinových komplexů. V prvním rozměru jsou separovány proteinové komplexy v nativním stavu, v druhém rozměru se tyto komplexy rozpadají na jednotlivé podjednotky, které se v gelu vyskytují v jedné vertikální linii. (Schagger a von Jagow, 1991).

#### *Komplexy separované pomocí BN-PAGE*

Pomocí BN-PAGE byly separovány mitochondriální komplexy I-V (obr. 2), dále F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATPáza a další membránové komplexy (Grandier-Vazeille a Guerin, 1996; Schagger a von Jagow, 1991).

Metodou BN-PAGE byl také izolován celý komplex B buněčného receptoru (i s CD 79) a bylo potvrzeno složení jeho podjednotek pomocí dvouozměrné separace a detekce specifickými protilátkami (Schamel a Reth, 2000). Nativní elektroforesa našla využití i pro separaci jiných proteinových komplexů. Byl tak separován např. celý proteasom o velikosti 750 kDa (Petr Novák a Jan Černý – nepublikované výsledky). Pomocí modifikace této metody byly separovány celé partikule rostlinného viru (Plum Pox Virus) přímo z rostlinného extraktu. Separace probíhala ve směsném akrylamid-agarosovém gelu (Manoussopoulos a kol., 2000).

BN-PAGE umožňuje izolaci proteinových komplexů přímo z hrubých buněčných frakcí (membrány, homogenizovaná tkáň, buněčný lyzát, atd.). Tímto postupem je možné izolovat větší množství proteinu (řádově mg) v čistotě dostačující k následné identifikaci proteinu sekvenováním. Takto separovaný materiál je možné použít např. pro imunizaci (Schagger a kol., 1994).

### **2.3. Genetické metody**

#### **2.3.1. Dvojhybridní systém**

Je třeba také zmínit, že kromě tradičně používaných biochemických přístupů jako je např. vytváření příčných vazeb, imunoprecipitace nebo chromatografie, se v současnosti rozvíjejí i genetické techniky. Jednou z nich je dvojhybridní systém, který je založen na interakci modifikovaných proteinů. Tyto hybridní molekuly jsou produkty fúzních genů.

##### **2.3.1.1. Gal4 protein**

Pro tento systém se nejvíce používá kvasinkový Gal4 protein, který funguje jako aktivátor transkripce a je nezbytný pro expresi genů kódujících enzymy metabolické dráhy galaktózy. Skládá se ze dvou funkčních domén: N-terminální doména se váže ke specifické

sekvenci DNA ( $\text{UAS}_G$ ) a C-terminální doména obsahuje kyselé oblasti, které aktivují transkripci. Vzhledem k tomu, že DNA vazebná doména není schopna aktivace transkripce a naopak aktivační doména se nemůže specificky vázat k DNA, neaktivuje se transkripcie, dokud nejsou domény spolu spojeny. Pokud dojde ke spojení obou domén, protein se stane funkčním a aktivuje transkripcí specifického genu.

### 2.3.1.2. Experimentální podmínky

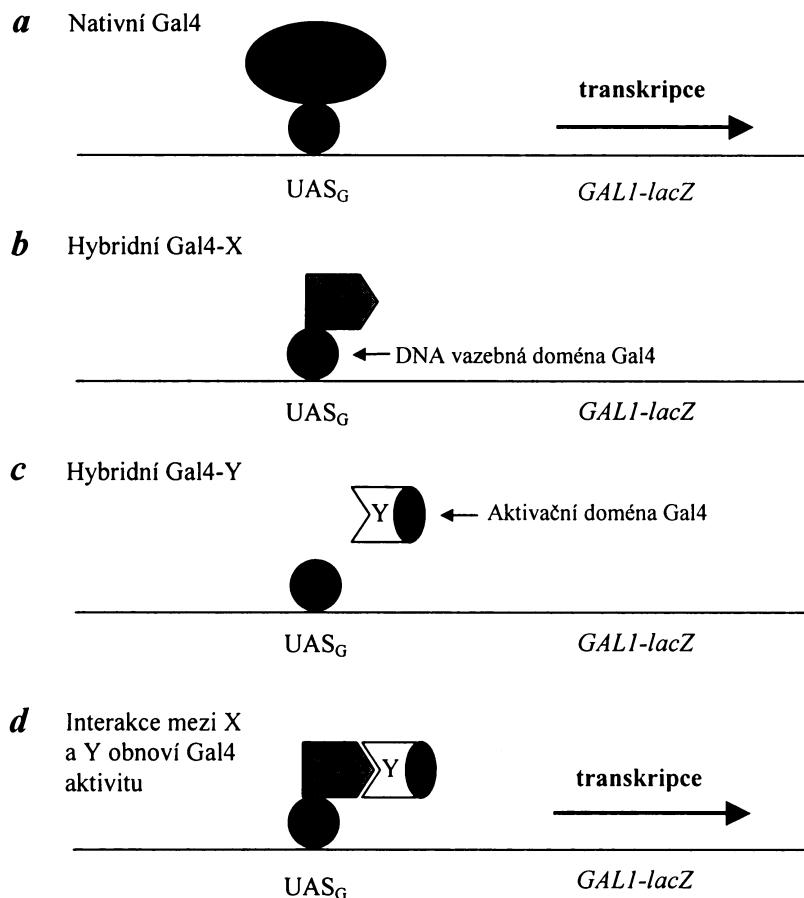
K experimentům se používají mutantní kmeny kvasinek, které mají deletovaný gen pro Gal4 protein a pro Gal80 protein (Gal80 je negativní regulátor Gal4 proteinu). Dále tyto kmeny obsahují bakteriální fúzní gen *GAL1-Lac Z*, jehož produkt ( $\beta$ -galaktosidáza) umožňuje metabolizovat  $\beta$ -galaktosidy (např. laktózu). Tyto kmeny se pak transformují plazmidy, které obsahují geny pro domény Gal4 proteinu. Takže  $\beta$ -galaktosidázová aktivita je dána mírou aktivity Gal4 z vnesených plazmidů.

Pro selekci transformovaných mutant se používají kmeny s mutací v genech pro syntézu histidinu (*HIS3*) a leucinu (*LEU2*). Tyto geny se používají jako markery plazmidů a jsou vnášeny spolu s plazmidem do buněk. Na selekčním mediu přezijí jen transformované buňky. Toto medium umožňuje transkripcí regulovanou  $\text{UAS}_G$  sekvencí (2% galaktóza, 2% ethanol, 2% glycerol) a neobsahuje leucin nebo histidin.  $\beta$ -galaktosidázová aktivita se projeví změnou zabarvení kolonie po přidání X-gal indikátoru do media. Snadno se tak odliší kolonie obsahující funkční Gal4 protein (tmavě modré) od kolonií, které přijaly jen jeden plazmid a jsou bílé.

### 2.3.1.3. Využití metody

Pomocí této metody se zkoumají interakce mezi dvěma proteiny. Funkční domény Gal4 proteinu se využijí k vytvoření dvou hybridních proteinů. Jeden hybrid vznikne fúzí DNA vazebné domény Gal4 a proteinu X, druhý hybrid se vytvoří spojením Gal4 aktivační domény s proteinem Y. Pokud dojde k interakci mezi proteiny X a Y a vytvoří spolu komplex, obě domény se k sobě přiblíží a obnoví se tak aktivita Gal4 proteinu, to se projeví spuštěním transkripce genu, který je regulován sekvencí  $\text{UAS}_G$  (obr. 3).

Obr. 3



Obr. 3 Aktivace transkripce pomocí obnovení Gal4 aktivity

- a – nativní Gal4 protein obsahuje vazebnou i aktivační doménu a indukuje transkripcí genu *GAL1-lacZ*
- b – hybrid skládající se z vazebné domény a proteinu X není schopen indukce transkripce
- c – hybrid aktivační domény a proteinu Y není schopen vazby na specifickou sekvenci DNA
- d – interakce mezi proteiny X a Y vede k přiblížení obou domén a k aktivaci transkripce (Fields a Song, 1989)

Tento systém má svá omezení, lze ho použít pouze v případě, že zkoumané proteiny spolu mohou interagovat uvnitř jádra. Dále musí být aktivační doména Gal4 přístupná potřebným transkripčním faktorům a hybridní protein Gal4-X nesmí sám aktivovat transkripci.

Tato metoda má další možnosti uplatnění, můžeme hledat neznámé asociační partnery studovaných proteinů a to tak, že buňky transformované jedním Gal4-fúzním genem budeme dále transformovat druhým fúzním genem s jednotlivými štěpy genomové knihovny. Dvojité hybridy selektujeme a sledujeme β-galaktosidázovou aktivitu. Po výběru pozitivních klonů můžeme odhalit interagující protein identifikací sekvence z genomové knihovny.

Tento přístup je vhodný pro zjišťování proteinů a pro mapování specifických vazebních domén. V aplikovaném výzkumu má význam pro syntézu terapeutických proteinů reagujících s bakteriálními nebo virovými proteiny (Fields a Song, 1989).

## 2.4. Hmotnostní spektrometrie

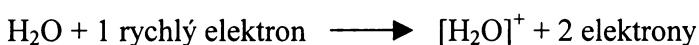
Tato metoda se používá k chemickým analýzám nejrůznějšího materiálu, od sloučenin kovů a ropných produktů až po biologický materiál. Využíala se více než sto let, v současnosti jsou její technologie využívány ve většině přírodovědných oborů. V posledních dvaceti letech se hmotnostní spektrometrie začala široce uplatňovat v biologii. Umožňuje rychlou a přesnou proteinovou analýzu, což usnadňuje vývoj proteomiky. Hmotnostní spektrometry umožňují generovat velké množství dat v krátké době. Jsou velmi citlivé, k analýze stačí pikogramová množství proteinu. Pomocí této metody lze určit přesnou molekulovou hmotnost a aminokyselinovou sekvenci proteinu.

### 2.4.1. Hmotnostně spektrometrická analýza

#### 2.4.1.1. Separace a identifikace částic

Hmotnostní spektrometry separují nabité částice podle jejich hmotnosti pomocí elektrického nebo magnetického pole. Přístroj neměří přímo hmotnost, ale poměr hmotnosti ku náboji částice ( $m/z$ ). Z této hodnoty se pak odvozuje molekulová hmotnost částice.

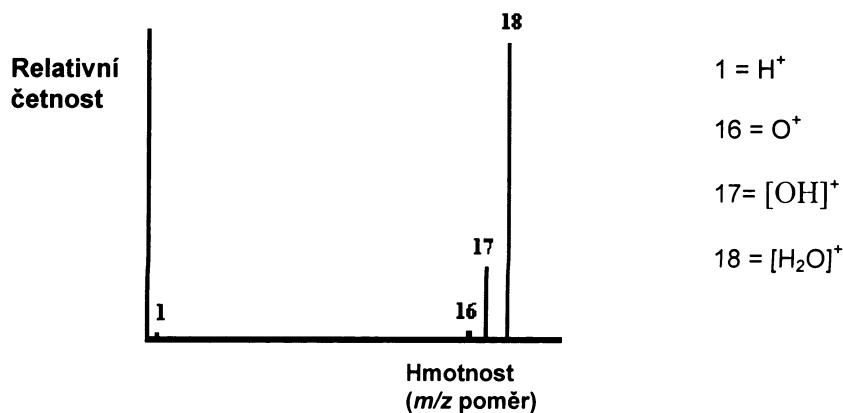
Postup měření je vysvětlen na příkladu molekuly vody. Ta se skládá ze dvou atomů vodíku a jednoho atomu kyslíku. Molekulová hmotnost vody je 18. Při analýze vody zavedeme vodní páry do vakuové komory spektrometru (komora funguje jako iontový zdroj). Když necháme procházet parami vody paprsek elektronů, dojde ke srážkám molekul a to způsobí vyražení elektronů z molekul vody a vznik kladně nabitych částic  $[H_2O]^+$ .



Kolize mezi elektrony a molekulami mohou způsobit fragmentaci částic. Z molekuly vody vznikají kationty  $[OH]^+$ ,  $O^+$  a  $H^+$ . Všechny tyto fragmenty jsou změřeny analyzátem, takže výsledné hmotnostní spektrum se skládá z jejich vrcholů, viz obr. 4. Kombinace naměřených  $m/z$  hodnot těchto fragmentů je specifická pro molekulu vody.

Obr. 4

### Hmotnostní spektrum vody



Obr. 4 Hmotnostní spektrum molekuly vody

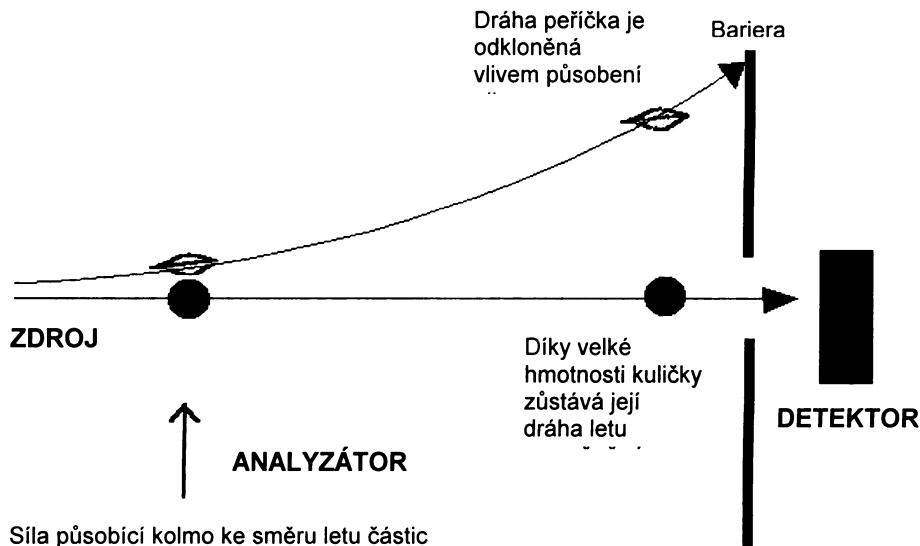
Pokud měříme jinou částici, která má stejnou hodnotu molekulové hmotnosti, např.  $[\text{OH}]^+$ , odlišíme ji právě díky jiné kombinaci  $m/z$  hodnot fragmentů.  $[\text{NH}_4]^+$  má molekulovou hmotnost 18, ale fragmenty  $\text{N}^+$  a  $[\text{NH}]^+$  mají hmotnost 14 a 15. Odborníci zabývající se touto metodou jsou schopni ze získaných dat interpretovat molekulovou hmotnost a strukturu analyzované molekuly; v současné době se k tomuto účelu používají speciální počítačové programy. Moderní hmotnostní spektrometry jsou schopny měřit molekulovou hmotnost natolik přesně, že od sebe odliší přímo  $m/z$  hodnoty molekul  $[\text{H}_2\text{O}]^+$  (18,010) a  $[\text{NH}_4]^+$  (18,035) bez použití  $m/z$  hodnot fragmentů.

#### **2.4.1.2. Přístroje používané ve hmotnostní spektrometrii**

V současnosti existuje mnoho druhů hmotnostních spektrometrů, všechny však obsahují tři základní části: iontový zdroj, analyzátor a detektor. V první části vznikají z molekul vzorku nabité částice. V analyzátoru jsou tyto částice separovány podle své hmotnosti a náboje ( $m/z$  poměr). Třetí část určuje  $m/z$  hodnoty rozdělených iontů pomocí změny proudu. V současnosti se používá pro analýzu mnoho druhů hmotnostních spektrometrů lišících se přípravou nabitých částic. Odlišují se druhem matrice použité k ionizaci částic a k jejich uvedení do pohybu, postupem ionizace a přípravou vzorku k analýze. Tyto postupy jsou stále zdokonalovány a vyvíjeny pro měření velkých proteinů a proteinových nedisociovaných komplexů.

Obr. 5

### SEPARACE PODLE HMOTNOSTI – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR



Obr. 5 Schéma hlavních součástí hmotnostního spektrometru

Všechny spektrometry využívají pro separaci částic magnetické nebo elektrické pole. Částice jsou děleny podle svého momentu (v magnet. poli) nebo podle své kinetické rychlosti (v el. poli). Síla působí vždy v kolmém směru ke dráze letu částice, takže ionty jsou odkláněny od své původní dráhy. Čím je částice lehčí, tím odklon nastává dříve, protože její moment setrvačnosti je menší. Princip je naznačen na příkladu peříčka a ocelové kuličky (viz obr. 5). Výjimkou jsou TOF analyzátory, které měří dobu doletu částic [time-of-flight (Yates, 2000)].

#### **2.4.1.3. Analýza proteinů**

Způsob měření molekulové hmotnosti proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie je podstatně přesnější než elektroforesa nebo chromatografie. Odchylka měření není větší než 1% hmotnosti daného proteinu, v případě nových spektrometrů napojených na chromatografickou kolonu nepřesahuje chyba měření 0,1%. Navíc získáváme informace o reálné struktuře proteinů a o jejich přesném složení. Můžeme tak identifikovat neznámé součásti vzorku nebo můžeme zjišťovat sekvenci nových proteinů (Biemann, 1992).

#### *Preseparační metody*

Biologický materiál je komplexní a poměrně složitý pro hmotnostní analýzu, proto je vhodné použít některé separační techniky před samotnou analýzou. Čím složitější je vzorek, tím

menší je rozlišení a přesnost spektrometru. Nejčastěji se jako preseparační metody proteinů používají elektroforetické techniky, imunoprecipitace nebo chromatografie. Nejlepších výsledků dosahují kapalinové chromatografické kolony napojené přímo na hmotnostní spektrometr. Vzorek vytékající z kolony je ihned analyzován. Pro hmotnostní analýzu dnes již stačí pouze nanogramové až pikogramové množství proteinu.

Jednodušším preseparačním systémem je elektroforesa. Pro jednodušší proteinové směsi (do 100 komponent) se používá jednorozměrná SDS-PAGE. Složitější směsi (buněčné lyzáty) jsou separovány pomocí dvourozměrné elektroforesy, kde v prvním rozměru dochází k separaci proteinů podle vlastního náboje a ve druhém směru jsou separovány podle molekulové hmotnosti. Obě dělení probíhají za denaturačních podmínek. Tak vznikne proteinová dvourozměrná mapa, jejíž jednotlivé části mohou být dále analyzovány.

Proteiny separované v gelu se obarví za použití stříbra nebo Coomassie Brilliant Blue R a jednotlivé skvrny nebo pásy se vyřežou. Proteiny jsou štěpeny přes noc proteázou (trypsin). Vzniklé peptidy jsou poté analyzovány hmotnostním spektrometrem a naměřené hodnoty jsou porovnávány s teoretickými hodnotami odvozenými z dat genomových knihoven. Tyto databáze obsahují sekvence všech známých proteinů a dále i hypotetické proteinové sekvence. Pokud jsou vzorky příliš složité a identifikace proteinů není jednoznačná, použije se k měření tandemový hmotnostní spektrometr (Matsuo a Seyama, 2000).

V současnosti se začíná využívat jako preseparační technika i BN-PAGE. Analyzují se komplexy přímo z prvorozměrového nativního gelu. Tímto způsobem byl identifikován např. komplex proteasomu (750 kDa), ATPsyntasa (230 kDa), podjednotka ribosomu 40 S (zhruba okolo 1MDa) nebo klatrinový triskelion (700 kDa) (P. Novák, J. Černý - data nepublikována).

### *Ionizace peptidů*

Analýza velkých proteinových molekul je podstatně obtížnější než analýza organických sloučenin nebo malých peptidů. V nedávné době byly vyvinuty dvě techniky pro tvorbu iontů z velkých molekul. Jednou z nich je MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization), kde se používá laser k excitaci matrix nesoucí vzorek. To vede k jejímu odpaření a vzorek se ionizuje a přechází do plynné fáze. Druhou metodou je ESI (electrospray ionization), kde se vzorek v roztoku nabíjí elektrickým potenciálem a vzápětí se rozprašuje v drobných kapičkách, které jsou zahřátím převáděny do plynné fáze (Yates, 2000).

### *Informace získané hmotnostní analýzou*

Podle separace jednotlivých peptidů se identifikuje celý protein. Nyní se provádí rychlá identifikace proteinů prostřednictvím hledání dat získaných spektrometrem v databázích

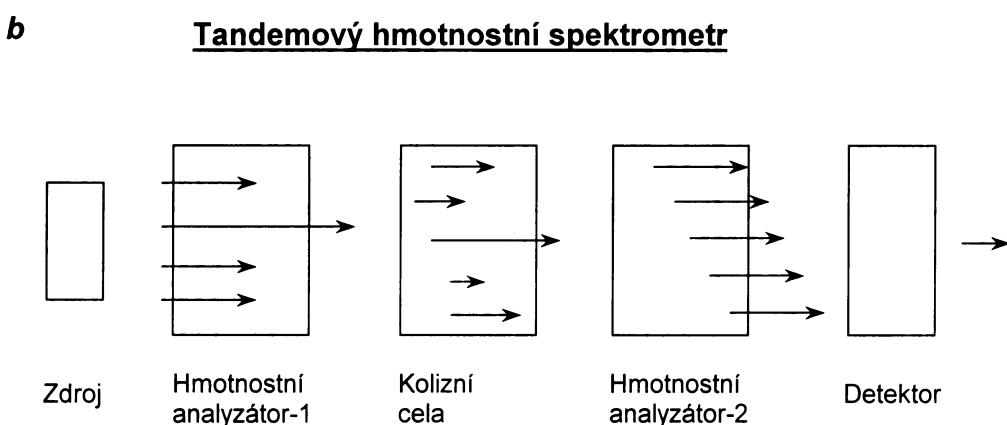
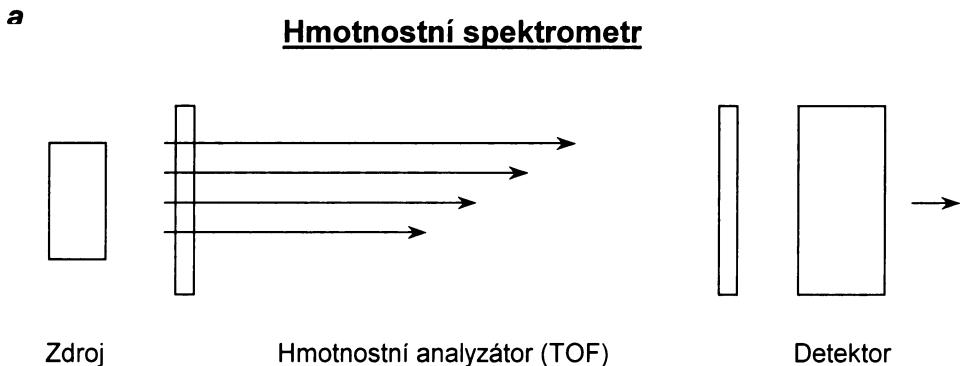
proteinových a nukleotidových sekvencí. Tento postup významně přispěl k identifikaci proteinových komplexů.

Hmotnostní spektrometry poskytují dva druhy informací. Měří přesnou molekulovou hmotnost částic (často se používá MALDI ve spojení s TOF analyzátem) a určují aminokyselinovou sekvenci proteinu (k tomuto účelu se používají MS/MS – tandemové hmotnostní spektrometry) (Yates, 2000).

Hmotnostní spektrometry jsou schopny generovat data poměrně rychle také díky zjednodušené analýze dat. Data ze spektrometru mají přímou souvislost se sekvencemi aminokyselin. Z naměřených molekulových hmotností peptidů můžeme určit jejich aminokyselinové složení a podle fragmentace peptidů můžeme určit pořadí aminokyselin. Oba typy informací se dají využít při hledání proteinové sekvence v databázi. Specifický protein se nedá určit z hmotnosti jednoho peptidu, ale je zapotřebí většího množství různých peptidů (zpravidla více než tří). Pokud určujeme neznámý protein, porovnáváme naměřené hmotnostní spektrum s teoretickými hmotnostmi peptidů získaných naštěpením všech proteinů v databázi. Za odpovídající se považují proteiny, jejichž peptidové hmotnosti jsou shodné s převážnou většinou naměřených  $m/z$  hodnot. Proto je pro tento postup důležitá vysoká přesnost měření.

Další možnosti jsou tandemové hmotnostní spektrometry používané pro analýzu komplexních vzorků. Pomocí tohoto postupu je možné izolovat peptid o určité  $m/z$  hodnotě ze složité peptidové směsi. Tento peptid je dále fragmentován až na jednotlivé aminokyseliny, z tohoto materiálu je možné určit aminokyselinovou sekvenci peptidu. Při porovnání několika tandemových hmotnostních spekter získáme velmi přesnou informaci o sekvencích peptidů a identifikujeme tak celý protein. Při této identifikaci nevadí přítomnost jiných proteinů ve vzorku (Biemann, 1992).

Obr. 6



Obr. 6 Schéma - rozdíl mezi hmotnostním spektrometrem a tandemovým hmotnostním spektrometrem Obr. a – jednostupňový hmotnostní spektrometr s TOF analyzátorem.  $m/z$  hodnoty jsou odvozeny od hodnot měření doby, za kterou ionty doletí od zdroje k detektoru. Obr. b – tandemový hmotnostní spektrometr. Přístroj se skládá ze dvou analyzátorů, mezi nimiž je plynová kolizní cela. První analyzátor oddělí iont s určitou  $m/z$  hodnotou. Tento iont disociuje v kolizní cele a jeho fragmenty jsou analyzovány v druhém analyzátoru. Výsledkem je hmotnostní spektrum malých fragmentů až jednotlivých aminokyselin peptidu (Biemann, 1992).

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Materiál

##### 3.1.1. Chemikálie

• Agarosa	Sigma Chemical Co., USA
• Akrylamid	Bio-Rad Laboratories, USA
• Akrylamid/Bis (29:1) 30% roztok	Serva, SRN
• Akrylamid/Bis (37,5:1) 40% roztok	Serva, SRN
• APS	Sigma Chemical Co., USA
• Azid sodný	Sigma Chemical Co., USA
• Benzonáza	Boehringer Mannheim, SRN
• Bis-Tris	Sigma Chemical Co., USA
• $\beta$ -merkaptoothanol	Sigma Chemical Co., USA
• Bovinní fetální sérum	Gibco, USA
• Bromfenol modrý	Lachema, ČR
• BSA	Sigma Chemical Co., USA
• Coomassie - Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, USA
• Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva, SRN
• Coomassie Brilliant Blue R	Mann Research Laboratoires, USA
• Dithiothreitol	Fluka AG, Švýcarsko
• DMSO	Sigma Chemical Co., USA
• DNáza I	Boehringer Mannheim, SRN
• EDTA	Serva, SRN
• Ethanol	Jan Kulich, ČR
• Ethidium bromid	Sigma Chemical Co., USA
• Formaldehyd 16% roztok	Eletron Microscopy Science, USA
• Gentamicin	Lek Pharmaceutical and Chemical Co., Slovensko
• Glutamin GL	Sevac, ČR
• Glycerol	Lachema, ČR
• Glycin	Sigma Chemical Co., USA
• $H_2O_2$ 30% sol.	Peroxides, ČR
• HEPES	Serva, SRN
• Jodoacetamid	Sigma Chemical Co., USA
• Kyselina aminokapronová	Fluka AG, Švýcarsko
• Kyselina p-kumarová	Sigma Chemical Co., USA
• Laurylmaltosid	Calbiochem, USA
• Leupeptin	Sigma Chemical Co., USA
• L-histidin	Reanal, Maďarsko
• L-tryptofan	Fluka AG, Švýcarsko
• Luminol	Sigma Chemical Co., USA
• Methanol	Jan Kulich, ČR
• N'N'-methylen-bis-akrylamid	Bio-Rad Laboratories, USA
• NaHCO <sub>3</sub>	Sevapharma, ČR
• Nonidet P-40	Fluka AG, Švýcarsko

• Odtučněné sušené mléko Eligor	<i>Promil, ČR</i>	
• Pefabloc	<i>Roche, SRN</i>	
• Pentaamine chlorocobalt(III) chloride Co(III)(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> Cl <sup>2+</sup>	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>	
• Pepstatin	<i>Sigma Chemical Co., USA</i>	
• Ponceau S	<i>Bio-Rad Laboratories, USA</i>	
• Pyruvát sodný	<i>Sigma Chemical Co., USA</i>	
• RPMI 1640	<i>Akademie věd, ČR</i>	
• Sacharosa	<i>Serva, SRN; Sigma Chemical Co., USA</i>	
• SDS	<i>Fluka AG, Švýcarsko; Serva, SRN</i>	
• S-MEM	<i>Sevapharma, ČR</i>	
• SuperSignal West Femto Trial Kit - substráty pro ECL	<i>Pierce, USA</i>	
• TEMED	<i>Sigma Chemical Co., USA</i>	
• Tricin	<i>Sigma Chemical Co., USA</i>	
• Tris	<i>Serva, SRN</i>	
• Tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium(II) hexahydrát Ru(II)(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>	
• Triton X-100	<i>Serva, SRN</i>	
• Tween 20	<i>Serva, SRN</i>	
• AgNO <sub>3</sub>	<i>Lachema, ČR</i>	
• CH <sub>3</sub> COOH	<i>Lachema, ČR</i>	
• HCl	<i>Lachema, ČR</i>	
• KCl	<i>Lachema, ČR</i>	
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>Lachema, ČR</i>	
• MgCl <sub>2</sub>	<i>Lachema, ČR</i>	
• Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	<i>Lachema, ČR</i>	
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	<i>Lachema, ČR</i>	
• Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . 5H <sub>2</sub> O	<i>Lachema, ČR</i>	
• Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	<i>Lachema, ČR</i>	
• NaCl	<i>Lachema, ČR</i>	
• NaOH	<i>Lachema, ČR</i>	

### 3.1.2. Materiál

- Chromatografický papír Grade 17 Chr
  - Immobilon-P - PVDF membrána
  - Nitrocellulosa - membrána
  - Rentgenový film MXB
- Whatman Scientific, UK*  
*Sigma, USA*  
*Pall Corporation, USA*  
*Kodak, USA*

### 3.1.3. Přístroje

- 75W xenonová lampa, model U-ULH
  - Automatický vyvolávač pro rentgenové filmy
  - Centrifuga
  - CO<sub>2</sub> inkubátor
  - Fotografický blesk Metablitz 23 BC 4
  - Homogenizér
  - Laminární box
  - Semi-Dry Blot
  - Skenovací kamera
- Olymus Optical Co., Japan*  
*Fomei, ČR*  
*Jouan, Francie*  
*Jouan, Francie*  
*Metz, SRN*  
*Mechanika precyzyjna, Polsko*  
*Jouan, Francie*  
*Bio-Rad Laboratories, USA*  
*Syngene, Velká Británie*

• Spektrofotometr Spekol 210	<i>Carl Zeiss, SRN</i>
• Ultracentrifuga	<i>Beckman, USA</i>
• Vertikální elektroforesa EV 1	<i>Vývojové dílny, ČR</i>
• Vertikální elektroforesa Mighty Small SE250, SE260	<i>Hoefer Scientific Instruments, USA</i>
• Vertikální elektroforesa Mini-Protean	<i>Bio-Rad Laboratories, USA</i>
• Závěrka fotoaparátu Zorkij	<i>Rusko</i>

### 3.1.4. Protilátky

#### *Sekundární protilátky*

Anti-myší kozí sérum konjugované s peroxidázou (GAM-HRP) *Bio-Rad Laboratoires, USA*

Anti-králičí kozí sérum konjugované s peroxidázou (GAR-HRP) *Bio-Rad Laboratoires, USA*

*Primární protilátky poskytnuté ze souboru protilátek Dr. Hozáka*

Monoklonální protilátky:

protilátky proti velké podjednotce RNA polymerázy II (X 3)

protilátky proti vimentinu (X 89) *Amersham, UK*

Polyklonální protilátky:

protilátky proti aktinu (X 123) *Sigma, USA*

protilátky proti velké podjednotce RNA polymerázy I (X 159) *Indrid Grummt, Heidelberg*

protilátky proti nukleární DNA helikáze II (X 142) *Dr. Suisheng Zhang, IMB Jena e. V., SRN*

*Primární protilátky pocházející z laboratoře prof. Hořejšího*

Monoklonální protilátky:

protilátky proti fosfatáze CD 45 (E 28)

protilátky proti  $\beta_1$ -integrinu CD 29 (E 101A)

protilátky proti  $\beta_2$ -integrinu CD 18 (E 48)

protilátky proti leukosialinu CD 43 (E 59)

Polyklonální protilátky:

protilátky proti chaperonu VCP

### 3.1.5. Roztoky

#### *Fyziologické pufry*

Dulbecco modifikovaný PBS pro buňky (D-PBS)

0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g NaCl, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O ad 1000ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5

PBS pro protilátky

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 0,38 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5, 0,5 ml Tween 20

*Roztoky používané při izolacích*

Hypotonický pufr pro izolaci membrán

10 mM HEPES pH 7,4, 42 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

TKM pufr

10 mM Tris pH 7,4, 25 mM KCl, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub>

Homogenizační pufr pro izolaci jader

0,25 M sacharosa, 25 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (přidávat těsně před použitím)

Pufr pro ultracentrifugaci

2,3 M sacharosa, 25 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (přidávat těsně před použitím)

*Roztoky pro BN-PAGE*

Katodový pufr

15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, pH 7,0

Modrý katodový pufr

15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricin, pH 7,0, 0,02% CBB G

Anodový pufr

50 mM Bis-Tris, pH 7,0 upravováno HCl

Mitochondriální pufr

750 mM aminokapronová kyselina, 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0 upravováno HCl

Vzorkový roztok pro BN-PAGE

750 mM aminokapronová kyselina, 0,5% CBB G

3x konc. gelový pufr pro BN-PAGE

1,5 M aminokapronová kyselina, 150 mM Bis-Tris, pH 7,0 upravováno HCl

*Roztoky pro příčně vazebnou reakci*

PBS pro příčně vazebnou reakci

15 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 150 mM NaCl

4x konc.vzorkový pufr pro příčně vazebnou reakci

0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 40% glycerol, 8% SDS, 2,88 M β-merkaptoethanol, 0,4% bromfenol

*Roztoky pro SDS-PAGE*

Gelový pufr 1 pro SDS-PAGE

1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS

Gelový pufr 2 pro SDS-PAGE

0,5 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS

Pufr pro SDS-PAGE

25 mM Tris, 188 mM glycín, 0,1% SDS

4x konc.redukující vzorkový pufr pro SDS-PAGE

250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glycerol, 8% SDS, 0,4% β-merkaptoethanol, 0,01% bromfenol

vzorek se míchá s pufrem v poměru 3:1

4x konc.neredukující vzorkový pufr pro SDS-PAGE

250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glycerol, 8% SDS, 0,01% bromfenol

vzorek se míchá s pufrem v poměru 3:1

*Roztoky pro blotovací membrány*

TGM pufr pro blotování

25 mM Tris, 192 mM glycín, 20% methanol

Chemiluminiscenční substrát

Roztok 1 : rozpustit 22,5 mg Luminolu v 0,5 ml DMSO, přidat k 50 ml Trisu pH 8,8

přidat 220 µl 90 mM p-kumarové kyseliny rozpuštěné v DMSO

Roztok 2 : přidat 30,6 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do 50 ml 0,1 M Trisu pH 8,8

Smíchat roztoky v poměru 1:1

*Roztoky pro barvení gelů pomocí CBB R*

Fixační roztok

50% methanol, 10% kyselina octová

Barvící roztok CBB R

0,1% CBB R, 40% methanol, 10% kyseliny octová

### Odbarvovací roztok

40% methanol, 10% kyselina octová

*Roztoky pro barvení gelů pomocí stříbra*

### Fixační roztok

50% methanol, 10% kyselina octová

### Roztok stříbra

0,2% AgNO<sub>3</sub>, 0,028% formaldehyd

### Vývojka

2,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,0004% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0,0185% formaldehyd

*Rozpis gelových roztoků*

### Gelové roztoky pro BN-PAGE

## **Nativní gradientový gel**

	Horní roztok	Dolní roztok
[%]	<b>4</b>	<b>16</b>
Objem roztoku	<b>9</b>	<b>9</b>
3 x GB	3	3
40 % ACR/Bis	0.9	3.6
H <sub>2</sub> O	5.1	0.3
87% glycerol	0	2.1
10 % APS	0.05	0.03
TEMED	0.005	0.003
Celkový objem	<b>9.05</b>	<b>9.03</b>

### Gelové roztoky pro SDS-PAGE

## **SDS gradientový gel**

	Horní roztok	Dolní roztok
[%]	<b>4</b>	<b>16</b>
Objem roztoku	<b>20</b>	<b>20</b>
Voda	12.3	2
Pufr 1	5	5
30% ACR/Bis	2.7	8
100% glycerol	0	5
10 % APS	0.09	0.09
TEMED	0.008	0.008
Celkový objem	<b>20.1</b>	<b>20.1</b>

### **Standartní SDS gel**

	Separační gel	Zaostřovací gel
[%]	<b>10</b>	<b>4</b>
Objem roztoku	<b>10</b>	<b>5</b>
Voda	4.2	3
Pufr 1	2.5	0
Pufr 2	0	1.25
30% ACR/Bis	3.3	0.65
100% glycerol	0	0
10 % APS	0.05	0.045
TEMED	0.004	0.004
<i>Celkový objem</i>	<b>10.1</b>	<b>4.95</b>

*Vzorce pro výpočet koncentrace gelových roztoků*

$$T = \frac{[a + b] \times 100}{V} \quad a - \text{hmotnost ACR(g)}$$

$$C = \frac{b \times 100}{a + b} \quad b - \text{hmotnost Bis(g)}$$

V - objem roztoku(ml)

## **3.2. Metody**

### **3.2.1. Kultivace buněčných linií**

*Buněčná linie pro izolaci membrán*

Buněčná lymfocytární linie Jurkat divoký kmen odvozená od T lymfocytů byla kultivována v mediu RPMI 1640 jako suspenzní kultura při teplotě 37°C, v 5% CO<sub>2</sub> a 100% vlhkosti.

#### Kultivační medium RPMI 1640

5x koncentrát RPMI 1640..... 200 ml

Bovinní fetální sérum..... 100 ml

Glutamin GL..... 6 mg

Gentamicin konc. 4 mg/ml..... 10 ml

100 mM pyruvát sodný..... 10 ml

7,5% NaHCO<sub>3</sub>..... 26 ml

25 mM β-merkaptoethanol..... 2 ml

1 M HEPES pH 7,2.....15 ml

H<sub>2</sub>O.....ad 1000 ml

#### *Buněčná linie pro izolaci jader*

Buněčná linie HeLa byla kultivována v mediu S-MEM jako suspenzní točící se kultura při teplotě 37°C.

#### Kultivační medium S-MEM

10x koncentrát S-MEM.....100 ml

Bovinní fetální sérum.....50 ml

Gentamicin konc. 4 mg/ml.....10 ml

7,5% NaHCO<sub>3</sub>.....15 ml

H<sub>2</sub>O.....ad 1000 ml

#### **3.2.2. Izolace buněčných membrán**

Všechny kroky probíhaly při 0°C na ledu. Pro izolaci byly použity buňky linie Jurkat. Buňky byly spočítány a 3x promyty 'D-PBS'. Pak byly inkubovány 15 minut v 'hypotonickém roztoku' s inhibitory (1 mM Pefabloc, 5 mM jodoacetamid). Buněčná suspenze byla 8x protažena injekční jehlou 30G. Nejprve byla centrifugována buněčná jádra 400xg, 5 minut, supernatant byl odebrán a centrifugován 14 000xg, 20 minut. Supernatant byl odstraněn, peleta membrán byla ihned zamražena v -70°C.

#### **3.2.3. Reakce PICUP**

Reakce probíhala v celkovém objemu 20 µl v 'PBS pro příčně vazebnou reakci' obsahujícím 0,125 mM Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> a 2,5 mM APS nebo 20,5 mM Co(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sup>2+</sup> (Fancy *a kol.*, 2000; Fancy a Kodadek, 1999). Obě reagencie byly přidávány ke vzorku těsně před světelnou expozicí (v pokusech studujících účinek histidinu byl v reakci přítomen 7,5 mM L-histidin). Koncentrace proteinů v reakci byla cca 2 µg/µl. Vzorek byl osvěcován v 0,5 ml Eppendorf zkumavkách 75 W xenonovou lampou. Světlo procházelo uzávěrkou fotoaparátu, dále fotografickým UV filtrem (odstranil UV záření) a přes 5 cm destilované vody (odstranila infračervené záření). Vzorek byl umístěn 30 cm od světelného zdroje. Doba osvitu byla přesně regulována fotografickou závěrkou. Ihned po expozici byly vzorky zhášeny '4x konc. redukujícím vzorkovým pufrem pro SDS-PAGE' nebo 75 mM roztokem tryptofanu (konečná koncentrace v reakční směsi byla 7,5 mM, pak byl použit '4x konc. neredukující vzorkový puf

pro SDS-PAGE'). Vzorky byly zahřáty na 95°C po dobu 90 sekund a byly separovány v gradientových polyakrylamidových gelech metodou SDS-PAGE.

### **3.2.4. Izolace jader z HeLa buněk**

Suspenzní HeLa buňky byly spočítány a promyty v 'D-PBS' a centrifugovány 400xg po 5 minut, opakováno celkem třikrát. Ve všech roztocích byly přítomny inhibitory proteáz (1 mM Pefabloc, 0,5 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin). Peleta buněk byla suspendována ve 40 objemech 'TKM' pufru, těsně před homogenizací byl přidán 10% roztok NP-40 (konečná koncentrace 0,4%). Buněčná suspenze byla homogenizována 60-ti pohyby teflonového pístu ve skleněném homogenizéru a poté centrifugována 100xg po 5 minut. Supernatant byl odebrán, peleta byla resuspendována v 1 ml 0,25 M roztoku sacharosy v roztoku 50 mM Tris (pH 6,8). Suspenze jader byla navrstvena na 1 ml 0,88 M roztoku sacharosy v roztoku 50 mM Tris (pH 6,8). Jádra byla přečištěna centrifugací přes roztok sacharosy 1000xg po 10 min ve výkyvném rotoru. Supernatant byl odebrán a jádra byla promyta v PBS a zamražena v -70°C.

### **3.2.5. Izolace jader z krysích jater**

Pro získání jaterní tkáně byly použiti potkani kmene Wistar ve stáří 50 dní. Zvířata byla usmrčena etherem a následnou dekapitací.

Celý postup byl prováděn při 0°C na ledu podle protokolu Blobela a Pottera (Blobel a Potter, 1966), ve všech roztocích byly přítomny inhibitory proteáz (1 mM Pefabloc, 0,5 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin). Vyjmutá játra z čerstvě usmrcených zvířat byla zvážena, rozstříhána na 1-2 mm části a homogenizována 15-ti pohyby teflonového pístu ve skleněném homogenizéru v 'homogenizačním pufru' (30% homogenát). Homogenát byl přefiltrován přes 4 vrstvy gázy, k filtrátu bylo přidáno 5 µl 1 M DTT/1 ml filtrátu a filtrát byl následně centrifugován 15 minut, 800xg. Supernatant byl odebrán, peleta byla suspendována v 'homogenizačním pufru'. Byly přidány 2 objemy 'pufru pro ultracentrifugaci' a suspenze byla dobře promíchána. Do ultracentrifugačních zkumavek byl navrstven sacharosový gradient - do poloviny zkumavky byl navrstven 'pufr pro ultracentrifugaci', na něj byl navrstven roztok homogenátu. Rozhraní obou roztoků bylo jemně narušeno Pasteurovou pipetou. Ultracentrifugace probíhala v ultracentrifuze Beckman při 4°C 1 hodinu, při zrychlení 124 000xg, rotor SW 28. Po skončení byl supernatant odebrán, peleta obsahující izolovaná jádra byla suspendována v 'homogenizačním roztoku'. Jádra byla centrifugována 15 minut, 800xg a suspendována v roztoku 50 mM Bis-Tris, 20% glycerol v objemovém poměru 1:1. Suspenze byla ihned zamražena v -70°C.

### **3.2.6. Příprava jaderného extraktu z jader krysích jater**

Všechny kroky byly prováděny při 0°C na ledu. V pokusu znázorněném na obr. 14 byla jaderná suspenze naředěna 2,5 násobným objemem roztoku 50 mM Bis-Tris (pH 7), ke vzorku byla přidána DNÁza I (400 U/ml). Vzorek byl inkubován na třepačce 40 minut při pokojové teplotě. Poté byl ke vzorku přidán Triton X-100 v konečné koncentraci 1% a kyselina aminokaronová v konečné koncentraci 750 mM. Vzorek byl centrifugován 20 minut při 14 000xg.

V pokusech znázorněných na obr. 15 a 16 byla jaderná suspenze naředěna 1,5 násobným objemem roztoku 50 mM Bis-Tris (pH 7,0). Ke vzorku byl přidán 2 M roztok kyseliny aminokaronové (v konečné koncentraci 750 mM). Ke vzorku byl přidán 10% roztok laurylmaltosidu (v konečné koncentraci 1%). Vzorek byl centrifugován 40 minut, 14 000xg.

V pokusech znázorněných na obr. 17, 18 a 19 byla jaderná suspenze naředěna stejným objemem roztoku 50 mM Bis-Tris (pH 7). Ke vzorku byla postupně přidávána aminokaronová kyselina v objemovém poměru 1:1. Byla vytvořena sada vzorků se stoupající koncentrační řadou kyseliny aminokaronové (0 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M, 1,5 M, 2 M). Ke všem vzorkům byl přidán 10% roztok laurylmaltosidu (v konečné koncentraci 1%) a vzorky byly ponechány na ledu 20 minut, následně byly centrifugovány 20 minut, 14 000xg.

### **3.2.7. Příprava cytosolických a membránových proteinových komplexů pro BN-PAGE**

Všechny kroky probíhaly při 0°C na ledu. Pro izolaci byly použity buňky linie Jurkat. Buňky byly spočítány a 3x promyty 'D-PBS'. Poté byly resuspendovány v 'mitochondriálním pufru'. K buněčné suspenzi byl přidán 10% roztok laurylmaltosidu (v konečné koncentraci 1%) a vzorek byl ponechán na ledu 20 minut. Následně byl centrifugován 20 minut, 14 000xg. K supernatantu byla přidána CBB G v konečné koncentraci 0,25%.

### **3.2.8. Stanovení koncentrace proteinů**

Měření bylo prováděno podle postupu uvedeného v manuálu pro měření koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976) soupravou BioRad (BioRad Protein Assay). Jako standard byl použit bovinní sérový albumin, resp. jeho koncentrační řada. K 800 µl vzorku (standardu) bylo přidáno 200 µl 5x ředěného reakčního roztoku. Po 5 minutách byla měřena extinkce vzorků při vlnové délce 595 nm pomocí spektrofotometru. Z hodnot extinkcí standardů byla stanovena kalibrační křivka závislosti extinkce na koncentraci a z této křivky byla odvozena koncentrace proteinů ve vzorku.

### **3.2.9. Příprava gradientových gelů pro BN-PAGE**

Standartně byly nalévány gradientové gely 4-16% T, s celkovou délkou cca 11 cm a s tloušťkou 1 mm.

V pokusu znázorněném na obr. 16 na zpolymerovaný gel byl navrstven 1 cm teplem ztekučené 2% agarosy v '1x koncentrovaném gelovém roztoku pro SDS-PAGE'.

### **3.2.10. Příprava nativního vzorku pro BN-PAGE**

Vzorek byl smíchán s 5% roztokem CBB G alespoň 5 minut přes nanášením na gel, konečná koncentrace CBB G ve vzorku byla 0,25%, což odpovídá čtvrtinové koncentraci detergentu ve vzorku.

### **3.2.11. BN-PAGE**

Separace proteinových komplexů probíhala v gradientovém nativním gelu, v elektroforese EV 1, systém byl chlazen na 4°C [v chladové místnosti; (Schagger a von Jagow, 1991)]. Vzorky proteinových komplexů byly nanášeny na gel v množství 100 µg proteinů na jamku gelu. Pro udržení komplexů v solubilní formě během separace byla přidána CBB G do 'katodového pufru' v konečné koncentraci 0,02%. Separace probíhala 16 hodin při napětí 70 V. Separace byla zastavena po vyběhnutí čelní zóny CBB G z gelu. Gel obsahující separované komplexy byl obarven 'CBB R' nebo byl blotován či použit k separaci v druhém rozměru (SDS-PAGE).

### **3.2.12. Druhý rozměr – SDS-PAGE**

Komplexy separované pomocí BN-PAGE byly ve vyříznutém gelovém pásu redukovány a denaturovány 0,5 hod. v roztoku 1% SDS, 1% β-merkaptoethanolu, gel byl nato opláchnut krátce vodou. Poté byl gelový pás umístěn mezi dvě skla, a pod něj byl navrstven 10% SDS separační gel a následně zaostřovací gel (tloušťka gelu 1 mm). Separace proteinů podle molekulové hmotnosti probíhala při proudu 25 mA cca 5 hodin v elektroforese EV 1. Gel byl obarven stříbrem (Blum a kol., 1987) nebo byl blotován na nitrocelulosovou membránu.

### **3.2.13. Příprava gradientových gelů pro SDS-PAGE**

Standartně byly nalévány gradientové gely 4-16% T, s celkovou délkou cca 6 cm a s tloušťkou 0,75 mm.

### **3.2.14. SDS-PAGE**

Byl připraven 10% separační gel, na něj byl nalit 4% zaostřovací gel. Vzorky byly smíchány s '4x konc. vzorkovým pufrem' v poměru 3:1 a zahřáty na 95°C po dobu 90 sekund. Vzorky byly naneseny na zaostřovací gel a proteiny byly separovány v 10% SDS gelu, separace probíhala na Mighty Small SE 250 při napětí 200V (resp. 20mA/gel) cca 1,5 hod.

### **3.2.15. Přenos proteinů z gelu na membránu (Western blot)**

#### *Denaturující SDS gely*

Pro blotování byl použit polosuchý blot, případně mokrý blot (Bio-Rad). Chromatografické papíry a nitrocelulosová membrána o velikosti gelu byly smočeny v 'TGM blotovacím pufrem'. Na vrstvu papírů byla přenesena membrána a na ní gel obsahující separované proteiny. Gel byl překryt vrstvou papírů. Gely byly blotovány 1,5 hod. při proudu 0,8 mA/cm<sup>2</sup> gelu.

#### *Nativní gely*

Postup byl obdobný jako u SDS gelů. Proteiny byly přenášeny na PVDF membránu, která byla před blotováním smočena v methanolu. Poté byla i s chromatografickými papíry smočena v 'bezbarvém katodovém pufrem'. Gely byly blotovány 1,75 hod. při proudu 0,8 mA/cm<sup>2</sup> gelu. Modré pozadí na membráně bylo odbarveno 'odbarvovacím roztokem'.

### **3.2.16. Detekce protilátkami**

Všechny roztoky byly připravovány z 'PBS pro protilátky'. Membrány s navázanými proteiny byly blokovány v 5% roztoku sušeného nízkotučného mléka 45 minut. Poté byly inkubovány s primární protilátkou v 1% roztoku mléka s 0,1% azidem sodným po dobu 45 minut. Nadbytek protilátky byl odmyt pufrem (4x 5 minut). Sekundární protilátka byla 5 000x řeďena v 1% roztoku mléka, inkubace trvala 45 minut. Nadbytek protilátky byl odmyt pufrem (4x 5 minut).

Na membránu byl aplikován roztok substrátu pro peroxidázu 1 minutu. Membrány byly exponovány na rentgenové filmy, které byly vyvolány v automatickém vyvolávači pro rentgenové filmy.

### **3.2.17. Barvení stříbrem**

Barvení gelů stříbrem probíhalo podle protokolu Bluma a kol. (Blum a kol., 1987). Gely byly ihned po ukončení elektroforetické separace fixovány ve 'fixačním roztoku' (30 minut).

Poté byly třikrát promyty 30% ethanolem po 20 minutách. Gely byly inkubovány v 0,02%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  přesně jednu minutu a opláchnuty vodou (3x 20 sekund). Dále byly 20 minut inkubovány v 'roztoku stříbra' a opláchnuty vodou (2x 20 sekund). Proteiny byly obarveny 'vývojkou' (asi 5 minut), vyvíjení bylo zastaveno 'fixačním roztokem' (10 minut).

### **3.2.18. Barvení CBB R**

Gely obsahující separované proteiny byly ihned po ukončení elektroforesy fixovány ve 'fixačním roztoku' 30 minut, pak byly barveny v 'roztoku CBB R' 30 minut. Pozadí bylo odstraněno po několika promytích 'odbarvovacím roztokem'.

### **3.2.19. Příprava vzorku na hmotnostní spektrometrii**

Obarvené gely v CBB R byly inkubovány v 1% roztoku kyseliny octové. Poté byly z nativního gelu vyříznuty proužky s proteiny a dále zpracovávány pro přípravu na spektrometrické měření Mgr. Petrem Novákem v Laboratoři hmotnostní spektrometrie (MBÚ AV ČR), kde byla prováděna i hmotnostní analýza pomocí hmotnostního spektrometru Decca.

## **4. Cíle práce**

Hlavním cílem práce bylo ověření dvou nových experimentálních přístupů určených k identifikaci podjednotkového složení proteinových komplexů. Aplikovali jsme tyto techniky na studium proteinových komplexů vyskytujících se ve dvou buněčných subkompartimentech – plasmatické membráně a buněčných jádrech. Zaměřili jsme se na elektroforetickou separaci proteinových komplexů v nativním stavu a na následnou identifikaci jejich podjednotkového složení pomocí hmotnostní spektrometrie. Naším záměrem bylo rovněž ověřit možnost přesnějšího mapování proteinových interakcí uvnitř komplexů pomocí nedávno publikované metody vzniku příčných kovalentních vazeb mezi asociovanými proteiny.

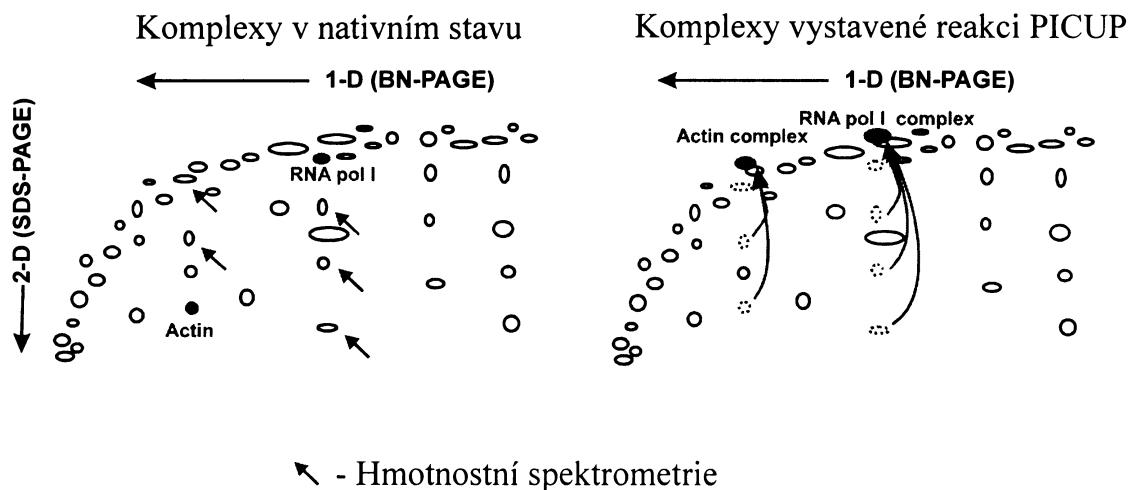
### **4.1. Konkrétní cíle práce**

1. Najít podmínky pro separaci jaderných proteinových komplexů pomocí BN-PAGE
2. Ověřit, zda by bylo možné identifikovat podjednotkové složení takto separovaných komplexů pomocí hmotnostní spektrometrie
3. Ověřit, zda nedávno publikovaná metoda tvorby příčných kovalentních vazeb mezi asociovanými proteiny (PICUP) je použitelná pro studium proteinových komplexů v hrubých buněčných preparacích či v celých buňkách

### **4.2. Předpokládané výsledky**

Pro přesné určení podjednotkového složení proteinových komplexů je třeba izolovat jednotlivé proteinové komplexy navzájem od sebe. K tomuto účelu se používá dvourozměrná separace, ale ani tato metoda nevylučuje možnou společnou komigraci dvou nebo více proteinových komplexů. Při studiu proteinové mapy dvourozměrné separace pak nemůžeme zcela přesně určit, zda proteiny nacházející se v jedné linii pod sebou skutečně pocházejí původně z jednoho komplexu. Proto jsme zamýšleli využít metodu tvorby příčných vazeb pro ověření podjednotkového složení. V ideálním případě bychom porovnávali dvě proteinové mapy dvourozměrné separace, které by se lišily v přítomnosti samostatných podjednotek komplexů viz obr. 7. Proteinové komplexy separované v nativním stavu by se rozpadly na podjednotky při SDS-PAGE. Proteinové komplexy podrobené reakci PICUP před separací by se při SDS-PAGE již nerozpadaly. Odlišili bychom tak podjednotky komplexů od monomerních proteinů. Pomocí hmotnostního spektrometru bychom pak identifikovali vybrané proteiny.

Obr. 7



Obr. 7 Schéma postupu identifikace podjednotkového složení proteinových komplexů pomocí metody BN-PAGE a reakce PICUP. Obrázek představuje schéma dvourozměrné separace (1. rozměr BN-PAGE, 2. rozměr SDS-PAGE) proteinových komplexů v nativním stavu (obrázek vlevo) a proteinových komplexů podrobených reakci PICUP před samotnou separací.. Zatímco komplexy separované v nativním stavu se při druhém rozměru rozpadnou na jednotlivé proteiny, proteiny komplexů vystavených reakci PICUP zůstanou propojené kovalentními vazbami, takže se komplexy nerozpadnou. Porovnání obou proteinových map by mohlo vést k přesnému určení podjednotkového složení, resp. touto cestou by bylo možno vyloučit proteiny, které se vyskytují na mapě v jedné linii s podjednotkami určitého komplexu, ale z tohoto komplexu nepochází. Následnou hmotnosně spektrometrickou analýzou by mohly být jednotlivé složky komplexu identifikovány (naznačeno šipkami).

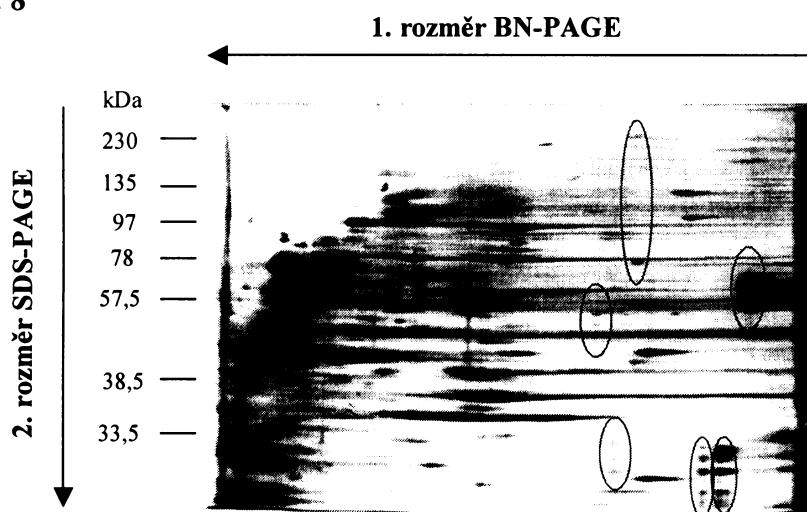
## 5. Výsledky

### 5.1. Jaderné proteinové komplexy lze separovat metodou BN-PAGE

Naším prvním cílem bylo ověřit, zda je možné separovat jaderné proteinové komplexy pomocí metody BN-PAGE stejným postupem, jaký byl popsán pro membránové proteiny Schaggerem a von Jagowem (Schagger a von Jagow, 1991). Obr. 8 ukazuje typickou dvourozměrnou separaci cytosolického a membránového materiálu. V prvním rozměru byly separovány cytosolické a membránové komplexy v nativním stavu metodou BN-PAGE, v druhém rozměru byly separovány za denaturujících podmínek jednotlivé podjednotky komplexů metodou SDS-PAGE. Na proteinové mapě barvené stříbrem jsou patrné jednotlivé separované proteiny v podobě skvrn. Proteiny vyskytující se v pravé části gelu se ve vzorku nacházely v monomerním stavu nebo byly součástí malých komplexů. Proteiny v levé části gelu se ve vzorku původně nacházely ve větších proteinových komplexech. Proteiny vyskytující se původně v jednom komplexu se nacházejí na gelu v jedné linii pod sebou (příklady vyznačeny oválkem).

To ovšem nevylučuje možnost, že v prvním rozměru při separaci komigrovaly dva nebo více proteinových komplexů spolu, takže nemůžeme určit jejich přesné podjednotkové složení, resp. nemůžeme určit, které proteiny separované na proteinové mapě pod sebou patří do kterého komplexu.

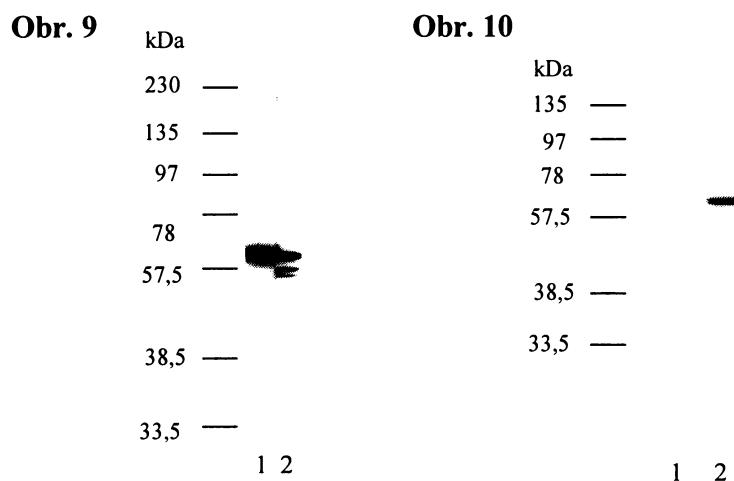
Obr. 8



Obr. 8 Stříbrem barvený gel dvourozměrné separace cytosolických a membránových komplexů Jurkat buněk. V prvním rozměru (horizontální směr gelu) byly separovány proteinové komplexy za nativních podmínek metodou BN-PAGE, ve druhém rozměru (vertikální směr gelu) byly separovány

jednotlivé podjednotky proteinových komplexů za denaturujících podmínek metodou SDS-PAGE. Jednotlivé separované proteiny se jeví na gelu jako skvrny. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotnosti.

Pro studium jaderných komplexů jsme používali jádra izolovaná různými způsoby. Pro řadu experimentů jsme použili jádra izolovaná z buněčných linií (např. HeLa), ale tímto způsobem jsme získali jádra, která byla vždy částečně kontaminována cytosolickými proteiny (viz obr. 9, dráha č. 1). Kontaminace jader cytosolickými proteiny byla po každé izolaci testována na přítomnost vimentinu specifickou protilátkou. Vimentin je cytosolický protein obalující poměrně pevně jadernou membránu.



Obr. 9 *Western blot* jaderné a cytosolické frakce HeLa buněk separovaných pomocí SDS-PAGE, na němž byl detekován specifickou protilátkou cytosolický protein vimentin. Signál odpovídající velikosti vimentinu (cca 60 kDa) je znatelný v jaderné i cytosolické frakci (dráha č. 1 a 2). Množství proteinů jaderné frakce nanesené na gel bylo dvakrát větší než množství cytosolických proteinů. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotnosti.

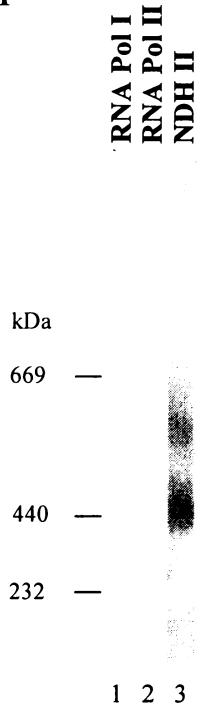
Obr. 10 *Western blot* jaderné a cytosolické frakce krysí jaterní tkáně separovaných pomocí SDS-PAGE, na němž byl detekován specifickou protilátkou cytosolický protein vimentin. Zde se v dráze jaderné frakce (č. 1) nevyskytuje žádný signál. V dráze cytosolické frakce (č. 2) je znatelný signál o velikosti 60 kDa odpovídající vimentinu. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotnosti.

Jedním z našich záměrů bylo studovat jaderné komplexy obsahující aktin. Pro tento účel bylo nutno použít jádra izolovaná způsobem, kterým by byl odstraněn veškerý cytosol. Kontaminace jaderného materiálu cytosolem by znesnadnila detekci jaderných komplexů obsahujících aktin, protože anti-aktinové protilátky reagují jak s cytosolickou tak i s jadernou

formou aktinu. Jako zdroj jaderných proteinových komplexů jsme pro tyto experimenty použili jádra izolovaná z krysí jaterní tkáně přes sacharosový gradient. Obr. 10 představuje Western blot izolované jaderné frakce a cytosolických proteinů separovaných metodou SDS-PAGE inkubovaný s protilátkou proti vimentinu. V jaderné frakci izolované touto metodou není přítomen signál specifický pro vimentin zatímco v cytosolické frakci ano. Tento postup izolace tedy zaručil, že izolovaná jádra byla zbavena veškerého cytosolu.

Pro separaci jaderných komplexů pomocí BN-PAGE byla jádra HeLa buněk extrahována vzorkovým pufrem pro BN-PAGE (viz kapitola Materiál a metody) a proteinové komplexy byly separovány pomocí BN-PAGE za národních podmínek přesně podle postupu publikovaného Schaggerem a von Jagowem (Schagger a von Jagow, 1991). Separované proteinové komplexy byly přeneseny z gelu na PVDF membránu. Jaderné proteinové komplexy byly na membráně detekovány pomocí protilátek, vybrali jsme protilátky proti velkým podjednotkám RNA polymerázy I (116 kDa) a RNA polymerázy II (220 kDa) a protilátku proti nukleární DNA helikáze II (140 kDa), viz obr. 11. Protilátkou proti RNA polymeráze I jsme detekovali jeden pás o velikosti 550 kDa (dráha č. 1), protilátkou proti RNA polymeráze II jsme detekovali pás o velikosti 600 kDa (dráha č. 2), protilátkou proti nukleární DNA helikáze II jsme detekovali dva difusní pásky v oblastech 440 a 560 kDa (dráha č. 3). Proteinové komplexy detekované protilátkami proti podjednotkám obou polymeráz přibližně odpovídají svou velikostí holoenzymům RNA polymeráz (Voet a Voet, 1995).

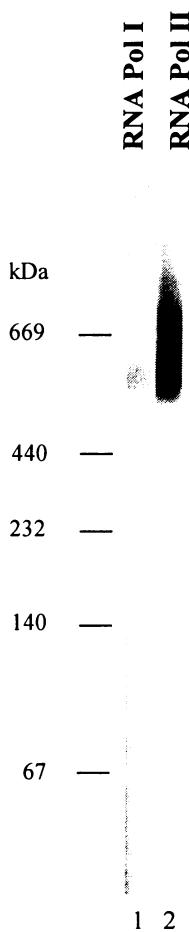
Obr. 11



Obr. 11 *Western blot jaderných proteinových komplexů HeLa buněk separovaných metodou BN-PAGE. Blot byl inkubován se specifickými protilátkami proti podjednotce RNA polymerázy I (dráha č. 1), proti podjednotce RNA polymerázy II (dráha č. 2) či proti nukleární DNA helikáze II (dráha č. 3). V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.*

Tyto výsledky byly ověřeny na jádrech izolovaných z krysí jaterní tkáně viz obr. 12. Podobně jako v předchozím případě jsme detekovali výše uvedenými protilátkami komplex RNA polymerázy I vyskytující se v oblasti 550 kDa (dráha č. 1) a komplex RNA polymerázy II jevíci se jako silný pás v oblasti molekulových hmotností 500 - 700 kDa (dráha č. 2).

### Obr. 12



Obr. 12 *Western blot jaderných proteinových komplexů z jader krysí jaterní tkáně separovaných metodou BN-PAGE. Blot byl inkubován se specifickými protilátkami proti podjednotce polymerázy I (dráha č.1) a proti podjednotce polymerázy II (dráha č. 2). V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.*

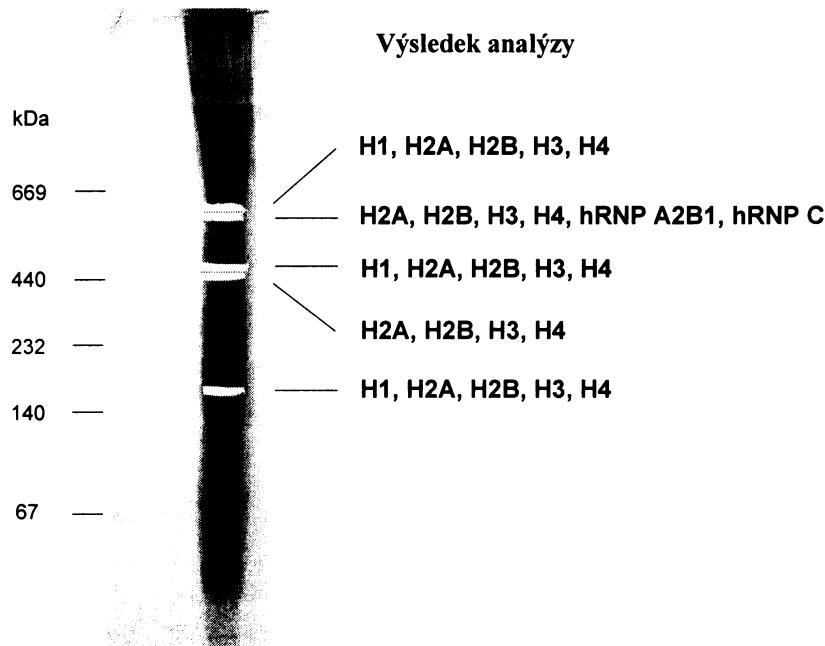
Lze tedy uzavřít, že separace jaderných proteinových komplexů metodou BN-PAGE je v principu možná.

Podle předchozích experimentů (P. Novák, J. Černý - nepublikované výsledky) bylo zjištěno, že proteinové komplexy separované metodou BN-PAGE je možno přímo analyzovat pomocí hmotnostního spektrometru bez další purifikace jejich podjednotek. Tímto postupem byl identifikován celý proteasom, ATP syntasa a další proteinové komplexy. Dalším naším cílem bylo tedy ověřit, zda je možné využít stejný postup i v případě jaderných komplexů. K hmotnostní analýze spektrometrem Decca byly vybrány majoritní proteinové komplexy, tj.

barvitelné CBB R (obr. 13). Výsledky analýzy byly obdobné, ve všech vzorcích byly identifikovány histony H2A, H2B, H3 a H4 (v některých vzorcích byl přítomen i H1), které vytvářejí nukleosomový oktamer a některé ribonukleoproteiny. Pro jinou analýzu byly vybrány a zpracovány ty oblasti gelu, kde byly určeny protilátkami komplexy RNA polymeráz I a II a komplexy obsahující aktin nebo nukleární DNA helikázu II (obrázek neuveden). Ve všech vzorcích byly opět identifikovány pouze histony, v žádném analyzovaném vzorku nebyly nalezeny součásti RNA polymerázových komplexů, aktin ani nukleární DNA helikáza II.

**Obr. 13**

**Hmotnostní spektrometrická analýza separovaných proteinových komplexů**



Obr. 13 *Hmotnostně spektrometrická analýza Gel barvený CBB R obsahuje proteinové komplexy jader izolovaných z krysích jater separované metodou BN-PAGE. Proteinové komplexy vyskytující se ve vybraných oblastech gelu (vyřezané pásy) byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru. Výsledek analýzy složení proteinových komplexů je uveden v pravé části obrázku. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotnosti.*

Tento výsledek je možné interpretovat tak, že histonové proteiny, které jsou v jádře vysoce zastoupeny, jsou nedokonale separovány a vytvářejí tak silné pozadí, které znemožňuje identifikaci jiných dobře separovaných komplexů. Tyto jaderné proteinové komplexy se ve

vzorcích pravděpodobně nacházejí v tak malém množství, které nedosahuje prahu citlivosti analyzátorů a nemohou být proto identifikovány.

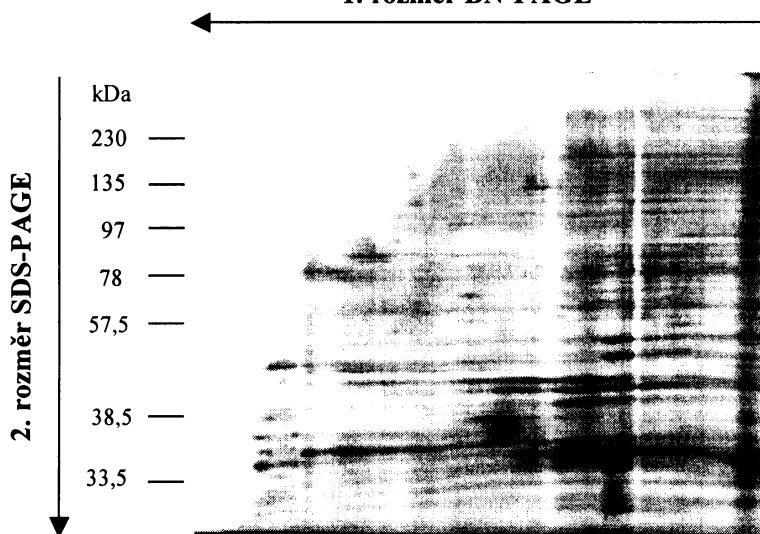
Jak bylo uvedeno, pro identifikaci podjednotkového složení vybraného proteinového komplexu je nutné splnění podmínky, že žádný jiný komplex s ním nebude komigrovat a následně interferovat s hmotnostně spektrometrickou analýzou. Jednou z možných cest, jak alespoň orientačně ověřit tento předpoklad, je dvourozměrná separace proteinových komplexů. Podrobili jsme nativně separované proteinové komplexy (1. rozměr) separaci za denaturujících podmínek pomocí SDS-PAGE (2. rozměr).

Na obr. 14 je znázorněn stříbrem barvený gel, který ukazuje dvourozměrnou separaci jaderných komplexů. Ve srovnání se separací cytosolických proteinů (obr. 8) je tato separace méně dokonalá, horizontální pruhy v gelu ukazují na nedostatečně separované proteinové komplexy v 1. rozměru.

Pro snížení viskozity vzorku způsobenou DNA jsme použili DNázu I. Pokusili jsme se odstranit nukleové kyseliny jejich degradací nukleolytickými enzymy. DNáza I však váže aktin a způsobuje rozpad aktinových komplexů. Pokusili jsme se odstranit DNA ze vzorku pomocí jiného enzymu degradujícího DNA. Zvolili jsme benzonázu, tento enzym nevytváří komplexy s aktinem. Výsledky separace proteinových komplexů byly stejné jako při použití DNázy I.

Obr. 14

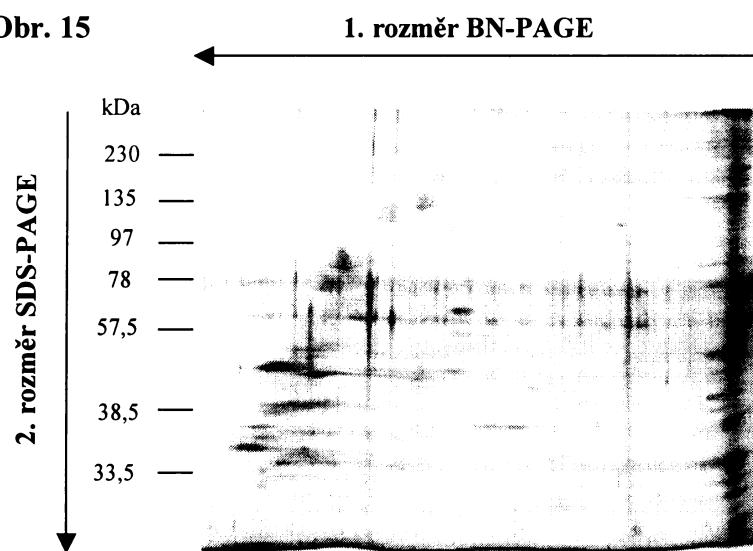
1. rozměr BN-PAGE



Obr. 14 Stříbrem barvený gel dvourozměrné separace jaderných proteinových komplexů extrahovaných DNázou I z izolovaných jader krysí jaterní tkáně. Separace probíhala stejně jako v pokusu znázorněném na obr. 8. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

V následujícím experimentu jsme se pokusili zabránit kontaminaci gelu chromatinem tím, že jsme se snažili zachovat chromatin v neporušeném stavu; vyloučili jsme tedy použití DNázy I. Nedegradovaný chromatin by podle našeho předpokladu neměl do gelu vstoupit. Pokud jsme DNázu I vyloučili z přípravy vzorku, výsledný lyzát byl vysoce viskózní a špatně se nanášel na gel. Na obr. 15 je stříbrem barvený gel obsahující jaderný extrakt separovaný ve dvou rozměrech. Na tomto gelu vidíme, že při nativní separaci (1. rozměr) byly separovány pouze proteiny v monomerním stavu a malé proteinové komplexy, zatímco většina proteinového materiálu (velké a nerozpuštěné komplexy) zůstala na startu gelu 1. rozměru. Střední oblast gelu, kde by se měly nacházet větší proteinové komplexy, je téměř prázdná.

**Obr. 15**



Obr. 15 Stříbrem barvený gel dvourozměrné separace jaderných proteinových komplexů, které byly extrahouvány vzorkovým pufrem používaným v metodě BN-PAGE z izolovaných jader krysí jaterní tkáně bez použití DNázy I. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

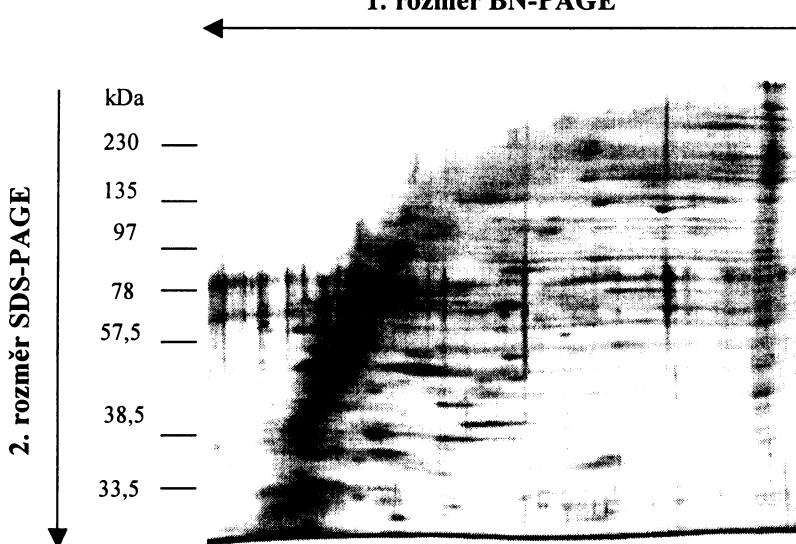
Autoři metody ve své původní práci (Schagger a von Jagow, 1991) naznačují, že v případě výskytu velkých nerozpustných struktur ve vzorku dochází k omezení vstupu větších proteinových komplexů do gelu. V případě vzorků z jader pravděpodobně zabraňuje průchodu komplexů do pórů gelu vysokomolekulární DNA.

Naším dalším cílem tedy bylo pokusit se najít způsob přípravy vzorku odstraňující DNA a zvyšující množství separovaných proteinových komplexů zachovaných v nativním stavu. Nukleové kyseliny není možné odstranit centrifugací, neboť jejich sedimentační konstanta je blízká sedimentační konstantě velkých proteinových komplexů.

Proto jsme se v dalším kroku pokusili zachytit DNA na agarosovém gelu vytvářejícím rozhraní (mezerník) mezi vzorkem a polyakrylamidovým gelem. DNA by neměla vstoupit do agarosového gelu, ale současně by neměla bránit vstupu proteinových komplexů do velkých pórů agarosového gelu. Na obr. 16 je gel barvený stříbrem znázorňující dvourozměrnou separaci jaderného materiálu, které předcházela separace DNA a proteinových komplexů na agarosovém gelu. Na horní hranici polyakrylamidového gelu jsme vytvořili agarosový gelový pruh o výšce 1 cm, na který jsme nanesli jaderný lyzát. Předpoklad o zachycení DNA agarosovým gelem byl potvrzen barvením ethidiumbromidem (neukázáno). Obr. 16 dále ukazuje, že celkové množství proteinů v gelu se zvýšilo a jsou zde přítomny i proteiny nacházející se původně ve velkých proteinových komplexech. Na startu gelu 1. rozměru a v agarosovém gelu přesto zůstalo určité množství proteinového materiálu.

Obr. 16

1. rozměr BN-PAGE

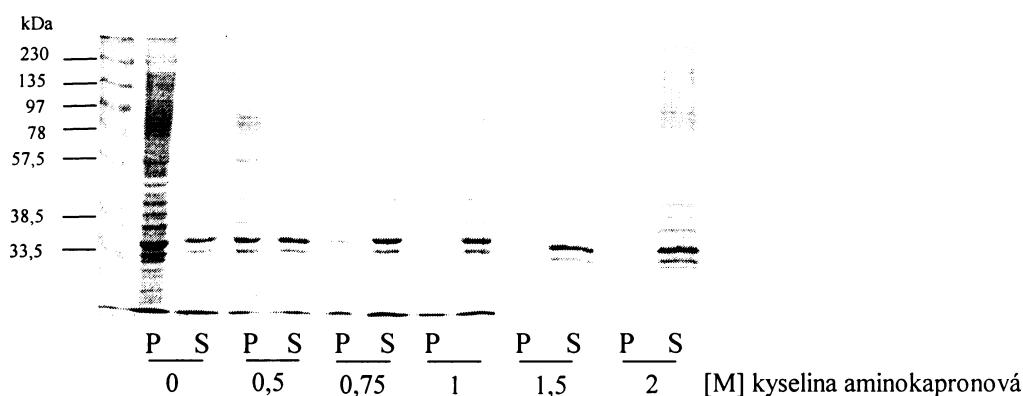


Obr. 16 Stříbrem barvený gel dvourozměrné separace jaderných proteinových komplexů, které byly extrafovány vzorkovým pufrem používaným v metodě BN-PAGE z izolovaných jader krysí jaterní tkáně. Jaderný vzorek byl nejprve separován v agarosovém pruhu nacházejícím se nad prvorozměrovým gelem. Následná separace probíhala stejně jako v pokusu znázorněném na obr. 8. V levé části obrázku jsou znázorneny standarty molekulových hmotností.

Velké množství proteinového materiálu v agarosovém gelu naznačuje, že solubilita jaderných komplexů je za podobných podmínek nízká. Tyto výsledky nás vedly k otestování rozpustnosti jaderných proteinových komplexů za daných podmínek a k hledání podmínek pro zvýšení solubility polymerázových komplexů.

Jaderné proteiny se běžně extrahují vysokou koncentrací soli (Dignam *a kol.*, 1983). Při separaci pomocí BN-PAGE nelze použít klasické soli, protože způsobují precipitaci CBB G, proto jsou proteinové komplexy za nativních podmínek solubilizovány kyselinou aminokapronovou. Abychom zvýšili solubilitu jaderných komplexů, rozhodli jsme se otestovat účinek koncentrace kyseliny aminokapronové. Na obr. 17 je gel barvený CBB R, který ukazuje solubilizační účinek kyseliny aminokapronové na jaderné proteiny v závislosti na její koncentraci. Se zvyšující se koncentrací kyseliny aminokapronové se zvětšuje množství solubilizovaných proteinů v supernatantu a snižuje se v nerozpustné části vzorku. Při 750 mM koncentraci kyseliny aminokapronové (tj. koncentraci této soli ve vzorkovém pufru používaném v předchozích pokusech) se nacházela více než polovina jaderných proteinů v supernatantu. K totální solubilizaci všech proteinů došlo v přítomnosti 1,5 – 2 M kyseliny aminokapronové.

Obr. 17

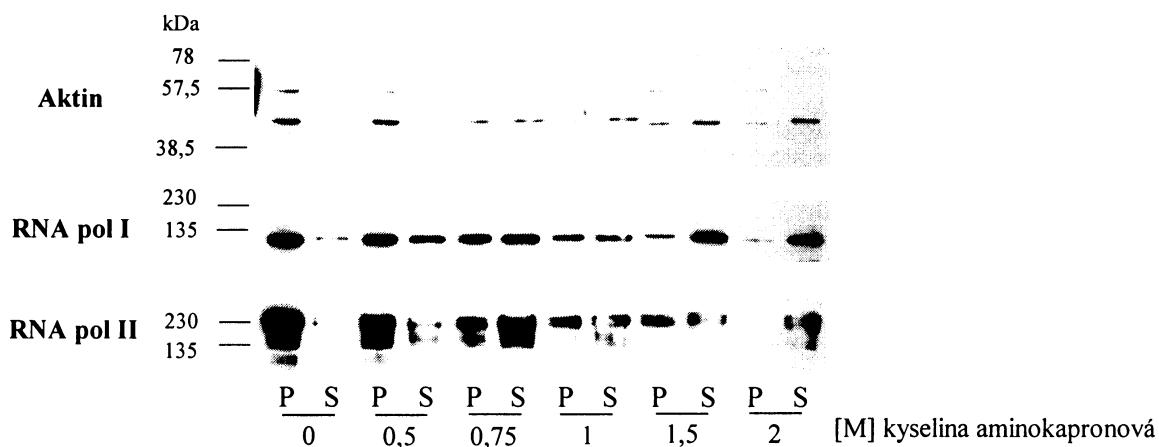


Obr. 17 Vliv koncentrace kyseliny aminokapronové na solubilitu jaderných komplexů. Gel barvený CBB R obsahuje separované jaderné proteiny extrahované kyselinou aminokapronovou z jader izolovaných z krysí jaterní tkáně. Jaderné proteiny byly extrahovány 0 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M, 1,5 M a 2 M kyselinou aminokapronovou. Nerozpustný zbytek (P) a supernatant (S) pro danou koncentraci kyseliny aminokapronové jsou analyzovány vedle sebe. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

Rozpustnost jaderných komplexů může být selektivní, proto byl proveden analogický experiment se záměrem zjistit podmínky pro solubilizaci komplexů RNA polymerázy I a II a aktinu kyselinou aminokapronovou. Western blot (obr. 18) byl barven protilátkami proti velkým podjednotkám RNA polymerázy I a II a proti aktinu. Uspořádání blotu je stejné jako v předchozím pokusu. Signál všech tří protilátek se zesiluje v drahách obsahujících solubilizované proteiny (S) a zeslabuje se v drahách obsahujících nerozpustnou část jaderné

frakce (P) v závislosti na zvyšující se koncentraci kyseliny aminokapronové ve vzorku. Zjistili jsme, že 1,5 M kyselina aminokapronová solubilizuje většinu proteinů.

**Obr. 18**



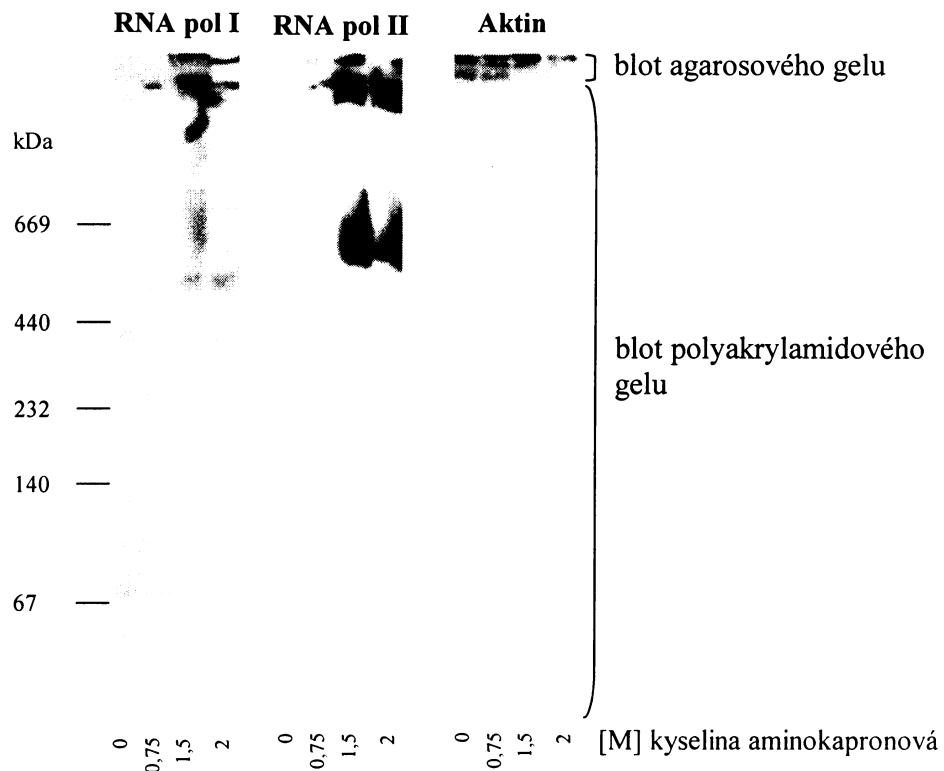
Obr. 18 *Western blot* jaderných proteinů extrahovaných kyselinou aminokapronovou z jader izolovaných z krysí jaterní tkáně. Extrakce a nanášení proteinů na gel je stejně jako v pokusu znázorněném na obr. 17. Blot byl inkubován s protilátkou proti velké podjednotce RNA polymerázy I, dále s protilátkou proti velké podjednotce RNA polymerázy II a s protilátkou proti aktinu. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

Podobný experiment byl proveden za nativních podmínek. Obr. 19 znázorňuje blot jaderných proteinových komplexů separovaných pomocí BN-PAGE. Pomocí protilátek jsme na blotu detekovali komplexy RNA polymerázy I a RNA polymerázy II ve formě solubilních holoenzymů při 0,75 M koncentraci soli ve vzorku, signál v oblasti 500-650 kDa se zesiloval se stoupající koncentrací kyseliny aminokapronové ve vzorku. Na obrázku blotu není patrný signál ve vzorcích obsahujících 0,75 M kyselinu aminokapronovou, protože obrázek byl pořízen z velmi krátce exponovaného filmu, aby byly dobře rozeznány signály na startu gelu. Při standartní expozici filmu byly signály holoenzymu RNA polymerázy I a RNA polymerázy II znatelné, ale signály velkých komplexů na startu polyakrylamidového gelu a v agarosovém gelu splývaly v jeden.

Při použití vysoké koncentrace kyseliny aminokapronové jsme na nativním blotu pomocí specifických protilátek detekovali tři typy různě velkých komplexů RNA polymerázy I a RNA polymerázy II. Signál nejmenšího z těchto komplexů u obou polymeráz se vyskytoval v oblasti odpovídající 500 - 650 kDa, což odpovídá holoenzymu vyskytujícímu se v solubilní jaderné frakci. Druhý signál se vyskytoval na startu polyakrylamidového gelu. Tento komplex může být větší než 1,5 MDa. Třetí signál polymerázových komplexů se nacházel v oblasti

agarosového gelu. Komplexy obsahující aktin jsme detekovali pouze v agarose a v zubu polyakrylamidového gelu.

Obr. 19



Obr. 19 *Western blot* jaderných proteinů extrahovaných kyselinou aminokapronovou z jader izolovaných z krysí jaterní tkáně separovaných pomocí BN-PAGE. Extrakce byla provedena stejně jako v pokusu znázorněném na obr. 17. Na gel byly nanášeny supernatanty jednotlivých vzorků. Na blotu byly specifickými protilátkami detekovány komplexy RNA polymerázy I a II a komplexy obsahující aktin. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

V následujícím kroku jsme izolovaná jádra solubilizovaná 1,5 M kyselinou aminokapronovou separovali pomocí systému BN-PAGE spojeného s agarosovým gelem. Dosáhli jsme tak dobré separace velkého množství proteinových komplexů (výsledek neznázorněn). Vybrané oblasti gelu obsahujícího separované proteinové komplexy jsme postoupili hmotnostní spektrometrické analýze. Ve vzorcích byly ovšem opět identifikovány pouze histonové proteiny. Tento extrakční a separační postup tedy nevedl k odstranění silného pozadí, které brání následné identifikaci proteinových komplexů vyskytujících se ve vzorku v menším množství.

## **5.2. Sledování podjednotkových interakcí proteinových komplexů pomocí reakce PICUP**

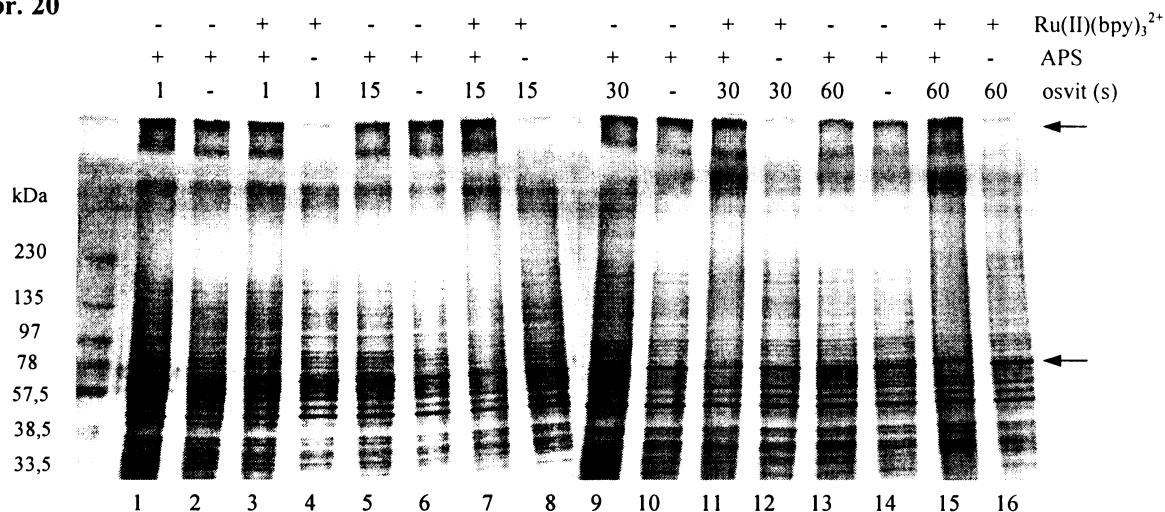
Ve velkých proteinových komplexech ne všechny podjednotky spolu interagují přímo svými povrhy. Pro sledování těchto interakcí se používají mimo jiné i metody vytvářející příčné kovalentní vazby mezi podjednotkami, které spolu přímo asociajují. V nedávné době byla popsána nová metoda světlem indukované tvorby příčných kovalentních vazeb mezi asociovanými proteiny (reakce PICUP – „photo-induced crosslinking of unmodified proteins“) (Fancy a Kodadek, 1999). Reakce je založena na fotolýze sloučeniny Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, což vede ke vzniku reaktivních intermediátů způsobujících vznik kovalentních vazeb mezi blízkými aminokyselinovými zbytky, především tyrosiny. V původní práci je uvedeno, že reakce PICUP probíhá velmi rychle (řádově milisekundy) a specificky propojuje pouze interagující proteiny.

V původní práci popisující tuto reakci byly experimenty prováděny na purifikovaných proteinech. Autoři publikace však uvádějí, že tuto reakci by bylo možno využít i při studiu složitějších systémů jako jsou buněčné frakce, lyzáty i celé buňky. Rozhodli jsme se ověřit, zda je možné použít reakci PICUP ke studiu proteinových interakcí v komplexních proteinových systémech. K tomuto testu jsme použili plasmatické membrány buněk Jurkat. Cílem bylo ověřit, zda při osvitu reakční směsi vznikají kovalentní vazby mezi asociovanými proteiny. Reakční směs obsahovala buněčnou membránovou frakci a reagenční činidlo - Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> a akceptor elektronů (APS), jak je uvedeno v kapitole Materiál a metody.

Nejprve jsme testovali závislost množství vzniklých kovalentně spojených komplexů na době expozice vzorku. Vzorky jsme exponovali viditelnou složkou světelného záření 75 W xenonové lampy po dobu 1, 15, 30 a 60 sekund. Po inhibici reakce jsme vzorky analyzovali na gradientových gelech pomocí SDS-PAGE. Sledovali jsme vznik kovalentně propojených proteinových komplexů. Na obr. 20 je znázorněn gel barvený stříbrem se separovanými membránovými proteiny. Ve vzorcích obsahujících Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> a APS, které byly exponovány světlem, jsme detekovali kovalentně spojené proteinové komplexy viditelné na startu gelu (viz horní šipka). Komplexy vzniklé reakcí tvoří heterogenní směs molekul s odlišnou molekulovou hmotností a mobilitou. Se zvyšující se dobou osvitu vzorku se zvětšovalo množství materiálu na startu gelu a zmenšovalo se množství proteinů v monomerním stavu (např. viz dolní šipka). Kovalentní komplexy vznikaly již při nejkratším osvitu 1s (dráha č. 3). Účinná reakce probíhala jen za přítomnosti všech složek reakční směsi a při expozici světlem. Zjistili jsme však, že ve vzorcích, které obsahovaly všechny reagencie, ale nebyly exponovány, docházelo přesto k částečnému propojení proteinů. Jak je patrné z obr. 20, reakce

probíhala částečně i za přítomnosti samotného APS, přitom osvit tohoto vzorku reakci nezvyšoval.

Obr. 20



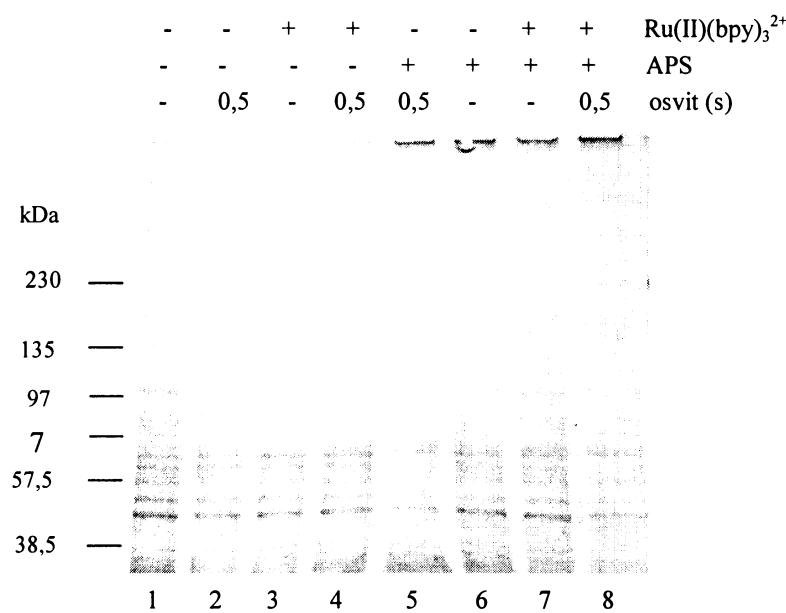
Obr. 20 Vliv délky světelné expozice na množství kovalentně spojených proteinů. Gely barvené stříbrem obsahující membránové proteiny buněk Jurkat separované pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly vystaveny reakci PICUP po různě dlouhou expozici světlem. Kontrolní dráhy ukazují reaktivitu jednotlivých reagenčních činidel. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

Zjišťovali jsme, zda lze reakci mediovanou  $\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3^{2+}$  aktivovat i slabším zdrojem světla. Vyzkoušeli jsme klasickou zářivku, fotografický blesk a spektrofotometr. První dva uvedené zdroje iniciovaly reakci po několikasekundovém osvitu (tyto postupy byly nevhodné z hlediska ohřívání vzorku a kvůli časovým prostořům při nabíjení blesku). Intenzita světla spektrofotometru byla již příliš slabá a k žádné reakci nedošlo ani po velmi dlouhém osvitu 60 s (výsledky neuváděny).

Naše zjištění o reaktivitě samotného APS se zdá být v rozporu s publikovanými údaji autorů metody. To nás vedlo k provedení analogického experimentu, viz obr. 21 znázorňující gel barvený CBB R obsahující membránové proteiny separované metodou SDS-PAGE. V tomto pokusu byla vytvořena řada kontrol, kterými jsme ověřovali reaktivitu samotného APS. Ve všech vzorcích obsahujících APS (at' už je přítomno  $\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3^{2+}$  nebo není) jsou přítomny velké kovalentně spojené komplexy proteinů, které zůstávají na startu gelu (dráhy č. 5 - 8) na rozdíl od vzorků neobsahujících APS, v kterých k reakci nedošlo (dráhy č. 1 - 4). Nicméně dráha č. 8 ukazuje, že i při krátké době expozice (0,5 s) reakční směsi obsahující všechny reagencie dochází k dalšímu vzrůstu množství proteinů zůstávajících na startu gelu. Samotný osvit nemá

žádný modifikační vliv na proteiny v reakční směsi (dráha č. 2). Tyto výsledky ukazují, že samotné APS způsobuje vznik kovalentních vazeb mezi proteiny.

**Obr. 21**

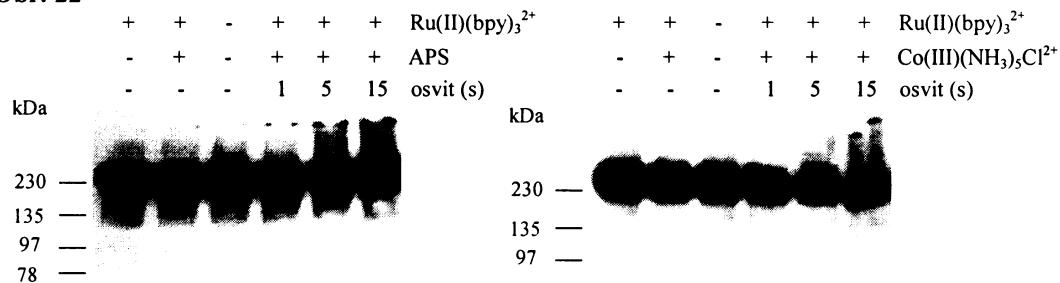


Obr. 21 *Vliv APS na tvorbu kovalentních vazeb mezi proteiny Gel barvený CBB R obsahující membránové proteiny buněk Jurkat separované metodou SDS-PAGE podrobené reakci PICUP. Reakční směs obsahovala jednotlivé komponenty tak, jak je uvedeno v legendě nad obrázkem gelu. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.*

Pokusili jsme se omezit vliv APS snížením jeho množství nutného pro reakci mediovanou  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$ . Zjistili jsme, že se snižující se koncentrací APS ve vzorku se snižuje i účinnost reakce mediované  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$ . Za přítomnosti 0,3 mM APS reakce již neprobíhá (obrázek neukázán).

Proto jsme se rozhodli nahradit tento akceptor elektronů Co(III) pentamin chloridem (Fancy *a kol.*, 2000), který má podobné vlastnosti jako APS. Na obr. 22 jsou znázorněny Western bloty membránových proteinů podrobených reakci PICUP za přítomnosti APS nebo  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$ . Pomocí specifické protilátky jsme na blotech detekovali fosfatázu CD 45. Jak vyplývá ze signálů na obou blotech, reakce PICUP v přítomnosti  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  má nižší účinnost než v přítomnosti APS, resp. kovalentně propojené komplexy obsahující CD 45 vznikají v přítomnosti APS již při osvitu 1 s, zatímco v přítomnosti  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  vznikají komplexy až při osvitu delším než 5 s.

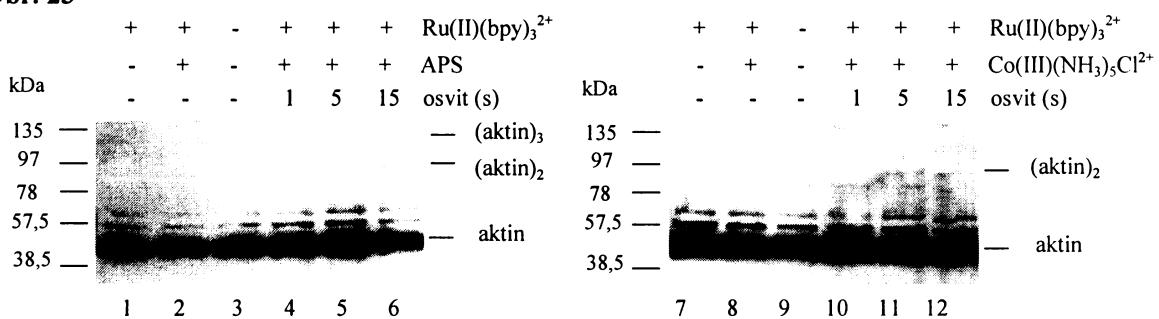
Obr. 22



Obr. 22 Porovnání účinnosti APS a  $\text{Co(III)}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$ . Western bloty membránových proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE inkubované s protilátkou proti fosfatáze CD 45. Proteiny byly podrobeny reakci PICUP za přítomnosti APS (obrázek vlevo) nebo  $\text{Co(III)}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  (obrázek vpravo). V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotnosti.

Tento poznamek byl potvrzen i následujícím experimentem (obr. 23), kde byl blot s membránovými proteiny inkubován s protilátkou proti aktinu. Na blotu obsahujícím proteiny podrobené reakci PICUP za přítomnosti APS jsme detekovali komplex o velikosti, která odpovídá dimeru aktinu (84 kDa, označeno šipkou) již při osvitu 5 s a komplex odpovídající trimeru aktinu (126 kDa, označeno šipkou) při osvitu 15s, zatímco na blotu obsahujícím proteiny podrobené PICUP reakci za přítomnosti  $\text{Co(III)}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  jsme detekovali pouze komplex o velikosti dimeru při osvitu 15 s.

Obr. 23

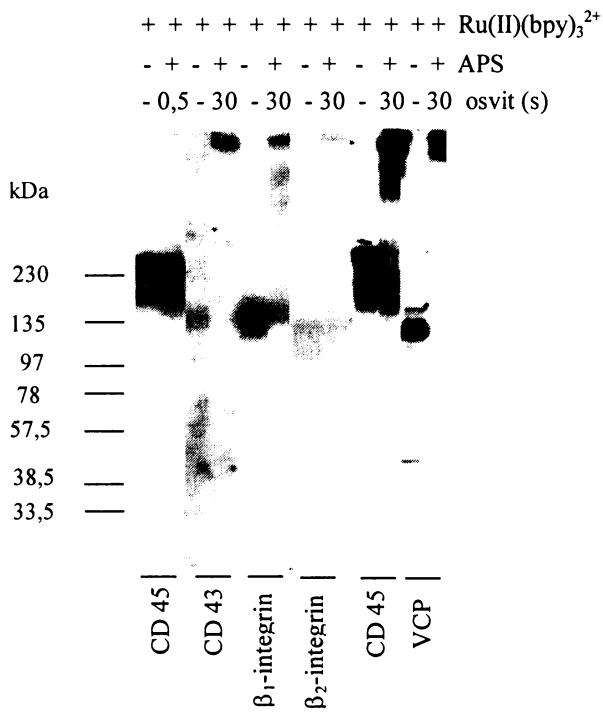


Obr. 23 Western blot membránových proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly podrobeny reakci PICUP za přítomnosti APS (obrázek vlevo) či za přítomnosti  $\text{Co(III)}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  (obrázek vpravo). K detekci byla použita protilátká proti aktinu. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotnosti.

V původní práci autoři uvádějí, že reakce PICUP indukuje vznik kovalentních vazeb pouze mezi asociovanými proteiny. Ověřili jsme toto tvrzení detekcí specifickými protilátkami proti známým proteinům vyskytujících se v komplexech. Použili jsme protilátky proti

membránovým lymfocytárním proteinům. Na obr. 24 je znázorněn blot membránových proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE, na kterém byly detekovány specifickými protilátkami vzniklé kovalentně spojené proteiny podrobené reakci PICUP. Vyzkoušeli jsme téměř patnáct specifických protilátek proti různým proteinům, pomocí šesti z nich jsme detekovali kovalentní komplexy. Byly to protilátky proti membránovým antigenům - fosfatáze CD 45, chaperonu VCP (vanosin containing protein),  $\beta_1$ -integrinu (CD 29),  $\beta_2$ -integrinu (CD 18), leukosialinu CD 43 a aktinu. Všechny tyto proteiny za fyziologických podmínek asociují s dalšími proteiny. Fosfatáza CD 45 (180-240 kDa) asociuje s tyrosinkinázami (Ostergaard *a kol.*, 1989), chaperon VCP (100 kDa) vytváří oktamery (Dai a Li, 2001),  $\beta_1$ -integrin (110-130 kDa) vytváří komplex s CD 49 a interaguje s cytoskeletem (Hemler, 1990),  $\beta_2$ -integrin (95 kDa) interaguje s CD 11 (Hibbs *a kol.*, 1991), leukosialin (100-135 kDa) interaguje s CD 54 (ICAM-1) (Rosenstein *a kol.*, 1991) a aktin (42 kDa) vytváří polymery - viz obr. 23. Při krátkých osvitech (0,5 s) většina proteinů i po reakci zůstala v nezměněném stavu, pouze protein CD 45 vytvářel vlivem krátkého osvitu kovalentní komplexy (1. dvojdráha zleva). Při delších osvitech jsme detekovali vzniklé komplexy leukosialinu CD 43,  $\beta_1$ -integrinu,  $\beta_2$ -integrinu, fosfatázy CD 45 a chaperonu VCP. Vlivem reakce vzniklo mnoho různě velkých multimerů, které se jevily jako široký pás v horní části blotu, velká část komplexů kvůli své velikosti nevstoupila do gelu a zůstala v jamce gelu.

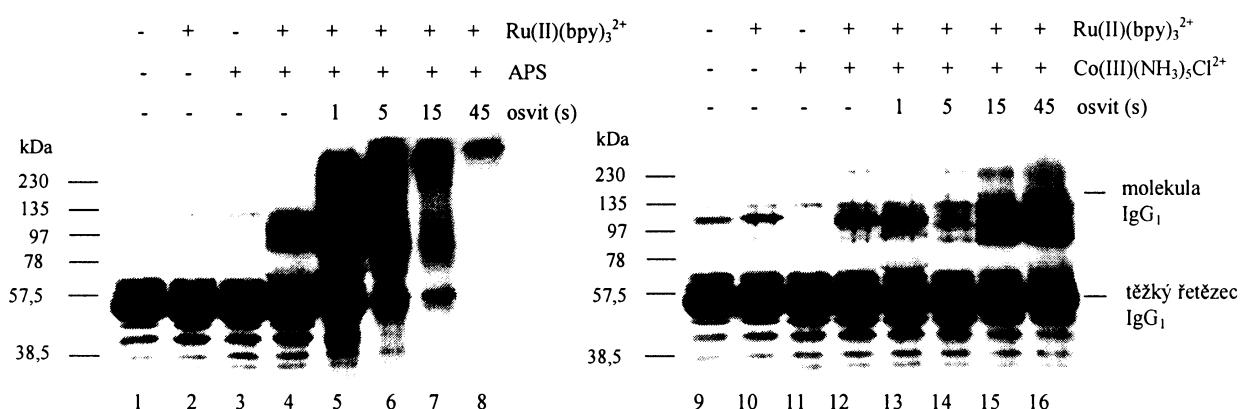
#### Obr. 24



Obr. 24 Western blot membránových proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE podrobených reakci PICUP. Každou protilátkou byl vždyobarven blot obsahující neexponované vzorky a blot obsahující proteiny vystavené reakci PICUP za přítomnosti APS. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

Rovněž jsme se pokusili ověřit reakci na jednodušším systému, který by obsahoval pouze purifikované proteiny. K tomuto účelu jsme použili přečistěný imunoglobulin IgG<sub>1</sub>. Na obr. 25 je znázorněn Western blot obsahující imunoglobulin, který byl vystaven reakci PICUP v přítomnosti APS nebo Co(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sup>2+</sup>. Detekovali jsme signály komplexů obsahujících těžký řetězec imunoglobulinu (75 kDa) sekundární protilátkou proti imunoglobulinu. Jak je vidět v dráze č. 5, při použití APS vznikal široký pás v horní části gelu již při osvitu 1s. V drahách delších osvitů zůstal prakticky všechn materiál na startu gelu. Při použití Co(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sup>2+</sup> jsme kovalentně spojenou molekulu imunoglobulinu o velikosti cca 150 kDa detekovali ve vzorcích s několikasekundovým osvitem (viz dráhy 15 a 16). Z toho plyne, že reakce v přítomnosti APS je podstatně účinnější než v přítomnosti Co(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sup>2+</sup>.

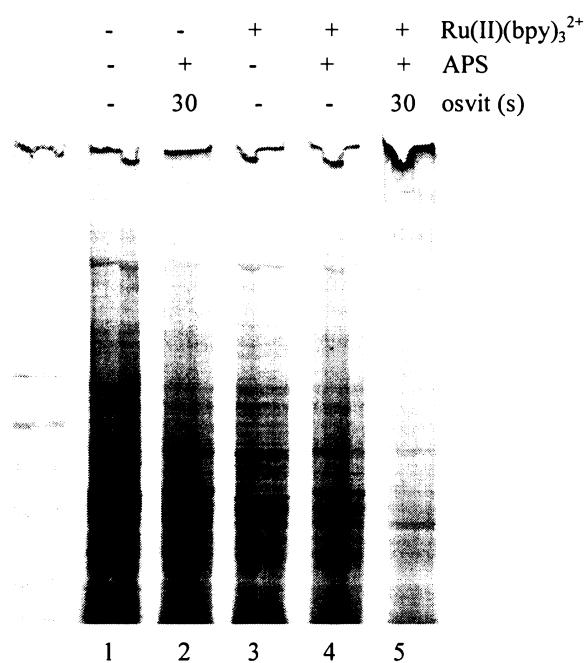
Obr. 25



Obr. 25 Western bloty imunoglobulinu IgG<sub>1</sub> separovaného pomocí SDS-PAGE vystaveného reakci PICUP. Blot vpravo obsahuje protein vystavený reakci PICUP v přítomnosti APS, blot vlevo obsahuje protein vystavený reakci v přítomnosti Co(III)(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sup>2+</sup>. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

Reakce PICUP v přítomnosti APS je vysoce účinná. Testovali jsme možnost, jak tuto reakci zbrzdit. Autoři v původní práci uvádějí, že reakci je možno inhibovat nadbytkem určité volné aminokyseliny (Fancy *a kol.*, 2000). Vyzkoušeli jsme histidin, který byl uváděn jako částečný inhibitor reakce. Tento poznatek jsme potvrdili (výsledky neukázány). Dále jsme vyzkoušeli možnost úplné inhibice reakce přidáním nadbytku volné aminokyseliny, zvolili jsme tryptofan kvůli dobré rozpustnosti v reakčním pufru. Zjistili jsme, že 7,5 mM tryptofan v reakční směsi inhibuje reakci mediovanou Ru(II)(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>. Ve vzorcích, v kterých byla reakce PICUP zhášena nadbytkem volné aminokyseliny však docházelo k viditelné modifikaci proteinů (proteiny měly jinou mobilitu při separaci), a to ve vzorcích obsahujících APS, viz obr. 26.

Obr. 26



Obr. 26 Vliv APS na proteiny v přítomnosti tryptofanu. Gel barvený CBB R obsahující membránové proteiny buněk Jurkat separované metodou SDS-PAGE podrobené reakci PICUP, která byla zhášena tryptofanem. V levé části obrázku jsou znázorněny standarty molekulových hmotností.

## **6. Diskuse**

Účelem práce bylo otestování dvou nových metod studujících interakce v proteinových komplexech. První z nich byla elektroforetická technika separující proteinové komplexy za národních podmínek, tato metoda byla původně vyvinuta pro membránové mitochondriální proteiny (Schagger a von Jagow, 1991). Chtěli jsme touto cestou dosáhnout separace jaderných proteinových komplexů, které by bylo možno následně přímo identifikovat pomocí hmotnostního spektrometru. Druhou metodou byla nedávno nově vyvinutá modifikace metody chemické tvorby příčných kovalentních vazeb mezi proteiny. Tato metoda označovaná zkratkou PICUP byla autory aplikována v experimentálním systému obsahujícím pouze purifikované proteinové komplexy (Fancy a Kodadek, 1999). Naším záměrem bylo pokusit se adaptovat tuto techniku na analýzu proteinových interakcí *“in situ”*, tj. v nepurifikovaných buněčných frakcích (buněčných membránách).

### **6.1. Využití BN-PAGE pro separaci jaderných komplexů dále analyzovaných hmotnostní spektrometrií**

Zavedení hmotnostní spektrometrie pro biologické struktury podstatně usnadnilo identifikaci proteinů. K přípravě vzorku na hmotnostní analýzu není již nutné použít purifikačních metod, jejichž výtěžkem je velké množství materiálu, ale lze použít i malé množství proteinů např. separovaných pouze pomocí elektroforetických technik. To vede v současnosti ke zvýšenému zájmu o speciální elektroforetické techniky. BN-PAGE umožňuje separaci proteinových komplexů ve stavu, v jakém se nacházejí v buňce. Tato metoda má podstatně lepší rozlišení než klasicky používané metody studující proteinové komplexy (ultracentrifugace, gelová filtrace), kalibrace systému pomocí standardů je jednoduchá a potřebné množství vzorku je v porovnání s výše uvedenými metodami minimální. Ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou analýzou je možné tímto postupem analyzovat podjednotkové složení i velmi velkých a složitých proteinových komplexů (Schagger a kol., 1994).

Rozhodli jsme se ověřit, zda je možné použít tento systém pro separaci jaderných proteinových komplexů. Zjistili jsme, že separace některých jaderných proteinových komplexů (RNA polymeráza I a II, nukleární DNA helikáza II) metodou BN-PAGE způsobem používaným pro separaci membránových komplexů je v principu možná. Molekulové hmotnosti holoenzymů RNA polymerázy I a RNA polymerázy II separovaných pomocí BN-PAGE odpovídaly hodnotám získaným chromatografickými separačními technikami (Bitter, 1983; Hannan a kol., 1998).

Nevyřešeným problémem ovšem zůstala hmotnostní analýza separovaných jaderných komplexů. Ve všech analyzovaných vzorcích byly nalezeny pouze jaderné histony. Je otázkou, zda histonové proteiny vytvářejí silné pozadí pro jejich nedokonalou separaci (viz níže) nebo zda dochází k separaci mnoha různě velkých fragmentů nukleosomů, které tak pokryjí celou separační dráhu. Poměrné zastoupení jednotlivých histonů ve vzorku určené analýzou ovšem nenaznačuje, že by se mohlo jednat o intaktní nukleosomy či fragmenty chromatinu.

Nejprve byly analyzovány vzorky obsahující majoritní jaderné komplexy barvitelné CBB R, o nichž by bylo možné předpokládat, že budou obsahovat nukleosomy či fragmenty chromatinu. Tento předpoklad se potvrdil, ve všech vzorcích byly identifikovány histony. Rovněž byly analyzovány vzorky, ve kterých by se měly nacházet komplexy RNA polymerázy I a II a komplexy obsahující aktin nebo nukleární DNA helikázu II (jejich pozice v gelu byla určena protilátkami). I v těchto vzorcích byly nalezeny ve všech případech histonové proteiny, nikoliv proteiny vyskytující se v hledaných komplexech. Možným vysvětlením je, že se tyto proteiny nacházely v gelu v množství, které nedosahovalo prahu citlivosti hmotnostních analyzátorů. Výsledky několika hmotnostních analýz, kde byly vždy ve všech vzorcích identifikovány histony, naznačují, že histonové proteiny jsou přítomny v celém gelu. Zda se tyto proteiny v systému BN-PAGE pohybují v gelu aberantně, tedy ne v ostré zóně, může být způsobeno jejich silně bazickým charakterem, pro který za daného pH disociují pouze částečně a tudiž se nepohybují v elektrickém poli homogenně. V původní práci Schaggera a von Jagowa (Schagger a von Jagow, 1991) je uvedeno, že systém BN-PAGE je schopen separovat pouze kyselé proteiny, resp. proteiny, které mají  $pI$  nižší než 8,6 a to v případě, že jsou schopny vázat CBB G. Proteiny, které nevážou CBB G mohou být úspěšně separovány pouze v případě, že jejich  $pI$  je nižší než 5,4. Druhým možným vysvětlením přítomnosti histonů v celém gelu může být uvolňování chromatinových fragmentů z vysokomolekulární DNA, která zůstává na startu separačního gelu (jak bylo ověřeno barvením ethidium bromidem). Během separace může docházet vlivem elektrického pole k postupnému uvolňování nukleosomů nebo jejich částí do gelu.

Neměli jsme však k dispozici specifické protilátky proti histonovým proteinům, abychom oba tyto předpoklady jednoznačně ověřili.

Ať už dochází k nedokonalé separaci histonových proteinů kterýmkoliv z uvedených mechanismů, bylo nutné najít způsob, jak proceduru modifikovat a “kontaminaci histony“ ze separace jaderných proteinových komplexů odstranit. Byly testovány různé způsoby přípravy vzorku a modifikace separačního postupu vedoucích ke zvýšení množství minoritních jaderných proteinových komplexů v gelu.

Pokusili jsme se odstranit chromatinové pozadí ze vzorku nukleolytickými enzymy. Za tímto účelem jsme použili enzymy degradující DNA – DNázu I a benzonázu. Působením obou enzymů došlo k částečné degradaci chromatinu, takže proteinové komplexy mohly volně vstupovat do gelu, ovšem silné pozadí způsobené histony, které znemožňuje identifikaci jiných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie se tímto postupem odstranit nepodařilo. Je možné, že krátká doba inkubace s nukleázami nevedla k totálnímu rozštěpení chromatinu na mononukleosomy.

Pokud byly nukleázy vyloučeny z přípravy vzorku, docházelo k blokování pórů akrylamidového gelu chromatinem a tím k zabránění vstupu velkých proteinových komplexů do gelu. Proto jsme se pokusili zabránit tomuto jevu použitím agarosového mezerníku umístěném na horní hranici polyakrylamidového gelu. Agarosový gel sice zadržel vysokomolekulární DNA, výsledky následné hmotnostní analýzy však ukázaly, že histonové komplexy se v gelu nacházejí stále. Tento výsledek opět naznačuje, že ke kontaminaci gelu histonovými proteiny zřejmě dochází v průběhu separace působením elektrického pole, které způsobuje vytrhávání částí chromatinu ze startovní zóny a tyto fragmenty pak postupnou migrací do gelu mohou vytvářet kontaminující pozadí.

Dalším problémem byla také špatná rozpustnost jaderného materiálu – velká část jaderných proteinových komplexů zůstávala za solubilizačních podmínek popsaných Schaggerem a Jagowem na startu gelu. Pokusili jsme se tedy zvýšit množství solubilních jaderných proteinových komplexů zlepšením solubilizačních podmínek. Při přípravě vzorku za podmínek používaných pro membránové proteiny, tak jak je popsáno v (Schagger a von Jagow, 1991), byla solubilizována pouze polovina celkového množství jaderných proteinů. Druhá polovina proteinů zůstala v nerozpustné formě vázaná na jaderné struktury a nemohla vstoupit do gelu. Ukázalo se, že nejlepších solubilizačních účinků se dosáhlo zvýšením koncentrace kyseliny aminokapronové ve vzorku na 1,5 - 2 M. Zjistili jsme rovněž, že se zvyšující se koncentrací kyseliny aminokapronové ve vzorku se zvětšoval poměr mezi solubilní formou holoenzymů RNA polymerázy I a II a velkými nerozpustnými komplexy těchto enzymů. Tento jev byl zřejmě způsoben účinkem vysoké koncentrace kyseliny aminokapronové na stabilitu větších polymerázových komplexů, které se za daných podmínek rozpadaly až na solubilní formu holoenzymu. Stabilita samotného holoenzymu však narušena nebyla, neboť na bletech není patrný signál polymerázových podjednotek v monomerním stavu. Tyto výsledky jsou obdobné pro RNA polymerasu I i pro RNA polymerázu II.

V konečné fázi jsme se pokusili spojit dva přístupy – solubilizaci jaderných komplexů 1,5 M aminokapronovou kyselinou a jejich preseparaci v agarosovém gelu. Množství

separovaných proteinových komplexů se sice celkově zvýšilo, nicméně ani nyní se nepodařilo odstranit pozadí způsobené přítomností histonových komplexů. Zatím žádný z námi použitých postupů nevedl k odstranění histonové kontaminace. V současné době testujeme další způsob odstranění vysokomolekulární formy chromatinu předseparací v agarosového gelu a odstraněním vysokomolekulární DNA před vlastní separací. Další možnosti, jak tento problém vyřešit, by mohlo být specifické odstranění DNA protilátkou proti DNA navázanou na magnetických kuličkách, DNA navázaná protilátkou na kuličky by byla odstraněna ze vzorku diferenční centrifugací.

## **6.2. Studium proteinových interakcí membránových komplexů metodou PICUP**

Studium interakcí podjednotek uvnitř proteinových komplexů je důležité pro pochopení jejich struktury a funkce a jak se tato funkce mění v závislosti na změně struktury. Jedním ze způsobů, jak tyto interakce studovat, je technika tvorby kovalentních vazeb mezi proteiny, jejichž povrchy jsou v těsném kontaktu. V současnosti se hledají postupy, které by umožnily studovat tímto způsobem komplexy za fyziologických podmínek. Jednou z nově vyvinutých metod, kterou by bylo možno uplatnit, je světlem indukovaná tvorba kovalentních vazeb reakcí PICUP (Fancy a Kodadek, 1999). Jak zmíněno v úvodní kapitole, tato reakce má mnoho výhod oproti tradičně používaným technikám využívajícím bifunkční spojky. Je založena na reakčních intermediátech, které nemají modifikační účinky na proteiny, probíhá velmi rychle a má vysoké výtěžky kovalentně propojených produktů. Tento systém je možno aktivovat v přesně definovaný okamžik, což by mohlo umožnit studium dynamických dějů. Reakce je aktivována viditelným zářením, to odstraňuje problémy s degradačním a modifikačním vlivem UV záření. K osvitu je vhodné používat silné světelné zdroje (xenonové nebo volframové lampy), ale je možné používat i dostupnější zdroje jako je fotografický blesk. K aktivaci reakce stačí milisekundové expozice, ale tuto dobu by bylo možné ještě zkrátit při použití laseru (Fancy a kol., 2000).

Reakce PICUP byla doposud ověřena pouze na purifikovaných proteinech (Bitan a kol., 2001; Lumb a Danpure, 2000). V původní práci však autoři uvádějí, že tento systém by mohl být využit i pro studium nepurifikovaných proteinů nacházejících se ve složitých systémech buněčných frakcí, případně na celých buňkách (Fancy a kol., 2000). Cílem naší práce bylo zjistit, zda reakce může být využita při studiu proteinových komplexů nacházejících se v hrubých buněčných preparacích, v našem případě v buněčných membránách. Zjistili jsme, že působením reakčních činidel dochází ke kovalentnímu propojení proteinů. Tento jev byl

znatelný již při velmi krátkých expozicích (1 s) zářením 75 W xenonové lampy, kdy vznikaly kovalentně spojené polymery o velké molekulové hmotnosti. Analyzovali jsme jejich složení pomocí protilátek. Ukázalo se, že proteiny, o kterých se uvádí, že asociaují s dalšími proteiny, vytvářely vlivem reakce polymery. Nebyly jsme však schopni určit jejich přesnou velikost, resp. proteiny se nacházely v mnoha různě velkých komplexech, které jsme detekovali jednak na startu gelu a jednak jako širší pás v horní části gelu. To může být vysvětleno tím, že membránové proteiny interagují s více proteiny a při reakci PICUP vznikají tedy rozdílné kovalentně spojené komplexy co do jejich složení a molekulové hmotnosti. V případech některých proteinů (CD 45 a  $\beta_1$ -integrin) jsme detekovali kromě polymerů v širokém pásu i vzniklé komplexy separované v úzké zóně vyskytující se v horní části gelu. V případě aktinu jsme detekovali jeho dimer a trimer, vznikající vlivem reakce PICUP.

Ověřili jsme vliv jednotlivých reagencí na tvorbu kovalentních vazeb. Zjistili jsme, že reakce PICUP probíhá účinně jen v přítomnosti  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$  a akceptoru elektronů při expozici proteinů světlem. Samotné  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$  v exponovaném vzorku žádnou reakci nevyvolává. Dále jsme zjistili, že účinnost reakce závisí na množství přítomného APS. Se snižující se koncentrací APS se snižuje i množství kovalentně spojených proteinů. Tento poznatek odpovídá výsledkům uváděným v původní práci (Fancy *a kol.*, 2000).

Dále jsme zjistili, že kovalentní propojení membránových proteinů při expozici reakční směsi není způsobeno pouze reakcí vyvolanou fotolýzou  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$ , ale dochází k němu částečně i bez osvitu a dokonce i v nepřítomnosti  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$ . Z výsledků našich experimentů je zřejmé, že tato reakce je způsobena reaktivitou samotného APS, resp. sulfátových radikálů. Reakce způsobená samotným APS je podstatně slabší než reakce vyvolaná fotolýzou  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$ . Ovšem v případě, že doba působení APS na proteiny je dlouhá (řádově desítky minut), dochází k výrazným modifikacím proteinů, což se projevuje změnou mobility proteinů v monomerním stavu při elektroforetické separaci. Tento jev by mohl být způsoben oxidací methioninových a cysteinových zbytků, která je popsána v původní práci. Oxidaci způsobuje APS při dlouhých inkubačních časech. V případě, že bylo APS přidáno do vzorku již obsahujícího redukční činidlo, tento typ reakce neproběhl. To naznačuje, že reakce způsobená APS je inhibována redukčními podmínkami, a že za tuto reakci jsou odpovědné radikály, které vznikají v přítomnosti APS. V podmínkách našich experimentů může APS způsobovat propojení lipidů do velkých celků a případně propojení lipidů a proteinů dohromady. To by vysvětlovalo výskyt velkých komplexů obsahujících proteiny v přítomnosti APS. Reakci v přítomnosti samotného APS jsme detekovali pouze pomocí proteinů barvených v gelu. Na blotech však tato reakce zřejmá nebyla, což vysvětluje, proč se tato reakce neobjevila ve výsledcích uváděných v práci D. A. Fancyho a kol. (Fancy *a kol.*, 2000; Fancy a Kodadek, 1999), kteří uvádějí

výsledky získané pouze pomocí Western blotů. Tento jev může mít několik vysvětlení. Reakce v přítomnosti samotného APS by mohla být specifická pro určité proteiny, které jsme my nestudovali protilátkami, takže jsme je detekovali pouze v barvených gelech. Dalším vysvětlením může být, že při reakci vzniká takové množství komplexů, které je ještě detekovatelné barvením v gelu, ale již ne protilátkou, a případně při přenosu proteinů z gelu na membránu se velké komplexy přenesou jen z části a jejich množství na membráně je již pod hranicí citlivosti protilátky. V průběhu naší práce jsme také zjistili, že při blotování docházelo k nerovnoměrnému přenosu proteinů, resp. proteiny vyskytující se na okrajích gelu nebo v jejich blízkosti a především velké polymery a proteiny se přenášely z gelu na membránu podstatně hůře než menší proteiny vyskytující se ve středových částech gelu. To nám znemožňovalo porovnávat intenzitu signálů protilátek detekujících velké kovalentně spojené komplexy.

Z výše uvedených důvodů reaktivitu APS jsme se rozhodli použít jako elektronový akceptor jinou sloučeninu, a to  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$ . Ve shodě s původní prací (Fancy *et al.*, 2000) při porovnání účinnosti obou reagencí jsme zjistili, že efektivita reakce PICUP v přítomnosti APS je několikanásobně vyšší. Kovalentně spojených polymerů o stejně velikosti vznikajících v přítomnosti APS při osvitu 1 s je možno dosáhnout pomocí  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  až při osvitu několika desítek sekund.  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  však nemá modifikační účinky na proteiny, jaké se vyskytly při použití APS. Z charakteru vznikajících polymerů je možné usoudit, že reakce v přítomnosti  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  je více specifická pro asociované proteiny než reakce v přítomnosti APS. Tyto poznatky byly potvrzeny experimentem, ve kterém byl pro zjednodušení použit purifikovaný imunoglobulin IgG<sub>1</sub>. I zde bylo APS podstatně účinnější, ale zároveň se reakce v jeho přítomnosti jevila jako méně specifická, protože vznikaly vlivem reakce PICUP kovalentní komplexy větší než molekula IgG<sub>1</sub>. To mohlo být ale také způsobeno spontánní agregací imunoglobulinu v roztoku ještě před iniciací reakce PICUP.

Další možností, jak omezit reaktivitu APS je použití inhibitorů volných radikálů jako je vitamin E, askorbát, DETAPAC, EDTA, glutathion a další. Tyto látky zházejí specifické radikály a mohly by tak selektivně inhibovat nežádoucí modifikační reakci. Jejich otestování by přispělo i k pochopení mechanismu samotné reakce.

V současnosti se snažíme najít podmínky reakce PICUP, při kterých vzniká minimum kovalentních vazeb mezi asociovanými proteiny (1 – 2 vazby na protein), aby nedocházelo k snížení množství analyzovatelných peptidů hmotnostní spektrometrií.

## 7. Závěr

Aplikovali jsme metodu BN-PAGE vyvinutou pro separaci membránových proteinových komplexů na jaderné membránové proteiny. Zjistili jsme, že v principu je separace tohoto materiálu pomocí BN-PAGE možná.

Takto separované jaderné proteinové komplexy není možno analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie z důvodu přítomnosti velkého množství histonových proteinů vytvářejících silné pozadí. Tyto proteiny pocházejí z fragmentů chromatinu.

Způsob přípravy vzorku pro BN-PAGE popsaný Schaggerem a von Jagowem (Schagger and von Jagow, 1991) pro membránové proteinové komplexy není optimální pro jaderné proteinové komplexy. Jejich solubilita je za daných podmínek nízká. My jsme ji podstatně zvýšili použitím vysoké koncentrace kyseliny aminokapronové (1,5 – 2 M).

Pokusili jsme se využít reakci PICUP pro studium protinových interakcí komplexů nacházejících v buněčných membránách.

Ověřili jsme, že v přítomnosti  $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+}$  a APS při expozici světelným zářením vznikají příčné kovalentní vazby mezi proteiny buněčných membrán.

Zjistili jsme, že v přítomnosti samotného APS probíhá analogická reakce způsobující propojení a modifikaci proteinů. Tato reakce neprobíhá za redukujících podmínek, což ukazuje, že příčinou by mohly být volné radikály.

Testovali jsme  $\text{Co(III)(NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$  jako možný akceptor elektronů. Reakce PICUP však byla v přítomnosti této reagencie podstatně méně účinná než tomu bylo v přítomnosti APS.

Obě studované metody by mohly sloužit k podrobnému studiu proteinových interakcí a ve spojení s hmotnostní spektrometrií by mohly přispět k identifikaci asociačních partnerů v proteinových komplexech.

## 8. Seznam použité literatury

Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Nakajima, T., Wolpin, E.S. a Parvin, J.D. (1998) BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet*, **19**, 254-6.

Bartůňková, J. a Hořejší, V. (1998) *Základy imunologie*. Triton, Praha.

Biemann, K. (1992) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem*, **61**, 977-1010.

Bitan, G., Lomakin, A. a Teplow, D.B. (2001) Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J Biol Chem*, **276**, 35176-84.

Bitter, G.A. (1983) Purification of DNA-dependent RNA polymerase II from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem*, **128**, 294-301.

B Blobel, G. a Potter, V.R. (1966) Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*, **154**, 1662-5.

Blum, H., Beier, H. a Gross, H.J. (1987) *Electrophoresis*, **8**, 93-99.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

Brown, K.C., Yang, S.H. a Kodadek, T. (1995) Highly specific oxidative cross-linking of proteins mediated by a nickel-peptide complex. *Biochemistry*, **34**, 4733-9.

Campbell, L.A., Kodadek, T. a Brown, K.C. (1998) Protein cross-linking mediated by metalloporphyrins. *Bioorg Med Chem*, **6**, 1301-7.

Celis, J.E. (1998) *Cell biology - a laboratory handbook*. Academic Press, San Diego.

Cuatrecasas, P. (1971) Affinity chromatography. *Annu Rev Biochem*, **40**, 259-78.

Cullen, S.E. (1984) Isolation of antigenic proteins from lymphocytes by binding immune complexes to staphylococcal protein A. *Methods Enzymol*, **108**, 467-80.

Dai, R.M. a Li, C.C. (2001) Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 740-4.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. a Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-89.

Egly, J.M., Miyamoto, N.G., Moncollin, V. a Chambon, P. (1984) Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? *Embo J*, **3**, 2363-71.

Fancy, D.A. (2000) Elucidation of protein-protein interactions using chemical cross-linking or label transfer techniques. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 28-33.

Fancy, D.A., Denison, C., Kim, K., Xie, Y., Holdeman, T., Amini, F. a Kodadek, T. (2000) Scope, limitations and mechanistic aspects of the photo-induced cross-linking of proteins by water-soluble metal complexes. *Chem Biol*, **7**, 697-708.

Fancy, D.A. a Kodadek, T. (1997) Site-directed oxidative protein crosslinking. *Tetrahedron*, **53**, 11953-11960.

Fancy, D.A. a Kodadek, T. (1998) A critical role for tyrosine residues in His6Ni-mediated protein cross-linking. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 420-6.

Fancy, D.A. a Kodadek, T. (1999) Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6020-4.

Fancy, D.A., Melcher, K., Johnston, S.A. a Kodadek, T. (1996) New chemistry for the study of multiprotein complexes: the six-histidine tag as a receptor for a protein crosslinking reagent. *Chem Biol*, **3**, 551-9.

Fields, S. a Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-6.

Grandier-Vazeille, X. a Guerin, M. (1996) Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem*, **242**, 248-54.

Hannan, K.M., Hannan, R.D. a Rothblum, L.I. (1998) Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci*, **3**, d376-98.

Hemler, M.E. (1990) VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol*, **8**, 365-400.

Hibbs, M.L., Xu, H., Stacker, S.A. a Springer, T.A. (1991) Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science*, **251**, 1611-3.

Hozak, P., Jackson, D.A. a Cook, P.R. (1994) Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci*, **107**, 2191-202.

Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D. a Young, R.A. (1996) A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **380**, 82-5.

- Kim, K., Fancy, D.A., Carney, D. a Kodadek, T. (1999) Photoinduced protein cross-linking mediated by palladium porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11896-11897.
- Kyte, J. (1995) *Structure in protein chemistry*. Garland Publishing, New York.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lumb, M.J. a Danpure, C.J. (2000) Functional synergism between the most common polymorphism in human alanine:glyoxylate aminotransferase and four of the most common disease-causing mutations. *J Biol Chem*, **275**, 36415-22.
- Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S. a Reinberg, D. (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*, **381**, 86-9.
- Manoussopoulos, I.N., Maiss, E. a Tsagris, M. (2000) Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. *J Gen Virol*, **81**, 2295-8.
- Matsuo, T. a Seyama, Y. (2000) Introduction to modern biological mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **35**, 114-30.
- Muronetz, V.I., Sholukh, M. a Korpela, T. (2001) Use of protein-protein interactions in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods*, **49**, 29-47.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**, 4007-21.
- Ostergaard, H.L., Shackelford, D.A., Hurley, T.R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B.M. a Trowbridge, I.S. (1989) Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 8959-63.
- Phizicky, E.M. a Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, **59**, 94-123.
- Rando, O.J., Zhao, K. a Crabtree, G.R. (2000) Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol*, **10**, 92-7.
- Rosenstein, Y., Park, J.K., Hahn, W.C., Rosen, F.S., Bierer, B.E. a Burakoff, S.J. (1991) CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature*, **354**, 233-5.
- Rosypal, S. (1999) *Úvod do molekulární biologie*. Stanislav Rosypal, Brno.
- Rungger, D., Rungger-Brandle, E., Chaponnier, C. a Gabbiani, G. (1979) Intranuclear injection of anti-actin antibodies into Xenopus oocytes blocks chromosome condensation. *Nature*, **282**, 320-1.

Schagger, H., Cramer, W.A. a von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*, **217**, 220-30.

Schagger, H. a Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J*, **19**, 1777-83.

Schagger, H. a von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-31.

Schamel, W.W. a Reth, M. (2000) Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity*, **13**, 5-14.

Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W.W. a Jockusch, B.M. (1984) Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell*, **39**, 111-22.

Stojiljkovic, L., Ji-Lao Fan, Cole, A.B., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J.A., Lessard, J.L., Hope, T.J., Hozak, P. a de Lanerolle, P. b-actin and nuclear myosin I are required for transcription by RNA polymerase II. v tisku.

Tamura, G.S., Dailey, M.O., Gallatin, W.M., McGrath, M.S., Weissman, I.L. a Pillemer, E.A. (1984) Isolation of molecules recognized by monoclonal antibodies and antisera: the solid phase immunoisolation technique. *Anal Biochem*, **136**, 458-64.

Vodrážka, Z. (1996) *Biochemie*. Academia, Praha.

Voet, D. a Voet, J.G. (1995) *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha.

Yates, J.R., 3rd. (2000) Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *Trends Genet*, **16**, 5-8.