

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Strukturní studie inhibičních mechanismů kinas fosfatidylinositolu

Structural studies of inhibitory mechanisms of phosphatidylinositol kinases

Diplomová práce

Bc. Jiří Gregor

Školitel: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Mgr. et Mgr. Evžena Bouři, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 10. května 2018

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školiteli Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D za odborné vedení, podporu a vstřícnost při vypracovávání diplomové práce. Dále bych také rád poděkoval RNDr. Martinu Klímovi, Ph.D a RNDr. Janu Šilhánovi, Ph.D za cenné rady a pomoc s vyhodnocováním dat a všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

+ssRNA viry po vstupu do buňky tvoří platformy pro svoji replikaci - replikační organely. V těchto oblastech je díky činnosti fosfatidylinositol 4-kinasy zvýšená koncentrace PI4P, který vytváří vhodné prostředí pro vazbu virové polymerasy 3D^{POL}. Jednou z těchto kinas je PI4KB, která je vázána na membránu prostřednictvím ACBD3 proteinu, který je sám k membráně vázán interakcí s giantinem. Některé kobuviry a enteroviry z čeledi *Picornaviridae* pomocí nestrukturního proteinu 3A vytěsní ACBD3 protein z vazby s giantinem a přemístí ho z Golgiho aparátu do replikační organely. Na ACBD3 se zde váže PI4KB a následně katalyzuje vznik PI4P. V Golgiho aparátu byly objeveny pouze dva proteiny – TBC1D22A a TBC1D22B – které se váží do stejného místa ACBD3 proteinu jako PI4KB. Cílem této práce bylo ověřit interakci peptidů z proteinů TBC1D22A a TBC1D22B s ACBD3 proteinem a zjistit sílu této interakce. Dalším cílem bylo vykristalizovat komplexy těchto interakčních partnerů a následně vyřešit jejich trojrozměrné struktury. Bylo zjištěno, že interakce ACBD3 proteinu s peptidy TBC1D22A a TBC1D22B je mnohem slabší než interakce ACBD3 s PI4KB. Podařilo se připravit krystaly komplexu ACBD3 s TBC1D22A, ale bohužel difraktovaly jen k velmi nízkému rozlišení, a tudíž struktura nemohla být vyřešena.

Abstract

+ssRNA viruses after entering the cell develop platforms for RNA replication called replication organelles. Due to the activity of phosphatidylinositol 4-kinases is in these areas a higher concentration of PI4P, which establishes suitable binding environment for the viral polymerase 3D^{POL}. One of these kinases is PI4KB, which is recruited to the membrane by the ACBD3 protein, which is itself recruited by giantin. Some kobuviruses and enteroviruses from the *Picornaviridae* family use their 3A protein to displace ACBD3 protein from the complex with giantin and transfer it from Golgi apparatus to the replication organelles. Here, PI4KB binds to ACBD3 protein and synthesizes PI4P. Recently, two proteins – TBC1D22A and TBC1D22B – were discovered to bind to the same area of ACBD3 protein as PI4KB. The goal of this project was verification of this

interaction and its subsequent characterization (e.g. dissociation constant measurements). My goal was to crystallize complexes of these interaction partners and to solve three-dimensional structure. Our results suggest, that interaction of ACBD3 protein with peptides derived from TBC1D22A and TBC1D22B proteins is much lower compared to interaction between ACBD3 protein and PI4KB. I successfully prepared crystals, however, they diffracted poorly, not allowing us to solve the three-dimensional structure, the crystals must be further optimized. (In Czech)

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	9
1. PŘEHLED LITERATURY	13
1.1. Fosfatidylinositol 4-kinasy	13
1.1.1. Fosfatidylinositol 4-kinasa III β (PI4KB)	13
1.2. PROTEIN ACBD3	16
1.3. <i>Picornaviridae</i>	19
1.3.1. Genom a proteom	20
1.3.2. Virové replikační organely	22
1.3.3. Zástupci <i>Picornaviridae</i> využívající k vazbě PI4KB protein ACBD3	24
1.4. Proteiny TBC1D22A a TBC1D22B	27
2. CÍL PRÁCE	29
3. MATERIÁL	30
4. METODY	37
4.1. Příprava fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	37
4.1.1. Příprava vektoru pro fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	37
4.1.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	37
4.1.1.2. Elektroforéza na agarózové gelu	39
4.1.1.3. Restrikční štěpení a ligace DNA	39
4.1.1.4. Transformace bakterií <i>E.coli</i> DH5 α a amplifikace	40
4.1.1.5. Preparace plazmidové DNA a její sekvenace	41
4.1.2. Expres fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	41
4.1.3. Purifikace fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	42
4.1.3.1. Lýza buněk	42

4.1.3.2.	Afinitní chromatografie na vázaných kovových kationtech a štěpení TEV proteasou	42
4.1.3.3.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného	43
4.1.3.4.	Měření koncentrace a ověření molekulové hmotnosti	44
4.2.	Příprava fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	44
4.2.1.	Příprava vektoru pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	44
4.2.1.1.	Klonování bez restričních endonukleas	44
4.2.1.2.	Cílená mutageneze	47
4.2.2.	Expresse fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	49
4.2.3.	Purifikace fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	49
4.2.3.1.	Lýza bakteriálních buněk, afinitní chromatografie na vázaných kovových kationtech, štěpení SUMO proteasou, gelová permeační chromatografie, SDS-PAGE	49
4.2.3.2.	Reverzní afinitní chromatografie na vázaných kovových kationtech, měření koncentrace a ověření molekulové hmotnosti	50
4.3.	Metoda „pull down“	50
4.4.	Termoforéza	51
4.5.	Krystalizace fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A a její optimalizace	51
5.	VÝSLEDKY	53
5.1.	Příprava fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	53
5.1.1.	Příprava vektorů pro fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	53
5.1.2.	Expresse a purifikace fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B	54
5.2.	Příprava fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	60
5.2.1.	Příprava vektorů pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	60

5.2.2. Expres a purifikace fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B	61
5.3. Metoda „pull down“	66
5.4. Termoforéza	67
5.5. Krystalizace fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A a její optimalizace	69
6. DISKUSE	71
7. ZÁVĚR	73
8. POUŽITÁ LITERATURA	74

Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
Acyl-CoA	z angl. Acyl-coenzyme A
ACBD3	z angl. Acyl-coenzyme A binding 3
ACBD3(Q)	z angl. Acyl-coenzyme A binding 3 (glutamine rich domain)
ACBD	z angl. Acyl-coenzyme A binding domain
Arf1	z angl. ADP-ribosylation factor 1
AiV-A (B,C,D,E,F)	Aichi virus A (B,C,D,E,F)
CAR	z angl. Charged amino-acids region
CAPON	z angl. Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein
CERT	z angl. Ceramide transfer protein
COPI	z angl. Coat protein complex I
COPII	z angl. Coat protein complex II
CypA	Cyklofilin A
Cytochrom P450 scc	z angl. Cytochrom P455 side chain cleavage
Dexas1	z angl. Dexamethasone-induced Ras-related protein 1
DMT1	z angl. Divalent metal transporter 1
DMV	z angl. Double-membrane vesicles
ER	Endoplasmatické retikulum
Emp24	z angl. Endomembrane protein 24

Fq	z angl. Frequentin
FAPP	z angl. Four-phosphate-adaptor protein
GA	Golgiho aparát
GFP	z angl. Green fluorescent protein
GTPasa	Guanintrifosfát fosfohydrolasa
GBF1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1
GOLD	z angl. Golgi dynamics domain
IFN- β	Interferon beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRES	z angl. Internal ribosomal entry site
kbp	z angl. kilo base pair
LB	z angl. Lysogeny broth
LKU	z angl. Lipid kinase unique domain
MHC-1	z angl. Major histocompatibility complex 1
NMDA	N-methyl-D-aspartát
nNOS	neuronální syntasa oxidu dusnatého
NTP	nukleotidtrifosfát
Numb	z angl. Protein numb homolog
OSBP (OSBP1)	z angl. Oxysterol binding protein (Oxysterol binding protein 1)
P	prolin

PI	Fosfatidylinositol
PI4P	Fosfatidylinositol 4-fosfát
PI4K2A	Fosfatidylinositol 4-kinasa II α
PI4K2B	Fosfatidylinositol 4-kinasa II β
PI4KA	Fosfatidylinositol 4-kinasa III α
PI4KB	Fosfatidylinositol 4-kinasa III β
PKD	Proteinkinasa D
PKAR1A	z angl. cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
PITP- β	z angl. Phosphatidylinositol transfer protein β
Q	Glutamin/doména bohatá na glutamin
SDS-PAGE	z angl. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide electrophoresis
StAR	z angl. Steroidogenic acute regulatory
Sec14	z angl. Secretory 14
Sac1	z angl. Suppressor of actin 1
SI	z angl. Spherule invagination
SMV	z angl. Single membrane vesicle
TBC1D22A	Transferrin receptor like 2/Budding Uninhibited by benzimidazol/Cell division cycle protein 16 1 Domain family member 22A

TBC1D22B	Transferrin receptor like 2/Budding Uninhibited by benzimidazol/Cell division cycle protein 16 1 Domain family member 22B
TSPO	z angl. Translocator protein
VDAC-1	z angl. Voltage-dependent anion-selective channel 1
VPg	z angl. Viral protein genome linked
+ssRNA	z angl. Single stranded RNA with positive polarity

1. Přehled literatury

1.1. Fosfatidylinositol 4-kinasy

Fosfatidylinositol 4-kinasy jsou enzymy, které katalyzují fosforylaci fosfatidylinositolu (PI) v pozici 4 s využitím adenosintrifosfátu (ATP) za vzniku fosfatidylinositol 4-fosfátu (PI4P). Rozlišujeme typ II a typ III s odlišnými vlastnostmi. Kinasy typu II lze inhibovat vápenatými kationty a jsou posttranslačně modifikovány palmitoylací, což vede k jejich membránové lokalizaci. Kinasy typu III nelze inhibovat vápenatými kationty a nemají posttranslační modifikaci, která by je mohla vázat k membráně. K membráně jsou však rekrutovány pomocí membránově vázaných interakčních partnerů. U obou z těchto typů rozlišujeme isoformy α a β , které se od sebe liší strukturou, lokalizací a funkcí. Existují tedy čtyři fosfatidylinositol 4-kinasy – fosfatidylinositol 4-kinasa II α (PI4K2A), fosfatidylinositol 4-kinasa II β (PI4K2B), fosfatidylinositol 4-kinasa III α (PI4KA) a fosfatidylinositol 4-kinasa III β (PI4KB). Zájmem této práce je především PI4KB, a proto bude dále pozornost věnována právě jí [1,2]. PI4KB je spojena se vznikem některých nemocí (například virových), a proto je snaha o vývoj inhibitorů této kinasy.

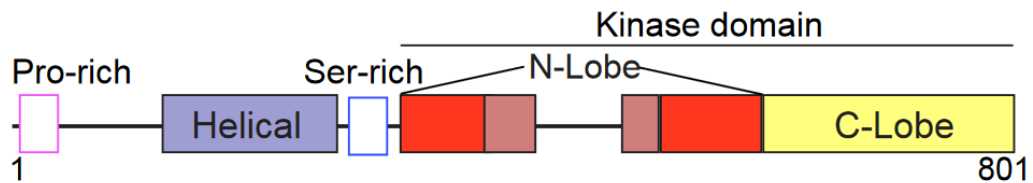
1.1.1. Fosfatidylinositol 4-kinasa III β (PI4KB)

Jedná se o protein velký přibližně 92 kDa exprimovaný především v srdci, kosterní svalovině a slinivce břišní. Na úrovni buňky se nachází převážně na cytosolické části membrány Golgiho aparátu (GA), endoplasmatického retikula (ER), jádra, lysozomů a v membránách endosomálního váčkového systému [3,4].

Struktura

Struktura PI4KB je převážně helikální a obsahuje několik domén. Na C-konci se nalézá katalytická doména, jejíž struktura mimo jiné obsahuje na svém N-konci antiparalelní β -skládaný list a na svém C-konci α -helix. Centrálně se nalézá helikální doména, která interaguje s malou GTPasou Rab11. Mezi katalytickou doménou a helikální

doménou se nachází neuspořádaná oblast s větším množstvím serinů. Tyto seriny mohou být fosforylovány, čímž mohou ovlivňovat funkci a lokalizaci PI4KB. Na N-konci se nachází N-terminální helix, který interaguje s ACBD3 proteinem [5]. Schematické znázornění domén PI4KB je na Obr.1.



Obr.1: Schematické znázornění domén PI4KB. Pro-rich – oblast bohatá na proliny, Ser-rich – oblast bohatá na seriny, Helical – helikální doména, Kinase domain – katalytická kinasová doména, N-lobe – N-konec katalytické domény složený z β -skládaných listů, C-lobe – C-konec katalytické domény složený z α -helixů. Převzato a upraveno z [5].

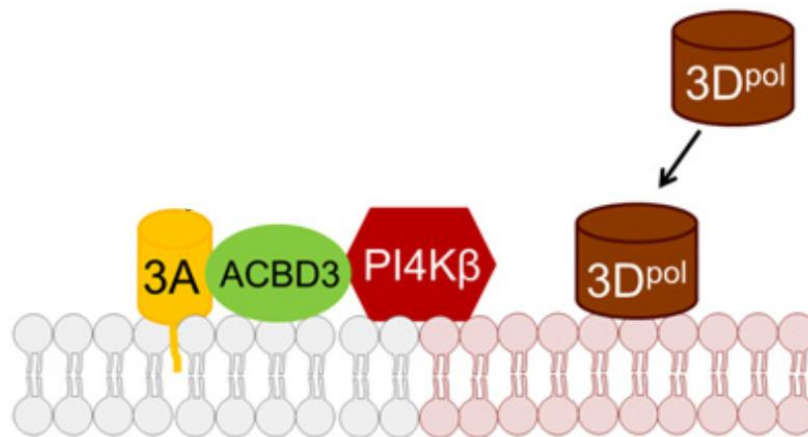
Funkce

PI4KB se účastní mnoha buněčných pochodů a její funkci můžeme rozdělit na nekatalytickou a katalytickou. Významnou funkci zastává na membránách, na které může být rekrutována. Mezi nekatalytické funkce řadíme interakce s jinými molekulami, které mohou v případě membránové lokalizace PI4KB vést ke změně lokalizace i těchto molekul. Příkladem je vazba regulátoru transportu buněčných váčků GTPasy Rab11. Dále může PI4KB interagovat s FAPP (z angl. Four-phosphate-adaptor protein), 14-3-3 proteiny a ACBD3 proteinem (z angl. acyl-CoA binding domain 3 protein), pomocí něhož může být PI4KB rekrutována k membráně. Katalytickou funkcí je tvorba PI4P z PI. Tento krok je významný ve fosfoinositidové signální kaskádě, k udržení membránové struktury a organizace GA či k regulaci metabolismu lipidů nebo transportu buněčných váčků. PI4KB tvorbou PI4P také vytváří prostředí pro vazbu polymerasy 3D^{POL} některých virů [2, 6].

Regulace

PI4KB je důležitý enzym, který tvorbou PI4P reguluje mnoho buněčných procesů. Z tohoto důvodu musí být sám regulován, což může probíhat několika cestami – například regulací vazby na membránu, fosforylací nebo pomocí 14-3-3 proteinů [7].

Virový 3A protein interaguje s ACBD3 proteinem (z angl. acyl-CoA binding 3 protein), který váže PI4KB k membráně - vytváří se tak ternární komplex 3A-ACBD3-PI4KB. Vazba PI4KB k membráně vede k membránovým změnám, které jsou klíčové pro vznik replikačních organel. Tuto vazbu podporuje také přítomnost proteinu 3B [10,11,12]. Tento model je znázorněn na Obr.2.



Obr.2: Model vazby PI4KB k membráně vedoucí k tvorbě PI4P a vazbě $3D^{POL}$. PI4KB je vázána k membráně prostřednictvím ternárního komplexu 3A-ACBD3-PI4KB a tvoří tak prostředí vhodné k vazbě virové polymerasy $3D^{POL}$. Převzato a upraveno z [12].

V enzymu PI4KB bylo nalezeno osm míst možné fosforylace. Fosforylace serinu v pozici 294 je zajištěna proteinkinasou D (PKD) a pozitivně ovlivňuje aktivitu a díky interakci s 14-3-3 proteiny také odolnost vůči degradaci. Fosforylace serinu v pozici 496 a threoninu v pozici 504 vede k lokalizaci PI4KB v jaderné membráně, fosforylace serinu v pozici 266 a serinu v pozici 258 pak k lokalizaci v GA [13].

Rodina 14-3-3 proteinů je napříč organismy vysoce konzervovaná. Má více než 300 interakčních partnerů, a proto hraje významnou roli v regulaci mnoha buněčných procesů a signálních drah. 14-3-3 proteiny rozpoznávají především proteiny s fosforylovanými serinovými a threoninovými aminokyselinami, jsou však známy i případy vazby nefosforylovaných proteinů. Tato interakce může způsobit konformační změnu cílové molekuly, zabránit její defosforylaci a degradaci, změnit její buněčnou lokalizaci nebo změnit enzymovou aktivitu. Jedním z interakčních partnerů 14-3-3 proteinů je i fosforylovaná PI4KB [13,14].

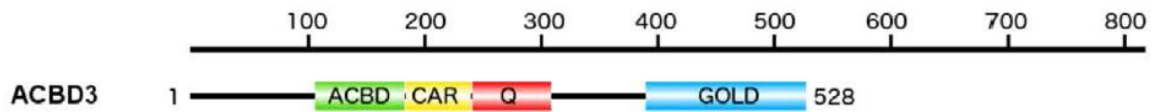
1.2. Protein ACBD3

ACBD3 je protein, který je na tkáňové úrovni hojně exprimován v buňkách vaječníků a varlat. V menší míře pak v buňkách nadledvin, ledvin, jater, mozkové kůry, hippocampu a hypothalamu. Na buněčné úrovni se nachází především v GA, méně pak v mitochondriích. Jeho membránová lokalizace je zajištěna přímou protein-proteinovou interakcí s giantinem (známým též jako golgin B1). ACBD3 protein je nezbytný pro udržení struktury a funkce GA. Kromě toho interaguje s mnoha jinými molekulami, a proto je důležitou součástí mnoha signálních drah a buněčných pochodů [15, 16].

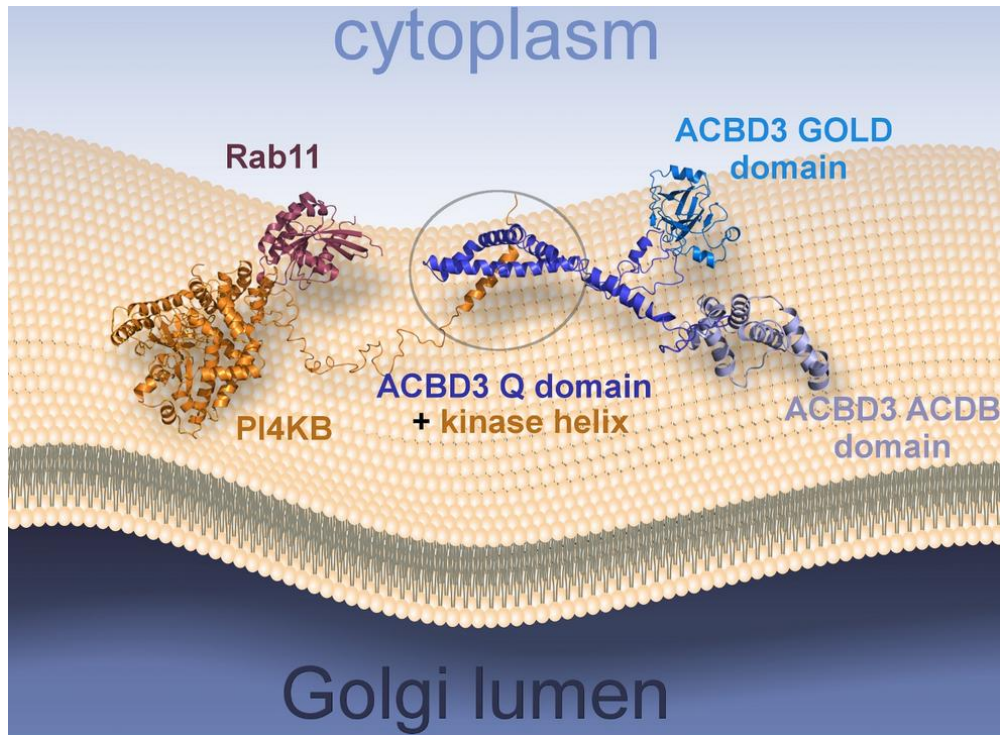
Struktura

Protein ACBD3 obsahuje několik domén – acyl-koenzym A (acyl-CoA, z angl. acyl-coenzyme A) vazebnou doménu (ACBD, z angl. acyl-CoA binding domain), doménu aminokyselin s nábojem (CAR, z angl. charged amino-acids region), doménu bohatou na glutamin (Q) a GOLD doménu (z angl. Golgi dynamics domain). Q doména se skládá z α -helixu, který tvoří smyčku pro vazbu PI4KB a proteinů TBC1D22A a TBC1D22B. GOLD doména váže giantin a nestrukturní protein 3A některých virů. GOLD domény jsou bohaté na β -skládané listy a jsou přítomny v různých proteinech podílejících se na funkci GA včetně transportu buněčných váčků mezi GA a ER. V lidském proteomu se GOLD domény vyskytují v proteinech podobných Sec14 (z angl. Secretary 14), Emp24 (z angl. Endomembrane protein 14) a v proteinu ACBD3 [12]. Schématické znázornění domén ACBD3 proteinu a model multiproteinového komplexu s ACBD3 na membráně je znázorněn na Obr.3 (strana 17).

(A)



(B)



Obr. 3: (A) Doménová organizace ACBD3 proteinu. ACBD – acyl-CoA vazebná doména, CAR – doména nabitých aminokyselin, Q – doména bohatá na glutamin, GOLD – GOLD doména (B) Model multiproteinového komplexu na membráně. Znáznorněna je vazba Rab11 k membráně prostřednictvím PI4KB a vazba PI4KB k membráně prostřednictvím ACBD3. Vazba ACBD3 k membráně prostřednictvím giantinu nebo virového proteinu 3A není znázorněna. Převzato a upraveno z [12].

Funkce

ACBD3 interaguje s mnoha buněčnými molekulami a figuruje tedy v mnoha buněčných pochodech. Podílí se na regulaci apoptózy pomocí interakce s golginem A3 (zvaným také golgin 160), kontrole asymetrického buněčného dělení a diferenciaci neuronů interakcí s Numb proteinem, udržování homeostázy železa interakcí s monomerním G proteinem Dexras1 (z angl. Dexamethasone-induced Ras-related

protein 1) a transportérem kovů DMT1 (z angl. divalent metal transporter 1) nebo udržování homeostázy lipidů interakcí s PI4KB. Dále figuruje v patogenezi některých neurodegenerativních onemocnění – například Huntingtonovy choroby a interaguje s některými virovými proteiny, čímž umožňuje vznik a progresi virových onemocnění [15].

Stimulace NMDA (N-methyl D-aspartát) receptorů aktivuje neuronální syntasu oxidu dusnatého (nNOS). Ta interaguje prostřednictvím adaptorového proteinu CAPON (z angl. Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein) s proteinem Dexras1, což vede k S-nitrosylaci a aktivaci Dexras1. Dexras1 se poté váže na ACBD3 a dochází k interakci s transportérem DMT1, který transportuje ionty železa do buňky [17,18].

Během neurogeneze dochází k asymetrickému dělení neuronálních progenitorových buněk, aby se obnovily a zároveň vytvořili neuronální buňku. Při mitose dochází k fragmentaci GA a uvolnění proteinu ACBD3. Ten je v buňce distribuován nerovnoměrně, a proto je nerovnoměrně distribuován i Numb protein. Segregace cytosolických Numb proteinů do jedné dceřiné buňky se podílí na diferenciaci v neuron [19].

Protein ACBD3 reguluje apoptózu interakcí s fragmenty golginu 160. Golgin 160 je cytoplasmatický protein lokalizovaný v membráně GA. Je složený z C-terminální domény s „coiled-coil“ motivem a N-terminální domény bez „coiled-coil“ motivu. N-terminální doména obsahuje motivy důležité pro cílení do GA a do jádra a tři aspartáty, které jsou rozpoznávány kaspasami v průběhu apoptózy. Některé fragmenty vzniklé rozštěpením golginu 160 kaspasami jsou akumulovány v jádře. Protein ACBD3 interaguje s fragmentem skládajícím se z aminokyselinových zbytků 140-311, čímž zamezuje jeho akumulaci v jádře. Přítomnost tohoto fragmentu v jádře snižuje senzitivitu buňky k apoptóze – protein ACBD3 tedy tuto senzitivitu zvyšuje [20].

Pro biosyntézu steroidních látek v mitochondriích je důležitý protein StAR (z angl. steroidogenic acute regulatory protein), který reguluje přestup cholesterolu z cytoplasmy přes vnější mitochondriální membránu k vnitřní mitochondriální membráně. Na ní se nachází cytochrom P450 11A1, známý jako cytochrom P450 scc (z angl. Cytochrome P450

side chain cleavage enzyme), který katalyzuje přeměnu cholesterolu na pregnenolon, z něhož mohou vznikat další steroidní látky. K aktivaci proteinu StaR a tedy k přenosu cholesterolu k vnitřní mitochondriální membráně je nezbytný komplex na vnější mitochondriální membráně. Ten se skládá z proteinu TSPO (z angl. translocator protein), napěťově řízeného aniontového kanálu VDAC-1 (z angl. voltage-dependent anion channel 1), regulační podjednotky 1 α protein kinasy A (PKAR1A, z angl. cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit) a ACBD3 proteinu [21].

Na vzniku Huntingtonovy choroby se podílí interakce ABCD3 s mutantním huntingtinem obsahujícím polyglutaminová opakování a striatum-selektivním monomerním G-proteinem Rhes [22].

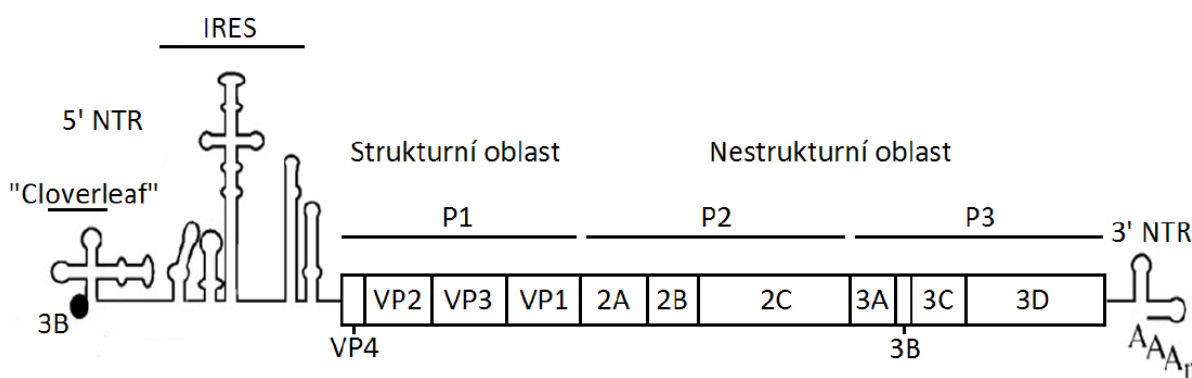
Dále je ACBD3 vazebným partnerem virového nestrukturního proteinu 3A některých virů (například polioviru, coxsackieviru B3 nebo Aichi viru). Tyto viry tvoří specifické membránové kompartmenty bohaté na PI4P zvané replikační organely. K vytvoření těchto kompartmentů viry využívají některé hostitelské molekuly, zahrnující fosfatidylinositol 4-kinasy, zajišťující vysoké koncentrace PI4P lipidů v membráně [11].

1.3. Picornaviridae

Čeď *Picornaviridae* je součástí čtvrté skupiny virů zahrnující jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou (+ssRNA viry). Jedná se o malé, neobalené viry s ikosahedrání kapsidou. V současné době tato čeď čítá 35 rodů, 80 druhů a více než 500 zástupců. Infekce těmito viry mohou nejčastěji způsobit onemocnění centrálního nervového systému, respiračního a gastrointestinálního traktu, srdce, jater, slinivky břišní, očí a kůže. Mnohé infekce jsou bezpříznakové, některé však život ohrožující. Ovlivňují různé buněčné pochody, které vedou k neschopnosti imunitního systému detekovat virus, replikaci virové nukleové kyseliny a složení nového viru [23].

1.3.1. Genom a proteom

Genom virů z čeledi *Picornaviridae* je malý, skládá se z 6,7 až 10,1 tisíců párů bází (kbp, z angl. kilo base pair). Obsahuje regulační oblasti a oblast kódující polyprotein, ze kterého vznikají strukturální a nestrukturní proteiny. Translatovaný polyprotein musí být pro vznik jednotlivých proteinů kontrtranslačně a posttranslačně procesován. Z tohoto polyproteinu vzniká vedoucí protein a tři proteiny P1, P2 a P3, přičemž dále z P1 vznikají strukturální kapsidové proteiny, z P2 vznikají nestrukturní proteiny 2A, 2B a 2C, z P3 pak nestrukturní proteiny 3A, 3B, 3C a 3D [23]. Schéma genomu polioviru (zástupce čeledi *Picornaviridae*) je uvedeno na Obr.4.



Obr.4: Schéma genomu polioviru z rodiny *Picornaviridae*. Převzato a upraveno z [24].

Na 5'-konci RNA je prostřednictvím tyrosinu v pozici 3 a argininu v pozici 17 kovalentně vázán peptid 3B (zvaný také VPg, z angl. viral peptide genome-associated) [25]. 3'-konec obsahuje polyA konec, který může být variabilně dlouhý [26]. Další regulační oblasti jsou vedoucí sekvence „cloverleaf“ a IRES (z angl. Internal ribosomal entry site). U picornavirů bylo popsáno pět různých typů IRES (například viry z rodu Enterovirus obsahují typ 1, viry z rodu Kobuvirus typ 5) [27].

Strukturální proteiny tvoří ikosahedrální kapsidu. Ta se skládá z 60 protomer, z nichž každá obsahuje některý z kapsidových proteinů VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C), VP4 (1A). U některých virů (například u Kobuvirů) se může vyskytovat protein VP1 a VP3 společně s nerozštěpeným prekurzorem proteinů VP2 a VP4 – VP0, respektive 1AB. VP1, VP2 a VP3

se skládají z osmivláknového β -barelu („jellyroll fold“) a konzervovaného vazebného místa „drug-binding site“. VP4 se nachází na vnitřní membráně kapsidy [28].

Vedoucí protein se v polyproteinu nachází před kapsidovými proteiny. Jeho funkce není v mnoha případech objasněna. U některých virů (například Aftovirů, Erbovirů) jde o proteasu podobnou papainu, která se váže na hostitelské proteiny [23].

Funkce některých nestrukturních proteinů je prozatím neznámá. Například Picornaviry se vyskytují různé formy proteinu 2A. U Enterovirů se jedná o cysteinovou proteasu podobnou chymotrypsinu, která štěpí polyprotein na jeho N-konci a váže se na hostitelské proteiny. 2A protein se strukturním motivem H-box/NC se nachází u mnoha rodů, například u Kobuvirů, Parechovirů nebo Salivirů. Další forma 2A proteinu dokáže zastavit a opětovně zahájit elongační fázi translace na dalším kodonu v rámci čtecího rámce, čímž zprostředkovává kontrtranslační procesování.

2B je membránově asociovaný protein, který zvyšuje permeabilitu plazmatické membrány (funguje tedy jako viroporin) a inhibuje vesikulární transport. 2C je helikasa asociovaná s membránami. 2BC je membránově zakotvený prekurzor proteinů 2B a 2C podílející se na formaci virových replikačních organel [29,30].

Nestrukturní protein 3A je součástí picornavirů nezbytnou pro tvorbu jejich replikačních organel. 3A proteiny obsahují C-terminální region, který je hydrofobní a N-terminálního region interagující s mnoha regulačními molekulami. Ten je za fyziologických podmínek z velké části nestrukturovaný, rozpustný, lokalizovaný v cytoplasmě. Za membránovou vazbu je zodpovědný C-terminální hydrofobní region a N-terminální myristoilovaný glycin (myristoilace je například rodiny *Picornaviridae* neobvyklá a je popsána jen u rodu Kobuvirus a Salivirus). Po vazbě na protein ACBD3 se stává 3A strukturovaný. 3A proteiny mnoha Picornavirů mají důležitou roli v membránové reorganizaci a inhibici buněčných transportních mechanismů. To zajišťují pomocí protein-proteinových interakcí s mnoha hostitelskými molekulami a jejich vazbou do replikačních organel. Mohou interagovat například s ACBD3 proteinem nebo GBF1 [31,32]. Při infekci je 3A protein schopen vytlačit ACBD3 z komplexu s giantinem na membráně GA a přemístit ACBD3 do

virové replikační organely. Zde vzniká ternární komplex 3A-ACBD3-PI4KB vedoucí k tvorbě PI4P na membráně, což je nezbytný proces pro vznik replikační organely [32, 33].

3B je virový peptid vznikající procesováním polyproteinu. Je kovalentně vázán na RNA, kde funguje jako primer, a také ve formě 3AB prekurzoru se podílí na vazbě 3D^{POL} k membráně. 3C^{PRO} je cysteinová proteáza podobná chymotrypsinu a je důležitá při procesování polyproteinu. 3D^{POL} je RNA-dependentní RNA-polymerasa replikující virovou RNA. 3CD^{PRO} je prekurzor proteinů 3C^{PRO} a 3D^{POL}. Vazbou RNA a 3B stimuluje iniciaci replikace. Má proteolytickou aktivitu, oproti samotnému 3C^{PRO} je tisíckrát efektivnější. Odštěpením N-konce vzniká 3D^{POL} a protein tak získává polymerasovou aktivitu, kterou 3CD^{PRO} nevykazuje [23].

1.3.2. Virové replikační organely

+ssRNA viry musí pro své množení a přežití vytvořit buněčné prostředí, které umožní replikaci jejich nukleové kyseliny a koncentraci potřebných molekul ke sbalení nové virové kapsidy na jednom místě. Tyto změněné oblasti hostitelské buňky se nazývají replikační organely a k jejich tvorbě je nezbytné změnit některé buněčné pochody. Nutno podotknout, že napříč viry jsou tyto mechanismy velmi rozmanité. Někteří zástupci mohou ovlivňováním transportu buněčných váčků omezit sekreci antivirových cytokinů interleukinu 6 (IL-6), interleukinu 8 (IL-8) a interferonu β (IFN- β) a zamezit tak prezentaci virových peptidů závislé na hlavním histokompatibilním komplexu 1 (MHC-1 z angl. major histocompatibility complex 1) [35].

V průběhu infekce dochází k poškozením buněčných membrán. Jsou známy dva typy těchto změn – typ dvojmembránových váčků (DMV, z angl. double membrane vesicle) a typ sférulový invaginační (SI, z angl. spherule invagination). DMV typ vzniká z jednomembránových váčků (SMV, z angl. single membrane vesicle). K tomuto procesu může dojít invaginací a následným splynutím membrány nebo exvaginací následovanou sekundární invaginací a splynutím membrány SMV. SI typ vzniká invaginací SMV bez

splynutí membrány. U Polioviru a Coxsackieviru B3 z jsou při rané infekci přítomny SMV a s její progresí dochází k přeměně SMV na DMV [36, 37].

Z virových proteinů mohou mít na membránové poškození největší přímý vliv proteiny s transmembránovou doménou – největší vliv má 2BC, dále pak 2B, 2C a 3A. Velikost genomu +ssRNA virů je však malá a nedokáže tak kódovat ostatní nezbytné faktory, a proto je nepostradatelný vliv faktorů hostitelského organismu, které jsou z těchto důvodů při infekci využívány. Jedná se o cyklofiliny, proteinový komplex I (COPI, z angl. coat protein complex I) a proteinový komplex II (COPII, z angl. coat protein complex II) ovlivňující buněčný transport váčků, dále molekuly zahrnuté v procesu autofagie, molekuly ovlivňující tvar membrán a molekuly ovlivňující metabolismus lipidů [35].

Cyklofiliny jsou látky řadící se mezi imunofiliny. Jedná se o peptidyl-prolyl cis/trans isomerasy, které fyziologicky hrají roli v celé řadě buněčných procesů. U mnoha virů hrají důležitou roli při replikaci. Cyklofilin A (CypA) je u enterovirů důležitý pro vstup a rozložení virových částic [38].

Viry z rodiny *Picornaviridae* ovlivňují a využívají transport buněčných váčků COPI nebo COPII prostřednictvím GTPasy Arf1 a jejího efektoru GBF1, čímž napomáhají tvorbě replikační organely a zabránění imunitnímu systému detekovat virus [39, 40].

Autofagie je proces, při kterém dochází k transportu cytoplasmatických komponent do lyzozomů. Některé viry využívají molekuly zahrnuté v autofagii pro replikaci své nukleové kyseliny. V případě polioviru se jedná například o molekulu LC3 [41].

Základními molekulami biologických membrán jsou strukturní a signální lipidy - glycerolfosfolipidy (například fosfatidylcholin), cholesterol a sfingolipidy. V replikačních organelách je méně dlouhých vyšších mastných kyselin, více cholesterolu a PI4P. Tyto změny jsou důležité pro enzymatické reakce při replikaci virového genomu a k procesování virového polyproteinu [35]. Dochází k aktivaci acyl-CoA synthetas specifických pro mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Tyto mastné kyseliny jsou thioesterifikovány a sledem reakcí vzniká acetyl-CoA. Pro stimulaci této synthetasy je

důležitá exprese nestrukturního proteinu 2A. Tento proces vede k nižší koncentraci dlouhých vyšších mastných kyselin a vyšší koncentraci kratších mastných kyselin, čímž se zvyšuje fluidita membrán [42]. Cholesterol je do replikačních organel dodáván několika z způsobů z různých buněčných kompartmentů, syntéza de novo však není ovlivněna. Hormon sensitivní lipasa může hydrolyzovat esterifikovaný cholesterol z lipidových kapének, který může být následně zabudován do membrány replikačních organel. Cholesterol může být přenesen také z plasmatické membrány. Nestrukturní protein 2BC stimuluje clathrinem zprostředkovanou endocytosu. Endosomy obsahující cholesterol z plasmatické membrány a protein Rab11 na svém povrchu jsou následně zabudovány do membrány replikační organely díky interakci Rab11 s PI4KB. Další možností je výměna cholesterolu za PI4P pomocí oxysterol vazebného proteinu 1 (OSBP1, z angl. oxysterol-binding protein 1). PI4KB katalyzuje přeměnu PI na PI4P v membráně replikační organely. OSBP1 transportuje PI4P replikační organely do membrány ER po koncentračním gradientu, kde ho mění za cholesterol, který je následně transportován do replikační organely. PI4P v ER je hydrolyzován fosfatasou Sac1 za vzniku PI, který je následně transportován zpět do replikační organely pomocí fosfatidylinositol transportního proteinu β (PITP- β , z angl. phosphatidylinositol transfer protein β), kde může být opět fosforylován příslušnou kinasou [43]. V replikačních organelách je také vyšší koncentrace PI4P, která umožňuje vazbu virové RNA-dependentní RNA-polymerasy 3D^{POL}. Pro syntézu této molekuly využívají viry PI4KB (například Poliovirus, Coxsackievirus B3, Aichi virus), PI4KA (Cardiovirus) či PI4K2A (například lidský rhinovirus A1A) [34,35].

1.3.3. Zástupci *Picornaviridae* využívající k vazbě PI4KB protein

ACBD3

Některé viry z rodu Enterovirus a Kobuvirus využívají k tvorbě replikačních továren a změnám vedoucím k replikaci virové RNA proteiny ACBD3 a PI4KB, a to prostřednictvím interakce s nestrukturními proteiny 3A. Jedná se například o Aichi virus, Coxsackievirus B3, Enterovirus 71 či Poliovirus [35].

Druh Coxsackievirus patří do rodu Enterovirus a nese své jméno podle města Coxsackie ve státě New York, kde byl poprvé izolován ze dvou dětí s paralytickou nemocí neznámého původu. Posléze byl v roce 1948 identifikován tento virus v německém městě Dalldorf. Podle histologických nálezů u infikovaných myší můžeme rozlišit dvě skupiny - A a B. U skupiny A dochází k poškození kosterního svalstva, u skupiny B dochází především k infekci jater, sleziny a centrálního nervového systému. Skupinu A můžeme rozlišit na sérotypy A1 až A22 a A24, skupinu B na sérotypy B1 až B6. K přenosu dochází fekálně-orální cestou nebo sekretem z dýchacích cest. Nejčastěji se virus množí v lymfatické tkáni *tela submucosa* nosohltanu a tenkého střeva. Odtud dochází k hematogennímu šíření do lymfatických uzlin, jater, sleziny a kostní dřeně. Jen u malého počtu nakažených dochází k replikaci viru v těchto orgánech a následnému šíření do dalších orgánů (například centrálního nervového systému, srdce, kůže). V 50-80 % případů se infekce významně neprojevuje. Obě skupiny mohou způsobit necharakteristické hořčnaté onemocnění, hořčnatý exantém, faryngitidu, perikarditidu, myokarditidu, meningitidu, encefalitidu, paralytické onemocnění. Coxsackie viry skupiny A se mohou navíc projevit syndromem ruka-noha-ústa, konjunktivitidou a herpangínou, Coxsackie viry skupiny B pak pleurodynií a generalizovaným onemocněním novorozenců. V poslední době jsou Coxsackieviry skupiny B také spojovány se vznikem diabetu mellitu prvního typu, není však známo, jestli v důsledku infekce dochází k poškození β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu nebo k navození autoimunitního procesu [44,45].

Do skupiny tak zvaných nezařazených enterovirů patří Enteroviry 68-71. Enterovirus 71 je velmi patogenní a způsobuje podobné projevy jako Coxsackieviry. Nejčastěji se projevuje jako syndrom ruka-noha-ústa a herpangína. Pokud se však projeví encefalitidou, myokarditidou, paralýzou, hemoragií nebo plicním edémem, tak může mít fatální následky. Smrtelné encefalitidy způsobují genotypy A2 a B. Ve světě bylo evidováno 14 epidemií, přičemž nejvíce smrtelných případů bylo při epidemii na Tchajwanu v roce 1998 [44,45].

Druh Poliovirus z rodu Enterovirus je původce poliomyelitidy, neboli dětské obrny. V současné době jsou známy 3 sérotypy tohoto viru – typ 1 se vyskytuje u velkých epidemií a způsobuje trvalé následky, typ 2 způsobuje méně časté paretické případy, typ 3

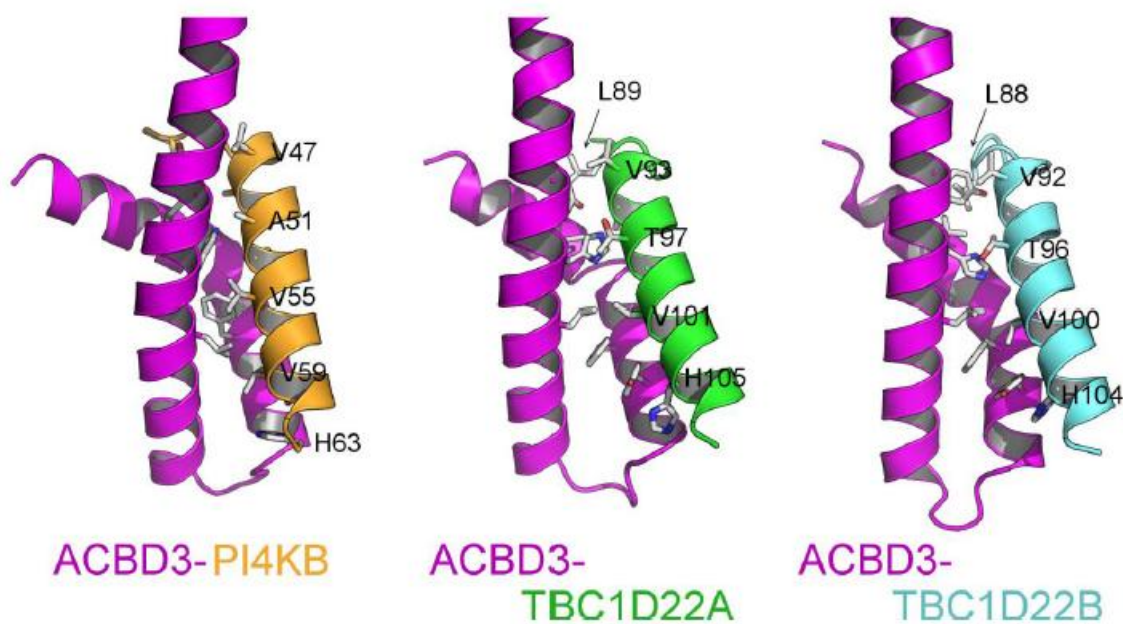
pak menší epidemie. Příznaky typické pro poliomyelitidu jsou znázorněny na kresbách starších než 3000 let, virová etiologie byla prokázána v roce 1908 rakouskými vědci Karlem Landsteinerem a Erwinem Popperem. Virus se přenáší fekálně-orální cestou a zdrojem je pouze člověk. V České republice byla největší epidemie v roce 1948 s více než 2 000 nakažených lidí. Virus byl téměř na celém světě eradikován, v roce 2002 patřily mezi země s výskytem poliomyelitidy pouze Indie, Nigérie, Egypt, Pákistán, Afgánistán, Somálsko a Niger. V Evropě byl poslední neimportovaný případ infekce v Turecku v roce 1998. Virus vstupuje do organismu přes gastrointestinální trakt, množí se v lymfatickém systému a je zanášen do orgánů retikuloendoteliálního systému. V 5-10% dochází k průniku do nervového systému a vzniku obrn. Největší poškození bývá v šedé hmotě míchy, dále bývají postiženy motorická jádra prodloužené míchy a pontu a motoneurony předních rohů míšních. 90-95% případů probíhá bez příznaků. Abortivní forma se projevuje horečkou, nevolnostmi, zvracením a únavou. U malé části pacientů může onemocnění přejít do meningeálního stadia bez vzniku obrn, tak zvané non-paretické formy. U 0,1-1 % se vyvine paretická forma, při které vznikají obrny, které se nejčastěji týkají nejvíce zatěžovaných oblastí těla. Další formou je tak zvaná bulbární forma, která se manifestuje obrnami svalů inervovaných hlavovými nervy. Při poliomyelitidě může dále vzniknout myokarditida, uroinfekce a bronchopneumonie. Lidé, kteří prodělali paretickou formu poliomyelitidy, mohou po 10-40 letech po akutní infekci trpět postpoliomyelitickým syndromem, který je charakterizován ztrátou nervové a svalové výkonnosti [44,45].

Aichi virus patří do rodu Kobuvirus. Své jméno nese podle japonské prefektury Aichi, ve které byl poprvé izolován. Rozlišujeme šest druhů – Aichivirus A (AiV-A, čítá 6 typů), Aichivirus B (AiV-B, čítá 3 typy), Aichivirus C (AiV-C, čítá 2 typy), Aichivirus D (AiV-D, čítá 2 typy), Aichivirus E (AiV-E, čítá 1 typ) a Aichivirus F (AiV-F, čítá 2 typy). AiV-A je lidský patogen, 80-90% dospělé populace má proti němu protilátky. Projevuje se průjmy, bolestmi břicha, nevolnostmi, zvracením a horečkou. Ačkoliv je tato infekce často bezpříznaková, může způsobit gastroenteritidy a u dětí mladších pěti let může být smrtelná. AiV-B napadá především hovězí dobytek, AiV-C především prasata [44,45].

1.4. Proteiny TBC1D22A a TBC1D22B

Zabránit PI4KB tvorbě PI4P na membráně lze několika způsoby. Jedním z nich je blokáce vazebného místa pro ATP, který tento enzym využívá k fosforylaci PI. Další možností je narušení membránové vazby PI4KB, například zablokováním vazebného místa pro tento enzym na proteinu ACBD3. Jedny z potenciálních inhibitorů jsou v tomto případě peptidy odvozené od TBC1D22A a TBC1D22B peptidů [31]. Podrobná znalost interakce ACBD3 proteinu s těmito peptidy by tedy mohla v budoucnu vést k vývoji nových inhibitorů PI4KB.

TBC1D22A je protein o velikosti 58 kDa, je lokalizovaný v membráně GA a s isoformou TBC1D22B sdílí 78% sekvenční identitu. Oba mají C-terminální TBC doménu, která je zodpovědná za vazbu a aktivaci Rab GTPasy, nejčastěji Rab33A a Rab33B. N-terminální část těchto peptidů obsahuje α -helix, který se váže ke Q doméně ACBD3 (obdobně jako N-terminální α -helix PI4KB). Interagující oblast se v α -helixu nachází mezi aminokyselinovými zbytky 90 až 105, přičemž pro vazbu je důležitý aminokyselinový pár valin-leucin. Pro vazbu tedy není potřebná TBC doména, a tak nedochází k ovlivnění interakce s Rab33A/B. Současná vazba PI4KB a TBC1D22A/B na ACBD3(Q) se vzájemně vylučuje. Tyto proteiny mohou také interagovat s adaptorovými 14-3-3 proteiny. V případě TBC1D22A je vazebné místo na serinu v pozici 167, v případě TBC1D22B na serinu v pozici 154. TBC1D22A a TBC1D22B soutěží s PI4KB o vazbu na ACBD3 [31]. Na Obr.5 (strana 28) je znázorněna interakce ACBD3(Q)-PI4KB z vyřešené trojrozměrné struktury tohoto komplexu a interakce ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B získané homologním modelováním [32].



Obr. 5: Vyřešená trojrozměrná struktura komplexu ACBD3-PI4KB a modely komplexů ACBD3-TBC1D22A a ACBD3-TBC1D22B získané homologním modelováním. Fialově je znázorněna ACBD3(Q), zeleně TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112) a tyrkysově TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108). Jsou znázorněné aminokyseliny důležité pro dané interakce. Převzato a upraveno z [32].

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo ověřit a zjistit sílu interakce mezi Q doménou proteinu ACBD3 a peptidy z proteinů TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112) a TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108). Dalším cílem bylo připravit krystaly komplexů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B k následnému vyřešení jejich trojrozměrné struktury.

Práce se skládala z následujících kroků:

- Příprava expresního vektoru pro fúzní proteiny skládající se z:
 - Q domény ACBD3 proteinu (ACBD3Q) a peptidů z proteinů TBC1D22A a TBC1D22B: ACBD3(Q)-TBC1D22A, ACBD3(Q)-TBC1D22B
 - Zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, z angl. green fluorescent protein) a peptidů z proteinů TBC1D22A a TBC1D22B: GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B
- Bakteriální exprese fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A, ACBD3(Q)-TBC1D22B, GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B
- Purifikace fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A, ACBD3(Q)-TBC1D22B, GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B
- Ověření interakce ACBD3(Q) s TBC1D22A a TBC1D22B
- Zjištění disociační konstanty interakce ACBD3(Q) s TBC1D22A a TBC1D22B
- Krystalizace fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B pro následné řešení jejich trojrozměrné struktury a difrakční experiment

3. Materiál

Přístroje a pomůcky

Aparát pro horizontální elektroforesu: Consort EV231 (P-LAB)

Aparát pro vertikální elektroforesu: Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad)

Centrifugy: Sorvall Evolution RC (Thermo Scientific), Avanti Centrifuge J-30I (Beckman Coulter), Allegra X-15R Centrifuge (Beckman Coulter), Centrifuge 5418 (Eppendorf)

Emulsiflex: EmulsiFlex C3 (Avestin)

Fotoaparát: E-620 (Olympus)

Homogenizátor: Dounceho (PYREX)

HPLC systém: ÄKTA purifier (GE Healthcare)

Inkubátor: IPP 400 (Mettler)

Kolona pro gelovou permeační chromatografii: HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare)

Krystalografický robot: Oryx8 (Douglas Instruments)

Krystalografická destička: Intelli-Plate 102-001-20 (Art Robbins Instrument)

Mikroskop: SZX10 (Olympus)

Předvážky: EMB 500-1 (KERN)

Rotátor: Multi RS-60 (Biosan)

Spektrofotometr: NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)

Termoforéza: Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies)

Termocyklér: TProfessional TRIO (Biometra Product Line)

Třepačky: Innova 44 (Eppendorf)

UV fotoaparát: QUANTUM ST4-1100 (Vilbert Lourmat)

Vodní lázeň: JB Aqua 1 plus (Grant)

Vortex: Vortex – Genie2 (Scientific Industries)

Chemikálie a komerční materiál

Agarosa: Agarosa SERVA pro DNA elektroforézu (SERVA)

Akrylamid, bisakrylamid: Rotiphorese gel 30 (37,5:1) (Carl Roth)

Ampicilin – sodná sůl (Carl Roth)

β-merkптоethanol (Sigma-Aldrich)

Bakterie: *Escherichia coli* DH5α (New England BioLabs), *Escherichia coli* BL21 star (New England BioLabs)

Bromfenolová modř (P-LAB)

BSA (Sigma Aldrich)

Coomassie Brilliant Blue: G-250 (Sigma-Aldrich)

Dialyzační střevo: Dialysing tubing visking, cellulosa, typ 27/32 šířka 34 mm, průměr 21,5 mm, MWCO 14000 (Medicell Membranes Ltd)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta)

DTT (Sigma Aldrich)

DNA ligasa: T4 DNA ligasa (NewEngland BioLabs Inc.)

DNA ligační pufr: T4 DNA ligační pufr (NewEngland BioLabs Inc.)

DNA polymerasa: Pfu (Agilent)

D-glukosa (Penta)

D-laktosa (Penta)

EDTA (Carl Roth)

Ethidium bromid (Carl Roth)

Hydrogenfosforečnan disodný (Penta)

Glycerol (Penta)

Chlorid hořečnatý (Sigma Aldrich)

Chlorid nikelnatý (Sigma Aldrich)

Chlorid vápenatý (Sigma Aldrich)

Chlorid sodný (Penta)

Imidazol (Carl Roth)

Kanamycinsulfát (Carl Roth)

Kvasničný extrakt (Sigma Aldrich)

Kyselina octová (Sigma Aldrich)

Methanol (Sigma Aldrich)

Koncentrátor: Amicon Ultra 30 000 Da (Millipore Ireland Ltd.), Amicon Ultra 3 000 Da (Millipore Ireland Ltd.)

Krystalografické sady: JCSG Core Suite I (Qiagen), JCSG Core Suite II (Qiagen), JCSG Core Suite III (Qiagen), JCSG Core Suite IV (Qiagen), SG1 (Molecular Dimension), MORPHEUS (Molecular Dimension), ProPlex (Molecular Dimension), MIDAS (Molecular Dimension), MIDAS plus (Molecular Dimension)

LB agar: Lennox (P-LAB)

LB medium: Lennox (P-LAB)

Master mix:

Mravenčan sodný (Sigma Aldrich)

Nanášecí pufr pro agarosovou elektroforézu: 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific)

Nanášecí pufr pro SDS PAGE: 4x Roti Load® 1 (Carl Roth)

NTA-agarosa (Qiagen)

Peroxodisíran amonný (Sigma Aldrich)

Restrikční endonukleasy: DpnI (New England Bio Labs), NotI (New England Bio Labs), NcoI (New England Bio Labs)

SDS (Sigma Aldrich)

Síran amonný (Penta)

Standard pro agarosovou elektroforesu: Gene ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Standart pro SDS PAGE: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10x250 kDa (Thermo Scientific)

Sada pro minipreparaci plazmidové DNA: QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Sada pro purifikaci plazmidové DNA: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Sokalan CP 45 (Molecular Dimension)

TEMED (Carl Roth)

TEV proteasa: koncentrace 1 mg/ml (připravena školitelem)

Tris-HCl (Carl Roth)

Triton-X100 (Sigma Aldrich)

Trypton (Sigma Aldrich)

Složení roztoků

Agarózový gel:

Agarosa 1% (w/v), Ethidium bromid 0,01% (v/v), TAE pufr

Barvící CBB roztok:

Coomassie Brilliant blue G-250 3 mmol/l, Kyselina octová 1,5 mol/l, Methanol 50% (v/v)

Elektroforetický pufr pro SDS PAGE:

Tris-HCl (pH 8,8) 25 mmol/l, Glycin 0,25 mmol/l SDS, 0,1 % (w/w)

Eluční pufr:

Tris-HCl (pH 8,0) 50 mmol/l, Chlorid sodný 300 mmol/l, Imidazol 300 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l, Glycerol 10% (v/v)

LB medium:

Trypton 10 g/l, Kvasničný extrakt 5 g/l, Chlorid sodný 5g/l

Pufr pro gelovou permeační chromatografii

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mmol/l, Chlorid sodný 100 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l

Pufr pro termoforézu

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mmol/l, Chlorid sodný 200 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l

Pufr pro krystalografii A

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l

Pufr pro krystalografii B

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mmol/l, Chlorid sodný 50 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l

Pufr pro krystalografii C

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mmol/l, Chlorid sodný 150 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l

Pufr pro krystalografii D

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mmol/l, Chlorid sodný 200 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l

Promývací pufr:

Tris-HCl (pH 8,0) 50 mmol/l, Chlorid sodný 300 mmol/l, Imidazol 20 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l, Glycerol 10% (v/v)

Pufr „pull down“:

Tris-HCl (pH 8,0) 50 mmol/l, Chlorid sodný 300 mmol/l, Imidazol 10 mmol/l, β -merkaptoethanol 3 mmol/l, Glycerol 10% (v/v)

TAE pufr:

Tris-HCl (pH 8,0) 40 mmol/l, Kyselina octová 20 mmol/l, EDTA 1 mmol/l

Vzorkový pufr pro SDS PAGE:

Tris-HCl (pH 6,8) 350 mmol/l, SDS 10% (w/v), β -merkaptoethanol 6% (v/v), Glycerol 30% (v/v), Bromfenolová modř 0,012% (w/v)

ZY medium:

Trypton 1% (v/v), Kvasničný extrakt, 0,5% (v/v), Glycerol 0,5% (v/v), Glukosa 2,8 mmol/l, Laktosa 6 mmol/l, Chlorid hořečnatý 1mmol/l, Síran amonný 25 mmol/l, Hydrogensíran amonný 50 mmol/l, Dihydrogenfosforečnan draselný 50 mmol/l

4% Zaostrňovací gel pro SDS PAGE:

Tris-HCl (pH 6,8) 125 mmol/l, Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) 4% (V/V), SDS 0,1% (w/v), TEMED 0,005% (v/v) Peroxodisíran amonný 0,05% (w/v)

10% Separáčnı gel pro SDS PAGE:

Tris-HCl (pH 6,8) 375 mmol/l, Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) 10% (v/v), SDS 0,1% (w/v), TEMED 0,001% (v/v), Peroxodisáran amonný 0,05% (w/v)

15% Separační gel pro SDS PAGE:

Tris-HCl (pH 6,8) 375 mmol/l, Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) 15% (v/v), SDS 0,1% (w/v), TEMED 0,001% (v/v), Peroxodisáran amonný 0,05% (w/v)

Oligonukleotidy pro PCR

Oligonukleotidy pro klonování Q domény z plazmitu pHGT2 do plazmidu pSUMO tak, aby Q doména byla o 8 koncových aminokyselin kratší:

Vedoucí: CGCGAACAGATTGGTGGACAGCAAAGCAGCAGATA

Zpětný: AGGCCTTTGAATCCGGACTACTGGACTTGATACAACTGC

Oligonukleotidy pro cílenou mutagenézi s vložením DNA pro peptidy TBC1D22A a TBC1D22B za vzniku DNA pro fúzní protein ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

Vedoucí oligonukleotid pro vložení TBC1D22A:

GCTGAGAGCCTGAACAGCGAGGTAGTAATGGAAACAGCTAACAGAGTCCTTCGAAACCACTCTC
AAAGACAGTAGTCCGGAATTCAAAGGCCT

Vedoucí oligonukleotid pro vložení TBC1D22B:

TTTCAAACCTTAATAGCAAAGTTGCCCTTGCGACGGCCGCCCAAGTCCTGGAAAATCACTCCAAG
CTGCGGTAGTCCGGAATTCAAAGGCCT

Zpětný oligonukleotid využitý při vložení TBC1D22A i TBC1D22B:

[P]TCCGGTACCCTGGACTTGATACAACTGC

Oligonukleotidy pro vyštěpení DNA pro TBC1D22A a TBC1D22B z příslušných plazmidů pSUMO

Výrobce: Sigma Aldrich

Modře je znázorněna DNA sekvence rozpoznávaná endonukleasou NcoI

Zeleně je znázorněna DNA sekvence rozpoznávaná restriční endonukleasou NotI

Červeně jsou znázorněny části DNA kódující sekvence peptidů TBC1D22A a TBC1D22B

TBC1D22A

Vedoucí: ATTCACCATGGCTGAGAGCCTGAACAGC

Zpětný: ATTCAGCGGCCGCCTACTGTCTTTGAGAGTGGTTTCGAA

TBC1D22B

Vedoucí: ATTCACCATGGAAATTTCAAACCTTAATAGCAAAGTTGCCCTT

Zpětný: ATTCAGCGGCCGCCTACCGCAGCTTGGAGTG

4. Metody

4.1. Příprava fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

4.1.1. Příprava vektoru pro fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

4.1.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

DNA pro TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112) a TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108) byla získána z plazmidu pSUMO s DNA pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B (jejich příprava je popsána v kapitole 4.2.1. na straně 44) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Oligonukleotidy pro tuto reakci obsahovaly vždy část plazmidu s TBC1D22A nebo TBC1D22B a DNA pro restrikční endonukleasy NcoI a NotI pro následné klonování. PCR probíhala v termocykléru TProfessional Trio (Biometra Product Line). Složení reakce je uvedené v Tab. 1 a reakce probíhaly za podmínek uvedených v Tab. 2. (strana 38) a Tab. 3 (strana 38). Oligonukleotidy využitě při těchto reakcích jsou uvedeny v kapitole 3. na straně 36.

Tab.1: Složení roztoků pro PCR vedoucí k zisku DNA pro TBC1D22A a TBC1D22B

Látka	Množství
DNA polymerasa Phusion flash High Fidelity Master mix	10 μ l
Oligonukleotidy „forwardní“	0,5 μ m
Oligonukleotidy „reversní“	0,5 μ m
Templát	1 ng
Voda v kvalitě pro HPLC	Doplněno do celkového objem 20 μ l

Tab. 2: Průběh PCR vedoucí k zisku DNA pro TBC1D22A

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování cyklu
98	10	1
98	1	30
62,1	5	
72	105	
72	60	1

Tab. 3: Průběh PCR vedoucí k zisku DNA pro TBC1D22B

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování cyklu
98	10	1
98	1	30
62,8	5	
72	105	
72	60	1

4.1.1.2. Elektroforéza na agarózové gelu

Přítomnost DNA pro peptidy TBC1D22A a TBC1D22B byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy na agarózovém gelu. Na 1% agarózový gel (složení na straně 32) byl do jedné jamky nanesen 1 µl standardu GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo scientific) a do další jamky vždy 1 µl daného vzorku smíchaný s 1 µl nanášecího pufru pro agarózovou elektroforézu 6x DNA Loading Dye (Thermo scientific). Elektroforéza probíhala 15 minut při konstantním napětí 300 V v pufru TAE (z angl. tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid, složení na straně 34). Proužky na gelu byly vizualizovány díky ethidiumbromidu v agarózovém gelu s pomocí UV fotoaparátu QUANTUM ST4 (Vilbert Lourmat).

4.1.1.3. Restrikční štěpení a ligace DNA

DNA připravená v kapitole 4.1.1.1. (strana 37) byla společně s plazmidem pRSFD (obahující DNA pro GFP protein) štěpena restrikčními endonukleasami NcoI a NotI a klonována tak do tohoto plazmidu. Vzniknul tak plazmid s DNA pro fúzní protein GFP-TBC1D22A a TBC1D22B. Reakční směsi uvedené v Tab. 4 byly inkubovány 1 h při teplotě 37°C.

Tab. 4: Složení reakčních směsí při štěpení plazmidu pRSFD s GFP proteinem a DNA s peptidy TBC1D22A/TBC1D22B pomocí restrikčních endonukleas NcoI a NotI. Plazmid i DNA pro peptidy obsahovaly cílová místa štěpení pro tyto restrikční endonukleasy.

	pRSFD(GFP)	TBC1D22A/TBC1D22B
DNA	122 ng	500 ng
NcoI	0,5 µl	0,5 µl
NotI	0,5 µl	0,5 µl
CIP	0,5 µl	X
Pufr	5 µl	5 µl
Voda	do objemu 50 µl	do objemu 50 µl

Produkty reakce byly přečištěny pomocí sady pro purifikaci plazmidové DNA QIAquick PCE Purification Kit (Qiagen) dle přiloženého návodu [46]. Poté byly ligovány pomocí T4 DNA ligasy. Složení ligační reakce je uvedené v Tab. 5.

Tab. 5: Složení ligační reakce připravených plazmidů

Látka	Množství
Vektor	55 ng
Insert	165 ng
T4 DNA ligasa	2 μ l
Pufr pro T4 DNA ligasu	0,2 μ l
Voda	Do celkového objemu 20 μ l

Produkty ligační reakce byly přečištěny pomocí sady pro purifikaci plazmidové DNA QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) a vizualizovány pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu stejně jako v kapitole 4.1.1.2 (strana 37).

4.1.1.4. Transformace bakterií *E.coli* DH5 α a amplifikace

Ke 3 μ l plazmidů připravených v kapitole 4.1.1.3. (strana 39) bylo přidáno 60 μ l bakterií *E. coli* DH5 α . Vzniklý roztok byl 15 minut inkubován na ledě, a poté byla provedena transformace teplotním šokem (42 °C, 42 s). Následně bylo přidáno 400 μ l LB (z angl. Lysogeny broth) media (složení na straně 34) a roztok byl inkubován 30 min při pokojové teplotě. Transformované bakterie byly přeneseny na Petriho misku s agarem obsahujícím kanamycin o koncentraci 40 μ g/ml. Vzorky byly inkubovány 12 h při teplotě 37°C v inkubátoru IPP 400 (Memmert).

Vybrané narostlé bakteriální kolonie byly přeočkovány do 5 μ l LB media s kanamycinem o finální koncentraci 40 μ l/ml. Roztok byl inkubován 12 h na třepačce

Innova 44 (Eppendorf) při 37°C a 220 otáček za minutu (RPM, z angl. Revolution per minute).

4.1.1.5. Preparace plazmidové DNA a její sekvenace

Roztok bakterií připravený v kapitole 4.1.1.4. (strana 40) byl odstředěn na centrifuze Beckmann Coulter X-15R (3000 RPM, 12 min, 4°C, rotor: SX470A). Supernatant byl odlit a z peletu byla izolována plazmidová DNA pomocí komerční sady na izolaci DNA QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) dle přiloženého návodu [47].

Oba vzorky plazmidové DNA byly poslána k sekvenaci do firmy GATC Biotech do Vídně. Sekvence byla provedena z jedné strany s využitím vedoucího oligonukleotidu komplementárního s částí GFP. Složení roztoků pro sekvenace DNA GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6: Složení roztoků pro sekvenaci GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B.

Komponenta	Koncentrace/množství
Plazmidová DNA	500 ng
Oligonukleotid GFP	10 μ mol/l
Voda v kvalitě pro HPLC	Doplněna do celkového objemu 10 μ l

4.1.2. Expresa fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

1 μ l roztoku plazmidů připravených v kapitole 4.1 (strana 36) byl smíchán vždy s 60 μ l kompetentních bakterií *E. coli* DL21 Star s následnou transformací teplotním šokem (42°C, 42 s). Poté byly vzorky smíchány se 400 μ l LB media (složení na straně 34) a inkubovány 1 h při 37°C v inkubátoru IPP 400 (Mettler). Tento roztok byl přidán do 5 ml LB media s kanamycinem o finální koncentraci 40 μ g/ml, a následně inkubován 12 h na třepačce Innova 44 (Eppendorf) při 37°C a 220 RPM.

Transformované bakterie byly v obou případech rovnoměrně rozděleny do tří dvoulitrových Erlenmayerových baněk, přičemž každá obsahovala 1 l autoindukčního ZY media (složení na straně 35) a 2 ml kanamycinu o koncentraci 40 mg/ml. Takto připravený roztok byl inkubován nejdříve 3,5 h při teplotě 37°C, a následně 15 h při teplotě 22 °C na třepačce Innova 44 (Eppendorf) při 220 RPM.

4.1.3. Purifikace fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

4.1.3.1. Lýza buněk

Bakteriální roztok z kapitoly 4.1.2. (strana 41) byl odstředěn v litrových kyvetách na centrifuze Sorval Evolution RC (7000 RPM, 7 min, 4°C, rotor: SLC6000). Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v promývacím pufru (složení na straně 35). Resuspendovaný pelet byl homogenizován homogenizátorem dle Dounceho, lyzován na emulsilexu Emulsiflex C3 (Avestin) při tlaku 120 MPa a odstředěn na centrifuze Beckman Coulter Avanticentriuge J30I (15 000 RPM, 15 min, 4°C, rotor: JA 25.50).

4.1.3.2. Afinitní chromatografie na vázaných kovových kationtech a štěpení TEV proteasou

Na kolonu o objemu 15 ml byl pipetován 1 ml NTA-agarózy (agaróza s navázanou nitriloctovou kyselinou). NTA-agaróza byla promyta 12 ml destilované vody, 12 ml NiCl₂ o koncentraci 50 mmol/l, 12 ml destilované vody a 12 ml promývacího pufru. Ekvilibrovaný nosič byl přidán k supernatantu z kapitoly 4.1.3.1. (strana 42) a inkubován 1 h na rotátoru Multi RS-60 (Biosan) při 20 RPM a 4 °C. Poté byl roztok odstředěn na centrifuze Beckmann Coulter Allegra X-15R (1700 RPM, 2 min, 4°C, rotor: SX470A). Supernatant byl odlit a pelet obsahující nosič resuspendován v 50 ml promývacího pufru. Tento proces byl opakován celkem pětkrát, a poté byl pelet s 10 ml promývacího pufru pipetován zpět na kolonu. Proteiny byly z kolony eluovány 5 ml elučního pufru (složení na straně 34).

Přípravený roztok byl smíchán s alikvotem 200 μ l TEV proteasy o koncentraci 1 mg/ml a 3 μ l β -merkaptoethanolu a následně inkubován 24 h při teplotě 4°C.

4.1.3.3. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Přítomnost exprimovaných proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B byla ověřena pomocí elektroforezy na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Do jedné jamky byl pipetován 1 μ l standardu PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa (Thermo Scientific). Do dalších jamek bylo pipetováno vždy 5 μ l daného vzorku před a po štěpení TEV proteasou s 5 μ l vzorkového pufru pro SDS-PAGE (strana 34). SDS-PAGE probíhala ve vertikálním uspořádání na 4% zaostřovacím (složení na straně 35) a 10% separačním gelu (složení na straně 35) při konstantním napětí 250 V na aparatuře Mini-PROTEAN (Tetra system). Byl použit Tris-glycinový elektroforetický pufr s dodecylsulfátem sodným (složení na straně 34). Gel byl obarven pomocí barviva Coomassie brilliant blue G250 (CBB G250, složení na straně 34).

4.1.3.3. Gelová permeační chromatografie

Proteinové vzorky štěpené TEV proteasou z kapitoly 4.1.3.2. (strana 42) byly odstředěny na centrifuze Beckmann Coulter Allegra X-15R (3000 RPM, 5 min, 4°C, rotor: SX470A) a supernatanty rozděleny podle velikosti pomocí gelové permeační chromatografie. Proces probíhal na přístroji ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare) a koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (maximální tlak 0,5 MPa, rozměry kolony 16x600 mm, mrtvý objem 120 ml, GE Healthcare). Kolona byla promyta 120 ml vody v kvalitě pro HPLC a ekvilibrována 120 ml pufru pro gelovou permeační chromatografii (složení na straně 34). Na ekvilibrované koloně byly poté proteiny obsažené v daném vzorku rozděleny podle velikosti. Frakce se zvýšenou hodnotou absorpance při vlnové délce 280 nm (absorbce proteinů) a 488 nm (absorbce GFP) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce s požadovaným proteinem v nejvyšší čistotě byly koncentrovány na finální objem 500 μ l

pomocí koncentrátoru Amicon Ultra 30 000 Da (Millipore Ireland Ltd.) na centrifuze Beckmann Coulter Allegra X-15R (30 min, 3500 RPM, 4°C, rotor: SX470A).

4.1.3.4. Měření koncentrace a ověření molekulové hmotnosti

Koncentrace proteinu byla vypočtena na základě znalosti molekulové hmotnosti, extinkčního koeficientu a změřené absorpance při 280 nm na přístroji NanoDrop Spectrophotometer 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Jako slepý vzorek byl použit pufr pro gelovou permeační chromatografii.

Molekulová hmotnost proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B byla ověřena pomocí SDS-PAGE popsané v kapitole 4.1.3.3. (strana 43). K dalšímu ověření molekulové hmotnosti a nepřítomnosti nečistot bylo odesláno 100 µl každého vzorku o koncentraci 10 mg/ml na hmotnostní spektrometrii do laboratoře doc. RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D. Hmotnostní spektrometrie byla provedena metodou MALDI-TOF (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight).

4.2. Příprava fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

4.2.1. Příprava vektoru pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

4.2.1.1. Klonování bez restričních endonukleas

DNA pro Q doménu ACBD3 proteinu byla získána z plazmidu pHis2 a překlonována do plazmidu pSUMO, protože exprese z tohoto plazmidu vede k proteinové sekvenci bez dvou počátečních glycinů, které mohou vadit při krystalizaci proteinu. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby sekvence pro ACBD3(Q) v plazmidu pSUMO byla kratší o část, která se nepodílí na vazbě PI4KB – tedy osm C-koncových aminokyselin. Byla využita dvoukroková metoda klonování bez restričních endonukleas. Oligonukleotidy využité při

těchto reakcích jsou uvedeny v kapitole 3. na straně 36. V prvním kroku se vytvořil jeden velký oligonukleotid a vzorek byl přečištěn pomocí sady pro purifikaci plazmidové DNA QIAquick PCE Purification Kit (Qiagen) dle přiloženého návodu [46]. Složení a průběh prvního kroku reakce je uvedeno v Tab. 7 a Tab.8.

Tab. 7: Složení reakce prvního kroku klonování Q domény ACBD3 proteinu z plazmidu pHis2 do plazmidu pSUMO bez použití restrikčních endonukleas

Látka	Koncentrace/množství
DNA polymerasa Phusion flash High Fidelity Master mix	10 μ l
Oligonukleotidy „forwardní“	0,5 μ M
Oligonukleotidy „reversní“	0,5 μ M
Templát pHis2	1 ng
DMSO	3%
Voda v kvalitě pro HPLC	Doplněno do celkového objem 20 μ l

Tab. 8: Průběh prvního kroku klonování Q domény ACBD3 proteinu z plazmidu pHis2 do plazmidu pSUMO bez použití restrikčních enzymů

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování cyklu
98	30	1
98	10	30
61	20	
72	10	
72	120	1

Tento velký oligonukleotid byl použit jako oligonukleotid pro PCR při druhém kroku klonování. Složení a průběh druhého kroku reakce je uvedeno v Tab. 9 (strana 46) a Tab. 10 (strana 46)

Tab. 9: Složení reakce druhého kroku klonování Q domény ACBD3 proteinu z plazmidu pHis2 do plazmidu pSUMO bez použití restrikčních enzymů

Látka	Koncentrace/množství
DNA polymerasa Phusion flash High Fidelity Master mix	10 μ l
„Megaoligonukleotid“	30 μ l
Templát pSUMO	20 ng
Voda v kvalitě pro HPLC	Doplněno do celkového objem 20 μ l

Tab. 10: Průběh druhého kroku klonování Q domény ACBD3 proteinu z plazmidu pHis2 do plazmidu pSUMO bez použití restrikčních enzymů

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování cyklu
98	30	1
98	10	30
58	25	
72	180	
72	120	1

Po PCR bylo ke vzorku přidáno 0,5 μ l enzymu DpnI, který štěpí původní templátovou DNA. Směs byla inkubována 2 h při 37°C v inkubátoru IPP 400 (Mettler). Vzorek byl přečištěn pomocí sady pro purifikaci plazmidové DNA QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) dle přiloženého návodu [46]. Úspěšnost přípravy plazmidu byla ověřena pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu stejným způsobem jako v kapitole 4.1.1.2. (strana 39).

4.2.1.2. Cílená mutageneze

Plazmidy s DNA kódující fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B byly připraveny cílenou mutagenezí pomocí PCR. Při této reakci byly použity oligonukleotidy obsahující DNA pro peptidy TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112) a TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108) a DNA pro sekvenci Glycin-Threonin-Glycin spojující dané peptidy s Q doménou ACBD3. Složení a průběh reakcí pro přípravu DNA těchto fúzních proteinů je uvedeno v tabulkách Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13 (strana 48) a Tab. 14 (strana 48). Oligonukleotidy využitě při těchto reakcích jsou uvedeny v kapitole 3. na straně 36.

Tab. 11: Složení PCR reakce při cílené mutagenezi při přípravě fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A

Látka	Koncentrace/množství
DNA polymerasa Phusion flash High Fidelity Master mix	10 μ l
Oligonukleotidy „forwardní“	0,5 μ M
Oligonukleotidy „reversní“	0,5 μ M
Templát – plazmid pSUMO se zkrácenou Q doménou ACBD3	1 ng
Voda v kvalitě pro HPLC	Doplněno do celkového objem 20 μ l

Tab. 12: Průběh PCR reakce při cílené mutagenezi při přípravě fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování cyklu
98	30	1
98	10	30
58	25	
72	180	
72	120	1

Tab. 13: Složení PCR reakce při cílené mutagenезi při přípravě fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22B

Látka	Koncentrace/množství
DNA polymerasa Phusion flash High Fidelity Master mix	10 μ l
Oligonukleotidy „forwardní“	0,5 μ M
Oligonukleotidy „reversní“	0,5 μ M
Templát – plazmid pSUMO se zkrácenou Q doménou ACBD3	1 ng
DMSO	5%
Voda v kvalitě pro HPLC	Doplněno do celkového objem 20 μ l

Tab. 14: Průběh PCR reakce při cílené mutagenезi při přípravě fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22B

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování cyklu
98	30	1
98	10	30
57	25	
72	180	
72	120	1

Připravené plazmidy pSUMO obsahující DNA pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B byly ligovány, amplifikovány v bakteriích *E. coli* DH5 α , izolovány a ověřeny stejným způsobem jako při přípravě fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B (kapitola 4.1.1., strana 37).

4.2.2. Exprese fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

Expresa fúzních proteinů probíhala obdobným způsobem jako exprese fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B popsaná v kapitole 4.1. (strana 37). V tomto případě byla však transformace provedena paralelně čtyřikrát. Vzniklé čtyři bakteriální suspenze byly následně rovnoměrně rozděleny do dvanácti dvoulitrových Erlenmayerových baněk, z nichž každá obsahovala 1 l ZY media (složení na straně 35) a 2 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Takto připravený roztok byl inkubován nejdříve 5 h při teplotě 37°C, a poté 14 h při teplotě 21°C na třepačce Innova 44 (Eppendorf).

4.2.3. Purifikace fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

4.2.3.1. Lýza bakteriálních buněk, afinitní chromatografie na vázaných kovových kationtech, štěpení SUMO proteasou, gelová permeační chromatografie, SDS-PAGE

Bakteriální suspenze z kapitoly 4.2.2. byla odstředěna, homogenizována, lyzována a purifikován pomocí chromatografie na vázaných kovových kationtech stejným způsobem jako při purifikaci proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B (kapitola 4.1.3., strana 42). K takto připravenému roztoku byl přidán alikvot 250 µl SUMO proteasy o koncentraci 1 mg/ml a následně byl inkubován 3 h při 4°C. Rozštěpení proteinu bylo ověřeno na SDS-PAGE. Vzorek ACBD3(Q)-TBC1D22A byl následně purifikován stejným způsobem jako v kapitole 4.1.3. (strana 42) pomocí gelové permeační chromatografie. Frakce vykazující zvýšenou absorpenci při vlnové délce 280 nm byly analyzovány na SDS-PAGE (4% zaostřovací gel a 15% separační gel, složení na straně 35 a 36) a frakce o nejvyšší čistotě spojeny.

4.2.3.2. Reverzní afinitní chromatografie na vázaných kovových kationtech, měření koncentrace a ověření molekulové hmotnosti

Vzhledem k přítomnosti nečistot byla jako další krok provedena reverzní afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech. Postup byl stejný jako při dříve popsané afinitní chromatografie (4.1.3.2., strana 42). Jímali jsme však eluát, ve kterém se nacházel protein ACBD3(Q)-TBC1D22A bez hexahistidinové kotvy. Proteiny vázané na nosič (SMT3 s navázanou hexahistidinovou kotvou a bakteriální nečistoty) byly uvolněny přidáním 5 ml elučního pufru (složení na straně 34). Eluát s ACBD3(Q)-TBC1D22A byl poté koncentrován na finální objem 500 µl pomocí koncentrátoru Amicon Ultra 3 000 Da (Millipore Ireland Ltd.) na centrifuze Beckmann Coulter Allegra X-15R (20 min, 3500 RPM, 4°C, rotor: SX470A).

Stejným způsobem jako v kapitole 4.1.3.5. (strana 44) byla změřena koncentrace proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A a ověřena molekulová hmotnost tohoto proteinu pomocí SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie.

4.3. Metoda „pull down“

K ověření interakce mezi peptidy TBC1D22A a TBC1D22B s ACBD3(Q) byla použita metoda „pull down“ s využitím připravených fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B a ACBD3(Q) s hexahistidinovou kotvou (ACBD3(Q)-His), která byla již dříve připravena v laboratoři.

Ke 20 µl roztoku NTA-agarózy s navázanými nikelnatými ionty v „pull down“ pufru (složení na straně 35) bylo přidáno 350 µg ACBD3(Q)-His a 175 µg proteinu GFP-TBC1D22A, respektive GFP-TBC1D22B. Obě směsi byly inkubovány 1 h při 4°C na rotátoru Multi RS-60 (Biosan) při 20 RPM. Poté byl roztok odstředěn na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418 (1800 RPM, 2 min, 4°C, rotor: FA 45-18-11). Supernatant byl odstraněn, k peletu bylo pipetováno 30 µl „pull down“ pufru, roztok byl promíchán a odstředěn stejným způsobem. Takovéto promytí bylo provedeno celkem pětkrát. Z nosiče byly proteiny eluovány přidávkem 30 µl elučního pufru (složení na straně 34), roztok byl

promíchán, opět odstředěn stejným způsobem a supernatant přenesen do čisté zkumavky. Jako negativní kontrola byla u obou interakcí provedena metoda „pull down“ stejným způsobem, ale bez přítomnosti ACBD3(Q)-His. Připravené roztoky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.4. Termoforéza

Ke zjištění disociační konstanty interakce ACBD3(Q) s TBC1D22A a TBC1D22B byla použita termoforéza. Pro pokus byly využity připravené fúzní proteiny GFP-TBC1D22A, GFP-TBC1D22B a ACBD3(Q), který byl již dříve připraven v laboratoři.

Experiment byl proveden na přístroji Monolith NT.115 (Nano Temper Technologies) dle přiloženého manuálu [48]. V obou reakcích byl použit pufr pro termoforézu (složení na straně 34) a GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B s konstantní koncentrací 150 nmol/l. Při měření síly interakce mezi GFP-TBC1D22A a ACBD3(Q) byla využita ACBD3(Q) o koncentraci 1,47 mmol/l a ředící řada 2:1, při měření síly interakce GFP-TBC1D22B a ACBD3(Q) pak ACBD3(Q) o koncentraci 1,47 mmol/l a ředící řada 3:1. Měření fluorescence probíhalo v mikrokapilárách Monolith NT.115 Capillaries (Nano Temper Technologies) při síle MST (microscale thermophoresis) 80% a síle LED (light emitting diode) 20%. Každý pokus byl proveden třikrát v tetraplikátech. Hodnoty byly analyzovány metodou teplotního skoku, při které se zjišťuje rozdíl fluorescence před zapnutím a po vypnutí laserového paprsku, a statisticky vyhodnoceny pomocí průměru a směrodatné odchylky.

4.5. Krystalizace fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A a její optimalizace

Krystalizace probíhala metodou difúze par v uspořádání sedící kapky v 96-ti jamkových destičkách Intelli-Plate 102-001-20 (Art Robbins Instrument) při 18°C. Kapky byly připraveny smícháním 0,5 µl roztoku proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A o koncentraci 5,1

mg/ml, 8,1 mg/ml, 12,1 mg/ml, 18,3 mg/ml, 20,1 mg/ml a 28,1 mg/ml v pufru pro gelovou permeační chromatografii (složení na straně 34) s 0,5 μ l krystalizačního roztoku pomocí přístroje Oryx8 (Douglas Instrumets). Při pokusech o krystalizaci byly využity komerční krystalografické sady JCSG Core Suite I-IV, cryo-JCSG Core Suite I-IV (tyto sady byly připraveny smícháním JCSG Core Suite I-IV s glycerolem v poměru 4:1), Morpheus, SG1, ProPlex, MIDAS a MIDAS plus. Difúze probíhala proti 70 μ l krystalizačního roztoku v rezervoáru a úniku par bylo zamezeno přelepením destičky průhlednou fólií.

Optimalizovali jsme podmínku sady MIDAS plus obsahující 20% Sokalan CP45 a mravenčan sodný o koncentraci 0,1 mol/l. Při optimalizaci byly vyzkoušeny kombinace Sokalan CP45 o koncentraci 8% až 32% (po 2%) a mravenčanu sodného o koncentraci 0,02 mol/l až 0,24 mol/l (po 0,02 mol/l). Pro tyto pokusy byl využit vzorek ACBD3(Q)-TBC1D22A o koncentraci 28,1 mg/ml. K ověření vlivu NaCl na krystalizaci byl vzorek v pufru pro gelovou chromatografii smíchán s pufrům pro krystalografii A, B, C, D (složení na straně 34 a 35). Připravili jsme tak jednotlivé vzorky v pufru s NaCl o koncentraci 200mM, 150mM, 100mM a 50mM. Vznikající krystaly byly monitorovány optickým mikroskopem SZX10 (Olympus). Vybrané krystaly byly zmrazeny v tekutém dusíku Mgr. et Mgr. Evženem Bouřou, Ph.D. Difrakční experiment byl proveden RNDr. Martinem Klímou, Ph.D a RNDr. Janem Šilhánem, Ph.D v Helmholtzově centru v Berlíně na synchrotronu BESSY II.

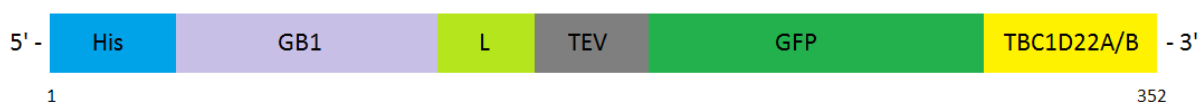
Druhá optimalizovaná podmínka byla ze sady JCSG Core Suite IV obsahující 30% polyethylenglykol 6000 a 0,1M Bicin s pH 9. V tomto experimentu byly využity stejné vzorky ACBD3(Q)-TBC1D22A jako v případě optimalizace předchozí podmínky. Při optimalizaci byly využity kombinace polyethylenglykolu 6000 o koncentraci 5% až 40% (po 5%) a Bicinu s pH 9 o koncentraci 0,02M až 0,20M (po 0,02M).

5. Výsledky

5.1. Příprava fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

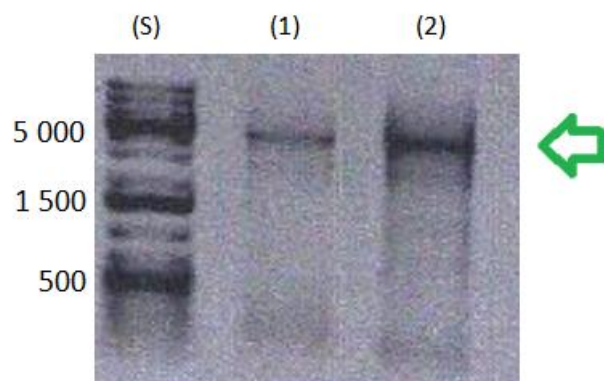
5.1.1. Příprava vektorů pro fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

Pomocí PCR byly z plazmidu připraveného v kapitole 4.2.1. (strana 44) získány DNA kódující peptidy TBC1D22A a TBC1D22B. Následně byly tyto DNA překlony s využitím restričních endonukleas NcoI a NotI do plazmidu pHGT2 za C-konec GFP. Vznikl tak vektor, jehož schéma je znázorněno na Obr. 6. Vektor obsahoval na 5' konci DNA pro hexahistidinovou kotvu důležitou pro afinitní chromatografii následovanou směrem k 3' konci DNA pro GB1 protein, který zvyšuje rozpustnost proteinu, místo pro klonování, cílové místo štěpení pro TEV proteasu, GFP a TBC1D22A nebo TBC1D22B.



Obr.6: Schéma vektoru obsahující DNA pro přípravu fúzního proteinu GFP-TBC1D22A, respektive GFP-TBC1D22B. His – hexahistidinová kotva, GB1 – protein GB1 důležitý pro zvýšení rozpustnosti proteinu, L – místo pro klonování, TEV – cílové místo štěpení pro TEV proteasu, GFP – zelený fluorescenční protein, TBC1D22A/B – DNA odpovídající sekvenci TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112) nebo TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108). Celkem tento vektor obsahuje DNA kódující 352 aminokyselin.

Úspěšnost přípravy plazmidu byla ověřena pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Elektroforeogram je znázorněn na Obr. 7 (strana 54) a je na něm patrný proužek odpovídající velikosti zhruba 5 000 páru bází, který velikostně odpovídá velikosti požadovaného plazmidu o velikosti 4 812 párů bází.

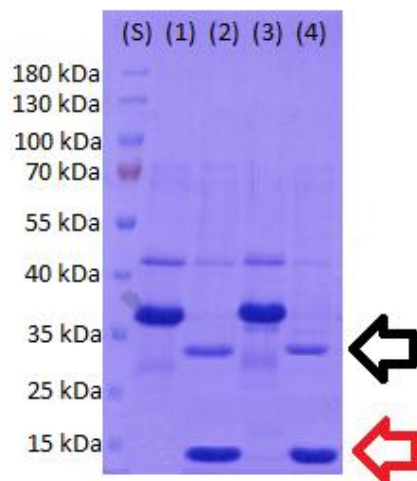


Obr.7: 1% agarózový gel znázorňující úspěšnost přípravy vektorů pro fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B. Proužky odpovídající těmto proteinům jsou znázorněny zelenou šipkou. (S) Standard, (1) GFP-TBC1D22A (2) GFP-TBC1D22B

DNA byla následně ligována a transformována do bakterií DH5 α . Vzniklá bakteriální kultura byla sklizena a plazmidová DNA z ní byla izolována a sekvenována.

5.1.2. Exprese a purifikace fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B

Fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B byly exprimovány ve 3 l autoindukčního media v bakteriích *E. coli* BL21 Star. Vytvořená bakteriální kultura byla odstředěna, resuspendována, homogenizována a lyzována. Protein byl exprimován jako fúzní protein s GB1 pro zvýšení rozpustnosti a s hexahistidinovou kotvou, pomocí které byl izolován z lyzátu afinitní chromatografií. Protein GB1 s hexahistidinovou kotvou byly poté odštěpeny TEV proteasou, což bylo ověřeno metodou SDS-PAGE. Elektroforeogram je prezentován na Obr.8 (strana 55).

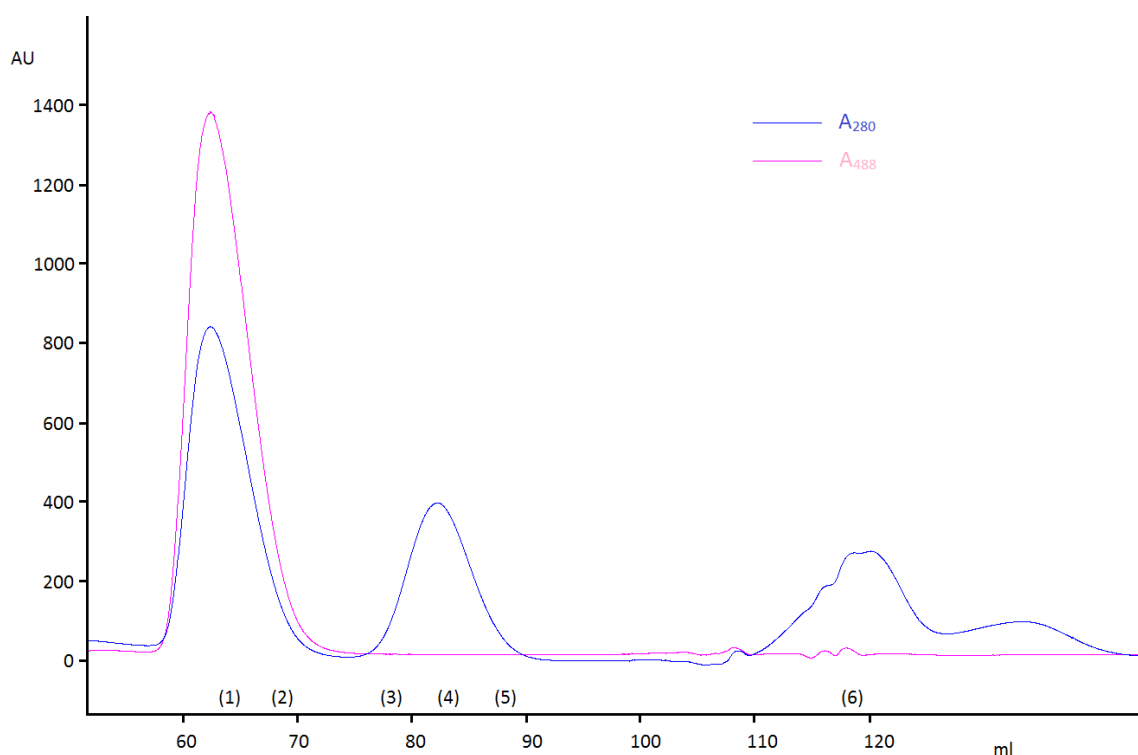


Obr. 8: 10% polyakrylamidový gel z SDS-PAGE – kontrola odštěpení GB1 a hexahistidinové kotvy od fúzních proteinů GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B TEV proteasou. (S) Standard, (1) GFP-TBC1D22A před štěpením TEV proteasou, (2) GFP-TBC1D22A po štěpení TEV proteasou, (3) GFP-TBC1D22B před štěpením TEV proteasou, (4) GFP-TBC1D22B po štěpení TEV proteasou. Černou šipkou jsou označeny fúzní proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B. Červenou šipkou je označen odštěpený protein GB1 s hexahistidinovou kotvou.

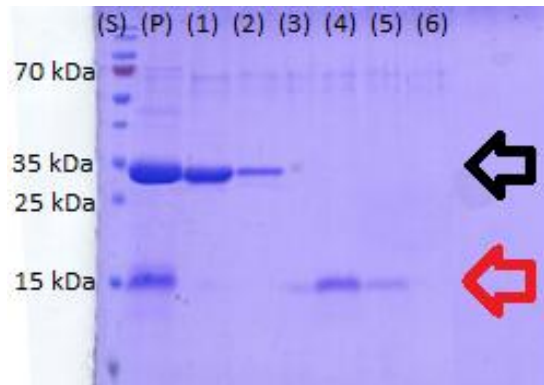
Proužky na Obr. 8 znázorňující proteiny o velikosti zhruba 39 kDa odpovídají GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B s vázaným proteinem GB1 a hexahistidinovou kotvou. Po štěpení TEV proteasou jsou patrné dva proužky. Proužek odpovídající velikosti zhruba 10 kDa znázorňuje odštěpený protein GB1 s hexahistidinovou kotvou (má mít 9,72 kDa). Proužek vyskytující se mezi 25 a 35 kDa odpovídá fúznímu proteinu GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B, které mají mít molekulovou hmotnost zhruba 30,1 kDa. Posun proužků tedy velikostně odpovídá odštěpení GB1 s hexahistidinovou kotvou. Ostatní přítomné proteiny jsou nejspíše bakteriální proteiny, které se také navázaly při afinitní chromatografii.

Dalším purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, při které byl rozštěpený proteinový vzorek rozdělen podle velikosti. Chromatogramy vzorků jsou znázorněny na Obr. 9 (strana 56) a Obr. 11 (strana 57). Proteiny byly analyzovány měřením absorpance při vlnové délce 280 nm, při které absorbují proteiny, a při vlnové délce 488 nm, při které absorbuje protein GFP přítomný v obou fúzních proteinech. Na obou elučních profilech jsou patrné dva vrcholy. Vrchol odpovídající většímu proteinu a

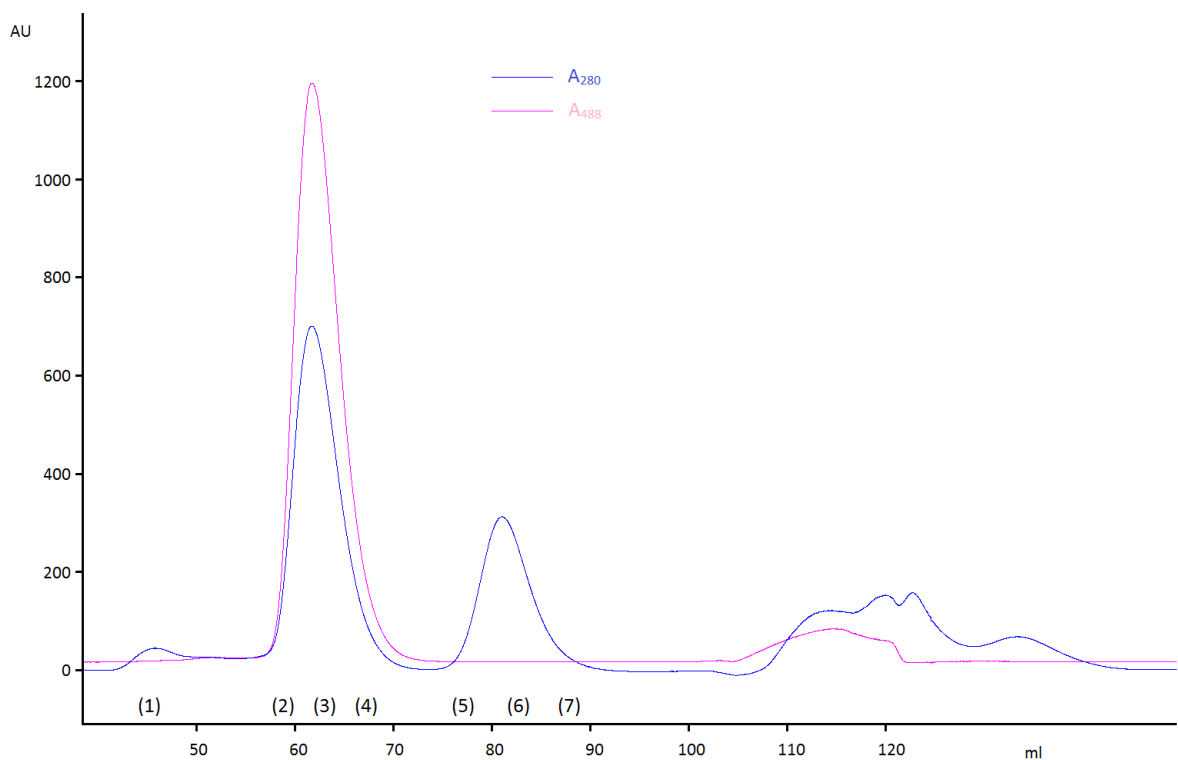
absorbující světlo o vlnové délce 280 nm i 488 nm odpovídá fúznímu proteinu GFP-TBC1D22A, respektive GFP-TBC1D22B. Vrchol odpovídající menšímu proteinu a absorbující světlo o vlnové délce pouze 280 nm odpovídá odštěpenému proteinu GB1 s hexahistidinovou kotvou. Pro potvrzení přítomnosti daného proteinu byly vybrané frakce analyzovány pomocí SDS-PAGE. Elektroforeogramy jsou na Obr. 10 (strana 57) a Obr. 12 (strana 58).



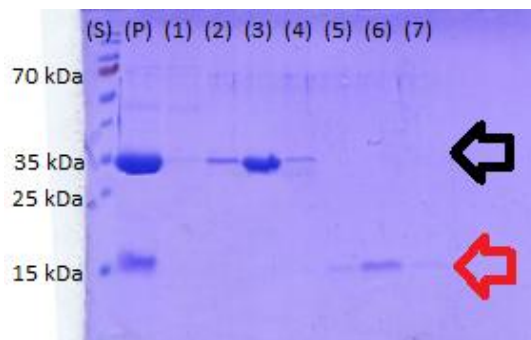
Obr. 9: Závislost absorbance na elučním objemu proteinu GFP-TBC1D22A při gelové permeační chromatografii na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované pufrem pro gelovou permeační chromatografii. Vybrané frakce pro elektroforetickou analýzu jsou znázorněny čísly (1)-(6). Modře je znázorněna absorbance při vlnové délce 280 nm, růžově absorbance při vlnové délce 488 nm.



Obr. 10: 15% polyakrylamidový gel barvený CBB G250 z SDS-PAGE vybraných frakcí gelové permeační chromatografie proteinu GFP-TBC1D22A. (S) Standard, (P) GFP-TBC1D22A po štěpení TEV proteasou aplikovaný na kolonu při gelové permeační chromatografii, (1)-(6) jednotlivé frakce z gelové permeační chromatografie. Černou je označen protein GFP-TBC1D22A. Červenou šipkou je označen odštěpený protein GB1 s hexahistidinovou kotvou.



Obr. 11: Závislost absorbance na elučním objemu proteinu GFP-TBC1D22B při gelové permeační chromatografii na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované puforem pro gelovou permeační chromatografii. Vybrané frakce pro elektroforetickou analýzu jsou znázorněny čísly (1)-(7). Modře je znázorněna absorbance při vlnové délce 280 nm, růžově absorbance při vlnové délce 488 nm.

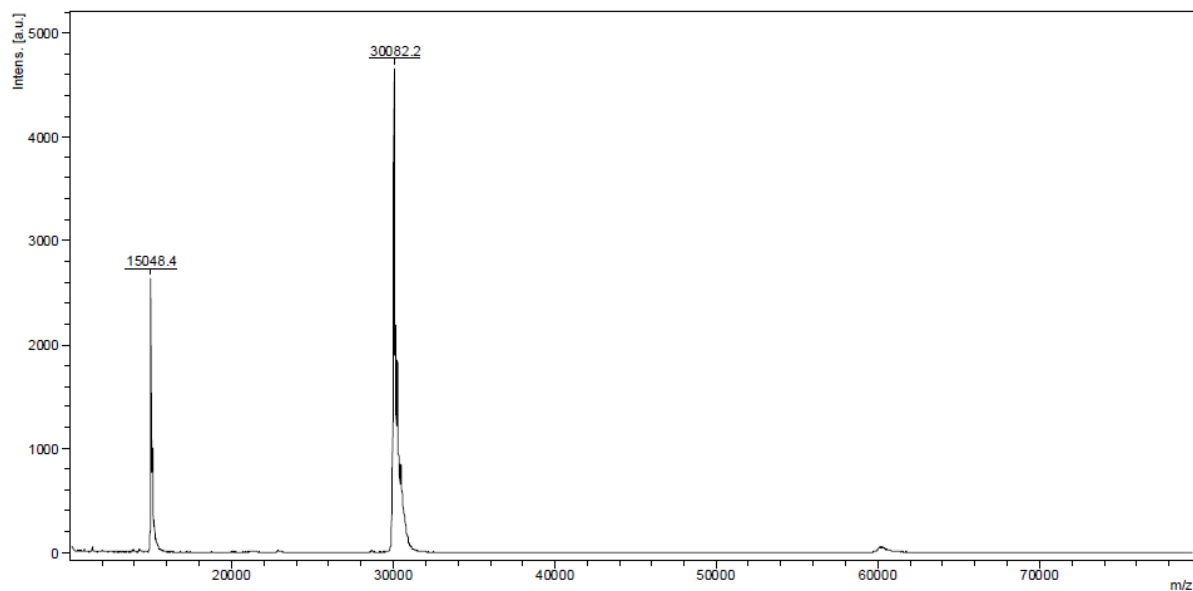


Obr. 12: 15% polyakrylamidový gel barvený CBB G250 z SDS-PAGE vybraných frakcí gelové permeační chromatografie proteinu GFP-TBC1D22B. (S) Standard, (P) GFP-TBC1D22B po štěpení TEV proteasou aplikovaný na kolonu při gelové permeační chromatografii, (1)-(7) jednotlivé frakce z gelové permeační chromatografie. Černou je označen protein GFP-TBC1D22B. Červenou šipkou je označen odštěpený protein GB1 s hexahistidinovou kotvou.

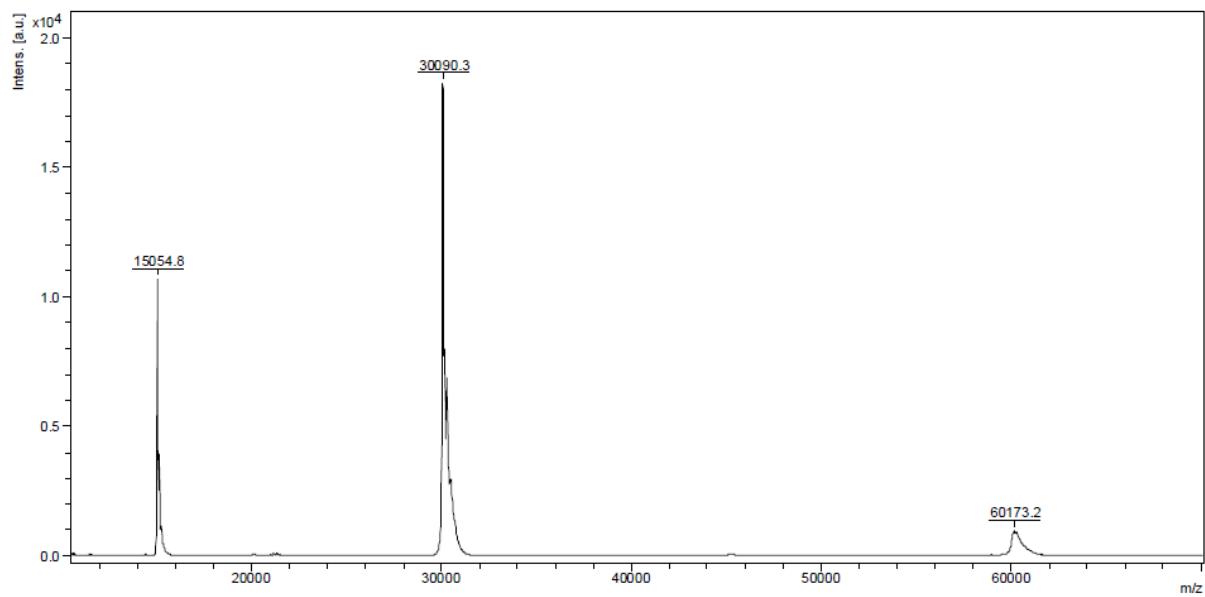
Proužky na Obr. 10 (strana 57) a Obr. 12 označené černou šipkou odpovídají velikosti mezi 25kDa a 35 kDa, tedy proteinům GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B. Proužky označené červenou šipkou odpovídají vzhledem velikosti zhruba 15 kDa, tedy proteinu složeného z proteinu GB1 a hexahistidinové kotvy. Frakce obsahující pouze námi požadované proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B byly jednotlivě smíchány, koncentrovány na koncentraci 10 mg/ml a odeslány na analýzu molekulové hmotnosti do servisní laboratoře doc. RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D. Zde byla provedena hmotností spektrometrie metodou MALDI-TOF.

Hmotnostní spektra obou vzorků jsou na Obr. 13 (strana 59). Vyplývá z nich, že připravené proteinové vzorky s GFP-TBC1D22A i GFP-TBC1D22B obsahují pouze tyto proteiny. Očekávaná velikost obou proteinů byla zhruba 30,1 kDa a odpovídá jí nejvyšší vrchol. Druhý nejvyšší vrchol má velikost zhruba 15 kDa, což je molekulová hmotnost odpovídající stejným proteinům, avšak s dvojnásobným nábojem. V obou proteinech jsou přítomné aminokyselinové zbytky cysteinu, což může vést ke spojování a vzniku multimerů. Nejnižší vrchol o velikosti zhruba 60 kDa tedy odpovídá dimerům daných proteinů.

(A)



(B)



Obr. 13: Hmotnostní spektra purifikovaných proteinů. (A) GFP-TBC1D22A, (B) GFP-TBC1D22B.

5.2. Příprava fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

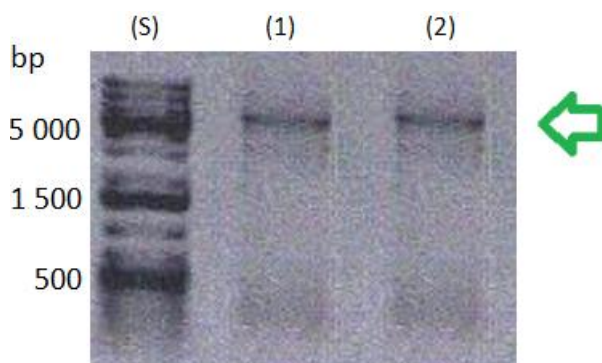
5.2.1. Příprava vektorů pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

Metodou klonování bez použití restrikčních endonukleas byla DNA pro ACBD3(Q) překlonována z plazmidu pHis2 do plazmidu pSUMO tak, aby plazmid pSUMO obsahoval ACBD3(Q) kratší o posledních 8 aminokyselin, tedy o oblast, která se nijak neúčastní vazby PI4KB ani vazby TBC1D22A či TBC1D22B. Původní vektor methylovaný bakteriemi byl rozštěpen pomocí DpnI. Takto připravená DNA byla využita jako vektor pro cílenou mutagenезi „in phusion“, při které byla do tohoto vektoru vložena DNA pro peptid TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112), respektive TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108). Při mutagenезi byla také vložena DNA pro aminokyselinovou sekvenci glycin-threonin-glycin tvořící spojku mezi ACBD3(Q) a TBC1D22A, respektive TBC1D22B, tak, aby byly tyto molekuly v prostoru vedle sebe. Vektory obsahovaly na 5' konci DNA sekvenci kódující hexahistidinovou kotvu. Směrem k 3' konci pak DNA kódující protein SMT3 (jedná se o kvasinkový homolog SUMO-1 proteinu, jehož trojrozměrnou strukturu rozeznává SUMO proteasa Ulp1 využívaná pro odštěpení hexahistidinové-SMT3 kotvy), ACBD3(Q), GTG můstek a peptidy TBC1D22A nebo TBC1D22B. Schéma tohoto vektoru je znázorněno na Obr. 14.



Obr. 14: Schéma vektoru obsahující DNA pro přípravu fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B. His – hexahistidinová kotva, SMT3 – kvasinkový homolog proteinu SUMO-1, ACBD3(Q) – Q doména ACBD3 proteinu, GTG – můstek glycin-threonin-glycin, TBC1D22A/B – GA rezidentní peptidy TBC1D22A (aminokyseliny 89 až 112) a TBC1D22B (aminokyseliny 85 až 108). DNA kóduje protein čítající 192 aminokyselin. Protein ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B čítají 83 aminokyselin (aminokyseliny 109 až 192 tohoto vektoru).

Výsledné produkty byly přečištěny komerční sadou a analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu. Elektroforeogram je znázorněn na Obr. 15 a jsou na něm patrné proužky o velikosti zhruba 6 000 párů bazí. Ty odpovídají velikostem připravovaných plazmidů, které mají v obou případech 6 015 párů bazí.

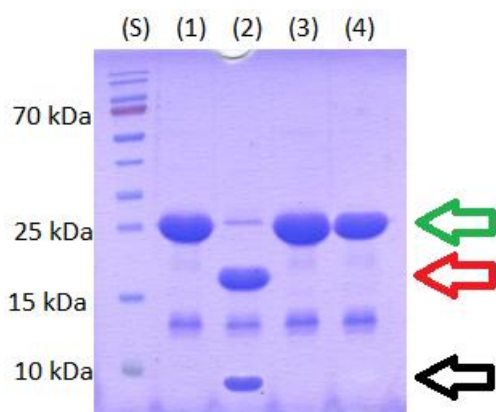


Obr. 15: 1% agarózový gel znázorňující úspěšnost přípravy vektorů pro fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A ACBD3(Q)-TBC1D22B. Proužky odpovídající těmto proteinům jsou znázorněny zelenou šipkou. (S) Standard, (1) ACBD3(Q)-TBC1D22A (2) (ACBD3(Q)-TBC1D22B

Výsledné produkty byly ligovány, přečištěny a transformovány do bakterií *E.coli* DH5 α . Plazmidová DNA byla v bakteriích amplifikována, izolována a posléze sekvenována.

5.2.2. Expresse a purifikace fúzních proteinů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B

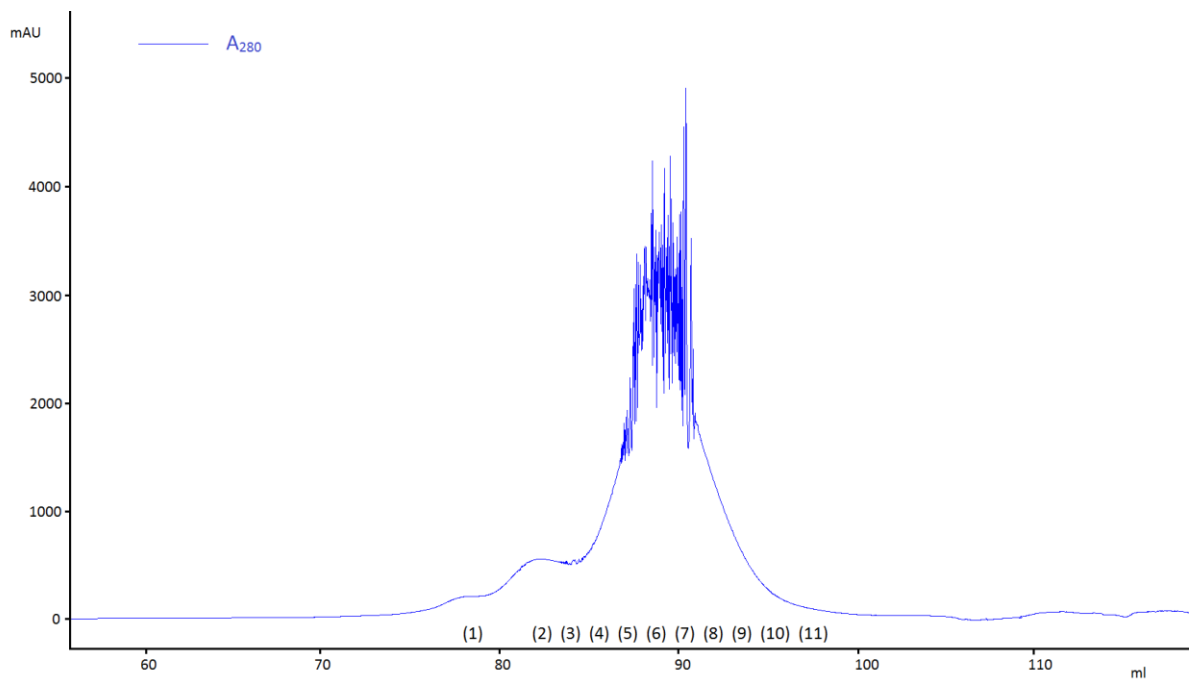
Proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B kódované v připravených plazmidech byly exprimovány ve 12 l autoindukčního media v bakteriálních buňkách *E. coli* BL21 Star. Vzniklá masa byla odstředěna, resuspendována, homogenizována a lyzována. Proteiny byly exprimovány společně s proteinem SMT3 a hexahistidinovou kotvou (pro purifikaci afinitní chromatografií). SMT3 s hexahistidinovou kotvou byly odštěpeny SUMO proteasou Ulp1 a úspěšnost odštěpení analyzována pomocí SDS-PAGE. Elektroforeogram je znázorněn na Obr. 16 (strana 62).



Obr. 16: 15% polyakrylamidový gel barvený CBB G250 z SDS-PAGE při kontrole štěpení SUMO proteasou. (S) Standard, (1) ACBD3(Q)-TBC1D22A před štěpením Ulp1 proteasou (2) ACBD3(Q)-TBC1D22A po štěpení Ulp1 proteasou (3) ACBD3(Q)-TBC1D22B před štěpením Ulp1 proteasou (4) ACBD3(Q)-TBC1D22B po štěpení Ulp1 proteasou. Černou šipkou je označen protein ACBD3(Q)-TBC1D22A. Červenou šipkou je označen odštěpený protein SMT3 s hexahistidinovou kotvou. Zelenou šipkou jsou označeny neštěpené proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B obsahující SMT3 protein a hexahistidinovou kotvu.

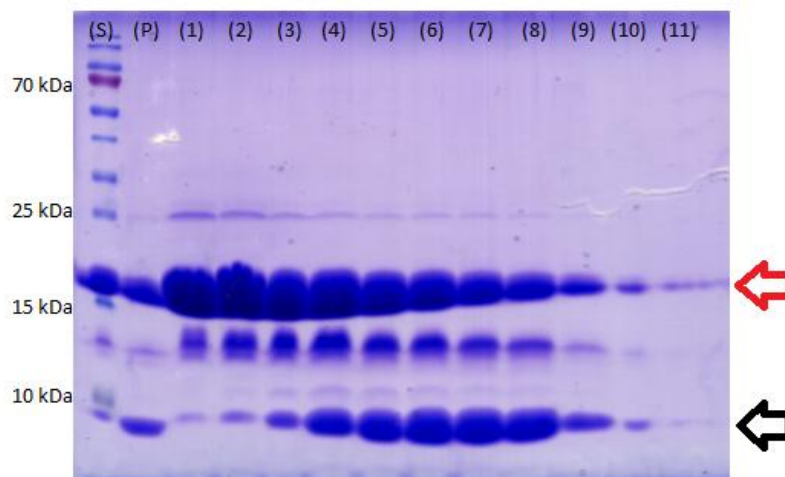
Z elektroforeogramu na Obr. 16 je patrné, že štěpení bylo úspěšné pouze v případě proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A. Štěpení vzorku s proteinem ACBD3(Q)-TBC1D22B bylo vyzkoušeno třikrát, pokaždé neúspěšně. Dále byl tedy purifikován pouze fúzní protein ACBD3(Q)-TBC1D22A.

Dalším purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, při které byly proteiny ze vzorku s ACBD3(Q)-TBC1D22A rozděleny dle velikosti. Chromatogram tohoto vzorku je znázorněn na Obr. 17 (strana 63). Eluované proteiny byly analyzovány měřením absorbance při vlnové délce 280 nm, při které absorbují proteiny. Na elučním profilu je patrný vrchol odpovídající fúznímu proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A. Vrchol odpovídající hexahistidinové kotvě a SMT3 proteinu, který se od původního proteinu odštěpil pomocí SUMO proteasy na elučním profilu patrný není, protože neobsahuje aminokyseliny absorbující při vlnové délce 280 nm.



Obr. 17: Závislost absorbance na elučním objemu proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A při gelové permeační chromatografii na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované pufrům pro gelovou permeační chromatografii. Vybrané frakce pro elektroforetickou analýzu jsou znázorněny čísly (1)-(11). Modře je znázorněna absorbance při vlnové délce 280 nm.

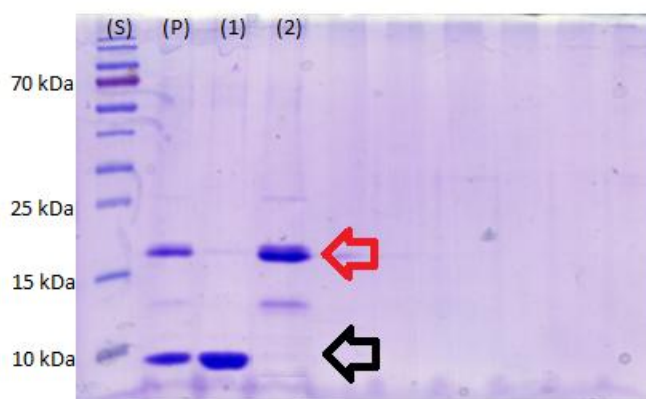
Pro potvrzení přítomnosti ACBD3(Q)-TBC1D22A byly vybrané frakce analyzovány pomocí SDS-PAGE. Elektroforeogram je znázorněn na Obr. 18 (strana 64). Je z něj patrné, že nedošlo zcela úspěšně k rozdělení proteinů podle velikosti. Je to způsobené tím, že velikosti proteinů jsou podobné. SMT3 spojený s hexahistidinovou kotvou je velký zhruba 12,6 kDa, ACBD3(Q)-TBC1D22A je velký zhruba 9,8 kDa. Dále můžeme vidět bakteriální proteiny, které se navázaly při afinitní chromatografii.



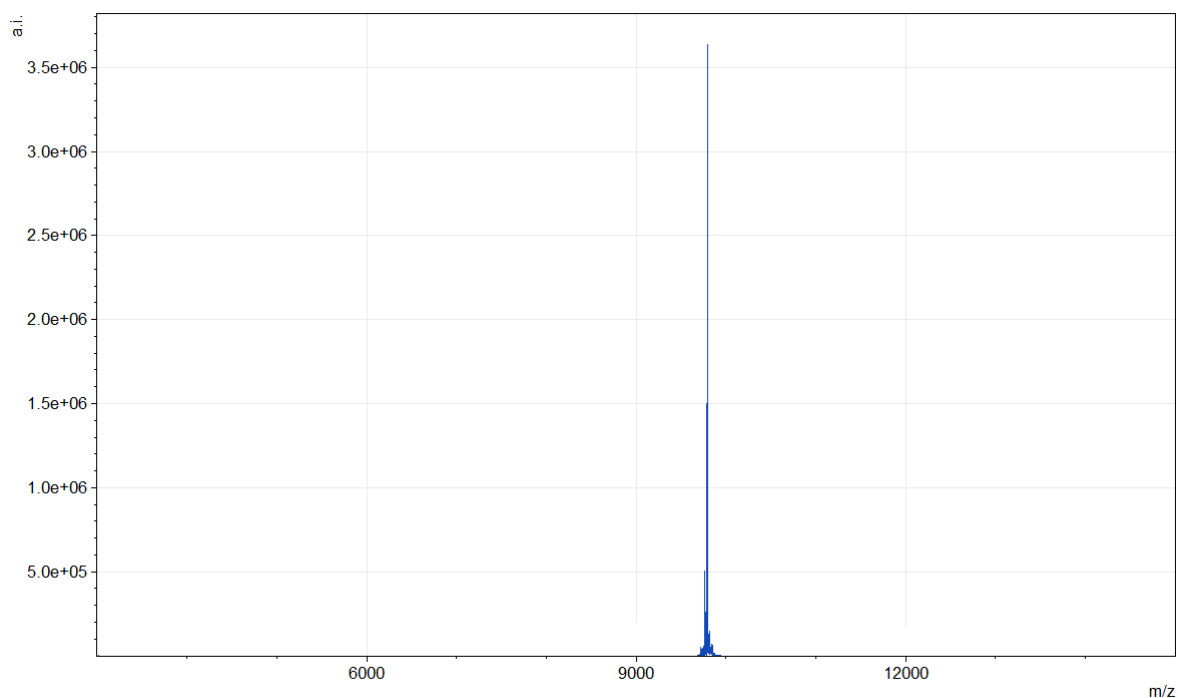
Obr. 18: 15% polyakrylamidový gel barvený CBB G250 z SDS-PAGE vybraných frakcí gelové permeační chromatografie proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A. (S) Standard, (P) ACBD3(Q)-TBC1D22A po štěpení SUMO proteasou aplikovaný na kolonu při gelové permeační chromatografii, (1)-(6) – jednotlivé frakce z gelové permeační chromatografie. Černou je označen protein ACBD3(Q)-TBC1D22A. Červenou šipkou je označen odštěpený protein SMT3 s hexahistidinovou kotvou.

Vzhledem k nedostatečnému rozdělení proteinů podle velikosti byla jako další purifikační krok využita reverzní afinitní chromatografie na vázaných nikelnatých kationtech. Všechny frakce z gelové permeační chromatografie vykazující absorbanční při vlnové délce 280 nm byly spojeny a inkubovány s NTA-Agarosou s vázanými nikelnatými ionty. Po aplikaci vzorku na kolonu byl jímán eluát. Navázané proteiny na nosič byly uvolněny elučním pufrem. První eluát i uvolněné proteiny z nosiče byly analyzovány na SDS-PAGE. Elektroforeogram je prezentován na Obr. 19 (strana 65). V eluovaném vzorku je patrný proužek odpovídající ACBD3(Q)-TBC1D22A. Ve vzorku s uvolněnými proteiny z nosiče jsou patrné proužky odpovídající SMT3 proteinu s hexahistidinovou kotvou i navázané bakteriální proteiny.

Molekulová hmotnost ACBD3(Q)-TBC1D22A byla následně ověřena hmotnostní spektrometrií v laboratoři doc. RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D metodou MALDI-TOF. Na hmotnostním spektru na Obr. 20 (strana 65) je patrný vrchol odpovídající molekulové hmotnosti zhruba 9,8 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti ACBD3(Q)-TBC1D22A. Získali jsme tedy čistý proteinový vzorek.



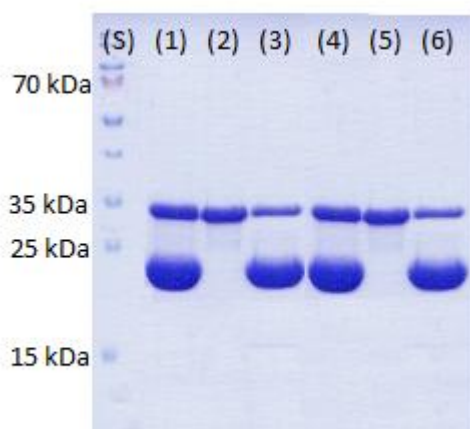
Obr. 19: 15% polyakrylamidový gel z SDS-PAGE při analýze úspěšnosti reverzní afinitní chromatografie. (S) Standard, (P) Proteinový vzorek spojením frakcí z gelové permeační chromatografie, (1) ACBD3(Q)-TBC1D22A nezachycený na nosič při reverzní afinitní chromatografii, (2) Protein SMT3 s hexahistidinovou kotvou a nečistoty zachycené na nosič při reverzní afinitní chromatografii. Černou šipkou je znázorněn protein ACBD3(Q)-TBC1D22A. Červenou šipkou protein SMT3 s hexahistidinovou kotvou.



Obr. 20: Hmotnostní spektrum purifikovaného proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A.

5.3. Metoda „pull down“

K ověření interakce ACBD3(Q) s peptidy z proteinů TBC1D22A a TBC2D22B byla využita metoda „pull down“. Byly použity připravené proteiny GFP-TBC1D22A, GFP-TBC1D22B a Q doména ACBD3 proteinu s hexahistidinovou kotvou, která již byla v laboratoři připravena. Reakční vzorky obsahovaly vždy ACBD3(Q) s hexahistidinovou kotvou a GFP-TBC1D22A nebo GFP-TBC1D22B v pufru „pull down“. Pro vyloučení nespecifické vazby GFP-TBC1D22A, respektive GFP-TBC1D22B, na nosič byla využita negativní kontrola, u které vzorky neobsahovaly ACBD3(Q) s hexahistidinovou kotvou. Výsledky byly analyzovány na SDS-PAGE. Z elektroforeogramu na Obr.21 je patrné, že se GFP-TBC1D22A i GFP-TBC1D22B váže na ACBD3(Q) a podle negativní kontroly nedochází k jejich vazbě na nosič.



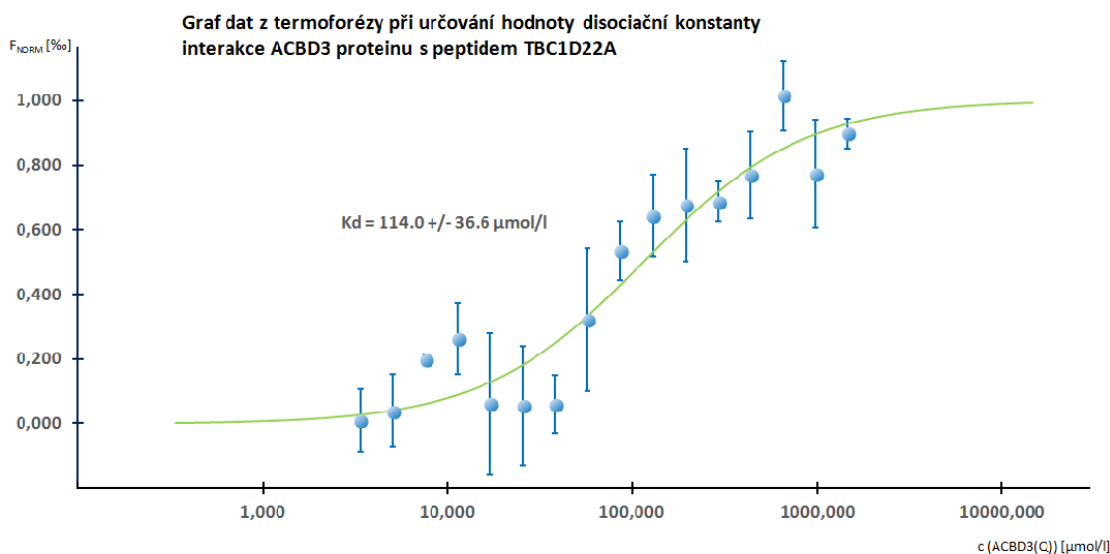
Obr. 21: 15% polyakrylamidový gel z SDS-PAGE při metodě „pull down“. (S) Standard, (1) Vzorek proteinů ACBD(Q)-His a GFP-TBC1D22A, (2) Eluce negativní kontroly obsahující pouze GFP-TBC1D22A, (3) Eluce ACBD3(Q) a GFP-TBC1D22A, (4) Vzorek proteinů ACBD(Q)-His a GFP-TBC1D22B, (5) Eluce negativní kontroly obsahující pouze GFP-TBC1D22B, (6) Eluce ACBD3(Q) a GFP-TBC1D22B.

5.4. Termoforéza

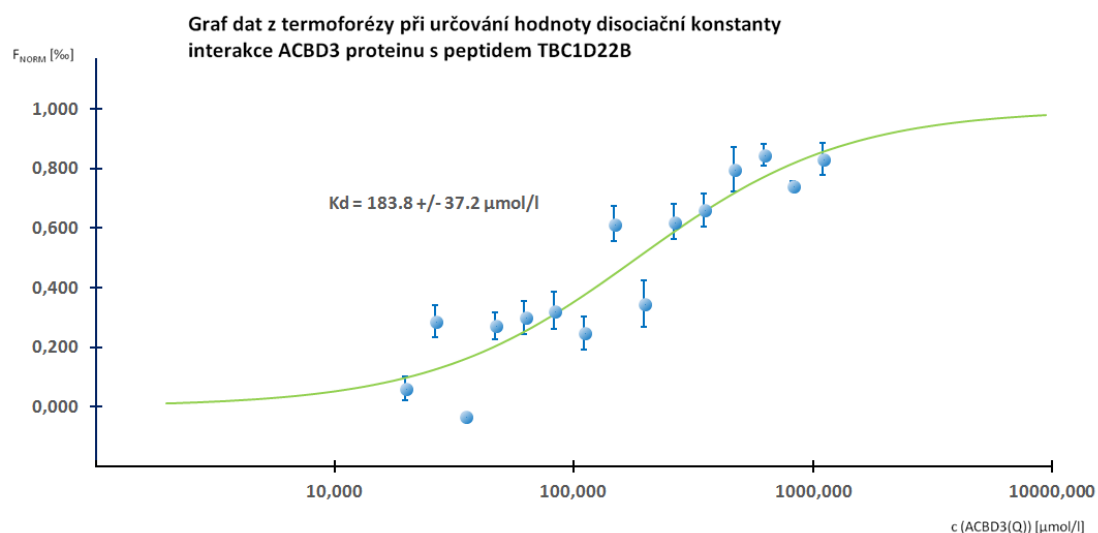
Ke zjištění disociační konstanty interakce ABCD3 s TBC1D22A a TBC1D22B byla využita termoforéza. Byly použity připravené peptidy TBC1D22A a TBC1D22B označené proteinem GFP a ACBD3(Q), která byla již v laboratoři připravena.

Oba pokusy byly provedeny třikrát v tetraplikátech a výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí průměru a směrodatné odchylky. Disociační konstanta interakce ACBD3(Q)-TBC1D22A je rovna $114,0 \pm 36,6 \mu\text{mol/l}$. Disociační konstanta interakce ACBD3(Q)-TBC1D22B je $183,8 \pm 37,2 \mu\text{mol/l}$. Grafy získaných výsledků jsou znázorněny v grafech na Obr. 22 (strana 68). Z výsledků je patrné, že se v obou případech jedná o slabou interakci.

(A)



(B)



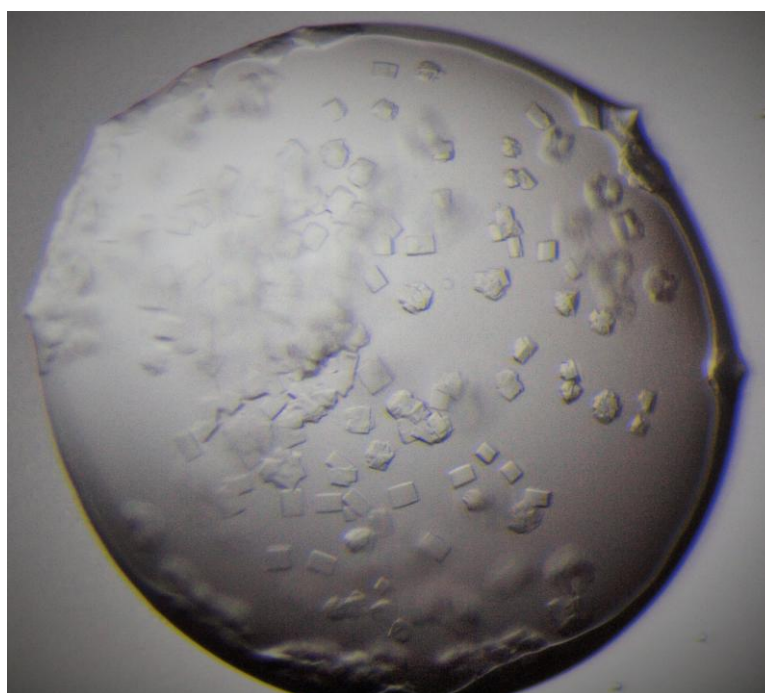
Obr. 22: Graf dat z termoforézy při určování disociační konstanty interakce ACBD3 proteinu s (A) peptidem TBC1D22A a (B) peptidem TBC1D22B. Na ose x je vynesena koncentrace ACBD3(Q). Na ose y je normalizovaná fluorescence (ta je vypočtená z hodnot frakce označených molekul TBC1D22A, respektive TBC1D22B navázaných na ligand ACBD3, normalizované fluorescence nenavázaných označených molekul a normalizované fluorescence komplexu ACBD3(Q)-TBC1D22A, respektive ACBD3(Q)-TBC1D22B).

5.5. Krystalizace fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A a její optimalizace

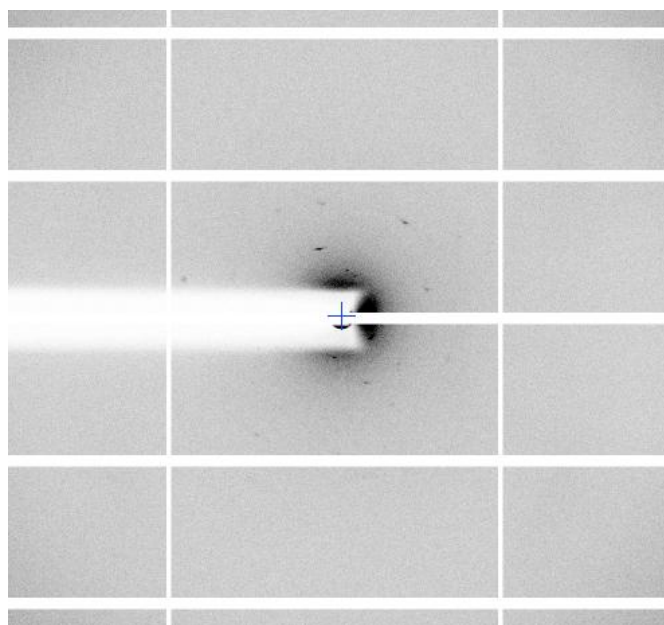
Krystalizace fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A probíhala v uspořádání sedící kapky metodou difúze par. Při pokusech o krystalizaci byly využity krystalografické sady zmíněně v kapitole 4.5. na straně 51. Ze všech vyzkoušených možností protein krystalizoval pouze při podmínce obsahující 20% Sokalan CP 45 a mravenčan sodný o koncentraci 0,1 mol/l a při podmínce obsahující 30% polyethylenglykol 6 000 a Bicin s pH 9 o koncentraci 0,1 mol/l. V obou případech byly krystaly malé a deformované a pro vznik větších symetrických krystalů jsme se tyto podmínky pokusili optimalizovat.

Při optimalizaci první zmíněné podmínky byly vyzkoušeny všechny kombinace 8% až 32% (po 2 %) Sokalanu CP45 s mravenčanem sodným o koncentraci 0,02 mol/l až 0,24 mol/l (po 0,02 mol/l). Dále byl vyzkoušen vliv NaCl v pufru, ve kterém byl protein rozpuštěn ACBD3(Q)-TBC1D22A. Pokus byl proveden v pufrch s Tris pH 8 o koncentraci 20 mmol/l, β -merkaptoethanol o koncentraci 3 mmol/l a NaCl s koncentracemi 50 mmol/l, 100 mmol/l, 150 mmol/l a 200 mmol/l. Ke krystalizaci docházelo pouze v pufrch s koncentrací NaCl 100 mmol/l a 200 mmol/l. Ve většině případů buď nedocházelo ke krystalizaci vůbec, popřípadě byly krystaly velmi deformované. Malé, ale symetrické krystaly vznikly při krystalizační podmínce obsahující 22% Sokalan CP45 a mravenčan sodný o koncentraci 0,02 mol/l s proteinem v pufru obsahujícím Tris pH 8 o koncentraci 20 mmol/l, β -merkaptoethanol o koncentraci 3 mmol/l a NaCl o koncentraci 100 mmol/l. Tyto symetrické krystaly získaly svoji finální podobu po 10 dnech krystalizace při 4°C a jejich fotka je uvedena na Obr. 23 (strana 70). Následně byl proveden difrakční experiment na synchrotronu BESSY II v Berlíně RNDr. Martinem Klímou, Ph.D a RNDr. Janem Šilhánem, Ph.D. Vzorek difraktoval k rozlišení zhruba 11 Å a difrakční obrazec je znázorněn na Obr.24 (strana 70).

V druhém případě byly vyzkoušeny podmínky obsahující všechny kombinace 5% až 40% (po 5%) polyethylenglykolu 6 000 s Bicinem s pH 9 o koncentraci 0,02 mol/l až 0,20 mol/l (po 0,02 mol/l). V tomto případě byly vzniklé krystaly vždy malé a deformované.



Obr. 23: Krystaly fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A vzniklý při podmínce obsahující 22% Sokalan CP 45 a mravenčan sodný o koncentraci 0,02 mol/l.



Obr. 24: Difrakční obraz krystalu fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A vzniklý při podmínce obsahující 22% Sokalan CP 45 a mravenčan sodný o koncentraci 0,02 mol/l. Rozlišení ~ 11 Å. Měřeno na synchrotronu BESSY II v Berlíně.

6. Diskuse

V přehledu literatury bylo uvedeno, že některé viry z čeledi *Picornaviridae* svými molekulami ovlivňují buněčné pochody hostitelského organismu k tvorbě replikačních organel, tedy oblastí nezbytných k virové reprodukci. Jedním z těchto buněčných pochodů je zvýšení produkce PI4P na membráně pomocí fosfatidylinositol 4-kinas [23]. Aichi virus, poliovirus, cosackie virus B3 nebo například enterovirus 71 dokážou prostřednictvím jejich nestrukturního proteinu 3A vázat protein ACBD3 do membrán replikačních organel [32]. Na ACBD3 se poté váže PI4KB, která zde tvoří PI4P, čímž se vytváří prostředí s negativním nábojem vhodné pro vazbu RNA-dependenční RNA polymerasy 3D^{POL} a replikaci virové RNA ve virových replikačních organelách. Molekuly podílející se na životním cyklu viru se tak koncentrují na jednom místě [32,34].

Pomocí bioinformatických metod byly nalezeny dva peptidy z GA, TBC1D22A a TBC1D22B, které se váží na stejné místo ACBD3 jako PI4KB, čímž dochází k omezení vazby PI4KB na membránu, a tím k inhibici tvorby PI4P v replikačních organelách. Peptidy TBC1D22A a TBC1D22B jsou tak potenciálními inhibitory PI4KB a replikace některých picornavirů [31]. Nebyla však doposud zjištěna síla této interakce ani vyřešen strukturní podklad interakcí ACBD3 a těmito peptidy. Pochopení těchto interakcí na atomární úrovni by mohlo vést k vývoji nových inhibitorů PI4KB.

Cílem diplomové práce bylo ověřit interakci ACBD3(Q) s peptidy odvozenými od proteinů TBC1D22A a TBC1D22B a zjistit sílu této interakce. Dále pak připravit krystaly proteinových komplexů ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B potřebné k vyřešení trojrozměrných struktur těchto komplexů, které by mohly být podkladem pro přípravu nových inhibitorů interakce PI4KB s ACBD3 proteinem.

V dříve publikované práci bylo zjištěno, že na interakci mezi ACBD3(Q) a PI4KB nemají vliv ostatní domény ACBD3 proteinu (GOLD doména, CAR doména ani ACBD doména). Z tohoto důvodu jsme v našich experimentech používali pouze ACBD3(Q). Dále bylo zjištěno, že tato interakce je velmi silná s disociační konstantou 0,32 +/- 0,13 $\mu\text{mol/l}$ [12].

V této práci byla studována disociační konstanta interakce ACBD3(Q) s peptidy TBC1D22A a TBC1D22B. V případě interakce ACBD3(Q)-TBC1D22A byla zjištěna disociační konstanta 114,00 +/- 36,60 $\mu\text{mol/l}$, v případě interakce ACBD3(Q)-TBC1D22B byla zjištěna disociační konstanta 183,80 +/- 37,20 $\mu\text{mol/l}$. Z výsledků je patrné, že tyto interakce jsou řádově mnohem slabší než interakce ACBD3(Q)-PI4KB potřebná k fosforylaci PI na membráně.

Dříve byla struktura samostatné ACBD3(Q) a komplexu s N-terminálním helixem PI4KB vyřešena metodou nukleární magnetické rezonance, protože nebyly známe přesné hranice Q domén [12]. Zde byl konstrukt Q domény upraven, aby obsahoval pouze uspořádané aminokyselinové zbytky.

V této práci jsme se pokusili připravit fúzní proteiny ACBD3(Q)-TBC1D22A a ACBD3(Q)-TBC1D22B pro následné řešení trojrozměrné struktury těchto komplexů. Jednotlivé komponenty byly spojeny můstkem z glycinu, threoninu a glycinu, který umožňuje jejich prostorové umístění blízko sebe. Takto se podařilo připravit pouze protein ACBD3(Q)-TBC1D22A. V případě ACBD3(Q)-TBC1D22B bylo neúspěšné štěpení SUMO proteasou Ulp1, která rozpoznává trojrozměrnou strukturu SUMO proteinu, v našem případě SMT3 proteinu - kvasinkového homologu proteinu SUMO-1. Pravděpodobně došlo ke sterickému zabránění přístupu SUMO proteasy.

Pokusili jsme se připravit krystaly proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A k následnému vyřešení trojrozměrné struktury. I po optimalizaci hranic Q domény byla krystalizace problematická (připravené krystaly jsou znázorněny na Obr.23 na straně 70), ale ty nejlepší z nich však difraktovaly pouze do rozlišení 11 Å (difrakční obrazec je znázorněn na Obr.24 na straně 70), které neumožňuje řešení trojrozměrné struktury.

Cílem další práce na tomto projektu bude optimalizace krystalizace, popřípadě vyřešení struktury pomocí nukleární magnetické rezonance, abychom porozuměli interakci ACBD3 proteinu s proteiny TBC1D22A a TBC1D22B na atomární úrovni.

7. Závěr

- Metodami genového klonování byly připraveny plazmidy kódující fúzní proteiny GFP-TBC1D22A(aminokyseliny 89-112), GFP-TBC1D22B(aminokyseliny 85-108), ACBD3(Q)-TBC1D22A(aminokyseliny 89-112) a ACBD3(Q)-TBC1D22B(aminokyseliny 85-108).
- Bakteriální expresí byly připraveny fúzní proteiny GFP-TBC1D22A, GFP-TBC1D22B a ACBD3(Q)-TBC1D22A. Z fúzního proteinu His-SMT3-ACBD3(Q)-TBC1D22B se nepodařilo odštěpit His-SMT3 pomocí Ulp1 proteasy.
- Proteiny GFP-TBC1D22A a GFP-TBC1D22B byly purifikovány afinitní chromatografií na vázaných nikelnatých kationtech a gelovou permeační chromatografií. Protein ACBD3(Q)-TBC1D22A byl purifikován afinitní chromatografií na vázaných nikelnatých kationtech, gelovou permeační chromatografií a reverzní afinitní chromatografií na vázaných nikelnatých kationtech.
- Metodou „pull down“ byly úspěšně ověřeny interakce proteinu ACBD3(Q) s peptidy odvozenými od TBC1D22A a TBC1D22B proteinů.
- Pomocí termoforézy byla změřena disociační konstanta interakcí proteinu ACBD3(Q) s TBC1D22A a TBC1D22B. V případě interakce ACBD3(Q) s TBC1D22A byla zjištěna disociační konstanta $114 \pm 36,6 \mu\text{mol/l}$, v případě interakce ACBD3(Q) s TBC1D22B pak $183,8 \pm 37,2 \mu\text{mol/l}$. Zjistili jsme, že se jedná o slabé interakce, řádově slabší než interakce ACBD3(Q) s PI4KB.
- Podařilo se připravit malé symetrické krystaly fúzního proteinu ACBD3(Q)-TBC1D22A, které však difraktovaly jen do rozlišení 11 \AA .

8. Použitá literatura

- [1] Balla, A., Balla, T.: Trends. Cell. Biol, 16, 351-361 (2006)
- [2] Boura, E., Nencka, R.: Exp. Cell. Res., 337, 136-145 (2015)
- [3] Wonk, K., Cantley L.C.: J. Biol. Chem., 272, 13236-13241
- [4] Sridhar, S., Patel, B., Aphkhasava, D., Macian, F., Santambrogio, L., Shields, D., Cuervo, A.M.: EMBO. J., 32, 324-339 (2013)
- [5] Burke, J.E., Inglis, A.J., Perisic, O., Masson, G.R., McLaughlin, S.H., Rutagarina, F., Shokat, K.M., Williams, R.L.: Science., 344, 1035-1038 (2014)
- [6] de Graaf, P., Zwart, W.T., van Dijken, R.A., Deneka, M., Schulz, T.K., Geijssen, N., Coffey, P.J., Gadella, B.M., Verkleij, A.J., van der Sluijs, P., van Bergen en Henegouwen, P.M.: Mol. Biol. Cell., 15, 2038-2047 (2004)
- [7] Minogue, S., Waugh, M.G.: Subcell. Biochem., 58, 1-24 (2012)
- [8] Belov, G.A., Fogg, M.H., Ehrenfeld, E.: J. Virol., 79, 7207-7216 (2005)
- [9] Belov, G.A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., Lippincott-Schwartz, J., Ehrenfeld, E.: J. Virol., 81, 558-567 (2007)
- [10] Sasaki, J., Ishikawa, K., Arita, M., Taniguchi, K.: EMBO. J., 31, 754-766 (2012)
- [11] Greninger, A.L.: Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 129, 189-212 (2015)
- [12] Klima, M., Tóth, D.J., Hexnerova, R., Baumlova, A., Chalupska, D., Tykvart, J., Rezabkova, L., Sengupta, N., Man, P., Dubankova, A., Humpolickova, J., Nencka, R., Veverka, V., Balla, T., Boura, E.: Sci. Rep., 6, 23641 (2016)
- [13] Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O., Pfizenmaier, K.: J. Cell. Sci., 119, 3613-3621 (2006)
- [14] Hausser, A., Storz, P., Märten, S., Link, G., Toker, A., Pfizenmaier, K.: Nat. Cell. Biol., 7, 880-886 (2005)

- [15] Fan, J., Liu, J., Culty, M., Papadopoulos, V.: *Prog. Lipid. Res.*, 49, 218-234 (2010)
- [16] Sohda, M., Misumi, Y., Yamamoto, A., Yano, A., Nakamura, N., Ikehara, Y.: *J. Biol. Chem.*, 276, 45298-45306 (2001)
- [17] Cheah, J.H., Kim, S.F., Hester, L.D., Clancy, K.W., Petterson S.E., Papadopoulos, V, Snyder, S.H.: *Neuron.*, 51, 431-440 (2006)
- [18] Fang, M., Jaffrey, S.R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X., Snyder, S.H.: *Neuron.*, 28, 183-193 (2000)
- [19] Zhou, Y., Atkins, J.B., Rompani, S.B., Bancescu, D.L., Petersen, P.H., Tang, H., Zou, K., Stewart, S.B., Zhong, W.: *Cell.*, 129, 163-178 (2007)
- [20] Sbodio, J.I., Hicks, S.W., Simon, D., Machamer, C.E.: *J. Biol. Chem.*, 281, 27924-27931 (2006)
- [21] Miller, W.L.: *Mol. Cell. Endokrinol.*, 379, 62-73 (2013)
- [22] Sbodio, J.I., Paul, B.D., Machamer, C.E., Snyder, S.H.: *Cell. Rep.*, 4, 890-897 (2013)
- [23] Zell, R.: *Arch. Virol.* 163, 299-317 (2018)
- [24] De Jesus, N.H.: *Virol. J.*, 4, 70 (2007)
- [25] Ambros, V., Baltimore, D.: *J. Biol. Chem.* 253, 5263-5266 (1978)
- [26] Dorsch-Haesler, K., Yogo, Y., Wimmer, E.: *J. Virol.*, 16, 1512-1517 (1975)
- [27] Jan, E., Mohr, I., Walsh, D.: *Annu. Rev. Virol.*, 3, 283-307 (2016)
- [28] Rossmann, M.G., Johnson, J.E.: *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 533-573 (1989)
- [29] Donnelly, M.L.L., Luke, G., Mehrota, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., Ryan, M.D.: *J. Gen. Virol.*, 82, 1013-1025 (2001)
- [30] Hughes, P.J., Stanway, G.: *J. Gen. Virol.*, 81, 201-207 (2000)
- [31] Greninger, A.L., Knudsen, G.M., Betegon, M., Burlingame A.L., Derisi, J.L.: *J. Virol.*, 86, 3605-3615 (2012)

- [32] Klima, M., Chalupska, D., Rozycki, B., Humpolickova, J., Rezabkova, L., Silhan, J., Baumlova, A., Dubankova, A., Boura, E.: *Structure.*, 25, 219-230 (2017)
- [33] McPhail, J.A., Ottosen, E.H., Jenkins, M.L., Burke, J.E.: *Structure.*, 25, 121-131 (2017)
- [34] Dubankova, A., Humpolickova, J., Klima, M., Boura, E.: *Sci. Rep.*, 7, 17309 (2017)
- [35] Harak, C., Lohmann, V.: *Virology.*, 479-480, 418-433 (2015)
- [36] Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt F.H., Fischer, E.R., Ehrenfeld, E.: *J. Virol.*, 86, 302-312 (2012)
- [37] Limpens, R.W., van der Schaar, H.M., Kumar, D., Koster, A.J., Snijder, E.J., van Kuppeveld, F.J., Barcena, M.: *MBio.*, 2, e00166-11 (2011)
- [38] Qing, J., Wang, Y., Sun, Y., Huang, J. Yan, W., Wang, J., Su, D., Ni, C., Li, J., Rao, Z., Liu, L., Lou, Z.: *PLoS. Pathog.*, 10, e1004422 (2014)
- [39] Wang, J., Wu, Z., Jin, Q.: *PLoS. One.*, 7, e38035 (2012)
- [40] Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., Anderson, D.A.: *J. Virol.*, 76, 11113-11122 (2002)
- [41] Taylor, M.P., Kirkegaard, K.: *J. Virol.*, 81, 12543-12553 (2007)
- [42] Nchoutmboube, J.A., Viktorova, E.G., Scott, A.J., Ford, L.A., Pei, Z., Watkins, P.A., Ernst, R.K., Belov, G.A.: *PLoS. Pathog.*, 9, e1003401 (2013)
- [43] Ishikawa-Sasaki, K., Nagashima, S., Taniguchi, K., Sasaki, J.: *J. Virol.*, 92, e01952-17 (2018)
- [44] Carter, J., Saunders, V.: *Virology: Principles and Applications*, Wiley, Chichester (2013)
- [45] Beneš, J.: *Infekční lékařství*, Galén, Praha (2009)
- [46] Qiagen, QIAquick PCR Purification Kit,
<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=3987caa6-ef28-4abd-927e-d5759d986658&lang=en>, 18.4.2018

[47] Qiagen, QIAprep Spin Miniprep kit,

<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=22df6325-9579-4aa0-819c-788f73d81a09&lang=en>, 18.4.2018

[48] Nano Temper Technologies, Monolith NT.115,

http://www.helsinki.fi/biosciences/corefacilities/microscalethermophoresis/StartingGuide_NT115.pdf, 25.4.2018

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Tab. 15 : Evidence vypůjčovatelů

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka