

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie



Úvodní strukturní a funkční analýza proteinu LONRF3

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Martinková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. Petr Müller, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliographic identification

Jméno a příjmení autora	Veronika Martinková
Název práce	Úvodní strukturní a funkční analýza proteinu LONRF3
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO)
Vedoucí práce	MUDr. Petr Müller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Proteiny tepelného šoku Hsp70/Hsp90 (Heat-shock protein 70/90) jsou nepostradatelnou součástí buněčných systémů podílejících se na udržení proteinové homeostáze. Fyziologická funkce Hsp70/90 je podmíněna existencí proteinových komplexů těchto chaperonů s tzv. ko-chaperony. Jedním z motivů podílejících se na těchto protein-proteinových interakcích je tzv. TPR (tetratricopeptide repeat) doména. Tato práce se zabývá charakterizací potenciálního TPR ko-chaperonu – proteinu LONRF3. V teoretickém úvodu je popsána role molekulárních chaperonů a ko-chaperonů v systémech udržujících buněčnou proteinovou homeostázi a také dosavadní poznatky o proteinech LONRF. V experimentální části práce byla zkoumána struktura a funkce proteinu LONRF3 pomocí biochemických a molekulárně biologických metod včetně limitované proteolýzy, interakčních studií a qRT-PCR. Výsledky ukázaly, že je protein LONRF3 asociován s chaperony Hsp70 a Hsp90, byla zjištěna jeho subcelulární lokalizace a také jsme prokázali zvýšenou expresi genu <i>LONRF3</i> v buňkách linie MCF-7 ovlivněných inhibátorem proteazomu (bortezomib).</p>
Klíčová slova	Chaperon, ko-chaperon, Hsp70, Hsp90, LONRF3, TPR doména, SBP pull-down, qRT-PCR, HDX
Počet stran	84
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author's first name and surname	Veronika Martinková
Title of thesis	Initial structural and functional analysis of LONRF3 protein
Type of thesis	Master
Department	Regional Centre for Applied Molecular Oncology
Supervisor	MUDr. Petr Müller, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>Heat-shock proteins 70/90 are essential components of cellular systems involved in maintaining of protein homeostasis. The physiological function of Hsp70/90 is influenced by protein complexes of these chaperones with their co-chaperones. Protein-protein interactions are controlled by structural motifs, one of them is TPR (tetratricopeptide) domain. This thesis is focused on the characterization of the putative TPR co-chaperone LONRF3 protein. The role of molecular chaperones and co-chaperones in maintenance of protein homeostasis is described in the theoretical part. In the experimental part we evaluated the structure and function of LONRF3 using biochemical and molecular methods including limited proteolysis, interaction studies and qRT-PCR. Our results uncovered LONRF3 protein association with Hsp70/90 chaperones, its subcellular localisation and an increase of <i>LONRF3</i> gene expression in MCF-7 cells with inhibited proteasomal function.</p>
Keywords	Chaperone, co-chaperone, Hsp70, Hsp90, LONRF3, TPR domain, SBP pull-down, qRT-PCR, HDX
Number of pages	84
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
MUDr. Petra Müllera, Ph.D. s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne

Veronika Martinková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Petrovi Müllerovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a poskytnutí cenných rad. Tato práce by nevznikla, nebýt dvou mladých a bystrých vědců – Filipa a Michala, kteří mě zasvětili do tajů molekulárních chaperonů. Velké díky jim patří nejenom za množství předaných znalostí, ale především za jejich trpělivost při sepisování diplomové práce, protože to se mnou neměli lehké. Dále bych chtěla poděkovat celé pracovní skupině za velmi příjemnou pracovní atmosféru a zvláště pak Katce za poskytnutí precizního návodu na miniprep s osobními poznámkami.

Vřelé díky patří také Ing. Petře Dvořákové, Ph.D. za provedení analýzy HDX a také Mgr. Adamovi Krejčímu za výpočet průměrné deuterace aminokyselin.

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

Obsah

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	12
2 PROTEINOVÁ HOMEOSTÁZA - PROTEOSTÁZA.....	14
2.1 Heat-shock protein 70.....	14
2.1.1 Struktura Hsp70	15
2.1.2 ATPázový cyklus Hsp70.....	16
2.2 Heat-shock protein 90.....	17
2.2.1 Struktura a konformační stavy Hsp90.....	18
2.2.2 Chaperonový cyklus Hsp90	20
2.3 Ostatní třídy chaperonů	20
2.3.1 Malé heat-shock proteiny (sHsps).....	20
2.3.2 Chaperoniny	21
2.3.3 Hsp100	21
2.4 Ko-chaperony a TPR ko-chaperony Hsp70/Hsp90.....	22
2.4.1 Ko-chaperony ATPázového cyklu Hsp70.....	22
2.4.2 Ko-chaperony ATPázového cyklu Hsp90.....	23
2.4.3 TPR ko-chaperony	24
2.5 Ubikvitin-proteazomový systém (UPS).....	26
2.5.1 E3-ubikvitin ligázy.....	27
2.6 Autofagie.....	29
2.6.1 Chaperony řízená autofagie (CMA).....	29
2.6.2 Makroautofagie	30
2.6.3 Mikroautofagie.....	30
2.7 Klinický význam chaperonů Hsp70 a Hsp90	30
2.8 Proteiny LONRF.....	31
3 MATERIÁL A METODY.....	34
3.1 Materiál	34
3.1.1 Přístrojové vybavení	34
3.1.2 Chemikálie	34
3.1.3 Roztoky a pufry.....	34
3.1.4 Růstová média.....	35
3.1.5 Buněčné linie	36
3.1.6 Protilátky.....	36
3.2 Metody	37
3.2.1 Klonování lidských genů: LR reakce.....	37
3.2.2 Transformace bakterií	38
3.2.3 Produkce proteinů v <i>E. coli</i> a jejich purifikace	38
3.2.4 SDS-PAGE	40
3.2.5 Coomassie barvení	40
3.2.6 Přenos proteinů na membránu (westernový přenos) a imunodetekce.....	40
3.2.7 Kultivace, transfekce, sklizení a lyze eukaryotických buněk	41
3.2.8 Detekce protein-proteinových interakcí.....	42
3.2.9 Frakcionace buněk linie MCF-7	44
3.2.10 Měření koncentrace proteinů metodou Bradforda	44
3.2.11 Cílená mutagenese	45
3.2.12 Izolace plasmidové DNA pomocí kolon QIAGEN (miniprep).....	46
3.2.13 Izolace plasmidové DNA pomocí kolon QIAGEN (maxiprep).....	46

3.2.14	Izolace RNA.....	47
3.2.15	Syntéza cDNA	47
3.2.16	qRT-PCR	47
3.2.17	Limitovaná proteolýza	49
3.2.18	Vodík/deuteriová výměna s MS (HDX – Hydrogen/Deuterium Exchange).....	49
4	VÝSLEDKY	51
4.1	Strukturní analýza a vazebné vlastnosti proteinu LONRF3	51
4.1.1	Základní bioinformatická analýza.....	51
4.1.2	Produkce proteinu LONRF3 v bakteriích	53
4.1.3	Optimalizace lyze bakterií pro extrakci proteinu LONRF3	53
4.1.4	Optimalizace purifikace proteinu na Ni-NTA agarózové matrici.....	55
4.1.5	Purifikace proteinů LONRF3.....	57
4.1.6	Limitovaná proteolýza	57
4.1.7	Charakterizace struktury pomocí HDX-MS	58
4.2	Charakterizace monoklonálních protilátek anti-LONRF3.....	60
4.3	Interakce proteinu LONRF3 s chaperony Hsp70 a Hsp90	62
4.4	Funkční analýza proteinu LONRF3	65
4.4.1	Funkční analýza proteinu LONRF3 <i>in vivo</i>	65
4.4.2	Vliv vybraných látek na transkripci genu <i>LONRF3</i>	67
5	DISKUZE	71
6	ZÁVĚR	76
7	SEZNAM ZDROJŮ	78

Seznam použitých zkratk

17-AAG	17-(allylamino)geldamycin
ADP	adenosindifosfát
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosintrifosfát
Aha1	Activator of Hsp90 ATPase 1
APPBP2	Amyloid protein-binding 2
ARX	Aristaless related homeobox
ATF3	Activating transcription factor 3
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
Bag	Bcl-2-associated protein
Bcl	B-cell lymphoma protein
BCRT1	BCR C-terminal domain
BiP	binding imunoglobulin protein
BSA	hovězí sérový albumin
CASA	chaperone-assisted selective autophagy
Cdc37	cell division cycle 37
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Clp	chitinase-like protein
CMA	chaperone-mediated autophagy
CRL	Cullin-RING E3
CSB	complete sample buffer
Ct	cycle of treshold
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DnaJ	homolog Hsp40 u <i>E. coli</i>
DnaK	homolog Hsp70 u <i>E. coli</i>
DTT	dithiothreitol
E	eluát
E6-AP1	E6-associated protein 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EtOH	ethanol
Gadd153	DNA damage inducible transcript 3
GroEL	homolog Hsp60 u <i>E. coli</i>
GroES	homolog Hsp10 u <i>E. coli</i>
Grp94	glucose-regulated protein 94
GrpE	glucose-regulated protein E
FKBP51	FK506 binding protein 51
HDX	vodík/deuteriová výměna (Hydrogen/Deuterium Exchange)
HECT	homologous to E6-associated protein C-terminus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
Hip	Hsp70-interacting protein
Hop	Hsp70/90 organizing protein
Hsc70	heat-shock cognate protein 70
HSE	heat-shock element

HSF1	heat-shock transkripční faktor 1
Hsp	heat-shock protein
HspBP1	heat-shock protein 70 binding protein 1
HSR	heat-shock response
HtpG	homolog Hsp90 u <i>E. coli</i>
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase
Chip	C-terminus of Hsc-70 interacting protein
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
KAc	acetát draselný
L,lyz	lyzát
LB médium	Luria broth médium
LDS	loading sample buffer
LONRF	LON peptidáza N-terminální doména a RING prstový protein
M	matrice
Mad1	Mitotic arrest deficient-like 1
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MeOH	methanol
MOPS	4-morpholinepropanesulfonic acid
MBP	maltose binding protein
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NEF	nucleotide exchange factor
NET	lyzační pufr obsahující NP-40, EDTA a Tris
NF	nenavázaná frakce
NLS	nuclear localization signal
NOTCH2	Notch homolog 2 N-terminal-like protein
NTA	nitrilotriacetic acid
NVD	nukleotid vazebná doména
P	pelet
PARP-1	poly ADP-ribose polymerase 1
PBS	phosphate-buffered saline
PDB	protein data bank
PEI	polyethyleneimine
PK	pozitivní kontrola
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPIáza	peptidyl-prolyl izomeráza
PPP5	Protein phosphatase 5
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RECAMO	regionální centrum aplikované molekulární onkologie
RING	really interesting new gene
S	supernatant
Sba1	homolog p23 u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBP	streptavidin-binding protein
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektororéza s dodecylsíránem sodným
SHR	receptor pro steroidní hormon
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
Ssa	homolog Hsp70 u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sti1	stress inducible 1

SVD	substrát vazebná doména
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
Tomm34	translocase of the outer mitochondria membrane 34
TP53	tumor gene 53
TPR	tetratricopeptide repeat
Trap1	TNF receptor-associated protein 1
Tric	TCP-1 ring complex
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ub	ubikvitin
UPS	ubikvitin-proteazomový systém
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1

Teoretická část

1 Úvod a cíle práce

Proteiny se účastní všech biologických procesů. Eukaryotní buňky obvykle exprimují více než 10 000 druhů proteinů, které jsou na ribozomech syntetizovány v podobě lineárních řetězců tvořených až několika tisíci aminokyselinami. K tomu, aby mohly plnit svoji funkci, musí být složeny do své přirozené trojrozměrné konformace. Udržení konformační stability je však vázáno na fyziologické prostředí (Dobson *et al.*, 1998, Hartl *et al.*, 2011). Kvůli tomu nezaujímá podstatná část všech proteinů eukaryotických buněk (20-30 %) svou konformaci, dokud nedojde k interakci s jejich vazebnými partnery a stabilizaci jejich struktur (Dunker *et al.*, 2008). Poskládání proteinů do jejich funkční konformace, udržení proteinové integrity a proteinová homeostáza proto velmi závisí na komplexní proteinové síti tzv. molekulárních chaperonů. Členové těchto proteinových rodin jsou známy jako stresové proteiny či proteiny tepelného šoku (heat-shock proteiny, Hsp) a jsou klasifikovány podle svých molekulových hmotností na Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 a malé Hsps. Hlavními úlohami chaperonů jsou: zamezení tvorby proteinových agregátů, případně jejich rozrušení, pomáhají skládat nově syntetizované proteiny či asistují při opětovném skládání chybně složených proteinů (Kim *et al.*, 2013). Proteiny, které se při těchto procesech s molekulárními chaperony asociují a napomáhají jejich funkci, jsou označovány jako ko-chaperony. Řada ko-chaperonů obsahuje tzv. TPR (tetratricopeptide) domény, které umožňují jejich vazbu k molekulárním chaperonům.

Pracovní skupina dr. Müllera ve výzkumném centru RECAMO je zaměřena převážně na studium molekulárních chaperonů Hsp70, Hsp90 a jejich ko-chaperonů. Při hledání nových potenciálních ko-chaperonů obsahujících TPR domény byl na tomto pracovišti identifikován protein LONRF3 (LON peptidáza N-terminální doména a RING prstový protein 3) jakožto možný interakční partner Hsp70/90.

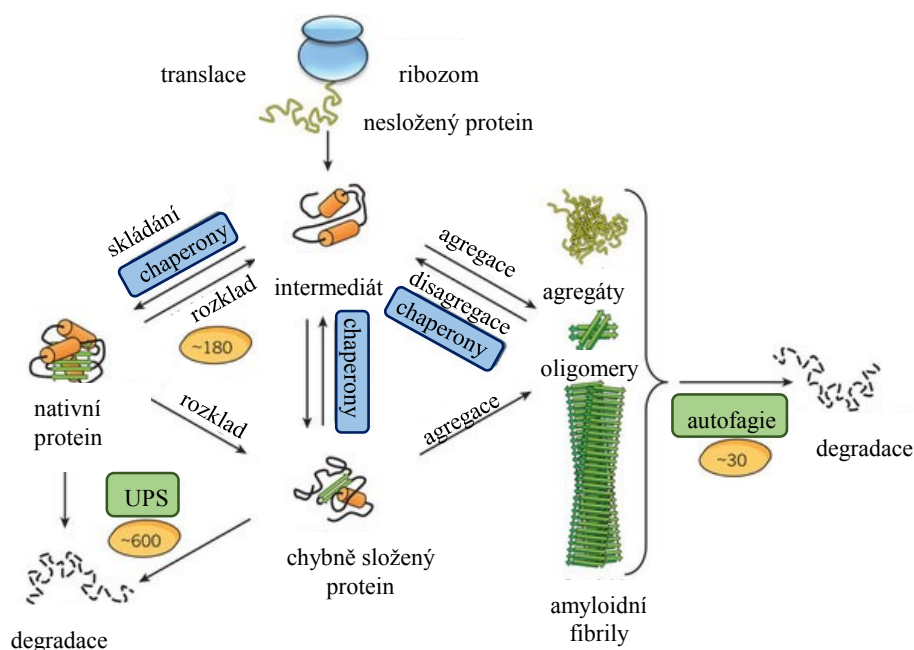
Cílem této práce je úvodní studium struktury a funkce proteinu LONRF3. Součástí práce bude klonování genu pro protein LONRF3 do expresních vektorů pro bakteriální produkci proteinu, optimalizace jeho purifikace a následná strukturní analýza pomocí limitované proteolýzy a vodík/deuteriové výměny v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS). Dále bude purifikovaný protein použit pro přípravu a charakterizaci specifických monoklonálních protilátek. Důležitou součástí diplomové práce bude analýza protein-proteinových interakcí proteinu LONRF3 s chaperony Hsp70 a Hsp90 v buněčných lyzátech pomocí různých variant metody pull-down. Při funkční analýze proteinu LONRF3 určíme a experimentálně verifikujeme jeho subcelulární

lokalizaci a stanovíme míru exprese genu *LONRF3* v závislosti na přítomnosti proteotoxického stresu pomocí metody qRT-PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase).

2 Proteinová homeostáza - proteostáza

Kontrola kvality proteinů a udržování proteinové homeostázy neboli proteostázy jsou klíčové pro zdraví buněk i celého organismu. Proteostáza je udržována díky integrované síti proteostatických systémů. Těmito systémy jsou: síť molekulárních chaperonů a jejich regulátorů (řídí zejména *de novo* skládání a přeskládání proteinů), ubiquitin-proteasomový systém (UPS) a kaskáda dějů označovaných jako autofagie (Obr. 1) (Hartl *et al.*, 2011).

Následující kapitoly představí nejdůležitější molekulární chaperony a mechanismy, které se podílí na udržení proteostázy včetně patologií, které nastanou při selhání některého ze systému.



Obr. 1 Úloha chaperonů v udržování buněčné proteostázy. Upraveno dle (Hartl *et al.*, 2011).

2.1 Heat-shock protein 70

Heat-shock proteiny 70 (Hsp70) tvoří rodinu velmi konzervovaných molekulárních chaperonů s molekulovou hmotností 70 kDa. Vyskytují se napříč všemi říšemi organismů kromě některých archeí - u bakterií (DnaK), rostlin (atHsp70 - *Arabidopsis thaliana*), kvasinek (Ssa) a člověka (Hsp70). Porovnáním sekvencí prokaryotního DnaK z *Escherichia coli* (*E. coli*) a eukaryotního Hsp70 byla zjištěna přibližně 50% shoda v jejich aminokyselinové sekvenci (Daugaard *et al.*, 2007, Gupta, 1998).

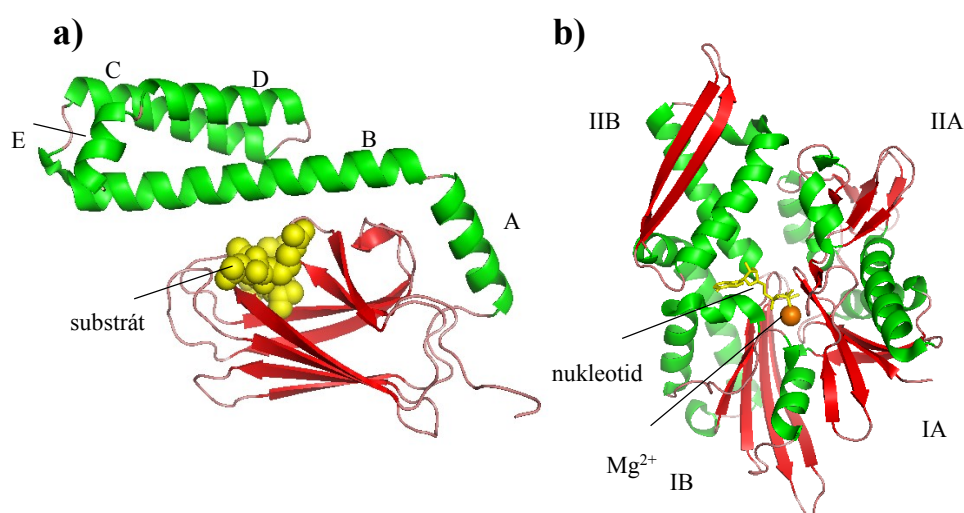
V lidských buňkách existuje 16 izoform Hsp70, které společně tvoří přibližně 2 % buněčného proteomu (Zylicz a Wawrzynow, 2001). Mezi nejdůležitější konstitutivně exprimované izoformy patří heat-shock cognate protein 70, Hsc70 (v jádře a cytosolu), dále mitochondriální mtHsp70 a protein vážící imunoglobuliny (BiP) v endoplasmatickém retikulu (Daugaard *et al.*, 2007).

Hsp70 jsou důležité u množství buněčných pochodů jak při fyziologickém stavu buňky, tak během stresu (změna teploty, zvýšení vápenatých kationtů, přítomnost těžkých kovů apod.). Pomáhají přeskupovat chybně složené a nově syntetizované proteiny, rozrušují shluky proteinů a asistují i při transportu vezikul. Díky těmto funkcím jsou nezbytné pro udržení proteinové homeostáze (Mayer a Bukau, 2005).

Rolí Hsp70 v jádře a jadérku se zabíral tým dr. Kotoglou. Bylo zjištěno, že je molekulární chaperon součástí drah podílejících se na ochraně jaderné nebo ribosomální DNA před jednořetězcovými zlomy. Zároveň zkoumali i molekulární mechanismus tohoto systému. Bylo objeveno, že Hsp70 kolokalizuje s PARP-1, váže se na jeho BCRT doménu a váže i současně XRCC1 s PARP-1, což naznačuje, že by tento chaperon mohl zaujímat funkci na úrovni opravy DNA a báze excisní opravy (Kotoglou *et al.*, 2009).

2.1.1 Struktura Hsp70

Hsp70 se skládají ze dvou domén, jejichž struktura je silně ovlivněna vazbou ATP/ADP. Na N-konci se nachází konzervovaná nukleotid vazebná doména (NVD) s ATPázovou aktivitou a na C-konci je více variabilní substrát vazebná doména (SVD). Obě domény jsou navzájem spojeny krátkou hydrofóbní sekvencí (Obr. 2) (Aprile *et al.*, 2013).



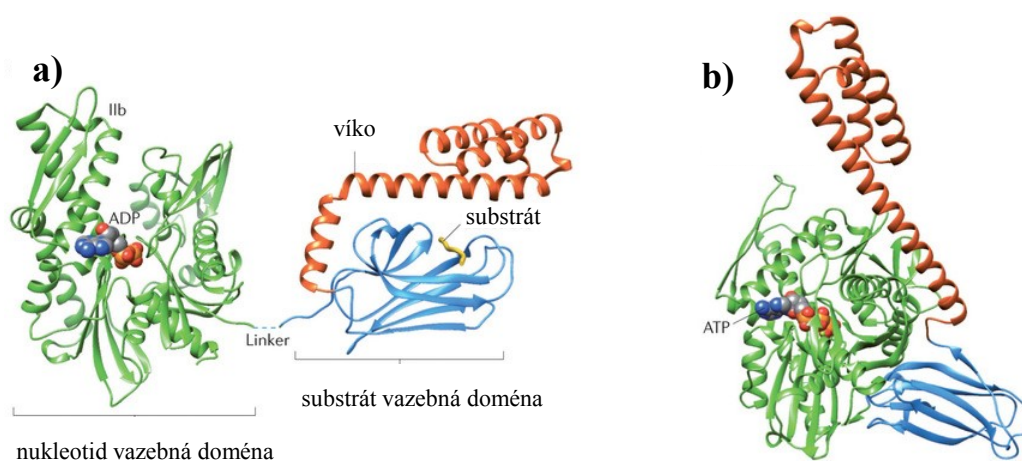
Obr. 2 Krystalová struktura Hsp70. a) substrát vazebná doména (PDB: 1DKZ) b) nukleotid vazebná doména (PDB: 4B9Q)

SVD doména se skládá ze dvou subdomén 10 kDa helikální a 25 kDa β -listové subdomény. Helikální doména je složena z pěti helixů, přičemž helix B interaguje se smyčkami β -helikální domény a uzavírá tak vazebné místo pro substrát jako víko. Na C-konci SVD je konzervovaný motiv EEVD (Glu, Glu, Val, Asp) umožňující interakci s některými ko-chaperony (Mayer a Bukau, 2005).

NVD vytváří tetramer ze dvou poddomén I a II, jež jsou rozděleny na podjednotky A/B. Mezi poddoménami je vytvořen žlábek pro vazbu ATP/ADP a hořčnatého a draselného kationtu (Flaherty *et al.*, 1990, Kityk *et al.*, 2012).

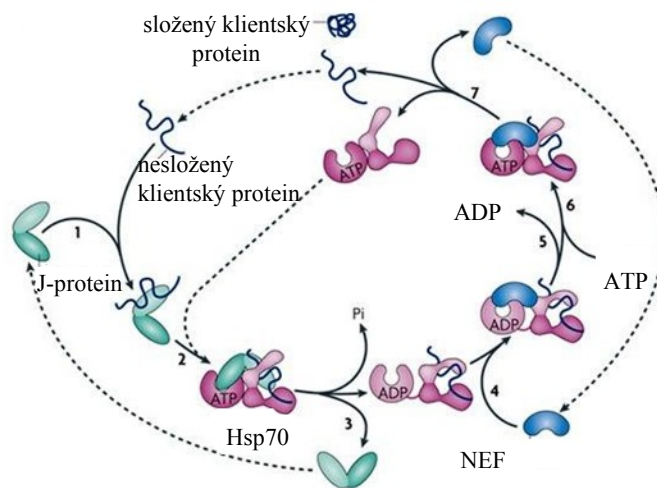
2.1.2 ATPázový cyklus Hsp70

Navázání substrátu je alostericky regulováno vazbou ATP/ADP (Obr. 3). Tím vznikají dva konformační stavy Hsp70: A) s navázaným ATP – „otevřená konformace“ (nízká afinita k substrátu) B) s navázaným ADP – „uzavřená konformace“ (vysoká afinita k substrátu). Samovolný přechod by byl mezi těmito stavy velmi pomalý, proto potřebuje Hsp70 své ko-chaperony (Mayer a Bukau, 2005).



Obr. 3 Konformační změny Hsp70 s ATP/ADP. a) ADP vazebný stav b) ATP vazebný stav. Upraveno dle (Saibil, 2013).

ATPázový cyklus začíná interakcí Hsp70 s proteiny obsahujícími tzv. J-doménu, čímž dochází k výrazným konformačním změnám proteinu vedoucím k hydrolýze ATP a uzavření aktivního místa-substrátové domény β (Obr. 4). (J-proteiny stimulují ATPázovou aktivitu až 1000krát). Jakmile je v NVD přítomno ADP, helix B „přiklopí“ klientský protein v SVD jako víko. K následnému uvolnění složeného klientského proteinu z chaperonu je zapotřebí pomoci nukleotid výměnného faktoru (NEF-nucleotide exchange factor) uvolnit ADP a následně navázat ATP (Kampinga a Craig, 2010, Mayer, 2013).



Obr. 4 ATPázový cyklus Hsp70. 1,2) Klientský protein je dopraven J-proteinem do Hsp70. 3) Po hydrolýze ATP dochází k uzavření klientského proteinu v SVD. 4,5) Vazbou NEF je ADP vyměněno za ATP. 6) Po navázání ATP nastanou konformační změny v SVD vedoucí k uvolnění složeného klientského proteinu. Upraveno dle (Kampinga a Craig, 2010).

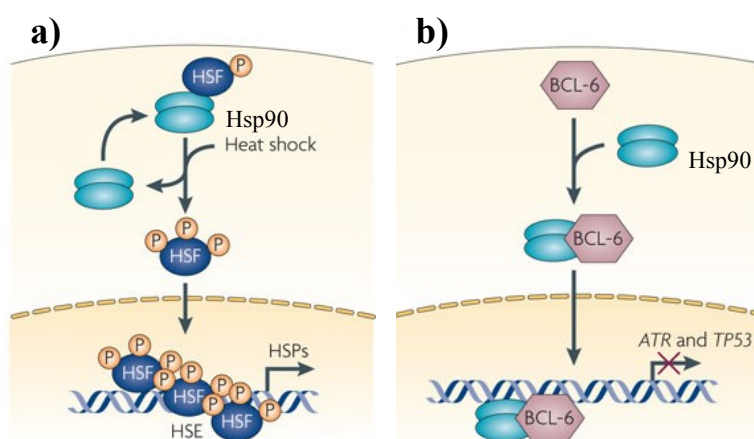
2.2 Heat-shock protein 90

Heat-shock proteiny 90 jsou evolučně konzervované molekulární chaperony, které utváří spolu s Hsp70 a svými ko-chaperony chaperonovou mašinerii, díky níž v savčích buňkách stabilizují a aktivují více než 200 proteinů (Makhnevych a Houry, 2012). Hsp90 se vyskytují v bakteriích, všech eukaryotech a patrně se nevyskytují u archeí. Ačkoliv není bakteriální HtpG pro *E. coli* nezbytný, pro eukaryotní buňky je Hsp90 esenciální (Borkovich *et al.*, 1989, Versteeg *et al.*, 1999). U savců jsou známy dvě hlavní cytoplasmatické izoformy – majoritní Hsp90 α , jejíž exprese je aktivována stresovými podmínkami a konstitutivně exprimovaná minoritní Hsp90 β (Csermely *et al.*, 1998). Izoformy Hsp90 existují i v dalších buněčných kompartmentech: Grp94 (glucose-regulated protein 94) v endoplasmatickém retikulu a Trap-1 (TNF receptor-associated protein 1) v mitochondriální matrix (Felts *et al.*, 2000, Sorger a Pelham, 1987).

Jak již bylo zmíněno, Hsp90 jsou pro eukaryotní buňky nepostradatelné a to zejména kvůli udržování buněčné proteostáze. Podílí se mimo jiné na regulaci transkripce, opravách DNA, buněčné homeostáze, přetváření chromatinu, přenosu signálu, vnitrobuněčném transportu a degradaci proteinů (Pennisi *et al.*, 2015).

Přibližně 3 % intracelulárního Hsp90 se nachází v jádře, kde reguluje několik jaderných pochodů a to zejména aktivitu receptorů pro steroidní receptory (SHR) včetně receptorů pro androgeny, glukokortikoidy a estrogeny (Csermely *et al.*, 1998, Trepel *et al.*, 2010). Hsp90 také reguluje zpětnou vazbou aktivitu heat-shock transkripčního

faktoru 1 (HSF1). V savčích buňkách vystavených proteotoxickému stresu nebo inhibitoru Hsp90 (geldamycin) disociují monomery HSF1 od Hsp90 (Obr. 5a). Posléze podléhají trimerizaci, jsou přesouvány do jádra a svou vazbou na promotorové sekvence následně zvyšují expresi heat-shock proteinů včetně Hsp70 (Zou *et al.*, 1998). Mimo regulaci HSF1 a SHR ovlivňuje Hsp90 i další jaderné pochody (Zhao a Houry, 2005). Příkladem je protein BCL-6 (B-cell lymphoma protein 6), který je transkripčním represorem genů *ATR* a *TP53*. Hsp90 je vázán na BCL-6 a společně tak tlumí expresi cílených genů (Obr. 5b) (Ci *et al.*, 2009).



Obr. 5 Ovlivnění jaderných pochodů chaperonem Hsp90. a) Regulace aktivity transkripčního faktoru HSF: tepelný šok způsobí uvolnění HSF z Hsp90, následně dojde k jeho aktivaci, trimerizaci, navázání na DNA v místě heat-shock elementů (HSE), čímž je spuštěna exprese heat-shock proteinů. **b)** Komplex Hsp90 s BCL-6: po navázání komplexu na DNA je potlačena transkripce několik tumor supresorových genů, což přispívá k tumorigenezi. Upraveno dle (Trepel *et al.*, 2010).

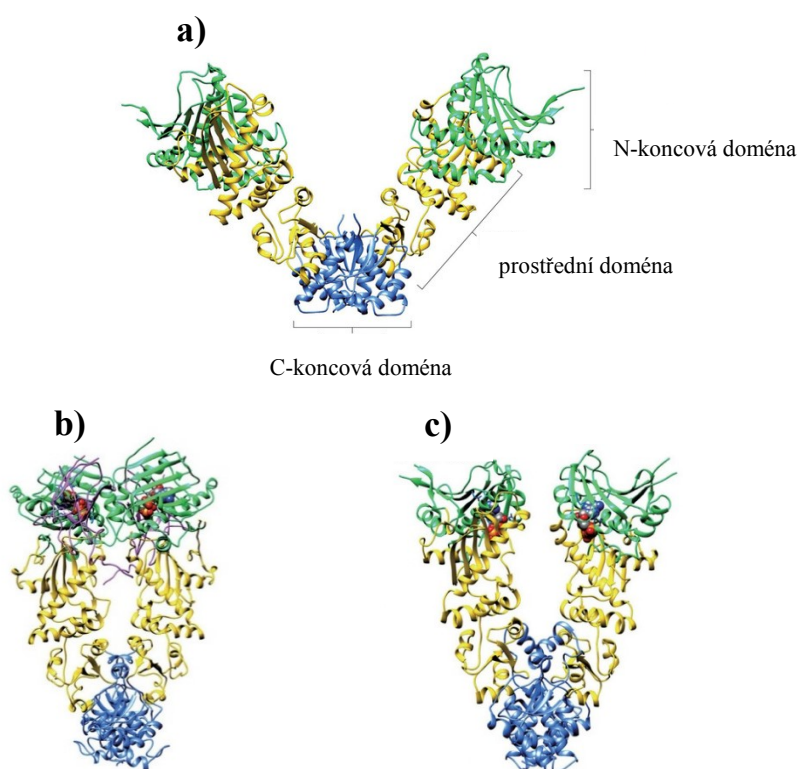
Na rozdíl od ostatních chaperonů nejsou Hsp90 potřebné pro *de novo* skládání proteinů, ale spíše ulehčují konečnou maturaci specifických (klientských) proteinů. Pro zajištění správného složení proteinů plní komplex Hsp90 za normálních podmínek tři hlavní funkce: 1) specificky interagují pomocí ko-chaperonů (p23, Cdc37-cell division cycle 37) s velkým množstvím klientských proteinů; 2) stabilizují konformačně intermediární stavy proteinů, čímž umožní klientským proteinům interagovat se svými vazebnými partnery a 3) regulují degradaci proteinů UPS (Pennisi *et al.*, 2015).

2.2.1 Struktura a konformační stavy Hsp90

Hsp90 je homodimerický protein nabývající otevřené a uzavřené konformace v závislosti na vazbě ligandů. Skládá se ze tří strukturálních domén a dvou rozvolněných regionů, přičemž od N-konce to jsou: 1) N-koncová nukleotid vazebná doména obsahující místo pro vazbu ATP; 2) raménko („linker“) - variabilní a nabitý region spojující N-koncovou a prostřední doménu, který se podílí na rozpoznání nukleotidu, klientských proteinů

a ko-chaperonů; 3) prostřední doména je zapojena do hydrolýzy ATP a podílí se také na rozpoznání ko-chaperonů; 4) C-koncová dimerizační doména a 5) konec dimerizační domény obsahující vysoce konzervovanou oblast MEEVD (Met, Glu, Glu, Val, Asp), která je důležitá pro vazbu ko-chaperonů. Jelikož je daný chaperon vysoce konzervovaný, lze pro popis jeho struktury použít i krystalové struktury *E. coli* HptG, Hsp82 ze *Saccharomyces cerevisiae* a Grp94 z *Canis lupus* (Ali *et al.*, 2006, Saibil, 2013, Shiau *et al.*, 2006, Scheufler *et al.*, 2000).

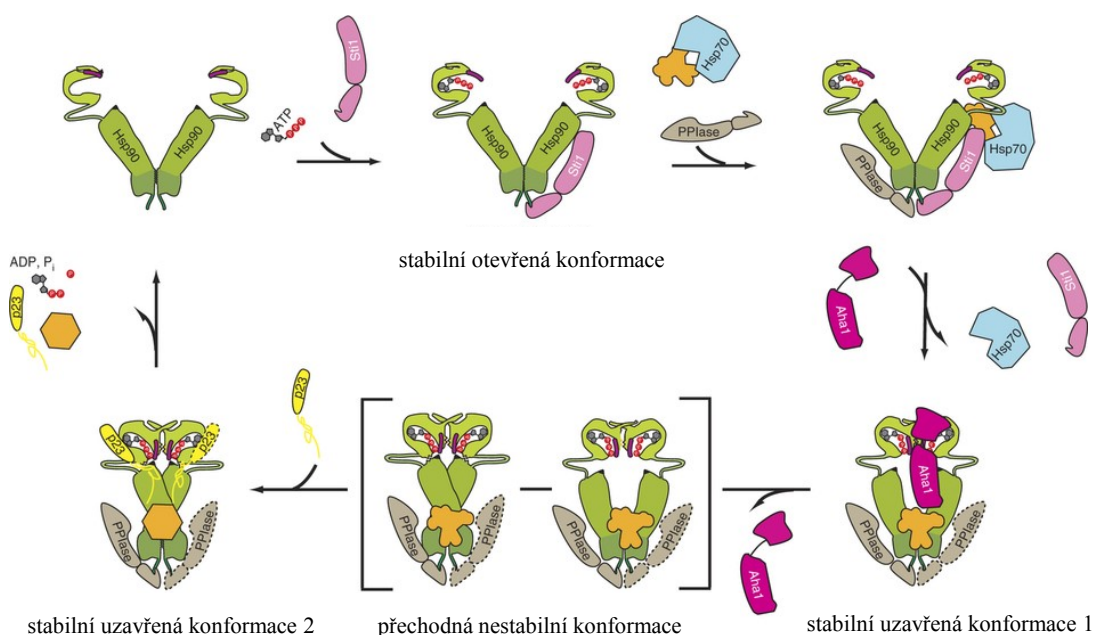
Struktura dimeru Hsp90 je podobně jako u ostatních chaperonů výrazně ovlivněna ATPázovým cyklem (Obr. 6). Bez navázaného ATP jsou dva proteiny Hsp90 spojeny svými dimerizačními doménami do tvaru „V“ a vytváří tím otevřenou konformaci. Navázání ATP způsobí dimerizaci nukleotid vazebných domén, čímž dojde k uzavření proteinového dimeru. Hydrolýzou ATP je následně, přes metastabilní konformaci s ADP, způsobeno oddálení nukleotid vazebných domén vedoucí k otevřené konformaci (Li *et al.*, 2013b, Saibil, 2013).



Obr. 6 Konformační změny ve struktuře Hsp90. a) Bez navázaného ATP je Hsp90 v „otevřeném stavu“. b) Navázáním ATP dochází k dimerizaci nukleotid vazebných domén. c) Hydrolýzou ATP je způsobeno oddálení nukleotid vazebných domén. Upraveno dle (Saibil, 2013).

2.2.2 Chaperonový cyklus Hsp90

Během maturace klientských proteinů spolupracuje Hsp90 v chaperonovém cyklu s řadou rozdílných ko-chaperonů, přičemž nejvíce prozkoumanou oblastí chaperonových komplexů je aktivace receptorů pro steroidní hormony. Nejprve vytvoří proteiny Hsp70 a Hsp40 s klientským proteinem „počáteční komplex“. Jakmile je tento komplex spojen přes adaptorový protein Sti1 (stress inducible 1) (ortolog lidského proteinu Hop; Hsp70-Hsp90 organizing protein) s Hsp90, vznikne „komplex intermediární“. V pozdější fázi chaperonového cyklu je uskupen „konečný komplex“, který je složen z proteinů Hsp90, p23 a peptidyl-prolyl izomerázy. Detailněji je maturace steroidního hormonu popsána níže obrázkem 7 (Li *et al.*, 2013a).



Obr. 7 Chaperonový cyklus Hsp90. Cyklus začíná navázáním proteinu Sti1 (ortolog HOP) na Hsp90 v jeho otevřené formě, inhibuje ATPázovou aktivitu Hsp90 a zároveň slouží jako místo pro navázání klientského proteinu s Hsp70. Na druhý monomer Hsp90 je navázána peptidyl-prolyl izomeráza. Synergická interakce Aha1 (aktivátor ATPázy1 Hsp90), nukleotidu a PPIázy vede k disociaci Sti1. Aha1 urychluje přechod Hsp90 do uzavřené konformace. Jakmile z komplexu odstoupí Aha1 a je navázán p23, dojde ke stabilizaci uzavřené konformace. Po hydrolýze ATP je proteinový komplex opět rozvolněn a dojde k uvolnění p23, složeného klientského proteinu, ADP a fosfátu. Upraveno dle (Li *et al.*, 2013a).

2.3 Ostatní třídy chaperonů

2.3.1 Malé heat-shock proteiny (sHsps)

Malé heat-shock proteiny mají velikost pouze 12-43 kDa a na rozdíl od předešlých chaperonů je jejich funkce nezávislá na ATP (Haslbeck, 2002). Jsou přítomny v jádře, membránách a cytoskeletu a váží částečně denaturované proteiny, čímž zabraňují během stresu jejich ireverzibilní agregaci. Monomery jsou složeny z α -krystalinové domény

(v průměru 90 aminokyselin) obklopené variabilní C- a N-koncovým úsekem a vytváří oligomery (Jakob *et al.*, 1993, Macrae, 2000, Sun a Macrae, 2005).

2.3.2 Chaperoniny

Chaperoniny jsou velké proteinové komplexy (800-900 kDa) tvořené dvěma prstenci, které do sebe uzavírají substrátové proteiny o velikosti až 60 kDa, čímž jim napomohou k jejich správnému složení. Chaperoninový komplex je závislý na vazbě a hydrolýze ATP. Podle závislosti na Hsp10 (GroES) dělíme chaperoniny na dvě skupiny. Do skupiny I patří chaperonin Hsp60 (vyskytující se v chloroplastech a mitochondriích) se svým ko-chaperonem Hsp10 a chaperonin GroEL (bakteriální) s ko-chaperonem GroES. Skupina II se nachází u arechií (*thermosom*) a eukaryot (TriC, TCP-1 ring complex) a jsou nezávislé na ko-chaperonu Hsp10 (GroES).

Nejlépe prostudovaným chaperoninovým systémem je GroEL-GroES z *E. coli* interagující s více než 250 různými cytosolickými proteiny (Hartl *et al.*, 2011, Hartl a Hayer-Hartl, 2009, Horwich a Fenton, 2009). Aby mohlo dojít k navázání substrátového proteinu do středu prstence, prezentuje na svém povrchu apikální doména GroEL hydrofobní aminokyseliny (Tartaglia *et al.*, 2010). Následné přeskládání substrátu závislé na vazbě GroES je řízeno ATP a způsobuje rozsáhlé konformační změny v GroEL vedoucí k vytvoření kavity s hydrofilní, negativně nabitou vnitřní stěnou. Obklopený substrát má v této fázi čas pro své poskládání, dokud není ukončena hydrolýza ATP v komplexu GroES-prstence. Substrát opouští kavitu po disociaci GroES z prstence, která je řízena navázáním ATP do protilehlého prstence (Hartl a Hayer-Hartl, 2009, Horwich a Fenton, 2009, Xu *et al.*, 1997).

2.3.3 Hsp100

Hsp100/Clp patří do superrodiny ATPáz s doménou AAA+ a jsou podle svých enzymatických funkcí děleny na dvě podrodiny: A) Hsp104/ClpB má disagregační aktivitu, která je využívána ve spojení s Hsp70 k rozkladu proteinových agregátů B) členové podrodiny ClpA rozkládají proteiny, spolupracují s proteázami (např. ClpP) a katalyzují proteolýzu závislou na ATP (Ben-Zvi a Goloubinoff, 2001, Neuwald *et al.*, 1999). Hsp100 je typicky tvořen šesti prstenci, které obklopují úzký, centrální otvor lemovaný smyčkami interagující s aromatickými a hydrofobními postranními řetězci substrátu. Tyto chaperony obsahují i velmi mobilní N-koncovou doménu, která hraje

klíčovou roli v transportu substrátů do středu prstence nebo umožňuje interakci s kofaktory (Cranz-Mileva *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2012).

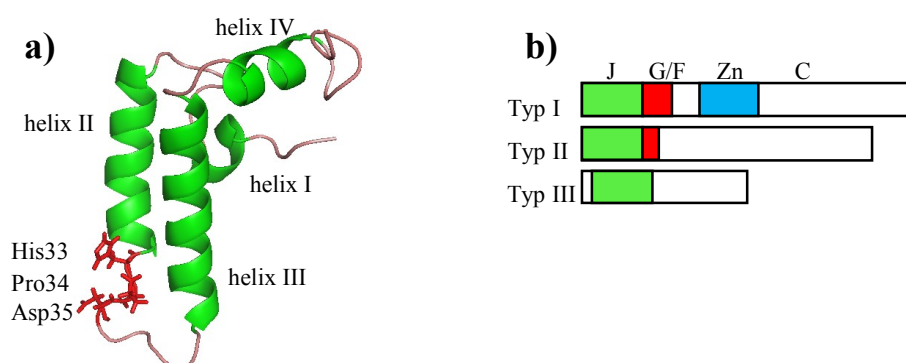
2.4 Ko-chaperony a TPR ko-chaperony Hsp70/Hsp90

2.4.1 Ko-chaperony ATPázového cyklu Hsp70

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.1.2 ATPázový cyklus Hsp70 je závislý na vazbě ATP/ADP. K tomu, aby však cyklus mohl probíhat, potřebuje Hsp70 své ko-chaperony, přičemž nejdůležitějšími jsou J-proteiny, NEF a Hip (Hsp70-interacting protein), které jsou blíže popsány v následujících odstavcích.

J-proteiny

J-proteiny (Hsp40) jsou obšírnou skupinou ko-chaperonů interagujících s Hsp70. Zajímavostí je, že existuje přibližně třikrát více lidských J-proteinů než Hsp70 a kromě toho vykazují značné sekvenční a strukturní odlišnosti, což je v souladu se skutečností, že tyto proteiny řídí multifunkčnost komplexu Hsp70 (Kampinga a Craig, 2010). J-proteiny obsahují konzervovanou oblast – J-doménu (pojmenovanou podle DnaJ z *E. coli*) – o velikosti přibližně 70 aminokyselin, jež je nepostradatelná pro stimulaci ATPázové aktivity Hsp70. Pro správnou funkci J-domény je důležitý částečně konzervovaný motiv His, Pro a Asp, který se nachází ve smyčce mezi helixy II a III (Obr. 8a) (Greene *et al.*, 1998). J-proteiny jsou rozděleny podle přítomnosti domén na tři skupiny (Obr. 8b) (Mayer a Bukau, 2005).



Obr. 8 Struktura J-proteinů. a) Struktura J-domény DnaJ z *E. coli* s výraznějším His, Pro, Asp motivem. PDB: 1XBL. b) Typy J-proteinů dle přítomnosti domén. J = J-doména, G/F = oblast bohatá na Gly a Phe, Zn = „doména s motivem zinkového prstu“ (zinc finger domain), C = C-terminální doména).

NEF

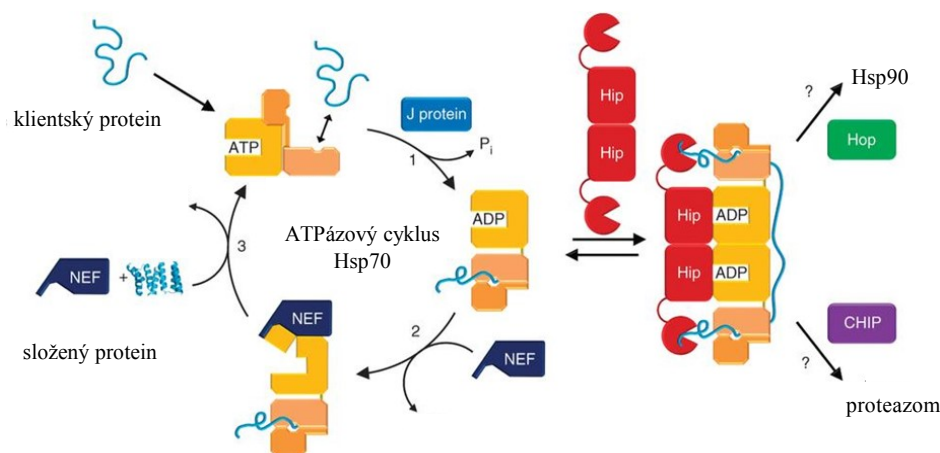
Nejlépe probádaným NEF je bakteriální protein GrpE. Jedná se o dimer, který je tvořen dlouhým α -helixem, na jehož konci je několik menších β -smyček a helixů. Interakce GrpE s DnaK je zprostředkována β -listovou doménou, která reaguje s doménami IB a IIB

DnaK, čímž nastane pootočení domény IIB, následně otevření vazebného místa a uvolnění ADP. Díky tomu je snížena afinita k substrátu v SVD DnaK, klientský protein může být uvolněn a tím je ukončen ATPázový cyklus Hsp70 (Harrison, 2003, Harrison *et al.*, 1997).

U eukaryot existují tři druhy NEF: Hsp110, HspBP1 (heat-shock protein 70 binding protein 1) a Bag (Bcl-2 associated anthogene) proteiny. Přestože jsou tyto NEF značně strukturně odlišné, všechny interagují se subdoménou IIB Hsp70 (Bracher a Verghese, 2015).

Hip

Dimer proteinu Hip je antagonistou NEF (Hohfeld *et al.*, 1995). Zpomaluje ATPázový cyklus Hsp70 jeho stabilizací v ADP-vazebném stavu, čímž je zvýšena afinita substrátu k SVD a je oddáleno uvolnění klientského proteinu z chaperonového komplexu. Jelikož protein Hip obsahuje ve své struktuře TPR doménu, může být řazen i mezi TPR ko-chaperony. Hip zaujímá funkci nejenom v ATPázovém cyklu Hsp70, ale může také dopravit komplex Hip-Hsp70-ADP-substrát k Hsp90 nebo do proteazomu k následné degradaci (Obr. 9). Ko-chaperon se pravděpodobně váže současně na dvě molekuly Hsp70 s navázaným substrátem. Tím by nastalo zvýšení interakce Hip-Hsp70 na takovou úroveň, kdy by byl Hip schopen účinněji kompetovat s NEF v NVD Hsp70 (Li *et al.*, 2013b).



Obr. 9 Schéma účasti proteinu Hip v chaperonovém cyklu Hsp70. Dimer Hip stabilizuje Hsp70 v jeho ADP-vazebném stavu, takže je oddáleno uvolnění substrátu z Hsp70. Kromě ATPázového cyklu může Hip napomoci i transportu klientských proteinů k Hsp90 nebo do proteazomu. Upraveno dle (Li *et al.*, 2013b).

2.4.2 Ko-chaperony ATPázového cyklu Hsp90

Při maturaci klientských proteinů dynamicky spolupracuje chaperon Hsp90 s řadou svých ko-chaperonů. Vytváří společně binární nebo ternární komplexy, čímž regulují různými cestami funkci Hsp90 (např. urychlení či inhibice hydrolýzy ATP nebo vazba klientských

proteinů) (Li *et al.*, 2013a). Mezi nejvýznamnější ko-chaperony ATPasového cyklu patří Aha1, Cdc37 a p23 (Hartl *et al.*, 2011). Průběh chaperonového cyklu Hsp90 je popsán v kapitole 2.2.2.

Aha1

Aha1 aktivuje ATPázovou aktivitu Hsp90 (Panaretou *et al.*, 2002). Svou vazbou do N-koncové a prostřední domény Hsp90 způsobí částečné uzavření dimeru Hsp90 a výrazně tak urychlí ATPázový cyklus (Retzlaff *et al.*, 2010). Zároveň účinně vytěšňuje Hop/Sti1 z Hsp90 a společně s PPIázou podporuje přechod dimeru z otevřené do uzavřené konformace (Li *et al.*, 2013a).

Kromě toho hraje tento ko-chaperon důležitou roli v cystické fibróze, protože se účastní kontroly kvality produkce proteinu CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Snížením jeho exprese by mohlo dojít ke zlepšení fenotypového projevu způsobeného defektním CFTR (Wang *et al.*, 2006).

Cdc37

Cdc37 byl prvně objeven jako esenciální gen pro průběh buněčného cyklu (Reed, 1980). Později bylo zjištěno, že se jedná o ko-chaperon Hsp90, který zprostředkovává interakci mezi chaperonem a značným množstvím proteinových kináz (Hunter a Poon, 1997). S kinázami interaguje tento ko-chaperon prostřednictvím N-koncové domény a svou C-koncovou doménou interaguje s N-doménou Hsp90. Interakce s Hsp90 vede ke stabilizaci jeho otevřené konformace a tím i inhibici ATPázové aktivity (Lee *et al.*, 2004b, Roe *et al.*, 2004).

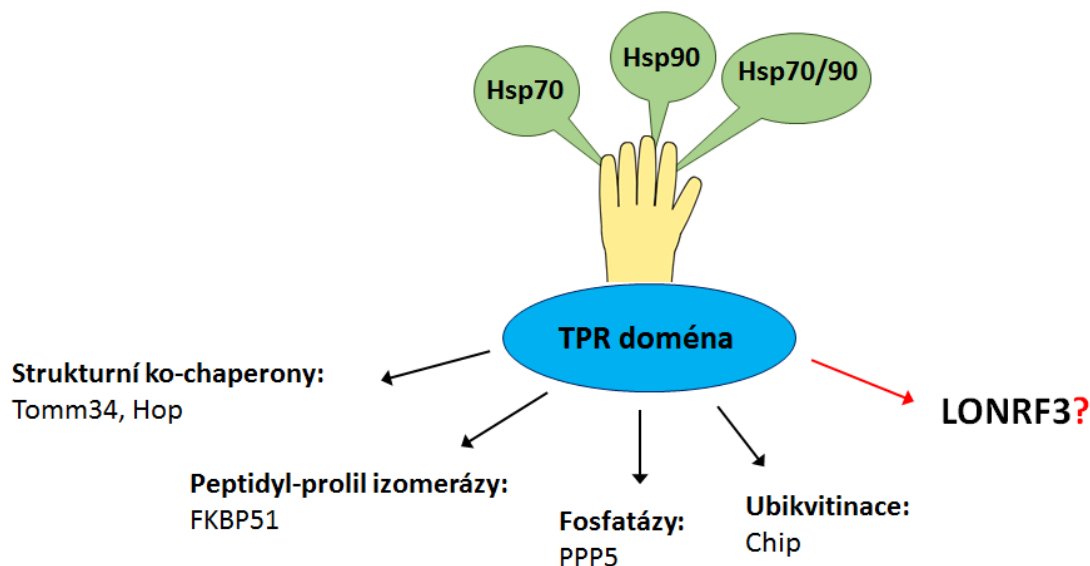
p23

p23 je malým, kyselým a konformačně specifickým ko-chaperonem, který je vázán svým rozvolněným C-koncem pouze do uzavřené konformace Hsp90 (Ali *et al.*, 2006, Weikl *et al.*, 1999). p23 napomáhá maturaci SHR stabilizací Hsp90 v uzavřeném stavu, což má za následek částečnou inhibici hydrolýzy ATP, která je nezbytná pro uvolnění substrátu (Ali *et al.*, 2006, Johnson a Toft, 1995, Weaver *et al.*, 2000).

2.4.3 TPR ko-chaperony

Multiproteinové komplexy jsou výsledkem protein-proteinových interakcí, které jsou často umožněny konzervovanými strukturními motivy přítomnými na specifických proteinech charakteristických pro daný druh interakce (Ballinger *et al.*, 1999). Jedním

z těchto strukturních motivů je TPR doména, která se skládá ze 3-16 tandemově uspořádaných TPR repetic. Každá repetice je tvořena 34 aminokyselinami. Doména se skládá ze dvou antiparalelních α -helixů, které vytváří hydrofobní oblast pro protein-proteinové interakce. Řada ko-chaperonů Hsp70 a Hsp90 obsahuje TPR doménu. TPR domény těchto proteinů rozpoznávají a váží EEVD (Glu, Glu, Val, Asp) motiv přítomný na C-konci chaperonů (Lamb *et al.*, 1995, Scheufler *et al.*, 2000). Interakce TPR domény a EEVD motivu je zprostředkována elektrostatickou interakcí karboxylových skupin koncového aspartátu EEVD s pěti konzervovanými rezidui TPR domény. Tyto dvě karboxylové skupiny vytváří s aminokyselinovými zbytky tzv. „two carboxylate clamp.“ Proteinové komplexy Hsp70/90 a TPR ko-chaperonů plní v buňce řadu funkcí v závislosti na druhu ko-chaperonu (Obr. 10) (Allan a Ratajczak, 2011).



Obr. 10 Příklad funkcí proteinových komplexů tvořených Hsp70/90 s různými druhy TPR ko-chaperonů.

Hop (Hsp70/Hsp90-organizing protein)

Hop hraje důležitou roli v maturaci SHR, kdy je předáván klientský protein z Hsp70 do komplexu s Hsp90 a současně inhibuje jeho ATPázovou aktivitu. Hop obsahuje N-koncovou doménu TPR1, následovanou regionem bohatým na prolin a aspartát a dvěma přilehlými doménami TPR2a a TPR2b následované opět Pro/Asp regionem (Allan a Ratajczak, 2011, Chen *et al.*, 1996). Na Hsc70 se Hop váže pomocí TPR1, rozpoznáním motivu PTIEEVD, zatímco TPR2A a TPR2B se specificky vážou na Hsp90. (TPR2A rozpoznává pět C-terminálních residuí Hsp90 - MEEVD).

Chip (carboxy terminus of Hsp70-interacting protein)

Chip je protein interagující s C-koncem Hsc70 (Ballinger *et al.*, 1999). Na svém N-konci má TPR doménu a na C-konci doménu U-box, která řídí jeho ubikvitin ligázovou aktivitu (řídí ubikvitinaci proteinů cílených k degradaci proteazomem) (Jiang *et al.*, 2001). Chip interaguje přes EEVD motiv i s chaperonem Hsp90 (Brinker *et al.*, 2002).

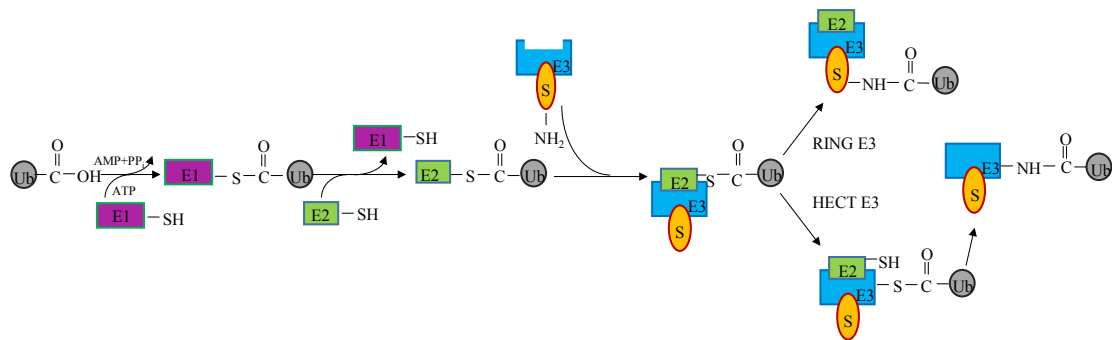
Tomm34 (34 kDa translocase of the outer mitochondrial membrane)

Tomm34 byl identifikován během hledání membránových proteinů zapojených do mitochondriálního importního mechanismu. Obsahuje dvě TPR domény, po jedné na N- a C-konci. Byla zjištěna jeho interakce s Hsp70 a Hsp90 (Faou a Hoogenraad, 2012). Prozatím bylo objasněno, že TPR1 doména je důležitá pro vazbu Hsp70, zatímco TPR2 doména zprostředkovává vazbu na Hsp90 (Trčka *et al.*, 2014).

2.5 Ubikvitin-proteazomový systém (UPS)

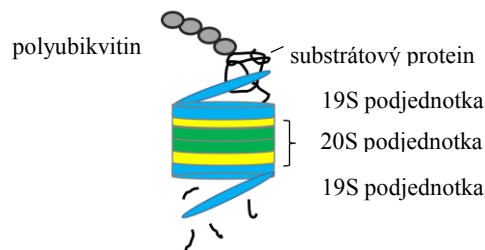
Regulace degradace proteinů je velmi důležitá pro správný vývoj a diferenciaci buněk. Většina proteinů je v buňkách degradována UPS: nejprve jsou proteiny určené k degradaci kovalentně označeny ubikvitinem (76 aminokyselin) a následně podlehnou proteolytické destrukci makromolekulárním proteazomovým komplexem (Johnson, 2015).

Ubikvitinace je uskutečněna kaskádou tří enzymů: E1 (aktivační enzym), E2 (konjugační enzym-přibližně 50 druhů) a E3 (ligační enzym-více než 500 druhů). E1 zahajuje ubikvitinační kaskádu vytvořením thiolesterové vazby mezi jeho cysteinem a C-koncovým glycinem ubikvitinu (Ub), aktivovaný ubikvitin s E1 je poté přenesen transesterifikací na aktivní cystein E2. E3 se substrátem následně váže komplex Ub-E2, přičemž je ubikvitin přenesen na lyzinové zbytky substrátového proteinu (Obr. 11). K tomu, aby mohl být protein degradován, je zapotřebí přítomnost alespoň čtyř ubikvitinů (Fang a Weissman, 2004).



Obr. 11 Schéma ubikvitinační kaskády. Nejprve je na aktivační enzym E1 navázán ubikvitin (Ub). Následně je Ub přenesen na konjugační enzym E2. Substrát (protein, který má být ubikvitinován) je navázán ke specifické E3 ligáze a poté dojde k jejich interakci s E2-Ub. Závěrečným krokem je vazba ubikvitinu na substrátový protein buďto přímo z E2 (RING E3) nebo přes mezikrok (HECT E3).

Polyubikvitinované proteiny jsou následně rozpoznány a degradovány 26S proteazomem, který je složen z katalytické podjednotky 20S a dvěma regulačními podjednotkami 19S (Obr. 12). Jakmile jsou proteiny dopraveny k proteazomu, dochází k jejich deubikvitinaci a rozkladu. Odstranění ubikvitinační značky mají na starosti deubikvitinační enzymy, které jsou v některých případech asociované s víkem podjednotky 19S. Rozložený a deubikvitinovaný protein je následně dopraven do části 20S, která je složena ze čtyř vrstev prstenců majících kaspázovou proteolytickou aktivitu, trypsinovou a chymotrypsinovou aktivitu. Společně pak tyto podjednotky rozloží protein na krátké oligopeptidy (Gallastegui a Groll, 2010, Groll *et al.*, 1997, Johnson, 2015).



Obr. 12 Schéma proteolýzy proteinů 26S proteazomem. Ubikvitinovaný protein je dopraven k proteazomu, kde je substrát deubikvitinován a následně podlehne ve 20S podjednotce proteolýze.

2.5.1 E3-ubikvitin ligázy

E3-ubikvitin ligázy jsou obsáhlou skupinou proteinů, které obsahují jednu z funkčních domén HECT, RING či U-box, které jsou popsány níže. Tyto motivy se vyskytují u stovek proteinových sekvencí, což naznačuje, že by mohly být potenciálními E3 ligázami (Ardley a Robinson, 2005).

HECT doména (homologous to E6-associated protein C-terminus)

Jednou z prvních identifikovaných E3 ligáz byla E6-AP1 (E6-associated protein 1). Později byla v databázích nalezena řada dalších proteinů s podobnou katalytickou

doménou o velikosti přibližně 350 aminokyselin. Zatímco má C-konec HECT doménového proteinu E3 ligázovou aktivitu (obsahuje cysteinová rezidua, která jsou akceptory ubiquitinu), N-konec je zahrnut do vazby substrátu (Huibregtse *et al.*, 1995, Scheffner *et al.*, 1993).

Dalším proteinem s HECT doménou je HUWE1 (HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase) o velikosti 500 kDa. Jeho funkce není zcela objasněna, protože existuje řada protichůdných výsledků. Nicméně bylo zjištěno zvýšené množství genu *Huwe1* v plicním a prsním karcinomu. Substráty HUWE1 jsou např. histony a protein p53 (Adhikary *et al.*, 2005, Bernassola *et al.*, 2008).

RING doména s motivem zinkového prstu (really interesting new gene finger domain)

Rodina RING domén je nejrozsáhlejší skupinou E3 ligáz. Kromě jejich E3 ligázové aktivity se podílí i na řadě protein-proteinových a protein-DNA interakcí. Tato doména je bohatá na aminokyseliny cystein a histidin a obsahuje také dva zinečnaté kationty. Atomy zinku jsou v komplexu s cysteinovými a histidinovými rezidui, čímž je zajištěno správné složení a biologická aktivita RING domény. Kromě RING domén existují i dvě podskupiny: RIR doména (má RING mezi RING-RING doménami a obsahuje pouze jeden zinečnatý kationt) a multiproteinový komplex E3 ligáz (CRL, Cullin-RING E3) (Ardley a Robinson, 2005, Borden a Freemont, 1996, Capili *et al.*, 2004).

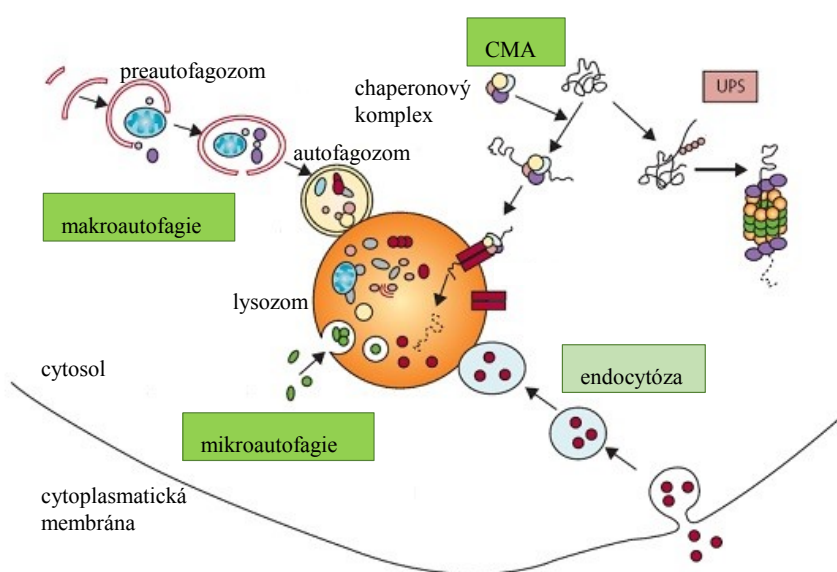
Mezi RING doménové E3 ligázy patří MDM2, která ubiquitinací proteinu p53 reguluje jeho transport z jádra do cytoplasmy k proteazomové degradaci. Za fyziologických podmínek p53 zvyšuje transkripci genu *MDM2*, zatímco ligáza MDM2 snižuje množství p53 (Ardley a Robinson, 2005).

U-boxová doména

U-boxová doména má velikost 74 aminokyselin a ačkoliv jí chybí klíčová rezidua pro vazbu zinečnatých kationtů, je strukturně podobná RING doméně. Mezi nejlépe probádaný protein patří Chip (TPR ko-chaperon, viz výše). Jeho substráty jsou např. CFTR, protein tau, receptor pro glukokortikoidy a transkripční faktor E2A. Substrátovou specifitu E3 ligázy Chip řídí chaperony Hsp70 a Hsp90. Kromě ubiquitinace substrátových proteinů Chip ubiquitínuje také samotný protein Hsp70. Touto ubiquitinací je urychleno snížení množství Hsp70 při vyčerpání substrátových proteinů (Cyr *et al.*, 2002, Qian *et al.*, 2006).

2.6 Autofagie

Degradace proteinů a organel je nezbytná pro správnou funkci buněk a k udržení buněčné homeostáze. Modifikace proteomu pomocí degradace tak umožňuje rychlou adaptaci buněk na změny extracelulárního prostředí, což zajišťuje odstranění poškozených buněčných komponent před tím, než by se mohly stát cytotoxickými. Autofagie je lysozomální systém, který je jedním z hlavních mechanismů udržujících v buňce proteostázu. Podle způsobu jakým jsou proteiny dopravovány do lysozomu, dělíme autofagii na makroautofagii, mikroautofagii a chaperony řízenou autofagii (CMA-chaperone mediated autophagy) (Obr. 13) (Kaushik a Cuervo, 2012, Koga a Cuervo, 2011).



Obr. 13 Autofagie. Prostřednictvím autofagie jsou degradovány např. proteiny a organely. Během **makroautofagie** je nejprve rozpoznán cílový protein či organela, poté jsou postupně ohraničeny membránou, až vznikne autofagozom. Vytvořený autofagozom následně splyne s lysozomem. **Mikroautofagii** jsou degradovány proteiny po invaginaci a následnému začkrvení lysozomální membrány. Chaperony řízená autofagie (**CMA**, chaperone-mediated autophagy) je proces, kdy jsou klientské proteiny po interakci s chaperonovým komplexem přepravovány k adaptérovému receptoru přítomnému na lysozomu. Jakmile je protein v lysozomu, nastane jeho rozklad. Upraveno dle internetového zdroje 1.

2.6.1 Chaperony řízená autofagie (CMA)

CMA je selektivní autofagie aktivovaná zejména během buněčného stresu. Substrátové proteiny (obsahující peptidovou sekvenci KFERQ – Lys, Phe, Glu, Arg, Gln) jsou v cytosolu rozpoznány chaperonovým komplexem Hsc70 se svými ko-chaperony (Dice *et al.*, 1986). Substráty jsou následně dopraveny k povrchu lysozomu, kde jsou navázány na příslušný receptor a translokovány do lysozomu k následnému rozkladu (Tanaka *et al.*, 2000). Touto autofagní drahou jsou proto degradovány pouze solubilní proteiny a nikoli ireverzibilní oligomery např. agregáty a celé organely. S proteinovým komplexem

Hsc70-substrát jsou asociovány proteiny Hsp90, Hsp40, Hip, Hop a Bag-1 (Kaushik a Cuervo, 2012).

2.6.2 Makroautofagie

Makroautofagie neboli chaperony usnadněná selektivní autofagie (CASA, chaperone assisted selective autophagy) je spojována s Hsc70, který váže substrátové proteiny spolu s malým HspB8. Bag3 působí jako ko-chaperon těchto dvou chaperonů a ulehčuje interakci s Chip, který ubikvitinuje substrát (Carra *et al.*, 2008). Vytvoření autofagosomu je řízeno dvěma drahami proteinové konjugace. První je řízen kaskádou Atg (autophagy-related gene) proteinů za vzniku komplexu Atg16L1, který je vystaven na povrch vnější membrány autofagosomu. Druhou je LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3) systém, který je konjugován s fosfatidylethanolaminem na vnější i vnitřní membráně autofagosomu. Kolem agregovaného proteinu je následně vytvořen autofagosom. Jakmile je membrána uzavřena a autofagosom je kompletní, izolovaný agregát je pomocí vezikulární fúze dopraven do lysozomu. Mezi substráty CASA patří např. polyglutaminový huntingtin a velké proteiny (superoxid dismutasa) (Carra *et al.*, 2008, Kaushik a Cuervo, 2012).

2.6.3 Mikroautofagie

Mikroautofagie je proces zahrnující zachycení obsahu cytosolu invaginací lysozomální membrány a následná degradace „uloveného nákladu“ po zaškrvení lysozomální membrány. U selektivní endozomální mikroautofagie jsou substráty obsahující sekvenci KFERQ rozpoznány Hsc70 (stejně jako u CMA), avšak komplex substrát-chaperon nevyžadují přítomnost adaptérového proteinu na membráně vezikul (Kaushik a Cuervo, 2012).

2.7 Klinický význam chaperonů Hsp70 a Hsp90

V předchozích kapitolách byly zmíněny úlohy chaperonů Hsp70/90 v udržování buněčné proteostáze. Její narušení způsobuje řadu chorob, a tudíž v posledních letech vzrůstá zájem o studium mechanismu kontroly kvality proteinů.

Zvýšená exprese jednoho nebo více chaperonů v nádorové tkáni je pozorována u množství nádorových onemocnění. Nadprodukce chaperonů je nezbytná pro manifestaci řady charakteristických znaků nádorových buněk včetně nekontrolovaného růstu, inhibice apoptózy, tvorby metastáz a zvýšené angiogenezi. Je známo, že

molekulární chaperon Hsp90 umožňuje dynamické změny v nádorových buňkách vedoucích k vytvoření buněčného fenotypu rezistentního na aplikovanou medikaci, což umožňuje progresi daného onemocnění. Současně je známo, že jsou pro různé druhy maligních onemocnění charakteristické určité onkogeny, se kterými může interagovat Hsp70. Kromě toho roste poslední dobou i důležitost extracelulárních Hsp, které mají vliv na etiologii nádoru a možná by mohly mít i efekt na nádorovou imunitu a tvorbu metastáz (Calderwood a Gong, 2016).

U neurodegenerativních onemocnění dochází často k nahromadění chybně složených proteinů, jakými jsou např. inkluzní tělíška agregovaného α -synukleinu u Parkinsonovy choroby, polyglutaminové plaky u Huntingtonovy choroby a extracelulární β -amyloidové plaky u Alzheimerovy choroby. Deregulace proteostáze jsou také spojovány s diabetem II. typu a kardiovaskulárními nemocemi (Kim *et al.*, 2013).

2.8 Proteiny LONRF

Do rodiny proteinů LONRF patří proteiny LONRF1, LONRF2 a LONRF3. Jejich alternativní názvy a základní charakteristika jsou uvedeny v Tab. 1. V jejich aminokyselinové sekvenci se nachází RING doména (popsána v kapitole 2.5.1), TPR doména (popsána v kapitole 2.4.3) a N-koncová doména homologní k sekvenci bakteriální Lon proteázy.

Tab. 1 Základní charakteristika proteinů LONRF. Data byla získána z uniprot.org.

Název	Alternativní názvy	Počet aminokyselin	Počet TPR repetit
LONRF1	FLJ23749, RNF191	773	4
LONRF2	FLJ45273, RNF192	754	6
LONRF3	FLJ22612, RNF127	759	4

O proteinech LONRF a expresi jejich genů toho není zatím příliš známo. Zvýšená exprese genu *LONRF1* byla pozorována u kolorektálního karcinomu, kdy byly hledány kandidátní geny zodpovědné za ztrátu heterozygoty přítomné na krátkém raménku chromozomu 8 (Flanagan *et al.*, 2004). Zvýšená exprese genu *LONRF2* byla pozorována u lidských adrenokortikálních buněk H295R po ovlivnění buněk angiotenzinem II (Romero *et al.*, 2004). *LONRF3* byl deregulovaný ve striatu myši při vyřazení ARX ze

své funkce (knock-out). Přičemž ARX je charakteristický pro mentální retardaci a další neurologická onemocnění (Quille *et al.*, 2011).

Lon proteázy jsou multiproteinové enzymy nacházející se ve všech organismech a jsou klíčovými enzymy zodpovědnými za vnitrobuněčnou proteolýzu, čímž přispívají k udržení proteostázy. Veškeré Lon proteázy obsahují ATPázovou doménu patřící k AAA⁺ nadrodině a proteolytickou doménu. Tyto proteázy jsou děleny na dvě skupiny: LonA (má N-doménu) a LonB (bez N-domény) (Lee a Suzuki, 2008, Rotanova *et al.*, 2006). U *Brevibacillus thermoruber* je N-doména dokonce zapojena do oligomerizace Lon proteáz (Lee *et al.*, 2004a). AAA⁺ proteázy jsou součástí mnoha buněčných pochodů včetně translokace organel a proteinů, DNA replikace, transkripce, proteolýzy a rozkladu multiproteinových komplexů (Rotanova *et al.*, 2006). Eukaryotní buňky během odpovědi na stres mezi endoplasmatickým retikulem, jádrem a mitochondrií zvyšují produkci Lon a tím umožňují cytoprotektivní ochranu buňky (Lee a Suzuki, 2008). Dřívější studie ukázaly, že je bakteriální Lon vázán primárně na dvouvláknovou DNA (Chung a Goldberg, 1982). Význam sekvenční homologie proteinů rodiny LONRF s N-koncovým motivem proteázy Lon není znám.

Experimentální část

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Přístrojové vybavení

7900 HT Fast real-time PCR systém (Thermo Fisher Scientific)

fluorescenční mikroskop Eclipse Ti-S (Nikon)

NaNoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific)

T100 Thermal cycler (BioRAD)

3.1.2 Chemikálie

DpnI restriktáza (New England BioLabs, kat. č. R0176)

FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, kat. č. 04913850001)

hmotnostní standard pro SDS-PAGE HyperPAGE ladder (Bioline, kat. č. BIO-33066)

kit pro izolaci plasmidů - maxiprep (QIAGEN)

kit pro izolaci plasmidů - miniprep (QIAGEN)

Koktejl proteázových inhibitorů (Sigma Aldrich, kat.č. P8340) ředěno 1:100

LR klonáza (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 11791100)

1Kb DNA Ladder RTU (GeneDirex, kat. č. DM010-R500)

matrice pro imunoprecipitaci – Dynabeads G protein (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 10003D)

Ni-NTA agarózová matrice (QIAGEN, kat. č. 30210)

Pfu tubro polymeráza (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0502)

QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, kat. č. 28104)

ReverAid H Minus Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0451)

RNeasy mini kit (QIAGEN, kat. č. 74104)

Streptavidin-agarózová matrice (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 20361)

3.1.3 Roztoky a pufry

amidová čern: 0,2% amidová čern v odbarvovacím roztoku

barvicí roztok: 1,2mM Coomassie Brilliant blue R250, 45% MeOH, 10% kyselina octová

blokovací roztok: 5% sušené mléko v PBS s 0,1% Tween-20

Complete sample buffer 2x (CSB): H₂O (6,9 ml), glycerol (2 ml), 0,5% bromfenolová modř v 1M Tris-HCl pH 6,8 (0,5ml), 20% SDS (2 ml), 1M Tris-HCl pH 6,8 (1,2 ml), před použitím přidán 2-merkaptoethanol (1:9)

čínidlo Bradforda: 0,01% Coomassie Brilliant blue R250, 95% EtOH, 85% kyselina fosforečná

ECL (enhanced-chemiluminiscence) A: 0,5mM EDTA, 10mM luminol, 200mM Tris, 405 μ M kyselina kumarová, pH 8,0

ECL B: 0,5mM EDTA, 50mM octan sodný, 8mM perboritan sodný tetrahydrát, pH 5,0

0,5% EGTA: 13mM EGTA ve sterilním PBS, pH 7,0

elektroforetický pufr: 50mM MOPS, 50mM Tris báze, 3,4mM SDS, 1mM EDTA, pH 7,7

Harvest pufr: 10mM HEPES pH 7,9, 50mM NaCl, 0,5M sacharóza, 0,1mM EDTA, 0,5% TritonX-100, těsně před použitím přidán 1mM DTT (dithiothreitol) a inhibitor proteáz 1:100

nanášecí pufr LDS 4x: NuPAGE LDS Sample Buffer: 2-merkapt ethanol 4:1

nanášecí pufr na pro vzorky na agarózový gel 6x: 30% glycerol, 37mM bromfenolová modř

NET pufr: 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris pH 8,0, 1% NP-40

Odbarvovací roztok: 45% MeOH, 10% kyselina octová

PBS: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2mM KH₂PO₄, pH 6,8

PBS Tween-20: PBS s 0,1% Tween-20

Ponceau S: 2,6mM Ponceau-S, 183mM kyselina trichloroctová, 118mM sulfosalicylová kyselina

přenosový (blotovací) pufr: 20% MeOH, 25mM Tris báze, 193mM glycin

pufr A: 10mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA

pufr C: 10mM HEPES pH 7,9, 500mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,1% NP-40 ,před použitím přidán 1mM DTT a 1:100 inhibitor proteáz

SOC (Super optimal broth with catabolite repression): 0,5% kvasinkový extrakt, 2% trypton, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO₄, 20mM glukóza

sterilní PBS: PBS sterilně přefiltrováno ve flowboxu

3.1.4 Růstová média

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium): DMEM, 10% fetální hovězí sérum, 1mM pyruvát, 1% směs antibiotik (penicilin a streptomycin)

LB (Luria broth) médium pro kultivaci bakteriálních buněk: 10g Bacto-trytone, 5g Bacto-yeast extract, 10g NaCl, doplněno do 1l redestilovanou H₂O, pH 7,0, autoklávováno

bezserové médium: DMEM bez aditiv

3.1.5 Buněčné linie

Prokaryotické:

Bakteriální kmen *E. coli* BL21-(D3)-RIPL

Bakteriální kmen *E. coli* TOP10

Eukaryotické (lidské):

HEK 293 – buněčná linie odvozená od embryonálních buněk ledvin

MCF-7 – buněčná linie odvozená od karcinomu prsu

H1299-N-SBP-Hsp70 – stabilně transfekovaná buněčná linie odvozená od nemalobuněčného plicního karcinomu exprimující SBP-Hsp70

H1299-N-SBP-Hsp90 - stabilně transfekovaná buněčná linie odvozená od nemalobuněčného plicního karcinomu exprimující SBP-Hsp90

3.1.6 Protilátky

primární protilátky:

anti- α -tubulin (Sigma Aldrich, T6074)

anti-HA (Moravian biotechnology)

anti-HSF-1-S326-p (Gene Tex, 821403890)

anti-Hsp70 (Moravian biotechnology)

anti-Hsp90 (Moravian biotechnology)

anti-Chip klon 11.1 (Moravian biotechnology)

anti-PARP-1 (Merck Milipore, AM30)

sekundární protilátky:

protilátka proti myši s konjugovanou peroxidázou (DAKO)

protilátka proti králíkovi s konjugovanou peroxidázou (DAKO)

3.2 Metody

3.2.1 Klonování lidských genů: LR reakce

Rekombinační klonování pomocí Gateway technologie je rychlým a přesným nástrojem pro klonování potřebných sekvencí, kdy je zachována orientace vloženého úseku a nejsou zapotřebí restriční enzymy. Nejprve byly příslušné sekvence vloženy do donorového vektoru za vzniku univerzální vstupních vektorů (BP reakce) (Hunt, 2005). Použité vstupní vektory připravily již dříve pracovníci RECAMO (Tab. 2).

Se vstupními vektory se sekvencemi genů (*LONRF3*, *Hsp70*, *Hsp70Δ*, *Hsp90* a *Hsp90Δ*) byla provedena rekombinační LR reakce s příslušným destinačním vektorem (Schéma 1, Tab. 2).

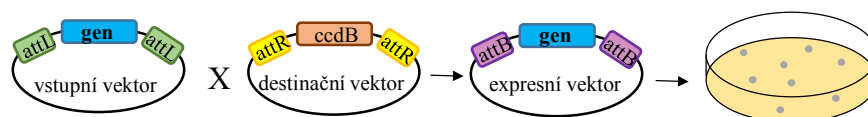


Schéma 1 Průběh LR reakce. Sekvenci klonovaného genu nesoucího vstupní vektor můžeme jednoduše vložit do příslušného destinačního vektoru pomocí enzymu LR klonázy (Gateway technologie, Invitrogen). K rekombinaci dochází mezi sekvencemi attL a attR. Získaný expresní vektor je následně transformován do bakteriálního kmene *E. coli* BL21-(DE3)-RIPL nebo TOP10. Růst *E. coli* probíhá na agarových plotnách se selekčními antibiotiky. X znázorňuje rekombinaci.

LR reakce probíhala v reakčním objemu 7 μ l a obsahovala 150 ng vstupního vektoru, 150 ng destinačního vektoru, EB pufr a 1,2 μ l LR klonázy. Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty. Následně byl k rekombinační směsi přidán 1 μ l proteinázy K (kvůli inaktivaci klonázy), směs byla inkubována 10 min při 37 $^{\circ}$ C. Po rekombinační reakci byla provedena transformace do bakteriálního kmene *E. coli* BL21-(D3)-RIPL (pro produkci proteinů) či *E. coli* TOP10 (pro produkci plasmidů). (Průběh transformace je popsán v kapitole 3.2.2.). Bakterie byly kultivovány na pevném LB médiu s přidanými selekčními antibiotiky ampicilinem (100 μ g/ml) a chloramfenikolem (30 μ g/ml) pro kmen RIPL a pouze ampicilinem (100 μ g/ml) pro kmen TOP10.

Tab. 2 Vstupní a destinační vektory použité v LR reakci. Vstupní vektor pENTR221-LONRF3-del₄₁₉KKRK₄₂₂-Flc byl připraven cílenou mutagenezí, která je popsána v kapitole 3.2.11. del = delece, SBP = streptavidin binding peptide, TEV = sekvence rozeznávaná TEV proteázou.

Vstupní vektory	Destinační vektory
pENTR221-rbs-LONRF3-Fls	pDEST15-N-His ₆ -GST-GW
pENTR221-tev-LONRF3-Fls	pDEST17-N-His ₆
pENTR221-rbs-LONRF3-Flc	pcDNA3-C-mCherry-GW-DEST
pENTR221-LONRF3del ₄₁₉ KKRK ₄₂₂ -Flc	pT7-N-SBP
pENTR221-tev-Hsp70Δ	
pENTR221-tev-Hsp70	
pENTR221-tev-Hsp90α	
pENTR221-tev-Hsp90Δ	

3.2.2 Transformace bakterií

K příslušnému rozmrazenému bakteriálnímu kmeni byla přidána DNA, se kterou proběhla inkubace na ledu 20-30 min. Následoval tepelný šok při 42 °C na 30 s a poté opět inkubace na ledu (2 min). K transformační směsi byl přidán 1 ml SOC média a celá směs byla inkubována 50-60 minut na 37 °C na třepačce. Bakteriální suspenze byla stočena (2000g, 5 minut), supernatant dekantován, pelet rozsuspendován a následně rozetřen na bakteriální plotnu.

3.2.3 Produkce proteinů v *E. coli* a jejich purifikace

Za účelem produkce proteinů byly klonované geny exprimovány v bakteriálním produkčním kmeni *E. coli* BL21-(D3)-RIPL umožňující efektivní expresi eukaryotních genů. Kódující sekvence genů pro proteiny LONRF3, Hsp70, Hsp70Δ, Hsp90 a Hsp90Δ byly klonovány do vektoru pT7 kódujícího N-terminální SBP (streptavidin-binding peptide) značku. Sekvence pro LONRF3 protein byla navíc klonována do vektoru pDEST15 kódujícího N-terminální His₆-GST značku, pDEST17 kódujícího N-terminální His₆ značku a také pDEST17, který kromě His₆ značky obsahuje i rozpoznávací místo pro TEV proteázu.

Bakteriální kultury byly kultivovány v LB médiu (s antibiotiky chloramfenikolem 30 µg/ml a ampicilinem 100 µg/ml) při 37 °C do optické hustoty (OD₆₀₀) 0,5. Indukce genové exprese byla provedena přidávkem 1mM IPTG (isopropyl-β-D-thioglukopyranosid) a probíhala při 30 °C po dobu 3 h. Bakteriální kultury byly peletovány centrifugací po dobu 10 min při otáčkách 5000g. Lyze probíhala

v následujících pufrách: 50mM HEPES, 100mM NaCl, 200mM KCl, 10% glycerol, 10 ng/μl avidin, 1mM PMSF a 1 mg/ml lysozym, pH 7,4 pro lyzi buněk produkujících SBP-Hsp70 a SBP-Hsp90 a 50mM HEPES pH 7,5, 0,3% sarkosyl (*N*-laurylsarcosin), 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) pro lyzi buněk produkujících LONRF3. Lyze byla usnadněna 15 min sonikací v režimu 8s pulz/52s pauza. Lyzáty byly připraveny centrifugací po dobu 30 min na 12000g.

His₆-rbs-LONRF3 a His₆-tev-LONRF3 byly purifikovány na koloně obsahující Ni-NTA agarózovou matici. His₆ značka vytváří komplex s Ni²⁺, takže je na matici navázán požadovaný protein a ostatní proteiny a nečistoty jsou vymyty (Schéma 2). K lyzátům byl před inkubací s maticí přidán TritonX-100 v konečné koncentraci 2 %. Inkubace s maticí probíhala 1 hod při 4 °C na rotační třepačce. Nenavázané proteiny byly odmyty pufrém 50mM HEPES pH 7,5 a navázaný His₆ značený protein byl eluován 250mM imidazolem v 50mM HEPES pH 7,5. Imidazol byl následně odstraněn pomocí odsolovacích kolon Zeba 7K (Thermo Scientific) a výsledná koncentrace purifikovaných proteinů byla stanovena spektrofotometricky (Nanodrop).

U proteinu His₆-tev-LONRF3 byla odštěpena His₆ značka přidáním TEV proteázy v poměru 1:5 (TEV proteáza:štěpený protein) v pufru obsahujícím 50mM HEPES pH 7,5, 0,3mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) a 0,5mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Reakce probíhala přes noc při 4 °C, následně bylo k reakci přidáno MgCl₂ v konečné koncentraci 1 mM a inkubováno 5 min na ledu. Odštěpená His₆ značka byla zachycena inkubací s Ni-NTA agarózovou maticí.

Přečištění proteinů se SBP značkou proběhlo následovně: Na streptavidinové matici byly vázány proteiny přes SBP značku, matrice byla promyta pufrém 25mM HEPES pH 7,5, 100mM KAc (acetát draselný), 2mM MgCl₂ a navázané proteiny byly eluovány 2mM biotinem.

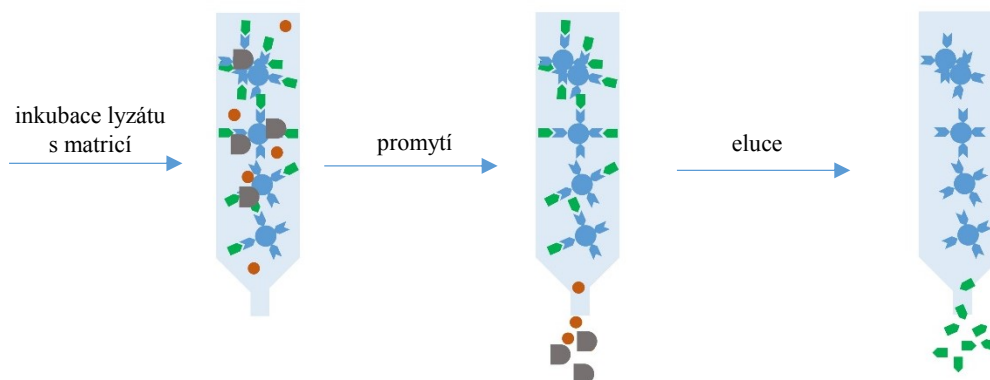


Schéma 2 Znázornění principu purifikace proteinů pomocí specifických značek. Nejprve je bakteriální lyzát inkubován s příslušnou maticí, přičemž dochází ke specifické vazbě mezi proteinem se značkou

a zvolenou maticí. Následuje promytí, kdy jsou odstraněny nežádoucí proteiny a kontaminace a na závěr je eluován navázaný protein.

3.2.4 SDS-PAGE

Ke vzorkům lyzátů a purifikovaných proteinů pro SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsíránem sodným) bylo přidáno 4xLDS v poměru 3:1. Vzorky byly 5-10 minut povařeny. Bakteriální pelety byly rozsuspendovány v horkém 2x CSB s 2-merkaptanoethanolem, 10 minut povařeny a pulsně stočeny v centrifuze. Pro SDS-PAGE byl použit 5% zaostřovací gel a 10% dělicí gel a elektroforetický pufr (Tab. 3). Separace probíhala nejprve 10 min na 90V a poté 60-90 minut na 135V. Gely byly dle potřeby buďto obarveny Coomassie nebo byly použity pro přenos proteinů na membránu.

Tab. 3 Složení zaostřovacího a dělicího gelu pro SDS-PAGE.

	Zaostřovací gel (5%)	Dělicí gel (10%)
H ₂ O	0,4 ml	1,18 ml
30% <i>N,N'</i> -metylenbisakrylamid	1,8 ml	1,96 ml
1,5M Tris pH 8,8		1 ml
0,5M Tris pH 6,8	0,25 ml	
20% SDS	12 μl	20 μl
10% APS	17 μl	12 μl
TEMED	5 μl	18 μl

3.2.5 Coomassie barvení

Gel byl po ukončení SDS-PAGE omyt deionizovanou vodou a poté fixován v odbarvovacím roztoku po dobu 5 min. Následně byl gel barven přibližně 60 minut v barvicím roztoku a poté byl odbarven odbarvovacím roztokem, přičemž byl roztok dle potřeby několikrát vyměněn. Odbarvení probíhalo, dokud nebyly jednotlivé proužky dobře pozorovatelné.

3.2.6 Přenos proteinů na membránu (westernový přenos) a imunodetekce

Pro přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu byl použit gel po SDS-PAGE. Aparatura byla sestavena v pořadí: houba, 2x papír Whatman, gel, nitrocelulóзовá membrána, 2x papír Whatman a houba. Samotný přenos proteinů probíhal v přenosovém pufru 1 h při napětí 100 V. Pro kontrolu úspěšnosti byla membrána obarvena v Ponceau S. Následně byla membrána blokována po dobu 1 h v 5% mléku s PBS 0,1% Tween-20. Poté byly na membránu naneseny primární protilátky v ředění 1:1000 v blokovacím

roztoku a byly inkubovány přes noc při 4 °C. Během práce byly použity primární protilátky: anti- α -tubulin, anti-HA, anti-HSF1-S236-p, anti-Hsp70, anti-Hsp90 a anti-PARP-1. Následovalo 3x promytí 15 min v PBS 0,1% Tween-20 a nanesení sekundární protilátky. Sekundární protilátky byly značeny peroxidázou a ředěny 1:3000 opět v 5% mléku v PBS 0,1% Tween-20 a inkubovány na membráně 1 h za laboratorní teploty. Poté byla membrána 4x omyta 5 min v PBS 0,1% Tween-20 a 2x omyta PBS. K vizualizaci navázaných sekundárních protilátek byl připraven roztok ECL smícháním ECL A s ECL B v poměru 1:1 (nebo femtoECL). Signál byl detekován na fotografickém filmu. Dle potřeby byly membrány pro kontrolu nanesení vzorků nespecificky obarveny amidočerní.

3.2.7 Kultivace, transfekce, sklizení a lyze eukaryotických buněk

Použité buněčné linie byly kultivovány v médiu DMEM s přidavkem 10% fetálního hovězího séra, 1mM pyruvátu a 1% směsi streptomycinu/penicilinu v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C. Dle potřeby byly buňky pasážovány (maximálně třikrát) při 90% konfluenci trypsinem.

Pro přechodnou transfekci byly použity plasmidy: pCMV-N-HA-LONRF1, pCMV-N-HA-LONRF2, pCMV-N-HA-LONRF3, pCMV-N-HA-GFP, pcDNA3-LONRF3-C-mCherry. Přechodně byly transfekovány buněčné linie HEK293, H1299-N-SBP-Hsp70 a H1299-N-SBP-Hsp90 při 70% konfluenci a transfekční směs byla připravena v bezsérovém médiu v poměru 3 μ l transfekčního činidla PEI/ 1 μ g DNA. Buňky byly následně sklizeny 16 h po transfekci. Pro kontrolu úspěšnosti transfekce byl použit konstrukt pCMV-HA-GFP.

Při sklizení byly buňky seškrabány do média, přeneseny do zkumavky a centrifugovány 5 min na 2000 g při 4 °C ve výkyvném rotoru. Supernatant byl odsán, pelet promyt studeným PBS a následně opět za stejných podmínek centrifugován. Poté byl pelet ještě jednou promyt stejným způsobem. Připravený pelet byl buďto zamrazen na -20 °C nebo rovnou podroben lyzi. Ovlivněné buňky pro analýzu qRT-PCR byly sklizeny ve sterilních podmínkách trypsinizací. Centrifugace a promytí probíhalo dle předchozího postupu.

Buňky transfekované konstrukty pCMV-N-HA-LONRF1-3 určenými pro následnou charakterizaci protilátek anti-LONRF3 byly lyzovány na ledu v NET pufru s přidaným inhibitorem proteáz 1:100. Buněčná suspenze byla homogenizována pulsní sonikací (3 krát 3 s), centrifugována 15 min při 4 °C na 21000 g a supernatant byl zamrazen na -20 °C. Lyze buněk pro SBP pull-down je popsána v kapitole 3.2.8.1.

3.2.8 Detekce protein-proteinových interakcí

3.2.8.1 SBP pull-down

SBP pull-down byl prováděn u lyzátů eukaryotických buněk H1299-SBP-Hsp70 a H1299-SBP-Hsp90 transfekovaných plasmidem kódujícím protein LONRF3. Dále pak s purifikovanými bakteriálně produkovanými proteiny SBP-Hsp70, SBP-Hsp70 Δ , SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90 Δ a lyzátem buněk HEK293 s ektopickou expresí HA-LONRF3. Pelety buněk H1299-SBP-Hsp70 a H1299-SBP-Hsp90 byly rozděleny na 4 díly a byly lyzovány v pufrech 50mM Hepes pH 7,5, 50mM KCl, 100mM KAc, 2mM MgCl₂, 1:100 avidin, 1:100 inhibitor proteáz s 1) 0,5% CHAPS 2) 0,5% CHAPS s benzonázou (1:2000) 3) 0,5% NP-40 nebo 4) 0,5% NP-40 s benzonázou (1:2000). Pro kontrolu specifity analyzovaných interakcí byly připravené lyzáty inkubovány s C-terminálními peptidy Hsp70/Hsp90 (GGSGSGPTIEEVD, GDDDTSRMEEVD) v konečné koncentraci 100 μ M (Schéma 3). Eluce probíhala 2mM biotinem opět v příslušném lyzačním pufru (bez biotinu a avidinu). U SBP pull-downu s čistými proteiny byly nejprve s maticí inkubovány 30 min čisté proteiny a poté byla frakce třikrát promyta 50mM Hepes, pH 7,5, 50mM KAc a 2mM MgCl₂. K navázaným proteinům byl následně přidán lyzát buněk linie HEK293 s ektopickou expresí HA-LONRF3, proběhla inkubace 1 h při 4 °C na rotační třepačce a poté byla matrice promyta příslušnými pufrů. Eluce probíhala 2mM biotinem opět v příslušném lyzačním pufru (bez biotinu a avidinu). Vzorky byly smíchány se 4xLDS a byly připraveny pro přenos proteinů na membránu s imunodetekcí.

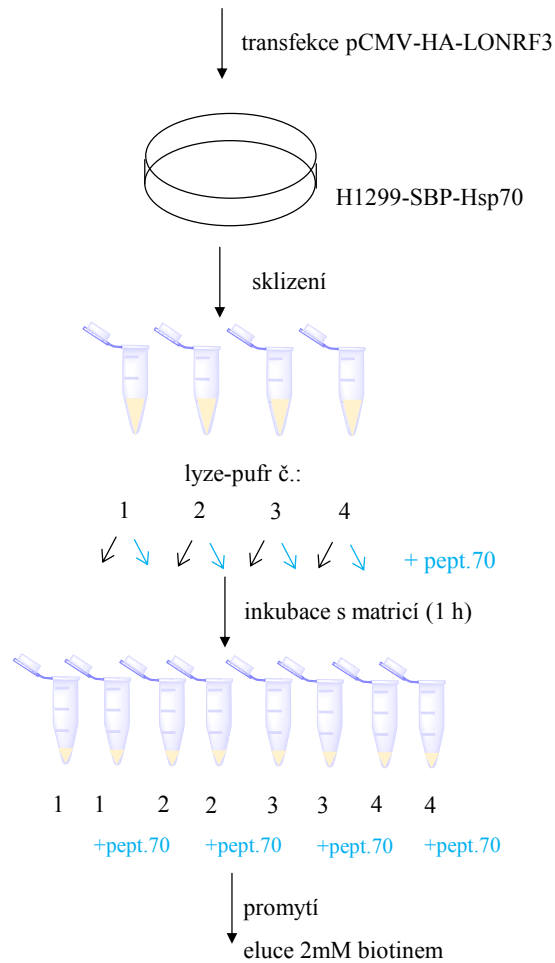


Schéma 3 SBP pull-downu H1299-SBP-Hsp70 s ektopickou expresí HA-LONRF3. Nejprve byl k buněčné linii transfekován plasmid exprimující protein HA-LONRF3. Po 16 h byly buňky sklizeny a pelety rozděleny na 4 části. Následovala lyze v pufrech 50mM Hepes pH 7,5, 50mM KCl, 100mM KAc, 2mM MgCl₂, 1:100 avidin, 1:100 inhibitor proteáz s 1) 0,5% CHAPS 2) 0,5% CHAPS a s benzonázou (1:2000) 3) 0,5% NP-40 nebo 4) 0,5% NP-40 s benzonázou (1:2000). V dalším kroku byl každý lyzát rozdělen na dvě části a k jedné byly ještě přidány C-terminální peptidy Hsp70. Takto připravené lyzáty byly inkubovány se straptavidin-agarózovou maticí. Po inkubaci byla matrice promyta v příslušných lyzačních pufrech bez avidinu a inhibitoru proteáz. Precipitáty byly eluovány 2mM biotinem opět v příslušných pufrech bez avidinu a inhibitoru proteáz. pept.70 = peptidy Hsp70

3.2.8.2 Imunoprecipitace

Buňky transfekované pCMV-N-HA-LONRF3 a pCMV-N-HA-GFP byly sklizeny při 90% konfluenci a lyzovány sonikací v pufre NET (50mM Tris pH 8,0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,1% NP-40) s inhibitorem proteáz s ředěním 1:100. Protein-G-matrice (30 µl/supernatant) byla inkubována 30 min se supernatanty kultivovaných hybridomů (8C8, 2G7, 5F12, 4C7, 6F5, 5A5, 4E10, 5G3; každá 500 µl) a následně byla matrice s navázanými protilátkami třikrát promyta NET pufrem. Jako kontrola sloužila inkubace protein-G-matrice s lyzátem buněk transfekovaných konstruktem kódujícím HA-GFP. Matrice s protilátkami či GFP byla 16 h při 4 °C inkubována s proteinovými lyzáty buněk s ektopickou expresí HA-LONRF3 a poté opět třikrát promyta NET pufrem. Jelikož byly

precipitáty eluovány nespecificky varem, byly vzorky přemístěny do nových zkumavek a následně povařeny v 1xLDS. Vzorky byly detekovány přenosem proteinů na membránu s imunodetekcí protilátkou anti-HA.

3.2.9 Frakcionace buněk linie MCF-7

Buňky MCF-7 byly ovlivněny 100nM bortezomibem nebo DMSO (0,1%) po dobu 16 h. Buňky byly sklizeny (kapitola 3.2.7), zlyzovány Harvest pufrem (před použitím přidán 1mM DTT a inhibitor proteáz 1:100) a inkubovány 15 min na ledu. Lyzát byl stočen v centrifuze s výkyvným rotorem (250 g, 5 min, 4 °C). V této fázi jsou v supernatantu membránové a cytoplasmatické proteiny. Supernatant byl tedy opatrně přemístěn do nové zkumavky, stočen (21000 g, 15 min, 4 °C) a opět přemístěn do nové zkumavky. Pelet, který vznikl po lyzi buněk, byl rozsuspendován v pufru A, stočen v centrifuze (250 g, 10 min, 4 °C) a supernatant byl odsán do odpadu. Na závěr byl k peletu přidán pufr C s přidáním 1mM DTT a inhibitorem proteáz (1:100). Následovala homogenizace vzorku třepáním (vortex) po dobu 5 min a stočení v centrifuze (21000 g, 15 min, 4 °C). V supernatantu se nachází jaderné proteiny. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky. V jednotlivých frakcích byla změřena koncentrace proteinů metodou dle Bradforda (3.2.10) a následně byly vzorky analyzovány westernovým přenosem a úspěšnost frakcionace ověřena pomocí anti- α -tubulin a anti-PARP1 protilátek.

3.2.10 Měření koncentrace proteinů metodou Bradforda

Koncentrace proteinů byla měřena pro vzorky získané frakcionací na jaderné a membránové + cytoplasmatické proteiny. Nejprve byly připraveny vzorky pro sestavení kalibrační křivky. Jelikož byla získaná jaderná frakce v pufru C a cytoplasmatická v Harvest pufru, bylo potřeba přichystat dvě kalibrační řady s proteinovým standardem BSA o koncentracích: 0,1; 0,5; 1; 1,5 a 2 mg/ml rozpuštěných v příslušných pufrech. Připravené vzorky pro kalibrační křivku, jaderné a cytoplasmatické proteiny byly aplikovány v triplicátech po 1 μ l do mikrotitrační destičky. Pro odečtení pozadí, byly do mikrotitrační destičky přidány i triplicáty 1 μ l pufru C a Harvest pufru. Vzorky byly následně inkubovány ve tmě 10 min s 200 μ l Bradfordova činidla a následně změřena absorbance na spektrofotometru (Tecan) při 595 nm. Z kalibračních křivek byly vypočítány koncentrace cytoplasmatických a jaderných proteinů.

3.2.11 Cílená mutageneze

Cílená změna (delece) v nukleotidové sekvenci byla provedena pomocí navržených mutagenních primerů a extenzi primerů zajišťovala *Pfu turbo* polymeráza. Templátovou DNA byl vektor pENTR221-LONRF3-F1c (50 ng). Složení reakční směsi je uvedeno v (Tab. 4) a polymerázová řetězová reakce probíhala podle podmínek uvedených v (Tab. 5). Vzniklé amplikony byly naštěpeny 1 μ l *DpnI* restriktázou (1 h, 37 °C), která štěpí methylovanou DNA (vstupní vektor). Následně byla směs transformována do bakteriálního kmene *E. coli* TOP10 a transformační směs byla pěstována na pevném médiu s antibiotikem kanamycinem o koncentraci 50 μ g/ml. Z narostlých kolonií byla následně vybrána jedna, jež byla transformována do 10 ml LB média s kanamycinem (50 μ g/ml) a byla inkubována přes noc na třepačce při 37 °C. Následně byly z bakterií vyzolovány plasmidy pomocí miniprepu (3.2.12.) Úspěšnost cílené mutageneze byla ověřena sekvenací. Sekvenační reakce obsahovala 400 ng plasmidu a 2,5 μ M primeru (M13F/M13R/LONRF3-mid-F/LONRF3-mid-R) v celkovém objemu 10 μ l. Sekvence byly sestaveny proti sekvenci genu *LONRF3* do souvislého kontigu pomocí programu SeqManPro (Lasergene).

Primery použité pro cílenou mutagenezi:

LONRF3del₄₁₉KKRK₄₂₂ F: 5' gattcaatctggcaatgttcctggcattttccag 3'

LONRF3del₄₁₉KKRK₄₂₂ R: 5' ctggaaaatgccaggaacattgccagattgaatc 3'

Primery použité pro sekvenační reakci:

M13F: 5' gtaaacgacggccagt 3'

M13R: 5' aacagctatgaccatg 3'

LONRF3-mid-F: 5' tttgtaaactgtgcctggaacg 3'

LONRF3-mid-R: 5' gcctgtctcaatgcatctacg 3'

Tab. 4 Složení reakční směsi pro mutagení PCR.

Složky reakční směsi	Objem (μl)
H ₂ O	37
Reakční pufr 10x	5
DNA (50ng/μl)	1
Primer R (10 μM)	1
Primer F (10 μM)	1
dNTP (zás. 10mM)	4
<i>Pfu turbo</i> polymeráza	1

Tab. 5 Podmínky pro průběh PCR.

94 °C	30 s
54 °C	1 min 12 cyklů
68 °C	5 min
4°C	∞

3.2.12 Izolace plasmidové DNA pomocí kolon QIAGEN (miniprep)

1. 1 kolonie byla inokulována v 5 ml LB média s antibiotikem a inkubována na 37 °C 8-20 h.
2. Kultura byla centrifugována na 21000 g/5 min/4 °C a supernatant dekantován.
3. Pelet rozsuspendován pufrem P1 (250 μl).
4. Přidán pufr P2 (250 μl), jemně pokýváno dokud roztok nezmodral.
5. Přidán pufr N3 (350 μl), promícháno.
6. Centrifugace 21000 g/10 min/4 °C.
7. Supernatant nanesen na kolonku.
8. Přidán pufr PB (500 μl), centrifugace 21000 g/1min.
9. Přidán pufr PE (800 μl), centrifugace 21000 g/1 min.
10. Centrifugace na 21000 g 1 min.
11. Eluce EB pufrem (50 μl).

3.2.13 Izolace plasmidové DNA pomocí kolon QIAGEN (maxiprep)

1. Inokulovaná bakteriální kultura v LB médiu (200 ml) byla centrifugována na 12000 g/10 min/4 °C, supernatant dekantován.
2. Pelet rozsuspendován v pufru P1 (10 ml).
3. Přidán pufr P2 (10 ml).
4. Přidán pufr P3 (10 ml), inkubováno 20 min na ledu, občas jemně promícháno.
5. Centrifugace na 12000 g/30 min/4 °C.
6. Ekvilibrace kolony pufrem QBT (10 ml).
7. Supernatant nanesen na kolonu.
8. Kolona promyta dvakrát QC pufrem (30 ml).

9. DNA eluována QF pufrem (15 ml).
10. Přidán 96% EtOH (25 ml), centrifugace 12000g/30 min/4 °C.
11. Supernatant opatrně dekantován a pelet omyt 70% EtOH (5 ml). Centrifugace 12000 g/10 min.
12. Po vysušení pelet rozpuštěn v EB pufriu.

3.2.14 Izolace RNA

Buňky linie MCF-7 byly ovlivněny DMSO (0,1%), bortezomibem (100nM), 17-AAG (2 μM), AUY922 (10nM) a puromycinem (0,5 μg/ml) a inkubovány 16 h. Druhý den byly buňky sklizeny (kapitola 3.2.7). Izolace RNA byla provedena kitem RNeasy mini kit (QIAGEN). Lyze peletu buněk byla provedena RLT pufrem (350 μl) (k pufriu byl přidán 2-merkptoethanol 10 μl do 1 ml RLT). Do homogenního lyzátu byl následně přidán 70% EtOH (350 μl), směs byla dobře promíchána. Následně byl vzorek nanesen na kolony centrifugací (centrifugace 15 s na 8000 g). Kolony promyty postupně: pufrem RW1 (700 μl, 15 s 8000 g), dvakrát pufrem RPE (500 μl, 15 s 8000 g) a centrifugace 2 min na 8000g. RNA byla eluována RNase-free vodou (50 μl, 1 min 8000 g). RNA byla zamrazena na -80 °C.

3.2.15 Syntéza cDNA

Reverzní transkripce vyizolovaných RNA proběhla pomocí ReverAid H Minus Reverse Transcriptase podle protokolu Thermo Fisher Scientific. Nejprve byla připravena směs celkové RNA (1 μg), náhodných hexamerů (0,2 μg) a RNase-free vody v celkovém objemu 12,5 μl a byla inkubována 5 min při 65 °C a poté dána na led. Dále byla připravena reakční směs obsahující 5x reakční pufr (4 μl), Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (0,5 μl, 20 U), dNTP Mix každý 10mM (2 μl) a RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (1 μl, 200 U). K této směsi bylo po inkubaci přidáno 12,5 μl směsi s RNA a primery. Celková směs byla následně inkubována 10 min na 25 °C a poté 60 min na 42 °C. Na závěr byla reakce ukončena zahřátím na 70 °C po dobu 10 minut. Vzniklá cDNA byla uchována na -20 °C.

3.2.16 qRT-PCR

Pro sestavení kalibrační řady o známém počtu kopií DNA byla nejprve provedena PCR reakce pro amplifikaci *LONRF3* o složení reakční směsi uvedeném v Tab. 6, přičemž nastavení reakce proběhlo podle podmínek uvedených v Tab. 7. Templátovou DNA byl

plasmid pENTR221-LONRF3. PCR produkty byly následně přečištěny pomocí kolonek QIAquick PCR purification kit (QIAGEN).

Použité primery:

LONRF3RT R: 5' gcgcctcttgccatgct 3'

LONRF3RT F: 5' ggccatcccaccgttcc 3'

Tab. 6 Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci genu *LONRF3*. Templátovou DNA byl pENTR221-LONRF3. Sekvence primerů je uvedena nad tabulkou.

Komponenty	Objem (μl)
5x Green GoTag Flexi Buffer	10
MgCl ₂ (zás. 25mM)	2
PCR nucleotide mix (10mM každý)	1
Primer R	1
Primer F	1
Templátová DNA	1
Nuclease-free voda	33,5
5U/μl GoTag HotStart polymerase	0,5
	50 μl

Tab. 7 Reakční podmínky pro PCR genu *LONRF3*.

95 °C	3 min	34 cyklů
95 °C	30 s	
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	2 min	
4°C	∞	

Po změření koncentrací byl spočítán počet kopií (pomocí molekulové hmotnosti amplifikované DNA, koncentrace a Avogadrovy konstanty) a byla připravena koncentrační řada pro následnou qRT-PCR (12 vzorků s počty kopií ampliconů $1 \cdot 10^{12}$ až $1 \cdot 10^1/\mu\text{l}$). Reakční směs pro qRT-PCR byla připravena podle Tab. 8 a reakce proběhla podle podmínek uvedených v (Tab. 9). Po ukončení qRT-PCR bylo provedeno měření disociační křivky (95 °C 15 s, 60 °C 15 s).

Tab. 8 Složení PCR směsi po qRT-PCR.

Syber Green	5 μl
Primer R LONRF3	0,5 μl
Primer F LONRF3	0,5 μl
H ₂ O	3 μl
cDNA	1 μl

Tab. 9 Podmínky pro qRT-PCR.

50 °C	2 min	40 cyklů
95 °C	10 min	
95 °C	15 s	
60 °C	1 min	

3.2.17 Limitovaná proteolýza

Pro limitovanou proteolýzu byl použit vyprodukovaný protein N-His₆-rbs-LONRF3. Na reakci byly použity 4 µg proteinu, 400µM ATP/ADP a 32 ng/µl trypsinu v 25mM HEPES pH 7,5, 100mM KAc, 2mM MgCl₂ a celkovém reakčním objemu 10 µl. Proteolýza probíhala v časech 0, 1, 10 a 60 min a byla ukončena přidáním nanášecího pufru 4xLDS (1:3). Následně byly vzorky nanášeny na polyakrylamidový gel pro následné Coomassie barvení.

3.2.18 Vodík/deuteriová výměna s MS (HDX – Hydrogen/Deuterium Exchange)

Pro analýzu struktury metodou HDX byl použit protein N-His₆-rbs-LONRF3 převedený do pufru 25mM HEPES, 50mM KAc, pH 7,4. Vzorek byl 10krát naředěn v deuterovaném pufru (25mM HEPES, 50mM KAc, pD 7,0) do celkového objemu 60 µl. Deuterace byla zastavena v časových intervalech 30s, 5 min, 1 h a 3 h přidavkem 10 µl 1M glycinu, pH 2,3 a rychlým zmrazením v tekutém dusíku. Množství proteinu, použitého v každém vzorku, bylo 250 pmol. Současně s deuterovanými vzorky byl připraven i nedeuterovaný vzorek, který sloužil pro peptidové mapování (HPLC-MS/MS) a jako vzorek v čase 0 s. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátech.

Průběh HPLC analýzy probíhal následovně: Vzorky byly rychle rozpuštěny a injektovány na kolonu s imobilizovaným pepsinem. Štěpení probíhalo ve vodním roztoku 2% acetonitrilu a 0,05% triflouroctové kyseliny při průtoku 20 µl/min. Peptidy byly zachyceny a odsoleny na koloně peptide microtrap (Michrom Bioresources), následně eluovány na analytickou kolonu (Jupiter C18, 1.0 × 50 mm, 5 µm, 300 Å, Phenomenex) a separovány lineárním gradientem roztoku B (10-40%) během 29 min. při průtoku 20 µl/min. Použity byly roztoky: A – vodní roztok 0,1% kyseliny mravenčí, B – vodní roztok 80% acetonitrilu a 0,08% kyseliny mravenčí. Všechny složky chromatografie byly uchovávány při 0°C, aby došlo k minimalizaci zpětné výměny. Výstup chromatografu byl napojen na ionizační zdroj ESI (Electrospray ionization) hmotnostního spektrometru.

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji ESI-Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific). Pro peptidové mapování (HPLC-MS/MS) byl přístroj nastaven na „data-dependent“ mód. Každý MS sken byl následován MS/MS skenem tří nejintenzivnějších iontů. Tandemová MS spektra byla prohledána s použitím SequestHT proti databázi obsahující sekvenci proteinu LONRF3. Sekvenční pokrytí bylo vizualizováno pomocí softwaru Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fischer Scientific).

Analýza deuterovaných vzorků byla provedena softwarem HD Examiner 1.4 (Sierra Analytics). Korekce pro zpětnou výměnu nebyla provedena. Průměrná deuterace jednotlivých aminokyselin byla vypočtena takto: Procento deuterace D_j aminokyseliny j bylo vypočteno jako vážený průměr procenta deuterace všech peptidů obsahujících danou aminokyselinu, váha byla nepřímo úměrná délce peptidu:

$$D_j = \frac{\sum_{i=1}^n D_{ji} \frac{L_j}{l_{ji}}}{\sum_{i=1}^n \frac{L_j}{l_{ji}}}$$

kde j je pozice aminokyseliny, n je počet peptidů obsahujících j -tou aminokyselinu, i je index peptidu mezi všemi n peptidy obsahujícími j -tou aminokyselinu, D_{ji} je procento deuterace i -tého peptidu obsahujícího j -tou aminokyselinu, l_{ji} je délka i -tého peptidu obsahujícího j -tou aminokyselinu, L_j je suma $l_{ji}(l_{ji})$.

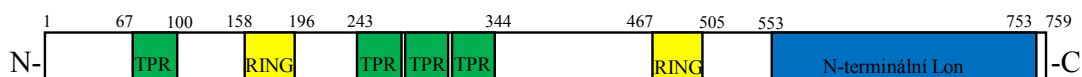
4 Výsledky

Molekulární chaperony jsou nedílnou součástí systému pro udržení proteinové homeostáze a spolu se svými ko-chaperony vytváří komplexní proteinovou mašinerii. Řada ko-chaperonů interagujících s Hsp70 a Hsp90 obsahují ve své struktuře TPR-domény (2.4.3.). Jedním z těchto ko-chaperonů je i E3 ubikvitin ligáza Chip, která řídí prostřednictvím vazby na C-konec Hsp70/90 degradaci substrátů daných chaperonů. Chip byl považován za jedinou E3 ligázu asociovanou s Hsp70/90, avšak degradace substrátů Hsp90 probíhala v myších fibroblastech *Chip*^{-/-} obdobně jako ve fibroblastech *Chip*^{+/+} (Morishima *et al.*, 2008). Tyto nové poznatky vedly naše pracoviště k úvaze, zda není v buňkách přítomen další chaperon s E3 ubikvitin ligázovou aktivitou schopný vazby k Hsp70/Hsp90. Z výsledků databázového vyhledávání (uniprot.org: klíčová slova TPR, U-box, RING, HECT) byl vybrán protein LONRF3 obsahující TPR a U-box domény, u něhož byla posléze na našem pracovišti potvrzena interakce s chaperonem Hsp90 pomocí metody SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture).

4.1 Strukturní analýza a vazebné vlastnosti proteinu LONRF3

4.1.1 Základní bioinformatická analýza

Jelikož o struktuře a funkci proteinu LONRF3 není mnoho známo, byla nejprve provedena základní bioinformatická analýza pomocí databáze uniprot.org. a klíčového slova LONRF3. Na základě porovnání proteinové sekvence LONRF3 s podobnými proteinovými sekvencemi byly databázi uniprot.org přiřazeny zkoumanému proteinu následující strukturní motivy: čtyři TPR (tetratricopeptide repeat) opakování, dva RING motivy zinkového prstu a N-koncovou Lon doménu. Přičemž LONRF3 vykazuje C-terminální homologii k N-terminální Lon doméně. Výskyt jednotlivých motivů je graficky znázorněn na obrázku 14.



Obr. 14 Rozložení motivů v sekvenci proteinu LONRF3. Daný protein obsahuje TPR opakování, RING doménu se zinkovým motivem a N-terminální Lon doménu. Data byla získána z uniprot.org.

Jelikož se ve struktuře vyskytují tandemově uspořádané tři TPR motivy, byla ověřena přítomnost TPR domény pomocí proteomického nástroje TPRpred (internetový zdroj 2). Výsledky analýzy (Obr. 15a) naznačují vysokou pravděpodobnost výskytu TPR opakování, respektive TPR domény. Jelikož je pro interakci mezi TPR doménou

a C-koncem chaperonů nezbytná přítomnost tzv. „two-carboxylate clamp,“ bylo provedeno mnohočetné přiřazení predikované TPR domény proteinu LONRF3 a ko-chaperonu Chip (pomocí uniprot.org/align). Výsledky ukázaly přítomnost konzervovaných aminokyselin, tvořících „two-carboxylate clamp“ (Obr. 15b). Tyto poznatky podporují hypotézu, že by mohl být protein LONRF3 schopen interakce s C-koncem Hsp70 a Hsp90.

a)

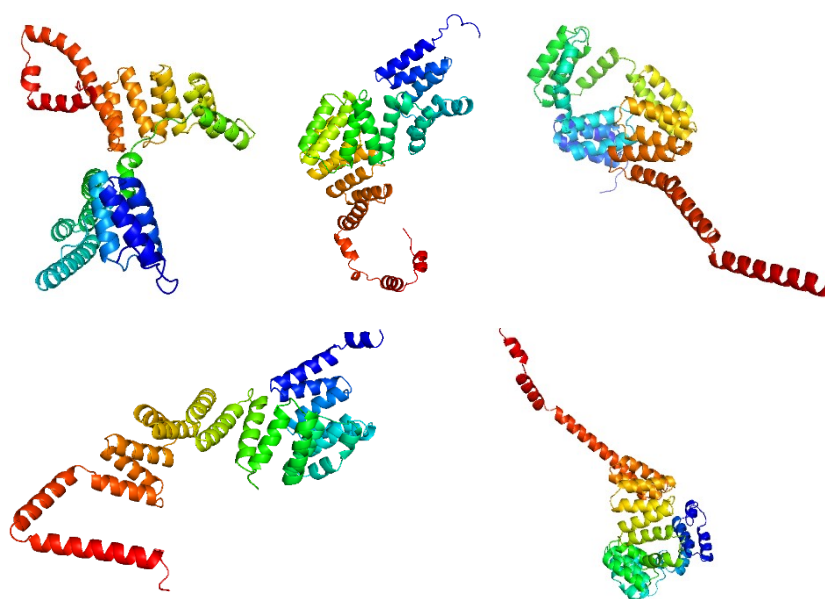
Per-protein P-value for being TPR : 1.0E-18				
Probability for being TPR : 100.00%				
Repeat	Begin	Alignment	End	P-value
TPR	67	SKVLLTQADALASRGRIEALVYRQLSERQQLV	100	9.7e-05
TPR	243	ASQLRHEGNRLYRERQVEAALLKYNEAVKLPND	276	1.2e-06
TPR	277	HLLYSNRSQIYFTLESHENALHDAEIAACKLRPMG	310	2.2e-06
TPR	311	FKAHFRKAQALATLGKVEEALREFLYCVSLDGKN	344	1.4e-08

b)

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment	
LONRF3	ASQLRHEGNRLYRERQVEAALLKYNEAVKLPNDHLLYSNRSQIYFTLESHENALHDAEI 60
Chip	AQELREQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKMQQHEQALADCRR 60
	.::..*:*:* *: * * .*: * :*:*: *:..:.*:*:* ..
LONRF3	ACKLRPMGFKAHFFKAQALATLGKVEEALREFLYCVSLDGKN 102
Chip	ALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIAANLQRAYSLAKEQ 102
	* : * ..*:* * * . : . :*: * : : * * :

Obr. 15 Sekvenční analýza. a) Analýza výskytu TPR domény pomocí proteomického nástroje TPRpred. Z výsledků vyplývá, podle hodnot P-value, vysoká pravděpodobnost, že protein LONRF3 obsahuje TPR doménu. b) Mnohočetné přiřazení TPR domény LONRF3 a Chip. Zvýrazněny jsou aminokyseliny „two-carboxylate clamp“.

Byla provedena i predikce 3D struktury úseku aminokyselin 57-401 pomocí serveru robetta.bakerlab.com (Obr. 16).

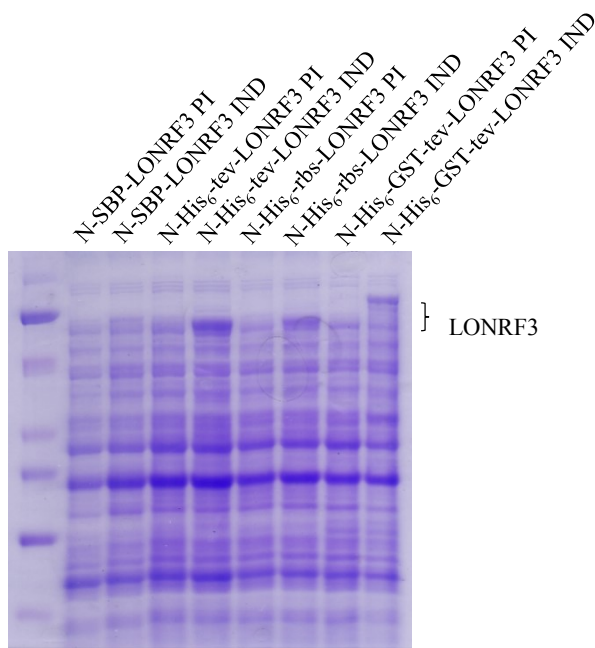


Obr. 16 Varianty 3D struktury úseku 57-401 proteinu LONRF3 predikované robetta.bakerlab.com.

4.1.2 Produkce proteinu LONRF3 v bakteriích

Abychom mohli provést základní strukturní a funkční analýzu proteinu LONRF3, exprimovali jsme tento protein v bakteriálním expresním systému a provedli jeho purifikaci. Nejprve bylo připraveno několik expresních vektorů pro produkci proteinu v bakteriích: pDEST17-N-His₆-rbs-LONRF3, pDEST17-N-His₆-tev-LONRF3 a pDEST15-N-His₆-GST-tev-LONRF3. (Konstrukt pT7-N-SBP-LONRF3 byl připraven již dříve na našem pracovišti).

Klonované geny byly exprimovány v produkčním kmeni bakterií *E.coli* BL21-(D3)-RIPL. Expres genů byla indukována přidavkem IPTG (1mM) do kultivačního média. Z výsledků indukce (Obr. 17) je patrné, že vyjma konstrukt pT7-N-SBP-LONRF3 byla expres proteinu LONRF3 výrazně indukována z vektorů pDEST17-N-His₆-tev-LONRF3 a pDEST17-N-His₆-rbs-LONRF3. Produkce chimerického proteinu N-His₆-GST-tev-LONRF3 je zřejmá díky přítomnosti proužku s vyšší molekulovou hmotností (GST značka zvyšuje molekulovou hmotnost proteinu přibližně o 30 kDa).



Obr. 17 Porovnání exprese LONRF3 v různých expresních vektorech. Pelety bakterií odebraných před a po indukci exprese LONRF3 byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly vizualizovány po SDS PAGE Coomassie barvením. Z výsledků indukce je patrné, že vyjma konstrukt pT7-N-SBP-LONRF3 byla expres genu *LONRF3* výrazně indukována z vektorů pDEST17-N-His₆-tev-LONRF3 a pDEST17-N-His₆-rbs-LONRF3. Produkce proteinu N-His₆-GST-tev-LONRF3 je zřejmá díky nárůstu molekulové hmotnosti přítomností GST značky. PI = před indukcí, IND = po indukci

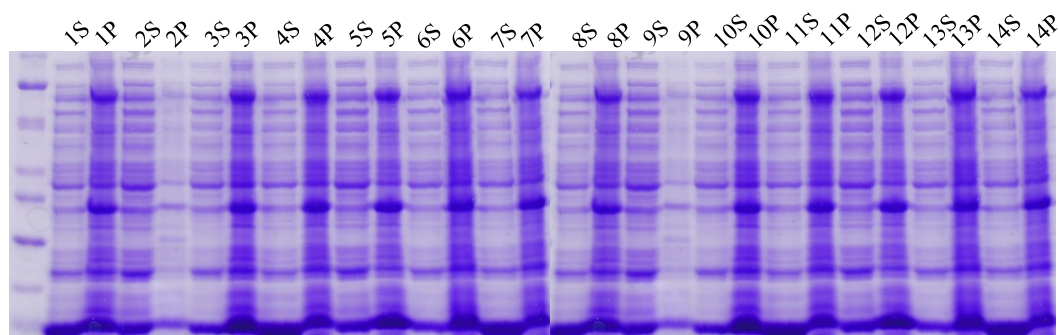
4.1.3 Optimalizace lyze bakterií pro extrakci proteinu LONRF3

Jakmile byly připraveny bakterie produkující požadovaný protein, bylo potřeba najít vhodný lyzační pufr pro získání proteinu v solubilním stavu. Protože byla pozorována

nejvýraznější indukce u proteinu N-His₆-tev-LONRF3, byl použit pro následnou optimalizaci lyzačního pufru. Nejprve byl testován vliv iontové síly a přítomnosti zinečnatých kationtů na solubilitu proteinu LONRF3 (Tab. 10, Obr. 18) (Zinečnaté kationty byly přidávány z důvodu přítomnosti RING domén motivu zinkového prstu ve struktuře LONRF3.). U žádného použitého pufru však nebyla prokázána dostatečná schopnost solubilizace LONRF3, který zůstal v majoritním zastoupení v bakteriálním peletu, pravděpodobně ve formě inkluzních tělísek.

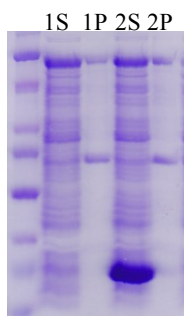
Tab. 10 Složení lyzačních pufrů pro extrakci proteinu N-His₆-tev-LONRF3 z bakterií.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
50mM HEPES	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
50mM KCl			✓			✓								
150mM KCl				✓			✓							
300mM KCl					✓			✓						
50mM NaCl									✓			✓		
150mM NaCl										✓			✓	
300mM NaCl											✓			✓
50 μM Zn		✓				✓	✓	✓				✓	✓	✓
lysozym 1mg/ml	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓



Obr. 18 Vliv iontové síly a Zn²⁺ (Tab. 10) na solubilitu proteinu N-His₆-tev-LONRF3. Žádný z pufrů nejeví dostatečnou schopnost solubilizovat protein LONRF3. Proteiny byly po SDS-PAGE vizualizovány Coomassie barvením. S = supernatant, P = pelet

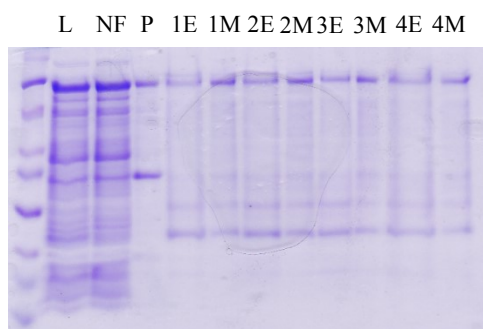
Nativně sbalené proteiny mohou být extrahovány z inkluzních tělísek pomocí detergentů jako je sarkosyl (Chisnall *et al.*, 2014). Proto byl následně testován vliv sarkosylu na solubilizaci LONRF3 proteinu (Obr. 19). Použitím 2% sarkosylu byla majoritní frakce LONRF3 převedena do supernatantu, současně nebyl pozorován vliv přídavku lysozymu na účinnost lyze.



Obr. 19 Vliv sarkosylu a lysozymu na solubilitu proteinu N-His₆-tev-LONRF3. Byly použity lyzační pufrů 50mM HEPES pH 7,5 s 2% sarkosylem (1) a 50mM HEPES pH 7,5, 2% sarkosyl a 1 mg/ml lysozymu (2). Použitím 2% sarkosylu byla majoritní frakce LONRF3 přítomna v supernatantu, přičemž nebyl pozorován vliv lysozymu na účinnost lyze. Proteiny byly vizualizovány po SDS-PAGE Coomassie barvením. S = supernatant, P = pelet

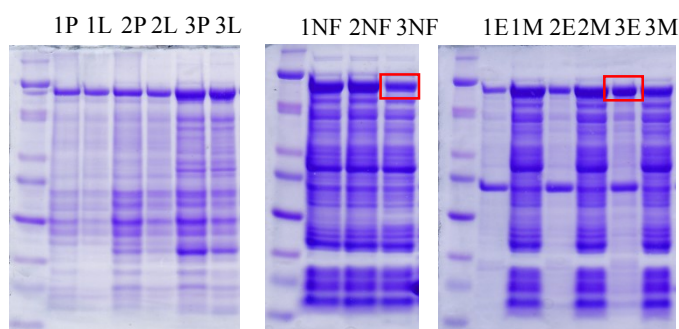
4.1.4 Optimalizace purifikace proteinu na Ni-NTA agarózové matrici

Důležitým krokem při procesu purifikace LONRF3 je odstranění sarkosylu, protože může mít efekt na strukturu proteinů (Yadava a Ockenhouse, 2003). Z tohoto důvodu byly během promývacích kroků použity pufrů bez sarkosylu a současně bez nebo s iontovou silou. Promývacími pufrů byly 50mM HEPES pH 7,5 s 1) 300mM KAc 2) 300mM NaCl 3) bez aditiv. Eluce probíhala 250mM imidazolem v příslušném promývacím pufru. Byla pozorována nízká vazba proteinu na matrici, která je doložena téměř nezměněným množstvím proteinu v lyzátu a v nenavázané frakci (L a NF na obr. 20). A zároveň, i když byla část proteinů na matrici navázána, většina zůstala navázána na matrici i po eluci. Navíc nebyl mezi jednotlivými promývacími pufrů pozorován výrazný rozdíl, proto byl v dalších krocích použit pouze 50mM HEPES pH 7,5.



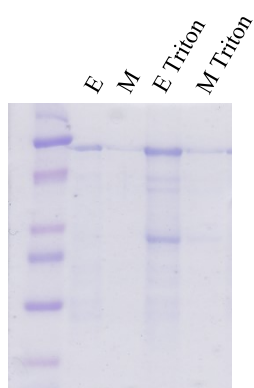
Obr. 20 Vliv iontové síly promývacích pufrů na výtěžek a čistotu proteinu N-His₆-tev-LONRF3. Pelet byl lyzován pufrů 50mM HEPES s 2% sarkosylem (L). Matrice s navázaným proteinem byla promyta pufrů 50mM HEPES pH 7,5 s 1) 300mM KAc 2) 300mM NaCl 3) bez aditiv. Většina proteinu nebyla navázána na matrici (NF) a nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi promývacími pufrů. Eluce probíhala 250mM imidazolem. L = lyzát, NF = nenavázaná frakce, P = pelet, E = eluát, M = frakce, která zůstala navázána na matrici. Proteiny byly vizualizovány po SDS-PAGE Coomassie barvením.

Jelikož sarkosyl může snižovat vazbu His₆-značeného proteinu na Ni-NTA matici (údaj výrobce), byla následně pro lyzi použita nižší koncentrace sarkosylu (1% a 0,3%) (Obr. 21).



Obr. 21 Vliv koncentrace sarkosylu na účinnost vazby N-His₆-tev-LONRF3 na Ni-NTA agarózovou matici. Bakterie byly lyzovány pufrům 50mM HEPES pH 7,5 s 2% sarkosylem (1), 1% sarkosylem (2), a 0,3% sarkosylem (3). Lyzáty byly inkubovány s Ni-NTA maticí a nenavázané proteiny byly odmyty pufrům 50mM Hepes pH 7,5. Eluce probíhala 250mM imidazolem v 50mM HEPES pH 7,5. Nejlepší vazbu na matici a následně i nejvyšší výtěžek byl dosažen lyzí v pufru obsahujícím 0,3% sarkosyl. P = pelet, L = lyzát, NF = nenavázaná frakce, E = eluát, M = frakce proteinů, které zůstaly po eluci na matici. Proteiny byly vizualizovány po SDS-PAGE Coomassie barvením.

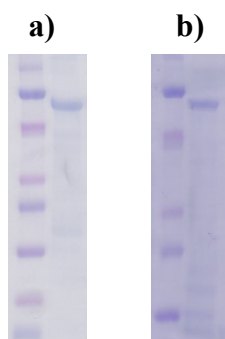
Podle Tao *et al.* TritonX-100 zlepšuje vazbu His₆-MPB (maltosa binding protein) solubilizovaného sarkosylem na Ni-NTA matici (Tao *et al.*, 2010). Proto byl před inkubací s maticí k bakteriálnímu lyzátu přidán TritonX-100 v konečné koncentraci 2 % (Obr. 22). Přítomností TritonuX-100 byl zvýšen výtěžek purifikace. Na obrázku 22 je v eluční frakci přítomný kromě proužku odpovídajícímu velikosti LONRF3 také proužek o nižší molekulové hmotnosti, pravděpodobně výsledek proteolytického štěpení, což bylo potvrzeno pomocí hmotnostní spektrometrie.



Obr. 22 Vliv TritonuX-100 na výtěžek purifikace proteinu N-His₆-tev-LONRF3 pomocí Ni-NTA agarózové matrice. K lyzi bakterií byl použit pufr 50mM HEPES pH 7,5, 0,3% sarkosyl a před inkubací lyzátu s maticí byl přidán TritonX-100 v konečné koncentraci 2 %. Nenavázané proteiny byly odmyty 50mM HEPES pH 7,5. Eluce probíhala 250mM imidazolem. E = eluát, M = proteiny, které zůstaly navázané po eluci na agarózové matici, Triton = TritonX-100. Proteiny byly vizualizovány po SDS-PAGE Coomassie barvením.

4.1.5 Purifikace proteinů LONRF3

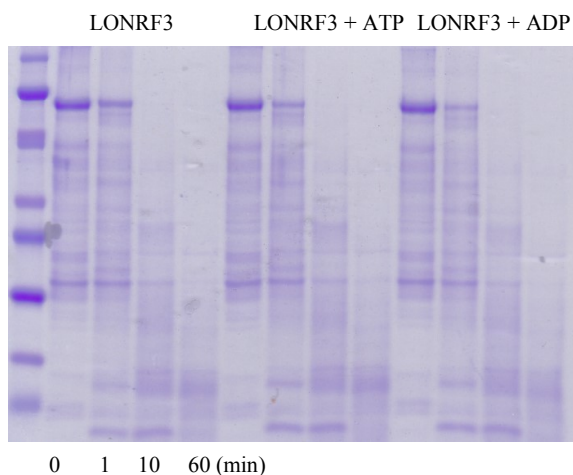
Po optimalizacích byl pro purifikaci zvolen lyzační pufr obsahující 50mM HEPES pH 7,5, 0,3% sarkosyl, 1mM PMSF (inhibitor proteolytického štěpení) a před inkubací s Ni-NTA agarózovou maticí byl k lyzátu přidán TritonX-100 v konečné koncentraci 2 %. Promývacím pufrem byl 50mM HEPES pH 7,5 a eluce probíhala 250mM imidazolem v 50mM HEPES pH 7,5. Purifikovány byly proteiny N-His₆-rbs-LONRF3 a N-His₆-tev-LONRF3, u něhož byla nakonec His₆ značka odštěpena pomocí TEV proteázy a zachycena na Ni-NTA maticí (Obr. 23). Protein His₆-rbs-LONRF3 byl následně zakoncentrován a analyzován metodou HDX nebo využit jako antigen pro přípravu protilátek.



Obr. 23 Výsledky purifikace proteinů LONRF3. Proteiny byly lyzovány v 50mM HPES pH 7,5 s 0,3% sarkosylem a 1mM PMSF. Promývacím pufrem byl 50mM HEPES pH 7,5 a eluce probíhala 250mM imidazolem v 50mM HEPES pH 7,5. Polyakrylamidový gel byl barven Coomassie. **a)** N-His₆-rbs-LONRF3 **b)** přečištěný protein N-His₆-tev-LONRF3 po odstranění značky TEV proteázou za vzniku LONRF3 (metoda 3.2.3.).

4.1.6 Limitovaná proteolýza

Řada chaperonů i ko-chaperonů patří mezi ATPázy a mění svou konformaci v závislosti na vazbě ATP/ADP (Hartl *et al.*, 2011) Abychom zjistili, zda protein LONRF3 váže nukleotidy a podléhá konformačním změnám vlivem jejich vazby, byla provedena limitovaná proteolýza proteinu N-His₆-rbs-LONRF3 trypsinem v přítomnosti ATP a ADP (Obr. 24). Z výsledků plyne, že protein N-His₆-rbs-LONRF3 nepodléhá konformačním změnám v závislosti na vazbě ATP a ADP. Výsledky však mohly být zkresleny přítomností nečistot.



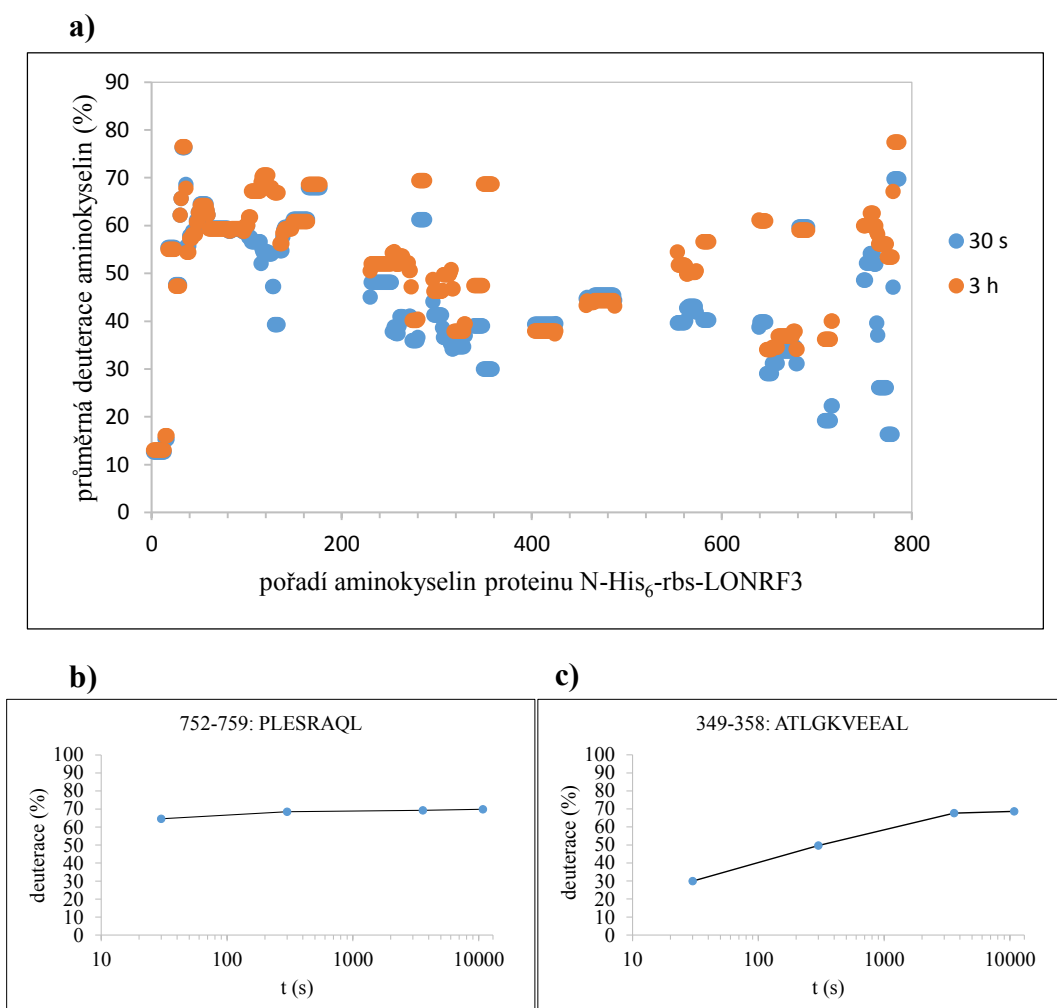
Obr. 24 Limitovaná proteolýza proteinu N-His₆-LONRF3 pomocí trypsinu. Na reakci byly použity 4 µg proteinu, 400µM ATP/ADP a 32 ng/µl trypsinu v celkovém reakčním objemu 10 µl. Reakce probíhala v časech 0, 1, 10 a 60 min a byla zastavena nanášecím pufrům 4xLDS v poměru 1:4. Obrázek zobrazuje výsledky SDS-PAGE po Coomassie barvení.

4.1.7 Charakterizace struktury pomocí HDX-MS

Vodík/deuteriová výměna s hmotnostní spektrometrií je analytická metoda vhodná pro studium struktury a dynamiky proteinů či protein-proteinových interakcí. Principem metody je výměna amidových vodíků za deuterium přítomné v rozpouštědle, přičemž k výměně dochází nejrychleji mezi částmi proteinu, které jsou na jeho povrchu nebo v rozvolněných strukturách. Výměna je následně ukončena zchlazením na 0 °C a snížením pH, poté je protein rozštěpen pepsinem a fragmenty analyzovány hmotnostní spektrometrií (Konermann *et al.*, 2011).

Tato metoda byla použita pro bližší charakterizaci struktury proteinu N-His₆-rbs-LONRF3. Výsledky ukazují (Obr. 25) průměrnou deuteraci jednotlivých aminokyselin (viz metoda 3.2.18) v časech 30 s a 3 h. U většiny peptidů nebyl pozorován růst deuterace s časem. Vzhledem k absenci rostoucího trendu deuterace s časem je možné, že byla většina proteinu v denaturovaném stavu a výsledky tak nemusí být relevantní. Podle průměrné deuterace aminokyselin v čase 30 s lze pozorovat, že je nejvíce deuterováno prvních ~150 aminokyselin a tudíž by se mohly vyskytovat na povrchu proteinu, ve střední části proteinu deuterace klesá a udržuje se v rozmezí 40-50 %. Na C-konci proteinu opět mírně stoupá stupeň deuterace (50-60 %). Nejvýraznější časovou změnu deuterace vykazovaly peptidy 127-133, 349-358 a 763-779. Oblasti proteinu LONRF3 pokryté těmito peptidy tak mohou představovat struktury s pomalou kinetikou deuterace. Pokud tyto výsledky nejsou zkresleny částečnou denaturací proteinu LONRF3 v důsledku

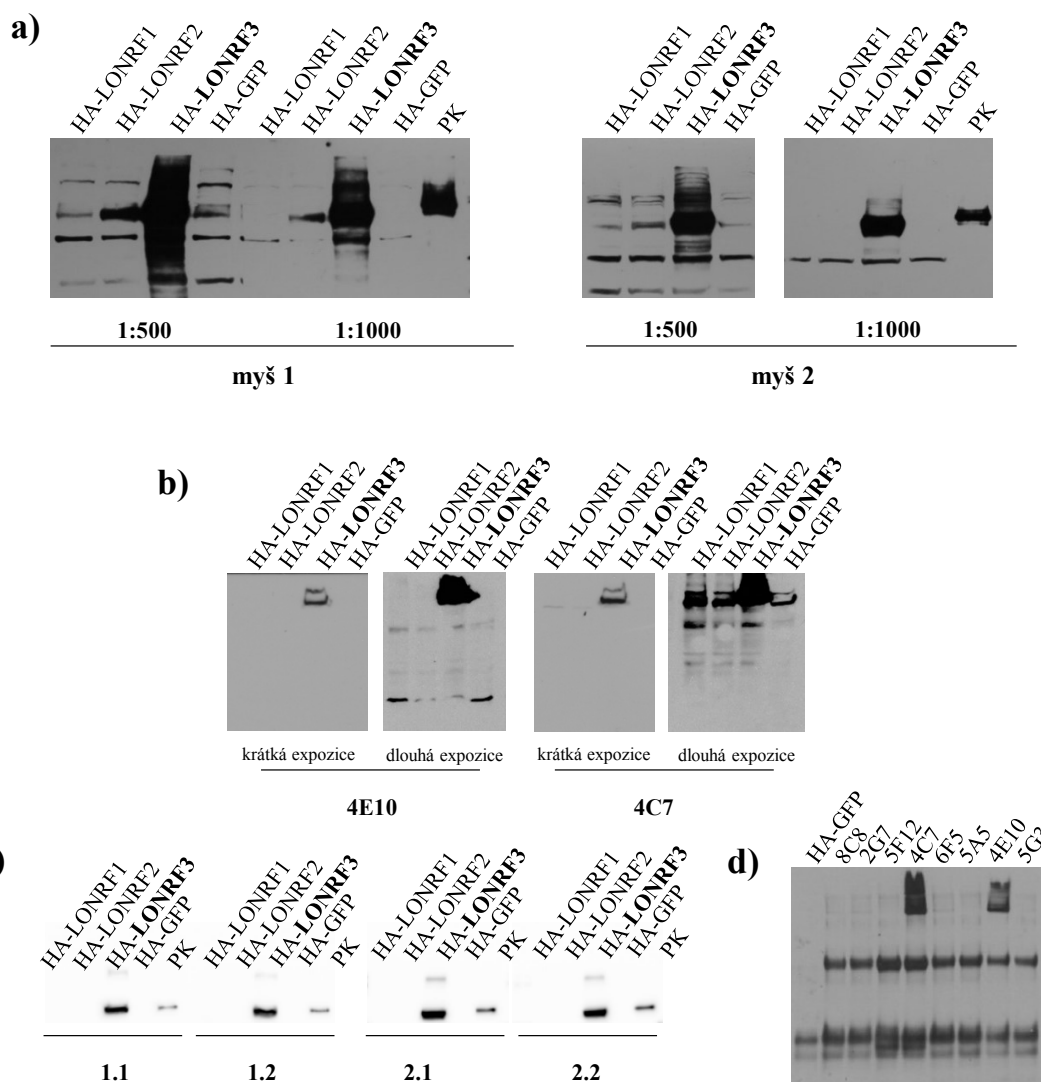
použité metody jeho purifikace, představují první experimentální ověření nativní sekundární struktury tohoto proteinu.



Obr. 25 a) Deuterace aminokyselin proteinu N-His₆-rbs-LONRF3 v časových intervalech 30 s a 3 h. Protein LONRF3 byl převeden do pufru 25mM HEPES, 50mM KAc, pH 7,4 a byl 10x naředěn v deuterovaném pufru (25mM HEPES, 50mM KAc, pD 7,0) do celkového objemu 60 μ l. Deuterace byla zastavena v časech 30 s, 5 min, 1 h a 3 h přidávkem 10 μ l 1M glycinu pH 2,3 a rychlým zmrazením v tekutém dusíku. Množství proteinu v každém vzorku bylo 250 pmol (viz. metoda 3.2.18.). Sekvence samotného LONRF3 začíná od 28. aminokyseliny. **b)** Ukázka průběhu deuterace peptidů (která se vyskytovala u většiny peptidů) v časech 30s, 5 min, 1 h a 3 h. **c)** Ukázka průběhu deuterace peptidu (deuterace se zvyšuje s rostoucím časem).

4.2 Charakterizace monoklonálních protilátek anti-LONRF3

Monoklonální protilátky byly připraveny firmou Moravian Biotechnology (Brno) imunizací dvou myší plnodélkovým purifikovaným proteinem N-His₆-rbs-LONRF3. Séra myší po třetí imunizační dávce byla testována westernovým přenosem s využitím lyzátů buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinu HA-LONRF1, 2 a 3, pozitivní kontrolou byl purifikovaný SBP-LONRF3 z eukaryotních buněk (*připraven dr. Trčkou*) a jako kontrola vazby protilátek na endogenní protein LONRF3 byl použit lyzát HEK293 s transfekovaným HA-GFP (Obr. 26a). Přítomnost HA-značených proteinů v lyzátu byla ověřena pomocí anti-HA protilátky. Myš č. 2 byla vybrána pro následnou fúzi a supernatanty ze vzniklých hybridomů byly otestovány na specifickou reakci s proteinem LONRF3. Celkem bylo westernovým přenosem testováno 8 hybridomových supernatantů (8C8, 4E10, 2G7, 5G3, 5F12, 6F5, 5A5 a 4C7) pomocí lyzátů buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinu HA-LONRF1, 2, 3 a HA-GFP. Dva hybridomy s označením 4E10 a 4C7 vykazovaly specifickou vazbu na protein LONRF3 (Obr. 26b). Následně byl u těchto klonů zjištěn izotyp imunoglobulinu, v obou případech se jednalo o IgG1 (*Izotypizace byla provedena v rámci rutinních analýz – neprováděla jsem ji.*). Klony 4E10 a 4C7 byly dále rozklonovány a u vzniklých klonů (1.1, 1.2, 2.1, 2.2) byla zjištěna jejich specifita vůči proteinu LONRF3 (Obr. 26c). Abychom zjistili, zda se námi připravené protilátky váží i na nativní protein LONRF3, byla provedena imunoprecipitace ektopicky exprimovaného proteinu HA-LONRF3 z lyzátů buněk HEK293 pomocí jednotlivých hybridomových supernatantů. Výsledky ukazují, že protilátky obsažené v supernatantech 4E10 a 4C7 váží i nativní formu proteinu LONRF3 (Obr. 26d).

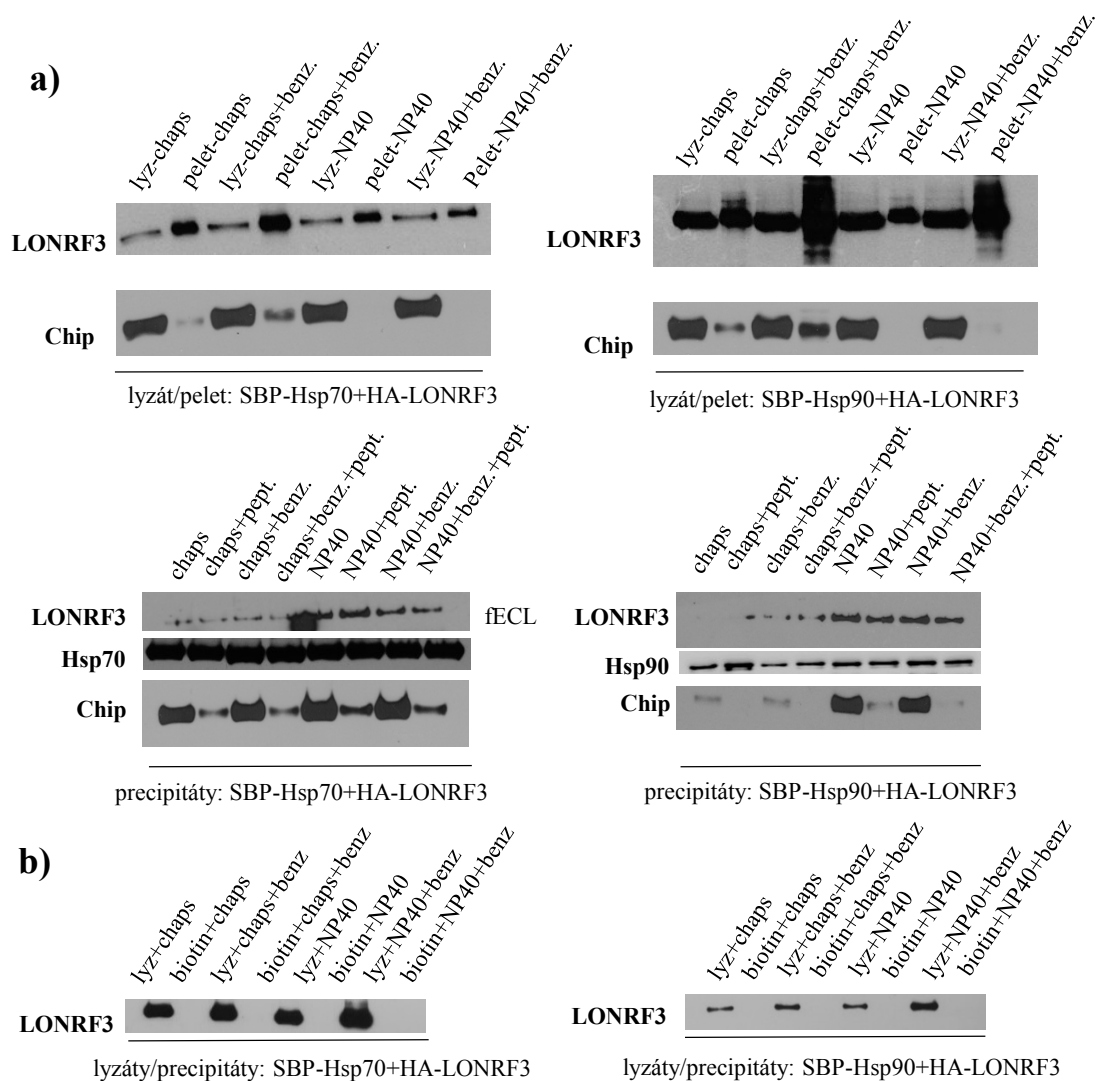


Obr. 26 Charakterizace protilátek anti-LONRF3. **a)** Testování myších sér ve dvou ředěních s lyzáty buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinů HA-LONRF1, 2, 3, jako kontrola vazby protilátek na endogenní protein LONRF3 byl použit lyzát HEK293 s transfekovaným HA-GFP. Pozitivní kontrolou (PK) byl purifikovaný protein SBP-LONRF3 z linie HEK293. Přítomnost HA-značených proteinů byla kontrolována anti-HA protilátkou. **b)** Testování supernatantů hybridomů s lyzáty buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinů LONRF1, 2, 3, jako kontrola vazby protilátek na endogenní protein LONRF3 byl použit lyzát HEK293 s transfekovaným HA-GFP. Supernatanty byly ředěny v 5% mléku 1:1. Přítomnost HA-značených proteinů byla kontrolována anti-HA protilátkou. **c)** Testování selektovaných klonů protilátek na buněčném lyzátu buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinů LONRF1, 2, 3, jako kontrola vazby protilátek na endogenní protein LONRF3 byl použit lyzát HEK293 s transfekovaným HA-GFP. Pozitivní kontrolou (PK) byl purifikovaný protein SBP-LONRF3 z buněčné linie HEK293. Supernatanty byly ředěny 1:1 v 5% mléku. Přítomnost HA-značených proteinů byla kontrolována anti-HA protilátkou. **d)** Imunoprecipitace supernatantů navázaných na matici s G proteinem s lyzátem buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinu LONRF3. Jako kontrola nespecifické vazby proteinu LONRF3 na matici sloužil buněčný lyzát buněk linie HEK293 s ektopickou expresí HA-GFP. Pro detekci proteinu LONRF3 byla použita anti-HA protilátka. Na filmu po westernovém přenosu jsou patrné i lehké a těžké řetězce imunoglobulinu.

4.3 Interakce proteinu LONRF3 s chaperony Hsp70 a Hsp90

Obdobně jako známé ko-chaperony Hsp70/90 (Chip, Hop, Tomm34) obsahuje protein LONRF3 TPR doménu (4.1.1.) teoreticky schopnou vazby C-terminálních sekvencí Hsp70/90 (Brinker *et al.*, 2002). Z tohoto důvodu jsme testovali schopnost proteinu LONRF3 vázat Hsp70/90 skrze svou TPR doménu.

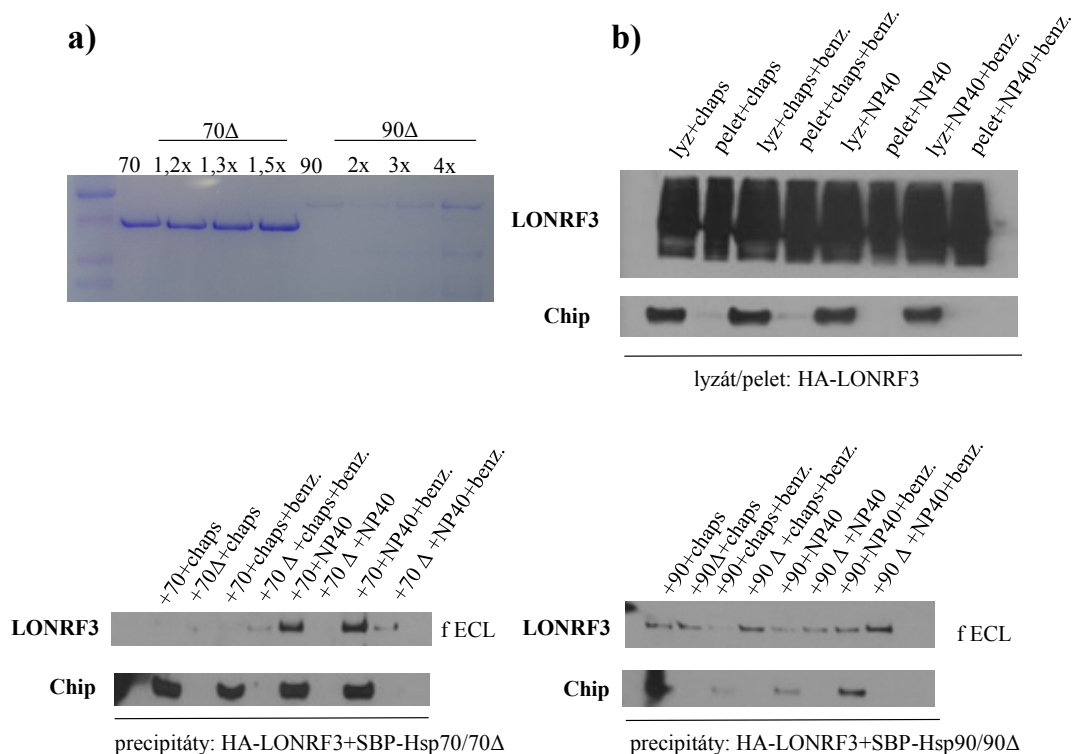
Nejprve byl proveden pull-down konstitutivně exprimovaných proteinů SBP-Hsp70/90 z lyzátů buněk linie H1299-SBP-Hsp70 a H1299-SBP-Hsp90 transfekovaných plasmidem kódujícím protein HA-LONRF3. Lyze buněk byla provedena ve dvou pufrch lišících se obsaženým detergentem (0,5% CHAPS nebo 0,5% NP-40, viz. metoda 3.2.8.1). Pro kontrolu specifity analyzovaných interakcí byly připravené lyzáty inkubovány s C-terminálními peptidy Hsp70/Hsp90 (GGSGSGPTIEEVD, GDDDTSRMEEVD) v konečné koncentraci 100 μ M. Pozitivní kontrolou byla detekce interakce SBP-Hsp70/90 s TPR ko-chaperonem Chip, u nějž je známa jeho vazba na C-konec chaperonů Hsp70/90 (Ballinger *et al.*, 1999). Kompeticí s C-koncovými peptidy je tudíž sníženo množství proteinu Chip navázaného na daném chaperonu. Pro kontrolu nespecifické vazby proteinu LONRF3 na streptavidinovou matici, byla část matrice před nanesením lyzátu zablokována 2mM biotinem (rozpuštěn v příslušných lyzačních pufrch). Z výsledků je patrné, že nedocházelo k nespecifické vazbě proteinu LONRF3 na matici (Obr. 27b). Výsledky podporují hypotézu interakce mezi proteinem LONRF3 a chaperony Hsp70/90, avšak pokles interakce v přítomnosti C-terminálních peptidů daných chaperonů je pouze mírný (Obr. 27a). Zajímavým pozorováním byl vliv lyzačních pufrů na protein-proteinové interakce. Pufř s 0,5% CHAPS totiž výrazně snížil interakci proteinů LONRF3/Chip-SBP-Hsp70/90.



Obr. 27 Interakce proteinu LONRF3 s chaperony SBP-Hsp70 a SBP-Hsp90. a) Výsledky SBP pull-downu lyzátní buněk H1299-SBP-Hsp70 a H1299-SBP-Hsp90 s transfekovaným plasmidem kódujícím protein HA-LONRF3. Proteiny byly detekovány westernovým přenosem s použitím protilátek anti-HA, anti-Chip, anti-Hsp70 a anti-Hsp90. Jako kontrola nanášek na gel byly detekovány Hsp70/90. Lyzačními pufrů byly: 50mM Hepes, pH 7,5, 50mM KCl, 100mM KAc, 2mM MgCl₂, 1:100 avidin, 1:100 inhibitor proteáz s 1) 0,5% CHAPS 2) 0,5% CHAPS s benzonázou (1:2000) 3) 0,5% NP-40 nebo 4) 0,5% NP-40 s benzonázou (1:2000). lyz = lyzátní, Benz = benzonáza, pept. = C-terminální peptidy Hsp70/90 b) Kontrola nespecifické vazby LONRF3 na streptavidinovou matici. Matrice byla před inkubací s lyzátem zablokována 2mM biotinem (viz. metoda 3.2.8.1.).

Pro ověření interakčního rozhraní mezi proteinem LONRF3 a chaperony Hsp70/90 byl proveden SBP pull-down purifikovaných bakteriálně produkovaných chaperonů SBP-Hsp70, SBP-Hsp70 Δ , SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90 Δ inkubovaných s lyzáty buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinu HA-LONRF3. Proteiny SBP-Hsp70 Δ a SBP-Hsp90 Δ mají deletovány jejich C-koncové sekvence (PTIEEVD, RMEEVD, v daném pořadí). Putativní interakce proteinu LONRF3 s C-koncem daných chaperonů by se měla projevit snížením vazby proteinu LONRF3 k terminálně deletovaným

proteinům oproti proteinům plnodělkovým. Z důvodu nepřesností při spektrofotometrickém stanovení koncentrace (nízká koncentrace obsažených proteinů) byla čistota a množství bakteriálně purifikovaných proteinů SBP-Hsp70, SBP-Hsp70Δ, SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90Δ nejprve ověřena pomocí SDS-PAGE a Coomassie barvení (Obr. 28a). Pro reakce bylo následně použito množství proteinů v poměrech SBP-Hsp70:SBP-Hsp70Δ 1:1,2 a SBP-Hsp90:SBP-Hsp90Δ 1:3. Z výsledků pull-down analýzy je patrné, že zatímco protein LONRF3 interaguje se chaperonem SBP-Hsp70, jeho vazba k proteinu SBP-Hsp70Δ je výrazně snížena (Obr. 28b). Interakce proteinů SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90Δ s proteinem LONRF3 byla nezměněna. Jako pozitivní kontrola byla opět detekována interakce s endogenním proteinem Chip. Tyto výsledky naznačují, že pro vazbu Hsp70-LONRF3 je přítomnost C-koncového motivu chaperonu Hsp70 nezbytná. Naopak, C-konec Hsp90 se zdá být postradatelným pro vznik komplexu Hsp90-LONRF3.



Obr. 28 Charakterizace interakce proteinu LONRF3 s bakteriálně produkovánými chaperony SBP-Hsp70, SBP-Hsp70Δ, SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90Δ. a) Srovnání hladin purifikovaných proteinů po SDS-PAGE s Coomassie barvením. Množství je vždy vztaženo k 5 μg SBP-Hsp70 (70) či SBP-Hsp90 (90). b) Detekce interakce purifikovaných bakteriálních proteinů SBP-Hsp70, SBP-Hsp70Δ, SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90Δ s lyzátem buněk HEK293 s ektopickou expresí proteinu HA-LONRF3. Deletované formy chaperonů jsou bez C-konce (PTIEEVD, RMEEVD). Proteiny byly detekovány westernovým přenosem s použitím protilátek: anti-HA a anti-Chip. Použité lyzační pufrы jsou uvedeny v kapitole 3.2.8.1. lyzát, benz = benzonáza

4.4 Funkční analýza proteinu LONRF3

4.4.1 Funkční analýza proteinu LONRF3 *in vivo*

Jelikož není o funkci proteinu LONRF3 doposud nic známo, byla nejprve určena jeho subcelulární lokalizace pomocí konstruktů pcDNA3-LONRF3-C-mCherry (*připraven dříve na našem pracovišti*), který byl transfekován do buněčné linie MCF-7. Tento konstrukt exprimuje protein LONRF3 s C-terminálně fúzovaným fluorescenčním proteinem mCherry, jehož fluorescence byla vizualizována fluorescenčním mikroskopem (excitace, 587 nm; emise, 610 nm). Výsledky ukazují, že je protein LONRF3 přítomen převážně v jádře (Obr. 30). Proteiny jsou transportovány z cytoplasmy do jádra díky specifické lokalizační sekvenci NLS (Nuclear Localization Sequence), která je rozpoznána importními mechanismy (Makkerh *et al.*, 1996). Analýza aminokyselinové sekvence proteinu LONRF3 pomocí nástroje NLS-mapper (internetový zdroj 3) odhalila sekvenci, jež by se mohla podílet na lokalizaci našeho proteinu v jádře (Obr. 29a). Pro správnou funkci NLS jsou důležitými aminokyselinami lysin (K) a arginin (R) a jedním z možných způsobů pro vyřazení NLS ze své funkce je delece sekvence obsahující tyto aminokyseliny (Makkerh *et al.*, 1996). Za účelem delece oblasti ${}_{419}\text{KKRK}_{422}$ proteinu LONRF3 byla provedena cílená mutagenese dané kódující sekvence na vektoru pENTR221-LONRF3-F1c neobsahujícího stop kodon v genu *LONRF3* (metoda 3.2.11.). Vzniklý konstrukt pENTR221-LONRF3-del ${}_{419}\text{KKRK}_{422}$ -F1c byl následně pomocí LR reakce s plasmidem pcDNA3-C-mCherry-DEST rekombinován za vzniku konstruktů pcDNA3-LONRF3-del ${}_{419}\text{KKRK}_{422}$ -C-mCherry. Abychom ověřili úspěšnost LR reakce, bylo provedeno restriční štěpení vektoru pcDNA3-LONRF3-del ${}_{419}\text{KKRK}_{422}$ -C-mCherry a destinačního vektoru pcDNA3-C-mCherry-DEST pomocí endonukleázy EcoRV, která vyštěpuje obsah rekombinační kazety (pokud je prázdná, vzniká fragment o velikosti 1700 bp). Výsledky potvrdily úspěšnost LR reakce, protože štěpení vektoru pcDNA3-LONRF3-del ${}_{419}\text{KKRK}_{422}$ -C-mCherry dalo vzniknout fragmentu odpovídajícímu velikosti sekvence kódující protein LONRF3 (2280 bp, Obr. 29b). Vzniklý plasmid pcDNA3-LONRF3-C-mCherry byl následně transfekován do buněk MCF-7 a pomocí fluorescenčního mikroskopu byla sledována lokalizace fluorescenčního signálu proteinu mCherry. Z výsledků je patrné, že protein LONRF3 s deletovaným úsekem NLS je přítomen pouze v cytoplasmě (Obr. 30). Tento výsledek naznačuje, že se nám podařilo identifikovat a ověřit NLS sekvenci proteinu LONRF3.

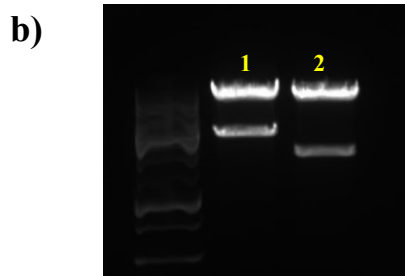
a)

```

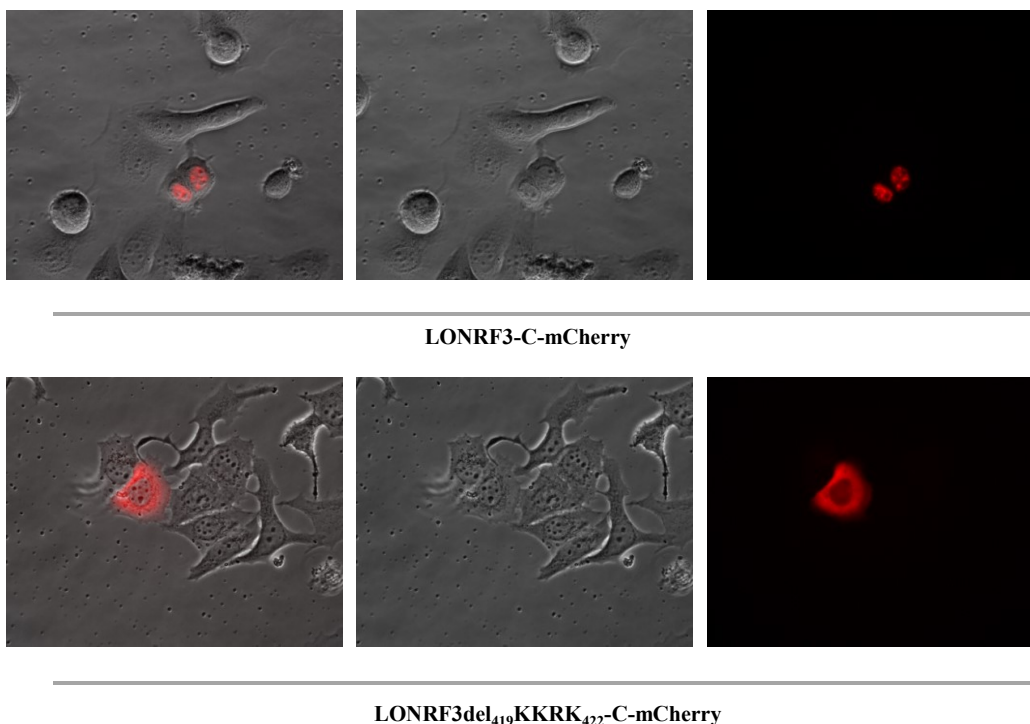
MESVRIEQMLSLPAEVSSDNLESAERGASAAQVDMGPHPKVAAEGPAPLP 50
TREPEQEQSPGTSTPESKVLTTQADALASRGRIREALLEVYRQLSERQQLV 100
AEQLEQLVRCIAEKVPQGEALAPAPDEGSTASGTVAEEETGAAAAAAT 150
EVDWGFKCRKCHGFLSDPVSLSCGHTFCKKLCLEGRADRRRCALCGVKLS 200
ALMVATGRARGARRAGQQPPPLRVNVVLSGLLGKLFPGPARASQLRHEG 250
NRLYRERQVEAALLKYNEAVKLAPNDHLLYSNRSQIYFTLESHENALHDA 300
EIAACKLRPMGFKAHFRKAQALATLGKVEEALREFLYCVSLDGKMKRARGE 350
AQRDNLELPHCSSQEEAAARGDGSSLMDPAKVKGDGQOHHMKDQEEEEK 400
WDATSPKAASSTGKCQEKKRKHCQIESQEETGMPNKASKQDPPDQGDGK 450
PALSLPLASFDASDLECALCMRLFYEPVTPCGHTFCLKCLERCLDHNAK 500
CPLCKDGLSQCLASRKYSKNVIMEELIAKFLPEELKERRKLYEEMEELS 550
NLNKNVPIFVCTMAYPTVPCPLHIFEPYRMLMIRRCIETGTRQFGMCLGD 600
PVKGFAYGCIIEIRNVQFFADGRSVVDSIGKRRFRVLHQSQRDGYNTAD 650
IEYIEDQKVGQEDCAELMGLHNCVYQOASLWFHSLKLSLKNRILNHFQPM 700
PEKDADPQMNPNPAGPAWCWMLAVLPLESRAQLPFLAMRSLKDRNLNGIRRV 750
LAFISRNQN 759

```

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
340	LDGKMKRARGE	6
417	QEKKRKHCQI	8.5



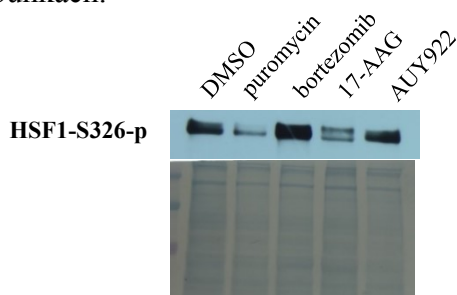
Obr. 29 Přítomnost NLS (nulcear localization signal) a cílená mutagenese v NLS. a) Výsledky predikce NLS pomocí nástroje NLS-mapper (internetový zdroj 3). Červeně jsou znázorněny sekvence predikovaných NLS. b) Výsledky restričního štěpení konstruktů pcDNA3-LONRF3-C-mCherry (1) a pcDNA-C-mChery-DEST (2) endonukleázou EcoRV. U vzorku 1 je viditelná přítomnost delšího fragmentu, odpovídající velikostně genu *LONRF3* (2280bp) a nižší fragment u vzorku 2 odpovídá velikostně sekvenci pro rekombinační kazetu (1700 bp).



Obr. 30 Lokalizace proteinu LONRF3 *in vivo*. Buňky MCF-7 byly transfekovány konstrukty pcDNA3-LONRF3-C-mCherry a pcDNA3-LONRF3-del₄₁₉KKRK₄₂₂-C-mCherry. Oba konstrukty exprimovaly protein LONRF3 s fúzovaným s fluorescenčním proteinem mCherry. Buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 300x.

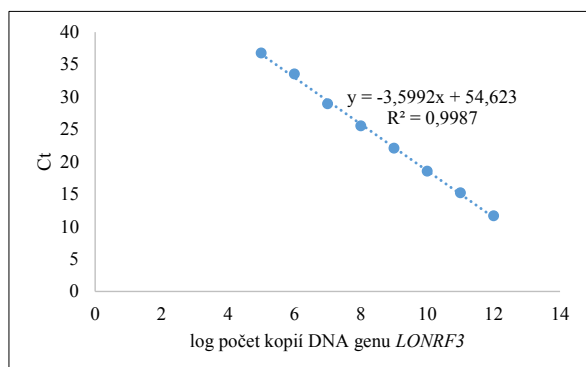
4.4.2 Vliv vybraných látek na transkripci genu *LONRF3*

Buňky reagují rychle na změnu vnitřního prostředí pomocí snížení či zvýšení exprese daných genů. Ovlivnění chaperonového systému tepelným šokem či farmakologickou inhibicí jeho složek vede k aktivaci transkripčního programu řízeného transkripčním faktorem HSF1 (Powers a Workman, 2007). Aktivita HSF1 vede ke zvýšené expresi některých molekulárních chaperonů a jejich ko-chaperonů (Shi *et al.*, 1998). Tento transkripční program je označován jako heat-shock response (HSR). Jelikož vycházíme z předpokladu, že by mohl být protein LONRF3 součástí chaperonové sítě (viz. předchozí výsledky), zjišťovali jsme, jak je ovlivněna exprese jeho genu v buněčné linii MCF-7 působením inhibitoru Hsp90 (AUY922, 10nM; 17-AAG, 2μM), inhibitoru translace (puromycin, 0,5 μg/ml) a inhibitoru proteazomu (bortezomib, 100nM) (Trepel *et al.*, 2010, Yarmolinsky a Delahaba, 1959). Všechny tyto látky vyvolávají HSR (Baler *et al.*, 1996, Powers a Workman, 2007). Kontrolou byly buňky linie MCF-7 ovlivněné 0,1% DMSO. Nejprve jsme ověřili, že došlo u ovlivněných buněk k aktivaci HSF1. HSF1 se vyskytuje v inaktivované formě jako monomer. Po vystavení buněk proteotoxickému stresu dochází k jeho trimerizaci a následnému přesunu do jádra, kde svou vazbou na promotorové sekvence zvyšuje expresi heat-shock proteinů. Součástí aktivace HSF1 je jeho fosforylace v pozici Ser326 (Guettouche *et al.*, 2005). Přítomnost této fosforylované formy HSF1 jsem testovali pomocí westernového přenosu (Obr. 31). Výsledky ukazují, že míra fosforylace HSF1 v pozici S326 je ovlivněna přítomností použitých induktorů HSR. Zatímco vlivem puromycinu a 17-AAG došlo ke snížení hladiny fosforylace HSF1, bortezomib a AUY922 tuto fosforylaci zvyšují (nanáška proteinů ve vzorku ovlivněném AUY922 je nižší oproti ostatním vzorkům). Na základě těchto výsledků jsme přistoupili k determinaci míry exprese genu *LONRF3* v ovlivněných buňkách.



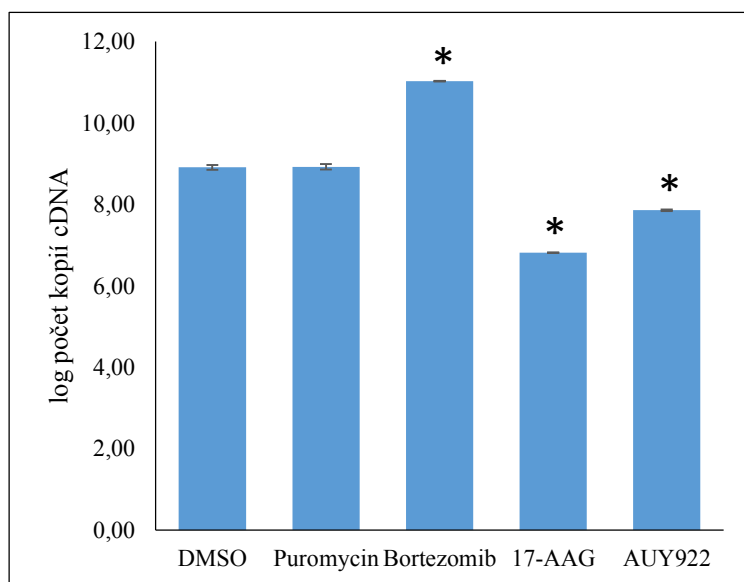
Obr. 31 Vliv vybraných látek na hladinu aktivovaného HSF1. Buňky linie MCF-7 byly ovlivněny AUY922 (10nM), 17-AAG (2μM), puromycinem (0,5 μg/ml), bortezomibem (100nM) a DMSO (0,1%) a inkubovány 16 h. Před zpracováním buněk pro qRT-PCR, byl odebrán vzorek pro westernový přenos. Buňky byly lyzovány v pufru NET s inhibitorem proteáz (1:100) (metoda 3.2.7.). HSF1 bylo detekováno westernovým přenosem s použitou protilátkou anti-HSF1-Ser326-p. Pro kontrolu naneseného množství vzorků byla membrána nespecificky obarvena amidočerní.

Abychom mohli určit přesný počet kopií molekul mRNA genu *LONRF3*, byla nejprve sestavena kalibrační přímka o známém počtu kopií (Obr. 32) (metoda 3.2.16).



Obr. 32 Kalibrační přímka pro množství kopií DNA genu *LONRF3* v závislosti na Ct (cycle of treshold, cyklus kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí). Pro sestavení kalibrační řady o známém počtu kopií DNA amplikonů byla provedena PCR reakce pro amplifikaci *LONRF3* (metoda 3.2.16). Z naměřených koncentrací přečištěných amplikonů byl spočítán počet kopií (pomocí molekulové hmotnosti amplifikované DNA, koncentrace a Avogadrovy konstanty) a byla připravena koncentrační řada pro následnou qRT-PCR (12 vzorků s počty kopií amplikonů $1 \cdot 10^{12}$ až $1 \cdot 10^1/\mu\text{l}$). Z naměřených hodnot qRT-PCR byla sestavena kalibrační přímka (počty kopií cDNA byly dekadicky zlogaritmovány), získaná regresní přímka byla použita pro výpočet počtu kopií cDNA podle naměřených hodnot Ct.

Výsledky qRT-PCR ukazují signifikantně zvýšené množství kopií cDNA pro gen *LONRF3* ve vzorcích po ovlivnění bortezomibem – 130krát vyšší exprese oproti kontrole (Obr. 33, Tab. 11). Naopak u buněk ovlivněných AUY922 a 17-AAG došlo u daného genu ke statisticky významnému snížení exprese ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test), přičemž AUY922 snížil expresi 11krát a 17-AAG 100krát.

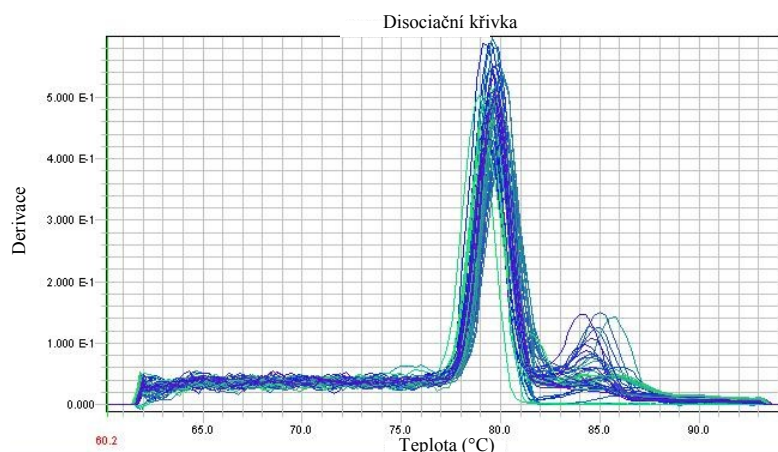


Obr. 33 Vliv vybraných látek na expresi genu *LORF3*. Buňky linie MCF-7 byly ovlivněny AUY922 (10nM), 17-AAG (2 μM), puromycinem (0,5 $\mu\text{g/ml}$), bortezomibem (100nM) a DMSO (0,1%) a inkubovány 16 h. Izolovaná RNA byla přepsána reverzní transkripcí na cDNA a byla provedena qRT-PCR. Absolutní počty kopií cDNA byly spočítány pomocí kalibrační křivky o známém počtu kopií DNA *LONRF3*. Získané hodnoty byly přepočítány pomocí dekadického logaritmu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty počtu kopií cDNA *LONRF3* a směrodatné odchylky získané z biologických triplikátů. Hvězdička znázorňuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolními buňkami ovlivněnými DMSO a ostatními látkami. ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test).

Tab. 11 Absolutní množství kopií DNA genu *LONRF3*. Buňky linie MCF-7 byly ovlivněny AUY922 (10nM), 17-AAG (2μM), puromycinem (0,5 μg/ml), bortezomibem (100nM) a DMSO (0,1%) a inkubovány 16 h. Izolovaná RNA byla přepsána reverzní transkripcí na cDNA a byla provedena qRT-PCR. Absolutní počty kopií DNA byly spočítány pomocí regresní rovnice *LONRF3* (Obr.32) viz metody 3.2.14-16.

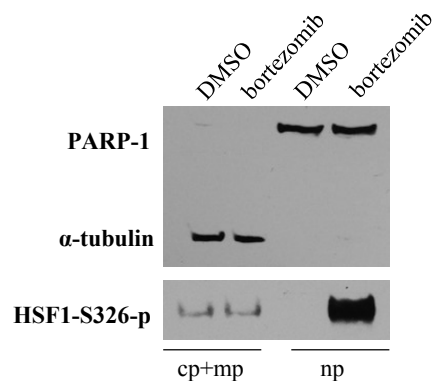
použitá látka	množství kopií cDNA genu <i>LONRF3</i>
DMSO	8,11E+08
Puromycin	8,40E+08
Bortezomib	1,07E+11
17-AAG	6,50E+06
Auy922	7,19E+07

Abychom ověřili, zda byl během qRT-PCR amplifikován specifický produkt, byla po ukončení PCR provedena analýza křivek tání (disociační analýza). Z disociační křivky (Obr. 34) lze usuzovat, podle přítomnosti dominantního píku, na výskyt jednoho PCR produktu.



Obr. 34 Disociační křivka produktů qRT-PCR. Analýza disociační křivky proběhla po ukončení qRT-PCR v režimu 95 °C 15 s a 60°C 15 s. Jelikož je přítomen pouze jeden pík, křivka podporuje výskyt pouze jednoho produktu z qRT-PCR.

Pro ověření aktivace HSF1 vlivem bortezomibu, byly buňky linie MCF-7 ovlivněné bortezomibem po dobu 16 h rozděleny na jadernou a cytoplasmatickou frakci a následně v nich bylo detekována přítomnost HSF1 (Obr. 35). Pro kontrolu úspěšnosti frakcionace byly použity protilátky proti jadernému proteinu PARP-1 a cytoplasmatickému α -tubulinu. Z výsledků westernového přenosu je patrné, že došlo vlivem bortezomibu k aktivaci HSF1 reprezentované jeho alokací v jaderné frakci. Tyto výsledky naznačují, že HSR aktivovaná bortezomibem může představovat selektivní transkripční program, mezi jehož cílové genu patří *LONRF3*.



Obr. 35 Rozdělení buněk MCF-7 ovlivněných bortezomibem na jadernou a cytoplasmatickou frakci. Buňky MCF-7 ovlivněné 100nM bortezomibem po dobu 16 hodin byly rozděleny na jadernou a cytoplasmatickou+membránovou frakci (metoda 3.2.9.). Kontrolou byly buňky ovlivněné 0,1% DMSO. Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byly zjištěny metodou dle Bradforda (metoda 3.2.10.). Úspěšnost frakcionace byla ověřena westernovým přenosem s protilátkami proti jadernému proteinu PARP-1 a cytoplasmatickému α -tubulinu. HSF bylo detekováno protilátkou proti aktivovanému (fosforylovanému) HSF1-Ser326-p. Z výsledků je patrná nukleární sekvestrace aktivovaného HSF1 vlivem 100nM bortezomibu. cp = cytoplasmatické proteiny, mp = membránové proteiny, np = jaderné proteiny.

5 Diskuze

Dosavadní poznatky o proteinu LONRF3 neposkytují mnoho opěrných bodů pro zasazení jeho možného významu do kontextu buněčného proteomu, což dokládá absence jakékoliv publikace o jeho funkci v databázi *webofknowledge.com*. Tato diplomová práce tedy přináší první výsledky týkající se charakterizace struktury a funkce proteiny LONRF3.

Pomocí databáze uniprot.org bylo zjištěno doménové uspořádání proteinu LONRF3. Jelikož tento protein obsahuje ve své struktuře RING doménu s motivem zinkového prstu a TPR doménu (Obr. 14), byla na základě funkční podobnosti formulována hypotéza, že by mohl mít protein LONRF3 obdobnou funkci jako E3 ubikvitin ligáza Chip. Protein Chip je TPR ko-chaperon proteinů Hsp70 a Hsp90 a prostřednictvím vazby na jejich C-konec řídí degradaci substrátů daných chaperonů (Jiang *et al.*, 2001). Na C-konci těchto chaperonů je přítomen EEVD motiv, který je ligandem pro TPR ko-chaperony a jejich vzájemná interakce je zprostředkována elektrostatickými silami mezi pěti konzervovanými aminokyselina TPR domény a karboxylovými skupinami koncového aspártátu motivu EEVD (Scheufler *et al.*, 2000). Proto bylo provedeno mnohočetné srovnání sekvencí TPR domény Chip a LONRF3. Výsledky u proteinu LONRF3 potvrdily přítomnost pěti reziduí tvořících „two-carboxylate clamp“, což podporuje hypotézu, že by mohl být LONRF3 potenciálním TPR ko-chaperonem (Obr. 15). Navíc byla na začátku „two-carboxylate clamp“ pozorována záměna lysinu (KXXGN) za arginin (RXXGN). Arginin i lysin jsou pozitivní aminokyseliny a jejich záměna tudíž nezpůsobuje změnu náboje. Jelikož se tato záměna vyskytuje i u ko-chaperonu Tomm34, jehož interakce s EEVD motivem není touto záměnou ovlivněna (Trčka *et al.*, 2014), předpokládáme, že by měl být protein LONRF3 schopen interakce s C-koncem Hsp70/90.

Pro provedení základní strukturní a funkční analýzy byl protein LONRF3 exprimován v bakteriálním expresním systému (produkční kmen bakterie *E. coli* BL21-(D3)-RIPL). Jelikož nejvýraznější indukci exprese proteinu LONRF3 vykazoval vektor pDEST17-N-His₆-tev-LONRF3 (Obr. 17), byl použit pro následnou optimalizaci purifikace daného proteinu. Během optimalizace lyzačního pufru bylo zjištěno, že vyšší iontová síla a přítomnost zinečnatých kationtů nemají pozitivní vliv na solubilizaci proteinu LONRF3, protože jeho majoritní množství zůstávalo nerozpustné v peletu (Obr. 18). Z toho důvodu předpokládáme, že protein LONRF3 vytváří v bakteriích nerozpustné agregáty-inkluzní tělíska, která jsou často tvořena během bakteriální

produkce proteinů (Williams *et al.*, 1982). Extrakce proteinů z těchto tělísek je možná pouze za použití detergentů (Chisnall *et al.*, 2014). Proto byl během další optimalizace použit aniontový detergent sarkosyl. Při použití jeho 2% roztoku v 50mM HEPES pH 7,5 bylo pozorováno výrazné zvýšení solubilizace proteinu N-His₆-tev-LONRF3 (Obr. 19), zároveň však byla pozorována nízká vazba proteinu na Ni-NTA agarózovou matici (Obr. 20). Pro solubilizaci proteinů je sarkosyl používán v koncentračním rozmezí 0,1-10 % (Chisnall *et al.*, 2014, Tao *et al.*, 2010). Použitá Ni-NTA agarózová matrice je optimalizována na koncentraci sarkosylu 0,3 %. Proto byla provedena optimalizace použitých koncentrací sarkosylu v rozmezí 0,3-1 % (Obr. 21). Zároveň, podle Tao *et al.*, zlepšuje TritonX-100 vazbu His₆-MBP solubilizovaného sarkosylem na Ni-NTA matici (Obr. 22). Díky těmto poznatkům byl nalezen vhodný lyzační pufr – 50mM HEPES, pH 7,5, 0,3% sarkosyl a 1mM PMSF a před inkubací bakteriálního lyzátu s maticí byl přidán TritonX-100 v konečné koncentraci 2 %. Tímto postupem byl připraven protein LONRF3 a N-His₆-rbs-LONRF3 (Obr. 23).

Proteiny Hsp70, Hsp90 a také některé ko-chaperony (p23) patří mezi ATPázy a mění svou konformaci v závislosti na vazbě ATP/ADP (Hartl *et al.*, 2011, Young a Hartl, 2000). Pomocí nástroje *NsitePred* bylo identifikováno v aminokyselinové sekvenci proteinu LONRF3 pět vazebných míst pro ATP a jedno pro ADP (Chen *et al.*, 2012). Výsledky limitované proteolýzy (Obr. 24) však neukazují, že by protein LONRF3 podléhal strukturním změnám indukovaným vazbou ATP/ADP, které by byly detekovatelné pomocí limitované proteolýzy. Avšak nelze s určitostí tvrdit, že strukturní motivy proteinu LONRF3 nejsou schopny vazby ATP a ADP, jelikož metoda jeho purifikace mohla vést k jeho denaturaci (viz níže).

Informace o struktuře proteinu LONRF3 doplňují výsledky analýzy HDX-MS (Obr. 25). Interpretace těchto výsledků není jednoznačná, jelikož nelze s určitostí říci, zda či nakolik byl protein LONRF3 (v důsledku použité metody jeho purifikace) v nativním či částečně denaturovaném stavu. Podle Chisnall *et al.* nemá přítomnost sarkosylu během purifikace vliv na funkci získaného proteinu, podle Tao *et al.* je však funkce ovlivněna koncentrací sarkosylu a dalšími aditivy, Yadava a Ockenhouse tvrdí, že při použití 0,5% sarkosylu je část získaných proteinů v denaturovaném a část v nativním stavu (Chisnall *et al.*, 2014, Tao *et al.*, 2010, Yadava a Ockenhouse, 2003). Na částečnou denaturaci proteinu LONRF3 purifikovaného sarkosylovou metodou však poukazuje absence rostoucího trendu deuterace s časem (Obr. 25). U dat získaných z HDX-MS TPR

domén proteinu Tomm34, lze totiž pozorovat s rostoucím časem výraznou změnu v deuteraci aminokyselin (Trčka *et al.*, 2014). Jako kontrola vlivu sarkosylu na strukturu proteinů by mohla sloužit HDX-MS analýza vzorků solubilního purifikovaného proteinu s či bez přidavku sarkosylu. Jestliže však byl protein LONRF3 purifikován v nativním stavu, byly tímto experimentem získány nové informace o jeho sekundární struktuře.

Výsledky charakterizace protilátek proti proteinu LONRF3 prokázaly jejich specifitu vůči proteinu LONRF3 (Obr. 26c). Zároveň bylo zjištěno, že jsou získané protilátky schopné vazby i na epitopy přítomné v nativní formě proteinu LONRF3 (Obr. 26d) a mohly tudíž být v budoucnu použity pro imunofluorescenční barvení či immunoprecipitaci.

Hlavní součástí diplomové práce bylo ověření hypotézy, zda je protein LONRF3 ko-chaperonem proteinů Hsp70 a Hsp90. Kromě *in silico* predikce k tomu sloužily také různá uspořádání SBP pull-down analýz. Jelikož je známo, že TPR ko-chaperony interagují s chaperony Hsp70/90 prostřednictvím jejich C-koncem (Ballinger *et al.*, 1999, Carrigan *et al.*, 2004), byla putativní interakce LONRF3-Hsp70/90 ověřena metodou pull-down v přítomnosti nadbytku C-terminálních peptidů Hsp70/90 či prostřednictvím proteinů Hsp70/90, jenž neměly ve své struktuře přítomen svůj C-konec. Z výsledků pull-down analýzy je patrné, že protein LONRF3 pravděpodobně interaguje jak s chaperonem Hsp70, tak s Hsp90. Pro ověření specifity analyzovaných interakcí, byl nejprve proveden SBP pull-down s lyzáty buněk linie H1299-SBP-Hsp70/90 s ektopicky exprimovaným proteinem HA-LONRF3 s přidanými C-terminálními peptidy Hsp70/90. Výsledky ukazují mírně sníženou interakci mezi proteinem LONRF3 a chaperony Hsp70/90 v přítomnosti nadbytku C-terminálních peptidů Hsp70/90 (Obr. 27a). Pouze nepatrné snížení LONRF3-Hsp70/90 interakce mohlo být způsobeno strukturně neuskutečnitelnou kompeticí mezi koncovými peptidy a TPR doménou proteinu LONRF3. Důvodem mohla být sterická nedostupnost TPR domény proteinu LONRF3 vazané k SBP-Hsp70/90 pro volné C-terminální peptidy. Obdobný jev byl pozorován u EEVD-závislé interakce proteinu Tomm34 s Hsp70 (Trčka *et al.*, 2014). Přesto však tyto výsledky podpořily hypotézu existence interakce mezi LONRF3 a molekulárními chaperony.

Pro další ověření interakčního rozhraní mezi proteinem LONRF3 a molekulárními chaperony byl proveden SBP pull-down purifikovaných bakteriálně produkovaných proteinů SBP-Hsp70/90 a SBP-Hsp70 Δ /90 Δ (s deletovanými C-konci) inkubovaných s lyzátem buněk HEK293 s ektopickou expresí HA-LONRF3. Výsledky ukázaly, že

zatímco HA-LONRF3 interaguje s chaperonem SBP-Hsp70, jeho vazba k SBP-Hsp70 Δ je výrazným způsobem snížena. Naopak interakce chaperonů SBP-Hsp90 a SBP-Hsp90 Δ je nezměněna (Obr. 28b). Dokonce je pozorováno mírné zvýšení interakce proteinu LONRF3 s proteinem SBP-Hsp90 Δ . Z výsledků SBP pull-down experimentů vyplývá, že je pro interakci LONRF3-Hsp70 nezbytná přítomnost C-koncového motivu, zatímco C-konec proteinu Hsp90 se jeví jako postradatelný pro vznik komplexu LONRF3-Hsp90. Skutečnost, že nebyl pozorován pokles interakce mezi proteinem LONRF3 a SBP-Hsp90 Δ , ale naopak její zesílení mohla být způsobena změnou konformace proteinu Hsp90 při delecí jeho C-konce nebo také může odrážet EEVD-nezávislou interakci LONRF3-Hsp90, která je zeslabována vazbou jiných ko-chaperonů k EEVD vazebnému motivu Hsp90. Zároveň byly chaperony v tomto SBP pull-down experimentu produkovány v bakteriích a postrádaly tudíž postranslační modifikace, jež byly u chaperonů v předchozím experimentu přítomny. Nelze tedy vyloučit, že jsou do interakce mezi těmito proteiny zahrnuty i postranslační modifikace chaperonů. Současně bylo potvrzeno, že nedochází k nespecifické vazbě proteinu LONRF3 na streptavidinovou matici (Obr. 27b).

Zajímavý byl vliv lyzačních pufrů na protein-proteinové interakce. Přestože protein Chip interaguje s C-koncem proteinů Hsp70/90 (Ballinger *et al.*, 1999), bylo pozorováno výrazné snížení této interakce při použití lyzačního pufru s 0,5% CHAPS oproti 0,5% NP-40. Protein CHAPS je zwitteriontový detergent a obsahuje tudíž kladně i záporně nabitou část, kdežto NP-40 je neionogenním detergentem. Je tedy možné, že díky své chemické struktuře rozrušuje CHAPS protein-proteinové interakce více a tudíž by mohl snáze rozrušit elektrostatické interakce, které jsou zapojeny v interakci Hsp-TPR doména (Scheufler *et al.*, 2000).

Další výsledky funkční analýzy proteinu LONRF3 *in vivo* ukazují, že se nám podařilo identifikovat a ověřit NLS sekvenci proteinu LONRF3 (Obr. 29). Výsledky tedy prokázaly lokalizaci proteinu LONRF3 v jádře (Obr. 30).

Propojení výsledků *in vivo* analýzy se SBP pull-down experimenty naznačuje, že protein LONRF3 interaguje s jadernými chaperony Hsp70 a Hsp90. Chaperon Hsp90 se kupříkladu účastní regulace transkripce, remodelace chromatinu a podílí se i na sestavení 20S jednotky proteazomu (Calderwood a Neckers, 2016, Eleuteri *et al.*, 2002). Protein Hsp70 se v jádře podílí na ochraně jaderné DNA před jednořetězcovými zlomy (Kotoglou *et al.*, 2009). Protein LONRF3 tady může představovat jaderný ko-chaperon Hsp70/90.

Za povšimnutí stojí i výsledky vyhledávání v databázi IntAct, která přiřadila proteinu LONRF3 interakce s proteiny APPBP2 (Amyloid protein-binding 2), NOTCH2 (Notch homolog 2 N-terminal-like protein) a s prohibitinem. Všechny tři proteiny jsou dle informací v databázi lokalizované i v jádře. Zároveň bylo z databáze zjištěno, že protein APPBP2 obsahuje ve své struktuře 8 TPR repetit. Protein NOTCH2 kromě řady jiných proteinů interaguje i se členem rodiny Hsp70-HSPA12A, což by mohlo naznačovat existenci komplexu LONRF3-Hsp70-NOTCH2 a prohibitin se účastní inhibice syntézy DNA.

Předchozí výsledky ukázaly, že by mohl být protein LONRF3 součástí chaperonového systému. Jelikož vede ovlivnění tohoto systému tepelným šokem nebo farmakologickou inhibicí jeho složek k aktivaci HSR řízeného HSF1 (Powers a Workman, 2007, Shi *et al.*, 1998), zjišťovali jsme jak je ovlivněna exprese genu *LONRF3* působením inhibitorů Hsp90 (17-AAG, AUY922), translace (puromycin) a proteazomu (bortezomib). I když měly všechny použité látky aktivovat HSR (Baler *et al.*, 1996, Powers a Workman, 2007), nebylo pozorováno zvýšené množství fosforylované formy HSF1 (S326) u buněk linie MCF-7 ovlivněných puromycinem a 17-AAG (Obr. 31). Jestliže však není fosforylace v pozici S326 vhodným ukazatelem míry aktivace HSF1 (Budzynski *et al.*, 2015), mohlo být i přes dané výsledky HSF1 aktivované. Signifikantně zvýšená exprese genu *LONRF3* byla pozorována pouze u buněčné linie MCF-7 ovlivněné inhibitorem proteazomu (Obr. 33). Na druhou stranu byl pozorován pokles exprese daného genu ovlivněním buněk inhibitory chaperonu Hsp90. Tento rozdíl naznačuje, že pravděpodobně nedošlo k aktivaci exprese genu *LONRF3* působením zvýšené aktivity transkripčního faktoru HSF1. Inhibicí proteazomu jsou kromě HSF1 aktivovány i transkripční faktory Mad1 (Mitotic arrest deficient-like 1), Gadd153 (DNA damage inducible transcript 3) a ATF3 (Activating transcription factor 3) (Zimmermann *et al.*, 2000). Je tedy možné, že by mohla být aktivita genu *LONRF3* ovlivněna jiným transkripčním faktorem.

6 Závěr

Proteinové komplexy Hsp70/90 jsou nepostradatelnou součástí buněčného proteomu podílejícího se na udržení proteinové homeostáze. Součástí těchto komplexů je i řada TPR ko-chaperonů. V rámci diplomové práce byl studován protein LONRF3 – nový, potenciální TPR ko-chaperon Hsp70/90. Cílem práce byla úvodní strukturní a funkční charakterizace tohoto proteinu.

Nejprve byl naklonován gen pro protein LONRF3 do několika expresních vektorů pro bakteriální produkci proteinu. Následně byla provedena řada optimalizací pro purifikaci proteinu z bakterií, přičemž byly nalezeny optimální purifikační podmínky použitím lyzačního pufru 50mM HEPES pH 7,5 s 0,3% sarkosyelm a 1mM PMSF a před inkubací vzniklého lyzátu s Ni-NTA agarózovou maticí byl přidán TritonX-100 v konečné koncentraci 2 %. Byly vyprodukovány a přečištěny protein His₆-rbs-LONRF3 a His₆-TEV-LONRF3 (následně byla značka tohoto proteinu odštěpena TEV proteázou za vzniku proteinu LONRF3).

Informace o struktuře proteinu LONRF3 byly získány jednak *in silico* predikcí, dále limitovanou proteolýzou za použití trypsinu a na závěr pomocí analýzy HDX-MS. U proteinu His₆-rbs-LONRF3 nebyl prokázán vliv vazby ATP a ADP na strukturu daného proteinu, která by byla detekovatelná limitovanou proteolýzou. Jestliže byl protein LONRF3 po purifikačních krocích v nativním stavu, podařilo se nám získat prvotní informace o jeho sekundární struktuře pomocí HDX-MS analýzy.

Protein His₆-rbs-LONRF3 byl taktéž použit pro produkci monoklonální protiátky v myši, která byla připravena ve spolupráci s firmou Moravian Biotechnology. Výsledky charakterizace protilátek prokázaly jejich specifitu vůči proteinu LONRF3 a zároveň bylo zjištěno, že jsou dané protilátky schopny vázat i nativní epitop přítomný v proteinu LONRF3.

Hlavní součástí diplomové práce bylo ověření formulované hypotézy, že by mohl být protein LONRF3 TPR ko-chaperonem proteinů Hsp70/90. Pomocí různých uspořádání SBP pull-down analýz byla prokázána interakce proteinu LONRF3-Hsp70/90. Zároveň výsledky ukázaly, že je pro interakci proteinu LONRF3 s Hsp70 nezbytná přítomnost C-konce daného chaperonu.

Během funkční analýzy jsme zjistili pomocí proteinu LONRF3 s fúzovaným fluorescenčním proteinem mCherry jeho lokalizaci v jádře. Subcelulární lokalizaci jsme následně verifikovali pomocí cílení mutagenese v NLS sekvenci.

Na závěr jsme zjistili pomocí qRT-PCR, jak je ovlivněna exprese genu *LONRF3* v závislosti na proteotoxickém stresu. Výsledky ukázaly signifikantně zvýšené množství kopií cDNA pro gen *LONRF3* u buněk linie MCF-7 ovlivněných inhibitorem proteazomu (bortezomibem) a statisticky významně snížené množství kopií cDNA vlivem inhibitorů Hsp90 (17-AAG a AU922).

Všechny cíle diplomové práce byly splněny.

7 Seznam zdrojů

- Adhikary S., Marinoni F., Hock A., Hulleman E., Popov N., Beier R., Bernard S., Quarto M., Capra M., Goettig S., Kogel U., Scheffner M., Helin K. a Eilers M. (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* **123**, 409-421.
- Ali M. M. U., Roe S. M., Vaughan C. K., Meyer P., Panaretou B., Piper P. W., Prodromou C. a Pearl L. H. (2006) Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* **440**, 1013-1017.
- Allan R. K. a Ratajczak T. (2011) Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperone* **16**, 353-367.
- Ardley H. C. a Robinson P. A. (2005). Essays in Biochemistry: The Ubiquitin-Proteasome System; E3 ubiquitin ligases. Portland Press Ltd, London, UK, **41**, pp. 15-30. ISBN 978-1-85578-153-5.
- Baler R., Zou J. Y. a Voellmy R. (1996) Evidence for a role of Hsp70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperone* **1**, 33-39.
- Ballinger C. A., Connell P., Wu Y. X., Hu Z. Y., Thompson L. J., Yin L. Y. a Patterson C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**, 4535-4545.
- Ben-Zvi A. P. a Goloubinoff P. (2001) Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol* **135**, 84-93.
- Bernassola F., Karin M., Ciechanover A. a Melino G. (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: Multiple players in cancer development. *Cancer Cell* **14**, 10-21.
- Borden K. L. B. a Freemont P. S. (1996) The RING finger domain: A recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 395-401.
- Borkovich K. A., Farrelly F. W., Finkelstein D. B., Taulien J. a Lindquist S. (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* **9**, 3919-3930.
- Bracher A. a Verghese J. (2015) The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front Mol Biosci* **2**, 1-9.
- Brinker A., Scheufler C., Von Der Mulbe F., Fleckenstein B., Herrmann C., Jung G., Moarefi I. a Hartl F. U. (2002) Ligand discrimination by TPR domains - Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 center dot Hop center dot Hsp90 complexes. *J Biol Chem* **277**, 19265-19275.
- Budzynski M. A., Puustinen M. C., Joutsen J. a Sistonen L. (2015) Uncoupling stress-inducible phosphorylation of heat shock factor 1 from its activation. *Mol Cell Biol* **35**, 2530-2540.
- Calderwood S. K. a Gong J. (2016) Heat shock proteins promote cancer: It's a protection racket. *Trends Biochem Sci* **41**, 311-323.
- Calderwood S. K. a Neckers L. (2016) Hsp90 in cancer: transcriptional roles in the nucleus. *Adv Cancer Res* **129**, 89-106.

- Capili A. D., Edghill E. L., Wu K. a Borden K. L. B. (2004) Structure of the C-terminal RING finger from a RING-IBR-RING/TRIAD motif reveals a novel zinc-binding domain distinct from a RING. *J Mol Biol* **340**, 1117-1129.
- Carra S., Seguin S. J., Lambert H. a Landry J. (2008) HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem* **283**, 1437-1444.
- Carrigan P. E., Nelson G. M., Roberts P. J., Stoffer J. N., Riggs D. L. a Smith D. F. (2004) Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. *J Biol Chem* **279**, 16185-16193.
- Ci W., Polo J. M., Cerchietti L., Shaknovich R., Wang L., Yang S. N., Ye K., Farinha P., Horsman D. E., Gascoyne R. D., Elemento O. a Melnick A. (2009) The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* **113**, 5536-5548.
- Cranz-Mileva S., Imkamp F., Kolygo K., Maglica Z., Kress W. a Weber-Ban E. (2008) The flexible attachment of the N-domains to the ClpA ring body allows their use on demand. *J Mol Biol* **378**, 412-424.
- Csermely P., Schnaider T., Soti C., Prohaszka Z. a Nardai G. (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* **79**, 129-168.
- Cyr D. M., Hohfeld J. a Patterson C. (2002) Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* **27**, 368-375.
- Daugaard M., Rohde M. a Jaattela M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* **581**, 3702-3710.
- Dice J. F., Chiang H. L., Spencer E. P. a Backer J. M. (1986) Regulation of gatabolism of microinjected ribonuclease A - identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide. *J Biol Chem* **261**, 6853-6859.
- Dobson C. M., Sali A. a Karplus M. (1998) Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Edit* **37**, 868-893.
- Dunker A. K., Silman I., Uversky V. N. a Sussman J. L. (2008) Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 756-764.
- Eleuteri A. M., Cuccioloni M., Bellesi J., Lupidi G., Fioretti E. a Angeletti M. (2002) Interaction of Hsp90 with 20S proteasome: Thermodynamic and kinetic characterization. *Proteins* **48**, 169-177.
- Fang S. a Weissman A. M. (2004) A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1546-1561.
- Faou P. a Hoogenraad N. J. (2012) Tom34: A cytosolic cochaperone of the Hsp90/Hsp70 protein complex involved in mitochondrial protein import. *BBA-Mol Cell Res* **1823**, 348-357.
- Felts S. J., Owen B. a L., Nguyen P., Trepel J., Donner D. B. a Toft D. O. (2000) The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J Biol Chem* **275**, 3305-3312.

- Flaherty K. M., Delucaflaherty C. a McKay D. B. (1990) 3-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**, 623-628.
- Flanagan J. M., Healey S., Young J., Whitehall V., Trott D. A., Newbold R. F. a Chenevix-Trench G. (2004) Mapping of a candidate colorectal cancer tumor-suppressor gene to a 900-kilobase region on the short arm of chromosome 8. *Gene Chromosome Canc* **40**, 247-260.
- Gallastegui N. a Groll M. (2010) The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* **35**, 634-642.
- Greene M. K., Maskos K. a Landry S. J. (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6108-6113.
- Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D. a Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 angstrom resolution. *Nature* **386**, 463-471.
- Guettouche T., Boellmann F., Lane W. S. a Voellmy R. (2005) Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* **6**, 4-4.
- Gupta R. S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1435-1491.
- Harrison C. (2003) GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress Chaperon.* **8**, 218-224.
- Harrison C. J., Hayerhartl M., Diliberto M., Hartl F. U. a Kuriyan J. (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**, 431-435.
- Hartl F. U., Bracher A. a Hayer-Hartl M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324-332.
- Haslbeck M. (2002) SHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1649-1657.
- Hohfeld J., Minami Y. a Hartl F. U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-598.
- Huibregtse J. M., Scheffner M., Beaudenon S. a Howley P. M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin protein ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 2563-2567.
- Hunt I. (2005) From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr Purif* **40**, 1-22.
- Hunter T. a Poon R. Y. C. (1997) Cdc37: A protein kinase chaperone? *Trends Cell Biol* **7**, 157-161.
- Chen K., Mizianty M. J. a Kurgan L. (2012) Prediction and analysis of nucleotide-binding residues using sequence and sequence-derived structural descriptors. *Bioinformatics* **28**, 331-341.
- Chen S. Y., Prapapanich V., Rimerman R. A., Honore B. a Smith D. F. (1996) Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. *Mol Endocrinol* **10**, 682-693.

Chisnall B., Johnson C., Kulaberoglu Y. a Chen Y. W. (2014). Structural genomics: General applications; Insoluble protein purification with sarkosyl: facts and precautions. Humana Press, NY, USA, **1091**, pp. 179-186. ISBN 978-1-62703-691-7.

Chung C. H. a Goldberg A. L. (1982) DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 795-799.

Jakob U., Gaestel M., Engel K. a Buchner J. (1993) Small heat-shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* **268**, 1517-1520.

Jiang J. H., Ballinger C. A., Wu Y. X., Dai Q., Cyr D. M., Hohfeld J. a Patterson C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase - Identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* **276**, 42938-42944.

Johnson D. E. (2015) The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocr-Relat Cancer* **22**, 1-17.

Johnson J. L. a Toft D. O. (1995) Binding of p23 and Hsp90 during assembly with the progesterone receptor. *Mol Endocrinol* **9**, 670-678.

Kampinga H. H. a Craig E. A. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 579-592.

Kaushik S. a Cuervo A. M. (2012) Chaperones in autophagy. *Pharmacol Res* **66**, 484-493.

Kim Y. E., Hipp M. S., Bracher A., Hayer-Hartl M. a Hartl F. U. (2013). Annual Review of Biochemistry; Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annual Reviews Inc., CA, USA, **82**, pp. 323-355. ISBN 978-0-8243-0882-7.

Kityk R., Kopp J., Sinning I. a Mayer M. P. (2012) Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell* **48**, 863-874.

Koga H. a Cuervo A. M. (2011) Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **43**, 29-37.

Konermann L., Pan J. a Liu Y.-H. (2011) Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. *Chem Soc Rev* **40**, 1224-1234.

Kotoglou P., Kalaitzakis A., Vezyraki P., Tzavaras T., Michalis L. K., Dantzer F., Jung J. U. a Angelidis C. (2009) Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperon*. **14**, 391-406.

Lamb J. R., Tugendreich S. a Hieter P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions - to TPR or not to TPR. *Trends Biochem Sci* **20**, 257-259.

Lee A. Y. L., Hsu C. H. a Wu S. H. (2004a) Functional domains of *Brevibacillus thermoruber* Lon protease for oligomerization and DNA binding - Role of N-terminal and sensor and substrate discrimination domains. *J Biol Chem* **279**, 34903-34912.

Lee I. a Suzuki C. K. (2008) Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *BBA-Mol Cell Res* **1784**, 727-735.

Lee P., Shabbir A., Cardozo C. a Caplan A. J. (2004b) Sti1 and Cdc37 can stabilize Hsp90 in chaperone complexes with a protein kinase. *Mol Biol Cell* **15**, 1785-1792.

- Li J., Richter K., Reinstein J. a Buchner J. (2013a) Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 326-331.
- Li Z., Hartl F. U. a Bracher A. (2013b) Structure and function of Hip, an attenuator of the Hsp70 chaperone cycle. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 929-937.
- Macrae T. H. (2000) Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci* **57**, 899-913.
- Makhnevych T. a Houry W. A. (2012) The role of Hsp90 in protein complex assembly. *BBA-Mol Cell Res* **1823**, 674-682.
- Makkerh J. P. S., Dingwall C. a Laskey R. A. (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* **6**, 1025-1027.
- Mayer M. P. (2013) Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* **38**, 507-514.
- Mayer M. P. a Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670-684.
- Morishima Y., Wang A. M., Yu Z., Pratt W. B., Osawa Y. a Lieberman A. P. (2008) CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. *Hum Mol Genet* **17**, 3942-3952.
- Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L. a Koonin E. V. (1999) AAA(+): A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**, 27-43.
- Panaretou B., Siligardi G., Meyer P., Maloney A., Sullivan J. K., Singh S., Millson S. H., Clarke P. A., Naaby-Hansen S., Stein R., Cramer R., Mollapour M., Workman P., Piper P. W., Pearl L. H. a Prodromou C. (2002) Activation of the ATPase activity of Hsp90 by the stress-regulated cochaperone Aha1. *Mol Cell* **10**, 1307-1318.
- Pennisi R., Ascenzi P. a Di Masi A. (2015) Hsp90: A new player in DNA repair? *Biomolecules* **5**, 2589-2618.
- Powers M. V. a Workman P. (2007) Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Lett* **581**, 3758-3769.
- Qian S. B., Mcdonough H., Boellmann F., Cyr D. M. a Patterson C. (2006) CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* **440**, 551-555.
- Quille M.-L., Carat S., Quemener-Redon S., Hirchaud E., Baron D., Benech C., Guihot J., Placet M., Mignen O., Ferec C., Houlgatte R. a Friocourt G. (2011) High-Throughput analysis of promoter occupancy reveals new targets for Arx, a gene mutated in mental retardation and interneuronopathies. *Plos One* **6**, 1-14.
- Reed S. I. (1980) The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell-division. *Genetics* **95**, 561-577.
- Retzlaff M., Hagn F., Mitschke L., Hessling M., Gugel F., Kessler H., Richter K. a Buchner J. (2010) Asymmetric Activation of the Hsp90 Dimer by Its Cochaperone Aha1. *Mol Cell* **37**, 344-354.

- Roe S. M., Ali M. M. U., Meyer P., Vaughan C. K., Panaretou B., Piper P. W., Prodromou C. a Pearl L. H. (2004) The mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* **116**, 87-98.
- Romero D. G., Plonczynski M., Vergara G. R., Gomez-Sanchez E. P. a Gomez-Sanchez C. E. (2004) Angiotensin II early regulated genes in H295R human adrenocortical cells. *Physiol Genomics* **19**, 106-116.
- Rotanova T. V., Botos I., Melnikov E. E., Rasulova F., Gustchina A., Maurizi M. R. a Wlodawer A. (2006) Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Protein Sci* **15**, 1815-1828.
- Saibil H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Bio* **14**, 630-642.
- Shi Y. H., Mosser D. D. a Morimoto R. I. (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* **12**, 654-666.
- Scheffner M., Huibregtse J. M., Vierstra R. D. a Howley P. M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G., Pegoraro S., Moroder L., Bartunik H., Hartl F. U. a Moarefi I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Sorger P. K. a Pelham H. R. B. (1987) The glucose-regulated protein-Grp94 is related to heat-shock protein-Hsp90. *J Mol Biol* **194**, 341-344.
- Sun Y. a Macrae T. H. (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2460-2476.
- Tanaka Y., Guhde G., Suter A., Eskelinen E. L., Hartmann D., Lullmann-Rauch R., Janssen P. M. L., Blanz J., Von Figura K. a Saftig P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902-906.
- Tao H., Liu W., Simmons B. N., Harris H. K., Cox T. C. a Massiah M. A. (2010) Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *BioTechniques* **48**, 61-64.
- Trčka F., Ďurech M., Man P., Hernychová L., Müller P. a Vojtěšek B. (2014) The assembly and intermolecular properties of the Hsp70-Tomm34-Hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem* **289**, 9887-9901.
- Trepel J., Mollapour M., Giaccone G. a Neckers L. (2010) Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 537-549.
- Versteeg S., Mogk A. a Schumann W. (1999) The *Bacillus subtilis* HtpG gene is not involved in thermal stress management. *Mol Gen Genet* **261**, 582-588.
- Wang X., Venable J., Lapointe P., Hutt D. M., Koulov A. V., Coppinger J., Gurkan C., Kellner W., Matteson J., Plutner H., Riordan J. R., Kelly J. W., Yates J. R., Iii a Balch W. E. (2006) Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* **127**, 803-815.

Weaver A. J., Sullivan W. P., Felts S. J., Owen B. a. L. a Toft D. O. (2000) Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. *J Biol Chem* **275**, 23045-23052.

Weickl T., Abelmann K. a Buchner J. (1999) An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. *J Mol Biol* **293**, 685-691.

Williams D. C., Vanfrank R. M., Muth W. L. a Burnett J. P. (1982) Cytoplasmic inclusion-bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* **215**, 687-689.

Yadava A. a Ockenhouse C. F. (2003) Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect Immun* **71**, 4961-4969.

Yarmolinsky M. B. a Delahaba G. L. (1959) Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **45**, 1721-1729.

Young J. C. a Hartl F. U. (2000) Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J* **19**, 5930-5940.

Zhang T., Ploetz E. A., Nagy M., Doyle S. M., Wickner S., Smith P. E. a Zolkiewski M. (2012) Flexible connection of the N-terminal domain in ClpB modulates substrate binding and the aggregate reactivation efficiency. *Proteins* **80**, 2758-2768.

Zhao R. M. a Houry W. A. (2005) Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem Cell Biol* **83**, 703-710.

Zimmermann J., Erdmann D., Lalande I., Grossenbacher R., Noorani M. a Furst P. (2000) Proteasome inhibitor induced gene expression profiles reveal overexpression of transcriptional regulators ATF3, GADD153 and MAD1. *Oncogene* **19**, 2913-2920.

Zou J. Y., Guo Y. L., Guettouche T., Smith D. F. a Voellmy R. (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**, 471-480.

Zylicz M. a Wawrzynow A. (2001) Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* **51**, 283-287.

internetový zdroj 1 (staženo 14. 4. 2016)

www.mdc-berlin.de/11041540/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/images/autophagy11.png

internetový zdroj 2

<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>

internetový zdroj 3

http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi