



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

# Afinitní purifikace proteinů interagujících s deriváty roscovitinu

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Eva Szczyrbová**  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Radim Simerský, Ph.D.**

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora:	Eva Szczyrbová
Název práce:	Afinitní purifikace proteinů interagujících s deriváty roscovitinu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce:	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	Afinitní chromatografie je separační technika, která k izolaci složky z komplexního vzorku využívá její speciální interakci s vazebným partnerem ligandem. V této práci byla užitím proteomických technik řešena problematika interakcí proteinů s potenciálními léčivy. Práce se tedy zabývá afinitními purifikacemi proteinů lyzovaných nádorových buněk linie HCT 116. Jako ligandy sloužily tři deriváty roscovitinu, selektivního inhibitoru CDK. Na základě analýzy dat byly určeny proteiny specificky interagující s ligandy. Výsledkem byla identifikace potenciálních terapeutických cílů roscovitinových derivátů.
Klíčová slova:	Afinitní chromatografie, roscovitine, nádorová onemocnění, buněčný cyklus, cyklin-dependentní kinázy.
Počet stran:	63
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and Suriname: Eva Szczyrbová

Title of thesis: Affinity purification of proteins interacting with roscovitine derivatives

Type of thesis: Bachelor

Department: Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Protein Biochemistry and Proteomics

Supervisor: Mgr. Radim Simerský, Ph.D.

The year of presentation: 2018

Abstract: Affinity chromatography is a separation technique which can be used for the isolation of the analyzed compounds from the complex samples by utilizing their specific interaction with the ligand binding partner. In this work we focus on the topic of protein interactions with potential drugs. Thus, we engaged the affinity purification of proteins from the colorectal carcinoma cells HCT 116 with subsequent mass spectrometry analysis. As ligands served three structural analogs of roscovitin, a selective CDK inhibitor. Following statistical data analysis, proteins specifically interacting with particular roscovitine ligands were identified.

Keywords: Affinity chromatography, roscovitine, tumor diseases, cell cycle, cyclin-dependent kinases.

Number of page: 63

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením  
Mgr. Radima Simerského, Ph.D. s použitím literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 15. 5. 2018

.....

podpis

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D. za odborné vedení této práce, laskavý přístup a trpělivost. Mé poděkování patří též Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za měření vzorků a následnou analýzu dat, Mg. Ivu Chamrádovi, Ph.D. za cenné rady, Mgr. Evě Řezníčkové za přípravu biologického materiálu a v neposlední řadě RNDr. Markovi Zatloukalovi, Ph.D. a Ing. Liboru Havlíčkovi, CSc. za poskytnutí ligandů.

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	7
<b>1 Úvod a cíle práce</b> .....	9
<b>2 Teoretická část</b> .....	10
<b>2.1 Proteomika a proteiny</b> .....	10
<b>2.2 Regulace buněčného cyklu – cyklin-dependentní kinázy</b> .....	12
2.2.1 Komplexy cyklin-CDK a jejich funkce během buněčného cyklu.....	12
2.2.2 Inhibitory CDK .....	14
<b>2.3 Proteomické techniky</b> .....	16
2.3.1 Afinitní chromatografie.....	17
2.3.2 Hmotnostní spektrometrie.....	20
2.3.3 Přístupy ke zpracování proteinových vzorků .....	23
<b>3 Experimentální část</b> .....	25
<b>3.1 Materiál a chemikálie</b> .....	25
<b>3.2 Přístrojové vybavení</b> .....	26
<b>3.3 Experimentální metody</b> .....	27
3.3.1 Imobilizace ligandu na afinitní nosič .....	27
3.3.2 Spektrofotometrické stanovení úspěšnosti imobilizace ligandu .....	28
3.3.3 Extrakce proteinů z buněčné linie .....	29
3.3.4 Purifikace proteinů za použití afinitní chromatografie.....	29
3.3.5 Štěpení v roztoku.....	30
3.3.6 Čištění peptidů na C-18 MicroSpin koloně.....	30
3.3.7 Hmotnostní spektrometrie .....	31
3.3.8 Bioinformatická analýza MS dat z afinitně-chromatografické izolace a identifikace proteinů.....	32
<b>4 Výsledky a diskuze</b> .....	34
<b>4.1 Spektrofotometrické stanovení úspěšnosti imobilizace ligandu</b> .....	34
<b>4.2 Extrakce proteinů z buněk linie HCT 116</b> .....	34
<b>4.3 Afinitní purifikace proteinů</b> .....	36
4.3.1 MS data z afinitně-chromatografické izolace.....	36
4.3.2 Vyhodnocení MS dat.....	37
<b>5 Závěr</b> .....	55
<b>6 Použitá literatura</b> .....	57

## Seznam zkratk

ABPP	profilování závislé na aktivitě sondy (activity based probe profiling)
AMK	aminokyselina
AP-MS	afinitní purifikace spojená s hmotnostní spektrometrií
BC	buněčný cyklus
C2-R	ligand, C2-(2'-aminoethylamino)-roscovitine
C8-R	ligand, C8-(2'-aminoethylamino)-roscovitine
CAK	CDK-aktivující kináza
CCCP	chemická proteomika zaměřená na sloučeninu (compound-centric chemical proteomisc)
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKI	inhibitor cyklin-dependentní kinázy
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FASP	štěpení na filtrech s regenerovanou celulózou (filter-aided sample preparation)
HCT 116	buněčná kultura (human colon colorectal carcinoma)
IAM	jodacetamid
Kegg	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LB	lyzační pufr
MALDI	ionizace pomocí laseru za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mTOR	protein kináza (mammalian target of rapamycin)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
p-Ph-R	ligand, p-phenyl-[(2'-aminoethylamino)carbonyl]-roscovitine
SAINT	Significance Analysis of INTeractome

SDS	dodecylsírán sodný
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
WB1	promývací pufr č. 1
WB2	promývací pufr č. 2



# 1 Úvod a cíle práce

Celá řada onemocnění je způsobena narušením správné buněčné fyziologie, často za účasti proteinů. Příkladem jsou onemocnění nádorová, u kterých dochází mimo jiné k deregulaci buněčného cyklu a následně k nadměrné buněčné proliferaci.

Tato práce se s využitím proteomických technik zabývá studiem proteinů, které interagují s látkami odvozenými od roscovitinu a které mají potenciál stát se léčivy. Roscovitine je protinádorové léčivo, které funguje jako inhibitor cyklin-dependentních kináz, proteinů řídících buněčný cyklus. Proteomické techniky jsou běžně užívány ve výzkumu potenciálních léčiv, neboť umožňují experimentálně studovat interakce chemických látek s proteomy pacientů. Málokdy dochází k interakci látky pouze s jediným proteinem, proto mohou tyto studie vést k objevení nových, často překvapujících terapeutických cílů a rovněž k odhalení případných vedlejších efektů léčiva a k snížení jeho toxicity (Rix et Superti-Furga, 2009).

Cíle mé bakalářské práce jsou:

- Za použití vybraných derivátů roscovitinu připravit afinitní gely.
- Optimalizovat postupy extrakce a afinitní purifikace proteinů z buněčných linií.
- Zpracovat vybrané vzorky a provést analýzu izolovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Vyhodnotit výsledky, srovnat jednotlivé varianty použitých ligandů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Proteomika a proteiny

Proteiny (bílkoviny) jsou univerzální makromolekuly živých systémů, které mají klíčové funkce v téměř všech biologických procesech. Název protein pochází z řeckého proteos (prvotní, nejpodstatnější). Z chemického hlediska se jedná o biopolymery složené z jednoho či více polypeptidických řetězců, které obsahují sto až několik tisíc aminokyselinových zbytků.

Aminokyseliny (AMK) jsou rozmanitou skupinou organických molekul, obsahující na jednom uhlíku jak aminoskupinu, tak karboxylovou skupinu. Veškeré bílkoviny jsou složeny pouze z 23 typů proteinogenních aminokyselin. Jejich kovalentní propojení v peptidickém řetězci zajišťuje peptidová vazba, která vzniká dehydratací karboxylové skupiny a aminoskupiny mezi sousedními AMK (Campbell et Reece, 2006). Fyzikální a chemické vlastnosti postranních řetězců AMK určují jejich jedinečnou charakteristiku a také vlastnosti proteinu, který je z nich složen. Aminokyseliny mohou být polární, nepolární, zásadité či kyselé. Složitě prostorové uspořádání proteinu (konformace) umožňuje přiblížení postranních skupin AMK, které jsou v primární struktuře vzdáleny. Vznikají oblasti (aktivní místa) schopné interakce se specifickými organickými látkami (ligandy) či jinými proteiny (Rosypal et al., 2003).

Proteiny tvoří přibližně polovinu hmotnosti sušiny většiny buněk, v nichž zastávají množství rozdílných funkcí. Dle funkce v buňce rozlišujeme strukturní, zásobní, transportní, receptorové, obranné, kontraktilní, enzymatické, regulační a hormonální proteiny. Strukturní proteiny se podílejí na stavbě buněčných membrán a cytoskeletu (keratin). Související kontraktilní bílkoviny zajišťují buněčný pohyb (aktin, myosin). Proteiny zásobní slouží jako zásoba aminokyselin (vaječný albumin, mléčný kasein). Transportní proteiny jsou užívány k transportu jiných molekul v rámci organismu (hemoglobin) nebo v rámci buňky, kde jsou bílkoviny často využívány k přenosu látek přes cytoplasmatickou membránu (kanály, přenašeče). V membráně jsou také receptorové proteiny zajišťující odpověď buněk na stimuly z vnějšího prostředí (receptory hormonů, receptory bílých krvinek), které mohou mít mimo jiné formu hormonálního proteinu (inzulín). Hormonální proteiny se podílí na koordinaci aktivit buněk v organismu. Obranu proti cizorodým látkám zajišťují obranné proteiny, které vznikají v buňkách imunitního systému. Velmi důležitou funkcí proteinů je funkce enzymatická. Spočívá v umožnění

průběhu biochemických metabolických reakcí. V neposlední řadě mají proteiny regulační funkci. Podílejí se na regulaci biologických procesů, jako je replikace, buněčný cyklus a buněčné dělení, jejichž správný průběh je pro buňky životně důležitý (Campbell et Reece, 2006; Koolman et al., 2009).

Bílkoviny vznikají v buňce během procesu proteosyntézy. Z DNA vzniká transkripce mRNA, která je následně přepsána během translace do pořadí aminokyselin. Proces je značně složitý a umožňuje buňce jej na mnoha místech regulovat. Díky tomu vznikají pouze proteiny v daný moment potřebné. Soubor všech proteinů organismu, tkáně či buňky, které jsou zde přítomny v daném okamžiku, označujeme jako proteom.

Proteomika je interdisciplinární vědní obor zabývající se studiem proteomu. Proteom vzniká na základě genomu, souboru veškeré genetické informace buňky či organismu. Vzhledem k alternativnímu sestřihu mRNA a velkému množství modifikací proteinů přesahuje jejich počet u člověka počet genů (Campbell et Reece, 2006).

Cílem proteomiky je identifikace veškerých bílkovin, pochopení jejich struktury, biosyntézy a funkce. V dnešní době rozlišujeme 3 základní proteomické směry a to proteomiku strukturní, funkční a expresní. Strukturní proteomika se zabývá strukturou a lokalizací bílkovin v rámci buňky či v rámci organel. Proteomika funkční zkoumá funkce bílkovin, jejich interakce s molekulami přítomnými v prostředí a vzájemné proteinové interakce. Expresní proteomika porovnává složení a míru exprese proteinů mezi různými proteomy. Kombinací těchto směrů získáváme komplexní poznatky, které mohou být využity v rámci akademické i klinické praxe.

Jak vyplývá z předchozího textu, proteiny plní v každé buňce důležité funkce. Často hrají také roli při vzniku a rozvoji nemocí. Proteomické techniky jsou běžně užívány ve výzkumu potenciálních léčiv, neboť umožňují experimentálně studovat interakce chemických látek s proteomy pacientů (Rix et Superti-Furga, 2009).

## **2.2 Regulace buněčného cyklu – cyklin-dependentní kinázy**

Průchod buňky buněčným cyklem (BC) je řízen pomocí fosforylace cílových proteinů, které iniciují či regulují replikaci DNA, mitózu a cytokinezi. Fosforylační reakce provádí určitá skupina kontrolních enzymů – cyklin-dependentní kinázy (CDK; Alberts et al, 2001).

Cyklin-dependentní kinázy jsou katalytické proteiny z rodiny serin/threoninových proteinkináz (Malumbres et al., 2007), které se skládají ze dvou domén (N- a C-terminální) mezi nimiž je vazebné místo pro ATP nebo inhibitor (Otyepka et al., 2000). V průběhu BC je jejich přítomnost v buňce konstantní, avšak jejich aktivita je proměnlivá a závisí na vazbách regulátorů (Malumbres et Barbacid, 2005).

Regulace CDK spočívá v post-translačních modifikacích (fosforylace/defosforylace), v přechodných vazbách regulátorů a intracelulární translokaci. Mezi regulátory savčích CDK řadíme aktivátory (cykliny), inhibitory ze skupin INK4 a Cip/Kip (protein p16, p21, p57 a další) a inhibující enzymy (wee1, mik1, myt1, KAP; Meijer et al, 1997, Otto et Sicinski, 2017). Nejvýznamněji aktivitu CDK regulují cykliny. Cykliny jsou aktivační proteiny, které buňka v pravidelných cyklech syntetizuje a degraduje. Koncentrace cyklinů osciluje v závislosti na fázi BC (Sánchez-Martínez et al., 2015).

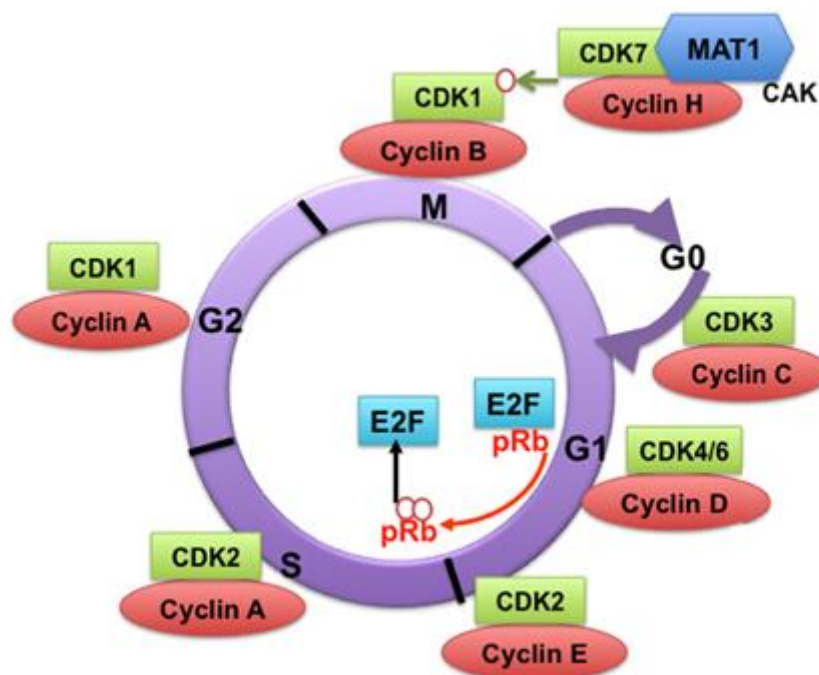
Lidský genom kóduje 21 CDK, přičemž pouze u sedmi (CDK1-4, 6, 10 a 11) bylo prokázáno, že hrají řídicí roli během BC. Další CDK mají odlišné funkce. Patří k nim role během apoptózy thymocytů, CDK3 má vliv na aktivaci výše uvedených CDK, CDK7-9 přispívají k regulaci transkripce a v neposlední řadě CDK5 se podílí na správné funkci neuronů (Knockaert et al., 2000, Sánchez-Martínez et al., 2015).

### **2.2.1 Komplexy cyklin-CDK a jejich funkce během buněčného cyklu**

Cykliny jsou nekovalentně vázány k CDK za tvorby komplexů cyklin-CDK. Po zformování není cyklin-CDK komplex hned aktivní. K jeho aktivaci vede fosforylace CDK na 2 místech (připojení aktivujícího a inhibujícího fosfátu) a následná defosforylace inhibujícího fosfátu. Fosforylace probíhá na konzervativních tyrosinových (Tyr15) a threoninových (Thr14) zbytcích a vede ke konformační změně, která posiluje vazbu s cyklinem (Jeffrey et al., 1995; Paulovich et Hartwell, 1995). Aktivující fosfát je připojen specifickou CDK-aktivující kinázou (CAK). Funkci CAK plní komplex cyklin H-CDK7 (Nigg, 1996). Připojení inhibujícího fosfátu zprostředkovává kináza Wee-1. Defosforylace

komplexu je zajištěna aktivační proteinfosfatázou cdc25 (Fattaey et al., 1997). Aktivovaný komplex se může zapojit v aktivaci dalšího komplexu cyklin-CDK nebo může fosforylovat cílový protein.

V různých fázích buněčného cyklu jsou exprimovány různé cykliny a dochází ke tvorbě rozličných cyklin-CDK komplexů (obr. 1). Mitogenické faktory aktivují tvorbu komplexu mezi cyklinem D a CDK4 či CDK6 v průběhu G1 či G0 fáze (Otto et Sicinski, 2017). Tento aktivovaný komplex fosforyluje retinoblastoma proteiny (Rb proteiny). Hyperfosforylace Rb proteinů vede k uvolnění E2F rodiny transkripčních faktorů a k transkripci genů nutných pro přechod mezi G1/S fází (Fischer et Lane, 2000). Mezi těmito geny je i gen pro syntézu cyklinu E (Malumbres et Barbacid, 2005). Cyklin E tvoří komplex s CDK2 během pozdní G1 fáze v hlavním kontrolním bodě buněčného cyklu. Aktivace komplexu cyklin E-CDK2 je stěžejní pro přechod do S fáze a replikaci DNA.



Obr. 1: Tvorba komplexů cyklin-CDK během buněčného cyklu (převzato a upraveno, Aleem et Arceci, 2015).

Během S fáze dochází k nahrazení cyklinu E cyklinem A a ke vzniku komplexu cyklin A-CDK2. Tento komplex je nutný k dokončení a výstupu buňky z S fáze. Po ukončení S fáze cyklin A interaguje s CDK1. Cyklin A je v průběhu fáze ubiquitinován, degradován a nahrazen cyklinem B. Komplex cyklin B-CDK1 řídí procesy vedoucí k přechodu z G2 fáze do fáze M (Nigg, 2001). Komplexy cyklin-CDK jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Komplexy cyklin-CDK v závislosti na fázi buněčného cyklu.

CDK	cyklin	fáze buněčného cyklu
CDK1	A	G2
CDK1	B	přechod G2/M
CDK2	E	přechod G1/S
CDK3	A, E	přechod G1/S
CDK3	C	přechod G0/G1
CDK4	D	G1
CDK6	D	G1
CDK7	H	CAK, všechny fáze BC
CDK10	-	přechod G2/M
CDK11	L	S

### 2.2.2 Inhibitory CDK

Negativní regulace cyklin-dependentních kináz je u savčích buněk zprostředkována vazbou CDK s inhibitory (CDKI). Rozlišujeme 2 rodiny CDKI a to rodinu INK4 (protein  $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  a  $p19^{INK4d}$ ) a rodinu Cip/Kip (proteiny  $p21^{Cip1}$ ,  $p27^{Kip1}$  a  $p57^{Kip2}$ ; Sherr et Roberts, 1999). Proteiny rodiny INK4 se váží na monomerní CDK4 a CDK6, čímž blokují jejich vazbu s cyklinem D. Proteiny rodiny Cip/Kip se neváží na monomerní CDK, ale na komplexy cyklin-CDK. Inhibitory rodiny Cip/Kip primárně inhibují kinázovou aktivitu komplexů cyklin D-CDK2, čímž zabraňují vytvoření komplexu cyklin E-CDK2, a kinázovou aktivitu komplexů cyklin-CDK1 (Malumbres et Barbacid, 2005; Otto et Sicinski, 2017). Vazba inhibitorů s CDK nebo komplexem cyklin-CDK vede k pozastavení buňky v dané fázi buněčného cyklu.

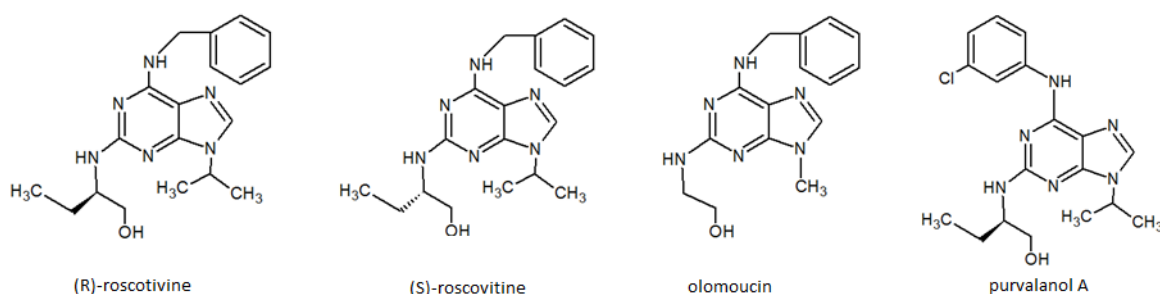
Cyklin-dependentní kinázy a jejich aktivátory i inhibitory jsou velmi často deregulovány v nádorových buňkách (M. Knockaert et al, 2000). Změna v genech kódujících CDK nebo jejich regulátory může vést k nadměrné expresi, amplifikaci a translokaci těchto genů. Proto mohou být CDK považovány za onkogeny (Allem et Arceci, 2015). Cykliny bývají v karcinomech exprimovány nadměrně, zato produkce inhibitorů bývá potlačena. Locus s genem pro inhibitor  $p16^{INK4a}$  (gen CDKN2A) je nejčastější deletovaný lokus v lidských nádorových buňkách (Beroukhim et al., 2010). Jeho ztráta způsobuje, že není exprimován protein p16, čímž nedochází k potlačení aktivity CDK4 a CDK6. Výsledkem je nadměrná proliferace nádorových buněk (Aleem et Arceci, 2015). Další potlačení exprese inhibitoru p16 je způsobeno methylací promotoru genu CDKN2A (Beroukhim et al., 2010). Není proto překvapující, že jsou zkoumány

farmakologické účinky uměle syntetizovaných inhibitorů CDK a také možnosti jejich aplikace v medicíně (M. Knockaert et al, 2000).

Uměle syntetizované inhibitory CDK mají terapeutický potenciál pro rozličná onemocnění včetně karcinomů, cukrovky, onemocnění ledvin, onemocnění neurodegenerativních (Alzheimerova, Parkinsonova choroba) a onemocnění infekčních. Výzkumy byly zaměřeny především na jejich protinádorové účinky s důrazem na BC a transkripci CDK (Sánchez-Martínez et al., 2015). Potenciální inhibitory CDK byly generovány akademickými a průmyslovými výzkumy od počátku devadesátých let 20. století.

Rozlišujeme několik hlavních tříd CDKI dle chemické podstaty: puriny, flavonoidy, butyrolakton-I, paullony a indigoidy (Fischer et Lane, 2000). Dle selektivity inhibice rozlišujeme 3 skupiny CDKI a to inhibitory neselektivní k žádné CDK (flavopiridol), selektivně inhibující CDK1,2,5,9 (olomoucín, R-roscovitine) a selektivně inhibující CDK4,6 (CINK4). Všechny uměle syntetizované CDKI kompetují o vazebné místo cyklin-dependentních kináz s ATP (Knockaert et al., 2002).

Skupina CDKI odvozených od purinu obsahuje jedny z nejdéle popsaných inhibitorů (Bach et al., 2005). Zahrnuje inhibitory jako olomoucín, roscovitine a purvalanol A (obr. 2). Roscovitine je N-6,2,9 trisubstituovaný derivát purinu s nízkou molekulovou hmotností (Havlíček et al., 1997). Rozlišujeme 2 isomery a to (R)- a (S)-roscovitine, přičemž (R)-roscovitine je jedním z nejvíce studovaných inhibitorů. Podobně jako další inhibitory odvozené od purinu specificky inhibuje cyklin-dependentní kinázy CDK1,2,5,7 a 9 (Bach et al., 2005).



Obr. 2: Struktury CDKI odvozených od purinu

Stejně jako jsou různé cíle roscovitinu, liší se i jeho účinky. Inhibicí CDK1 a CDK2 podmiňuje zastavení BC ve fázi G1 a blokáci přechodu z G2 fáze do fáze M. Způsobuje hromadění proteinu p53 v jádře. Ten indukuje expresi genů pro tvorbu inhibitorů CDK, konkrétně inhibitoru p21WAF1 (Ljungman et al., 2001). Důležité je rovněž, že roscovitine

ve vysokých dávkách spouští apoptózu v nádorových buňkách (Hahntow et al., 2004). Kromě roscovitinu byly připraveny i jeho deriváty. Jedná se o látky s velmi podobnou strukturou, u kterých předpokládáme, že by mohly rovněž působit jako specifické inhibitory CDK.

### **2.3 Proteomické techniky**

Abychom mohli pracovat se vzorkem proteinů, je nutné převést je z biologického materiálu do roztoku. Za tímto účelem jsou využívány různé homogenizační metody (mechanické nebo chemické). Cílem je narušení struktury biologických membrán (v případě rostlinných buněk i buněčných stěn) a uvolnění proteinů z cytoplazmy, samotných membrán nebo organel. Mezi mechanické homogenizace řadíme užití mixéru, kulového mlýnku, roztírání materiálu v třecí misce za přídavku abraziva či kapalného dusíku nebo střídavé mražení a ohřívání vzorku. Mezi chemické metody homogenizace řadíme užití lyzačních pufrů, které obsahují detergenty narušující strukturu cytoplazmatických membrán, soli k udržení optimálního osmotického tlaku a inhibitory proteolytických enzymů, které zabraňují degradaci proteinů (Kodíček et al., 2015). Během celého procesu je nutné mít na paměti, jaké proteiny chceme izolovat, zda musí být v nativním stavu a zda roztoky neobsahují interferující látky, které by narušovaly následné experimenty.

Rozlišujeme detergenty neiontové a iontové povahy. Neiontové detergenty jako Triton X-100 nebo Tween 20 nenesou náboj a zpravidla nemají vliv na denaturaci proteinů. Detergenty iontové dělíme dle povahy náboje na aniontové (záporný náboj, dodecylsírán sodný - SDS, deoxycholát sodný), kationtové (kladný náboj) a amfifilní (oba náboje, CHAPS). Některé iontové detergenty mají denaturační účinky (SDS).

K zablokování činnosti proteolytických enzymů, které štěpí peptidické vazby jiných proteinů, se užívají jejich inhibitory. Rozlišujeme inhibitory proteas (kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA, fenylmethylsulfonyl fluorid – PMSF) a inhibitory fosfatas (fluorid sodný, orthovanadát sodný). Pro zvýšení inhibice proteolytických enzymů a k zabránění denaturace proteinů je vhodné během celého procesu přípravy vzorků chlazení (inkubace vzorků na ledu, práce v chladové místnosti). Po uvolnění proteinů z buněk je nutné odstranit pevné části výchozího materiálu. Za tímto účelem je užívána centrifugace a ultracentrifugace. Částice v lyzátu mají rozdílnou hustotu a díky tomu i rozdílnou rychlost sedimentace, která je urychlena během centrifugace působením

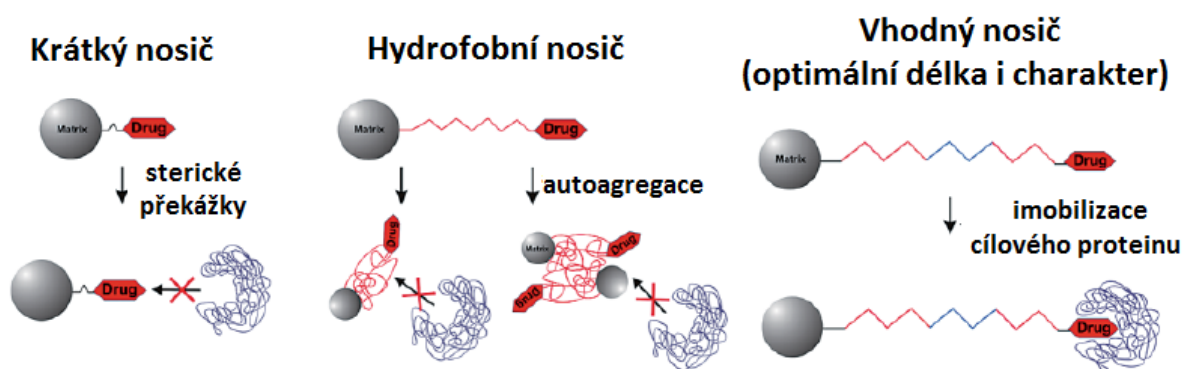


odstředivé síly. Dochází k oddělení proteinů převedených do roztoku (supernatant) od dalších složek buněk (pelet).

Typická lidská buňka exprimuje přes dvacet tisíc různých proteinů, buňky rostlinné dokonce až množství dvojnásobné. S ohledem na kapacitu datových uložení, časovou náročnost a cenu by bylo analyzovat takto komplexní vzorky extrémně náročné (Millar et Taylor, 2014). Z těchto důvodů jsou v proteomice často užívány rozličné separační techniky, které umožňují proteiny dělit na základě jejich rozdílných chemicko-fyzikálních vlastností. Vznikají tak frakce o nižším počtu bílkovin, které jsou analyzovány snadněji. Separální techniky můžeme rozdělit na elektromigrační, které využívají dělení proteinů působením elektrického pole, a na techniky chromatografické využívající k dělení proteinů jejich rozdílnou interakci se stacionární a mobilní fází.

### **2.3.1 Afinitní chromatografie**

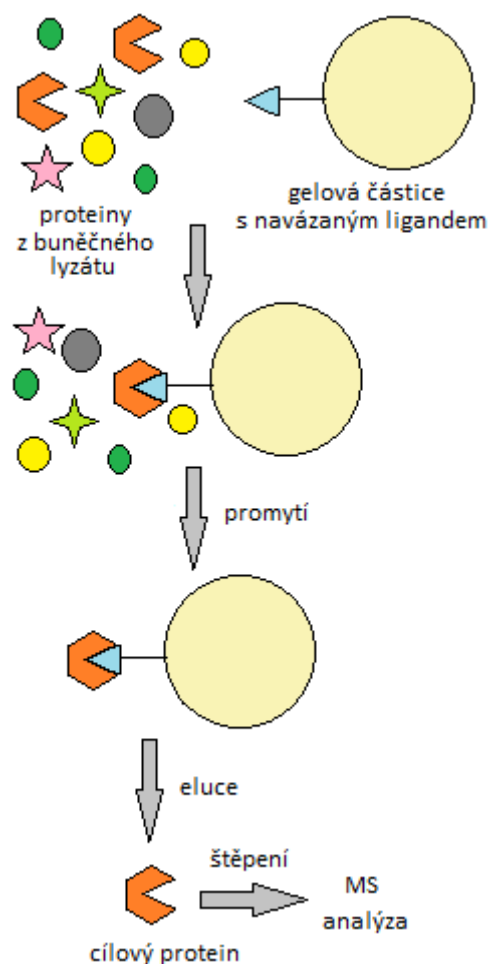
Afinitní chromatografie je moderní chromatografická metoda umožňující izolaci složek z komplexních vzorků. Je založena na specifických interakcích mezi cílovou molekulou a jejím partnerem (enzym-substrát, enzym-inhibitor, antigen-receptor a jiné). Jeden z vazebných partnerů – ligand je kovalentně vázán k inertnímu nosiči stacionární fáze (Pingoud et al, 2002). Ta bývá tvořena nejčastěji komerčně dodávanými aktivovanými agarosovými či sepharosovými částicemi. Připojení ligandu je dáno vznikem kovalentní vazby mezi reaktivní skupinou aktivované částice (karboxy-, amino-, hydroxy- nebo thiolová skupina) a specifickou chemickou skupinou ligandu (Daub, 2005; Rix et Superti-Furga, 2009). Reaktivní skupina ligandu bývá lokalizovaná na hydrofilním uhlíkatém řetězci. Tato lokalizace spolu s charakterem nosiče hraje významnou roli během tvoření komplexu ligand-protein (obr 3). Reaktivní místa agarosových částic, na která se nepodařilo připojit ligand, bývají blokována vazbou s ethanolaminem. Fáze mobilní obsahuje z pravidla směs molekul různé povahy (proteiny, sacharidy, ionty a další), přičemž pouze několik jejích složek (ideálně jedna) má k ligandu zvýšenou afinitu (Pingoud et al, 2002).



Obr 3: Vliv nosiče ligandu na vznik vazby mezi ligandem a cílovým proteinem. Při užití příliš krátkého nosiče nedochází ke vzniku komplexu protein-ligand. Obdobná situace nastává užitím nosiče nevhodného charakteru. Hydrofobní nosič je během procesu inkubován ve vodném prostředí, ve kterém dochází k jeho autoagregaci. Důsledkem je zneprístupnění ligandu pro vznik vazby s proteinem (převzato a upraveno, Guiffant et al, 2007).

Během experimentu je stacionární fáze inkubována s fází mobilní a poté přenesena do chromatografické kolony. Mezi ligandem a cílovou molekulou vzniká nekovalentní vazba, ostatní složky mobilní fáze jsou z kolony vymyty. Následně je změněno složení mobilní fáze tak, aby byla oslabena vazba ligand-vazebný partner. Výsledkem je eluce cílové molekuly (Pingoud et al, 2002).

Klasický koncept afinitní chromatografie tvoří základ technik užívaných v chemické proteomice. Rozlišujeme 2 základní směry. Prvním směrem je profilování závislé na aktivitě sondy (activity based probe profiling – ABPP), které je využíváno k výzkumu enzymatických aktivit rozličných rodin proteinů. Druhým směrem je chemická proteomika orientovaná na sloučeninu (compound-centric chemical proteomisc – CCCP), která je využívána k charakterizaci molekulárního mechanismu působení bioaktivních molekul (Adam et al, 2002; Hagensteind et Sewald 2006). Metoda je založena na interakci ligandu, imobilizované nízko-molekulární látky, s extraktem proteinů a na následné detekci purifikovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry – MS; obr. 4). Jako ligandy jsou běžně užívány uměle syntetizované inhibitory cyklin-dependentních kináz.



Obr. 4: Schéma afinitní purifikace proteinů před MS analýzou.

Pro úspěch experimentu je rozhodující zachování schopnosti ligandu tvořit nekovalentní vazby s proteiny i po jeho imobilizaci na inertním nosiči. Výhodou při navrhování vhodného napojení ligandu na afinitní gel je znalost prostorového uspořádání vazebného místa cílového proteinu případně prostorové orientace komplexu protein-ligand. Způsob imobilizace by měl umožňovat optimální vazbu proteinu a zároveň by neměl mít vliv na biologické účinky testované látky (Rix et Superti-Furga, 2009; Daub, 2014). Stejně tak je zásadní, aby během přípravy extraktu a samotné afinitní purifikace zůstala zachovaná nativní konformace proteinů (Guiffant et al, 2007).

Aplikace afinitních technik není omezena pouze na panely rekombinantních proteinů, nýbrž je možno užívat proteiny jakékoliv. Tato skutečnost bývá v klinické praxi užívána k srovnání bílkovin izolovaných z buněk zdravých a nemocných jedinců. Vlivem mutací, alternativního sestřihu a post-translačních modifikací totiž bývají značně různorodé. Další významnou předností metody je možnost testovat interakce léčiva s celými proteomy či definovanými subproteomy pacientů, díky čemuž mohou být získány nové poznatky o funkci proteinů či o možnostech jejich využití v medicíně.

Jako každá technika má i afinitní chromatografie svá úskalí a slabiny. Studovaná sloučenina nemusí obsahovat žádnou vhodnou funkční skupinu k připojení na stacionární fázi a nutná modifikace může narušovat její biologickou aktivitu. Dále se mohou vyskytovat nescifické vazby proteinů na gel, čímž vzniká vysoké pozadí při měření. Také nemusí být patrný rozdíl v četnosti specificky a nescificky vázaných proteinů. Další nevýhodou je zanedbání vlivu aktivního metabolismu a solubilizace proteinů (Rix et Superti-Furga, 2009).

### 2.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je široce rozšířená analytická metoda užívaná v proteomice k identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů. Principem techniky je rozlišení iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ , měrná hmotnost). Každý hmotnostní spektrometr je složen z ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru a z detektoru. Aby bylo zabráněno interakcím stanovovaných iontů s molekulami obsaženými ve vzduchu, probíhá analýza za vysokého vakua.

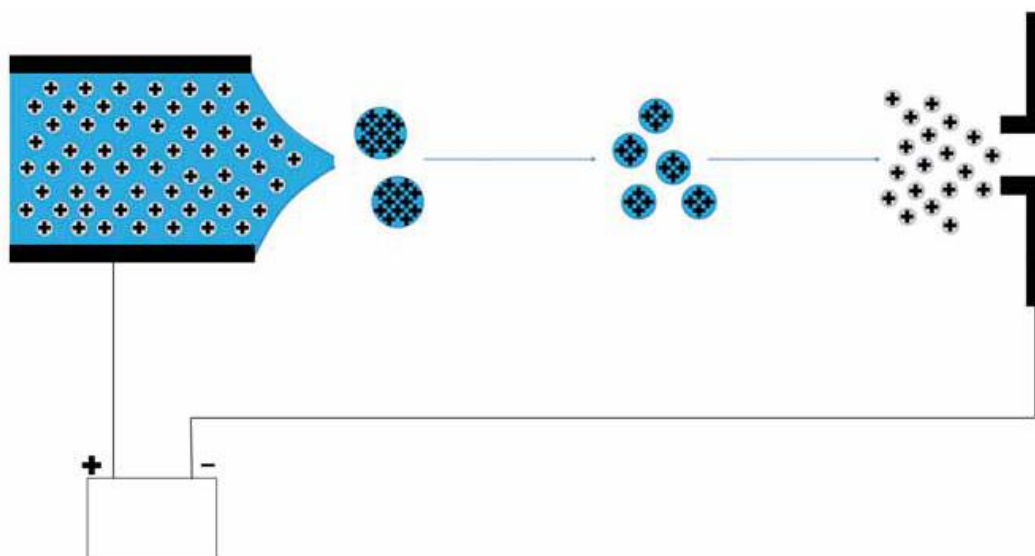
Molekuly analytu (v našem případě proteinu) jsou převedeny z kapalně fáze do fáze plynné a působením vhodné ionizační techniky na ionty. Rozlišujeme dva typy ionizačních zdrojů a to zdroje tvrdé a měkké. Užití tvrdých ionizačních zdrojů není pro proteomické účely vhodné, neboť způsobují fragmentaci biologických makromolekul (nukleové kyseliny, proteiny). Ionizační techniky, které dokáží účinně ionizovat makromolekuly, aniž by je poškodily, označujeme jako měkké. Analyty mohou být obsaženy v plynné, pevné či kapalně fázi, dle typu použité ionizační metody. Ionizace probíhá za tlaku sníženého nebo atmosférického. Mezi nejčastěji užívané měkké ionizační techniky v proteomice řadíme ionizaci pomocí laseru za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization – MALDI) a ionizaci elektrosprejem (electrospray ionization – ESI) či nanosprejem (nanoESI; Aebersold et Mann, 2003).

Při MALDI ionizaci se vzorek ponechá krystalizovat s vhodnou matricí na MALDI destičce. Pro peptidy se používá např.  $\alpha$ -kyano- 4-hydroxyskořicová kyselina nebo 2,5-dihydroxybenzoová kyselina a pro proteiny kyselina sinapová. Destička je poté vložena do vakuované části hmotnostního spektrometru. Ionizace je způsobena krátkými laserovými impulzy (v řádu ns), které jsou pohlcovány zejména matricí. Dochází k její ionizaci a k rychlé desorpci. Při ní s sebou ionty matrice strhávají ionty analytu a tím je převádí do fáze plynné. Z molekul matrice jsou v plynné fázi přenášeny protony

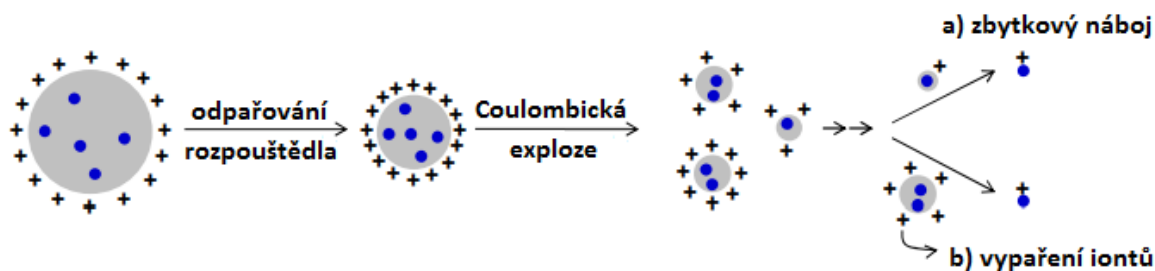
na molekuly analytu a dochází k jejich ionizaci. Pro tento typ ionizace je typický vznik pozitivních pseudomolekulárních iontů  $[A+H]^+$  (Yates et al, 2009).

Nejběžnější užívaná ionizační technika k analýze komplexních vzorků je ESI. Vzorek obsažen v kapalně fázi je veden kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Na výstupu z kapiláry dochází k odpařování kapalně fáze v podobě malých kapiček nesoucích na povrchu velké množství nábojů. Nabitě kapičky jsou tvořeny analytem obaleným v rozpouštědle. Rozpouštědlo je odpařováno, čímž dochází ke zvyšování hustoty náboje na povrchu kapiček. Při dosažení kritické hodnoty nastává Coulombická exploze – dojde k rozdělení kapičky za vzniku menších nabitých kapiček. Tím dochází k oddělení rozpouštědla od analytu, který je opakovaním Coulombických explozí převeden na iont. Převedení iontů analytu je realizováno dvěma způsoby. Buď zbytkovým nábojem – odpařováním rozpouštědla z nabitě kapičky za vzniku iontů, nebo vypařením iontů – povrchové napětí způsobí vytržení iontu analytu z kapičky. Ionty jsou následně usměrněny do analyzátoru (obr 5, 6). Vznikající ionty mohou nést více než jen jeden náboj v závislosti na velkém počtu faktorů např. své velikosti a bazicitě. Ionizace elektrosprejem bývá spojována on-line s kapalinovou chromatografií nebo s kapalinovou elektroforézou (Veenstra et Yates, 2006).

V obou případech popsaných ionizačních technik vznikají ionty analytu, které jsou vedeny do analyzátoru. Za účelem usměrnování iontů je užívána iontová optika.



Obr. 5: Vznik kapiček tvořených rozpouštědlem a molekulami analytu při ESI (převzato, Dvořáková et al, 2014).



Obr. 6: Převedení analytu na ionty při ESI (převzato a upraveno, Holčápek, 2014).

Podobně jako jsou rozličné ionizační zdroje, existují různé typy hmotnostních analyzátorů. V kontextu proteomiky jsou klíčové parametry citlivost, rozlišení, hmotnostní rozsah a schopnost generovat hmotnostní spektra bohatá na informace získané z peptidových fragmentů (Aebersold et Mann, 2003). Separace analytů převedených na ionty v hmotnostním analyzátoru je založena na různých fyzikálních principech. První typ analyzátorů užívá rozlišení iontů s danou  $m/z$  na základě různé stability jejich oscilací ve dvojrozměrné či trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Řadíme sem iontovou past a kvadrupól. Iontová past je tvořena elektrodou prstencovou a dvěma koncovými elektrodami. Na elektrody je přivedeno vhodné napětí, které zadržuje ionty vedené do prostoru v mezi elektrodami. Napětí je postupně měněno což způsobuje vypouštění iontů na detektor podle jejich měrné hmotnosti.

Kvadrupól je analyzátor, který bývá často kombinován s ionizací elektrosprejem (Yost et Boyd, 1990). Skládá se ze čtyř kovových tyčí, na které je přivedeno napětí. Na dvě protilehlé tyče je přivedeno kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí a na všechny tyče vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty jsou vedeny do prostoru mezi tyčemi, kde oscilují. Oscilace je stabilní jen pro ionty, které mají určitou měrnou hmotnost při daném poměru napětí a amplitudy. Tyto ionty projdou na detektor. Ostatní jsou zadrženy na tyčích. Postupnými změnami napětí a amplitud dojde k detekci všech iontů. Vzniká tím hmotnostní filtr iontů, což je důvod, proč se tento typ analyzátoru často kombinuje s jinými analyzátoři. Při užití dvou či více typů analyzátorů vzniká tandemová spektrometrie – MS/MS (Veenstra et Yates, 2006).

Kvadrupól je běžně kombinován s analyzátořem doby letu (time of flight – TOF; Olthoff et al, 1988). Ten využívá různou dobu, kterou potřebují ionty k překonání určité dráhy v závislosti na jejich poměru  $m/z$ . Na konci dráhy je umístěn detektor, který zaznamenává dopadající ionty.

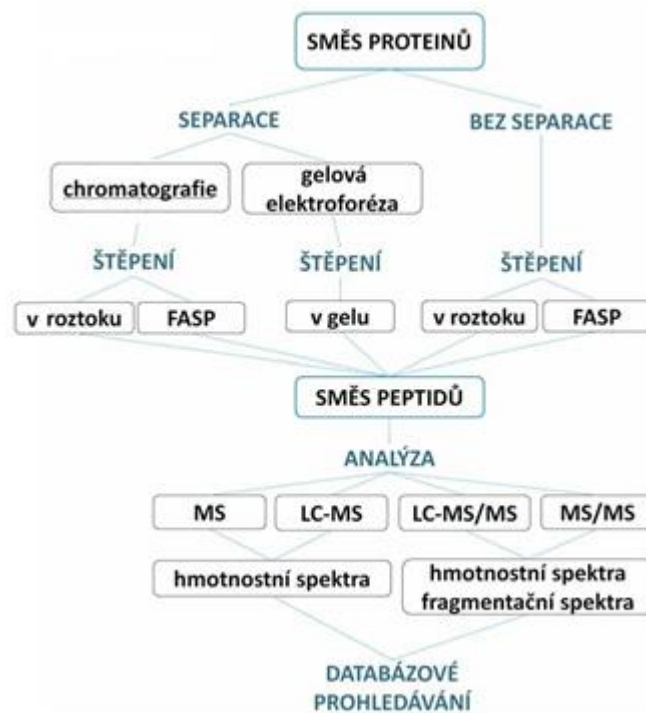
Detektor je třetí důležitou složkou hmotnostního spektrometru. Dopadají na něj ionty separované v analyzátoru a dochází k zaznamenání jejich počtu (intenzita signálu) a měrné hmotnosti ( $m/z$ ). Nejčastějším detektorem je elektronový násobič. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum, tedy graf závislosti intenzity signálu na měrné hmotnosti. Hmotnostní spektra jsou typická pro různé látky a dají se využít k jejich charakterizaci (Yates et al, 2009).

### 2.3.3 Přístupy ke zpracování proteinových vzorků

V dnešní době rozlišujeme dva hlavní proteomické přístupy zpracování proteinů pro hmotnostní analýzu. První přístup označujeme jako top-down. Jedná se o soubor technik využívaných k analýze vzorku proteinů, které nejsou před hmotnostní analýzou štěpeny na peptidy. Analýza je obecně méně účinná, vede však k získání celkové sekvence proteinu, včetně míst, která nejsou analýzou s užitím štěpení pokrytá. Díky tomu se metoda uplatňuje ve výzkumu místně specifických mutací a post-translačních modifikací, které mohou výrazně ovlivňovat biologickou aktivitu proteinů (McLafferty et al, 2007; Yates et al, 2009).

I přesto, že přesnost měření hmotností pomocí MS je vysoká, stále není dostatečně důvěryhodná při identifikaci proteinů *de novo*. Proteiny jsou proto během přípravy vzorku enzymaticky či chemicky rozštěpeny za vzniku charakteristických peptidů, které jsou analyzovány v hmotnostním spektrometru (Veenstra et Yates, 2006). Tento užívanější přístup nazýváme bottom-up (obr. 7). Mezi výhody metody patří vysoká senzitivita a velké množství dat získaných z jediné analýzy. Peptidové řetězce také bývají solubilizovány lépe než celé původní proteiny. Přístup bývá běžně využíván ke kvantifikaci a identifikaci proteinů obsažených v komplexních biologických vzorcích (Yates et al, 2009).

Štěpení je realizováno užitím jedné ze tří základních technik. Rozlišujeme štěpením v gelu (in-gel digestion) užívané pro proteiny dělené v elektroforetickém gelu, štěpení v roztoku (in-solution digestion) např. po chromatografickém dělení a štěpení na filtrech s regenerovanou celulórou (filter-aided sample preparation – FASP).



Obr. 7: Schéma technik bottom-up přístupu a následných MS analýz (převzato, Dvořáková et al, 2014).

Ke zpřístupnění proteolytických míst je vhodné před samotným štěpením narušit složitou prostorovou strukturu proteinů. Využívá se redukce, během které redukční činidla (dithiotreitol – DTT,  $\beta$ -merkптоethanol) rozrušují disulfidické vazby mezi AMK proteinu. V dalším kroku jsou na vzorek aplikována alkylační činidla (jodacetamid – IAM). Ta se váží na rozrušené disulfidické vazby a tím brání jejich opětovnému vytvoření. Následným krokem je štěpení. Nejčastěji používanou proteázou je trypsin specificky štěpící proteiny za vzniku peptidů majících na C- konci zbytek bazické aminokyseliny argininu nebo lysinu (pokud za nimi nenásleduje prolin; Dvořáková et al, 2014; Lenčo et Stulík, 2004).

Před samotnou analýzou na MS je vzorek ještě přečištěn a odsolen. Za tímto účelem jsou užívány kolony naplněné sorbentem, který nese uhlíkaté hydrofilní řetězce (C18), které interagují s peptidy. Ty jsou v koloně zachyceny, promyty a následně eluovány.



### 3 Experimentální část

#### 3.1 Materiál a chemikálie

Užitá buněčná kultura HCT 116 (human colon colorectal carcinoma) byla poskytnuta Laboratoří růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavem experimentální botaniky Akademie věd ČR, dodána ve formě peletu.

Pro přípravu buněčného lyzátu byly použity chemikálie a materiál: NaCl (Sigma-Aldrich, Německo), CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal CA 630 (Sigma-Aldrich, Německo), PMSF (Sigma-Aldrich, Německo), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma-Aldrich, Německo), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Německo), MgCl<sub>2</sub> (Fluka, Německo), NaF (Fluka, Německo), Roche inhibitor cocktail cOmplete EDTA free (Roche diagnostics, Německo), led, tekutý dusík, deionizovaná voda, ultracentrifugační zkumavky (Beckman Coulter, USA), stříkačky (B Braun, Německo), jehly (B Braun, Německo).

Stanovení koncentrace lyzátu: 2-D Quant Kit (GE Healthcare, USA), Albumin Standard (Thermo Scientific, USA), Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, USA), kyvety (Kartell, Itálie)

Při přípravě afinitních gelů byly užity tyto chemikálie: deionizovaná voda, dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Německo), ethanol (EtOH; Sigma-Aldrich, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), ethanolamin (Sigma-Aldrich, Německo), NHS-Activated Sepharose-4 FF NHS (GE Healthcare, Švédsko), triethylamin (Sigma-Aldrich, Německo), kolony s fritou (BioRad, USA), gelloader špičky 20 µl (Eppendorf, Německo), ligandy: C2-(2'-aminoethylamino)-roscovitine, C8-(2'-aminoethylamino)-roscovitine, p-phenyl-[(2'-aminoethylamino)carbonyl]-roscovitine. Ligandy byly připraveny v LRR UP & UEB AVČR (RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D. a Ing. Libor Havlíček, CSc.)

Pro afinitní chromatografii byly užity tyto chemikálie: deionizovaná voda, NaCl (Sigma-Aldrich, Německo), MgCl<sub>2</sub> (Fluka, Německo), CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal CA 630 (Sigma-Aldrich, Německo), HEPES (Sigma-Aldrich, Německo), NaF (Fluka, Německo), Roche inhibitor cocktail cOmplete EDTA free (Roche diagnostics, Německo), PMSF (Sigma-Aldrich, Německo), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Německo), led, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA; Sigma-Aldrich,

Německo), kyselina mravenčí (FA; Sigma-Aldrich, Německo), bikarbonát triethylamonný (TEAB; Fluka, Německo), chromatografické kolony (BioRad, USA) a tekutý dusík.

Pro přípravu vzorků před štěpením a pro štěpení bylo potřeba těchto chemikálií: deionizovaná voda, DTT (Serva, Německo), IAM (Sigma-Aldrich, Německo), trypsin (MP Biomedical, Francie), bikarbonát triethylamonný (TEAB; Fluka, Německo), kyselina trifluoroctová (TFA; Merck, USA), parafilm (Sigma-Aldrich, Německo).

Pro odsolení vzorků před hmotnostní analýzou byly použity tyto chemikálie: deionizovaná voda, mikrocentrifugační SPE kolony (MicroSpin Column, Harward Apparatus, USA), isopropanol (iPrOH; Sigma-Aldrich, Německo), FA (Sigma-Aldrich, Německo), methanol (MeOH; Biosolve, Německo).

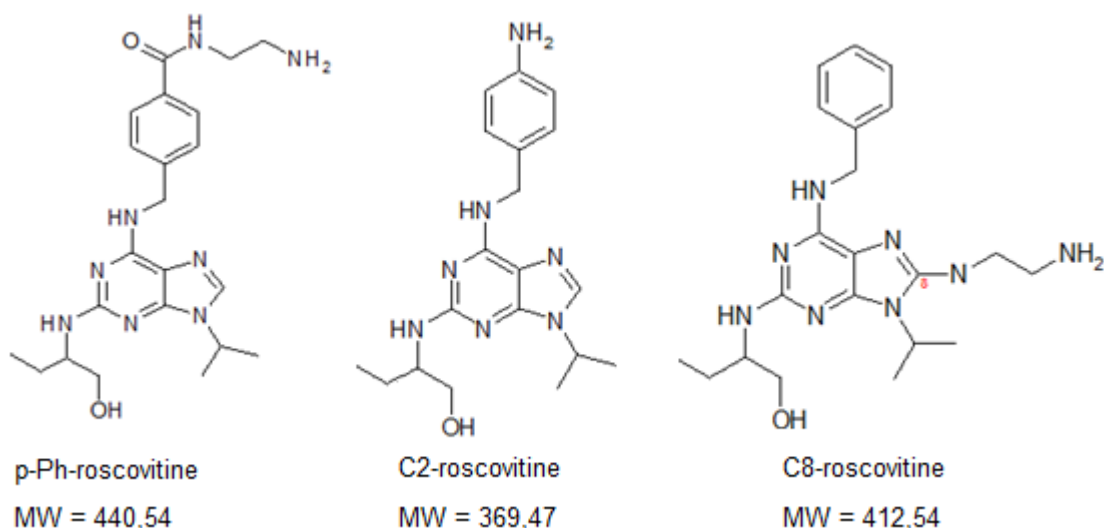
### **3.2 Přístrojové vybavení**

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko), třepačka Vortex 4 basic, (IKA, Německo), rotační míchačka multi-rotor PRS-22 (Biosan, USA), centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Německo), pH metr pH 50 (XS instruments, Itálie), pipety (Eppendorf, Německo), centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo), ultrazvuková lázeň Ultrasonic Cleaner (VWR, USA), ultracentrifuga CS 150NX (Hitachi, Japonsko), spektrofotometr UV-1601 (Shimadzu, Japonsko), spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek, USA), magnetická míchačka MS-3000 (Biosan, USA), lyofilizátor Alpha 1-2 (Christ, Německo), ThermoMixer comfort (Eppendorf, Německo), centrifuga IEC CL31R Multispeed (Thermo, USA), rotační vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo), Systém nLC nanoEASY (Proxeon, Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou hmotností detekcí Q-TOF vybavenou elektropray ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo), předkolona 75  $\mu\text{m}$   $\times$  3 cm (IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněná reverzní fází (Reprosil GOLD C4, 5  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch GmbH, Německo), analytická kapilární kolona (50  $\mu\text{m}$   $\times$  20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněná reverzní fází (Reprosil AQ C18, 3  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch GmbH, Německo).

### 3.3 Experimentální metody

#### 3.3.1 Imobilizace ligandu na afinitní nosič

Experimenty byly uskutečněny se třemi typy ligandů (obr. 8). Byly připraveny roztoky ligandů o koncentracích 20  $\mu\text{mol/ml}$  rozpuštěním dané navážky ligandu v 800  $\mu\text{l}$  100% DMSO. Následně bylo jejich pH upraveno na hodnotu 7-9 přidávkem triethylaminu.

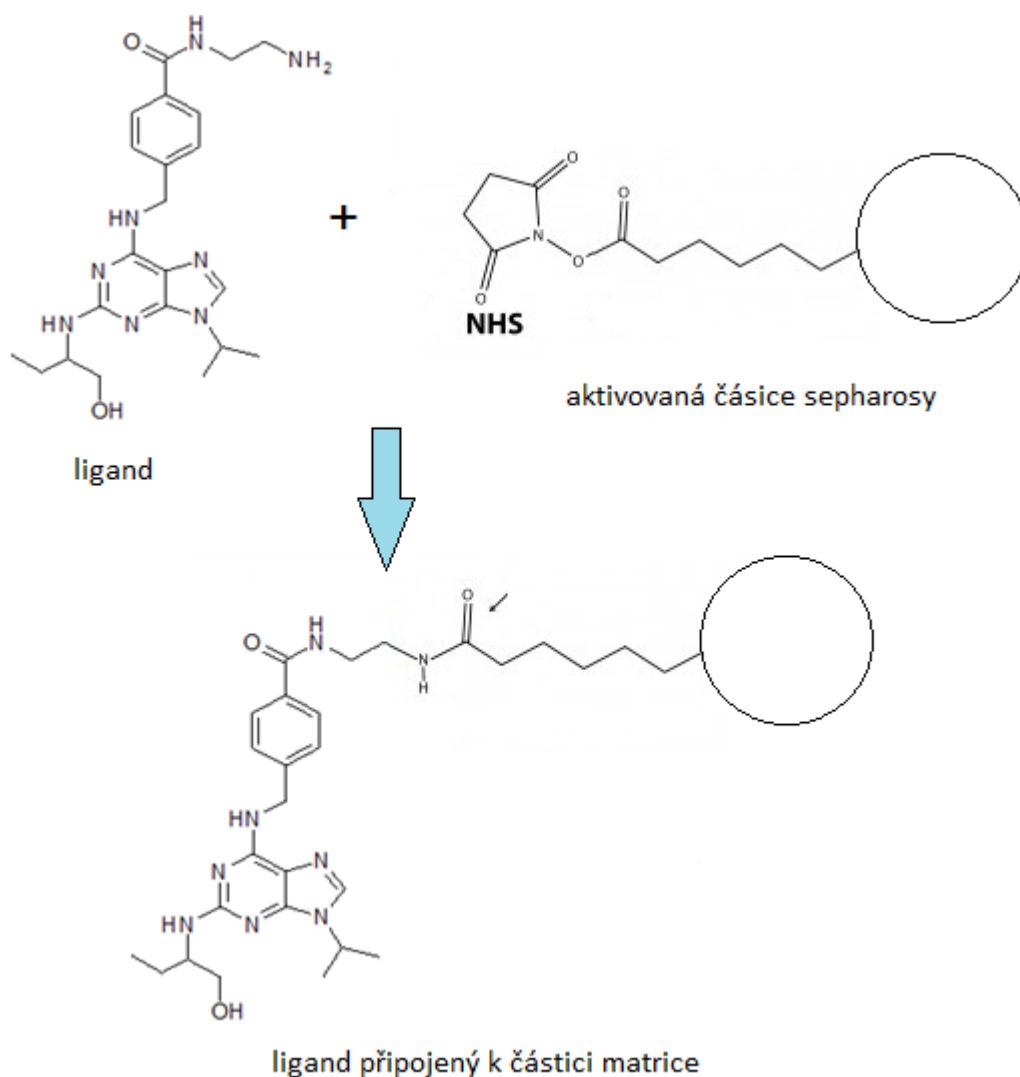


Obr. 8: Struktury derivátů roscovitinu, které byly imobilizovány na afinitní matrice.

Do 2 mililitrové mikrozkušavky byl předložen 1 ml komerčně dodávaného roztoku NHS-aktivovaných sepharosových částic. Byl odsán přebytečný konzervační roztok. Následně byly gely promyty 3x 900  $\mu\text{l}$  deionizované vody, poté 1x 50% DMSO a 3x 100% DMSO. Po ukončení promývání bylo ke gelu přidáno 800  $\mu\text{l}$  roztoku ligandu, se kterým byl gel inkubován za mírného míchání při pokojové teplotě přes noc.

Druhý den byla odstraněna reakční směs. Gel byl promyt 3x 900  $\mu\text{l}$  100% DMSO, 1x 50% DMSO a 3x  $\text{H}_2\text{O}$  stejným způsobem, jako je popsáno výše. Po odsátí posledního promývacího roztoku bylo na nosič napipetováno 800  $\mu\text{l}$  2 mol/l roztoku ethanolaminu, se kterým byl inkubován za mírného míchání při pokojové teplotě přes noc. Ethanolamin se vázal na volná aktivní místa matrice, kde nedošlo k vazbě s ligandem.

Další den byla reakční směs přenesena do kolony s fritou a postupně promývána vždy 2,7 ml následujících roztoků: 3x  $\text{H}_2\text{O}$ , 1x 50% DMSO, 2x 100% DMSO, 1x 50% DMSO, 3x  $\text{H}_2\text{O}$  a 2x 20% EtOH. Takto promytý gel byl přenesen do čisté mikrozkušavky. Připravený gel byl skladován při 4°C.



Obr. 9: Schéma imobilizace ligandu na afinitním nosiči (aktivovaná částice sepharosy). Dochází ke vzniku vazby mezi aminoskupinou ligandu a reaktivní skupinou částice.

### 3.3.2 Spektrofotometrické stanovení úspěšnosti imobilizace ligandu

Pomocí optické spektrofotometrie bylo zjišťováno pokrytí afinitního gelu ligandem. Byly připraveny standardy ligandu o známých koncentracích rozpuštěním ligandu v 1 ml 100% DMSO.

Při samotném měření bylo do křemenné kyvety napipetováno 980  $\mu$ l 50% glycerolu a 20  $\mu$ l standardu ligandu. V rozmezí vlnových délek 220 – 350 nm bylo stanoveno absorpční spektrum ligandu a určena vlnová délka absorpčního maxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Při ní byly změřeny absorbance dalších roztoků ligandů o známých koncentracích.

Dále byly změřeny absorbance vzorků afinitních gelů. Tyto vzorky byly připraveny napipetováním 980  $\mu$ l 50% glycerolu a 20  $\mu$ l roztoku gelu do křemenné kyvety a poté měřeny při  $\lambda_{\text{max}}$  daného ligandu. Měření bylo opakováno 4x.

Z Lambert-Beerova zákona byly dosazením dat získaných měření standardů vypočteny hodnoty extinkčních koeficientů  $\epsilon$ . Byl vytvořen jejich průměr a došlo k vypočtení koncentrace ligandu vázaného k dané afinitní matici.

### 3.3.3 Extrakce proteinů z buněčné linie

Buňky linie HCT 116 ve formě peletu byly rozsuspendovány v lyzačním pufru (LB, tabulka 2; 1 ml LB na  $50 \cdot 10^6$  buněk) a ponechány na ledu. Poté 20x nasáty do injekční stříkačky tenkou jehlou, aby došlo k porušení buněčných membrán. Směs byla inkubována 30 minut na ledu v chladové místnosti. Lyzát byl přenesen do čisté mikrozkušavky a 10 minut centrifugován při  $4^\circ\text{C}$  na  $20\,000 \times g$ . Následně byl supernatant přenesen do ultracentrifugační zkumavky. Ultracentrifugace probíhala 60 minut při  $4^\circ\text{C}$  na  $100\,000 \times g$ . Než došlo k zamrazení lyzátu, byla v něm stanovena koncentrace proteinů. Za tímto účelem byl použit 2D-Quant kit dle návodu výrobce. Lyzát byl rozdělen po  $500 \mu\text{l}$  do mikrozkušavek, zamrazen v tekutém dusíku a následně skladován při  $-80^\circ\text{C}$ .

Tabulka 2: Složení lyzačního pufru, pH upravováno 6M NaOH na hodnotu 7,5. Složky uvedené pod dvojitou čarou byly přidávány vždy těsně před užitím pufru.

složka	koncentrace
IGEPAL	0,2%
HEPES pH 7.5	25 mM
Glycerol	5%
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
NaCl	100 mM
NaF	25 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
PMSF	1 mM
ROCHE	200 $\mu\text{l}$ na 10 ml

### 3.3.4 Purifikace proteinů za použití afinitní chromatografie

Purifikace byla uskutečněna se čtyřmi typy afinitních gelů, které nesly jeden ze tří ligandů roscovitinu nebo ligand žádný (blankový gel). V rámci optimalizace metody byly uskutečněny afinitní purifikace s užitím různých množství proteinů (1000  $\mu\text{g}$ , 500  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g}$  nebo 100  $\mu\text{g}$ ) v různých objemech inkubační směsi (300  $\mu\text{l}$  nebo 200  $\mu\text{l}$ ). Každá z variant byla provedena ve čtyřech opakováních. Na základě dosažených výsledků byla pro další experimenty zvolena varianta s 300  $\mu\text{g}$  proteinů/200  $\mu\text{l}$ .

Třicet  $\mu\text{l}$  afinitní matrice bylo přeneseno do mikrozkuřavky. Ta byla centrifugována 2 minuty při 800 rpm a následně ponechána 6 minut stát. Po usazení matrice byl přebytečný konzervační roztok odebrán a nahrazen 1 ml promývacího pufru (WB1; 25 mmol/l HEPES a 100 mM NaCl, pH 7,5). Tento krok promývání se opakoval 2x s WB1, následně 1x LB. Po jeho odsátí bylo k afinitnímu nosiči přidáno 300  $\mu\text{g}$  proteinů z lyzátu doplněných LB do objemu 200  $\mu\text{l}$ . Inkubace probíhala 120 minut při 4 °C za mírného míchání.

Po ukončení purifikace byla veřkerá směs přenesena do kolony s fritou, která byla předem aktivována 2x 1 ml WB1. Následně byl gel promyt 3x LB, 3x WB1 a 3x promývacím puřrem WB2 (složením stejný jako WB1, ale obohacen o 0,5  $\mu\text{mol/l}$  EDTA). Po promytí byla kolona umístěna do mikrozkuřavky a krátce centrifugována (1 min, 100 x g). Purifikované proteiny byly z afinitního nosiče eluovány 250  $\mu\text{l}$  100 mmol/l FA do tlustostěnné vialky s předloženými 62,5  $\mu\text{l}$  1M TEABu. Eluát byl zamražen v tekutém dusíku a skladován při -80°C.

### 3.3.5 Štěpení v roztoku

K rozvolnění struktury proteinů byl použit redukční roztok 500 mmol/l DTT, ze kterého bylo ke vzorku odpipetováno 6  $\mu\text{l}$ . Vzorek byl následně inkubován 60 minut při 56°C. Poté byly proteiny alkylovány přidáním 17,5  $\mu\text{l}$  1 mol/l IAM. Vzorek byl inkubován ve tmě 30 minut při 25°C. Alkylace byla ukončena přidáním 15  $\mu\text{l}$  1 mol/l roztoku TEABu. Bylo zkontrolováno pH roztoku, které muselo být vyšší nebo rovno osmi. Ke vzorku bylo přidáno 0,4  $\mu\text{l}$  roztoku trypsinu o koncentraci 5,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Následovala inkubace při 37°C do druhého dne. Štěpení bylo zastaveno přidáním 15  $\mu\text{l}$  30% TFA tak, aby pH vzorku bylo nižší nebo rovno pěti.

### 3.3.6 Čiřtění peptidů na C-18 MicroSpin koloně

Centrifugační MicroSpin kolona byla vložena do mikrozkuřavky a aktivována 2x 100  $\mu\text{l}$  čistého iPrOH a poté 2x 100  $\mu\text{l}$  5% FA. Kolona byla přenesena do čisté mikrozkuřavky a byl na ní po 100  $\mu\text{l}$  aplikován vzorek naštěpených peptidů. Peptidy byly promyty 2x 100  $\mu\text{l}$  5% FA, průtok zamrazen. Kolona byla přenesena do čisté mikrozkuřavky a peptidy elulovány 2x 100  $\mu\text{l}$  roztoku 2,5% FA a 50% MeOH. Po uvolnění peptidů z kolony byl roztok přenesen do vialek a odpařen na vakuové odparce. Odpařené vzorky byly skladovány při -80°C.

### 3.3.7 Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly analyzovány pomocí systému kapilární chromatografie online spojeného s tandemovým hmotnostním analyzátozem Q-TOF vybaveným nano-ESI ionizací. Připravené odpařené vzorky ve skleněných vialkách byly rozpuštěny v 16  $\mu$ l roztoku 5% FA modifikované 5% MeOH, sonikovány po dobu 5 min a přeneseny do autosampleru chromatografického systému.

K analýze bylo odebráno 5  $\mu$ l vzorku a obsažené peptidy byly při průtoku 4  $\mu$ l/min zachyceny na předkoloně 75  $\mu$ m  $\times$  3 cm naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C4, 5 $\mu$ m) pomocí vzorkovací pumpy a následně izokraticky promyty 21  $\mu$ l 2% FA. Dělení zachycených peptidů bylo provedeno dvousložkovou gradientovou elucí v průběhu 47 min na analytické kapilární koloně (50  $\mu$ m  $\times$  20 cm, SilicaTip) naplněné reverzní fází (Reprosil AQ C18, 3  $\mu$ m) při průtoku 180 nl/min. Eluční gradient byl tvořen mícháním mobilní fáze A (0,1% FA) a mobilní fáze B (90% acetonitril modifikovaný 0,1% FA) se směrnici míchání složek gradientu odpovídající nárůstu mobilní fáze B v mobilní fázi A s rychlostí 0,625% složky B/min v průběhu 40 min (celý gradient je uveden v tabulce 3).

Tabulka 3: Nastavení chromatografického dělení peptidů obsažených ve vzorcích pomocí 67 min. gradientu při průtoku 180 nl/min. Složení mobilních fází bylo následující: pufr A: 0,1% FA ve vodě, pufr B: 90% acetonitril modifikovaný 0,1% FA.

Čas (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
10	90	10
50	65	35
55	10	90
57	10	90
60	90	10
72	90	10

Rozdělené peptidy eluované z analytické kolony byly ionizovány pomocí elektrospray ionizace a charakterizovány metodou tandemové hmotnostní analýzy v uspořádání „data-dependent analysis (DDA)“ s kolizně indukovanou fragmentací peptidů v kolizní cele plněnou dusíkem. Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; capillary voltage 1650 V; Dry gas: 6 L/min; Dry temperature: 150 °C);

Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 3,2 eV; collision energy 6 eV; Collision RF 1200 Vpp; transfer time 70  $\mu$ s; pre-puls storage 12  $\mu$ s); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; Precursor Ions: 2s cycle time; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 500 cts; active exclusion po 2 spektrech po dobu následujících 30 s; excluded mass rozsah prekurzorů 100-350 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 100-1600 m/z s dobou sběru (acquisition time) 500 ms pro MS a 100-300 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru.

### **3.3.8 Bioinformatická analýza MS dat z afinitně-chromatografické izolace a identifikace proteinů**

Ze získaných hmotnostně-spektrometrických dat byla pomocí programu DataAnalysis 4.3x64 (Bruker Daltonics, Německo) extrahována data zahrnující hodnoty peptidových prekurzorů a fragmentační spektra těchto prekurzorů. Tato data byla uložena do mgf (mascot generic file, Matrix Science, Anglie) souborů a nahrána do programu SearchGUI v.3.2.20 (Vaudel et al., 2011). Pomocí tohoto programu byla provedena identifikace peptidů a následně proteinů pomocí tří nezávislých identifikačních algoritmů X! Tandem (Craig et Beavis, 2004), MS Amanda (Dorfer et al., 2014), MS-GF+ (Kim et Pevzner, 2014) proti databázi (143544 sekvencí, 2018-03-28) obsahující referenční lidský proteom stažený z depozitu UNIPROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) a jeho reverzní sekvence pro stanovení spolehlivosti identifikace proteinů (False Discovery Rate, FDR). Parametry identifikace byly nastaveny takto: použitý enzym trypsin, počet miss-cleavage 2, chyby měření MS 25ppm, MSMS 0,03 Da; modifikace: fixní - karbamidomethylace cysteinu, variabilní – oxidace methioninu, acetylace N-konce proteinů, deaminace asparaginu a glutaminu.

Data identifikovaných peptidů a proteinů z jednotlivých identifikačních algoritmů byla souhrnně zpracována a filtrována pomocí programu PeptideShaker v 1.16.15 (Vaudel et al., 2015). Z programu PeptideShaker byly exportovány textové soubory obsahující souhrnné identifikace proteinů pro jednotlivé afinitní izolace dle použitého nosiče. Tyto textové soubory byly zpracovány pomocí programového modulu APOSTL (Kuenzi et al., 2016), který slouží k reprodukovatelné analýze proteomických dat z afinitně-chromatografických experimentů. Výsledkem je statisticky spolehlivá identifikace proteinů interagujících s ligandy vázanými na pevném nosiči.

K srovnání počtů proteinů s užitím jednotlivých ligandů byly používány Vennyho diagramy (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).



K následné bližší charakterizaci identifikovaných proteinů dle jejich zapojení v biologických pochodech byla využita Gene ontology analýza pomocí aplikace Kegg mapper ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)). K charakterizaci identifikovaných proteinů dle molekulárních funkcí byla použita Gene ontology analýza s využitím PANTHER Overrepresentation testu typu FISHER ([geneontology.org](http://geneontology.org)).

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Spektrofotometrické stanovení úspěšnosti imobilizace ligandu

Výpočtem z Lambert-Beerova zákona:  $A = c * \epsilon * d$ , kde A je absorbance vzorku, c jeho koncentrace, d optická dráha byl určen extinkční koeficient  $\epsilon$  pro standardy ligandu následovně:  $\epsilon = \frac{\text{průměrná absorbance}}{\text{koncentrace}}$ . Ze získaných hodnot  $\epsilon$  byl vytvořen průměr a ten použit k výpočtu koncentrace ligandu na afinitní matici. Koncentrace vyjádřená v % byla určena výpočtem z maximálního možného množství ligandu, které může být podle výrobce imobilizováno na částice (20  $\mu\text{mol/ml}$ ). Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4.

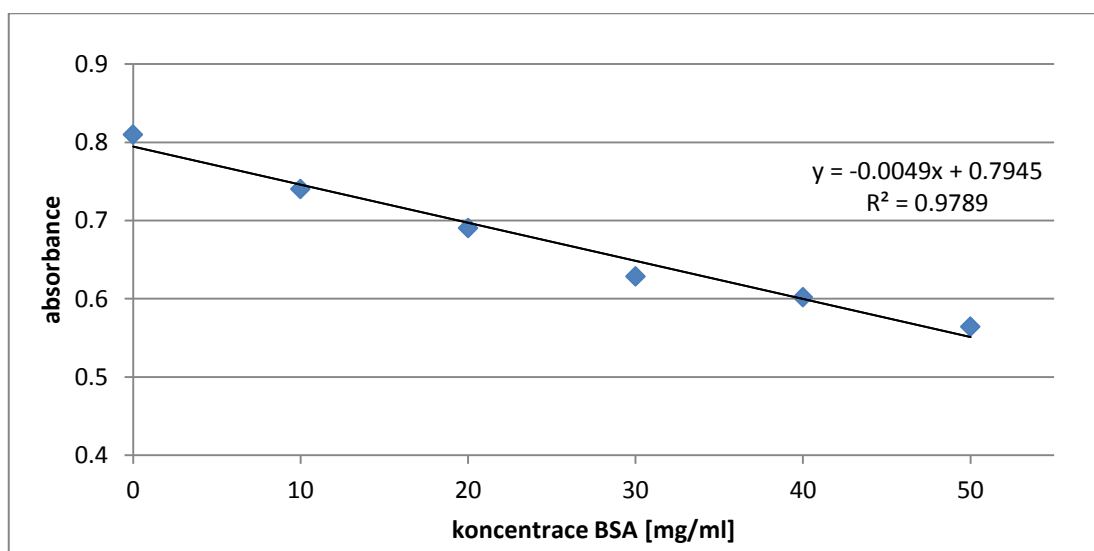
Tabulka 4: Výsledky spektrofotometrického stanovení úspěšnosti imobilizace ligandu.

ligand	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\epsilon$	c [ $\mu\text{mol/ml}$ ]	c [%]
p-Ph-R	294	0,22	2,83	14,13
C2-R	296	0,24	2,56	12,78
C8-R	303	0,22	2,85	14,25

Nejvyšší koncentrace ligandu 2,85  $\mu\text{mol/ml}$  bylo dosaženo užitím C8-R. Při imobilizaci p-Ph-R pak 2,83  $\mu\text{mol/ml}$  a C2-R 2,56  $\mu\text{mol/ml}$ . Pokrytí matrice by mělo být v rozmezí 1-15  $\mu\text{mol/ml}$  v závislosti na velikosti imobilizované molekuly a velikosti proteinu, který má být zachycen. Obecně je doporučena koncentrace 3  $\mu\text{mol/ml}$  (Guiffant et al., 2007). Připravené afinitní gely byly o optimální koncentraci ligandu.

### 4.2 Extrakce proteinů z buněk linie HCT 116

Koncentrace proteinů v buněčném lyzátu byla stanovena pomocí 2D-quant kitu. Byla připravena kalibrační řada roztoků hovězího sérového albuminu (BSA) o známých koncentracích, následně změřena jejich absorbance při 480 nm. Při této vlnové délce byla změřena také absorbance vzorku lyzátu. Byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci proteinů ve standardu (graf 1) a z rovnice regrese vypočítána koncentrace proteinů v lyzátu.



Graf 1: Závislost absorbance na koncentraci BSA ve standardu, měřeno při vlnové délce 480 nm.

Z rovnice  $y = -0.0049x + 0.7945$  byla určena koncentrace proteinů v lyzátu dosazením hodnoty absorbance za  $y$ . Tedy  $x = \frac{(y-0,7945)}{(-0,0049)} = 5 \text{ mg/ml}$ . V celém objemu lyzátu (2,15 ml) bylo 10,75 mg proteinů.

Jednou z výrazných limitací afinitních purifikací je jejich náročnost na množství biologického materiálu. Množství proteinů potřebné k purifikaci závisí na druhu výchozího materiálu, na povaze proteinů a izolačním protokolu (Rix et al, 2009). Nízký počet buněk v případě patientských vzorků např. biopsií nádorů způsobil snahu o minimalizaci experimentů.

Ve starších pracích byla k afinitním purifikacím používána množství proteinů v řádu miligramů. Například v publikaci S. Bacha et al. z roku 2005 byly použity 3 mg proteinů, o 4 roky později S. E. Ongem et al. 2 mg. Bílkoviny pocházely z buněk linie HeLaS3, přičemž jejich koncentrace v lyzátu byla mezi 1,7-2,2 mg/ml. Ve stejném roce K. L. Bennett použil 0,5 mg proteinů linie K562 odpovídající množství buněk  $2 \cdot 10^6$  (Rix et al, 2009). V této práci byl z  $50 \cdot 10^6$  buněk linie HCT 116 připraven lyzát o vysoké koncentraci proteinů 5 mg/ml.

Minimalizaci afinitních purifikací výrazně přispěla práce publikovaná Chamrádem et al. roku 2013 zabývající se interakcemi proteinů z buněk chronické myeloidní leukemie linie K562 s léčivem Bosutinib, ve které bylo k experimentům použito mnohem menší množství proteinů v malém objemu inkubační směsi (100  $\mu\text{g}$  proteinů/100  $\mu\text{l}$ ).

Ve snaze optimalizovat uspořádání našich experimentů byly v této práci nejdříve provedeny série afinitních purifikací s různým množstvím proteinů v různých objemech

inkubační směsi. Jako referenční ligand sloužil p-Ph-R, neboť jeho interakce s proteiny již byly dříve studovány.

Nejvyšší množství proteinů a také nejvíce popsanych terapeutických cílů roscovitinu bylo identifikováno při poměru 300  $\mu\text{g}$  proteinů/200  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{g}$  proteinů/200  $\mu\text{l}$  (tabulka 5). Pro následující experimenty byla zvolena varianta s nižší spotřebou buněčného lyzátu tedy 300  $\mu\text{g}$  proteinů/200  $\mu\text{l}$ .

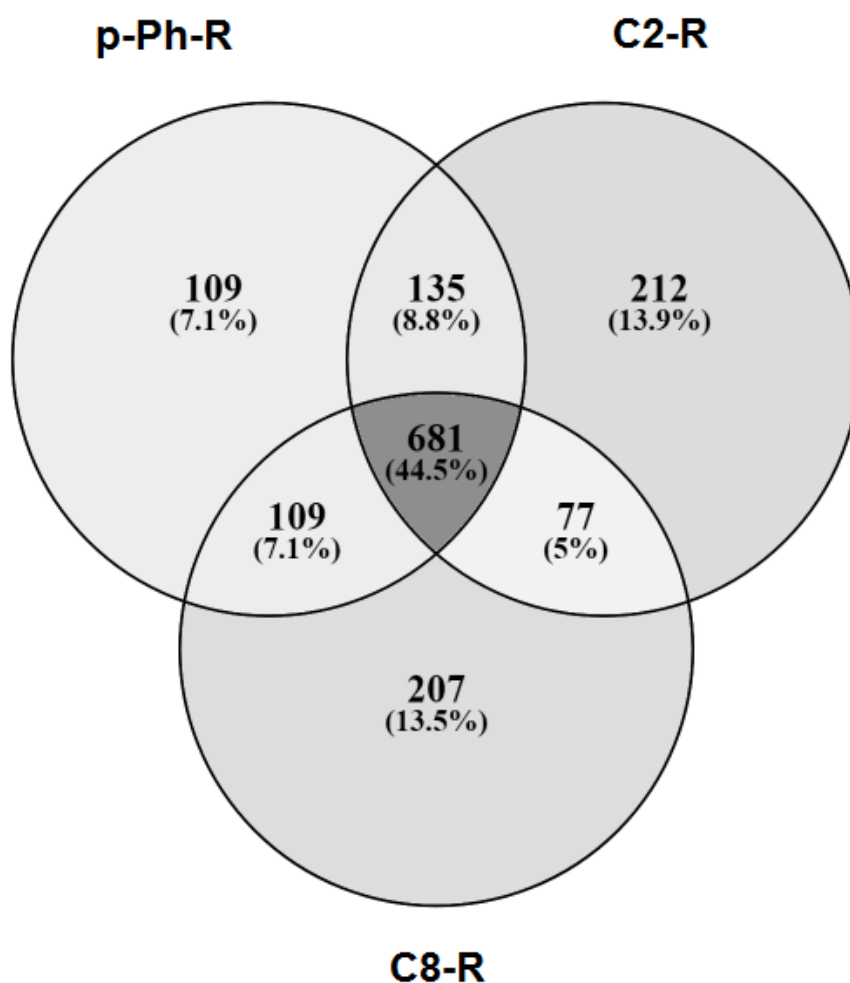
Tabulka 5: Výsledky afinitních experimentů v rámci optimalizace metody s užitím p-Ph-R.

množství proteinů ( $\mu\text{g}$ )	objem ( $\mu\text{l}$ )	počet proteinů	počet terapeutických cílů
1000	300	171	0
500	200	560	10
300	200	588	10
100	200	299	3

### 4.3 Afinitní purifikace proteinů

#### 4.3.1 MS data z afinitně-chromatografické izolace

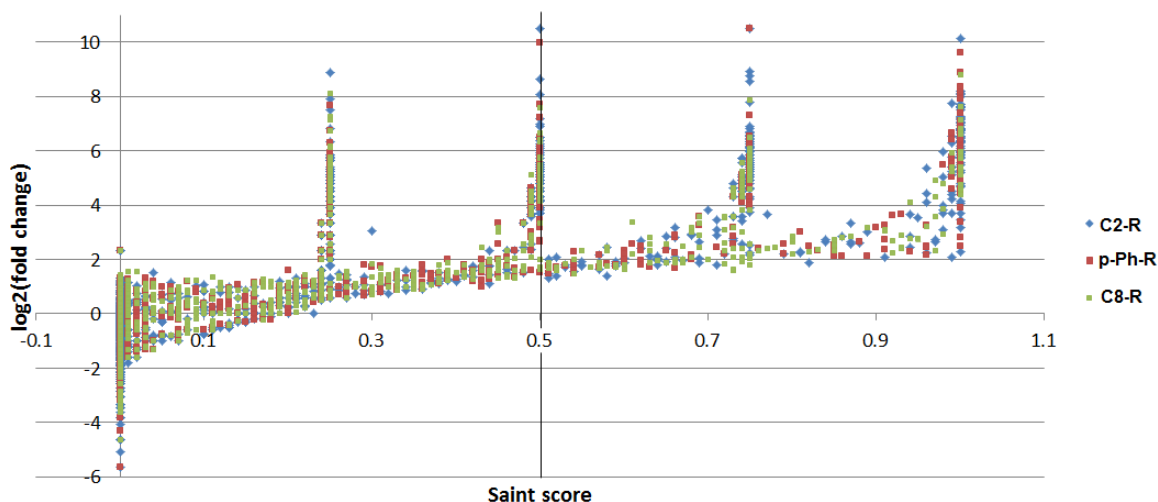
Použitím afinitní purifikace v kombinaci s hmotnostní spektrometrií bylo identifikováno celkem 1034 proteinů interagujících s p-Ph-R, 1105 proteinů, které se vázaly na ligand C2-R a 1074 interagujících s C8-R. Z těchto souborů proteinů se jich 681 vázalo bez rozdílu na všechny tři ligandy. Pouze 109 proteinů bylo zachyceno výhradně na p-Ph-R ligandu, 212 pak interagovalo specificky s C2-R a 207 s C8-R (graf 2). Z těchto výsledků je patrný dříve potvrzený fakt, že jednou z nevýhod afinitních purifikací je velký počet identifikovaných proteinů vázajících se k ligandu s nižší specifitou (Rix et Superti-Furga, 2009).



Graf 2: Vennyho diagram znázorňující překryv identifikovaných proteinů, které byly purifikovány s užitím různých ligandů roscovitinu (p-Ph-R, C2-R nebo C8-R). Počty proteinů jsou vyjádřeny také v procentech z celkového množství všech identifikací.

#### 4.3.2 Vyhodnocení MS dat

Data získaná užitím afinitní purifikace spojené s hmotnostní spektrometrií (AP-MS) byla dále analyzována pomocí programového modulu APOSTL, který purifikovaným proteinům přiřadil hodnoty Saint score,  $\log_2(\text{fold change})$ , Crapome score a další a to na základě srovnání dat z afinitních purifikací na gelech s ligandy roscovitinu s daty z afinitních purifikací za použití blankového gelu. Tyto hodnoty vyjadřují míru pravděpodobnosti specifické interakce mezi proteinem a ligandem. Saint score je hodnota vycházející ze srovnání četností detekce proteinů zachycených v experimentech s užitím ligandu a v experimentech kontrolních. Hodnota  $\log_2(\text{fold change})$  vyjadřuje míru obohacení daného proteinu oproti kontrole (Choi et al., 2011). Distribuce kompletního souboru proteinů purifikovaných během našich experimentů v závislosti Saint score na  $\log_2(\text{fold change})$  je znázorněna v grafu 3.

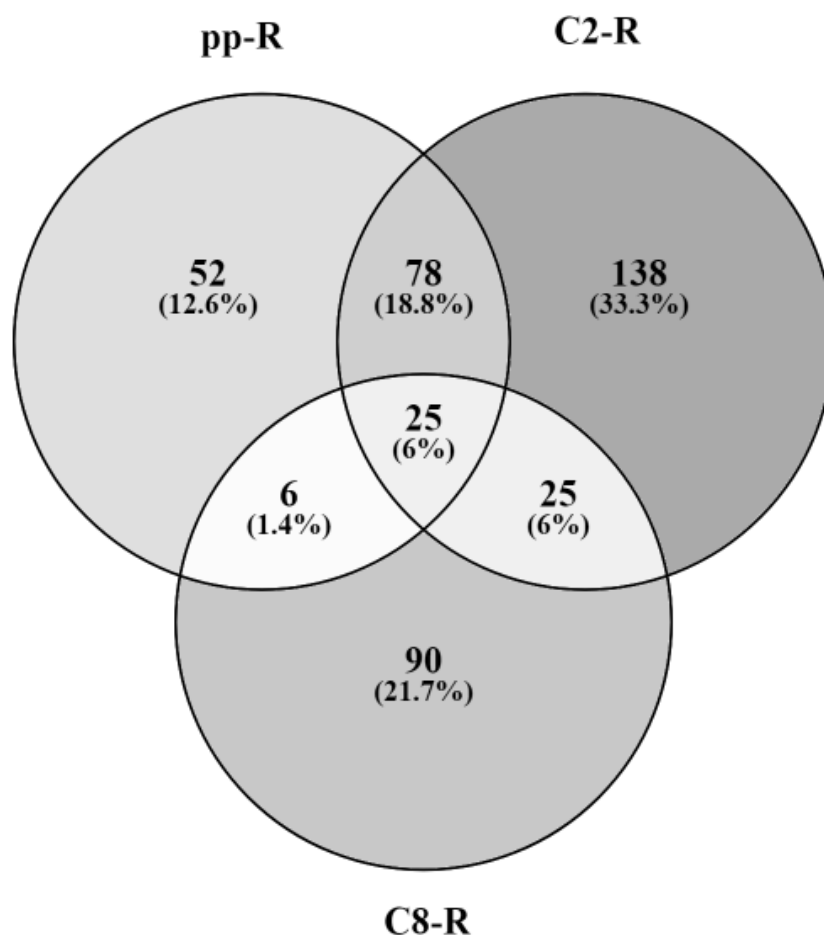


Graf 3: Veškeré proteiny purifikované s použitím jednotlivých ligandů roscovitinu (p-Ph-R, C2-R nebo C8-R) zobrazené v závislosti jejich Saint score na  $\log_2(\text{fold change})$ .

Existuje CRAPome databáze, do které jsou vědci nahrávány datasety proteinů purifikovaných při jimi provedených afinitních purifikacích (Mellacheruvu, 2013; <https://www.crapome.org>). Díky tomu jsou známy proteiny, které se vyskytují ve velkém množství afinitních experimentů bez ohledu na užitý ligand. Tyto nespecificky interagující proteiny se pak v datových souborech projevují nízkým Crapome score. Typicky se jedná například o tubuliny, které mají ATP vazebné místo, a proto bývají často detekovány při použití afinitních ligandů s podobnými vlastnostmi, jako roscovitine. Jejich Crapome score bývá nižší než 10.

Ve snaze omezit soubory námi purifikovaných proteinů na ty, u kterých se dá předpokládat specifická interakce s ligandem, byly z celkových souborů odstraněny proteiny se Saint score  $< 0,5$  a s Crapome score  $< 80$  (pokud byla tato hodnota v databázi), obdobně jako v publikaci B. M. Kuenziho et al. z roku 2016.

Ze srovnání upravených datových souborů pro jednotlivé ligandy je patrné, že tímto způsobem byly skutečně vyloučeny zejména proteiny interagující bez rozdílů se všemi ligandy. Současně došlo k výraznému proporčnímu navýšení počtu proteinů, které byly při experimentech zachyceny výhradně jedním ligandem (graf 4).



Graf 4: Vennyho diagram znázorňující překryv identifikovaných proteinů, které byly purifikovány s užitím různých ligandů roscovitinu (p-Ph-R, C2-R nebo C8-R) a které splňují následující kritéria: Saint score  $\geq 0,5$ ; Crapome PCT  $\geq 80$  (pokud byla tato hodnota v databázi). Počty proteinů jsou vyjádřeny také v procentech z celkového množství všech identifikací.

Značný rozdíl v počtu proteinů je patrný při srovnání jejich hodnot před aplikací statistické analýzy a po ní (tabulka 6). Z 1034 proteinů zachycených při užití p-Ph-R bylo na základě Saint score ( $\geq 5$ ) vybráno 161 proteinů (16 %). Podobnou situaci pozorujeme u ligandu C8-R, kdy z 1074 proteinů bylo vybráno 146 (14 %). Vyšší počet proteinů splnil danou podmínku u ligandu C2-R, 266 proteinů z původních 1105 (24 %).

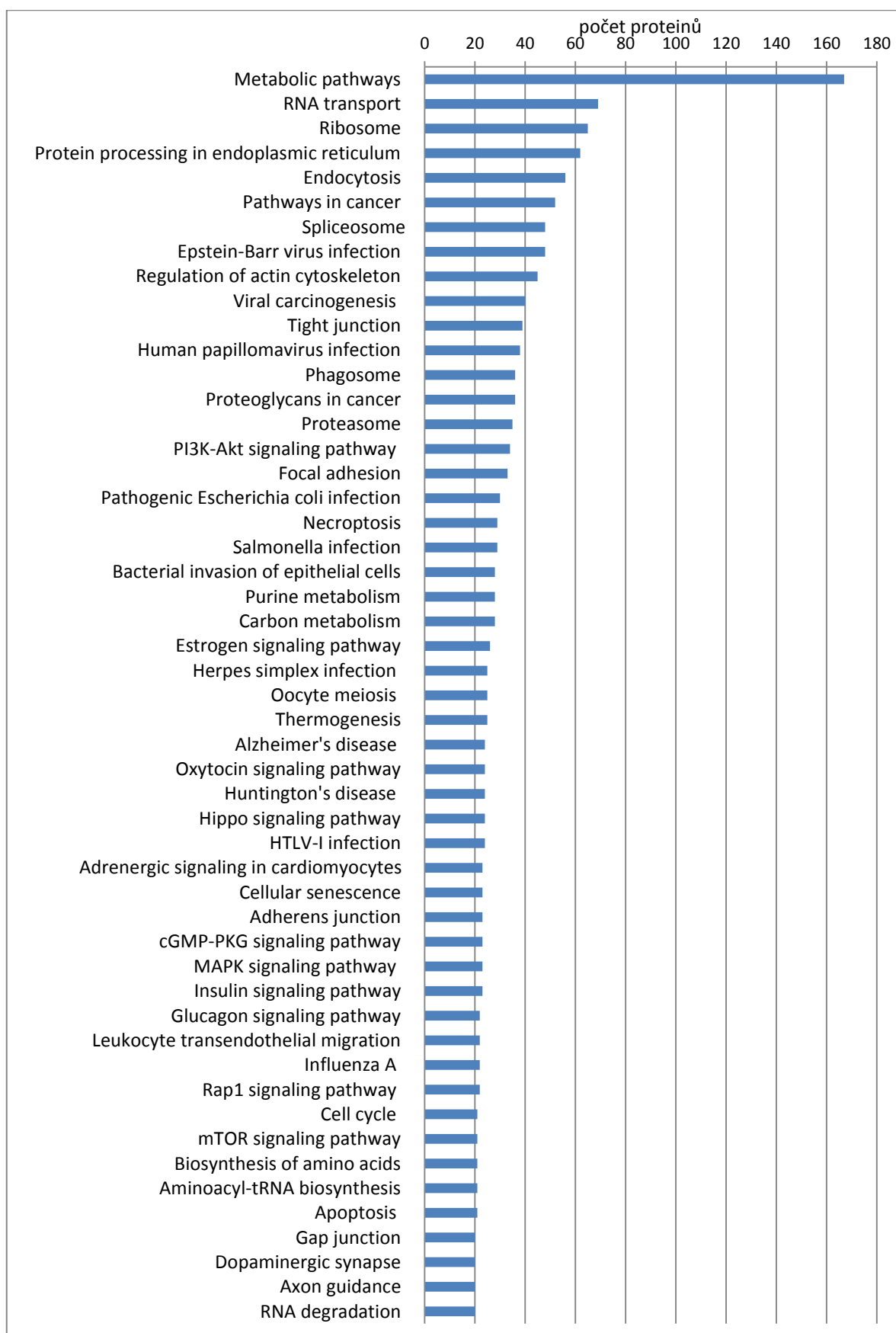
Tabulka 6: Počty proteinů před a po aplikaci statistické analýzy dat.

ligand	celkový počet proteinů	počet proteinů zachycených jen na daném ligandu
p-Ph-R	1034	109
C2-R	1105	212
C8-R	1074	207
Saint score $\geq 0,5$ , Crapome score $> 80$		
p-Ph-R	161	52
C2-R	266	138
C8-R	146	90

K charakterizaci identifikovaných cílů dle jejich zapojení v biologických pochodech byla využita Gene ontology analýza pomocí aplikace Kegg mapper (Kyoto encyclopedia of genes and genomes; grafy 5-8).

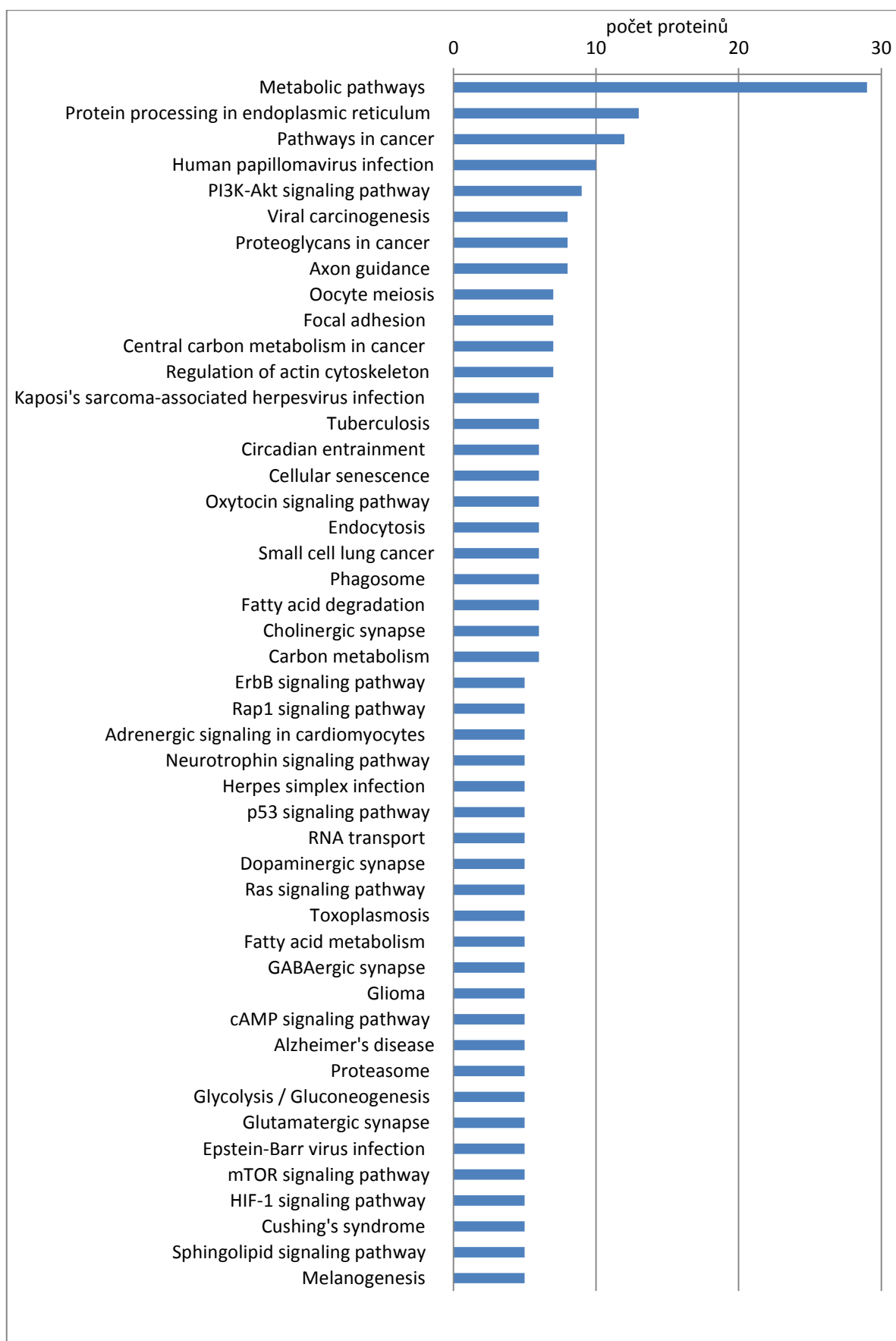
Nejdříve byl analyzován kompletní soubor proteinů, které byly identifikovány s užitím všech tří roscovitinových ligandů. Z grafu 5 je patrné, že většina proteinů spadá do obecných kategorií, jako jsou metabolické procesy, transport RNA, procesy v endoplasmatickém retikulu či endocytóza. Biologický materiál, který jsme použili k experimentům, pocházel z nádorových buněk HCT 116. Není tedy překvapivé, že pozorujeme rovněž metabolické dráhy související s karcinomy. Na šesté pozici vidíme proteiny zapojené do metabolických drah nádorů, na 8. pozici dále proteiny infekce virem Epstein-Barrové, na 10. proteiny virové karcinogeneze a následně nádorové proteoglykany. Zajímavý je rovněž výskyt proteinů Alzheimerovy choroby a proteinů účastnících se buněčného cyklu.





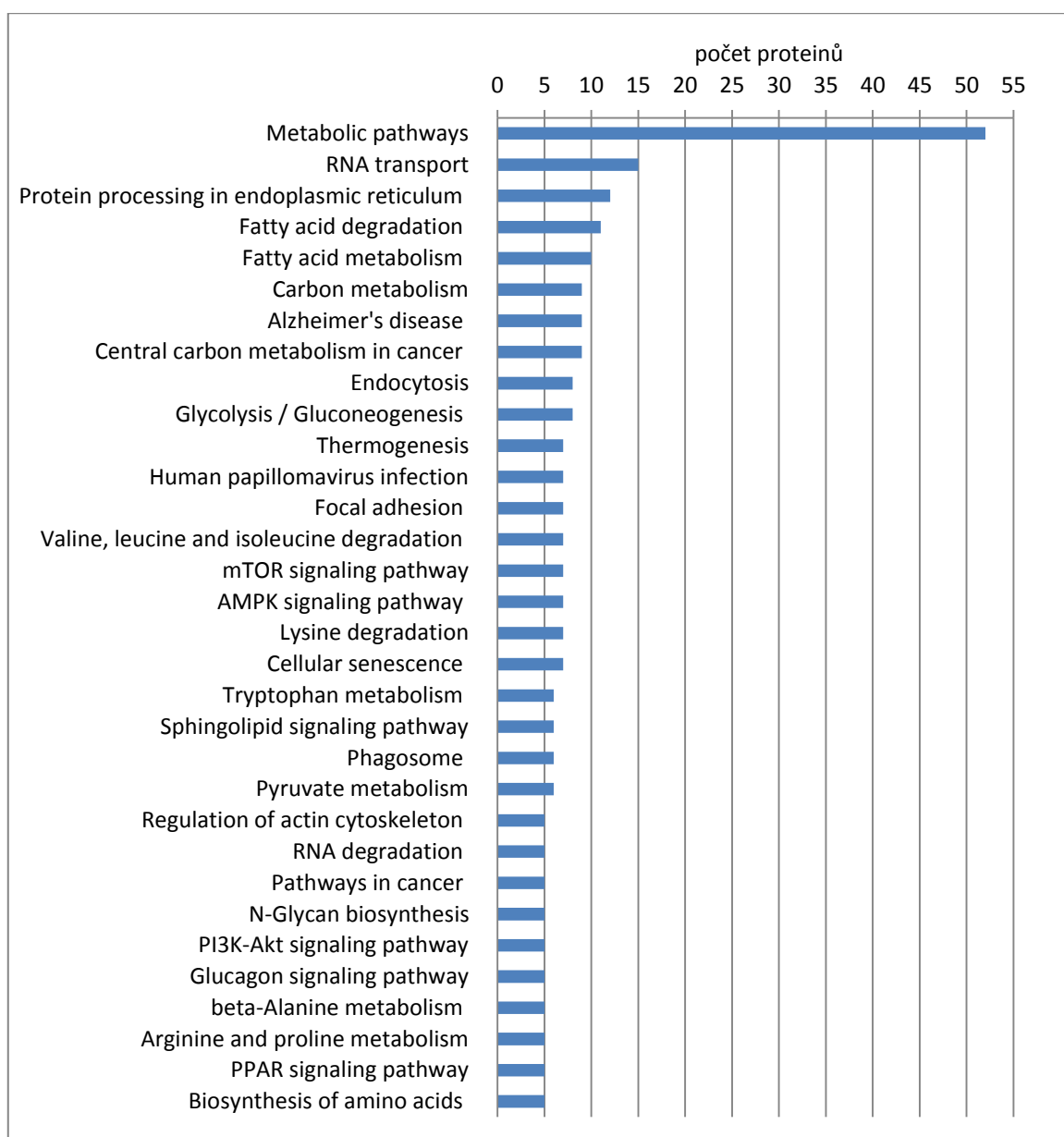
Graf 5: Rozdělení kompletní skupiny proteinů identifikovaných při afinitních purifikacích na ligandech p-Ph-R, C2-R a C8-R podle biologických pochodů na základě Kegg pathway analýzy. Délka sloupce znázorňuje počet proteinů spadajících do odpovídající kategorie. Zobrazované skupiny čítají 167-20 proteinů (celkem 52 skupin).

Afinitní purifikace proteinů spojených s rozvojem nádorových onemocnění za použití analogů ligandu p-Ph-R byla již dříve popsána (Iurisci et al, 2006). Z grafu 6 znázorňujícím proteiny námi izolované na p-Ph-R (Saint score  $\geq 0,5$ , Crapome score  $> 80$ ) je oproti celkovému souboru všech bílkovin skutečně patrné značné obohacení proteinů souvisejících s nádorovými onemocněními. Proteiny spojené s nádory jsou již na třetí pozici. Dále pozorujeme bílkoviny PI3K/Akt/mTOR signální dráhy. Jedná se o jednu z hlavních signálních drah podílející se na karcinogenezi. Protein kináza mTOR (mammalian target of rapamycin) z rodiny fosfatidylinositol-3-kináz (PI3K) hraje významnou roli při buněčné proliferaci, angiogenezi a buněčném růstu prostřednictvím ovlivňování proteosyntézy (Hay et Sonenberg, 2004). Blokací syntézy růstových faktorů (např. cyklinu D) inhibitory proteinu mTOR zabraňují buňce v přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu (Noh et al., 2004). Pozorujeme rovněž proteiny virové karcinogeneze a nádorové proteoglykany. Zajímavý je také výskyt proteinů centrálního metabolismu uhlíku v nádorových buňkách, proteinů herpevirové infekce spojené s Kaposiho sarkomem a proteinů spojených s Alzheimerovou chorobou. Významná je rovněž přítomnost proteinů signální dráhy ErbB. Jedná se o velkou rodinu tyrosin kináz, které fungují jako receptorové proteiny a spouští v buňkách řadu signálních drah, včetně již zmíněné dráhy PI3K/Akt/mTOR. Podílejí se na řízení buněčné proliferace, diferenciaci, migrace a přežívání (Tvorogov et Carpenter, 2004). V neposlední řadě pozorujeme přítomnost signální dráhy p53. Tento protein je významný antionkogen, přirozený inhibitor CDK. Zabraňuje buněčnému dělení zástavou BC, potlačuje buněčný růst a podílí se na spouštění apoptózy.



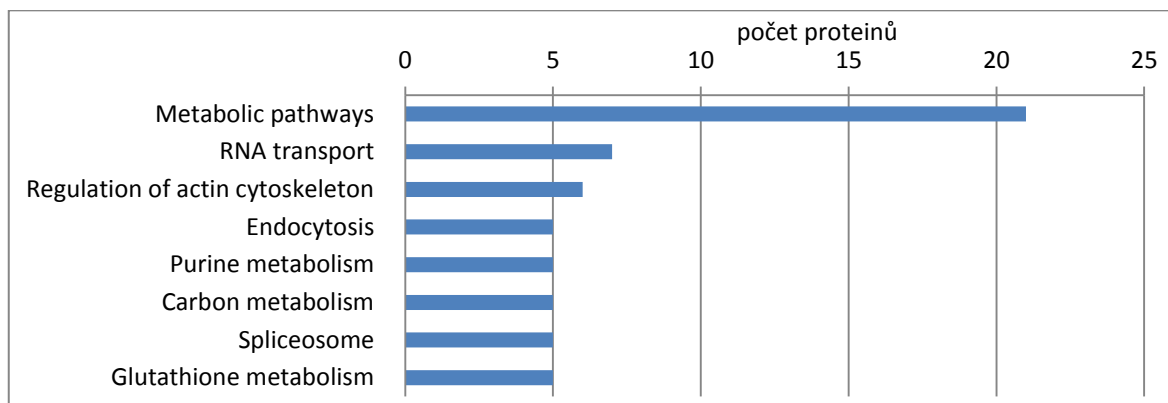
Graf 6: Rozdělení proteinů identifikovaných při afinitní purifikaci s ligandem p-Ph-R podle biologických pochodů na základě Kegg pathway analýzy. Délka sloupce znázorňuje počet proteinů spadajících do odpovídající kategorie. Zobrazované skupiny čítají 52-5 proteinů (celkem 47 skupin).

Proteiny zachycené na C2-R (graf 7) nejsou spojeny s nádory v takové míře jako proteiny interagující s p-Ph-R. Největší množství tvoří proteiny obecně související s metabolismem. Významná je přítomnost proteinů Alzheimerovy choroby na osmé pozici a následně proteinů centrálního metabolismu uhlíku v nádorových buňkách na pozici deváté. Dále se i zde vyskytují proteiny signální dráhy PI3K/AMPK/mTOR a rovněž proteiny spojené s metabolismem karcinomů. Signální kaskáda AMPK reguluje energetický metabolismus na úrovni buněčné i systémové. Je úzce propojena se signálními drahami mTOR a PI3K a spolupodílí se na vzniku nádorů, ale také na vzniku inzulinové tolerance, demence a kardiovaskulárních onemocnění (Ghillebert et al., 2011).



Graf 7: Rozdělení proteinů identifikovaných při afinitní purifikaci s ligandem C2-R podle biologických pochodů na základě Kegg pathway analýzy. Délka sloupce znázorňuje počet proteinů spadajících do odpovídající kategorie. Zobrazovaná oblast čítá 29-5 proteinů ve skupině (celkem 32 skupin).

Gene ontology analýza proteinů zachyceným během experimentů s C8-R ligandem je zobrazená na grafu 8. Na první pohled je patrné, že počet obohacených kategorií se výrazně snížil v porovnání s grafy předchozími. Nejvíce proteinů stejně jako u ostatních ligandů se účastní metabolických drah. Nepozorujeme zde výskyt charakteristických skupin proteinů spojených s nádorovým onemocněním ani s Alzheimerovou chorobou.



Graf 8: Rozdělení proteinů identifikovaných při afinitní purifikaci s ligandem C8-R podle biologických pochodů na základě Kegg pathway analýzy. Délka sloupce znázorňuje počet proteinů spadajících do odpovídající kategorie. Zobrazovaná oblast čítá 21-5 proteinů ve skupině (celkem 8 skupin).

Roscovitine je většinou popisován, jako selektivní inhibitor CDK, jsou však známy také jeho interakce s dalšími proteiny s kinázovou aktivitou. Všechny ligandy užívané v experimentech byly deriváty roscovitinu, proto byly v datových souborech vyhledány veškeré kinázy (tabulka 7). Následně byly kinázy interagující s ligandy porovnány s popsány terapeutickými cíli roscovitinu.

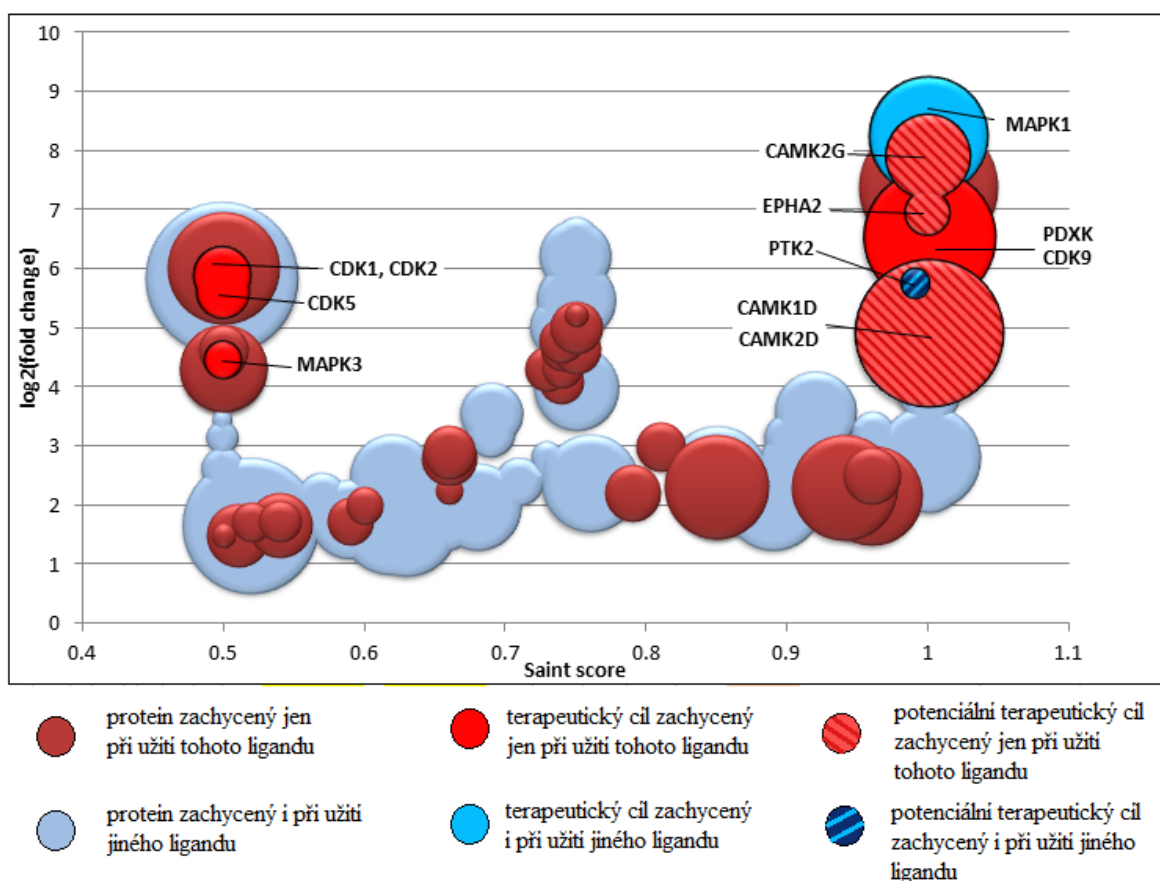
Tabulka 7: Kinázy či proteiny s kinázami interagující zachycené v experimentech s užitím p-Ph-R, C2-R a C8-R. Tučně jsou vyznačeny terapeutické a potenciální terapeutické cíle roscovitinu.

ligand	zkratka proteinu	název proteinu	typ proteinu
p-Ph-R	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, platelet type	sugar kinase
	ADPGK	ADP-dependent glucokinase	sugar kinase
	PFKL	ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, liver type	sugar kinase
	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	protein kinase
	<b>CDK1</b>	<b>Cyclin-dependent kinase 1</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>CDK2</b>	<b>Cyclin-dependent kinase 2</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>CDK9</b>	<b>Cyclin-dependent kinase 9</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>MAPK1</b>	<b>Mitogen-activated protein kinase 1</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>MAPK3</b>	<b>Mitogen-activated protein kinase 3</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>CSNK1E</b>	<b>Casein kinase I isoform epsilon</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>CDK5</b>	<b>Cyclin-dependent kinase 5</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>PDXK</b>	<b>Pyridoxal kinase</b>	<b>non-protein kinase</b>
	<b>PDXK</b>	<b>Pyridoxal kinase isoform CRA b</b>	<b>non-protein kinase</b>
	<b>EPHA2</b>	<b>Epithelial cell kinase</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>PTK2</b>	<b>Focal adhesion kinase 1</b>	<b>protein kinase</b>
<b>CAMK1D</b>	<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D</b>	<b>protein kinase</b>	
<b>CAMK2D</b>	<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</b>	<b>protein kinase</b>	
<b>CAMK2G</b>	<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II</b>	<b>protein kinase</b>	
C2-R	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofruktokinase	sugar kinase
	ADPGK	ADP-dependent glucokinase	sugar kinase
	PFKM	ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, muscle type	sugar kinase
	PFKL	ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, liver type	sugar kinase
	<b>MAPK1</b>	<b>Mitogen-activated protein kinase 1</b>	<b>protein kinase</b>
	<b>PTK2</b>	<b>Focal adhesion kinase 1</b>	<b>protein kinase</b>
	TBRG4	FAST kinase domain-containing protein 4	protein kinase
	CKB	Creatine kinase B-type	non-protein kinase
	PANK4	Pantothenate kinase 4	non-protein kinase
	MNAT1	CDK-activating kinase assembly factor MAT1	protein kinase interaction
	AUNIP	Aurora kinase A and ninein-interacting protein	protein kinase interaction
LAMTOR3	Ragulator complex protein	protein kinase interaction	
RACK1	Receptor of-activated protein C kinase 1	protein kinase interaction	
C8-R	PACSIN2	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	protein kinase
	PAPSS1	Sulfurylase kinase 1	non-protein kinase
	CKB	Creatine kinase B-type	non-protein kinase

Zatímco na matrici s p-Ph-R bylo zachyceno celkem 18 kináz či bílkovin s kinázami interagujících, na matrici s imobilizovaným C2-R bylo zachyceno nižší množství proteinů (13) a na matrici s třetím testovaným ligandem C8-R bílkoviny jen 3.

Zajímavé je srovnání proteinů dle jejich typu. S p-Ph-R v souladu s předchozími studii interagovaly zejména protein kinázy, přičemž se jedná převážně o popsané terapeutické cíle roscovitinu.

Komplexnější představu o charakteru interakce ligandů s proteiny si můžeme vytvořit díky užití bublinových grafů, jelikož ty zobrazují proteiny v závislosti na třech parametrech (Saint score,  $\log_2(\text{fold change})$  a NSAF score; Zybailov et al., 2007). NSAF score je normalizovaný faktor spektrální abundance, který má podobný význam jako Saint score. Vyjadřuje empirickou změnu složení dat a bývá užíváno k doplnění analýzy (Kuenzi et al, 2016). Graf 9 zobrazuje proteiny zachycené při experimentech s p-Ph-R a zároveň vyznačené terapeutické a potenciální terapeutické cíle. Nejvyšší množství terapeutických cílů bylo purifikováno s užitím právě tohoto ligandu, přičemž pozorujeme vysokou míru obohacení oproti kontrole ( $\log_2(\text{fold change})$ ).



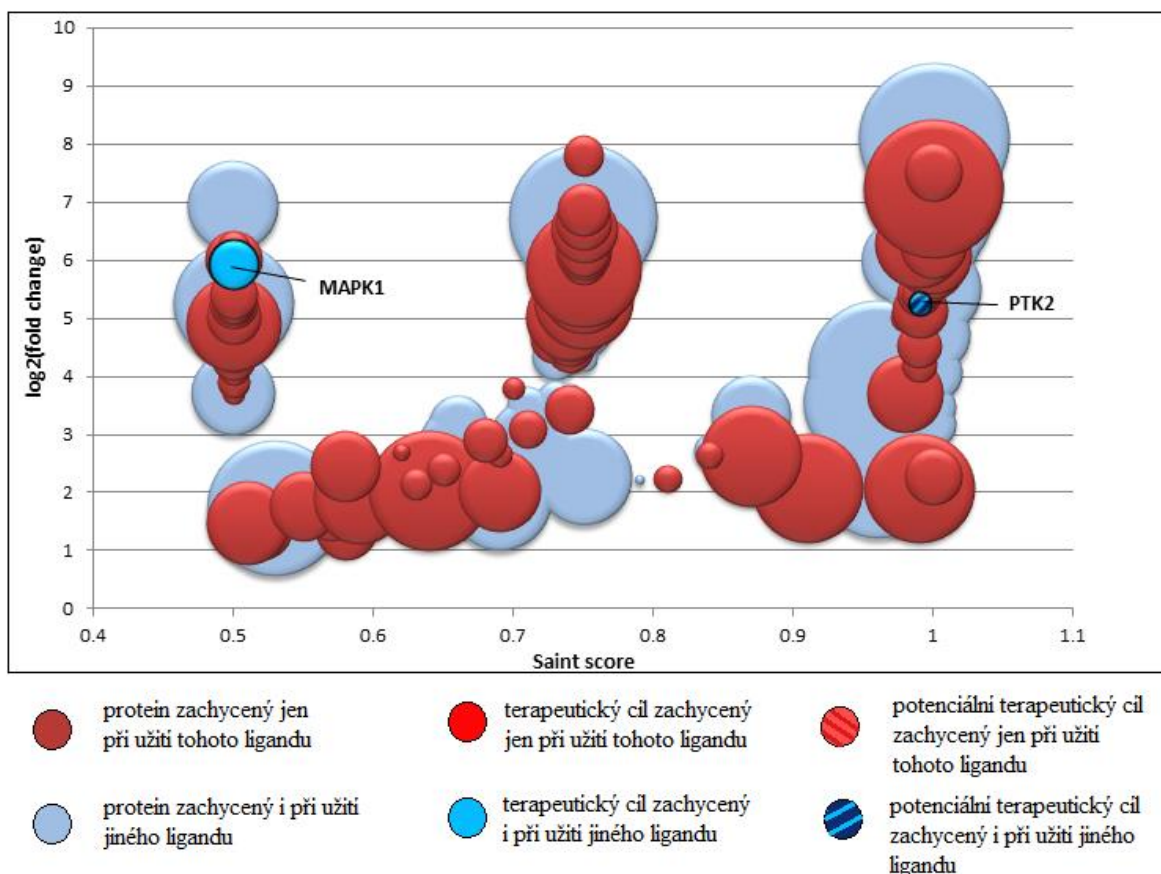
Graf 9: Proteiny purifikované s užitím p-Ph-R zobrazené v závislosti Saint score ( $\geq 0,5$ ) na  $\log_2(\text{fold change})$ . Plocha bubliny vyjadřuje NSAF score.

Jak již bylo zmíněno, užitím p-Ph-R se nám podařilo purifikovat velké množství popsaných terapeutických cílů roscovitinu. Předně proteiny ze skupiny cyklin-dependentních kináz, CDK1, CDK2, CDK9 (Iurisci et al., 2009) a CDK5 (Fabian et al., 2005). Dále kinázy MAPK1 a MAPK2, které hrají výraznou roli v procesech diferenciaci a buněčné proliferaci (Iurisci et al., 2006). V neposlední řadě byla purifikována pyridoxal kináza PDXK, která se podílí na metabolismu vitamínu B6 a jejíž interakce s roscovitinem byla popsána v práci Bach et al. z roku 2006. Během purifikačních experimentů byla zachycena také kasein kináza 1 isoforma  $\epsilon$  CSNK1E identifikovaná jako terapeutický cíl roscovitinu roku 2006 v publikaci Iurisci et al., která však měla nízké Saint score (0,49) a tudíž ve výsledném grafu 9 zvýrazněna není.

Kromě těchto cílů jsme identifikovali také proteiny, které byly potvrzeny jako cíle jiných, roscovitinu podobných, léčiv. Konkrétně protein EPHA2 (protein-thyrosinový receptor epitelálních buněk), který je cílem léčiva Dasatinib. Kinázu PTK2 (Sunitinib, Staurosporine) a kinázy CAMK1D, CAMK2D, CAMK2G (Midostaurin, Staurosporine; Karaman et al., 2008).

Soubor kináz interagujících s C2-R je rozmanitějšího charakteru. Sledujeme výrazný úbytek protein kináz a nárůst množství proteinů, které s kinázami interagují (MNAT1, AUNIP, LAMTOR3, RACK1). Rovněž je v této skupině vyšší počet kináz, které fosforylují cukry. Podařilo se nám purifikovat pouze jeden terapeutický cíl MAPK1 a jeden terapeutický cíl potenciální PTK2, které jsou vyznačeny v grafu 10.



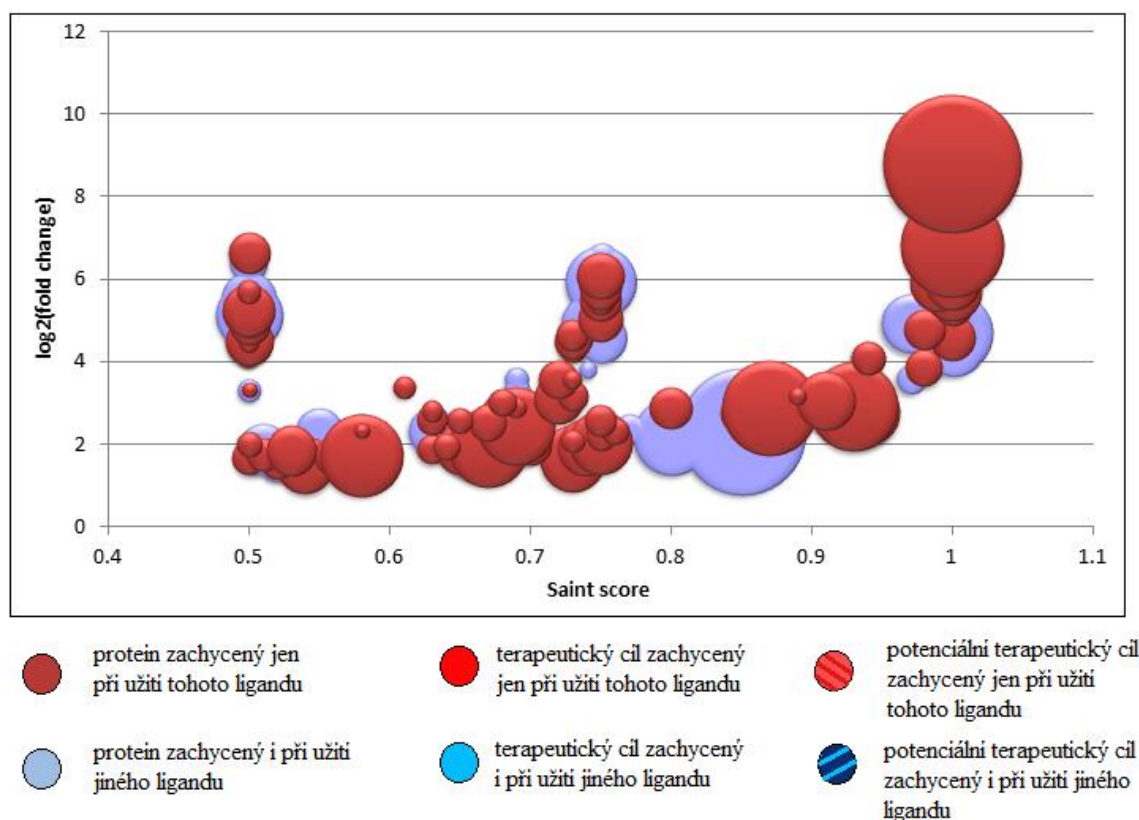


Graf 10: Proteiny purifikované s užitím C2-R v závislosti Saint score ( $\geq 0,5$ ) na  $\log_2(\text{fold change})$ . Plocha bubliny vyjadřuje NSAF score.

Zajímavé je porovnání proteinů MAPK1 a PTK2 mezi grafy 9 a 10. V grafu 9 znázorňujícím pravděpodobnost specifické interakce proteinu s ligandem vykazuje MAPK1 silnou vazbu s p-Ph-R (vysoké Saint score, hodnota  $\log_2$  i NSAF score). V grafu 10 pozorujeme zcela jiné umístění tohoto proteinu, což je dáno nižšími hodnotami statistických parametrů. Protein PTK2 je v obou grafech znázorněn na obdobné pozici.

Přestože většina proteinů interagujících s C2-R nejsou terapeutickými cíli roscovitinu, jedná se o proteiny významné, zapojené do řady biologických procesů. Protein MNAT1 stabilizuje komplex cyklin H-CDK7 tvořící enzymatický komplex CAK. CAK aktivuje kinázy CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6 připojením aktivujícího fosfátu. Protein AUNIP signalizuje dvouvláknové zlomy DNA a účastní se rekombinačních procesů (Lou et al, 2017). Protein LAMTOR3 je součástí komplexu Ragulator, který se podílí na aktivaci mTORC signální dráhy podporující růst buněk v reakci na růstové faktory, energetické hladiny a aminokyseliny. Dále zvyšuje účinnost dráhy MAP kinázy vedoucí k aktivaci MAPK2 (Sancak et al, 2010). Protein RACK1 hraje roli v celé řadě procesů. Podílí se na fosforylaci kinázy PTK2, která reguluje buněčné dělení, migraci, apoptózu a organizaci cytoskeletonu (Chang et al, 1998).

Kinázy interagující s C8-R byly identifikovány pouze tři. Protein kináza C PACSIN2, která ovlivňuje stavbu buněčných membrán a transport pomocí intracelulárních vezikul (Senju et al, 2011). Sulfurylase kinase 1 je protein metabolismu síranů, který zprostředkovává syntézu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (Harjes, 2004). Třetím proteinem je CKB, kreatinfosfokináza, která zprostředkovává reverzibilní přenos fosfátu z molekuly ATP na kreatin (Mariman et al, 1987). Výše uvedené proteiny obsahují několik vazebných míst pro ATP či nukleotidy umožňující vazbu s C8-R. Popsané terapeutické cíle roscovitinu ani cíle potenciální užitím C8-R zachyceny nebyly (graf 11).



Graf 11: Proteiny purifikované s užitím C8-R v závislosti Saint score ( $\geq 0,5$ ) na  $\log_2(\text{fold change})$ . Plocha bubliny vyjadřuje NSAF score.

K podpoře relevance i těch námi identifikovaných proteinů, které nespádaly přímo do skupiny popsanych cílů roscovitinu, byla provedena GO analýza, při které byly proteiny zařazeny do kategorií dle molekulárních funkcí (PANTHER Overrepresentation Test; geneontology.org). Jelikož všechny použité ligandy byly deriváty roscovitinu, mělo by dojít zejména k obohacení kategorií souvisejících s vazbou nukleotidů, ATP, NAD a dalších kofaktorů.

Tento předpoklad byl plně potvrzen u proteinů interagujících s p-Ph-R a také s C2-R (tabulky 8 a 9). Kromě zcela jednoznačných pojmů (např. MAP kinase activity, Cyclin-dependent protein kinase activity) jsou zde zastoupeny i jiné kategorie, jako Lithium ion

binding související s funkcí PDXK, Phosphofruktokinase activity (vazba ATP během reakce) nebo Aldehyde dehydrogenase activity (redukce NAD, NADP). Zajímavou je také kategorie Mu-type opioid receptor binding, která odpovídá receptorům reagujícím na vazbu opioidů aktivací G-proteinu a následnou aktivací metabolických drah obsahujících MAPK, fosfolipázu C, protein kinázu C, PI3K a další proteiny (Gris et al, 2010).

Tabulka 8: Proteiny purifikované s užitím p-Ph-R rozdělené pomocí GO analýzy do skupin dle molekulární funkce. Hodnota fold Enrichment vyjadřuje obohacení oproti referenční databázi proteomu Homo sapiens (GO Ontology database Released 2018-04-04). Zobrazené jsou kategorie s fold Enrichment > 5.

GO molecular function	fold Enrichment
lithium ion binding	100
dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase activity	84
6-phosphofruktokinase activity	84
mu-type opioid receptor binding	84
proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	28
MAP kinase kinase activity	25.2
RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinase activity	23.62
Ran GTPase binding	22.24
threonine-type peptidase activity	21.91
threonine-type endopeptidase activity	21.91
calmodulin-dependent protein kinase activity	18
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, rotational mechanism	14.4
neutral amino acid transmembrane transporter activity	14.4
cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	13.62
cyclin-dependent protein kinase activity	13.26
cation-transporting ATPase activity	11.28
ATPase coupled ion transmembrane transporter activity	11.12
active ion transmembrane transporter activity	11.12
protein transporter activity	10.72
amino acid transmembrane transporter activity	7.68
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	6.2
cadherin binding	5.6

Tabulka 9: Proteiny purifikované s užitím C2-R rozdělené pomocí GO analýzy do skupin dle molekulární funkce. Hodnota fold Enrichment vyjadřuje obohacení oproti referenční databázi proteomu Homo sapiens (GO Ontology database Released 2018-04-04). Zobrazené jsou kategorie s fold Enrichment > 5.

GO molecular function	fold Enrichment
6-phosphofructokinase activity	77.93
phosphofructokinase activity	33.4
nuclear export signal receptor activity	29.23
3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase activity	29.23
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity	25.98
Ran GTPase binding	25.21
structural constituent of nuclear pore	24.19
proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	21.65
aldehyde dehydrogenase (NAD) activity	19.48
nuclear localization sequence binding	16.12
C-acyltransferase activity	15.59
calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	14.84
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, rotational mechanism	11.13
neutral amino acid transmembrane transporter activity	11.13
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	10.82
protein transporter activity	10.78
signal sequence binding	9.74
monosaccharide binding	8.91
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors	8.29
polyubiquitin modification-dependent protein binding	8.29
cation-transporting ATPase activity	8.14
ribosome binding	8.06
ATPase coupled ion transmembrane transporter activity	8.02
active ion transmembrane transporter activity	8.02
NAD binding	7.93
oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	7.74
coenzyme binding	6.29
proton transmembrane transporter activity	5.77
oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as akceptor	5.7
carboxylic acid transmembrane transporter activity	5.32
organic acid transmembrane transporter activity	5.32
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	5.11

Nízký počet obohacených kategorií pozorujeme u proteinů interagující s C8-R, přesto se i zde objevují kategorie související s vazbou odpovídajících molekul (tabulka 10). Kategorie Cadherin binding zahrnuje proteiny, které se účastní formování cytoskeletu. Kategorie Phosphorylase activity (přenos fosfátové skupiny z ATP) a Ligase activity (vazba ATP či NAD) pak proteiny obecně související s metabolismem spolu s kinázami PACSIN2, PAPSS1 a CKB.

Tabulka 10: Proteiny purifikované s užitím C8-R rozdělené pomocí GO analýzy do skupin dle molekulární funkce. Hodnota fold Enrichment vyjadřuje obohacení oproti referenční databázi proteomu Homo sapiens (GO Ontology database Released 2018-04-04). Zobrazené jsou kategorie s fold Enrichment > 5.

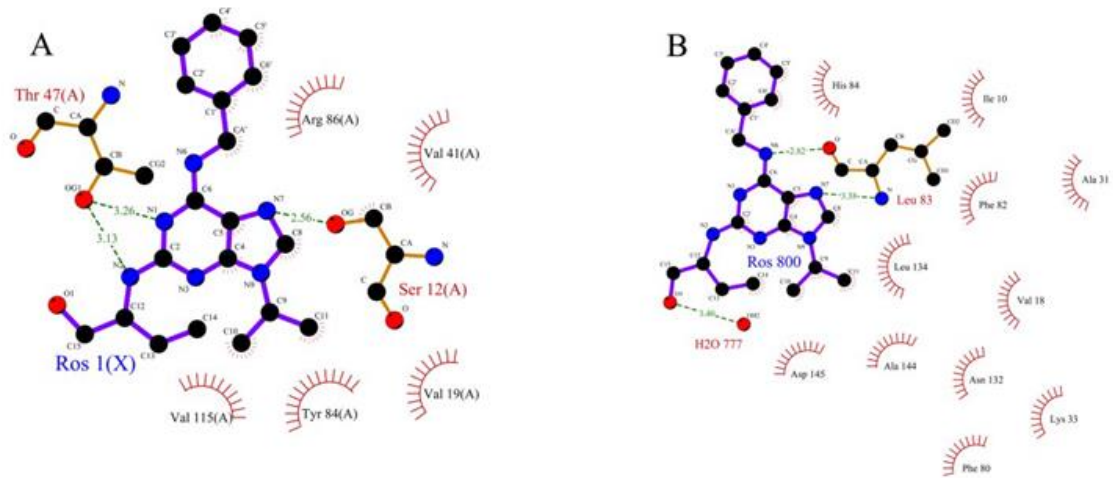
GO molecular function	fold Enrichment
phosphorylase activity	59.33
cadherin binding	7.91
ligase activity	6.71
coenzyme binding	5.34

Rozdíly mezi proteiny purifikovanými za použití jednotlivých ligandů jsou dány jejich strukturními odlišnostmi. Na obrázku 10 vidíme strukturu roscovitinu ve vazbě s PDXK a CDK2. V případě ligandu p-Ph-R je raménko propojující ligand se sepharosovou částicí matrice umístěno na aromatickém kruhu, který není situován do místa vazby (obr. 9). Z těchto důvodů je možná interakce mezi molekulou p-Ph-R a vazebným místem PDKX, respektive CDK.

Ligand C2-R nese místo k připojení na částici matrice v odlišné poloze než p-Ph-R. Zdá se, že modifikace polohy připojovacího raménka znemožnila vazbu mezi tímto ligandem a kinázami PDXK a CDK, stejně jako s většinou dalších známých terapeutických cílů roscovitinu. Přesto však bylo užitím tohoto ligandu purifikováno 13 kináz a s nimi souvisejících proteinů. Také námi provedená Gene ontology analýza potvrdila interakci tohoto ligandu s velkým množstvím proteinů souvisejících s karcinogenezí.

Třetí ligand C8-R nese chemickou modifikaci na 8. uhlíku purinového cyklu. Při pohledu na obrázek 10 je zřejmé, proč tento ligand neinteragoval s PDXK ani CDK. Pozice připojovacího raménka matrice brání navázání C8-R do vazebného místa těchto kináz. Struktura ligandu C8-R pravděpodobně obecně kolidovala se strukturou proteinů známých jako terapeutické cíle roscovitinu. Přesto bylo užitím tohoto ligandu identifikováno mnoho proteinů, u nichž GO analýza podpořila jejich potenciální

specifickou interakci s C8-R. Je pravděpodobné, že i některé z těchto proteinů se tak podílí na komplexním efektu roscovitinu na rakovinné buňky.



Obr. 10: Model vazby (R)-roscovitinu na A pyridoxal kinázu a B cyklin-dependentní kinázu 2 (převzato a upraveno, Tang et al., 2005).

## 5 Závěr

Tato práce se zabývala afinitními purifikacemi proteinů interagujících s deriváty roscovitinu a měla několik cílů. Prvním bylo za použití vybraných derivátů roscovitinu připravit afinitní gely. Byly zvoleny deriváty s rozdílnými modifikacemi p-Ph-R, C2-R a C8-R, které se podařilo imobilizovat na afinitní matrice v optimálním množství.

Druhým cílem byla optimalizace postupů extrakce a afinitní purifikace proteinů z buněčných linií. Byla zvolena buněčná linie HCT 116, ze které se podařilo vyizolovat dostatečné množství proteinů k následným experimentům. Extrakce probíhala za nedenedurujících podmínek, aby nedošlo k narušení konformace a vazebných schopností proteinů. Ke zjištění optimálního nastavení afinitních purifikací byly provedeny experimenty s p-Ph-R s užitím různého množství proteinů (1000, 500, 300 či 100  $\mu\text{g}$ ) v různých objemech inkubační směsi (300 či 200  $\mu\text{l}$ ). Nejvyšší počet identifikovaných proteinů a popsáných terapeutických cílů roscovitinu byl zachycen při použití 300  $\mu\text{g}$  proteinů/200  $\mu\text{l}$  inkubační směsi. Toto nastavení bylo následně použito i při experimentech s ostatními ligandy.

Dalším cílem bylo provést analýzu izolovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie, vyhodnotit výsledky a srovnat jednotlivé varianty použitých ligandů. Rozdíly v proteinech interagujících s jednotlivými ligandy byly podle předpokladů značné. V souladu s předchozími studiemi s p-Ph-R ligandem specificky interagovaly proteiny, které jsou popsány jako terapeutické cíle roscovitinu (CDK, MAPK), čímž bylo potvrzeno správné nastavení afinitních experimentů. Kromě popsáných cílů byla zjištěna interakce s dalšími proteiny, které mají potenciál být využity v klinické praxi (CAMK1D, CAMK2D, CAMK2G, EPHA2). S C2-R interagovaly jiné proteiny než s ligandem předchozím. Především byla identifikována vazba MAPK1, PTK2 a proteinů MNAT1, AUNIP, LAMTOR3 a RACK1 vázících se na kinázy. Nejnižší počet specificky interagujících kináz byl zachycen užitím C8-R.

Přesto, že popsáných terapeutických cílů roscovitinu nebylo identifikováno s užitím C2-R a C8-R mnoho, vedly naše experimenty k objevení jiných specificky interagujících proteinů, které mohou nést podíl na terapeutickém efektu tohoto léčiva. Tento závěr stavíme na výsledcích Gene ontology analýzy molekulárních funkcí, která potvrzuje, že identifikované proteiny obsahují vazebná místa pro nukleotidy, ATP či jiné kofaktory, která zprostředkovávají také vazbu s roscovitinem. Stejně tak Gene ontology analýza biologických procesů dokládá purifikaci proteinů souvisejících s rozvojem karcinomů.

Výsledky našich experimentů potvrzují význam imobilizace afinitních ligandů na více pozicích v rámci jejich struktury. Aplikací tohoto přístupu bude možné významně rozšířit naše poznatky týkající se mechanismu účinku protinádorových léčiv.



## 6 Použitá literatura

Adam G C, Sorensen E J, Cravatt B F (2002) Trifunctional chemical probes for the consolidated detection and identification of enzyme activities from complex proteomes. *Molecular and Cellular Proteomics* 1, 828-835

Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198– 207

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2001) *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Pp. 572-578. Espero Publishing, Česká republika

Aleem E, Arceci R J (2015) Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3, 1-22

Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn S P, Tang L, Jiang T, Liang D, Galons H, Dierick J F, Pinna L A, Meggio F, Totzke F, Schächtele Ch, Lerman A S, Carnero A, Wan Y, Gray N, Meijer L (2005) Roscovitin target, protein kinase and pyridoxal kinase. *Journal of Biological Medicine* 35, 31208-31219

Bantscheff M, Scholten A, Heck, A J (2009) Revealing promiscuous drug-target interactions by chemical proteomics. *Drug Discovery Today* 14, 1021–1029

Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm J S, Dobson J, Urashima M, Mc Henry K T, Pinchback R M, Ligon A H, Cho Y J, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence M S, Weir B A, Tanaka K E, Chiang D Y, Bass A J, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye F J, Sasaki H, Tepper J E, Fletcher J A, Taberero J, Baselga J, Tsao M S, Demichelis F, Rubin M A, Janne P A, Daly M J, Nucera C, Levine R L, Ebert B L, Gabriel S, Rustgi A K, Antonescu C R, Ladanyi M, Letai A, Garraway L A, Loda M, Beer D G, True L D, Okamoto A, Pomeroy S L, Singer S, Golub T R, Lander E S, Getz G, Sellers W R, Meyerson M (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905

Campbell N A, Reece J B (2006) *Biologie*. Pp. 71-79, 392, Computer Press, Česká republika

Craig R et Beavis R C (2004) TANDEM: matching proteins with mass spectra. *Bioinformatics* 20, 1466-1467

- Daub H (2005) Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1754, 183-190
- Daub H (2014) Quantitative proteomics of kinase inhibitor targets and mechanisms. *ACS Chemical Biology* 10, 201-212
- Dorfer V, Pichler P, Stranzl T, Stadlmann J, Taus T, Winkler S, Mechtler K (2014) MS Amanda, a Universal Identification Algorithm Optimized for High Accuracy Tandem Mass Spectra. *Journal of Proteome Research* 13, 8, 3679-3684
- Dvořáková P, Hernychová L, Vojtěšek B (2014) Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klinická onkologie* 27, 104–109
- Fabian M A, Biggs W H 3rd, Treiber D K, Atteridge C E, Azimioara MD, Benedetti M G, Carter T A, Ciceri P, Edeen P T, Floyd M, Ford J M, Galvin M, Gerlach J L, Grotzfeld R M, Herrgard S, Insko D E, Insko M A, Lai A G, Lélías J M, Mehta S A, Milanov Z V, Velasco A M, Wodicka L M, Patel H K, Zarrinkar P P, Lockhart D J (2005) A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature Biotechnology* 23, 329-336
- Fattaey A, Booher R N (1997) Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Progress in Cell Cycle Research* 3, 233-240
- Fischer P M, Lane D P (2000) Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Current Medicinal Chemistry* 7, 1213-1245
- Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J* 278, 3978-3990
- Gris P, Gauthier J, Cheng P, Gibson D G, Gris D, Laur O, Pierson J, Wentworth S, Nackley A G, Maixner W, Diatchenko L (2010) A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. *Molecular Pain* 6, 33, 1-10
- Guiffant D, Tribouillard D, Gug F, Galons H, Meijer L, Blondel M, Bach S (2007) Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnology Journal* 2, 68-75
- Hagensteind M C, Sewald N (2006) Chemical tools for activity-based proteomics. *Journal of Biotechnology* 124, 56-73

- Hahntow I N, Schneller F, Oelsner M, Weick K, Ringshausen I, Fend F, Peschel C, Decker T (2004) Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 18, 747 – 755
- Harjes S, Scheidig A, Bayer P (2004) Expression, purification and crystallization of human 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase 1. *Acta Crystallographica Section D* 60, 350-352
- Havlíček L, Hanuš J, Veselý J, Leclers S, Shaw G, Strnad M (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 4, 408-12
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development*; 18,1926–1945
- Chamrád I, Rix U, Stukalov A, Gridling M, Parapatics K, Müller A C, Altiock S, Colinge J, Superti-Furga J, Haura E B Bennett K L (2013) A Miniaturized Chemical Proteomic Approach for Target Profiling of Clinical Kinase Inhibitors in Tumor Biopsies. *Journal of Proteome Research* 12, 4005–4017
- Chang B Y, Conroy K B, Machleder E M, Cartwright C A (1998) RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology* 18, 3245-3256
- Choi H, Larsen B, Lin Z, Bretkreutz A, Mellacheruvu D, Fermin D, Qin Z S, Tyers M, Gingras A Nesvizhskii A I (2011) SAINT: Probabilistic Scoring of Affinity Purification – Mass Spectrometry Data. *Nature Methods* 8, 1, 70–73
- Iurisci I, Filipski E, Reinhardt J, Bach S, Gianella-Borradori A, Iacobelli S, Meijer L, Lévi F (2006) Improved tumor control through circadian clock induction by Seliciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Research* 66, 10720-10728
- Jeffrey P D, Russo A A, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich N P (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320
- Karaman M W, Herrgard S, Treiber D K, Gallant P, Atteridge CE, Campbell B T, Chan K W, Ciceri P, Davis M I, Edeen P T, Faraoni R, Floyd M, Hunt J P, Lockhart DJ, Milanov Z V, Morrison M J, Pallares G, Patel H K, Pritchard S, Wodicka L M, Zarrinkar P P (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* 26, 127-132

- Kim S, Pevzner P A (2014) MS-GF+ makes progress towards a universal database search tool for proteomics. *Nature Communications* 5, 5277
- Knockaert M, Gray N, Damiens E, Chang Y T, Grellier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz J F, Le Roch K, Doerig C, Schultz PG, Meijer L (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chemistry and Biology* 7, 411–422
- Kodíček M, Valentová O, Hynek R (2015) *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*. Pp. 78-82. Academia, Česká republika
- Koolman J, Röhm K H (2009) *Barevný atlas biochemie, překlad 4. vydání: Biomolekuly*. Pp. 54. Grada Publishing, Česká republika
- Kuenzi B M, Borne A L, Li J, Haura E B, Eschrich S A, Koomen J M, Rix U, Stewart P A (2016) APOSTL: An Interactive Galaxy Pipeline for Reproducible Analysis of Affinity Proteomics Data. *Journal of Proteome Research* 15, 12, 4747-4754
- Lenčo J, Stulík J (2004) Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonovaných peptidů. *Chemické listy* 98, 264– 267
- Ljungman M, O'Hagan H M, Paulsen M T (2001) Induction of ser15 and lys382 modifications of p53 by blockage of transcription elongation. *Oncogene* 20, 5964 – 5971
- Lou J, Chen H, Han J, He H, Huen M S Y, Feng X H, Liu T, Huang J (2017) AUNIP/C1orf135 directs DNA double-strand breaks towards the homologous recombination repair pathway. *Nature Communications* 8, 985, 1-14
- Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependentkinases. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 630–641
- Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff J R (2007) CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 16-21
- Mariman E C M, Broers C A M, Claesen C A A, Tesser G I, Wieringa B (1987) Structure and expression of the human creatine kinase B gene. *Genomics* 1, 126-137
- McLafferty F W, Breuker K, Jin M, Han X, Infusini G, Jiang H, Kong X, Begley T P (2007) Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS Journal* 274, 6256–6268
- Meijer L, Borgne A, Mulner O Chong J P J, Blow J J, Inagaki N, Inagaki M, Delcros J G, Moulinoux J P (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and

selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry* 243, 527-536

Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens A L, Lambert J-P, St-Denis N A, Li T, Miteva Y V, Hauri S, Sardi M E, Low T Y, Halim V A, Bagshaw R D, Hubner N C, Al-Hakim A, Bouchard A, Faubert D, Fermin D, Dunham W H, Goudreault M, Lin Z Y, Badillo B G, Pawson T, Durocher D, Coulombe B, Aebersold R, Superti-Furga G, Colinge J, Heck A J, Choi H, Gstaiger M, Mohammed S, Cristea I M, Bennett K L, Washburn M P, Raught B, Ewing R M, Gingras A C, Nesvizhskii A I (2013) The CRAPome: A Contaminant Repository for Affinity Purification-Mass Spectrometry Data. *Nature Methods* 10, 730–736.

Millar A H, Taylor N L (2014) Subcellular proteomics – where cell biology meets protein chemistry. *Frontiers in Plant Science* 5, 1-2

Nigg, E A (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Current Opinion in Cell Biology* 8, 312 - 317

Nigg, E A (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 21–32

Noh WC, Mondesire WH, Peng J, Jian W, Zhang H, Dong J, Mills GB, Hung MC, Meric-Bernstam F (2004) Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* 10, 3, 249–258

Olthoff J K, Lys I A, Cotter R J (1988) A pulsed time-of-flight mass spectrometer for liquid secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2, 171-175

Ong S E, Schenone M, Margolin A A, Li X, Do K, Doud M K, Mani D R, Kuai L, Wang X, Wood J L, Tolliday N J, Koehler A N, Marcaurelle L A, Golub T R, Gould R J, Schreiber S L, Carr S A (2009) Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 4617–4622

Otto T, Sicinski P (2017) Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews* 17, 93-115

Otyepka M, Kryštof V, Havlíček L, Siglerová V, Strnad M, Koča J (2000) Docking- based development of purine-like inhibitor of cyclin-dependent kinase-2. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 2506-2513

- Paulovich A G, Hartwell L H (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 82, 841-847
- Pingoud A, Urbanke C, Hoggett J, Jeltsch A (2003) *Biochemical methods – A concise guide for students and researchers*, Pp. 93-96. Wiley-VCH, Německo
- Rix U, Superti-Furga G (2009) Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nature Chemical Biology*, 5, 9, 616-624
- Rosypal S a kolektiv autorů (2003) *Nový přehled biologie: Chemické složení buňky*. Pp. 37-39, Scientia, Česká republika
- Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard A L, Nada S, Sabatini D M (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303
- Sánchez-Martínez, Gelbert L M, Lallena M J, de Dios A (2015) Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 25, 3420–3435
- Senju Y, Itoh Y, Takano K, Hamada S, Suetsugu S (2011) Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *Journal of Cell Science* 124, 2032-2040
- Sherr C J, Roberts J M (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* 13, 1501–1512
- Tang L, Li M H, Cao P, Wang F, Chang W R, Bach S, Reinhardt J, Ferandin Y, Galons H, Wan Y, Gray N, Meijer L, Jiang T, Liang D C (2005) Crystal Structure of Pyridoxal Kinase in Complex with Roscovitine and Derivatives. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 35, 31220 –31229
- Tvorogov D et Carpenter G (2004) *Encyclopedia of Biological Chemistry: Epidermal Growth Factor Receptor Family*. Pp. 51 Elsevier Inc., USA
- Vaudel M, Barsnes H, Berven FS, Sickmann A, Martens L (2011) SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X! Tandem searches. *Proteomics* 11, 5, 996-999
- Vaudel M, Burkhardt J M, Zahedi R P, Oveland E, Berven F S, Sickmann A, Martens, Barsnes H (2015) PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets *Nature Biotechnology* 33, 1, 22–24

Veenstra T D et Yates J R (2006) Proteomics for biological discovery. Pp. 4, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey (USA)

Yates J R, Ruse C I, Nakorchevsky A (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advantages, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 11, 49– 79

Yost R A, Boyd R K (1990) Tandem mass spektrometry: quadrupole and hybrid instruments. *Methods in Enzymology* 193, 154-200

Zybaïlov B L, Florens L, Washburn M P (2007) Quantitative shotgun proteomics using a protease with broad specificity and normalized spectral abundance factors. *Molecular BioSystems* 3, 354–360