

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Afinitní purifikace proteinů z nádorové linie MCF-7 interagujících s  
potenciálními steroidními kancerostatiky**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Tereza Frydryšková</b>
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Radim Simerský, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Frydryšková
Název práce	Afinitní purifikace proteinů z nádorové linie MCF-7 interagujících s potenciálními steroidními kancerostatiky.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů a CRH
Vedoucí práce	Mgr. Radim Simerský, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá purifikací proteinů interagujících se steroidními látkami. V teoretické části jsou shrnuty informace o steroidních hormonech, jejich významu v rozvoji nádorových onemocnění, estrogenových receptorech, proteinech a afinitní chromatografii. V experimentální části je popsána extrakce proteinů z nádorové linie MCF-7 a purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie je separační technika pro čištění specifických molekul nebo skupin molekul z komplexní směsi s využitím specifické vazebné reverzibilní interakce mezi molekulami. Purifikované proteiny byly dále zpracovány proteomickými metodami.
Klíčová slova	Steroidní hormon, estrogeny, estrogenový receptor, rakovina prsu, afinita, chromatografie, protein
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Bc. Tereza Frydryšková
Title of thesis	Affinity purification of proteins from the MCF-7 tumor line interacting with potential steroidal anticancer drugs.
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	Mgr. Radim Simerský, Ph. D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The diploma thesis deals with purification of proteins that are interacting with steroids. The theoretical part summarizes information about steroid hormones, their importance in development of cancer, estrogen receptors, proteins and affinity chromatography. In the experimental part, the extraction of proteins from the MCF-7 tumor line and purification of proteins by affinity chromatography is described. Affinity chromatography is a separation technique for purifying specific molecules or groups of molecules from a complex mixture using a specific binding reversible interaction between molecules. Purified proteins were further processed by proteomic methods.</p>
Keywords	Steroid hormone, estrogens, estrogen receptor, breast cancer, affinity, chromatography, protein
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne ..... ..

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při zpracování této práce, vstřícný přístup, trpělivost a jeho čas.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janě Oklešťkové, Ph.D. a RNDr. Miroslavu Kvasnicovi, Ph.D. za přípravu afinitních gelů a ligandů, Mgr. Lucii Rárové za kultivaci a poskytnutí buněk, Mgr. Ivu Chamrádovi, Ph.D. za rady a milý přístup a Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za odborné vedení při frakcionaci a LC-MS/MS analýze.

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	8
1 Úvod a cíle práce .....	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Steroidní hormony.....	12
2.1.1 Role steroidních hormonů v rozvoji rakovinného bujení .....	13
2.2 Rakovina prsu.....	13
2.2.1 Estrogenové receptory a rakovina.....	15
2.2.2 Struktura estrogenových receptorů .....	15
2.2.3 Signalizace estrogenových receptorů.....	16
2.2.4 Nádory s exprimovanými/neexprimovanými estrogenovými receptory .....	17
2.3 Proteiny, jejich struktura a funkce .....	18
2.4 Proteomika .....	19
2.5 Chromatografické techniky .....	20
2.6 Afinitní chromatografie.....	21
2.6.1 Historie afinitní chromatografie.....	22
2.6.2 Princip afinitní chromatografie .....	22
2.6.3 Nosné materiály v afinitní chromatografii .....	23
2.6.4 Imobilizační techniky v afinitní chromatografii .....	24
2.6.5 Afinitní ligandy .....	25
2.6.6 Cílové profilování malých molekul pomocí chemické proteomiky .....	26
2.6.7 Aplikace afinitní chromatografie .....	27
3 Experimentální část .....	29
3.1 Chemikálie a materiál .....	29
3.2 Použité přístroje .....	30
3.3 Metody .....	31
3.3.1 Nativní extrakce proteinů z buněčné linie MCF-7.....	31
3.3.2 Purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie.....	32
3.3.3 Štěpení v roztoku .....	33
3.3.4 Čištění peptidů na SPE mikrokolonkách (tzv. Stage-tip) .....	33
3.3.5 LC-MS/MS analýza a zpracování dat.....	34
3.3.6 Vyhodnocování dat z LC-MS/MS .....	35
4 Výsledky a diskuze.....	36
4.1 Extrakce proteinů z buněčné nádorové linie MCF-7 .....	36
4.2 Stanovení koncentrace buněčného lyzátu .....	36

4.3	Afinitní purifikace proteinů.....	37
4.4	Čištění peptidů na SPE-mikrokolonách .....	38
4.5	Vyhodnocování dat z LC-MS/MS .....	38
5	Závěr.....	47
	Použitá literatura .....	48

## **Seznam použitých zkratk**

- ABPP – activity-based probe profiling
- AC – afinitní chromatografie
- ACLY – ATP-citrát syntáza
- ADSL – adenylosukcinát lyáza
- ADSS – adenylosukcinát syntáza
- AF-1/2 – aktivační funkce 1/2
- AKT1 – RAC-alfa serin threonin kináza
- APRT – adenin fosforibosyl transferáza
- ASR – světový věkový standard
- ATIC – protein PURH
- BRCA 1/2 – BReast CAncer 1/2, tumor supresorové geny
- BSA – bovine serum albumine (hovězí sérový albumin)
- CCCP – compound-centric chemical proteomics
- COMT – katechol O-methyl transferáza
- DBD – DNA vazebná doména
- DP – druhý posel
- ECHS1 – enoyl-CoA hydratáza
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
- EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru
- ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay
- ER – estrogenový receptor
- EREs – estrogen response elements
- ERBB2 – lidský epidermální růstový faktor 2
- ESI – ionizace elektrosprejem
- FGF – fibroblastový růstový faktor
- GARS – glycin-tRNA ligáza
- GMPS – GMP syntáza
- GO – gene ontology
- GSTM3 – glutathion S-transferáza Mu 3



HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová  
HER2 – humánní epidermální receptor 2  
HPRT – hypoxantin-guanin fosforibosyl transferáza  
HSA – human serum albumine (lidský sérový albumin)  
IAC – imunoafinitní chromatografie  
IAM – immobilized artificial membrane  
IEC – iontově výměnná chromatografie  
IMPDH – IMP dehydrogenáza  
LB – lyzační pufr  
LBD – doména vážící ligand  
LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií  
LDL – low density lipoprotein  
MCF-7 – Michigan Cancer Foundation-7  
MF – mobilní fáze  
nLC – nanokapilární chromatografie  
PEP – fosfoenolpyruvát  
PKM – pyruvát kináza  
PMSF – fenylmethansulfonylfluorid  
PR – progesteronový receptor  
PRPP – fosforibosyl pyrofosfát  
Q-TOF – spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu  
RF – růstový faktor  
rpm – počet otáček za minutu  
SF – stacionární fáze  
SHMT2 – serin hydroxymethyl transferáza  
SPE – extrakce pevnou fází  
TEAB – bikarbonát triethylamonný  
TF – transkripční faktor  
TFRC – transferinový receptor 1  
TNF – tumor nekrotizující faktor

VEGF – vaskulární epidermální růstový faktor

WB1 – promývací pufr 1

WB2 – promývací pufr 2

XRN2 – 5-3 exoribonukleáza 2

x g – tíhové zrychlení

## 1 Úvod a cíle práce

Steroidní hormony jsou lipofilní molekuly, které mají v organismu úlohu chemického posla. Na základě fyziologické funkce se steroidní hormony dělí do pěti skupin na: mineralokortikoidy, glukokortikoidy, progestiny, androgeny a estrogenery. Účinky steroidních hormonů mohou vést i k řadě patologických stavů jako jsou rakovina, necitlivost na steroidy nebo jejich abnormální syntéza (Henley, 2005).

Estrogeny řídí rozmanitou škálu biologických procesů u obratlovců, hrají klíčovou roli ve vývoji a udržování normálních sexuálních funkcí. Jak endogenní, tak exogenní estrogeny se ale také podílejí na patogenezi prsu. Buněčná signalizace estrogenů je zprostředkována pomocí estrogenových receptorů (ER), což jsou steroidní receptory spadající do rodiny steroidních jaderných receptorů, které působí jako ligand dependentní transkripční faktory (Begam, 2017).

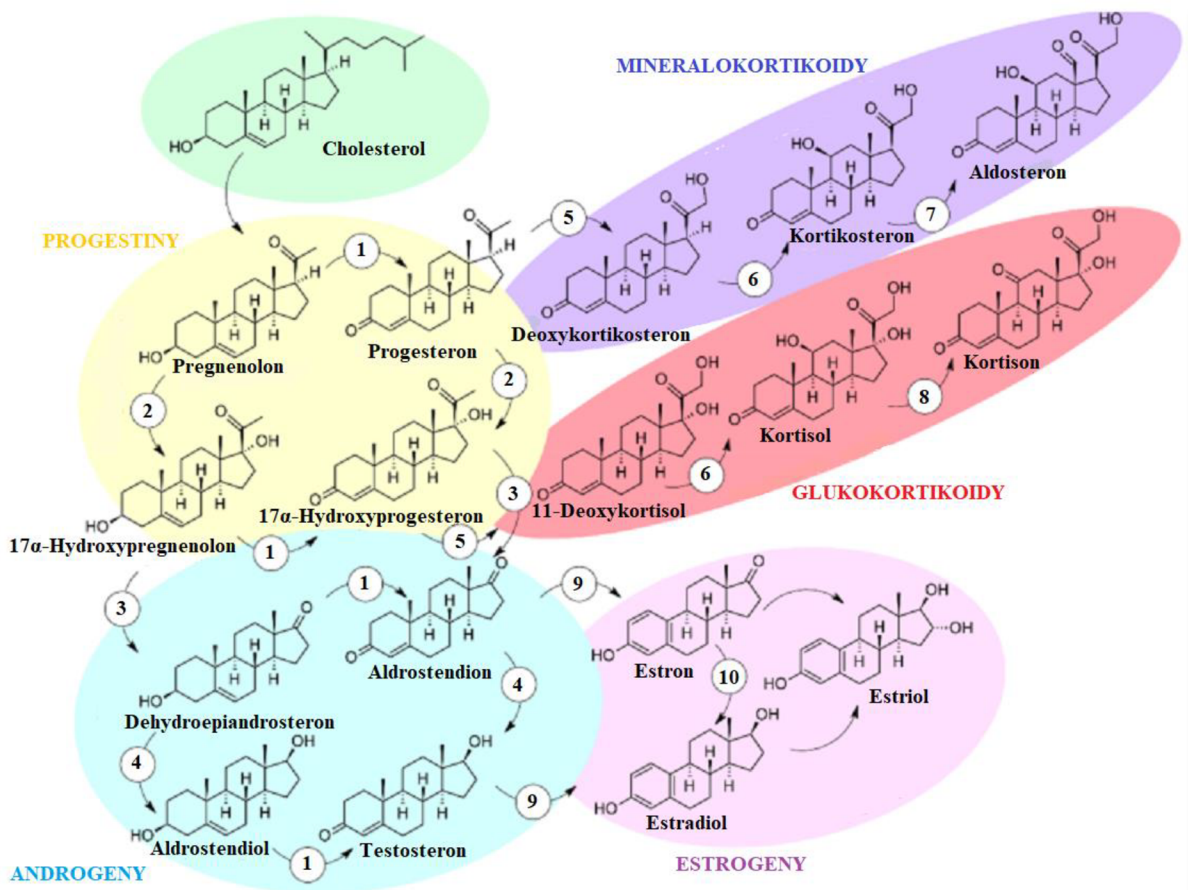
Diplomová práce se zabývá purifikací proteinů interagujících se steroidními látkami. V rámci experimentu bylo využito strukturních analogů steroidů jako afinitních ligandů, které byly použity k přípravě afinitních gelů. Na gelech byla provedena série afinitních experimentů, během nichž byly izolovány proteiny z extraktů buněčných nádorových linií. Modelovou linií byly nádorové buňky MCF-7 (zkratka pro Michigan Cancer Foundation-7). Purifikované proteiny byly identifikovány pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

Cílem diplomové práce je vypracování literární rešerše na zadané téma, extrakce proteinů z nádorové linie, purifikace proteinů interagujících se steroidními látkami pomocí afinitní chromatografie a jejich následná identifikace.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou lipofilní molekuly, které mají v organismu úlohu chemického posla. Hlavními místy jejich syntézy a sekrece jsou vaječníky, varlata, nadledviny a placenta (Capper, 2016). Prekurzorem steroidních hormonů, ale také vitamínu D a žlučových kyselin je C<sub>27</sub> cholesterol, jehož hlavním zdrojem pro syntézu steroidních hormonů je LDL (low density lipoprotein) cholesterol. Cholesterol je metabolizován řadou enzymatických cest a je přeměněn na 21-, 19- a 18-uhlíkaté steroidní hormony (Obr. 1). Na základě fyziologické funkce se steroidní hormony dělí do pěti skupin na: mineralokortikoidy, glukokortikoidy, progestiny, androgeny a estrogeny (Chimento, 2019).



Obr. 1. Biosyntéza a metabolismus steroidních hormonů (převzato a upraveno z Valko-Rokytkovská, 2021).

Katalyzátory reakce jsou enzymy: **1:** 3β-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 2, **2:** 17α-hydroxyláza, **3:** 17, 20-lyáza, **4:** 17β-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 3/5, **5:** 21-hydroxyláza, **6:** 11β-hydroxyláza, **7:** aldosteron syntáza, **8:** 11β-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 2, **9:** aromatáza, **10:** 17β-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1/3.

Na základě vzdálenosti cílového místa od místa syntézy a sekrece se steroidní hormony klasifikují jako endokrinní (ovlivňují vzdálené orgány), parakrinní (ovlivňují okolní buňky) nebo autokrinní (ovlivňují buňku, která je vyprodukovala). U obratlovců působí steroidy na širokou škálu tkání a ovlivňují např. pohlavní diferenciaci, reprodukční fyziologii a metabolismus. Účinky steroidních hormonů mohou vést i k řadě patologických stavů jako jsou rakovina, necitlivost na steroidy nebo jejich abnormální syntéza (Henley, 2005).

### **2.1.1 Role steroidních hormonů v rozvoji rakovinného bujení**

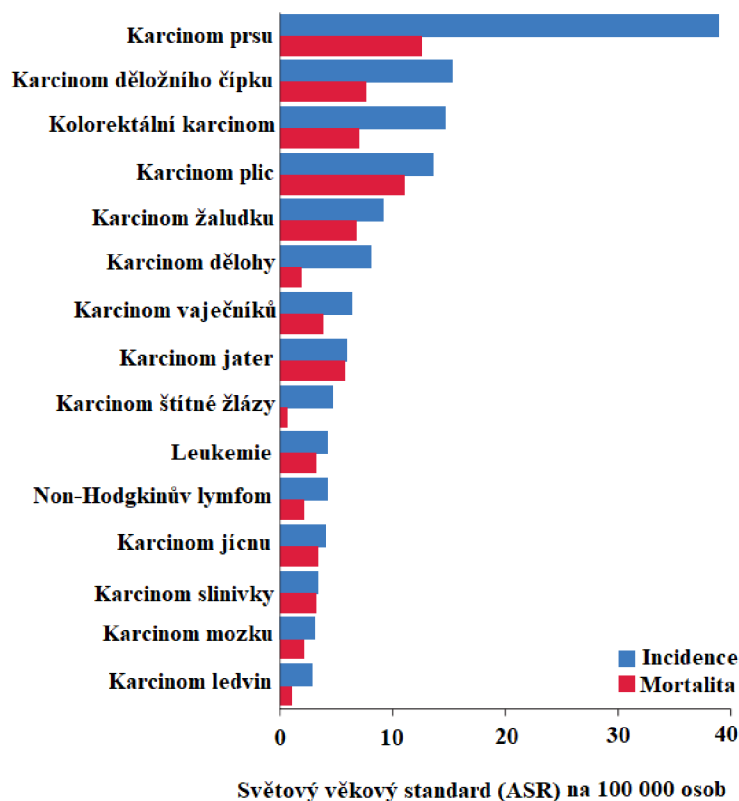
Bylo provedeno několik studií na rakovinných buňkách, které odhalily, že je v nich oproti normálním buňkám zesílena syntéza cholesterolu. Vysoké hladiny cholesterolu v séru jsou také spojeny se zvýšeným rizikem vzniku mnoha typů rakovin (Chimento, 2019).

V roce 2019 Anh a kol. ve své studii poukázali na významné změny ve steroidogenezi a metabolismu androgenů a estrogenů u rakoviny. Jejich zjištění naznačují, že estradiol, dehydroepiandrosteron, kortizol a metabolity estrogenu mohou být považovány za onkosteroidy. Zejména estradiol je spojován se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu a vaječníků.

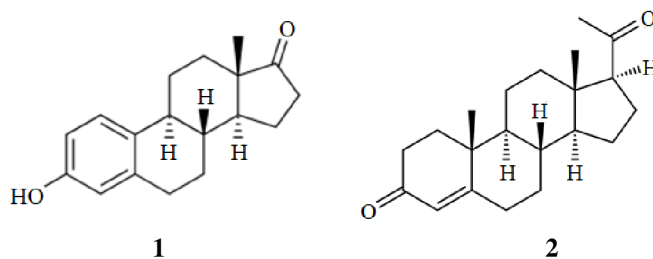
Biotransformace estronu a estradiolu vede k tvorbě katecholových derivátů jako jsou 4-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestron a 4-hydroxyestron, u kterých se předpokládá, že jsou karcinogenní metabolické produkty, zatímco 2-methoxyestrogeny jsou považovány za antiproliferativní a ochranné proti karcinogenezi (Valko-Rokytovská, 2021).

## **2.2 Rakovina prsu**

Rakovina prsu je často vyskytující se zhoubný nádor mléčné žlázy, u kterého je buněčná proliferace řízena steroidními hormony. U žen se jedná o nejčastější typ nádorového onemocnění s vysokou mortalitou (Obr. 2). Vlivem neustálé změny hormonů od narození do puberty, dále v těhotenství až po menopauzu dochází k dynamickým změnám v prsní tkáni. Nejvýznamněji působícími hormony jsou estrogen a progesteron (Obr. 3), přičemž jejich nadprodukce nebo nedostatečná produkce je důvodem abnormálního růstu a změn v prsní tkáni (Camarillo, 2014).



Obr. 2. Výskyt a mortalita rakoviny prsu ve srovnání s jinými typy rakovin (převzato a upraveno z Camarillo, 2014).



Obr. 3. Struktura estrogenu (1) a progesteronu (2).

Rizikové faktory pro vznik rakoviny se dělí na nemodifikované, mezi které patří věk, mutace genů BRCA1 (BReast CAncer 1) a BRCA2 (BReast CAncer 2), rodinná a reprodukční anamnéza a vysoké dávky záření, a na potenciálně modifikované kam spadají endogenní estrogény, hormonální terapie, obezita, výživa a konzumace alkoholu (Samavat, 2015).

Rakovina prsu je kategorizována na tři hlavní podtypy nádorů na základě přítomnosti/nepřítomnosti molekulárních markerů pro ER nebo progesteronové receptory (PR) a výskytu lidského epidermálního růstového faktoru 2 (ERBB2, dříve HER2 – humánní

epidermální receptor 2) na hormonální receptor pozitivní/ERBB2 negativní, ERBB2 pozitivní a tripl negativní (postrádají všechny tři standardní molekulární markery) (Waks, 2019).

Nádorové buňky MCF-7 jsou nejrozsáhleji studovanou buněčnou linií lidského karcinomu prsu na světě. Linie MCF-7 byla izolována v roce 1970 z prsní tkáně 69-leté Catherine Frances Mallon, jejíž buňky se staly hlavním zdrojem současných znalostí o rakovině prsu. MCF-7 jsou také první buněčnou linií rakoviny prsu, která reaguje na hormony. Linie obsahuje čtyři třídy receptorů pro estrogény, progestiny, androgeny a glukokortikoidy a je tedy vynikajícím modelem pro studium hormonálních mechanismů kontroly růstu nádoru a vzájemných vztahů mezi hormony (Lee, 2015).

### **2.2.1 Estrogenové receptory a rakovina**

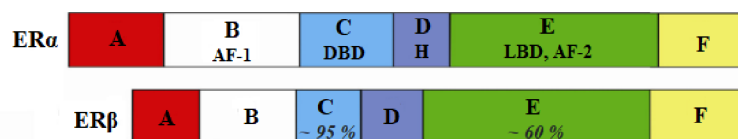
Estrogény jsou steroidní hormony, které řídí rozmanitou škálu biologických procesů u obratlovců, hrají klíčovou roli ve vývoji a udržování normálních sexuálních funkcí a mají tkáňově selektivní účinek, který má význam v medicíně při vývoji optimálních terapeutik pro prevenci a léčbu rakoviny prsu (Begam, 2017).

Buněčná signalizace estrogenů je zprostředkována pomocí ER, což jsou steroidní receptory spadající do rodiny steroidních jaderných receptorů, které působí jako ligand dependentní transkripční faktory a jejich aktivita je spojena s buněčným cyklem. ER se podílejí na regulaci různých fyziologických systémů (centrální nervový, kardiovaskulární a reprodukční systém) a regulují buněčnou proliferaci. ER se klasifikují na ER $\alpha$  a ER $\beta$  a lze je detekovat v širokém spektru tkání. Exprese ER $\alpha$  a ER $\beta$  v tkáních se mění během vývoje, stárnutí nebo chorobného stavu (Begam, 2017). ER $\alpha$  je umístěn na chromozomu 6 a je převážně exprimován v děloze, vaječnicích, Leydigových buňkách varlat, prsu, játrech, mléčné žláze a tukové tkáni. ER $\beta$  nacházející se na chromozomu 14 je primárně exprimován v epitelu prostaty, močovém měchýři, tlustém střevě a buňkách imunitního systému (Zhao, 2019).

### **2.2.2 Struktura estrogenových receptorů**

ER mají šest strukturních domén, které se označují jako A, B, C, D, E a F (Obr. 4). N-terminální oblast A/B domén obsahuje aktivační funkci-1 (AF-1), která přispívá k transkripční aktivitě ER a je základní doménou pro interakci s koregulátory. Domény A/B obsahují aminokyseliny, které jsou cílem posttranslačních modifikací. Doména C kóduje

centrálně umístěnou DNA vazebnou doménu (DBD). Doména D zahrnuje sekvence aminokyselin, které stimulují jadernou lokalizaci signalizace a usnadňují posttranslační modifikace receptorů, což vede k aktivaci ER signalizace v buňkách. E a F doména jsou umístěny v C-koncové oblasti a obsahují doménu vážící ligand (LBD). Součástí LBD je ligandově závislá aktivační funkce-2 (AF-2), která prochází výraznými konformačními změnami v přítomnosti různých ligandů a určuje následnou vazbu koaktivátorů nebo korepresorů (Begam, 2017).



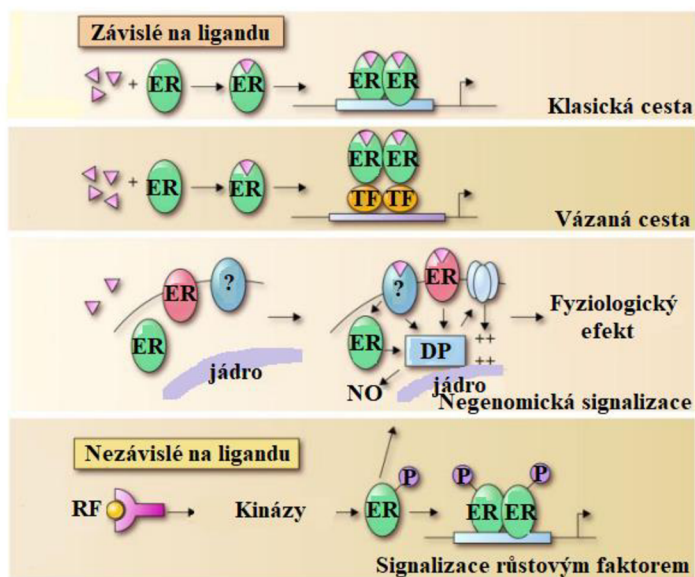
Obr. 4. Organizace strukturních domén ER $\alpha$  a ER $\beta$  (převzato a upraveno z Begam, 2017). Procenta udávají homologii mezi ER $\alpha$  a ER $\beta$ .

### 2.2.3 Signalizace estrogenových receptorů

Estrogeny jsou nezbytnými faktory pro zahájení procesu morfogeneze, a především vývoje orgánů. ER zprostředkovávají komunikaci mezi epitelem a mezenchymem, bez níž by nemohla nastat morfogeneze (Begam, 2017).

Signalizace může být na ligandu závislá (dependentní) nebo nezávislá (independentní) (Obr. 5). Ligand dependentní estrogení signalizace začíná vazbou estrogenu na ER v jádře, kde indukuje konformační změnu v receptorech, což vede k disociaci z chaperonů, dimerizaci a aktivaci transkripčních domén receptoru (Capper, 2016). Klasická cesta zahrnuje aktivaci ligandu a přímou vazbu DNA na specifické sekvence zvané EREs (estrogen response elements) ještě před modulací genové regulace. Vázaná cesta zahrnuje protein-protein interakce s dalšími transkripčními faktory po aktivaci ligandu, čímž dochází k ovlivnění genové regulace nepřímou vazbou na DNA. Při negenomické signalizaci ligand aktivuje receptor. Signalizační kaskády jsou iniciovány prostřednictvím druhých posílů, kteří ovlivňují iontové kanály nebo zvyšují hladinu oxidu dusnatého v cytoplasmě, což vede k rychlé fyziologické odpovědi bez zapojení genové regulace. Cesta nezávislá na ligandu zahrnuje aktivaci prostřednictvím jiných signálních drah (např. signalizace růstovým faktorem). Aktivované kinázy fosforylují ER a tím je aktivují k dimerizaci, vazbě na DNA a genové regulaci (Heldring, 2007).



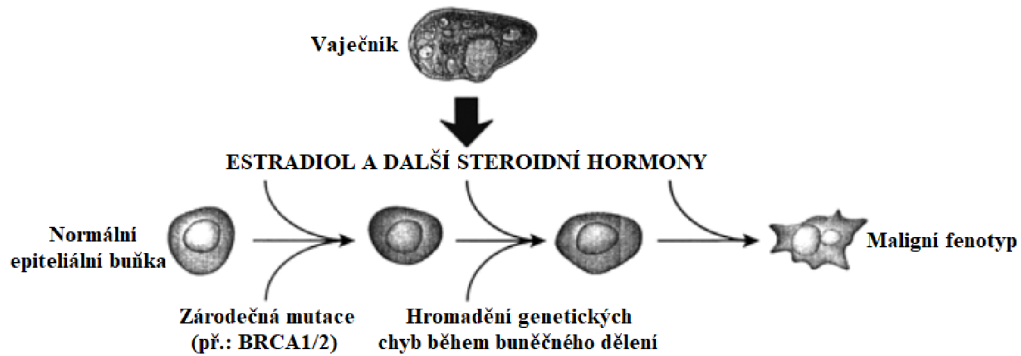


Obr. 5. Model představující mechanicky odlišné molekulární dráhy používané v regulaci ER (převzato a upraveno z Heldring, 2007).

△ ligand, TF = transkripční faktor, DP = druhý posel, RF = růstový faktor.

#### 2.2.4 Nádory s exprimovanými/neexprimovanými estrogenovými receptory

Celoživotní expozice jak endogenním, tak exogenním estrogenům je hlavním faktorem, který se podílí na rozvoji rakoviny prsu. Estrogeny modulují tento proces buď mechanismy závislými nebo nezávislými na receptorech (Santen, 2009). Mechanismy závislé na receptorech jsou založeny na vazbě estradiolu na ER $\alpha$ , čímž je stimulována buněčná proliferace a je iniciován vznik mutací v důsledku replikačních chyb DNA. Mutace se v průběhu času hromadí a vyvolávají neoplastickou transformaci (Obr. 6). Mechanismy nezávislé na receptorech jsou založeny na přeměně estradiolu na genotoxické metabolity, které se mohou vázat na DNA a vést k nárůstu mutací a podílet se tak na rozvoji rakoviny prsu (Yue, 2013).



Obr. 6. Vliv estradiolu a dalších steroidních hormonů na buněčnou proliferaci a vznik mutací, které vedou k malignímu fenotypu (staženo 3. 4. 2022 z [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/09\\_hormonalni.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/09_hormonalni.html)).

Většina karcinomů prsu (70 – 75 %) exprimuje ER a PR a na základě molekulární klasifikace tyto nádory odpovídají luminálnímu typu. Luminální karcinomy exprimují především ER $\alpha$  a dělí se na luminální A a B na základě toho, zda mají nízkou nebo vysokou míru proliferace. Luminální tumory mají lepší prognózu než ostatní druhy karcinomů prsu a dobře reagují na léčbu endokrinní terapií, která je zaměřena na blokování ER. Skupina nádoru, které neexprimují ER, je tvořena podskupinou nadměrně exprimující HER2 nebo tripl negativními nádory (neexprimují ER, PR ani HER2), které mají špatnou prognózu a nemají cílenou terapii (Lamb, 2019).

### 2.3 Proteiny, jejich struktura a funkce

Proteiny (bílkoviny) jsou nejhojnějšími biologickými makromolekulami, které jsou přítomny ve všech buňkách. V případě poruch struktury proteinů dochází ke vzniku molekulárních chorob provázených změnou v metabolických funkcích (Vasudevan, 2016).

Základní stavební jednotkou proteinů jsou aminokyseliny tvořící významnou skupinu biomolekul nezbytných pro život. Geneticky je kódováno celkem 23 aminokyselin, které jsou označovány jako proteinogenní, a které se nacházejí pravidelně ve všech proteinech. Některé aminokyseliny vznikají až po jejich zabudování do proteinu posttranslačně. Jednotlivé aminokyseliny jsou spojeny pomocí specifického typu kovalentní vazby – peptidické vazby, která se vytváří mezi karboxylovou skupinou jedné aminokyseliny a aminoskupinou druhé. Proteiny se dle počtu aminokyselin dělí na oligopeptidy (obsahují 2 – 10 aminokyselin), polypeptidy (obsahují 11 – 100 aminokyselin) a vlastní bílkoviny (tvořeny více než 100 aminokyselinami) (Koolman, 2012).

Proteiny plní v organismu mnoho funkcí, např. katalytické (enzymy), strukturní (kolagen, elastin), kontraktilní (aktin, myosin), transportní (albumin, hemoglobin), regulační (inzulin), genetické (histony), zásobní a obranné (Koolman, 2012).

## 2.4 Proteomika

Složité biologické děje zahrnují souhru genů, transkriptů, proteinů, metabolitů a lipidů. Vývoj omických metod (genomika, proteomika, transkriptomika, metabolomika a lipidomika) je mimo jiné důležitý pro pochopení komplexních onemocnění (rakovina a neurodegenerativní choroby) a tyto metody slouží k identifikaci četných genetických, epigenetických a enviromentálních faktorů, které se těchto onemocnění účastní (Monti, 2019).

Proteomika je vědní obor zabývající se systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí. Soubor všech proteinů v buňce, který je charakterizován s ohledem na jejich lokalizace, interakce a posttranslační modifikace v daném okamžiku je označován jako proteom, který je na rozdíl od genomu velmi dynamický kvůli komplexním regulačním systémům, které řídí hladiny exprese proteinů. Proteomika je jedním z nejdynamičtějších oborů v přírodních vědách, a to díky rozvoji molekulární biologie, genomiky, bioinformatiky a spektroskopických a separačních metod, které vedly ke zdokonalení analýzy nukleových kyselin a separace a charakterizace bílkovin (Chmelík, 2005; Aslam, 2017).

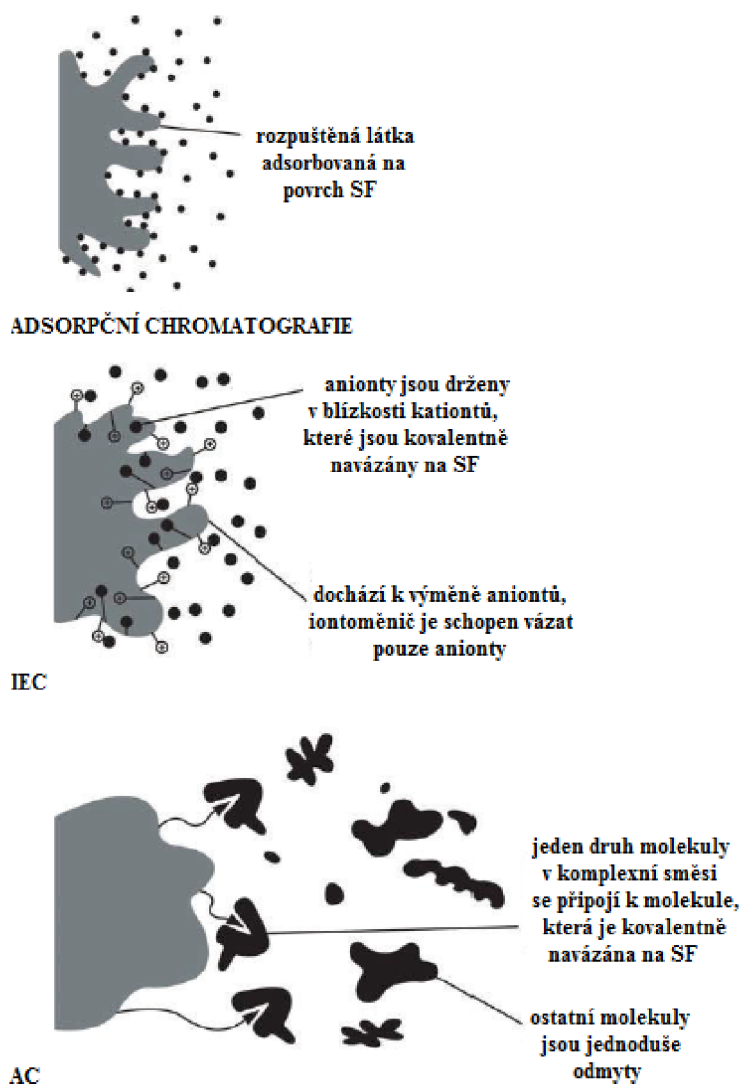
Hlavním cílem proteomiky je popis a vysvětlení role bílkovin v procesech probíhajících v organismech, což zahrnuje identifikaci bílkovin současně se stanovením molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin a posttranslačních modifikací, dále interakce bílkovin s dalšími látkami, kvalitativní a kvantitativní stanovení změn složení bílkovin při biologických procesech atd. Proteomika má důležité uplatnění v medicíně, kde slouží ke studiu příčin a mechanismů chorob, ve farmacii k vývoji léčiv, v potravinářství ke kontrole kvality a bezpečnosti potravin, v zemědělství ke zvyšování výnosů a také v průmyslu a ochraně životního prostředí (Chmelík, 2005).

Mezi konvenční proteomické techniky pro separaci proteinů patří chromatografické techniky jako jsou iontově výměnná chromatografie (IEC) a afinitní chromatografie (AC). Pro analýzu selektivních proteinů může být použita ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) nebo western blotting (Aslam, 2017; Hage, 2012).

## 2.5 Chromatografické techniky

Chromatografie je důležitá biofyzikální technika a obecný pojem aplikovaný na širokou škálu separačních technik založených na rozdělování nebo distribuci vzorku mezi mobilní (pohyblivou) fází (MF) a stacionární (pevnou) fází (SF). Proteiny mohou být separovány na základě jejich rozdílné velikosti a tvaru, celkového náboje a vazebné kapacity se SF. Kvůli těmto rozdílům zůstávají některé složky směsi déle ve SF, zatímco jiné procházejí rychle do MF a opouštějí systém rychleji. SF je složena z pevné fáze nebo kapalně adsorbované na pevný povrch, zatímco MF je vždy tvořena kapalinou nebo plynem (Ismail, 2010; Coskun, 2016).

Chromatografii lze dělit dle uspořádání na sloupcovou (kolonovou), kdy je SF umístěna v trubici a na planární (plošnou), kdy je SF umístěna na pevném a plochém podkladu např. na skle, hliníkové folii. Dle podmínek se dělí na izokratickou probíhající za konstantních podmínek a gradientovou, u které se podmínky mění např. teplota, pH, složení MF. Dle druhu interakce analytu a sorbentu se chromatografie dělí na adsorpční, kde o separaci rozhoduje různá schopnost složek adsorbovat na povrch SF, permeační chromatografii založenou na separaci dle velikosti molekul, IEC, kde o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami SF a ionty vzorku a AC, kde je SF schopna vázat určité složky směsi, ke kterým má selektivní vztah (afinitu) (Obr. 7) (Coskun, 2016).

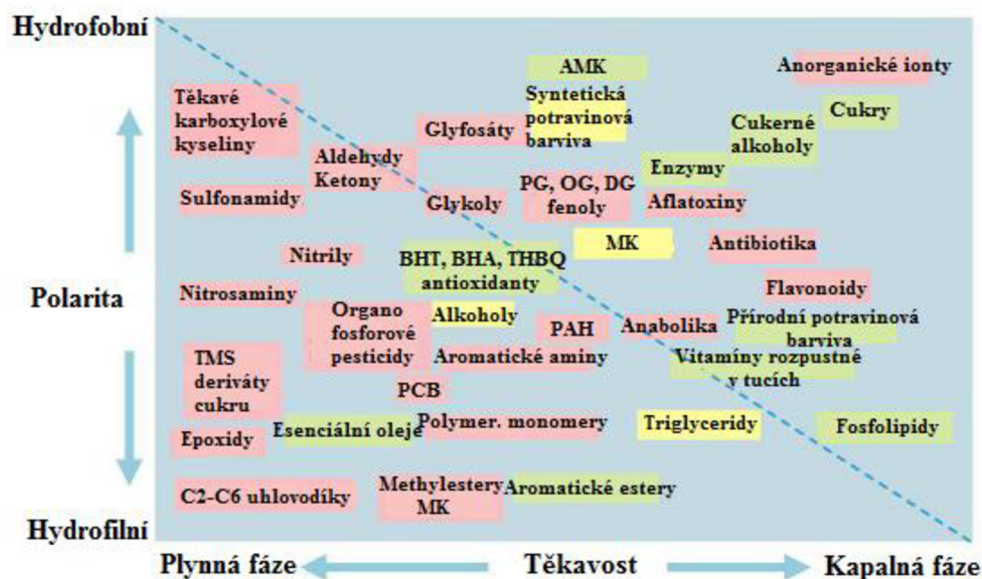


Obr. 7. Schéma principu adsorpční chromatografie, IEC a AC (převzato a upraveno z Ismail, 2010)

Chromatografie má velký vliv na všechny oblasti analýzy a rozvoj vědy. Moderní chromatografické techniky, včetně automatizovaných systémů, jsou široce používané při charakterizaci a kontrole kvality potravinářských surovin a výrobků (Ismail, 2010).

## 2.6 Afinitní chromatografie

Většina přirozeně se vyskytujících vzorků je tvořena složitou směsí látek, což vedlo k rozvoji separačních technik jako je kapalinová chromatografie. Jedním z typů kapalinové chromatografie je metoda AC, která je vynikající díky vysoké selektivitě. AC, též nazývaná afinitní purifikace, je separační technika pro izolaci specifických molekul nebo skupin molekul z komplexní směsi (Obr. 8). AC využívá specifické vazebné reverzibilní interakce mezi molekulami (Hage, 2015).



Obr. 8. Příklady molekul, které lze separovat pomocí AC (převzato a upraveno z Magdeldin, 2012)

### 2.6.1 Historie afinitní chromatografie

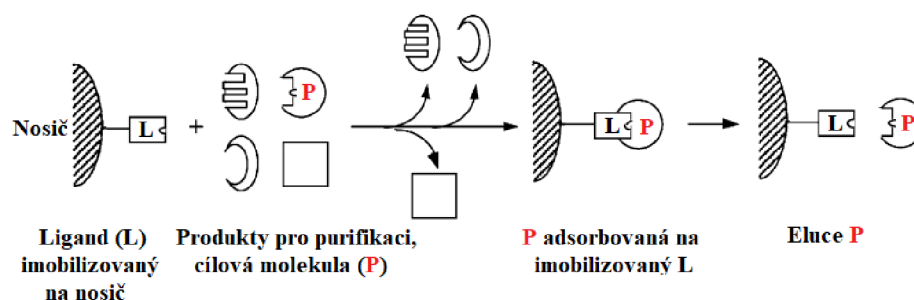
První hlášené zmínky o použití AC sahají do počátků 20. století. Roku 1910 studoval Emil Starkenstein vazbu enzymu  $\alpha$ -amylázy na kolonu, která obsahovala nerozpustný škrob. Starkensteinem použitá metoda byla založena na přirozené interakci, ke které dochází mezi enzymem  $\alpha$ -amylázou a jejím substrátem škrobem (Hage, 2015).

Ve 20 – 40 letech 20. století byla AC rozšířena k použití pro purifikaci protilátek a jako nosiče byly použity dřevěné uhlí a kaolin. V roce 1960 došlo k pokroku a jako nosič se začala používat agaróza, která měla větší mechanickou stabilitu než nosiče na bázi celulózy používané v kapalinové chromatografii. Dalším pokrokem byl vývoj bromkvanové imobilizační metody, která snadno umožňovala připojení peptidů a proteinů na bromkvanem aktivovanou agarózu. Díky těmto pokrokům se AC stala běžně používanou separační technikou v biochemii a chemii za posledních 50 let (Rodriguez, 2020).

### 2.6.2 Princip afinitní chromatografie

Afinitní purifikace zahrnuje tři hlavní kroky. V prvním kroku je vzorek, který obsahuje požadovanou cílovou molekulu, aplikován na kolonu v přítomnosti MF (též nazývaná jako aplikační pufr), která musí mít správné složení a pH, aby umožnila vazbu molekuly na afinitní ligand, jehož pomocí lze izolovat cílovou molekulu z afinitní kolony (Hage, 2015). Druhý krok zahrnuje odmytí nenavázaných složek z pevného nosiče. Třetím krokem je eluce

zadržené cílové molekuly z imobilizovaného ligandu, tak že jsou změněny podmínky pufru a tím je ukončena vazebná interakce (Obr. 9) (Anusha, 2018).



Obr. 9. Reakce mezi ligandem a cílovou molekulou (převzato a upraveno z Denizli, 2001)

K uvolnění navázané molekuly z afinitní kolony je možné použít izokratickou eluci v případě, že se cílová molekula váže na kolonu středně silně. Aplikační pufr se používá jak k nanesení vzorku, tak později i k eluci cílové molekuly. Mnohem běžnější metodou pro uvolnění cílové molekuly z kolony je použití krokové eluce nebo gradientu. Tento přístup používá druhou MF (zvanou též eluční pufr), která ukončí vazebnou interakci mezi ligandem a cílovou molekulou, a ta je poté uvolněna z kolony (Hage, 2015).

### 2.6.3 Nosné materiály v afinitní chromatografii

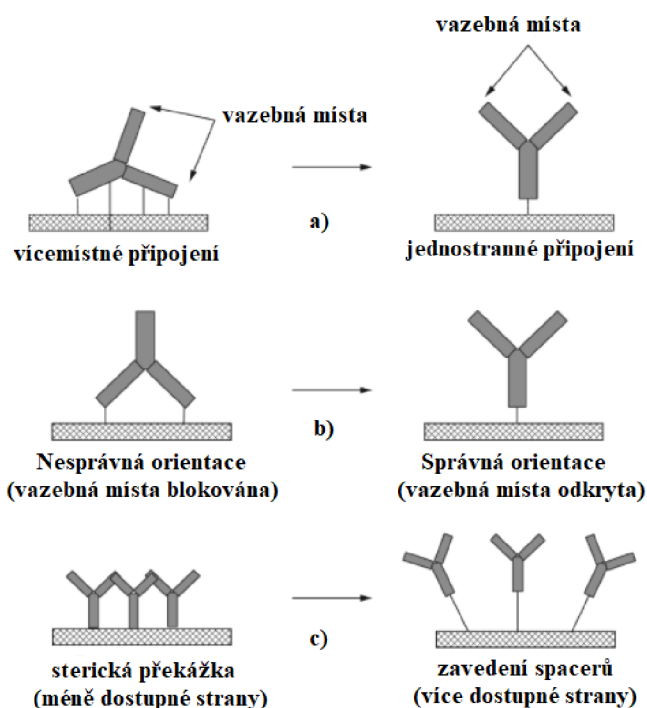
Nosné materiály pro AC jsou tvořeny porézním materiálem agarózou, polymethakrylátem, polyakrylamidem, celulórou nebo oxidem křemičitým, které jsou komerčně dostupné. Dnes existují kromě těchto porézních materiálů další typy podpůrných materiálů jako jsou neporézní nosiče, membrány a monolitické nosiče. Neporézní materiály se skládají z neporézních kuliček o průměru 1 – 3  $\mu\text{m}$  a umožňují rychlou separaci, stejně jako membrány (Magdeldin, 2012).

Při výběru nosných materiálů musí být zváženo několik faktorů, mezi které patří chemická inertnost, chemická i mechanická stabilita, velikost pórů a částic. Chemická inertnost vyžaduje, aby se afinitní nosič vázal jen na určité molekuly. Nosný materiál musí být chemicky stabilní, tedy odolný vůči degradaci všemi enzymy a elučními pufrů, které budou v koloně použity. Kromě chemické stability je důležitá i stabilita mechanická, jelikož nosné materiály musí být schopny odolávat změně tlaků. Z hlediska velikosti částic jsou ideální malé částice, protože mají větší povrchovou plochu, takže umožňují imobilizaci většího počtu afinitních ligandů na povrch nosiče. Důležitá je také velikost pórů, na jejímž základě je umožněn průchod sledovaných biomolekul. Když jsou póry moc velké, tak se

zmenšuje povrch a tím je omezeno množství ligandů, které může být imobilizováno na nosiči (Magdeldin, 2012).

#### 2.6.4 Imobilizační techniky v afinitní chromatografii

Správný výběr imobilizační techniky je klíčovým faktorem při přípravě afinitní kolony, jelikož může mít hluboký dopad na konečnou aktivitu afinitního ligandu. Pokud není metoda použita správně, může dojít k několika nežádoucím efektům, mezi které se řadí vícemístné připojení ligandu k nosiči, nesprávná orientace ligandu a sterické překážky (Obr. 10). Dalšími faktory ovlivňující imobilizaci jsou volba nosiče, specifita, stabilita a rychlost imobilizační metody a reprodukovatelnost (Seung Kim, 2006).



Obr. 10. Nežádoucí efekty vznikající při nesprávném použití imobilizační techniky (převzato a upraveno ze Seung Kim, 2006).

a) Vícemístné připojení ligandu k nosiči, b) náhodná nebo nesprávná orientace ligandu, c) sterická překážka

Nejčastěji používaným prostředkem připojení ligandu k nosiči je kovalentní imobilizace, která vyžaduje nejdříve aktivaci ligandu a/nebo nosiče. Příkladem jsou bromkyanová metoda nebo redukční aminace. Afinitní ligandy mohou být také umístěny na nosič nekovalentní imobilizací, která je založena na fyzikální adsorpci pojiva na povrch prostřednictvím elektrostatických nebo hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb.



Výhodou nekovalentní imobilizace je jednoduchost a nevýhodou je omezená stabilita pro afinitní nosič. Formou nekovalentní imobilizace je biospecifická adsorpce, která využívá sekundárního ligandu, který je připojen k nosiči a slouží k imobilizaci primárního ligandu. Nejčastějšími sekundárními ligandy jsou avidin, streptavidin a proteiny A a G (Seung Kim, 2006).

### **2.6.5 Afinitní ligandy**

Ligand je molekula, která se reverzibilně váže na konkrétní cílovou molekulu nebo skupinu molekul. Výběr ligandu pro AC ovlivňují dva faktory. Ligand musí vykazovat specifickou a reverzibilní vazebnou afinitu pro cílové látky a musí mít chemicky modifikované skupiny, které umožní jeho připojení k nosiči, aniž by byla narušena vazebná aktivita. Ligandy se dělí na biologické a syntetické.

Biologické ligandy se začaly používat v roce 1910 a zahrnují protilátky (imunoglobuliny) a antigeny, proteiny vázící imunoglobuliny, biotin s avidinem nebo streptavidinem, enzymy, sérové proteiny, lipidy a nukleové kyseliny (Rodriguez, 2020).

Nejběžněji využívanou formou AC je imunoafinitní chromatografie (IAC), která pro separaci využívá protilátky, na které se mohou navázat cílové molekuly. Protilátky jsou výhodnými ligandy z hlediska jejich vysoké specifity a poměrně velkých vazebných konstant (Arora, 2017). Proteiny vázící imunoglobuliny jsou používány k zachycení a purifikaci protilátek nebo k měření koncentrace protilátek ve vzorcích. Některé formy AC jsou založeny na interakci ligandu biotinu (vitamín B7/H) s proteiny avidinem a streptavidinem, které vykazují silnou afinitu k biotinu (Hage, 2006). Dále je AC důležitou technikou pro separaci a izolaci enzymů, jejichž výhodou je schopnost vázat substrát s vysokou afinitou a selektivitou, schopnost katalyticky přeměnit svůj substrát na produkt účinným způsobem a jejich dobrá stabilita a možnost opětovného použití (Zhang, 2017).

V AC je jako afinitních ligandů využíváno také sérových proteinů. Dvěma příklady jsou transportní proteiny BSA (bovine serum albumine) a HSA (human serum albumine), které jsou nejhojnějšími proteiny hovězí a lidské plazmy, a které mají slabé až velmi silné interakce s řadou léčiv, hormonů a mastných kyselin (Patel, 2006). Jako ligandy mohou sloužit i lipidy, které jsou používány v chromatografii s imobilizovanou umělou membránou (IAM – immobilized artificial membrane) (Rodriguez, 2020). DNA afinitní chromatografie je technika pro purifikaci proteinů vázících se na DNA. Nespecifická AC využívá kolony k oddělení proteinů vázících se na DNA od proteinů, které se na DNA neváží. U specifické

AC se jako ligand používá určitý úsek DNA, který obsahuje sekvenci, strukturu nebo restriční místo k zachycení proteinu, který bude s tímto segmentem DNA interagovat (Moxley, 2006).

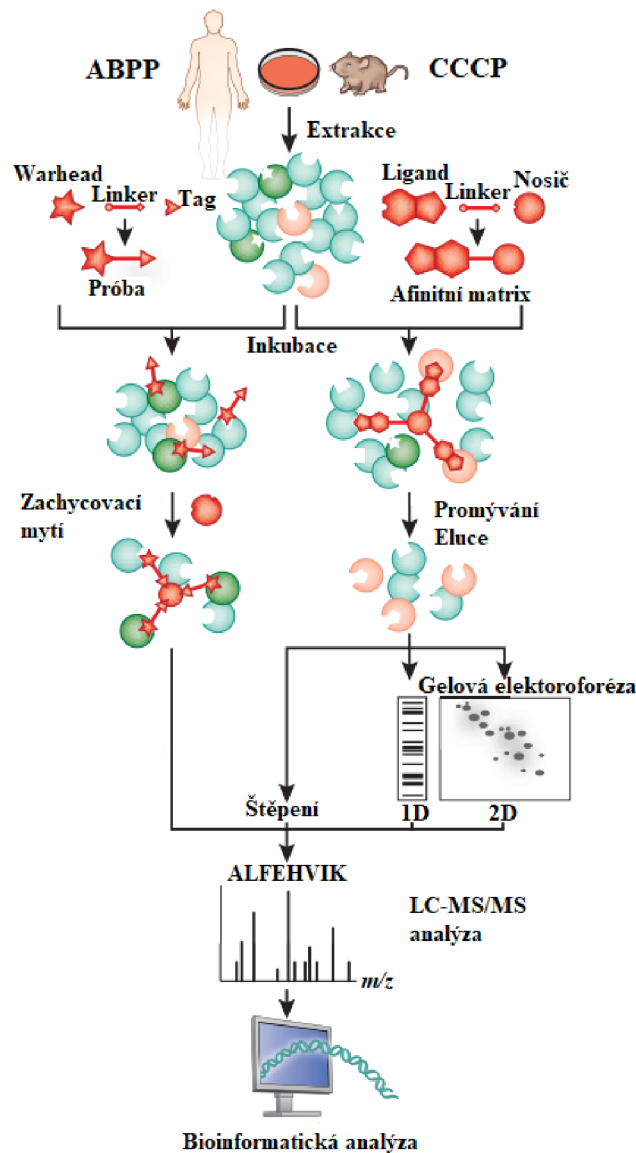
Začátky používání syntetických látek v AC sahají do počátku 70. let 20. století, kdy Staal a kol. použili barviva Blue Dextran jako vazebného činidla k izolaci pyruvátkinázy. Barviva jako ligandy mají řadu výhod, mezi které patří nízká cena, jednoduchost imobilizace na nosičích a jejich stabilita. Nejčastěji používanými jsou triazinová barviva a příbuzné sloučeniny, které obsahují chromofor (Denizli, 2001). Dalšími nebiologickými ligandy jsou aptamery, což jsou syntetické oligonukleotidové sekvence založené na DNA nebo RNA. Lze je použít jako alternativy k protilátkám díky jejich specifčnosti, nízké imunogenicitě a schopnosti produkce dle potřeby (Jayasena, 1999). Důležitým příkladem nebiologického vazebného činidla jsou také cheláty kovových iontů. Kovové ionty jako měďné, stříbrné a rtuťnaté váží cíle obsahující síru, zatímco nikelnaté, měďnaté a zinečnaté váží cíle obsahující dusík, síru nebo kyslík (Salha, 2021).

#### **2.6.6 Cílové profilování malých molekul pomocí chemické proteomiky**

Chemická proteomika je postgenomickou verzí klasické lékové AC, která je spojena s následnými hmotnostními a bioinformatickými analýzami. Existují dvě varianty chemické proteomiky: Activity-based probe profiling (ABPP), které se zaměřuje na enzymatickou aktivitu určité proteinové rodiny a compound-centric chemical proteomics (CCCP), která se zaměřuje na charakterizaci molekulárních mechanismů účinku individuálních bioaktivních malých molekul (Obr.11) (Rix, 2009).

Typický proteomický chemický experiment CCCP začíná imobilizací bioaktivní látky (ligand) na nosič, kterým bývá sepharóza nebo agaróza. Následně je připraven buněčný extrakt, buďto z buněk nebo z tkáně. Výhodou chemické proteomiky je, že lze použít jakýkoliv typ buněk/tkání, případně druhů (člověk, rostliny, zvířata, mikroorganismy), což umožňuje zkoumání mechanismu účinku látek souvisejících s onemocněními (př. použití nádorové tkáně). Získaný lyzát je následně inkubován s afinitním matricí, dochází k vyhledávání vazebných partnerů vybraného aktivního ligandu. Metoda zahrnuje důkladné promývání před samotnou elucí. Eluáty obsahující proteiny jsou štěpeny pomocí proteáz, typicky trypsinem, díky čemuž se vytváří komplexní směs peptidů, která je následně analyzována pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

(LC-MS/MS) a vyhodnocena bioinformatickými metodami. CCCP nabízí vyhledávání nových terapeutických cílů a je důležitým modelem pro studium onemocnění (Rix, 2009).



Obr. 11. Porovnání metod ABPP a CCCP (převzato a upraveno z Rix, 2009).

### 2.6.7 Aplikace afinitní chromatografie

Díky své selektivitě, specifitě, jednoduchosti obsluhy, výtěžnosti a propustnosti je AC užitečná při práci s biomolekulami (enzymy, rekombinantní proteiny, protilátky), farmaceutiky a dalšími látkami. Slouží k separaci aktivních biomolekul od denaturovaných nebo funkčně odlišných forem, k izolaci čistých proteinů a odstranění kontaminant. Umožňuje identifikaci a charakterizaci intramolekulárních interakcí. Kromě toho má

schopnost odstraňovat patogeny, což je nezbytné při použití biomolekul v klinických aplikacích (Rodriguez, 2020).

V důsledku mnoha současných aplikací této metody se očekává, že se AC bude v budoucnu dále rozvíjet jako zásadní nástroj v oblastech sahajících od produkce farmaceutik po klinickou analýzu, dále jako nástroj pro farmaceutického testování a výzkumu biomedicíny (Hage, 2015).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Chemikálie a materiál

Použitá buněčná kultura MCF-7 byla poskytnuta Mgr. Lucíí Rárovou, Ph.D.

K přípravě extrakčního pufru byly použity: kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES; Sigma-Aldrich, Německo), chlorid hořečnatý ( $MgCl_2$ ; Fluka, Německo), chlorid vápenatý ( $CaCl_2$ ; Sigma-Aldrich, Německo), chlorid sodný ( $NaCl$ ; Sigma-Aldrich, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal CA 630 (Sigma-Aldrich, Německo), fenylmethansulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich, Německo), vanadičnan sodný ( $Na_3VO_4$ ; Sigma-Aldrich, Německo), fluorid sodný ( $NaF$ ; Fluka, Německo), Roche inhibitor cocktail cOmplete EDTA free (Sigma-Aldrich, Německo), led, tekutý dusík, deionizovaná voda, ultracentrifugační zkumavky (Beckman Coulter, USA), stříkačky (B Braun, Německo), jehly (B Braun, Německo), mikrozukavky (Eppendorf, Německo). Na úpravu pH byl použit hydroxid sodný ( $NaOH$ ; Sigma-Aldrich, Německo).

Pro stanovení koncentrace lyzátu byl použit: 2-D Quant Kit (Cytiva, USA).

Pro afinitní chromatografii byly použity: kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES; Sigma-Aldrich, Německo), chlorid hořečnatý ( $MgCl_2$ ; Fluka, Německo), chlorid vápenatý ( $CaCl_2$ ; Sigma-Aldrich, Německo), chlorid sodný ( $NaCl$ ; Sigma-Aldrich, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal CA 630 (Sigma-Aldrich, Německo), fenylmethansulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich, Německo), vanadičnan sodný ( $Na_3VO_4$ ; Sigma-Aldrich, Německo), fluorid sodný ( $NaF$ ; Fluka, Německo), Roche inhibitor cocktail cOmplete EDTA free (Sigma-Aldrich, Německo), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA; Sigma-Aldrich, Německo), deionizovaná voda, ethanol (EtOH, Sigma-Aldrich, Německo), hydroxid sodný ( $NaOH$ ; Sigma-Aldrich, Německo), bikarbonát triethylamonný (TEAB; Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (FA; Sigma-Aldrich, Německo), tekutý dusík, afinitní kolony (BioRad, USA), mikrozukavky (Eppendorf, Německo). Použité afinitní gely MK-613 (neaktivní ligand) a MK-617 (aktivní ligand) byly poskytnuty Mgr. Janou Oklešťkovou, Ph.D. a RNDr. Miroslavem Kvasnicou, Ph.D.

Pro štěpení vzorků z gelu byly použity: dithiothreitol (Fluka, Německo), jodoacetamid (Sigma-Aldrich, Německo), trypsin (Promega, USA), mikrozkušavky (Eppendorf, Německo).

Při frakcionaci eluátů byly použity: kyselina trifluoroctová (TFA; Merck, USA), isopropanol (iPrOH; Sigma-Aldrich, Německo), acetonitril (ACN; Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (FA; Sigma-Aldrich, Německo), pipetovací špičky (velikost 20-200  $\mu$ l; Eppendorf, Německo), extrakční disk C18 Empore (3M Center, USA), mikrozkušavky (1,5 ml; Eppendorf, Německo).

Pro analýzu vzorků pomocí LC-MS/MS byly použity: kyselina mravenčí (FA; Sigma-Aldrich, Německo), acetonitril (ACN; Sigma-Aldrich, Německo), analytické kapilární kolony (50  $\mu$ m  $\times$  20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reposil GOLD C18, 3  $\mu$ m, MaischGmbH, Německo).

### **3.2 Použité přístroje**

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko),  
třepačka Vortex 4 basic (IKA, Německo),  
pH metr pH 50 (XS instruments, Itálie),  
pipety (Eppendorf, Německo),  
špičky (Eppendorf, Německo),  
magnetická míchačka MS-3000 (Biosan, USA),  
pH testovací proužky 0,0 – 6,0 (Sigma-Aldrich, Německo),  
pH testovací proužky 0,0 – 14,0 (Sigma-Aldrich, Německo),  
rotační míchačka multi-rotar PRS-22 (Biosan, USA),  
centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo),  
centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Německo),  
centrifuga IEC CL31R Multispeed (Thermo, USA),  
ThermoMixer comfort (Eppendorf, Německo),  
koncentrátor plus (Eppendorf, Německo),  
spektrofotometr WPA Lightwave II. (Biochrom, USA)  
systém nanokapilární chromatografie (nLC) (RSLCnano3000, Dionex, Thermo, USA) s  
tandemovou hmotností detekcí Q-TOF vybavenou ionizací elektrosprejem (ESI) (UHR-Q-  
TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo)

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Nativní extrakce proteinů z buněčné linie MCF-7

Nádorové buňky z linie MCF-7 byly rozsuspendovány v 550  $\mu$ l lyzačního pufru (LB – složení viz. Tabulka 1; 1,1 ml LB na  $60 \cdot 10^6$  buněk) a ponechány na ledu. Směs byla 15x promíchána injekční stříkačkou za účelem narušení buněčných membrán a 30 minut inkubována na ledu v chladové místnosti. Lyzáty byly přeneseny do čistých mikrokumavek a následně 10 minut centrifugovány při 4 °C na 15 000 x g. Po centrifugaci byly supernatanty přeneseny do čistých mikrokumavek a 20 minut centrifugovány při 4 °C na 20 000 x g. Supernatanty byly přeneseny do čistých mikrokumavek a umístěny na led do chladové místnosti. Lyzáty byly rozděleny na alikvoty po 400  $\mu$ l, zamrazeny tekutým dusíkem a skladovány při -80 °C. Pro stanovení koncentrace lyzátu byl použit 2D-Quant kit.

*Tabulka 1.* Složení LB. Úprava pH LB na hodnotu 7,5 byla provedena přidavkem hydroxidu sodného. Inhibitory byly přidány těsně před použitím pufru.

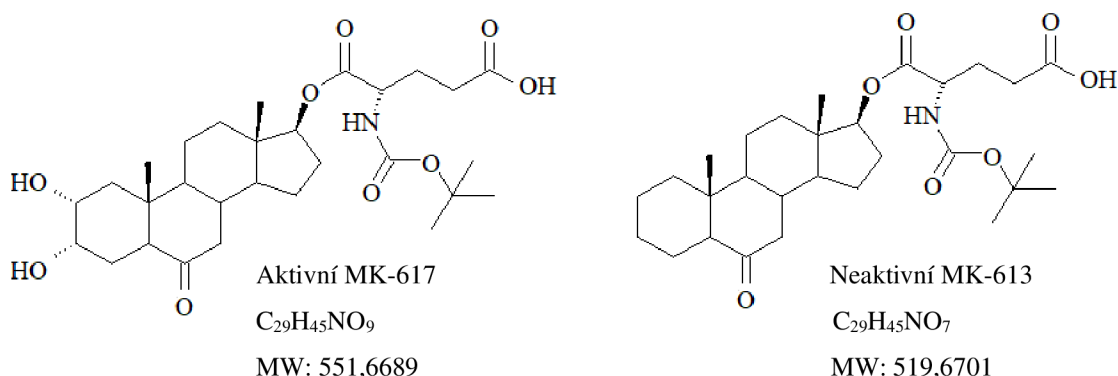
Složka	Koncentrace
HEPES	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
NaCl	100 mM
Glycerol	5%
Igepal	0,20%

Inhibitory	Koncentrace
NaF	25 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
PMSF	1 mM
Roche c.	200 l na 10 ml

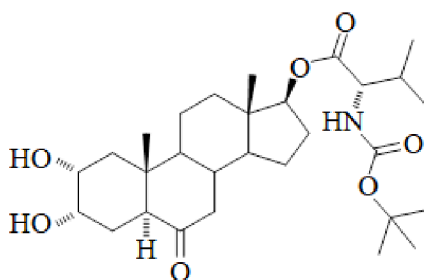
### 3.3.2 Purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie

Afinitní purifikace proteinového extraktu byla provedena ve třech opakováních za použití dvou typů imobilizovaných ligandů: MK-613 (neaktivní ligand) a MK-617 (aktivní ligand) (Obr.12).



Obr. 12. Struktury ligandů MK-617 [1-(2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -yl)-N-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-glutamát] a MK-613 [1-(6-oxo-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -yl)-N-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-glutamát].

Jako výchozí látka pro přípravu ligandů MK-613 a MK-617 byla zvolena MK-349 (Obr. 13) z toho důvodu, že se jedná o aktivní látku, která vykazuje účinek na nádorových liniích MCF-7, která ale neobsahuje linker pro navázání. MK-613 je výchozí látce strukturně podobná, ale je neaktivní, a proto byla pro experiment zvolena jako negativní kontrola.



Obr. 13. Struktura původní účinné látky bez linkeru pro navázání, MK-349 [(2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -yl)-N-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-valinát].

Do mikrozkušavek bylo napipetováno 70  $\mu$ l gelu ve 20% etanolu. Gely byly centrifugovány po dobu 2 minut při 800 rpm a poté ponechány 6 minut stát. Byl odpipetován supernatant a ke gelům byl přidán 1 ml promývacího pufru 1 (WB1; 25mM HEPES s 100mM chlorid sodný, pH 7,5). Gely byly 2 minuty třepány, poté centrifugovány po dobu 2 minut při 800 rpm a znovu ponechány 6 minut stát, a nakonec byl odpipetován WB1.



Promývání byly opakováno ještě 2x, ale namísto WB1 bylo použito 800  $\mu$ l LB (složení viz. Tabulka 1). Po odstranění LB byl na gely nanesen objem lyzátu odpovídající 300  $\mu$ g proteinů, který byl doplněn LB do 200  $\mu$ l. Vzorky byly inkubovány v chladové místnosti po dobu 2 hodin za stálého míchaní v rotační míchačce.

Biorad kolony byly těsně před nanesením vzorků 2x promyty 1 ml WB1, čímž byly aktivovány. Vzorky byly z mikrozkušavek přeneseny na kolony a mikrozkušavky byly vymyty 800  $\mu$ l LB. Na kolony bylo postupně napipetováno 800  $\mu$ l LB, 2x 1 ml WB1 a 2x 1 ml promývacího pufru 2 (WB2; 25mM HEPES, 100mM chlorid sodný a 0,5 $\mu$ M EDTA, pH 7,5). Špičky kolon byly před přenesením do mikrozkušavek omyty WB2. Mikrozkušavky s kolonami byly 0,5 minuty centrifugovány na 200 x g. Kolonky byly přeneseny do tlustostěnných vialek s předloženými 62,5  $\mu$ l 1M TEAB a proteiny z nosiče byly eluovány přídatkem 250  $\mu$ l 100mM kyseliny mravenčí. Eluáty byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

### **3.3.3 Štěpení v roztoku**

Ke směsi eluovaných proteinů bylo připipetováno 6  $\mu$ l redukčního činidla (500mM dithiothreitol) a vzorky byly inkubovány v Thermomixeru po dobu 60-ti minut při 56 °C a 500 rpm. Ke směsi bylo poté připipetováno 17,5  $\mu$ l alkylačního činidla (1M jodoacetamid v 0,1M TEAB) a vzorky byly inkubovány v Thermomixeru po dobu 30-ti minut při 25 °C a 500 rpm. Po inkubaci bylo zkontrolováno pH ( $\text{pH} \geq 8$ ) a k vzorku bylo přidáno 1,5  $\mu$ l roztoku trypsinu. Vzorky byly inkubovány přes noc v Thermomixeru při 37 °C. Štěpení bylo ukončeno přídatkem 12  $\mu$ l 30% kyseliny trifluoroctové, aby bylo  $\text{pH} \leq 5$ .

### **3.3.4 Čištění peptidů na SPE mikrokolonkách (tzv. Stage-tip)**

Nejprve byl objem vzorků odpařen na polovinu při 60 °C. Stage-tipy byly vytvořeny z pipetovacích špiček (velikost 20 – 200  $\mu$ l) a na ně kovovou hamiltonkou (vnitřní průměr 1 mm) nanesených dvou disků sorbentu C18. Připravené kolony byly vsunuty do otvoru ve víčku 1,5 ml mikrozkušavky a byly vloženy do centrifugy. Sorbenty byly aktivovány přídatkem 2x 60  $\mu$ l isopropanolu (Tabulka 2). Poté byly mikrokolony ekvilibrovány 2x 60  $\mu$ l 85% acetonitrilu a 2x 60  $\mu$ l 5% k. mravenčí. Takto aktivované kolony byly přeneseny do předem označených čistých mikrozkušavek (tzv. Load) a byly na ně naneseny vzorky obsahující naštěpené peptidy, které byly promyty 2x 60  $\mu$ l 5% kyseliny mravenčí. Následně

byla provedena 6-ti kroková eluce vzorků přidavkem 8%, 12%, 16%, 20%, 24% a 48% acetonitrilu do příslušných vialek a roztoky byly odpařeny.

Tabulka 2. Postup čištění peptidů na SPE mikrokolonkách.

<b>Aktivace a ekvilibrace C18 kolony</b>				
Krok	Roztok	Objem (μl)	Tíhové zrychlení (x g)	Čas (min)
1	iPrOH	2x60	4000	5
2	85% ACN	2x60	2500	5
3	5% FA	2x60	3000	5
<b>Nanesení a promytí vzorku</b>				
Krok	Roztok	Objem (μl)	Tíhové zrychlení (x g)	Čas (min)
1	5% FA	2x60	2500	5
<b>Eluce vzorku</b>				
Krok	Roztok	Objem (μl)		
1	8% ACN	60		
2	12% ACN	60		
3	16% ACN	60		
4	20% ACN	60		
5	24% ACN	60		
6	48% ACN	60		

### 3.3.5 LC-MS/MS analýza a zpracování dat

Vzorky byly analyzovány pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF s ionizací elektrosprejem (ESI) pod dohledem Mgr. Reného Lenobela, Ph.D. Z každé frakce byly provedeny celkem 3 nástřiky vzorku o objemu 5 μl. Gradientem eluované peptidy (Tabulka 3) z analytické kapilární kolony naplněné reverzní fází C18 byly ionizovány pomocí elektrospreje a analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií metodou data-dependent analysis s kolizí indukovanou fragmentací iontů v kolizní cele.

Získaná data byla zpracována programem MaxQuant software v.1.6.10.43 (Tyanova, 2016) zahrnující prohledávací algoritmus Andromeda (Cox, 2011) s nastavením parametrů „Bruker TOF“ (Beck, 2015). Identifikace proteinů byla provedena proti referenční proteinové databázi pro *Homo sapiens* stažené z deponitáře proteinové databáze UniProt.

Tabulka 3. Gradientová eluce peptidů z C18 kolony. MF A: 0,1% kyselina mravenčí, MF B: 90 % acetonitril + H<sub>2</sub>O okyselená na 0,1 % kyselinou mravenčí.

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	95	5
13	95	5
53	75	25
60	65	35
62	45	55
64	15	85

### 3.3.6 Vyhodnocování dat z LC-MS/MS

Seznam identifikovaných proteinů byl vložen a editován pomocí MS Excel. Nejprve byly proteiny seřazeny podle počtu peptidů identifikovaných ve všech třech kontrolních pulldownech MK-613. Bylo vybráno 215 proteinů, které neměly žádné zastoupení v MK-613. Z tohoto nového seznamu byly dále vybrány pouze proteiny, které byly identifikovány na základě minimálně 3 razor a unique peptidů. Z těchto proteinů byly odstraněny ty, které nebyly zastoupeny ve všech třech pulldownech MK-617. Takto bylo z celkového počtu 1508 proteinů identifikovaných ve všech provedených pulldownech vybráno 34 (2,25 %), se kterými byla provedena další analýza.

Se seznamem těchto 34 proteinů byla provedena gene ontology (GO) analýza s využitím PANTHER Overrepresentation Testu typu FISHER (geneontology.org) a proteiny byly rozděleny do kategorií dle jejich zapojení v biologických procesech. Seznam proteinů byl také vložen do proteinové databáze UniProt (<https://www.uniprot.org>), kde byly získány obecné informace o funkcích proteinů v organismu. Pro více informací o funkcích byla provedena doplňující PANTHER GO-Slim analýza. Taktéž byla provedena analýza pomocí databáze STRING (<https://string-db.org/>) za účelem zjištění, zda dochází k interakcím mezi vybranými proteiny.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Extrakce proteinů z buněčné nádorové linie MCF-7

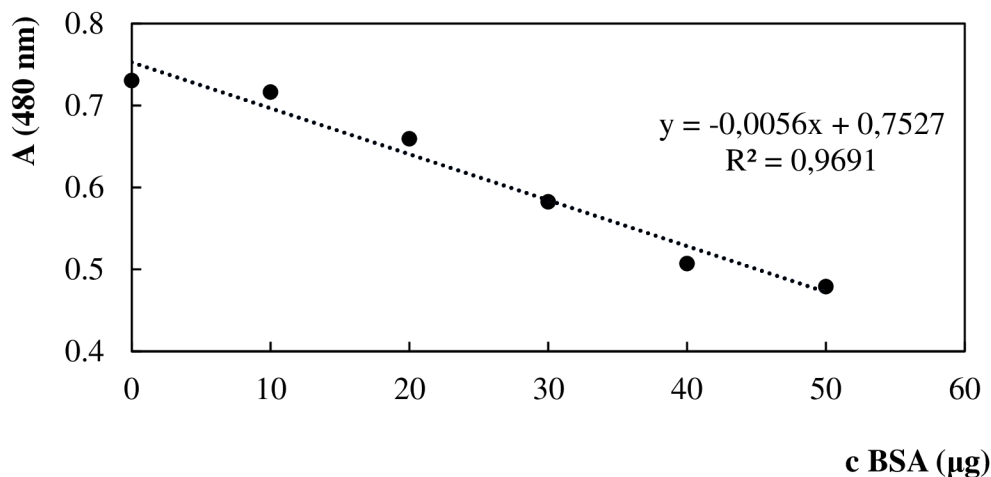
Prvním cílem diplomové práce byla nativní extrakce proteinů z buněčné nádorové linie MCF-7, k čemuž byl použit lyzační pufr. Jeho složení bylo uzpůsobeno tak, aby nedocházelo k narušení terciální struktury proteinů. Součástí pufru byly soli chloridu hořečnatého a vápenatého, jejichž kationty mají funkci kofaktorů, které stabilizují proteiny, dále igepal CA 630, neionogenní detergent, zvyšující rozpustnost proteinů a HEPES potřebný pro udržování požadovaného pH. K pufru byly přidány také inhibitory proteáz, aby nedocházelo k enzymatickému štěpení proteinů v extraktu.

### 4.2 Stanovení koncentrace buněčného lyzátu

Pomocí 2D-Quant kitu byla stanovena koncentrace proteinů v buněčném lyzátu. Byla připravena kalibrační řada roztoků BSA o známých koncentracích a poté byla změřena hodnota absorbance těchto roztoků a vzorku buněčného lyzátu při 480 nm (Tabulka 4). Byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci proteinů ve standardu BSA (Obr. 14).

Tabulka 4. Naměřené hodnoty absorbance standardu BSA a vzorku.

Koncentrace BSA ( $\mu\text{g}$ )	A	B	Průměr A + B
0	0,723	0,738	0,731
10	0,716	0,717	0,717
20	0,667	0,652	0,660
30	0,590	0,575	0,583
40	0,503	0,511	0,507
50	0,483	0,475	0,479
Vzorek	0,387	0,358	0,373



Obr. 14. Závislost absorbance na koncentraci proteinů ve standardu BSA při vlnové délce 480 nm.

Z rovnice regrese  $y = -0,0056x + 0,7527$  byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorku dosazením hodnoty absorbance za  $y$ . Z rovnice  $x = \frac{y-0,7527}{(-0,0056)}$  bylo vypočítáno, že ve 20 μl lyzátu bylo obsaženo 67,81 μg proteinů, což odpovídá 3,39 μg proteinů/μl.

#### 4.3 Afinitní purifikace proteinů

Druhým cílem práce byla afinitní purifikace proteinů. Použitý afinitní gel obsahoval nosič (preaktivovaná sepharóza) s navázaným ligandem (2 analogy steroidů): MK-613 (neaktivní), který sloužil jako negativní kontrola a MK-617 (aktivní). Výchozí látkou pro jejich syntézu byl MK-349.

MK-349 [(2α,3α-dihydroxy-6-oxo-5α-androstan-17β-yl)-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*L*-valinát] (též BR4848) je syntetický analog brassinosteroidů, který byl Rárovou a kol., 2018 použit na panelu nádorových buněčných linií pro charakterizaci jeho antiproliferativní aktivity. Screeningový panel rakovinných buněčných linií zahrnoval: T-lymfoblastickou leukémii CEM, epiteloidní karcinom děložního čípku HeLa, chronickou myeloidní leukémii K562, karcinom prostaty LNCaP, adenokarcinom prsu MDA-MB 468, mnohočetný myelom RPMI 8226 a mimo jiné i karcinom prsu MCF-7 (citlivý na estrogény), který byl použit pro extrakci proteinů v diplomové práci. U HeLa buněk BR4848 indukoval apoptózu prostřednictvím modulace antiapoptických proteinů a inhiboval buněčnou proliferaci a vykazoval účinek na nádorových liniích MCF-7, u kterých bylo studováno zapojení nádorových proteinů do steroidní signalizace.

#### 4.4 Čištění peptidů na SPE-mikrokolonách

Eluáty získané po AC byly frakcionovány za účelem zvýšení citlivosti analýzy na hmotnostním spektrometru. V rané fázi experimentu byla pro tyto účely vybrána C18 reverzní kolona, která byla nejprve aktivována isopropanolem, poté ekvilibrována 80% acetonitrilem a 5% kyselinou mravenčí, následovalo nanesení vzorků a použití gradientu acetonitrilu (8, 12, 16, 20, 24 a 48%). Při používání C18 kolony trvala eluce peptidů buďto velmi dlouho, nebo byla neúspěšná, docházelo totiž k ucpávání kolony, a tedy ke ztrátě vzorku. Vzhledem k charakteru (hustotě) vzorků byla nakonec použita metoda frakcionace na Stage-tip mikrokolonách, které se ukázaly jako vhodnější volba.

#### 4.5 Vyhodnocování dat z LC-MS/MS

Seznam identifikovaných proteinů byl vložen a editován pomocí MS Excel. Nejprve byly vybrány proteiny, které neměly žádné zastoupení v kontrolních puldownech MK-613, z nich byly odstraněny proteiny bez zastoupení ve všech třech puldownech MK-617 a nakonec byly vybrány proteiny, které byly identifikovány na základě minimálně 3 razor a unique peptidů. Z celkového množství 1508 proteinů ve všech realizovaných puldownech bylo vyselektováno 34 (2,25 %) (Tabulka 5).

*Tabulka 5.* Proteiny zachycené výhradně na afinitním gelu s ligandem MK-617. Proteiny jsou seřazeny dle počtu detekovaných razor/unique peptidů, což odpovídá míře jejich obohacení.

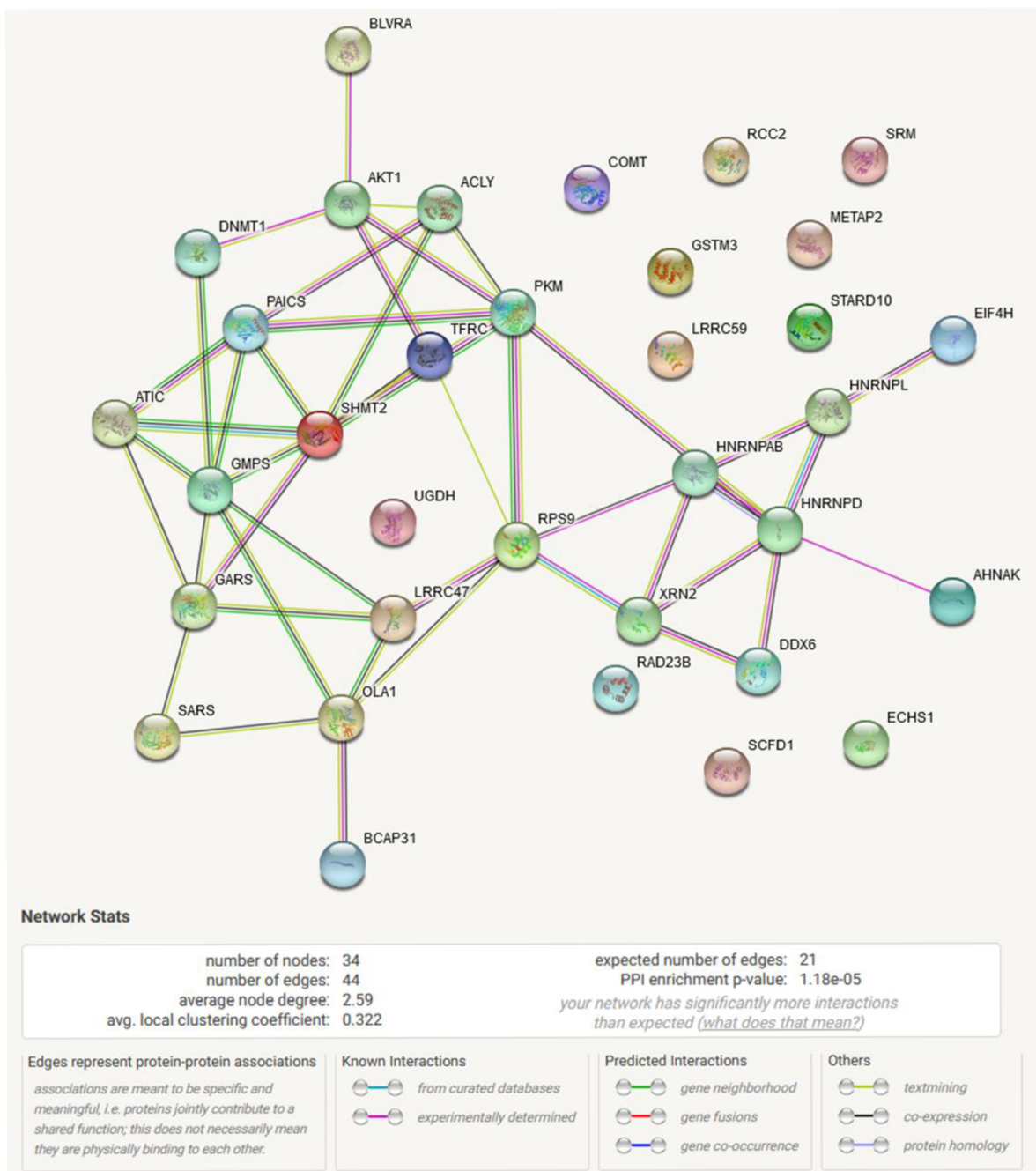
Název proteinu	Název genu	MW (kDa)
Pyruvate kinase	PKM	57,936
Transferrin receptor protein 1, serum form	TFRC	84,870
Catechol O-methyltransferase	COMT	30,037
UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	55,023
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6	54,416
Glycine--tRNA ligase	GARS	69,931
Glutathione S-transferase Mu 3	GSTM3	26,559
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	61,312
Sec1 family domain-containing protein 1	SCFD1	72,379
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1	179,160
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB	30,302

PCTP-like protein	STARD10	16,004
40S ribosomal protein S9	RPS9	22,591
Biliverdin reductase A	BLVRA	33,428
Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRC47	63,472
Protein RCC2	RCC2	56,084
B-cell receptor-associated protein 31	BCAP31	15,979
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	35,904
Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	27,058
RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase	AKT1	58,212
Methionine aminopeptidase 2	METAP2	48,876
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHMT2	25,676
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	23,811
Obg-like ATPase 1	OLA1	44,743
Spermidine synthase	SRM	33,824
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	PAICS	47,079
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1	31,387
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	64,615
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GMPS	76,715
ATP-citrate synthase	ACLY	120,840
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RAD23B	43,171
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	629,090
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	34,930
5-3 exoribonuclease 2	XRN2	108,580

---

Výše uvedený soubor 34 proteinů by se měl skládat z proteinů interagujících s ligandem MK617. Vzhledem k účinku této látky na příbuzné procesy spojené s rozvojem rakovinného bujení, se dá očekávat, že tyto identifikované proteiny budou také projevovat vyšší míru vzájemných interakcí, než by bylo možné pozorovat u náhodného souboru proteinů z daného typu vzorku.

Za účelem zjištění, zda dochází k interakcím mezi vybranými proteiny, byla provedena analýza pomocí databáze STRING (<https://string-db.org/>) (Obr. 15.)



Obr. 15. STRING protein-protein interakční síť vybraných proteinů.

Výsledkem bylo celkem 44 vykázaných interakcí, což představuje více než dvojnásobné množství oproti míře předpokládané u náhodného vzorku.

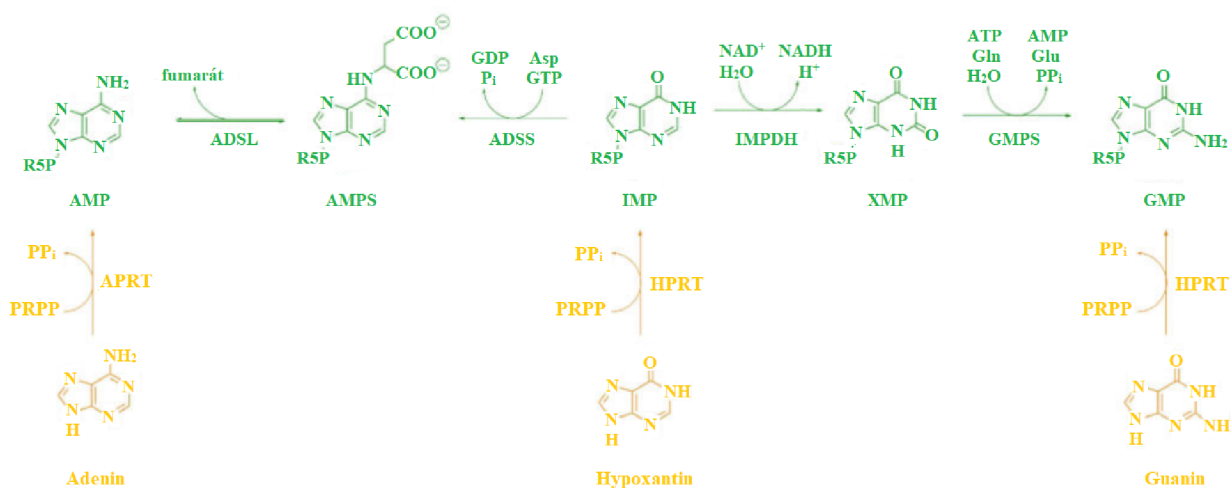


Vybrané proteiny byly pomocí GO analýzy s využitím PANTHER Overrepresentation Testu typu FISHER rozděleny do kategorií podle jejich zapojení v biologických procesech (Tabulka 6).

*Tabulka 6.* MK-617 purifikované proteiny rozdělené pomocí GO analýzy do kategorií podle jejich zapojení v biologických procesech. Hodnota fold Enrichment vyjadřuje obohacení oproti referenční databázi proteomu Homo sapiens (GO Ontology database Released 2022-03-22). Zobrazeny jsou kategorie s fold Enrichment > 5.

<b>GO biological process</b>	<b>fold Enrichment</b>	<b>raw P value</b>
'de novo' IMP biosynthetic process	> 100	3,73E-07
'de novo' XMP biosynthetic process	> 100	5,32E-07
purine nucleobase biosynthetic process	> 100	6,86E-09
'de novo' AMP biosynthetic process	> 100	7,31E-07
GMP biosynthetic process	> 100	2,09E-08
tetrahydrofolate biosynthetic process	> 100	9,99E-05
brainstem development	> 100	1,25E-04
tRNA aminoacylation for protein translation	42,03	6,04E-05
regulation of translation	10,45	4,18E-06

Důležitost IMP je ilustrována na obr. 16. IMP je základním prekurzorem pro syntézu XMP, GMP, AMP a je nezbytný pro tvorbu purinových bází, které mají souvislost s rozvojem nádorového bujení.



Obr. 16. IMP jako prekurzor pro syntézu purinových bází (převzato a upraveno z Pedley, 2017).

ADSL = adenylosukcinát lyáza, ADSS = adenylosukcinát syntáza, IMPDH = IMP dehydrogenáza, GMPS = GMP syntáza, APRT = adenin fosforibosyl transferáza, HPRT = hypoxantin-guanin fosforibosyl transferáza, PRPP = fosforibosyl pyrofosfát

Neomezená buněčná proliferace je charakteristickým znakem rakoviny. Puriny jsou nejhojnějšími metabolickými substráty pro živé organismy (substráty nukleových kyselin, koenzymů), jsou nezbytné pro proliferaci nádorových buněk a slouží jako modulátory reakce imunitních buněk a k uvolňování cytokinů, což se značně podílí na rozvoji onkogeneze. V nádorových buňkách jsou indikovány vysoké koncentrace purinových metabolitů (Yin, 2018).

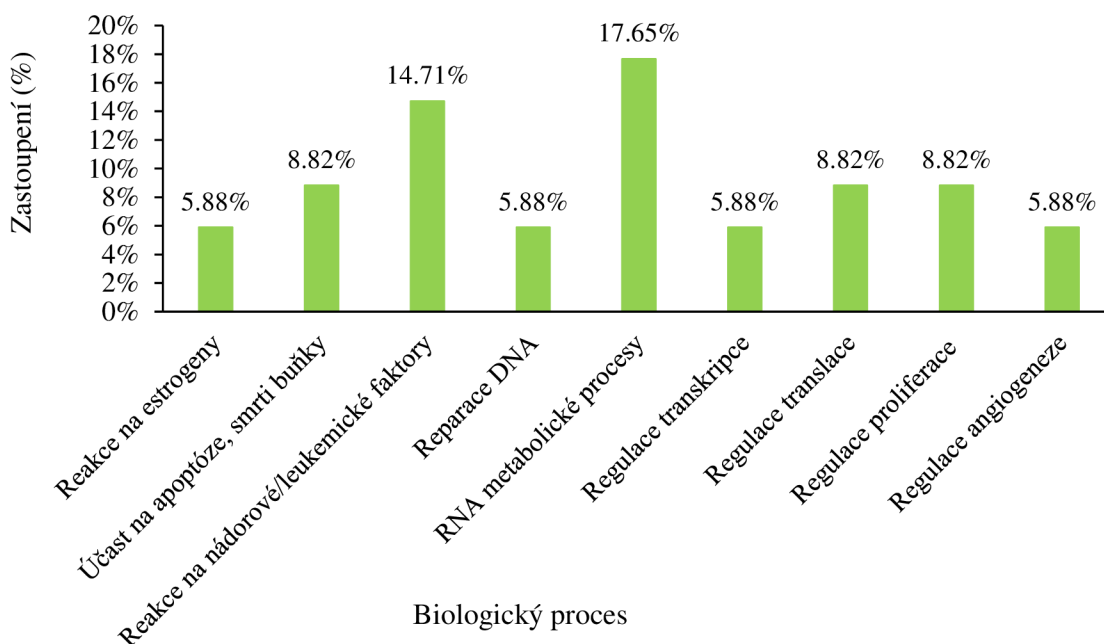
Dnes jsou na trhu dostupná terapeutika tzv. „purinové antimetabolity“. Jedná se o proléčiva, která slouží k zastavení replikace DNA a indukci apoptózy. Mnohé z těchto terapeutik jsou ale toxické pro zdravé buňky, a proto jsou i nadále hledány nové způsoby inhibice rozvoje rakoviny (Pedley, 2017). Taktéž bylo prokázáno, že metabolismus purinů, zejména guanylátů, zprostředkovává rezistenci glioblastomu (nejčastější agresivní nádor mozku u dospělých) na radiaci. Purinové metabolity rezistenci způsobují tak, že podporují opravu záření indukovaných dvouřetězcových zlomů DNA. Naopak samotná

syntéza purinů přispívá k agresivnímu chování glioblastomu a dalších typů rakovin (Zhou, 2020).

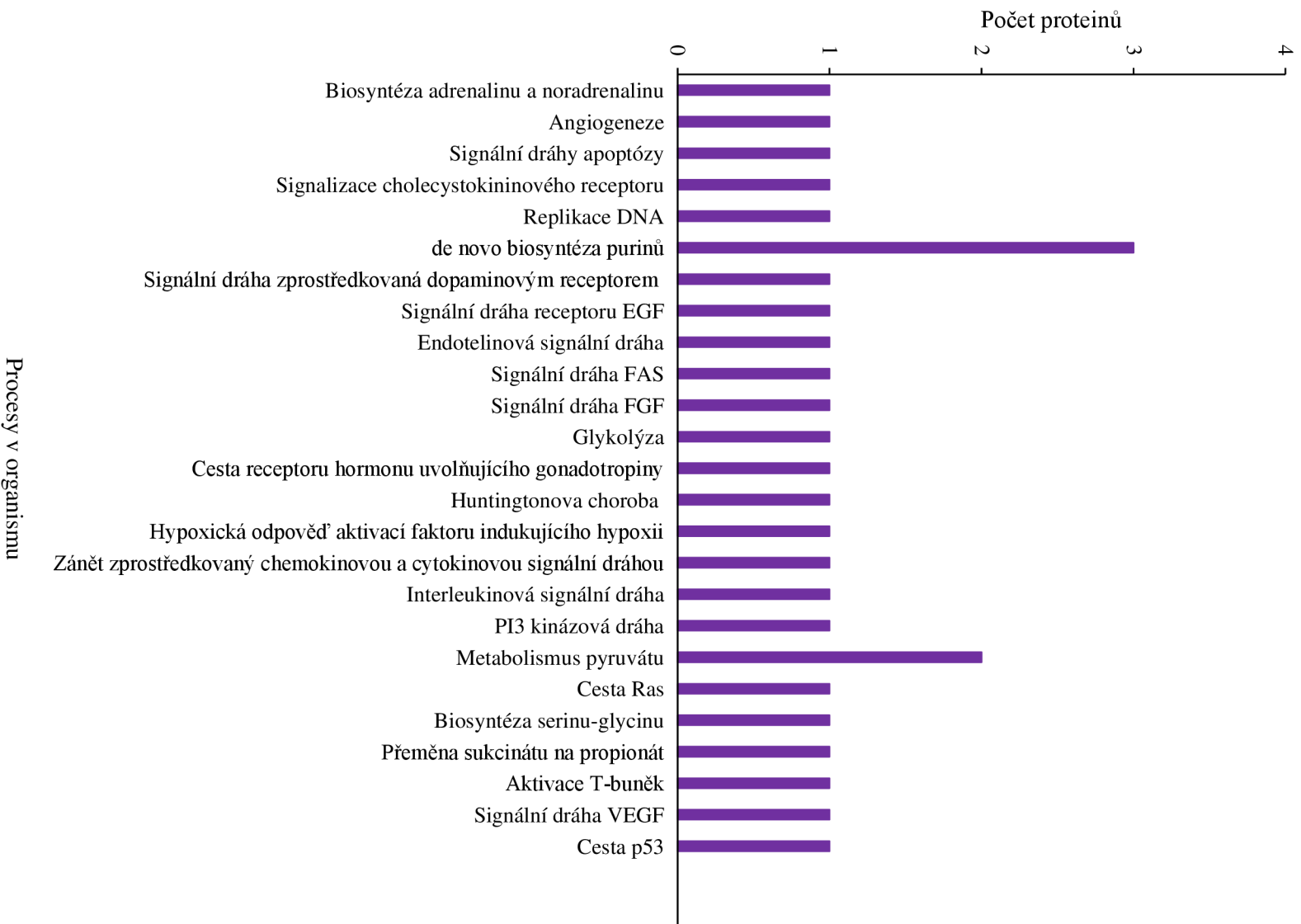
Z výše uvedených informací vyplývá, že zaměření se na metabolismus purinů může sloužit jako potenciální terapie u nádorových onemocnění. Pokud by byla zvýšena degradace purinů docházelo by k omezení jejich dostupnosti pro syntézu nukleotidů, čímž by byla inhibována buněčná proliferace rakovinných buněk. Stejně tak inhibice syntézy purinů může být slibnou strategií, jak překonat rezistenci nádorů k terapii.

Seznam vybraných 34 proteinů byl dále vložen do proteinové databáze UniProt za účelem získání informací o jejich funkcích v organismu. Bylo zjištěno, že zachycené proteiny se účastní například reparace DNA, podílejí se na regulaci translace, proliferace a angiogeneze, jsou zapojeny do reakce organismu na estrogény, tumor supresorové faktory a ovlivňují apoptický proces nebo se ho přímo účastní (procentové rozložení viz obr. 17).

K získání podrobnějších informací o proteinech a jejich zapojení do konkrétních signálních drah byla provedena doplňující PANTHER GO-Slim analýza (Obr. 18).



Obr. 17. Funkce proteinů v biologických procesech a jejich procentuální zastoupení.



*Obr. 18. Výsledky PANTHER GO-Slim analýzy. Proteiny byly rozděleny do několika kategorií dle jejich zapojení do procesů, které vykonávají v organismu.*

Významně obohacenými proteiny na afinitním gelu s ligandem MK-617 byly pyruvát kináza PKM (PKM), transferinový receptor 1 (TFRC) a katechol O-methyl transferáza (COMT), jejichž přítomnost je relevantní vzhledem k souvislosti s rakovinovým bujením.

Pyruvát kináza PKM je klíčový enzym glykolytické dráhy, který přeměňuje fosfoenolpyruvát (PEP) na pyruvát za využití 1 molekuly ATP. Pyruvát kináza se vyskytuje ve 2 izoformách PKM1 a PKM2 v lidských fibroblastech. Fibroblasty exprimující PKM1 vykazují zvýšenou sekreci laktátu, který slouží jako zdroj vysokoenergetických živin pro podporu růstu epitelu nádoru. Při expresi PKM2 se zvyšuje tvorba ketolátů, které slouží jako zdroj energie pro nádorové buňky v případě nedostatku živin (Chiavarina, 2014).

Nedávné studie ukázaly, že transferinový receptor 1 (TFRC) je nadměrně exprimován v nádorových buňkách prsu, zejména při nedostatku železa. Bylo prokázáno, že některé experimentální léky a protilátky cílené na transferinový receptor vykazují silné protinádorové účinky a může tak být využit jako potenciální molekulární cíl pro diagnostiku a léčbu rakoviny (Shen, 2018).

Katechol O-methyl transferáza (COMT) se podílí na biosyntéze adrenalinu a noradrenalinu a je součástí signální dráhy zprostředkované dopaminovým receptorem. Hraje roli v metabolismu estrogenů prostřednictvím inaktivace katecholestrogenů. Inaktivace snižuje rakovinotvorný potenciál metabolitů a současně zvyšuje množství 2-methoxyestradiolu, o kterém je známo, že má ochranný účinek proti tvorbě nádorů. 2-methoxyestradiol vykazuje také silnou apoptickou aktivitu (Lakhani, 2003).

Dalším proteinem, jehož zapojení do rozvoje nádorových onemocnění je předmětem mnoha studií je také RAC-alfa serin threonin kináza (AKT1). Tato kináza je součástí mnoha signálních drah, například receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), endotelinové dráhy, dráhy receptoru FAS patřícího do rodiny TNF receptorů (TNF – tumor nekrotizující faktor), dráhy fibroblastového růstového faktoru (FGF), dráhy receptoru uvolňujícího gonadotropin, dráhy interleukinové signalizace, dráhy PI3 kinázy, dráhy onkogenu Ras, dráhy vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a dráhy tumor supresorového proteinu p53. Kináza se mimo jiné účastní aktivace T-buněk, podílí se na angiogenezi, apoptických pochodech a významně ovlivňuje proliferaci a migraci nádorových buněk (Alwhaibi, 2019).

Dalšími zajímavými proteiny jsou 5-3 exoribonukleáza 2 (XRN2), která se podílí na replikaci DNA. Glycin-tRNA ligáza (GARS), GMP syntáza (GMPS) a protein PURH (ATIC) se podílejí na *de novo* syntéze purinu, což má, jak již bylo zmíněno dříve, souvislost s proliferací nádorových buněk. ATP-citrát syntáza (ACLY) se účastní metabolismu pyruvátu a je zapojena do biosyntézy cholesterolu, serin hydroxymethyl transferáza (SHMT2) se zase podílí na biosyntéze serinu a glycinu. Enoyl-CoA hydratáza (ECHS1) se účastní přeměny sukcinátu na propionát a je zapojena do metabolismu lipidů a  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. Tyto proteiny svými funkcemi umožňují růst nádoru, jelikož jsou zdrojem potřebných živin a energie.

Jelikož byla jako biologický materiál k experimentům použita nádorová linie MCF-7, tak bylo očekáváno, že provedená GO analýza potvrdí interakci ligandu s proteiny, které mají souvislost s rozvojem nádorových onemocnění. Očekávaný byl účinek proteinů na řízení oprav DNA, buněčné proliferace a angiogeneze, které byly ovlivněny buďto pozitivně nebo negativně. Stejně tak nebyla překvapivá ani jejich reakce na přítomnost leukemických a nádorových faktorů a jejich zapojení v signálních drahách p-53, VEGF, FAS a dalších.

Původní předpoklad, že s ligandem MK-617 budou přednostně interagovat proteiny, které jsou zapojeny do ER signalizace, byl potvrzen jen částečně. Tato představa vznikla na základě znalosti toho, že původní struktura MK-349, která byla použita pro syntézu ligandů, byla aktivní mimo jiné na MCF-7 liniích (jedná se o ER exprimující karcinom). Z 34 identifikovaných proteinů se do ER signalizace zapojují jen 2 proteiny, katechol O-methyl transferáza (COMT) a glutathion S-transferáza Mu 3 (GSTM3). Nabízí se tedy vysvětlení, že ligand interaguje spíše s proteiny s obecnějším vlivem na rozvoj nádorů, mimo jiné karcinomů neexprimujících ER. Tyto karcinomy mají velmi špatnou prognózu a medikace je u nich podstatně složitější oproti ER exprimujícím karcinomům, jelikož neodpovídají na obvykle využívanou hormonální terapii.

## 5 Závěr

V rámci diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma Afinitní purifikace proteinů z nádorové linie MCF-7 interagujících s potenciálními steroidními kancerostatiky. V teoretické části jsou shrnuty známé informace o steroidních hormonech a jejich významu v rozvoji nádorových onemocnění, estrogenových receptorech, proteinech a afinitní chromatografii.

V experimentální části byla provedena nativní extrakce proteinů z nádorové linie MCF-7, jejichž izolace byla úspěšná pro provedení dalších experimentů. Proteiny byly purifikovány s využitím afinitní chromatografie a byly frakcionovány za účelem zvýšení citlivosti analýzy pomocí LC-MS/MS. Na základě stanovených analytických parametrů bylo vybráno 34 proteinů, se kterými byla provedena GO analýza, pomocí které byly proteiny rozděleny do kategorií dle jejich zapojení v biologických procesech. Další informace o funkcích proteinů v organismu byly získány prostřednictvím proteinové databáze UniProt a z doplňující PANTHER GO-Slim analýzy.

Gene ontology analýza odhalila signifikantní obohacení proteinů zapojených do metabolismu purinů (IMP, XMP, GMP a AMP), které mají souvislost s rozvojem rakoviny, jelikož hrají významnou roli v proliferaci nádorových buněk. Zaměření se na jejich metabolismus by mohlo v budoucnu sloužit jako potenciální terapie k léčbě nádorových onemocnění. Stejně tak inhibice syntézy purinů představuje slibnou strategii k překonání rezistence nádorů k terapii.

Byla prokázána relevance mezi zachycenými proteiny a jejich souvislostí s rozvojem nádorových onemocnění. Proteiny mají vliv na replikaci DNA, proliferaci a angiogenezi, reagují na přítomnost nádorových a leukemických faktorů, jsou zapojeny v signálních drahách p53, VEGF, FAS aj. Významně obohacené proteiny pyruvát kináza a transferinový receptor jsou exprimovány v nádorových buňkách a podporují jejich růst, zatímco katechol O-methyltransferáza má protektivní účinek.

Nebyl potvrzen předpoklad, že proteiny interagující s aktivní látkou MK-617 jsou primárně zapojeny do ER signalizace. I přes to mají výsledky potenciál a do budoucna by bylo vhodné zopakovat experiment s jinými typy nádorových linií, které neexprimují ER, případně zopakovat experiment v kombinaci s MK-617 s inhibitory ER.

## Použitá literatura

Alwhaibi A., Verma A., Adil M. S. a Somanath P. R., 2019. The unconventional role of Akt1 in the advanced cancers and in diabetes-promoted carcinogenesis. *Pharmacological Research*. **145**, 1-21.

Anh N. H., Long N. P., Kim S. J. a kol., 2019. Steroidomics for the Prevention, Assessment and Management of Cancers: A Systematic Review and Functional Analysis. *Metabolites*. **9**, 199.

Anusha S. a kol., 2018. A Overview on Affinity Chromatography: A Review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. **8**, 1463-1471.

Arora S., Saxena V. a Ayyar B. V., 2017. Affinity Chromatography: A Versatile Technique fot Antibody Purification. *Methods*. **116**, 84-94.

Aslam B., Basit M., Nisar M. A. a kol., 2017. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*. **55**, 182-196.

Beck S., Michalski A., Raether O., Lubeck M. a kol., 2015. The Impact II, a very high-resolution quadrupole time-of-flight instrument (QTOF) for deep shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. **14**, 2014-2029.

Begam J. A., Jubie S. a Nanjan M. J., 2017. Estrogen Receptor Agonists/Antagonists in Breast Cancer Therapy: A Critical Review. *Bioorganic Chemistry*. **71**, 257-274.

Camarillo I. G., Xiao F., Madhivanan S. a kol. Low and High Voltage Electrochemotherapy for Breast Cancer: An in vitro Model Study, in: Sundararajan A., 2014. Electroporation-Based Therapies for Cancer, 1. vydání. Cambridge: Woodhead Publishing, 55-102. ISBN 978-190-756-815-2.

Capper C. P., Rae J. M. a Auchus R. J., 2016. The Metabolism, Analysis, and Targeting of Steroid Hormones in Breast and Prostate Cancer. *Hormones and Cancer*. **7**, 149-164.

Coskun O., 2016. Separation Tecniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. **3**, 156-160.



- Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R. A., Olsen J. V. a Mann M., 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research*. **10**, 1794-1805.
- Denizli A. a Pişkin E., 2001. Dye-ligand Affinity Systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **49**, 391-416.
- Hage D. S., Bian M, Burks R., Karle E a Ohnmacht C. a Wa C. Bioaffinity chromatography, in: D.S. Hage D. S., 2006. Handbook of Affinity Chromatography, 2. vydání. Boca Raton: CRC Press. 101–126. ISBN 978-082-475-198-2.
- Hage D. S, Anguizola J. A., BIC. a kol., 2012. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Affinity Chromatography: Recent Trends and Developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **69**, 93-105.
- Hage D. S. a Matsuda R. Affinity Chromatography: A Historical Perspective, in: Reichelt S., 2015. Affinity Chromatography: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 3. vydání. New York: Humana Press, 1-19. ISBN 978-149-392-446-2.
- Heldring N., Pike A., Andersson S. a kol., 2007. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*. **87**, 905-931.
- Chiavarina B., Whitaker-Menezes D., Martinez-Outschoorn U. E. a kol., 2014. Pyruvate kinase expression (PKM1 and PKM2) in cancer-associated fibroblasts drives stromal nutrient production and tumor growth. *Cancer Biology & Therapy*. **12**, 1101-1113.
- Chimento A., Casaburi I., Avena P. a kol., 2019. Cholesterol and Its Metabolites in Tumor Growth: Therapeutic Potential of Statins in Cancer Treatment. *Frontiers in Endocrinology*. **9**, 1-9.
- Chmelík J., 2005. Proteomický průvodce. *Chemické listy*. **99**, 883-885.
- Ismail B. a Nielsen S. S. Basic Principles of Chromatography, in: Nielsen S. S., 2010. Food Analysis. *Food Science Texts Series*, 473-498. ISBN 978-144-191-477-4.
- Jayasena S. D., 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*. **45**, 1628-50.
- Koolman J. a Röhm K. H., 2012. Barevný atlas biochemie. Praha: Grada, 48-62. ISBN 978-80-247-2977-0.

- Lakhani N. J., Sarkar M. A., Venitz J. a Figg W. D., 2003. 2-Methoxyestradiol, a Promising Anticancer Agent. *Pharmacotherapy*. **23**, 165-172.
- Lamb C. A., Vanzulli S. I. a Lanari C., 2019. Hormone Receptors in Breast Cancer: More than Estrogen Receptors. *Medicina*. **79**, 540-545.
- Lee A. V., Oesterreich S. a Davidson N. E., 2015. MCF-7 Cells-Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*. **107**, 1-3.
- Magdeldin S. a Moser A. Affinity Chromatography: Principles and Applications, in: Magdeldin S., 2012. Affinity Chromatography. Londýn: IntechOpen, 4-24. ISBN: 978-953-510-325-7.
- Henley D. V., Lindzey J. a Korach K. S. Steroid Hormones, in: Melmed S. a Conn P. M., 2005. Endocrinology: Basic and Clinical Principles, 2.vydání. Totowa NJ: Humana Press, 49-64. ISBN 978-158-829-427-2.
- Monti C., Zilocchi M., Colugnat I. a Alberio T., 2019. Proteomics Turns Functional. *Journal of Proteomics*. **198**, 36-44.
- Moxley R. A., Oak S., Gadgil H. a Jarrett H. W. DNA affinity chromatography, in: Hage D. S., 2006. Handbook of Affinity Chromatography, 2. vydání. Boca Raton: CRC Press. 173–214. ISBN 978-082-475-198-2.
- Patel J. S., Wainer I. W. a Lough W. J. Affinity-based chiral stationary phases, in: Hage D. S., 2006. Handbook of Affinity Chromatography, 2. vydání. Boca Raton: CRC Press. 571–592. ISBN 978-082-475-198-2.
- Pedley A. M. a Benkovic S. J., 2017. A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in Biochemical Sciences*. **42**, 141-154.
- Rárová L., Sedlák D., Oklešťková J. a kol., 2018. The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **178**, 263-271.
- Rix U. a Superti-Furga G., 2009. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nature Chemical Biology*. **5**, 616-624.

- Rodriguez E. L., Poddar S., Iftekhar S. a kol., 2020. Affinity Chromatography: A Review of Trends and Developments over the Past 50 Years. *Journal of Chromatography B*. **1157**, 1-74.
- Salha D., Andaç M. a Denizli A., 2021. Molecular Docking of Metal Ion Immobilized Ligands to Proteins in Affinity Chromatography. *Journal of Molecular Recognition*. **34**, 2875.
- Samavat H. a Kurzer M. S., 2015. Estrogen Metabolism and Breast Cancer. *Cancer Letters*. **356**, 231-243.
- Santen R., Cavalieri E., Rogan E. a kol., 2009. Estrogen Mediation of Breast Tumor Formation Involves Estrogen Receptor-Dependent, as Well as Independent, Genotoxic Effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1155**, 132-140.
- Seung Kim H., Hage D. S. Immobilization methods for affinity chromatography, in: Hage D. S., 2006. *Handbook of Affinity Chromatography*, 2. vydání. Boca Raton: CRC Press, 36–78. ISBN 978-082-475-198-2.
- Shen Y., Li X., Dong D., Zhang B. a kol., 2018. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *American Journal of Cancer Research*. **8**, 916-931.
- Tyanova S., Temu T. a Cox J., 2016. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols*. **11**, 2301-2319.
- Valko-Rokytovská M., Očenáš P., Salayová A. a Kostecká Z., 2021. Breast Cancer: Targeting of Steroid Hormones in Cancerogenesis and Diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences*. **22**, 1-11.
- Vasudevan D. M., Sreekumari S. a Vaidyanathan K. Proteins: Structure and Function, in: Vasudevan D. M., 2016. *Textbook of Biochemistry for Medical Students*, 6. vydání. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 36-51. ISBN 978-935-025-016-7.
- Waks A. G. a Winer E.P., 2019. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA Internal Medicine*. **321**, 288-297.
- Yin J., Ren W., Huang X., Deng J., Li T. a Yin Y., 2018. Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Frontiers in Immunology*. **9**, 1-8.

Yue W., Yager J. D., Wang J. P. a kol., 2013. Estrogen Receptor-Dependent and Independent Mechanisms of Breast Cancer Carcinogenesis. *Steroids*. **78**, 161-170.

Zhang C., Rodriguez E., Bi C. a kol., 2017. High Performance Affinity Chromatography and Related Separation Methods for the Analysis of Biological and Pharmaceutical Agents. *Analyst*. **175**, 1-53.

Zhao L., Zhou S. a Gustafsson J. A., 2019. Nuclear Receptors: Recent Drug Discovery for Cancer Therapies. *Endocrine Reviews*. **40**, 1207-1249.

Zhou W., Yao Y., Scott A. J. a kol., 2020. Purine metabolism regulates DNA repair and therapy resistance in glioblastoma. *Nature Communications*. **11**, 1-14.