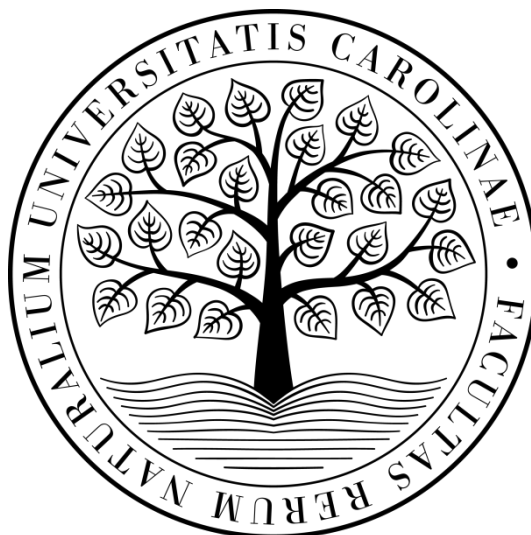


**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. VOJTĚCH DUCHOSLAV

Biofyzikální charakterizace proteinového komplexu CAR/RXR s jeho
vazebnými partnery

Biophysical characterization of the CAR/RXR protein complex with its
binding partners

Diplomová práce

Vedoucí práce
Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.
Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.06.2021

Podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph. D. za vedení a ochotu vždy poskytnout cennou radu. Dále děkuji Mgr. Radimovi Nenckovi, Ph. D. za jeho cenné rady a RNDr. Martin Klíma, Ph. D. za jazykovou korekci.

Abstrakt

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) hraje v organismu významnou roli xenosenzoru, a proto je hojně exprimován v ledvinách, játrech, žlučníku a v epitelu tenkého střeva, kde dochází k biotransformaci xenobiotik. CAR je také důležitým faktorem pro eliminaci žlučových kyselin a bilirubinu. Taktéž se ukázalo, že CAR má významnou roli v regulaci metabolismu glukózy a lipidů. Narušení metabolismu tuků a glukózy je častou příčinou kardiovaskulárních a metabolických onemocnění, jako jsou ateroskleróza, cukrovka druhého typu, obezita a inzulínová rezistence. Tento stav nazýváme metabolickým syndromem a mívá za následek vážné poškození orgánů. Díky schopnosti ovlivňovat metabolismus se CAR, respektive jeho komplex s RXR α (retinoidní X receptor α), stal slibným biologickým cílem pro výzkum potenciálních léčiv metabolického syndromu. Cílem této diplomové práce byla především strukturní charakterizace proteinového komplexu CAR/RXR α spolu s agonistou IV676*HCl, která by detailně popsala interakci této malé molekuly s receptorem. Získané strukturní informace by byly využity při návrhu nových agonistů.

Klíčová slova: jaderný receptor, konstitutivní androstanový receptor, biofyzikální charakterizace

Abstract

The constitutive androstane receptor (CAR) plays an important role as a xenosensor in the organism and is therefore widely expressed in the kidney, liver, gallbladder and in the small intestine epithelium, where the biotransformation of xenobiotic occurs. CAR is also an important factor in the elimination of bile acids and bilirubin. CAR has also been shown to have an important role in regulation of glucose and lipid metabolism. Impairment of lipid and glucose metabolism is a common cause of cardiovascular and metabolic diseases such as atherosclerosis, type 2 diabetes, obesity and insulin resistance. These diseases are called metabolic syndrome and result in severe organ damage. CAR respective its complex with RXR α (retinoid X receptor α) has become a promising biological target for drug discovery for metabolic syndrome. The major aim of this study was a structural characterization of the CAR/RXR α protein complex together with the agonist IV676*HCl, which would describe in detail the interaction of this small molecule with the receptor. Obtained structural information would be used to design improved agonists.

Key words: nuclear receptor, constitutive androstane receptor, biophysical characterization

Seznam použitých symbolů a zkratk

(v/v)	Objemová procenta
(w/v)	Procenta hmotnosti v objemu
2A1	Sulfotransferáza 2A1
AF-1	Transaktivační doména nukleárních receptorů
AF-2	Oblast LBD domény nukleárních receptorů (domény vázající malé molekuly)
AR	Androgenní receptor (z angl. androgen receptor)
AV ČR	Akademie věd České republiky
CAR	Konstitutivní androstanový receptor (z angl. constitutive androstane receptor)
CCRP	Proteinová kináza CCRP
CD	Cirkulární dichroismus
CITCO	(6-(4-chloramfenyl)imidazo[2,1-B][1,3]thiazole-5-carboaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime)
COUP-TF	Transkripční faktor kuřecího ovalbuminu - COUP-TF (z angl. chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors)
CYP2B	Člen rodiny cytochromů P450
CYP2B10	Člen rodiny cytochromů P450
CYP3A11	Člen rodiny cytochromů P450
DAX 1	Receptor DAX 1 (z angl. dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1)
DBD	Doména vázající DNA (z angl. DNA-binding domain)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
ER α	Estrogenový receptor α (z angl. estrogen receptor).
Er β	Estrogenový receptor β (z angl. estrogen receptor).
FOXO1	Protein FoxO1 (z angl. Forkhead box protein O1)

FPLC	Provedení kapalinové chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
FXR	Fanesoidní X receptor (z angl. farnesoid X receptor)
G6PÁZA	Defosforyláza glukóza-6-fosfátu
GCFN	Zárodečný buněčný jaderný faktor (z angl. germ cell nuclear factor)
GR	Glukokortikoidový receptor (z angl. glucocorticoid receptor)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A reduktáza (z angl. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase)
HNF4	Hepatocytický jaderný faktor 4 (z angl. hepatocyte nuclear factor 4).
HSP	Chaperonový protein
HSP90	Chaperonový protein 90
Insig-1	Protein Insig-1 (z angl. Insulin-induced gene 1 protein)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IV676*HCl	Označení organické molekuly syntetizované na ÚOCHB AV ČR v.v.i
LBD	Doména vázající malé molekuly (z angl. ligand binding domain)
LDL	Lipoproteinový receptor (z angl. low-density lipoprotein receptor 1)
LRH-1	Jaterní receptor homolog-1 (z angl. liver receptor homolog-1)
LXR	Jaterní X receptor (z angl. liver X receptor)
MR	Mineralokortikoidový receptor (z angl. mineralocorticoid receptor)
MRP2	Transportní protein MRP2
MRP3	Transportní protein MRP3
NGF1-B	Receptor nervového růstového faktoru 1B (z angl. nerve growth factor 1-B)
NiCo21 (DE3)	Bakteriální kmen <i>Escherichia coli</i> NiCo21 (DE3)
NOR-1	Osiřelý neuronový receptor 1 (z angl. neuron-derived orphan receptor-1)
NR1I3	Gen kódující lidský protein CAR NR1I3
NURR1	Nurr faktor 1 (z angl. Nurr-related factor-1)

OD _{600nm}	Optická hustota při vlnové délce 600 nm
ot./min	Otáčky za minutu
P450	Cytochrom P450
PDB	Proteinová databáze (z angl. protein data bank)
PEPCK	Fosfoenolpyruvátcarboxykináza (z angl. Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
pH	Vodíkový exponent (z angl. potential of hydrogen)
pKUMO	Expresní vektor
PP2A	proteinová fosfatáza PP2A (z angl. protein phosphatase 2A)
PPAR	Receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu (z angl. the peroxisome proliferator-activated receptor)
PR	Progesteronový receptor (z angl. progesteron receptor)
pSUMO	Expresní vektor
PXR	Pregnanový X receptor (z angl. pregnane X receptor)
RACK-1	Receptor pro aktivovanou proteinkinázu C 1 (z angl. receptor of activated protein C kinase-1)
RAR	Receptor kyseliny retinové (z angl. retinoic acid receptor)
RAR α	Receptor kyseliny retinové, isoforma α (z angl. retinoic acid receptor)
RAR β	Receptor kyseliny retinové, isoforma β (z angl. retinoic acid receptor)
RAR γ	Receptor kyseliny retinové, isoforma γ (z angl. retinoic acid receptor)
REV-ERB	Reverzní Erb receptor (z angl. reverse Erb receptor)
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RXR	Retinoidní X receptor (z angl. retinoid X receptor)
RXR α	Retinoidní X receptor, isoforma α (z angl. retinoid X receptor)
RXR β	Retinoidní X receptor, isoforma β (z angl. retinoid X receptor)
RXR γ	Retinoidní X receptor, isoforma γ (z angl. retinoid X receptor)
SDS	Dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SF-1	Steroidogenní faktor 1 (z angl. steroidogenic factor 1)

SHP	Receptor nazývaný krátký heterodimerní partner - SHP (z angl. short heterodimer partner)
SRC-1	Koaktivátor steroidního receptoru (z angl. steroid receptor co-activator 1)
SREBP	Protein SREBP (z angl. Sterol regulatory element-binding protein 1)
SUMO	SUMO protein (z angl. small ubiquitin-like modifier)
TCPOBOP	(1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)]benzen)
TD	Transaktivační doména (z angl. transactivation domain)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TR	Receptor hormonu štítné žlázy (z angl. thyroid hormone receptor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGT 1A1	Glukuronyltransferáza UGT 1A1
Ulp1	Proteáza Ulp1 (z angl. Ubiquitin-like-specific protease 1)
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
v.v.i.	Veřejná výzkumná instituce
VDR	Receptor vitamínu D (z angl. vitamin D receptor)

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	6
OBSAH	10
1. TEORETICKÝ ÚVOD	12
1.1 JADERNÉ RECEPTORY	12
1.2 STRUKTURNÍ PODOBNOST JADERNÝCH RECEPTORŮ	13
1.3 KLASIFIKACE JADERNÝCH RECEPTORŮ	15
1.4 MECHANISMY ÚČINKU JADERNÝCH RECEPTORŮ	18
1.5 RETINOIDNÍ X RECEPTORY	20
1.6 KONSTITUTIVNÍ ANDROSTANOVÝ RECEPTOR (CAR).....	21
1.6.1 <i>Exprese CAR</i>	21
1.6.2 <i>Funkce CAR</i>	21
1.6.2.1 Eliminace žlučových kyselin.....	22
1.6.2.2 Eliminace bilirubinu.....	22
1.6.2.3 Metabolismus glukózy.....	22
1.6.2.4 Metabolismus lipidů.....	23
1.6.3 <i>Mechanismus aktivace</i>	24
1.6.4 <i>Struktura CAR v komplexu s RXRα</i>	26
2. CÍLE	28
3. MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	29
3.1 MATERIÁL.....	29
3.1.1 <i>Chemikálie</i>	29
3.1.2 <i>Použité pufry, roztoky a média</i>	30
3.1.3 <i>Enzymy, peptidy a ligandy</i>	32
3.1.4 <i>Bakteriální kmeny a expresní plazmidy</i>	32
3.1.5 <i>Ostatní materiál</i>	33
3.2 PŘÍSTROJE.....	33
4. METODY.....	36
4.1 TRANSFORMACE BAKTERIÁLNÍHO KMENE <i>ESCHERICHIA COLI</i> NICO21 (DE3) EXPRESNÍMI PLAZMIDY.....	36
4.2 HETEROLOGNÍ EXPRESE CAR	36
4.3 HETEROLOGNÍ EXPRESE RXRA.....	37
4.4 IZOLACE PROTEINŮ.....	37

4.4.1	<i>Disrupce buněk</i>	37
4.4.2	<i>Chromatografické metody</i>	38
4.4.2.1	Afinitní chromatografie	38
4.4.2.2	Štěpení Ulp1 proteázou a afinitní chromatografie	38
4.4.2.3	Gelová permeační chromatografie	38
4.5	ELEKTROFORÉZA	39
4.5.1	<i>SDS-PAGE</i>	39
4.5.2	<i>Sušení gelů</i>	39
4.6	PŘÍPRAVA PROTEINOVÉHO KOMPLEXU CAR/RXRA/SRC1	40
4.7	PŘÍPRAVA PROTEINOVÉHO KOMPLEXU CAR/RXRA/SRC1 s IV676*HCL	40
4.8	CIRKULÁRNÍ DICHROISMUS	40
4.9	ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE	41
4.10	PROTEINOVÁ KRYSTALOGRAFIE	41
4.10.1	<i>Příprava krystalů</i>	41
4.10.2	<i>Měření difrakce</i>	41
5.	VÝSLEDKY	42
5.1	EXPRESE A PURIFIKACE CAR	42
5.2	EXPRESE A PURIFIKACE RXRA	43
5.3	PŘÍPRAVA PROTEINOVÉHO KOMPLEXU CAR/RXRA/SRC1 A JEHO BIOFYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE	45
5.3.1	<i>CD spektroskopie</i>	47
5.3.2	<i>Analytická ultracentrifugace</i>	47
5.3.3	<i>Příprava krystalů proteinového komplexu CAR/RXRα/SRC1 s ligandem IV676*HCl</i> ..	50
6.	DISKUSE	52
7.	ZÁVĚR	53
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

1. Teoretický úvod

1.1 Jaderné receptory

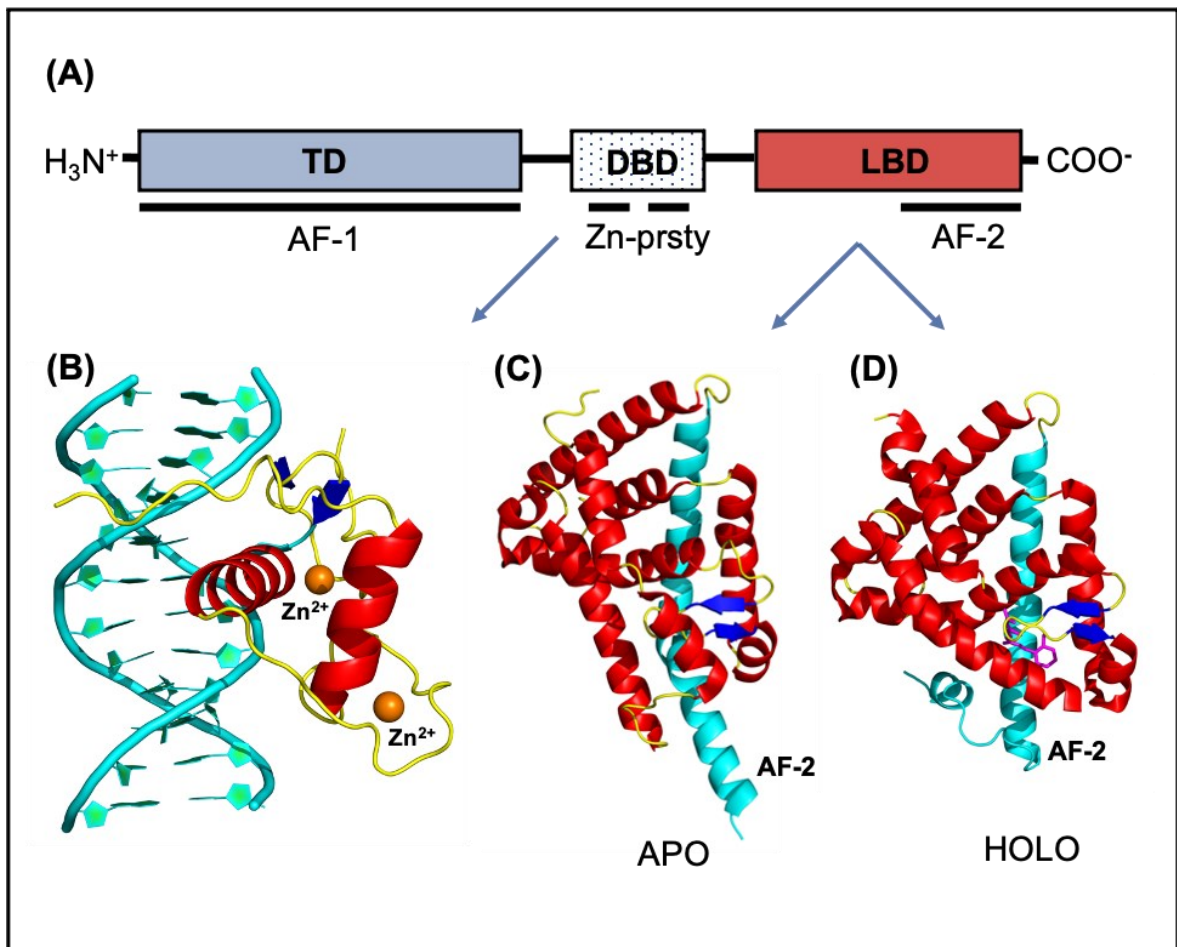
Největší skupinu transkripčních faktorů v eukaryotních buňkách tvoří superrodina strukturně podobných proteinů označovaných jako jaderné receptory. Biologická aktivita těchto receptorů je regulována vazebnými partnery, kterými nejčastěji bývají steroidní hormony, jako je například testosteron, aldosteron, estrogen, kortizol, progesteron a další. Kromě steroidních hormonů se mezi vazebnými partnery vyskytují i nesteroidní sloučeniny, jako je například 9-*cis* retinová kyselina, žlučové kyseliny a další. Jaderné receptory rozeznávají specifická místa na DNA, na která se vážou a působí jako transkripční regulátory. Postupem času byly díky sekvenčním podobnostem objeveny další jaderné receptory, jejichž přirození vazební partneři nebyli nalezeni. Předpokládá se, že by mohlo jít o endogenní sloučeniny nebo metabolické produkty. Tyto receptory byly pojmenovány jako jaderné osiřelé receptory [1, 2].

Jaderné receptory regulují široké spektrum fyziologických procesů: metabolismus, buněčné dělení, imunitní reakce, vývoj, reprodukci, udržování homeostázy a další. Kromě fyziologických procesů ovlivňují i mnohé patologické procesy, jako je nádorové bujení, neurologické a psychiatrické syndromy, poruchy imunity, cukrovka, revmatoidní artritida, astma, hormonální rezistence, poruchy kardiovaskulárního systému, metabolický syndrom, předčasné stárnutí a další [3-7]. Jaderné receptory jsou i přes svoji dlouhou historii velmi zajímavými cíli nejen pro akademický výzkum, ale zejména pro výzkum potenciálních léčiv.

1.2 Strukturní podobnost jaderných receptorů

Přestože jsou biologické procesy řízené jadernými receptory velmi rozsáhlé, mají tyto proteiny pozoruhodnou strukturní podobnost. Největší homologie se vyskytuje v aminokyselinové sekvenci domény vázající DNA, takzvané DBD domény (z angl. DNA-binding domain), kterou tvoří dva zinkové prsty. Dále se pak vyskytuje v doméně vázající malé molekuly, takzvané LBD doméně (z angl. ligand-binding domain) [8]. Rozložení domén je vyobrazeno v Obr. 1 (A). Jak naznačuje její název, DBD doména zprostředkovává vazbu receptoru na specifické sekvence DNA. LBD doména pak zprostředkovává vazbu na malé molekuly, kterými jsou obvykle molekuly lipofilního charakteru. Schopnost LBD domény regulovat transkripci je řízena α -helixem na C-konci proteinu, nazývaným AF-2. Vazba malé molekuly na receptor způsobí konformační změnu domény, která je po navázání na DNA schopná spustit transkripci vybraných genů (Obr. 1 (C,D)).

Nejméně konzervovanou oblastí jaderných receptorů je transaktivační doména – TD (z angl. transactivation domain), často nazývaná jako AF-1 (Obr. 1 (A)). AF-1 doména vykazuje variabilitu jak v délce, tak v aminokyselinové sekvenci u různých členů superrodiny jaderných receptorů. Nejprve se myslelo, že se jedná o vysoce selektivní oblast proteinu v důsledku interakcí této domény s jinými jadernými receptory. Tyto proteinové komplexy jsou následně zodpovědné za specifitu receptoru. Nicméně dnes již víme, že specifita receptoru není výhradně ovlivněná jen těmito proteinovými komplexy [1, 9, 10].



Obr. 1 – (A) Schematické rozložení domén jaderných receptorů. (B) DBD doména s fragmentem DNA tvořená dvěma zinkovými prsty (6XWH). (C) LBD doména bez vazebného partnera (6HN6). (D) LBD doména s navázaným, růžově vyznačeným vazebným partnerem (1FBY). V části (C) a (D) je tyrkysovou barvou vyznačen C-koncový α -helix nazývaný AF-2. Vazba malé molekuly na receptor způsobí konformační změnu domény, která je poté schopná spustit transkripci vybraných genů. V závorkách jsou uvedeny kódy struktur uložených v PDB databázi.

1.3 Klasifikace jaderných receptorů

Superrodinu jaderných receptorů můžeme rozdělit do 7 podrodin na základě jejich sekvenční podobnosti.

Podrodina 0: Tato podrodina zahrnuje atypické receptory: DAX-1 (z angl. dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1) a receptor, který se nazývá krátký heterodimerní partner - SHP (z angl. short heterodimer partner). Tyto dva receptory jsou jedinečné tím, že obsahují pouze LBD doménu. Tvoří heterodimery s jinými jadernými receptory a spolu s nimi regulují transkripci [11, 12].

Podrodina 1: Tato rozsáhlá podrodina je tvořena receptory hormonů štítné žlázy - TR (z angl. thyroid hormone receptor), receptory kyseliny retinové - RAR (z angl. retinoic acid receptor), receptory aktivovanými proliferátorem peroxisomu - PPAR (z angl. the peroxisome proliferator-activated receptor), reverzních Erb receptorů - REV-ERB (z angl. reverse Erb receptor), farnesoidních X receptorů - FXR (z angl. farnesoid X receptor), jaterních X receptorů - LXR (z angl. liver X receptor) a receptorů vitamínu D - VDR (z angl. vitamin D receptor). Tyto proteiny jsou regulovány řadou lipofilních molekul, jako jsou hormony štítné žlázy, mastné kyseliny, žlučové kyseliny a steroly [13].

Podrodina 2: Tato podrodina obsahuje osiřelé receptory, jako jsou retinoidní X receptory - RXR (z angl. retinoic X receptor), transkripční faktory kuřecího ovalbuminu - COUP-TF (z angl. chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors) a hepatocytický jaderný faktor 4 - HNF4 (z angl. hepatocyte nuclear factor 4). U všech těchto osiřelých receptorů bylo prokázáno, že se vážou na mastné kyseliny. RXR má zvláštní význam, protože tvoří heterodimerní komplexy s mnoha jadernými receptory a je jediným ve skupině se známým aktivujícím ligandem, kyselinou 9-*cis* retinovou [13].

Podrodina 3: Tato podrodina zahrnuje steroidní receptory, které jsou klíčovými regulátory řady metabolických, reprodukčních a vývojových procesů. Zahrnuje androgenní receptor - AR (z angl. androgen receptor), progesteronový receptor - PR (z angl. progesteron receptor), glukokortikoidový receptor - GR (z angl. glucocorticoid receptor), mineralokortikoidový receptor - MR (z angl. mineralocorticoid receptor) a dva úzce související estrogenové receptory - ER α a ER β (z angl. estrogen receptor). Hormony odvozené od cholesterolu, jako je kortizol a estrogen, regulují steroidní receptory prostřednictvím přímé vazby [13, 14].

Podrodina 4: Tato podrodina obsahuje osiřelé jaderné receptory nervového růstového faktoru 1B - NGF1-B (z angl. nerve growth factor 1-B), Nurr faktor 1 - NURR1 (z angl. Nurr-related factor-1) a osiřelého neuronového receptoru - NOR-1 (z angl. neuron-derived orphan receptor-1). Tyto proteiny jsou potřebné pro vývoj a údržbu neuronové sítě [13].

Podrodina 5: Tato skupina obsahuje steroidogenní faktor 1 - SF-1 (z angl. steroidogenic factor 1) a jaterní receptor homolog-1 - LRH-1 (z angl. liver receptor homolog-1). I když se stále obecně klasifikují jako osiřelé jaderné receptory, důkazy naznačují, že tyto proteiny jsou regulovány fosfolipidy. SF-1 a LRH-1 jsou životně důležité pro vývoj a metabolismus [13, 15].

Podrodina 6: Tato skupina obsahuje pouze jeden receptor, zárodečný buněčný jaderný faktor - GCNF (z angl. germ cell nuclear factor). Tento protein se řadí do své vlastní kategorie kvůli výraznému rozdílu v jeho LBD doméně. Neobsahuje α -helix na C-konci proteinu, takzvaný AF-2 helix, díky kterému je doména schopna regulovat transkripci [13].

Kompletní přehled zástupců jaderných receptorů zařazených do podrodin s ligandy, které je aktivují, je vypsán v tabulce 1.

Podrodina	Jméno	Zkratka	Ligand
0B	DAX-1	DAX-1	Neznámý
	Krátký heterodimerní partner	SHP	Neznámý
1A	Receptor hormonů štítné žlázy- α	TR α	Hormony štítné žlázy
	Receptor hormonů štítné žlázy- β	TR β	Hormony štítné žlázy
1B	Receptor kyseliny retinové- α	RAR α	Kyselina retinová
	Receptor kyseliny retinové- β	RAR β	Kyselina retinová
	Receptor kyseliny retinové- γ	RAR γ	Kyselina retinová
1C	Receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu- α	PPAR α	Mastné kyseliny
	Receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu- β	PPAT β	Mastné kyseliny
	Receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu- γ	PPAR γ	Mastné kyseliny
1D	Reverzní Erb receptor- α	REV-ERB α	Hem
	Reverzní Erb receptor- β	REV-ERB β	Hem
1E	Farnesoidní X receptor- α	FXR α	Žlučová kyselina
	Farnesoidní X receptor- β	FXR β	Neznámý
1F	Jaterní X receptor- α	LXR α	Oxysteroly
	Jaterní X receptor- β	LXR β	Oxysteroly
1G	Receptor vitamínu D	VDR	1 α ,25-dihydroxyvitamin D3
	Pregnanový X receptor	PXR	Xenobiotika
	Konstitutivní androgenový receptor	CAR	Xenobiotika
2A	Hepatocytární jaderný faktor 4- α	HNF4 α	Mastné kyseliny
	Hepatocytární jaderný faktor 4- β	HNF4 β	Mastné kyseliny
2B	Retinoidní X receptor- α	RXR α	Kyselina 9- <i>cis</i> retinová
	Retinoidní X receptor- β	RXR β	Kyselina 9- <i>cis</i> retinová
	Retinoidní X receptor- γ	RXR γ	Kyselina 9- <i>cis</i> retinová
2C	Testikulární receptor 2	TR2	Neznámý
	Testikulární receptor 4	TR4	Neznámý
2E	Receptor specifický pro fotoreceptorovou buňku	PNR	Neznámý
2F	Transkripční faktor kuřecího ovalbuminu- α	COUP-TF α	Neznámý
	Transkripční faktor kuřecího ovalbuminu- β	COUP-TF β	Neznámý
	Transkripční faktor kuřecího ovalbuminu- γ	COUP-TF γ	Neznámý
3A	Estrogenový receptor- α	ER α	Estrogen
	Estrogenový receptor- β	ER β	Estrogen
3B	Estrogeneru příbuzný receptor- α	ERR α	Neznámý
	Estrogeneru příbuzný receptor- β	ERR β	Neznámý
	Estrogeneru příbuzný receptor- γ	ERR γ	Neznámý
3C	Androgenní receptor	AR	Androgen
	Glukokortikoidní receptor	GR	Glukokortikoidy
	Mineralokortikoidní receptor	MR	Mineralokortikoidy
	Progesteronový receptor	PR	Progesteron
4A	Receptor nervového růstového hormonu 1B	NGF1-B	Neznámý
	Nurr faktor 1	NURR1	Nenasycené mastné kyseliny
	Osířelý neuronový receptor	NOR-1	Neznámý
5A	Steroidogenní faktor 1	SF-1	Fosfolipidy
	Jaterní receptor homolog-1	LRH-1	Fosfolipidy
6A	Zárodečný buněčný jaderný faktor	GCNF	Neznámý

Tabulka 1 – Superrodina lidských jaderných receptorů, jejich názvy, zkratky a ligandy, které je aktivují [13].

1.4 Mechanismy účinku jaderných receptorů

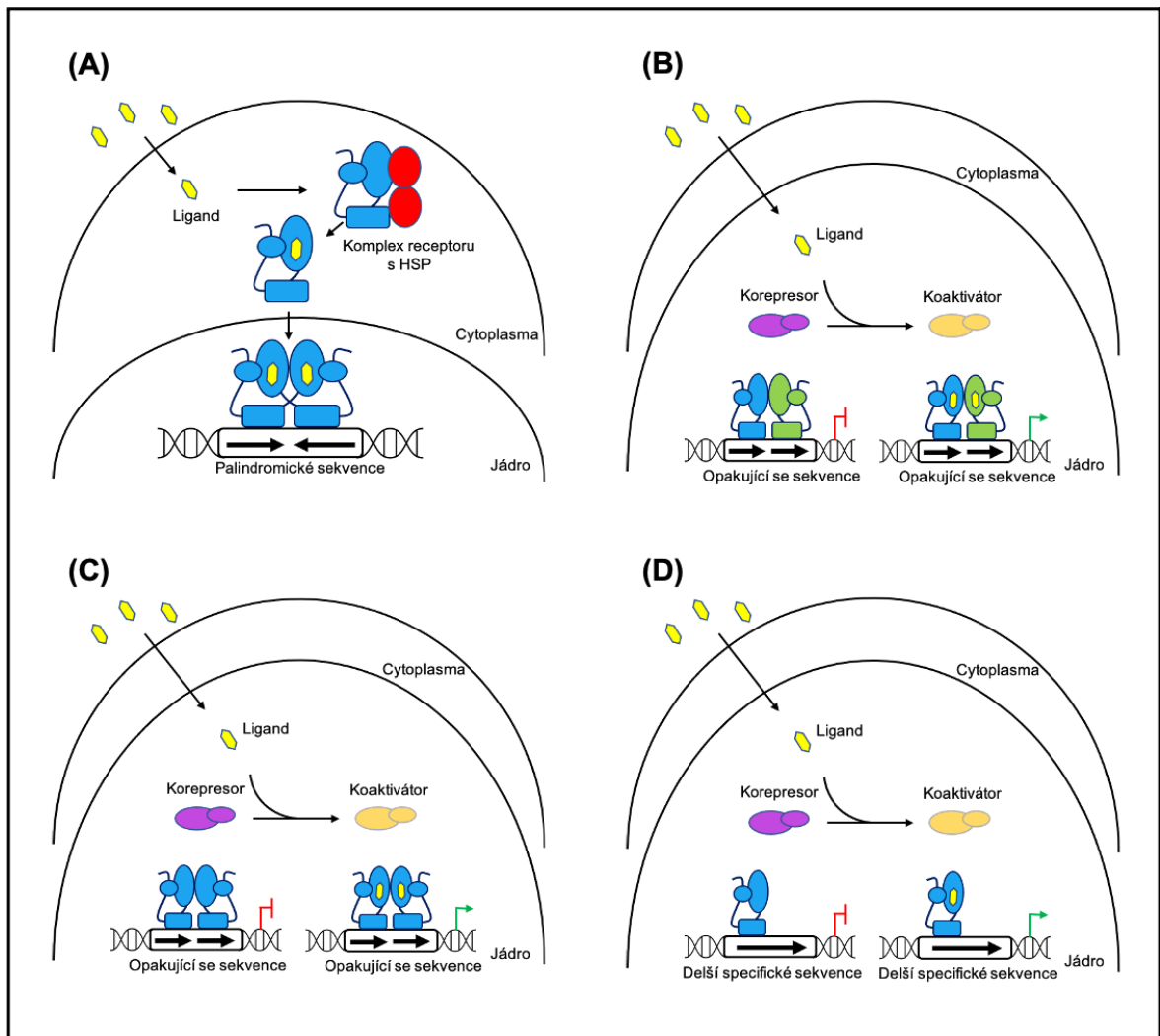
Jaderné receptory se od sebe liší také mechanismem účinku, podle něhož je můžeme dělit do 4 typů [9, 13, 16, 17].

Typ I: Nejčastějšími zástupci tohoto typu jsou steroidní receptory, které jsou aktivovány steroidními hormony jako například estrogeny, androgeny, progestageny a kortikoidy. Tyto receptory se nacházejí v cytoplazmě a tvoří proteinové komplexy s chaperonovými proteiny – HSP (z angl. heat shock protein). Po aktivaci, tedy po navázání ligandu na receptor, proteinový komplex s HSP disociuje a receptor se přemísťuje do jádra buňky. V jádru tvoří homodimer a váže se na specifické úseky DNA obsahující dva stejné protichůdné sekvenční motivy (Obr. 2 (A)).

Typ II: Receptory tohoto typu jsou například RAR a LXR. Vyskytují se v jádře buňky. V nepřítomnosti aktivačního ligandu je receptor v konformačním stavu, který upřednostňuje vazbu korepresorových proteinů. Tyto proteiny aktivují histonové deacetylázy, tedy enzymy, které posilují asociaci histonů s DNA, a tím potlačují transkripci cílových genů. Vazba aktivačních ligandů na jaderné receptory vyvolává konformaci receptoru, který přednostně váže koaktivátorové proteiny. Tyto proteiny často mají vlastní acetyltransferázovou aktivitu, která oslabuje asociaci histonů s DNA, a tím podporují transkripci genů. Takto aktivované receptory běžně tvoří heterodimery s RXR a vážou se na specifické opakující se sekvence DNA (Obr. 2 (B)).

Typ III: Tento typ receptorů má obdobný mechanismus účinku jako receptory druhého typu. V jádře ovšem tyto receptory tvoří homodimery a vážou se na specifické opakující se sekvence DNA. Příkladem receptoru třetího typu je například VDR (Obr. 2 (C)).

Typ IV: Tento typ receptorů má podobný mechanismus účinku jako receptory druhého typu, s tím rozdílem, že se tyto receptory vážou na DNA v podobě monomeru a rozpoznávají delší specifické sekvence. Příklady typu IV jsou LRH-1 a SF-1 (Obr. 2 (D)).



Obr. 2 – Schéma mechanismů účinku jaderných receptorů. **(A)** Receptory *typu I* jsou umístěny v cytoplazmě v komplexu s chaperonovými proteiny. Po navázání ligandu je receptor uvolněn z tohoto komplexu a je transportován do jádra, kde se typicky váže na palindromické sekvence DNA v podobě homodimeru a reguluje transkripci. **(B)** Receptory *typu II* jsou lokalizovány v jádře. Vazba ligandu na receptor spustí acetyltransferázovou aktivitu koaktivátorových proteinů, která oslabuje asociaci histonů s DNA a tím podporuje transkripci genů. Běžně tvoří heterodimery s RXR a vážou se na specifické opakující se sekvence DNA. **(C)** *Typ III* má obdobný mechanismus jako *typ II* s tím rozdílem, že tvoří homodimery. **(D)** *Typ IV* má obdobný mechanismus jako *typ II* s tím rozdílem, že tvoří monomery a váže se na delší specifické sekvence DNA. Obrázek byl vytvořen dle [13].

1.5 Retinoidní X receptory

První identifikovaný retinoidní X receptor označovaný jako RXR α byl původně přiřazen do podrodiny jaderných osiřelých receptorů [18]. Specificky však reagoval na vysoké koncentrace kyseliny all-*trans* retinové, které ho aktivovaly. Dále bylo zjištěno, že jeho dalším vazebným partnerem je kyselina 9-*cis* retinová. Stejně tak s těmito vazebnými partnery reagovaly později objevené isoformy téhož receptoru RXR β a RXR γ [18-20].

RXR receptory byly identifikovány jako nezbytné faktory pro účinnou vazbu na DNA několika členů superrodiny jaderných receptorů. Bylo prokázáno, že tvoří heterodimerní struktury s jinými jadernými receptory [21]. Další studie ukázaly, že RXR může také tvořit homodimer RXR/RXR, což naznačuje existenci nezávislé RXR signální dráhy [18, 22]. Díky těmto vlastnostem jsou RXR receptory mezi členy rodiny jaderných receptorů jedinečné. Navzdory četným studiím od jejich počátečního objevu, stále ještě neexistuje shoda ohledně jejich hlavní biologické role.

Ačkoli mnohé tyto základní otázky stále ještě zůstávají nezodpovězeny nebo jsou odpovědi kontroverzní, je jasné, že RXR receptory jsou důležitými hráči v několika biologických signálních dráhách. Tvoří mnoho heterodimerů s vazebnými partnery z řad členů superrodiny jaderných receptorů a fungují jako transkripční faktory, které jsou aktivované vazbou malé molekuly. Díky tomu se zde otevírají terapeutické příležitosti, jak dokazuje klinické použití RXR-selektivních malých molekul označovaných jako rexinoidy, které se používají k léčbě rakoviny a metabolických poruch [17, 19, 23, 24].

1.6 Konstitutivní androstanový receptor (CAR)

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) je protein, který je v lidském genomu kódován genem NR1H3. K jeho objevu došlo v roce 1994 a byl řazen mezi osiřelé jaderné receptory. Poté však byli objeveni jeho vazební partneři a byl zařazen do první skupiny jaderných receptorů (viz tabulka č. 1). Jeho myší analog (mCAR) byl prvně popsán v roce 1997 [25].

V průběhu let byly odhalovány jeho hlavní funkce. Zjistilo se, že má vliv na indukci genů kódující cytochromy P450, zejména na podrodinu CYP2B. Indukce těchto genů je zprostředkována fenobarbitalem či jinými induktory, jako jsou polychlorované bifenyly, fenytoin, TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)]benzen) a další. V experimentech se ukázalo, že CAR je nezbytným faktorem pro indukci dalších genů cytochromů P450, podrodiny CYP2B10. Má tedy velký vliv na metabolismus xenobiotik a v organismu figuruje jako xenosenzor [26].

1.6.1 Exprese CAR

Jelikož CAR v organismu hraje důležitou roli xenosenzoru, je v hojné míře exprimován ve tkáních, kde dochází ke vstupu a biotransformaci xenobiotik, převážně v játrech a epitelové tkáni tenkého střeva. Dále je CAR exprimován v ledvinách, žlučníku, plicích, kosterním svalstvu, mozku a srdeční tkáni. Jeho funkce v některých z těchto tkání však nebyly doposud detailně prozkoumány [26].

1.6.2 Funkce CAR

Kromě senzoru toxických látek v organismu a indukce biotransformačních enzymů hraje CAR důležité role i v jiných metabolických drahách. Má význam při metabolismu endogenních látek a tím přispívá k udržení homeostázy vnitřního prostředí organismu. Další role má v β -oxidaci mastných kyselin, jaterní lipogenezi a glukoneogenezi. Ve většině případů působí v synergii s mnohými dalšími koregulátory a vytváří složité metabolické dráhy.

1.6.2.1 Eliminace žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou velmi důležité látky, které pomáhají emulgovat, vstřebávat a transportovat lipidy ve střevě. Jejich produkce je velmi pečlivě řízena, poněvadž ve vyšších koncentracích mohou mít toxický účinek. Experimenty na myších potvrdily, že CAR indukuje transportní proteiny a enzymy důležité pro eliminaci žlučových kyselin. Indukuje tvorbu sulfotransferázy 2A1, transportní protein MRP3 a cytochrom P450 CYP3A11.

V dalších experimentech na myších, kterým byly vyjmuty geny pro receptory FXR a PXR, bylo zjištěno, že kyselina cholová způsobila rapidní zvýšení koncentrace CAR. Lze tedy předpokládat, že FXR, PXR a CAR spolupracují při udržování homeostázy žlučových kyselin [25].

1.6.2.2 Eliminace bilirubinu

Bilirubin je žlučové barvivo vznikající rozpadem hemu v hladkém endoplazmatickém retikulu retikuloendoteliálních buněk v játrech, kostní dřeni a ve slezině. Jeho nahromadění v organismu může zapříčinit žloutenku nebo až fatální encefalopatii.

CAR indukuje expresi biotransformačního enzymu glukuronyltransferázy UGT 1A1 a proteinového transportéru MRP2. UGT 1A1 vytvoří z bilirubinu ve vodě rozpustný konjugát, který je pak pomocí MRP2 vyloučen do žluči [25].

1.6.2.3 Metabolismus glukózy

Glukoneogeneze je důležitým metabolickým procesem, kterým organismus udržuje hladinu glukózy v krvi. Spolu s odbouráváním zásobního glykogenu má zásadní význam během hladovění. Důležité enzymy zapojené do glukoneogeneze jsou fosfoenolpyruvátcarboxykináza (PEPCK) a glukóza-6-fosfatáza (G6Páza). PEPCK katalyzuje přeměnu oxalacetátu na fosfoenolpyruvát a G6Páza katalyzuje defosforylaci glukóza-6-fosfátu. Na regulaci jaterní glukoneogeneze má pozitivní vliv glukagon a glukokortikoidy. Negativní vliv má inzulín a glukóza [27].

CAR interaguje s transkripčními faktory hrajícími důležitou roli v indukci glukoneogenních enzymů, jako je například transkripční faktor FoxO1. CAR spolu s inzulínem inhibuje vazbu FoxO1 na promotory genů pro enzymy PEPCCK a G6Pázu a tím potlačuje jejich indukci [25].

1.6.2.4 Metabolismus lipidů

Metabolismus lipidů v játrech zahrnuje sekreci lipidů, β -oxidaci mastných kyselin a lipogenezi. V průběhu lipogeneze se syntetizují mastné kyseliny, které jsou dále přeměněny na triglyceridy a ukládány do tukové tkáně a jater. Lipogeneze zahrnuje i vychytávání volných mastných kyselin z krevní cirkulace a jejich konverzi na triglyceridy. Toto vychytávání nastává při nadbytku mastných kyselin v krevním řečišti například při obezitě či inzulínové resistenci. Nadměrné hromadění triglyceridů v játrech způsobené zvýšenou lipogenezí může vést až k steatóze [28].

Ukázalo se, že CAR má důležitou roli v regulaci metabolismu lipidů. Indukuje expresi proteinu Insig-1, který v endoplazmatickém retikulu blokuje aktivaci proteinu SREBP. SREBP je transkripční faktor regulující indukci genů dvou důležitých proteinů v lipidovém metabolismu: HMG-CoA reductázy a LDL receptoru. Tímto mechanismem snižuje hodnoty triglyceridů [25, 28].

Díky nedávné studii na myších se zjistilo, že CAR má pozitivní vliv v prevenci obezity a také ve zmírnění průběhu cukrovky druhého typu. Ve studii byla myším vyvolána obezita dietou s vysokým obsahem tuku a byl jim podáván známý CAR agonista TCPOBOP. Aktivace CAR receptoru viditelně vedla ke zmírnění již rozvinuté obezity či dokonce k prevenci jejího vzniku. Další experimenty vedly ke zjištění, že podávání TCPOBOP myším s cukrovkou druhého typu výrazně zlepšuje inzulínovou senzitivitu. Pozitivní vliv aktivace CAR receptoru na metabolismus je způsoben několika faktory. Dochází k inhibici glukoneogeneze, lipogeneze a sekrece lipoproteinových partikulí do krevního oběhu [29].

Narušení metabolismu tuků a glukózy může zapříčinit kardiovaskulární a metabolická onemocnění, jako jsou ateroskleróza, cukrovka druhého typu, obezita a inzulínová rezistence. Tento stav nazýváme metabolickým syndromem a mívá za následek vážné

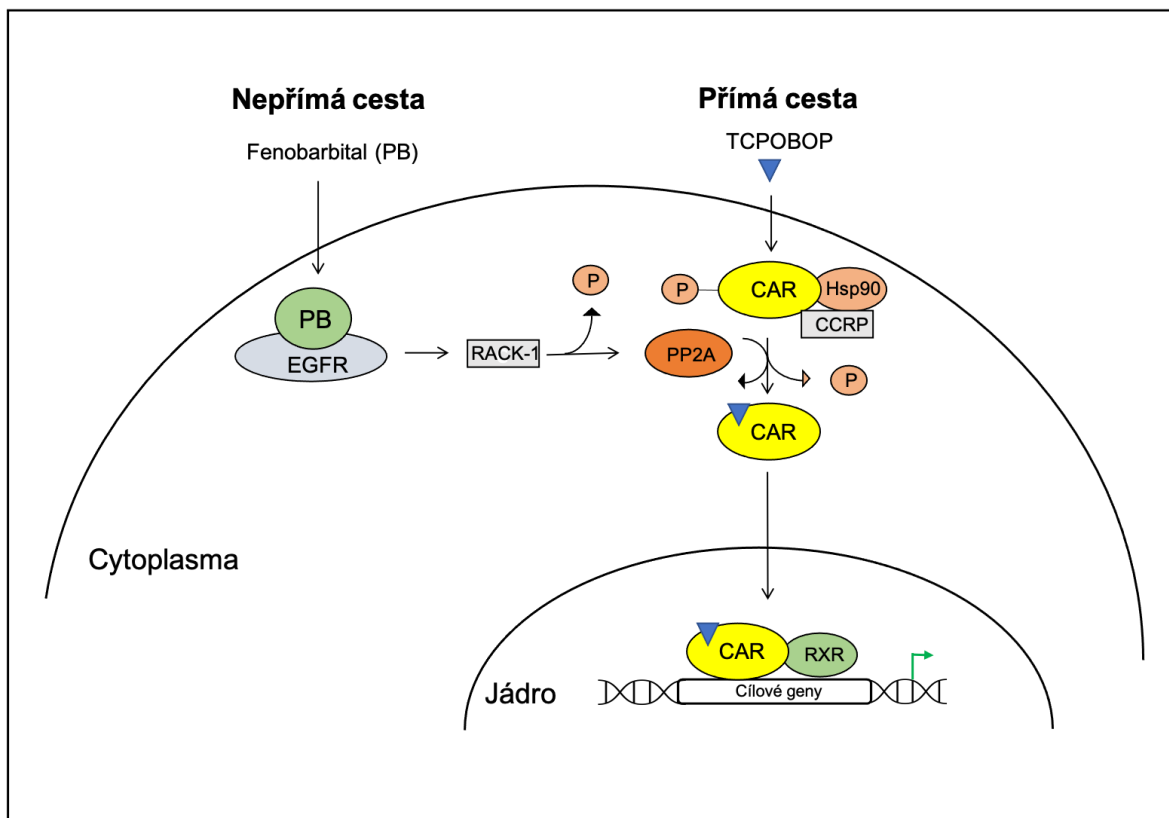
poškození orgánů. Díky schopnosti ovlivňovat metabolismus se CAR stal slibným biologickým cílem pro výzkum potenciálních léčiv metabolického syndromu.

1.6.3 Mechanismus aktivace

Podobně jako steroidní receptory se CAR nachází v cytoplazmě. V nedávné době bylo zjištěno, že pro jeho aktivaci nemusí dojít k přímé vazbě ligandu na jeho LBD doménu, ale může být aktivován i takzvanou nepřímou cestou skrze signální dráhu receptoru epidermálního růstového faktoru – EGFR (z angl. epidermal growth factor receptor) [30].

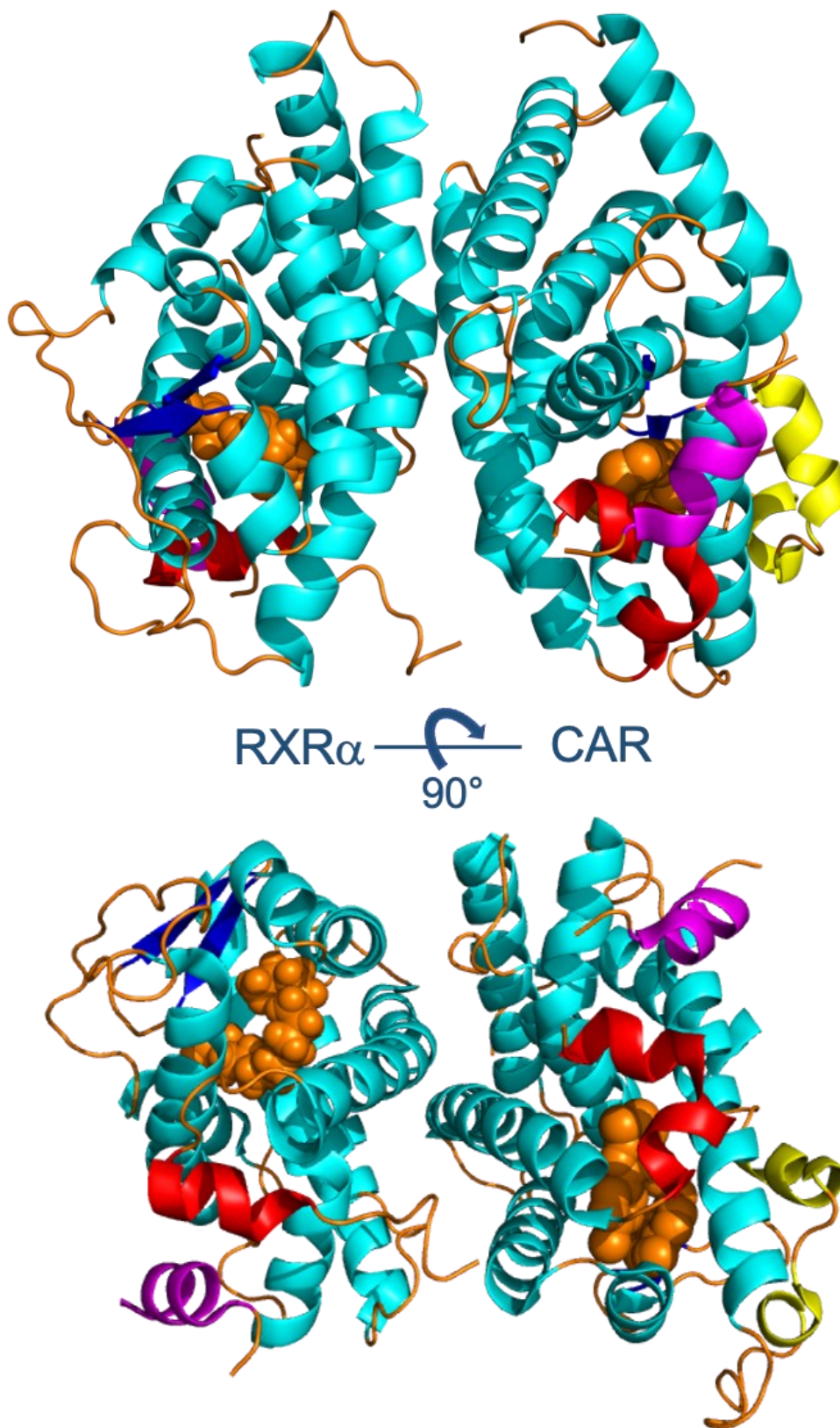
Přímou cestou lze CAR aktivovat například vazbou známého ligandu TCPOBOP. Po navázání ligandu na LBD doménu receptoru dojde k aktivaci proteinové fosfatázy PP2A (z angl. protein phosphatase 2A), defosforylaci tyrosinu 38 a následnému uvolnění CAR z proteinového komplexu CAR/Hsp90/CCRP. Po translokaci z cytoplazmy do buněčného jádra vytvoří heterodimer s RXR a indukuje expresi cílových genů (Obr. 3) [25].

Nepřímou cestou lze aktivovat CAR prostřednictvím fenobarbitalu. Fenobarbital se váže na EGFR a způsobuje defosforylaci proteinu RACK-1 (z angl. receptor of activated protein C kinase-1). Následně dojde k aktivaci proteinové fosfatázy PP2A a receptor je aktivován stejným mechanismem jako v případě přímé cesty (Obr. 3) [31].



Obr. 3 – Schematické vyobrazení mechanismů aktivace CAR - přímou cestou skrze vazbu ligandu TCPOBOP na LBD doménu a nepřímou cestou využívající signální dráhu receptoru epidermálního růstového faktoru.

1.6.4 Struktura CAR v komplexu s RXR α



Obr. 4 – Struktura heterodimeru CAR/RXR α v komplexu s nesteroidní sloučeninou CITCO (6-(4-chloramfenyl)imidazo[2,1-B][1,3]thiazole-5-carboaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl) oxime), mastnou kyselinou a SRC-1 peptidem (z angl. steroid receptor co-activator 1). Oranžovou barvou je vyobrazena endogenní mastná kyselina a CITCO, které jsou zanořeny v hydrofobních kapsách proteinů. Červenou barvou jsou vyobrazeny AF2 helixy, růžovou barvou SRC-1 peptidy a žlutou barvou 3₁₀ helixy. Obrázek byl vytvořen dle [32].

2. Cíle

Hlavním cílem této diplomové práce bylo detailně popsat, na atomární úrovni, interakci ligandu IV676*HCl s konstitutivním androstanovým receptorem.

Specifickými cíli diplomové práce byla:

- Exprese a purifikace rekombinantních proteinů CAR a RXR
- Biofyzikální charakterizace komplexu CAR/RXR
- Krystalizace komplexu CAR/RXR s vazebnými partnery

3. Materiály a přístroje

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

β-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
Agarosa	Serva,
Akrylamid/Bisakrylamid	Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth
Ampicilin	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich
Dihydrogenfosforečnan draselný	Penta
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Penta
Ethidium bromid	Carl Roth
Glukóza	Carl Roth
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan sodný	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný	Penta
Chlorid horečnatý	Penta
Chlorid sodný	Penta
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Carl Roth
Kvasničný extrakt	Carl Roth
Kyselina chlorovodíková	Penta
Kyselina octová	Lachema
Laktóza	Carl Roth
Methanol	Penta
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Ni-NTA agarosa	Protino
Persírán amonný	Sigma-Aldrich

Síran amonný	Penta
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Trypton	Carl Roth

3.1.2 Použité pufrы, roztoky a média

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- **Elektrodový pufr (Tris-glycinový pufr):** 25 mM Tris HCl, pH 8,8; 0,25 M glycin, 0,1% (w/w) SDS,
- **Vzorkový pufr:** 125 mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol, 0,2% (v/v) bromfenolová modř, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-merkaptoethanol
- **Standard molekulových vah:** PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific

Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu

- **Vyvolávací roztok:** 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% (v/v) methanol, 10% kyselina octová

Transformace plazmidovou DNA a proteinové exprese v bakteriích

- **LB médium (Luria-Bertani):** 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1 % (w/v) trypton, 85 mM chlorid sodný
- **ZY médium:** 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 85mM chlorid sodný, 6 mM laktóza, 2,8 mM glukóza, 0,5% (v/v) glycerol, 1 mM MgCl₂, 50 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 25 mM (NH₄)₂SO₄

Izolace proteinů

- **Lyzační pufr:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 3 mM β-merkaptoethanol, 10% glycerol

Afinitní chromatografie na Ni-NTA agarózovém resinu

- **Ekvilibrační pufr:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol
- **Promývací pufr A:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20mM imidazol, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol
- **Promývací pufr B:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 M NaCl, 20 mM imidazol, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol
- **Promývací pufr C:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl, 30 mM imidazol, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol
- **Promývací pufr D:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl, 40 mM imidazol, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol
- **Eluční pufr:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol

Gelová permeační chromatografie

- **Ekvilibrační pufr:** 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM NaCl, 3 mM β -merkptoethanol, 10% glycerol

Komerční sady krystalizačních roztoků

- JCSG I
- JCSG II
- JCSG III
- JCSG IV
- Morpheus
- ProPlex
- Neo

Cirkulární dichroismus

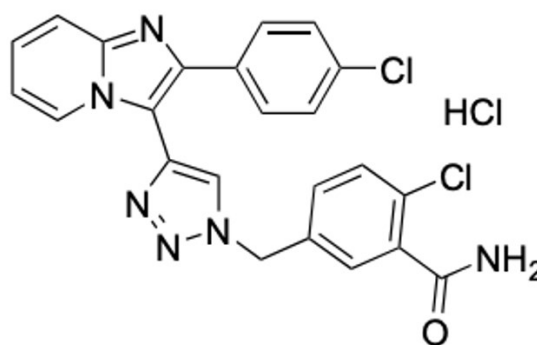
- **PBS pufr:** 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl

Analytická ultracentrifugace

- *Tris pufr*: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM NaCl, 3 mM β -merkaptoethanol

3.1.3 Enzymy, peptidy a ligandy

- *Ulp1*: Proteáza připravená rekombinantně ve školící laboratoři. Obsahuje histidinovou kotvu na N-konci.
- *SRC1*: Peptid syntetizovaný v laboratoři Dr. Pavla Majera na ÚOCHB AV ČR v.v.i. Sekvence peptidu: ERHKILHRLQEG.
- *IV676*HCl*: Agonista CAR receptoru, připravený v laboratoři Mgr. Radima Nencky PhD na ÚOCHB AV ČR v.v.i. Struktura ligandu je vyobrazena na Obr. 5.



Obr. 5 – Struktura ligandu IV676*HCl.

3.1.4 Bakteriální kmeny a expresní plazmidy

Escherichia coli NiCo21 (DE3), New England BioLabs: Chemicky kompetentní buňky *E. coli* odvozené od BL21 (DE3). Rekombinantní proteiny značené polyhistidinovou kotvou, které jsou izolovány pomocí afinitní chromatografie (např. na Ni-NTA nosiči), jsou často kontaminovány endogenními proteiny s afinitou pro nikelnaté ionty. Proteinový expresní kmen NiCo21 (DE3) byl navržen tak, aby minimalizoval kontaminaci endogenními proteiny při afinitní chromatografii.

p209: Plazmid pro heterologní expresi lidského proteinu RXR α (227-456). Obsahuje umělý gen (syntetizovaný firmou Eurofins) kódující RXR α (227-456) v expresním vektoru typu pSUMO. RXR α (227-456) je kontrolován indukovatelným T7 promotorem a při expresi poskytuje proteinový produkt ve formátu: 6xHis (histidinová kotva) – SUMO – RXR α (227-456).

p210: Plazmid pro heterologní expresi lidského proteinu CAR (103-351). Obsahuje umělý gen (syntetizovaný firmou Eurofins) kódující CAR (103-351) v expresním vektoru typu pKUMO. Expresní vektor pKUMO je odvozen z expresního vektoru pRSFD vnešením genu pro SUMO protein. CAR (103-351) je kontrolován indukovatelným T7 promotorem a při expresi poskytuje proteinový produkt ve formátu: 6xHis (histidinová kotva) – SUMO – CAR (103-351).

3.1.5 Ostatní materiál

- **Chromatografický nosič:** HisPurTM Ni-NTA, Thermo Fisher Scientific
- **Koncentrátory:** Amicon® Ultra 3K a Microcon®, Millipore Ireland Ltd.
- **Dialyzační membrána:** Membra-cel® 14 kDa, Carl Roth
- **Krystalizační destičky:** Intelli-plate102-0001-20, Art Robbins Instruments

3.2 Přístroje

Centrifugy

Avanti Centrifuge J30I, rotor JLA-16.250,
Beckmann Coulter

Avanti Centrifuge J-265 XPI, rotor JLA-9.1000,
Beckmann Coulter

Allegra X-15 R Centrifuge, rotor SX47910A,
Beckmann Coulter

Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf

	Optima AUC-Absorbance/Interference, rotor An-50 Ti, Beckmann Coulter
	Centrifuge 5424 R, rotor FA-45-24-11, Eppendorf
FPLC	ÄKTA purifier, GE Healthcare Life Sciences
Sonikátor	QSonica Q700, Sonicator Sonda: model CL-334
Blokový termostat	SBH130D, Stuart
Aparatura pro elektroforézu	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Zdroj PowerPac Basic, Bio-Rad
Krystalizační roboti	CrystalGryphon, Art Robbins Instruments Mosquito Crystal, TTP Labtech
pH metr	HI 3220 pH ORP Meter, Hanna instrument
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick Incubation Mini Shaker, VWR international
Nylonové smyčky	MiTeGen
Vortex	Gene 2, Scientific Industries

Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus, Grant
Předvážky	EMB 500-1, Kern
Analytické váhy	Adventurer Pro, Ohaus
Spektrofotometry	Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop BioPhotometr plus, Eppendorf
Magnetická míchačka	Jenway 1000, Hotplate and Stirrer
Autokláv	Unisteri HP 336-1
Inkubátor	Memmert IPP 400
Rotační míchačka	TubeRoller, Bechmark Scientific Inc.
Sušička	Slab gel dryer model GD 2000, Bio-Rad
Mikroskopy	SZX10, Olympus JANSi UVEX, JAN Scientific Inc.
Rotační anoda	MicroMax™-007 HF Microfocus
CD spektropolarimetr	J-1500, Jasco

4. Metody

4.1 Transformace bakteriálního kmene *Escherichia coli* NiCo21 (DE3) expresními plazmidy

Bakteriální suspenze chemicky kompetentních buněk *E. coli* NiCo21 (DE3) byly transformovány připravenými expresními plazmidy pomocí metody teplotního šoku [33]. Do 100 μ l buněk byl přidán 1 μ l plazmidu a směs byla držena 30 minut na ledu. Následně byla směs 45 sekund inkubována ve vodní lázni o teplotě 42 °C a poté 5 minut na ledu. K takto transformované bakteriální suspenzi bylo přidáno 300 μ l LB média a výsledná směs byla inkubována při teplotě 37 °C v rotačním inkubátoru Incubation Mini Shaker po dobu 1 hodiny.

Po 1 hodině kultivace byla suspenze rozetřena na LB agarovou plotnu s antibiotikem (ampicilin 100 μ g/ml nebo kanamycin 50 μ g/ml v závislosti na expresním plazmidu) a poté byla přes noc ponechána při 37 °C v inkubátoru Memmert IPP 400.

4.2 Heterologní exprese CAR

Jedna kolonie bakterií transformovaných (kapitola 4.1 str. 36) expresním plazmidem *p210* (kapitola 3.1.4 str. 32) byla přenesena do 100 ml LB média s kanamycinem (50 μ g/ml) a byla přes noc kultivována v rotačním inkubátoru Innova 44 při teplotě 37 °C a otáčkách 220 ot./min.

Takto připravené inokulum bylo využito na zaočkování LB médií s kanamycinem (50 μ g/ml). Do 1 l LB média ve 2l Erlenmeyerově baňce bylo přidáno 6 ml inokula. Bakteriální kultury byly poté kultivovány při teplotě 37 °C a otáčkách 220 ot./min v rotačním inkubátoru. Každou hodinu byla na spektrofotometru BioPhotometr plus měřena hodnota OD_{600nm}. Při dosažení hodnoty OD_{600nm} přibližně 0,8 byla indukována exprese přidáním IPTG o výsledné koncentraci 300 μ mol/l. Následně byla ztlumena teplota na 18 °C a kultivace pokračovala přes noc.

Následující den byla kultivace ukončena a buněčná biomasa oddělena centrifugací (5000 ot./min, 8 min, 4 °C, Avanti Centrifuge J-265 XPI, rotor JLA-9.1000). Pelety byly zamrazeny a uloženy v -80 °C.

4.3 Heterologní exprese RXR α

Postup přípravy inokula pro heterologní expresi RXR α byl obdobný jako v případě CAR (kapitola 4.2 str. 36). Jedinou obměnou bylo využití expresního plazmidu *p209* (kapitola 3.1.4 str. 32) s resistencí na ampicilin. Ampicilin byl do 100 ml LB média přidán do finální koncentrace 100 μ g/ml.

Připravené inokulum bylo využito na zaočkování autoindukčních ZY médií s ampicilem (100 μ g/ml). Do 1l ZY média ve 2l Erlenmeyerově baňce bylo přidáno 6 ml inokula. Bakteriální kultury byly poté kultivovány při teplotě 37 °C a otáčkách 220 ot./min v rotačním inkubátoru. Každou hodinu bylo na spektrofotometru BioPhotometr plus měřeno OD_{600nm}. Při dosažení hodnoty OD_{600nm} přibližně 1,0 byla ztlumena teplota na 18 °C a kultivace pokračovala přes noc.

Následující den byla kultivace ukončena a buněčná biomasa oddělena centrifugací (5000 ot./min, 8 min, 4 °C, Avanti Centrifuge J-265 XPI, rotor JLA-9.1000). Pelety byly zamrazeny a uloženy v -80 °C.

4.4 Izolace proteinů

4.4.1 Disrupce buněk

Zamražená buněčná biomasa byla rozmrazena a resuspendována v lyzačním pufu vychlazeném na 4 °C (5 ml/g biomasy). Vzniklá buněčná suspenze byla sonikována na sonikátoru QSonica Q700. Výkon byl nastaven na 60% a buněčná suspenze byla intenzivně chlazená na ledu. Uvolněný cytosol z rozbitých bakteriálních buněk byl oddělen centrifugací (30000 ot./min, 45 min, 4 °C, Avanti Centrifuge J-30I, rotor JLA-16.250).

4.4.2 Chromatografické metody

4.4.2.1 Afinitní chromatografie

Prvním krokem purifikace zkoumaných proteinů byla afinitní chromatografie pomocí Ni-NTA resinu. Resin byl nejprve promyt 50 ml ekvilibračního pufru a poté ho bylo přidáno 5 ml k buněčnému lyzátu. Směs buněčného lyzátu a Ni-NTA resinu byla inkubována na rotační míchačce TubeRoller při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla směs odstředěna (1620 g, 2 min, 4 °C, Allegra X-15 R Centrifuge, rotor SX47910A) a supernatant byl odstraněn. Poté byl resin 3x promyt 50 ml promývacího pufru A, 1x 50 ml promývacího pufru B a znovu 50 ml promývacího pufru A. Oddělení resinu od supernatantu bylo provedeno centrifugací dle výše uvedených parametrů. Takto vyčištěný resin byl nanesen na plastovou kolonku a proteiny z něj byly eluovány 8 ml elučního pufru. Eluát byl posléze analyzován pomocí SDS-PAGE.

4.4.2.2 Štěpení Ulp1 proteázou a afinitní chromatografie

Po prvním purifikačním kroku na Ni-NTA resinu byla od proteinových konstruktů odštěpena histidinová kotva se SUMO proteinem. K proteinovému roztoku získanému v předchozím kroku (kapitola 4.4.2.1 str. 38) byla přidána Ulp1 proteáza v poměru k substrátu 1:50 (v/v). Cílový protein byl štěpen přes noc při 4 °C a posléze byl dialyzován proti ekvilibračního pufru.

Druhým purifikačním krokem, jehož účelem bylo oddělení SUMO proteinu s histidinovou kotvou od zbytku proteinového konstruktu, byla znovu afinitní chromatografie na Ni-NTA resinu. Na kolonku s Ni-NTA resinem promytým ekvilibračním pufrem byl nanesen proteinový roztok. Resin se následně promýval 8 ml promývacích pufrů C a D a 8 ml elučního pufru. Frakce byly sbírány a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.4.2.3 Gelová permeační chromatografie

Třetím purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie. Pro čištění cílových proteinů byly zvoleny kolony HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade o objemu 120 ml, Superdex 75 increase 10/300 GL o objemu 24 ml a Superdex 200 increase 10/300 GL o

objemu 24 ml. Kolona byla připojena na FPLC stanici ÄKTA purifier a následně byla promyta ekvilibračním pufrem. Proteinové roztoky byly nanášeny na kolonu prostřednictvím 5 ml smyčky připojené k FPLC stanici. Eluční profily byly analyzovány spektrofotometricky při 280 nm. Frakce odpovídající jednotlivým vrcholům v chromatogramu byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.5 Elektroforéza

4.5.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE gel se skládal ze zaostřovacího gelu o složení 4% (v/v) Akrylamid/Bisakrylamid (37,5:1); 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$; 0,005% (v/v) TEMED a dělicího gelu o složení 15% (w/v) Akrylamid/Bisakrylamid (37,5:1); 375 mM Tris pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$; 0,001% (v/v) TEMED.

Zpolymerizovaný gel byl umístěn do vertikální polohy do aparatury Mini-PROTEAN Tetra Cell a aparatura byla naplněna elektrodoým pufrem. Proteinové vzorky byly v poměru 1:2 smíchány se vzorkovým pufrem a naneseny na SDS-PAGE společně se standardem molekulových vah. Aparatura byla zapojena do zdroje PowerPac Basic. Elektroforéza probíhala při napětí 220 V a laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny.

Proteiny na SDS-PAGE byly detekovány pomocí barvicího vyvolávacího roztoku a následným odbarvením pomocí destilované vody bylo dosaženo interpretovatelného gelu.

4.5.2 Sušení gelů

Gely byly za účelem dokumentace a archivace sušeny na sušičce slab gel dryer model GD 2000 při teplotě 65 °C po dobu 90 minut.

4.6 Příprava proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1

Vyčištěné proteiny CAR a RXR α byly po posledním kroku purifikace smíchány v molárním poměru 1:1. K proteinové směsi byl přidán dvojnásobný molární nadbytek peptidu SRC1. Směs byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 2 hodin. Následně byla za účelem analýzy vzniklého proteinového komplexu provedena gelová permeační chromatografie (dle kapitoly 4.4.2.3 str. 38) na koloně Superdex 200 increase 10/300 GL. Frakce odpovídající jednotlivým vrcholům v chromatogramu byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (dle kapitoly 4.5.1 str. 39).

4.7 Příprava proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1 s IV676*HCl

K připravenému proteinovému komplexu (dle kapitoly 4.6 str. 40) byl přidán pětinasobný molární nadbytek ligandu IV676*HCl. Následně byla směs odstředěna (10000 ot./min, 10 min, 4 °C, Centrifuge 5424 R, rotor FA-45-24-11) a sediment byl odstraněn.

4.8 Cirkulární dichroismus

Proteinový komplex CAR/RXR α /SRC1 připravený dle kapitoly 4.6 str. 40 byl dialyzován proti PBS pufru a koncentrován na 0,5 mg/ml. Posléze byl proměřen na CD spektropolarimetru J-1500 při délce optické dráhy 0,1 mm. Získaná CD spektra byla použita k výpočtu zastoupení prvků sekundární struktury a tím i ke kontrole správného sbalení proteinového komplexu. Měření bylo provedeno s pomocí pracovníků analytické laboratoře ÚOCHB AV ČR v.v.i.

4.9 Analytická ultracentrifugace

Analytická centrifugace byla provedena za účelem zjištění oligomerních stavů proteinů CAR a RXR α a k charakterizaci proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1. Proteinový komplex CAR/RXR α /SRC1 byl připraven dle kapitoly 4.6 str. 40 ve stechiometrických poměrech CAR:RXR α – 1:1, 1:2 a 2:1. Posléze byl spolu se samotnými proteiny CAR a RXR α dialyzován proti tris pufru pro analytickou ultracentrifugaci. Takto připravené vzorky byly analyzovány metodou sedimentační rychlosti na ultracentrifuze Optima AUC-Absorbance/Interference, rotor An-50 Ti, Beckmann Coulter (480000 ot./min, 20 °C, počet snímků: 400, vlnové délky: 280, 320 nm).

4.10 Proteinová krystalografie

4.10.1 Příprava krystalů

Pro přípravu krystalů byla použita metoda difúze par v uspořádání sedící kapky. Pomocí krystalizačního robota CrystalGryphon bylo pipetováno 70 μ l komerčních krystalizačních roztoků do rezervoárů destiček Intelli-plate102-0001-20. Následně byly krystalizačním robotem Mosquito Crystal připraveny sedící kapky vzniklé smícháním 200 nl CAR/RXR α /SRC1 s IV676*HCl připraveného dle kapitoly 4.7 str. 40 a 200 nl komerčního krystalizačního roztoku z rezervoáru. Takto připravené destičky byly poté přelepeny průhlednou lepicí páskou, aby se zabránilo úniku par.

Pomocí optického mikroskopu Olympus SZX10 byly destičky každé 2 dny kontrolovány. Proteinové krystaly byly zamrazeny v tekutém dusíku.

4.10.2 Měření difrakce

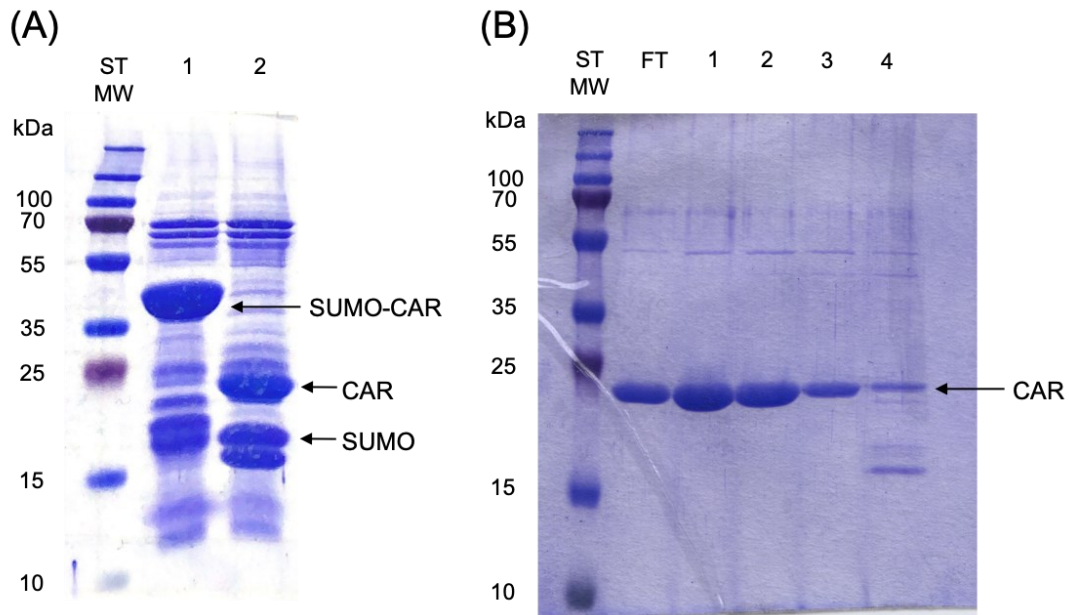
Difrakční experiment byl proveden pomocí měděné rotační anody MicroMaxTM-007 HF Microfocus. Za účelem snížení radiačního poškození byly krystaly kontinuálně chlazeny parami tekutého dusíku na teplotu 100 K.

5. Výsledky

5.1 Exprese a purifikace CAR

Buněčná masa získaná kultivací bakterií *E. coli* NiCo21 (DE3) transformovaných expresním vektorem pro CAR₍₁₀₃₋₃₅₁₎ byla použita k purifikaci proteinu (dle kapitoly 4.2. str. 36.). Proteinový produkt připravený heterologní expresí je fúzní protein ve formátu 6xHis (histidinová kotva) – SUMO – CAR₍₁₀₃₋₃₅₁₎. Samotný protein CAR je dlouhý 248 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 28418 Da.

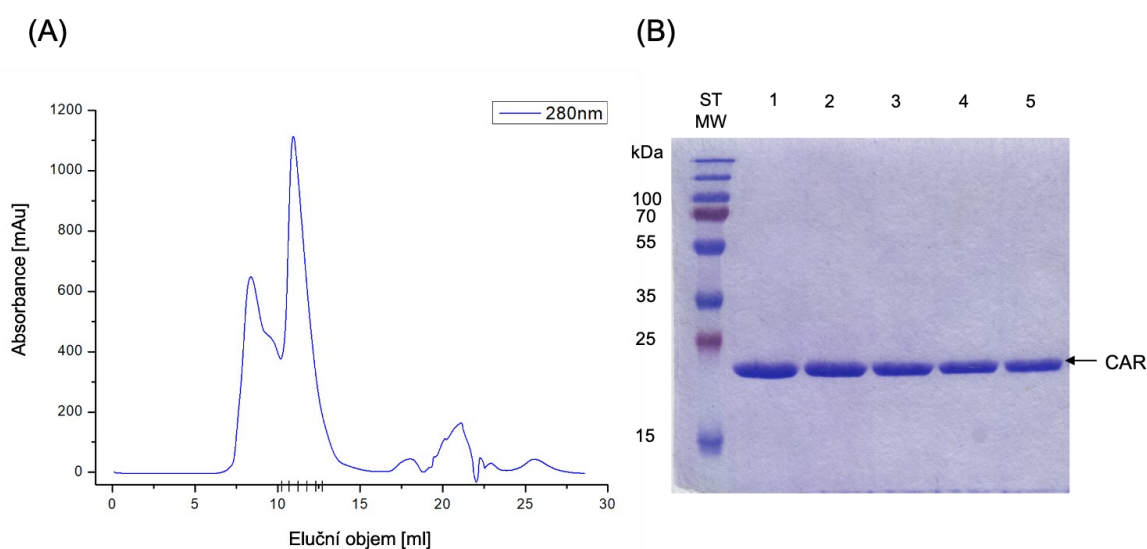
Díky histidinové kotvě na fúzním SUMO – CAR proteinu byla úspěšně k purifikaci použita afinitní chromatografie pomocí Ni-NTA resinu (dle kapitoly 4.4.2.1 str. 38) Čistota eluátu byla kontrolována pomocí SDS-PAGE dle kapitoly 4.5.1 str. 39 (Obr. 6 (A)). K proteinovému vzorku byla přidána Ulp1 proteáza a posléze byl vzorek dialyzován přes noc při 4 °C do ekvilibračního pufru. Vzorek byl poté znovu nanesen na Ni-NTA resin za účelem oddělení odštěpeného SUMO proteinu s histidinovou kotvou od CAR dle kapitoly 4.4.2.2 str. 38). Sbírané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 6 (B)).



Obr. 6 – SDS-PAGE sbíraných frakcí po afinitní chromatografii na Ni-NTA resinu. (A) První purifikační krok s pomocí Ni-NTA resinu. ST MW – standard molekulových hmotností, 1 – eluovaný vzorek před štěpením Ulp1 proteázou, 2 - eluovaný vzorek po

štěpení Ulp1 proteázou. (B) Druhý purifikační krok s pomocí Ni-NTA resinu. ST MW – standard molekulových hmotností, FT – proteklá frakce, 1 – frakce po promytí ekvilibračním pufrém, 2 – frakce po promytí promývacím pufrém C, 3 – frakce po promytí promývacím pufrém D, 4 – frakce po promytí elučním pufrém.

Frakce FT, 1, 2 a 3 obsahující odštěpený cílový protein CAR byly spojeny a koncentrovány pomocí koncentrátoru Amicon® Ultra 3K. Protein byl dále čištěn gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 75 increase 10/300 GL dle kapitoly 4.4.2.3 str. 38. Eluční profil je vyobrazený na Obr. 7 (A). Vrchol při elučním objemu 11,3 ml byl analyzován na SDS-PAGE (Obr. 7 (B)).

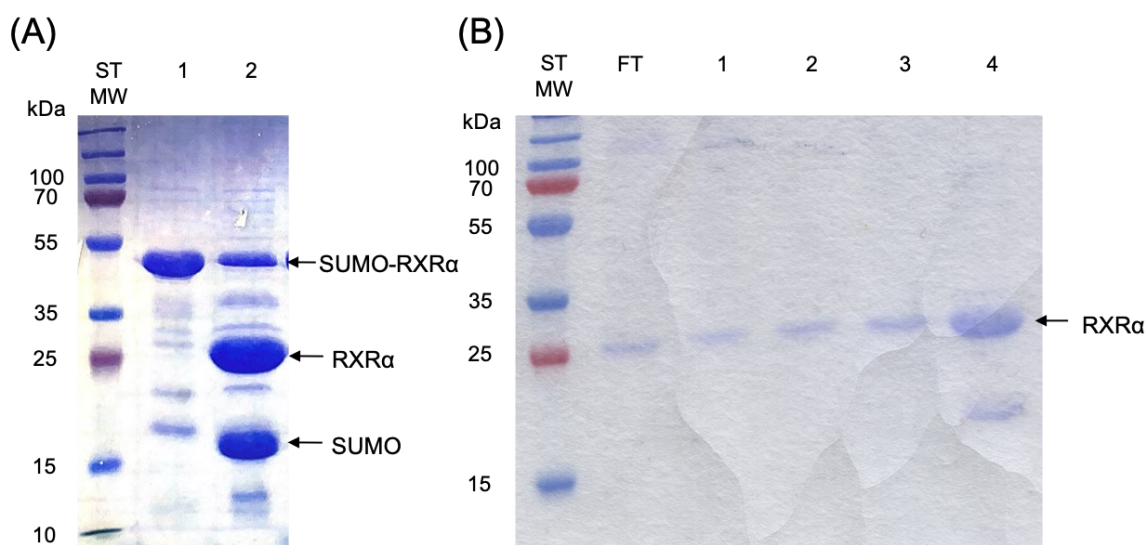


Obr. 7 – (A) Chromatogram z gelové permeační chromatografie. Vertikálními čárkami na ose elučního objemu jsou vyznačeny analyzované frakce (1-5). (B) SDS-PAGE frakcí 1-5, ST MW – standard molekulových hmotností

5.2 Exprese a purifikace RXR α

Buněčná masa získaná kultivací bakterií *E. coli* NiCo21 (DE3) transformovaných expresním vektorem pro RXR α (227-456) byla použita k purifikaci proteinu (dle kapitoly 4.3 str. 37). Proteinový produkt připravený heterologní expresí je fúzní protein ve formátu 6xHis (histidinová kotva) – SUMO – RXR α (227-456). Samotný protein CAR je dlouhý 229 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 26476 Da.

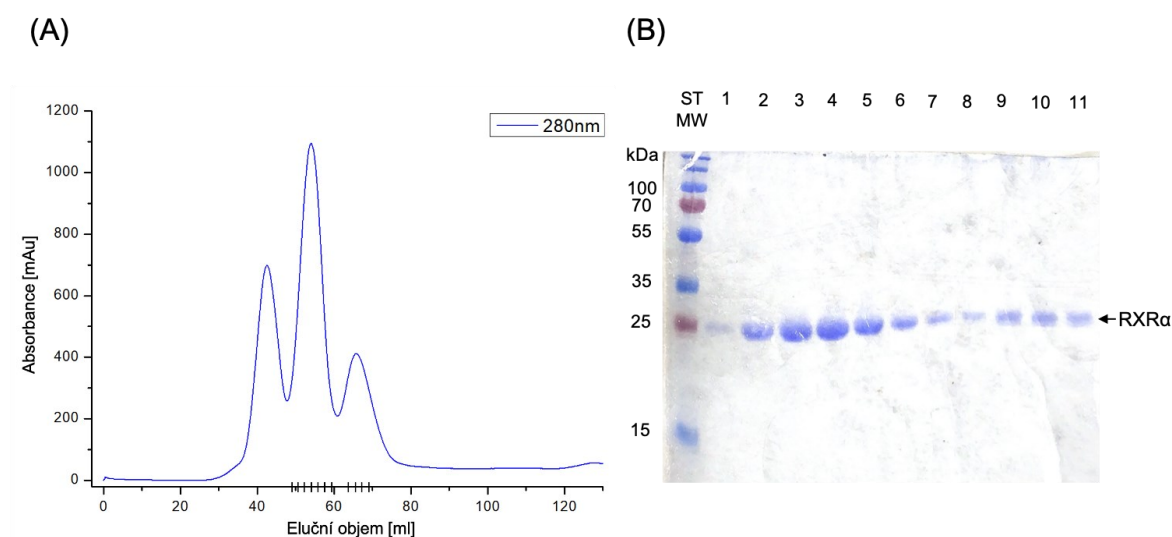
Díky histidinové kotvě na fúzním SUMO – RXR α proteinu byla úspěšně k purifikaci použita afinitní chromatografie pomocí Ni-NTA resinu (dle kapitoly 4.4.2.1 str. 38). Čistota eluátu byla kontrolována pomocí SDS-PAGE (Obr. 8 (A)). K proteinovému vzorku byla přidána Ulp1 proteáza a posléze byl vzorek dialyzován přes noc při 4 °C do ekvilibračního pufru. Vzorek byl poté znovu nanesen na Ni-NTA resin za účelem oddělení odštěpeného SUMO proteinu s histidinovou kotvou od RXR α (dle kapitoly 4.4.2.2 str. 38). Sbírané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 8 (B)).



Obr. 8 – SDS-PAGE sbíraných frakcí po afinitní chromatografii na Ni-NTA resinu. (A) První purifikační krok s pomocí Ni-NTA resinu. ST MW – standard molekulových hmotností, 1 – eluovaný vzorek před štěpením Ulp1 proteázou, 2 - eluovaný vzorek po štěpení Ulp1 proteázou. (B) Druhý purifikační krok s pomocí Ni-NTA resinu. ST MW – standard molekulových hmotností, FT – proteklá frakce, 1 – frakce po promytí ekvilibračním pufrem, 2 – frakce po promytí promývacím pufrem C, 3 – frakce po promytí promývacím pufrem D, 4 – frakce po promytí elučním pufrem.

Frakce FT, 1, 2 a 3 obsahující odštěpený cílený protein RXR α byly spojeny a koncentrovány pomocí koncentrátoru Amicon® Ultra 3K. Protein byl dále čištěn gelovou permeační chromatografií na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade dle kapitoly 4.4.2.3 str. 38. Eluční profil je vyobrazený na Obr. 9 (A). Vrcholy při elučních objemech 56 ml a 67 ml

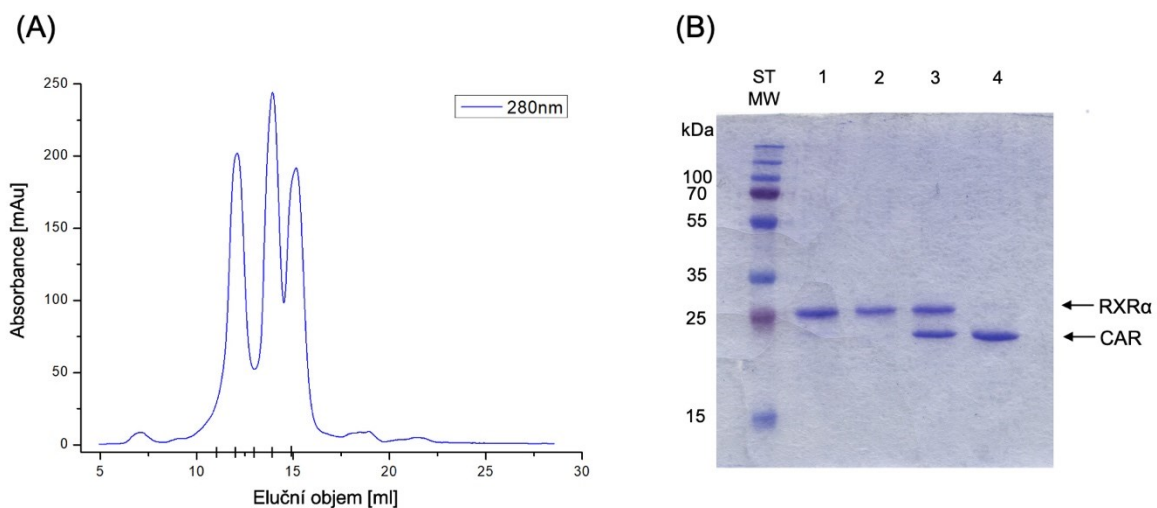
byly analyzovány na SDS-PAGE (Obr. 9 (B)). Vrchol při elučním objemu 56 ml dle kalibrace kolony odpovídá dimeru a vrchol při 67 ml monomeru.



Obr. 9 – (A) Chromatogram z gelové permeační chromatografie. Vertikálními čárkami na ose elučního objemu jsou vyznačeny analyzované frakce (1-11). Vrchol při elučním objemu 56 ml dle kalibrace kolony odpovídá dimeru a vrchol při 67 ml monomeru. **(B)** SDS-PAGE frakcí 1-11, ST MW – standard molekulových hmotností.

5.3 Příprava proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1 a jeho biofyzikální charakterizace

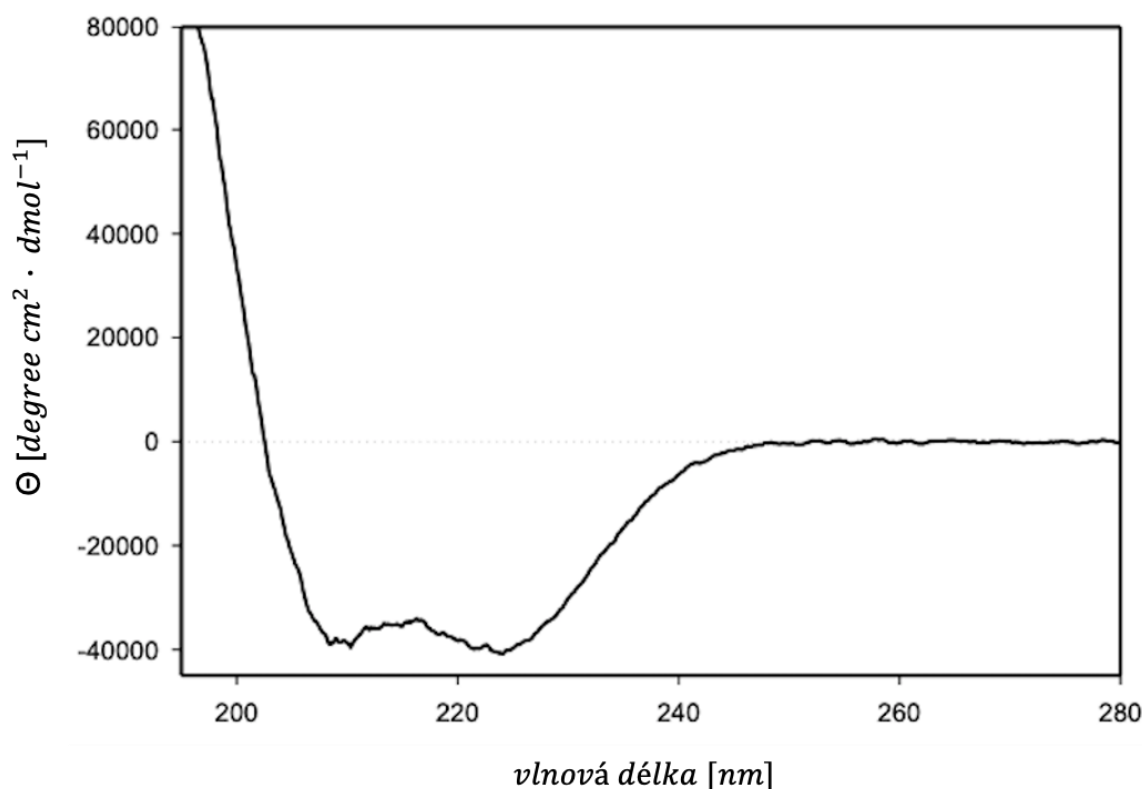
Vyčištěné proteiny CAR a RXR α byly koncentrovány pomocí koncentrátoru Amicon® Ultra 3K na koncentraci 1,5 mg/ml a smíchány s peptidem SRC1 dle kapitoly 4.6 str. 40. Za účelem oddělení vytvořeného proteinového komplexu od volných proteinů a peptidu SRC1 bylo využito gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 increase 10/300 GL. Eluční profil je vyobrazen na Obr. 10 (A). Vrcholy byly analyzovány na SDS-PAGE (Obr. 10 (B)). Vrchol při elučním objemu 12,9 ml dle kalibrace kolony odpovídá tetrameru RXR α , vrchol při 14,3 ml vytvořenému komplexu CAR/RXR α /SRC1 a vrchol při 16 ml monomeru CAR.



Obr. 10 – (A) Chromatogram z gelové permeační chromatografie. Vertikálními čárkami na ose elučního objemu jsou vyznačeny analyzované frakce (1-4). **(B)** SDS-PAGE frakcí 1-4. 1,2 - tetramer RXR α , 3 - komplex CAR/RXR α /SRC1, 4 - monomer CAR, ST MW - standard molekulových hmotností.

5.3.1 CD spektroskopie

Za účelem výpočtu zastoupení prvků sekundární struktury a tím i ke kontrole správného sbalení proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1 bylo změřeno spektrum cirkulárního dichroismu (dle kapitoly 4.8 str. 40). Dle výpočtu je sekundární struktura komplexu tvořena z 99% helixy a 1% je nestrukturované. CD spektrum je vyobrazeno na Obr. 11.



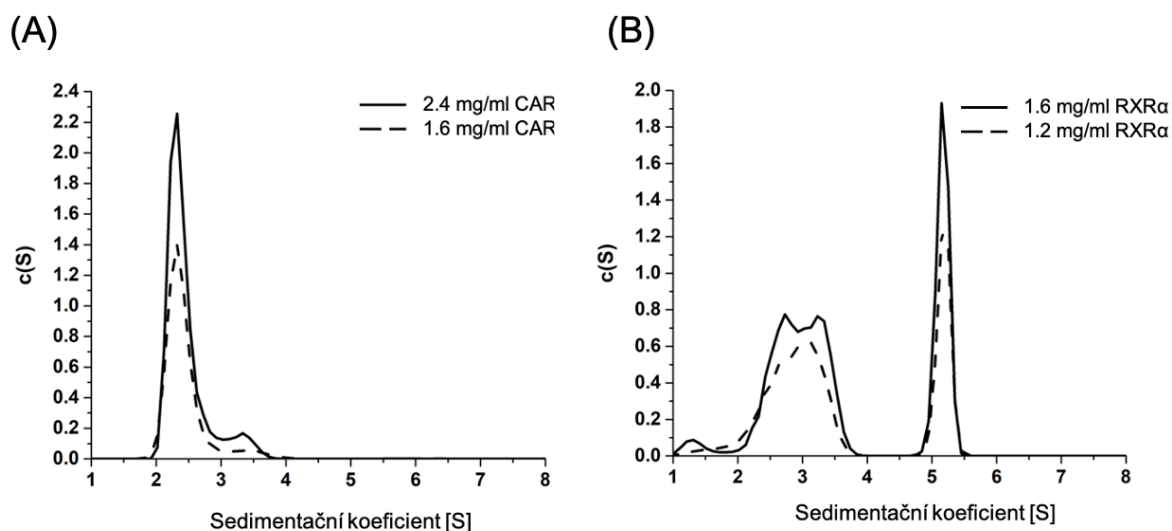
Obr. 11 – Graf závislosti molární elipticity na vlnové délce proteinové komplexu CAR/RXR α /SRC1. Složení prvků sekundárních struktur: 99% helix, 1% nestrukturované.

5.3.2 Analytická ultracentrifugace

Pro zjištění oligomerních stavů proteinů CAR a RXR α a k charakterizaci proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1 byly vzorky měřeny na analytické ultracentrifuge metodou sedimentační rychlosti (dle kapitoly 4.9 str. 41). Data byla analyzována v programu Sedfit. Výsledkem analýzy vzorků jsou grafy distribucí sedimentačních koeficientů $c(S)$, které ukazují na zastoupení částic s danými sedimentačními koeficienty ve vzorcích. Integrací ploch pod vrcholy distribucí byly určeny hodnoty sedimentačních koeficientů.

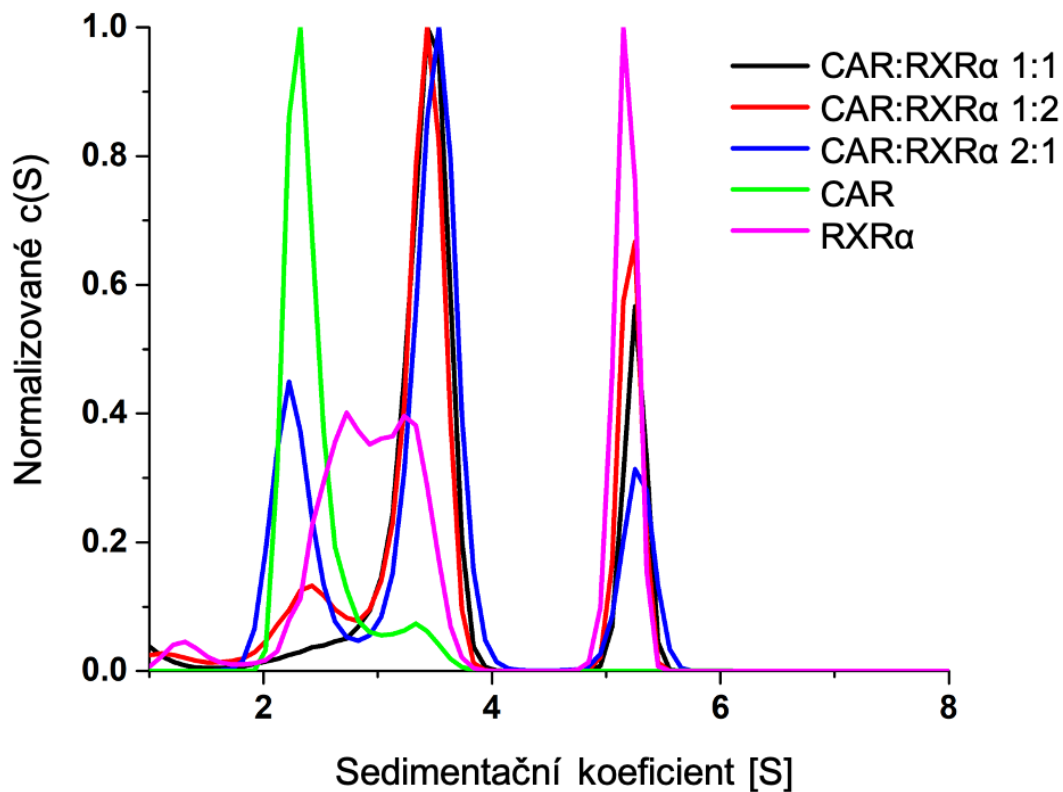
CAR byl měřen při koncentracích 1,6 mg/ml a 2,4 mg/ml. Vykazoval dva vrcholy. První vrchol se sedimentačním koeficientem 2,4 S odpovídá monomeru. Druhý, menší, vrchol se sedimentačním koeficientem 3,4 S odpovídá dimeru. Graf je vyobrazen na Obr. 12 (A).

RXR α byl měřen při koncentracích 1,2 mg/ml a 1,6 mg/ml. Vykazoval tři vrcholy. První vrchol se sedimentačním koeficientem 2,6 S odpovídá monomeru. Druhý vrchol se sedimentačním koeficientem 3,3 S odpovídá dimeru. Třetí vrchol se sedimentačním koeficientem 5,2 S odpovídá tetrameru. Graf je vyobrazen na Obr. 12 (B). Pozorované výsledky jsou v souladu s předchozími experimenty (Obr. 9 a Obr. 10).



Obr. 12 – Grafy distribucí sedimentačních koeficientů $c(S)$, které ukazují na zastoupení částic s danými sedimentačními koeficienty ve vzorcích. **(A)** CAR - první vrchol má hodnotu sedimentačního koeficientu 2,4 S a druhý 3,4 S. **(B)** RXR α - první vrchol má hodnotu sedimentačního koeficientu 2,6 S, druhý 3,3 S a třetí 5,2 S.

Proteinový komplex CAR/RXR α /SRC1 byl připraven dle kapitoly 4.6 str. 40 ve stechiometrických poměrech CAR:RXR α – 1:1, 1:2 a 2:1 a následně proměřen. Naměřené hodnoty naznačují existenci komplexu pouze ve stechiometrickém poměru 1:1 (Obr. 13). Pro přehlednost výsledků byly hodnoty distribucí sedimentačních koeficientů $c(S)$ normalizovány.



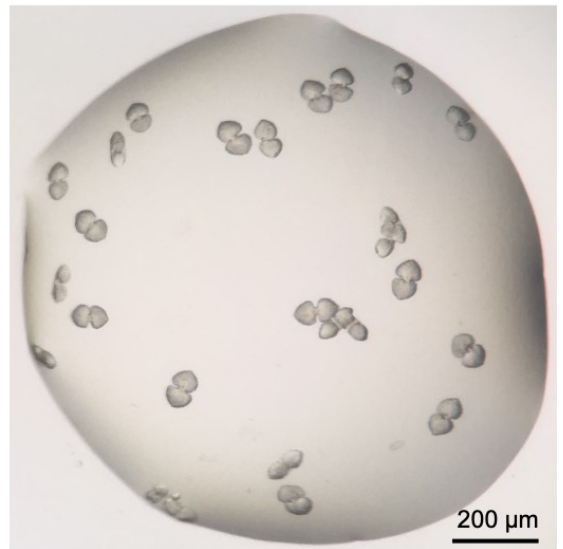
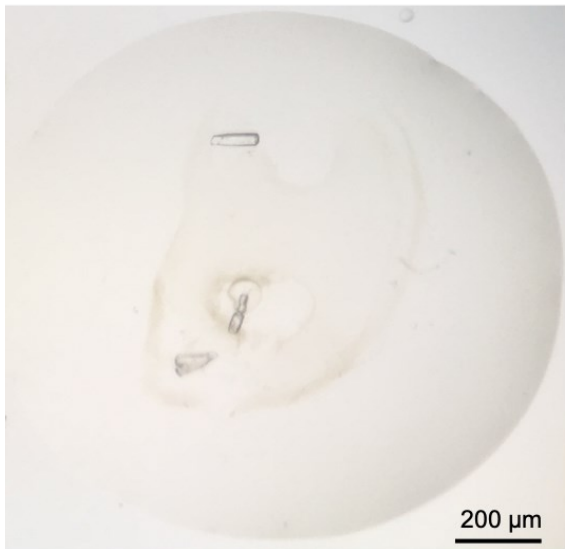
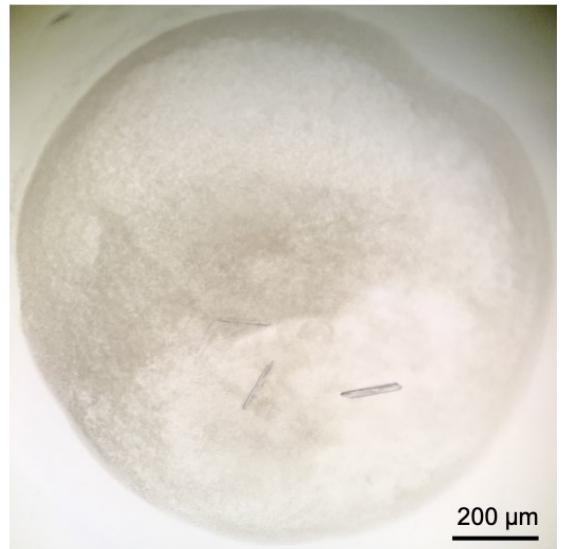
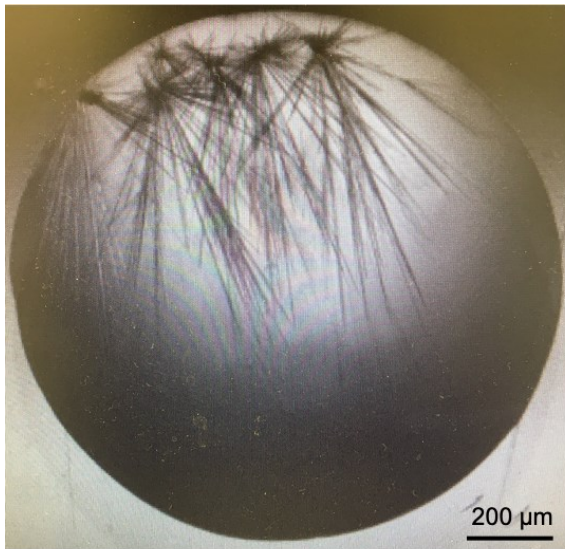
Obr. 13 – Překryté grafy normalizovaných distribucí sedimentačních koeficientů $c(S)$, které ukazují na zastoupení částic s danými sedimentačními koeficienty ve vzorcích. Černou barvou je vyobrazen proteinový komplex CAR/RXR α /SRC1 ve stechiometrickém poměru CAR:RXR α – 1:1, červenou ve stechiometrickém poměru CAR:RXR α – 1:2, modrou ve stechiometrickém poměru CAR:RXR α – 2:1, zelenou barvou je vyobrazen CAR a růžovou RXR α .

5.3.3 Příprava krystalů proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1 s ligandem IV676*HCl

Připravený proteinový komplex CAR/RXR α /SRC1 s inkorporovaným ligandem IV676*HCl (dle kapitoly 4.7 str. 40) byl koncentrován na koncentraci 3 mg/ml a použit pro přípravu krystalů dle kapitoly 4.10.1 str. 41. Krystalizační destičky byly kontrolovány každé dva dny. Po dvou týdnech nebyly nalezeny žádné krystaly. Kapky v krystalizačních destičkách byly čiré, bez viditelné precipitace.

Proteinový komplex CAR/RXR α /SRC1 s inkorporovaným ligandem IV676*HCl byl poté postupně koncentrován na koncentraci 5 mg/ml, 7 mg/ml a 10 mg/ml. V těchto koncentracích byl znovu použit pro přípravu krystalů. Při koncentraci 10 mg/ml bylo v krystalizační destičce přibližně 50% kapek s viditelnou precipitací. Po 8 dnech vyrostly viditelné krystaly (Obr. 14).

Krystaly byly kontrolovány pomocí mikroskopu. Posléze byly pomocí krystalografických smyček vyloveny a zamraženy v tekutém dusíku. Následně byly provedeny difrakční experimenty na měděné rotační anodě dle kapitoly 4.10.2 str. 41. Při experimentech nebyla pozorovaná žádná difrakce.



Obr. 14 – Krystaly získané v podmínke s CAR/RXR α /SRC1 a ligandem IV676*HCl

6. Diskuse

V rámci diplomové práce byly úspěšně připraveny rekombinantní proteiny CAR a RXR α (viz kapitola 5.1 str. 42 a 5.2 str. 43) v dostatečném množství a čistotě pro strukturní a biofyzikální studie. Následně bylo ověřeno, že tyto proteiny spolu tvoří komplex (viz kapitola 5.3 str. 45).

Z naměřeného spektra cirkulárního dichroismu bylo vypočteno zastoupení prvků sekundárních struktur (Obr. 11 str. 47). Sekundární struktura komplexu CAR/RXR α /SRC1 byla tvořena z 99% helixy a 1% bylo nestrukturované, jak bylo předpokládáno na základě známé krystalové struktury. Toto pozorování bylo v souladu s předpokladem, že komplex CAR/RXR α /SRC1 je správně sbalený [32].

Určení oligomerního stavu námi připraveného komplexu CAR/RXR α a jednotlivých proteinů bylo provedeno metodou sedimentační rychlosti na analytické ultracentrifuze. Získaná data byla analyzována v programu Sedfit. Integrací ploch pod vrcholy distribucí byly určeny hodnoty sedimentačních koeficientů a zjištěny oligomerní stavy proteinů CAR a RXR α . CAR vykazoval vrcholy se sedimentačními koeficienty 2,4 S odpovídající monomeru a 3,4 S odpovídající dimeru (Obr. 12 (A) str. 48). RXR α vykazoval tři vrcholy se sedimentačními koeficienty 2,6 S odpovídající monomeru, 3,3 S odpovídající dimeru a 5,2 S odpovídající tetrameru (Obr. 12 (B) str. 48). Analyzovaná sedimentační data proteinového komplexu CAR/RXR α /SRC1 připraveného ve stechiometrických poměrech CAR:RXR α – 1:1, 1:2 a 2:1 naznačují, že komplex existuje pouze ve stechiometrickém poměru 1:1 (Obr. 13 str. 49), jak naznačuje dřívější krystalografická studie [32].

Krystaly získané z roztoku obsahujícího proteiny CAR/RXR α /SRC1 a ligand IV676*HCl byly zamrazeny v tekutém dusíku a připraveny pro difrakční experiment (viz kapitola 5.3.3 str. 50). Při difrakčním experimentu na měděné rotační anodě nebyla pozorována žádná difrakce. To naznačuje, že se jedná o makromolekulární krystaly. Nízkomolekulární látky jako např. anorganické soli mají vždy vysoce uspořádanou krystalovou mřížku a vykazují difrakci. Určení složení připravených krystalů pomocí difrakčního experimentu nebylo možné.

7. Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo detailně popsat, na atomární úrovni, interakci ligandu IV676*HCl s konstitutivním androstanovým receptorem. Dílčími cíli proto byla příprava rekombinantních proteinů CAR a RXR α , ověření správného sbalení připravených rekombinantních proteinů, jejich biofyzikální charakterizace, zejména zjištění oligomerních stavů proteinu CAR a RXR α 1 a příprava krystalů komplexu CAR/RXR α /SRC1 s ligandem IV676*HCl pro difrakční experiment.

Připravené proteiny byly využity na přípravu proteinového komplexu CAR/RXR α s peptidem SRC1. Následně bylo z dat cirkulárního dichroismu vypočteno zastoupení prvků sekundárních struktur a tím i ověřena správnost sbalení proteinů. Pomocí analytické ultracentrifugace byly zjištěny jejich oligomerní stavy a dále pak určen stechiometrický stav komplexu CAR/RXR α /SRC1.

Podářilo se připravit proteinové krystaly, které však nevykazovaly při difrakčním experimentu difrakci.

8. Seznam použité literatury

1. Gustafsson, J.A., *Historical overview of nuclear receptors*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016. **157**: p. 3-6.
2. Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia, and V. Laudet, *The nuclear receptor superfamily*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 585-6.
3. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 518-30.
4. Lonard, D.M. and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(10): p. 598-604.
5. Malek, G. and E.M. Lad, *Emerging roles for nuclear receptors in the pathogenesis of age-related macular degeneration*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(23): p. 4617-36.
6. Oyekan, A., *PPARs and their effects on the cardiovascular system*. Clin Exp Hypertens, 2011. **33**(5): p. 287-93.
7. Ranhotra, H.S., *The orphan nuclear receptors in cancer and diabetes*. J Recept Signal Transduct Res, 2013. **33**(4): p. 207-12.
8. Mazaira, G.I., et al., *The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges*. Nucl Receptor Res, 2018. **5**.
9. Kumar, R. and I.J. McEwan, *Allosteric modulators of steroid hormone receptors: structural dynamics and gene regulation*. Endocr Rev, 2012. **33**(2): p. 271-99.
10. Rastinejad, F., et al., *Understanding nuclear receptor form and function using structural biology*. J Mol Endocrinol, 2013. **51**(3): p. T1-T21.
11. Nedumaran, B., et al., *Orphan nuclear receptor DAX-1 acts as a novel corepressor of liver X receptor alpha and inhibits hepatic lipogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 9221-32.
12. Ortlund, E.A., et al., *Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 357-63.
13. Weikum, E.R., X. Liu, and E.A. Ortlund, *The nuclear receptor superfamily: A structural perspective*. Protein Sci, 2018. **27**(11): p. 1876-1892.
14. Jacobsen, B.M. and K.B. Horwitz, *Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **357**(1-2): p. 18-29.

15. Hoivik, E.A., et al., *Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1)*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **315**(1-2): p. 27-39.
16. Amoutzias, G.D., et al., *A protein interaction atlas for the nuclear receptors: properties and quality of a hub-based dimerisation network*. BMC Syst Biol, 2007. **1**: p. 34.
17. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 950-64.
18. Mangelsdorf, D.J., et al., *Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway*. Nature, 1990. **345**(6272): p. 224-229.
19. Germain, P., et al., *International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(4): p. 760-72.
20. Yu, V.C., et al., *RXR β : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1251-1266.
21. Glass, C.K., *Differential Recognition of Target Genes by Nuclear Receptor Monomers, Dimers, and Heterodimers**. Endocrine Reviews, 1994. **15**(3): p. 391-407.
22. Mader, S., et al., *The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains*. The EMBO journal, 1993. **12**(13): p. 5029-5041.
23. Altucci, L. and H. Gronemeyer, *The promise of retinoids to fight against cancer*. Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(3): p. 181-193.
24. Thacher, S., J. Vasudevan, and R.A.S. Chandraratna, *Therapeutic Applications for Ligands of Retinoid Receptors*. Current pharmaceutical design, 2000. **6**: p. 25-58.
25. di Masi, A., et al., *Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(5): p. 297-343.
26. Swales, K. and M. Negishi, *CAR, driving into the future*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(7): p. 1589-98.
27. Konno, Y., M. Negishi, and S. Kodama, *The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism*. Drug Metab Pharmacokinet, 2008. **23**(1): p. 8-13.
28. Wada, T., J. Gao, and W. Xie, *PXR and CAR in energy metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(6): p. 273-9.

29. Gao, J., et al., *The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25984-92.
30. Mutoh, S., et al., *Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling*. Science signaling, 2013. **6**(274): p. ra31-ra31.
31. Mutoh, S., et al., *Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling*. Sci Signal, 2013. **6**(274): p. ra31.
32. Xu, R.X., et al., *A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXR β ; Heterodimer*. Molecular Cell, 2004. **16**(6): p. 919-928.
33. Froger, A. and J. Hall, *Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2007. **6**: p. 253.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka