

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ MARTINI

**INTERAKCIJA MED PERIOD 2 IN KONSTITUTIVNIM  
ANDROSTANSKIM RECEPTORJEM**

INTERACTION BETWEEN PERIOD 2 AND CONSTITUTIVE ANDROSTANE  
RECEPTOR

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo sem opravljal v Centru za funkcijsko genomiko in biočipe (CFGBC) na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Damjane Rozman, univ. dipl. kem.

### **Zahvala**

Za strokovno pomoč, svetovanje, usmerjanje, teoretično predstavitev eksperimentalnih metod, potrpežljivost in zaupanje in kritično vrednotenje raziskovalnega dela se zahvaljujem somentorici prof. dr. Damjani Rozman, univ. dipl. kem. Za organizacijo izvedbe diplome na CFGBC in svetovanje se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Za usmerjanje med praktičnim delom, demonstracijo eksperimentalnih metod, organizacijo eksperimentalnega dela in odstop lastnih reagentov se zahvaljujem delovnim mentoricama dr. Uršuli Prosenc Zmrzljak, univ. dipl. biol., in dr. Mateji Hafner, univ. dipl. mikro.

Iskrena zahvala gre prof. dr. Juretu Stojanu, dr. med., ki je nesebično in z veliko razumevanja pomagal pri raziskovanju proteinskih interakcij *in silico* in mi dal obširne smernice za nadaljnje delo ter podal svoje videnje interakcije med preiskovanima proteinoma. Namenil mi je veliko svojega časa, se mi posvetil in mi ne samo odgovoril na vprašanja, ampak mi je podal tudi veliko znanja, ki mi bo koristilo v prihodnosti. Poleg tega je demonstriral izvedbo molekulske dinamike in omogočil njeno izvedbo na svoji strojni opremi.

Zahvalil bi se tudi vsem ostalim iz CFGBC, ki so mi med delom večkrat pomagali z nasveti in izkušnjami ter odgovarjali na moja pogosta vprašanja, hkrati pa so mi omogočili opravljanje diplomske naloge v prijetnem in sproščenem vzdušju. Na tem mestu bi izpostavil ddr. Jureta Ačimoviča, ki me je vodil pri statistični obdelavi eksperimentalnih rezultatov, dr. Nino in Nušo Trošt ter Žiga Urlepa za veliko pomoč pri delu v celičnem laboratoriju in transfekcijah.

Za pomoč pri praktični izvedbi in organizaciji luminiscenčnih meritev na Fakulteti za farmacijo gre zahvala dr. Matjažu Ravnikarju, mag. farm., in dr. Martini Gobec, mag. farm.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm., in prof. dr. Damjane Rozman, univ. dipl. kem.

## 1. VSEBINA (VSEBINSKO KAZALO)

2. Povzetek .....	6
3. Abstract.....	7
4. Okrajšave .....	8
5. Uvod .....	10
5.1. Cirkadiani ritem .....	10
5.2. Zaporedje LXXLL pri koaktivatorjih jedrnih receptorjev .....	13
5.3. Period 2 .....	15
5.4. Konstitutivni androstanski receptor .....	17
5.5. BMAL1 .....	19
5.6. Peroksisomski proliferativni receptor alfa .....	19
5.7. Peroksisomski proliferativni receptor gama .....	20
5.8. Retinoidni X receptor $\alpha$ .....	20
6. Namen dela, načrt in hipoteze .....	21
6.1. Hipoteze: .....	21
6.2. Predhodni rezultati .....	21
6.3. Načrt dela .....	21
7. Metode in materiali.....	23
7.1. Raztopine .....	23
7.2. Delo z bakterijami.....	24
7.2.1. Priprava tekočega LB (Luria-Bertani) gojišča.....	24
7.2.2. Priprava trdnega LB (Luria-Bertani) gojišča.....	24
7.2.3. Priprava kompetentnih bakterij .....	25
7.2.4. Plazmidi .....	25
7.2.5. Transformacija kompetentnih bakterij s plazmidi in inokulacija bakterij .....	26
7.2.6. Priprava prekonočnih kultur bakterijskih celic.....	26
7.3. Izolacija plazmidov iz prekonočnih kultur bakterijskih celic in njihovo vrednotenje	26
7.3.1. Spektrofotometrično vrednotenje koncentracije in čistote plazmidov .....	26
7.3.2. Gelska elektroforeza .....	27
7.4. Delo s sesalskimi celicami .....	27

7.4.1.	Priprava medija DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) .....	27
7.4.2.	Priprava celic .....	28
7.4.3.	Precepljanje celic .....	28
7.4.4.	Štetje celic.....	28
7.4.5.	Transfekcija Hepa 1-6 celic .....	29
7.4.6.	Liza celic in priprava na analizo.....	29
7.4.7.	Analiza betagalaktozidazne aktivnosti .....	29
7.4.8.	Analiza luciferazne aktivnosti .....	30
7.5.	Študij sprememb izražanja <i>Bmal1</i> v celicah, kotransfeciranih s <i>Per2</i> in <i>Car</i> .....	30
7.6.	In silico metode.....	31
7.6.1.	Izbira in priprava ustreznih kristalnih struktur proteinov za nadaljnje delo.....	31
7.6.2.	Pregled sorodnosti LXXLL zaporedij PER2 z zaporedji LXXLL koaktivatorjev CAR .....	31
7.6.3.	Postavljanje drugega LXXLL zaporedja PER2 na CAR in pregled ter vrednotenje rezultatov .....	32
8.	Rezultati.....	34
8.1.	Povišanje izražanja <i>Bmal1</i> po kotransfekciji mišjih hepatokarcinomskih celic s <i>Per2</i> in <i>Car</i> .....	34
8.2.	Sorodnost LXXLL zaporedij PER2 z zaporedji LXXLL znanih koaktivatorjev CAR ..	36
8.2.1.	Negativni rezultati pregleda koaktivatorjev, za katere je znana kristalna struktura s CAR .....	36
8.2.2.	Pozitivni rezultati pregleda koaktivatorjev, za katere ni znana kristalna struktura s CAR .....	38
8.3.	Rezultat pregleda drugemu LXXLL zaporedju PER2 sorodnega zaporedja pri PGC1 $\alpha$ in njegovega vezavnega mesta na PPAR $\gamma$ .....	39
8.4.	Izdelava drugega LXXLL zaporedja PER2 in njegova postavitve v vezavno mesto CAR .....	42
8.5.	Preverjanje kompleksa drugega LXXLL zaporedja PER2 in CAR z molekularno dinamiko.....	44
9.	Razprava.....	46

10.	Sklepi.....	51
11.	Literatura .....	52
12.	Kazalo slik.....	59

## 2. POVZETEK

Protein period 2 (PER2) je eden izmed ključnih akterjev tvorbe cirkadianih ritmov v sesalskih celicah, medtem ko je konstitutivni androstanski receptor (CAR) eden ključnih elementov metabolizma lipofilnih molekul, saj z njimi interagira, kar sproži izražanje citokromov P450, ki so odgovorni za oksidacijo teh lipofilnih molekul.

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti, ali obstaja interakcija med proteinoma PER2 in CAR, ki bi povezala metabolizem in cirkadiani ritem. Za doseg cilja smo izvedli kotransfekcije mišjih hepatokarcinomskih Hepa 1-6 celic s plazmidoma, ki kodirata PER2 in CAR, in spremljali spremembe v izražanju izbranega gena cirkadianega ritma – *Bmal1*. Sprememba izražanja tega gena pomeni spremembo v cirkadianem ritmu.

*Bmal1* smo sklopili z genom za luciferazo. Encimska aktivnost luciferaze nam je služila kot merilo izražanja *Bmal1*. Izražanje *Bmal1* se je po kotransfekciji celic s *Per2* in *Car* povečalo.

Možnost neposredne interakcije med period 2 in konstitutivnim androstanskim receptorjem smo preverili tudi *in silico* z iskanjem zaporedij, prek katerih bi lahko proteina interagirala. Ker je PER2 koaktivator jedrnih receptorjev, smo analizirali njegovi LXXLL zaporedji, pregledali in analizirali pa smo tudi LXXLL zaporedja znanih koaktivatorjev CAR. Ugotovili smo, da obstaja podobnost med drugim LXXLL zaporedjem PER2 in LXXLL zaporedji znanih koaktivatorjev CAR. Na podlagi tega pregleda in analize smo s pomočjo upoštevanja strukturnih podobnosti LXXLL zaporedij *in silico* ustvarili LXXLL zaporedje PER2. Ob upoštevanju znanih kristalnih struktur jedrnih receptorjev in koaktivatorjev smo predlagali način neposredne interakcije med proteinoma, predlog pa smo podkrepili tudi z molekularno dinamiko.

Predlagali smo metode za izdelavo *in silico* modela kompleksa CAR in večjega strukturnega dela PER2 okrog drugega LXXLL zaporedja. Takšne strukture PER2 še ni na voljo. Omenjen model bi lahko tudi dodatno potrdil našo predlagano neposredno interakcijo med PER2 in CAR.

### 3. ABSTRACT

Period 2 (PER2) is one of the key proteins in circadian rhythms in mammalian cells while the constitutive androstane receptor (CAR) as one of the key elements in metabolism of lipophilic molecules interacts with these. This causes expression of cytochromes P450 and oxidation of lipophilic molecules.

Our goal was to find whether PER2 and CAR interact as this would establish a new connection between the circadian rhythm and metabolism. To achieve this we cotransfected mouse hepatocarcinoma Hepa 1-6 cells with plasmids which code PER2 and CAR and monitored changes in expression of a chosen circadian gene – *Bmal1*. A change in expression of this gene means that there is a change in the circadian rhythm.

*Bmal1* was fused with a luciferase gene. The enzyme activity of luciferase served as a measure of expression of *Bmal1*. The expression was upregulated after the cotransfection with *Per2* and *Car*.

The possibility of a direct interaction between PER2 and CAR was examined with *in silico* methods. We searched for potential structural elements that could explain a protein-protein interaction. Because PER2 is a cofactor of nuclear receptors we analysed PER2's LXXLL motifs. We also analysed LXXLL motifs of known CAR coactivators. A similarity was found between the second LXXLL motif of PER2 and LXXLL motifs of known coactivators of CAR. On the basis of this similarity we created a LXXLL motif of PER2 *in silico*. After searching through known crystal structures of nuclear receptors and their cofactors we suggested a direct interaction between PER2 and CAR. This model was favoured by molecular dynamics.

We also suggested methods for making an *in silico* model of the complex of CAR and a bigger portion of PER2 that contains the second LXXLL motif. Such a crystal structure of PER2 has not been published yet. This model could also additionally back our suggestion of the interaction between PER2 and CAR.

#### 4. OKRAJŠAVE

<i>Bgal</i>	gen, ki kodira betagalaktozidazo
BGAL	betagalaktozidaza
<i>Bmal</i>	tekmo diplomskega dela <i>Bmal1</i> sklopljen z genom za luciferazo
<i>Bmal1</i>	gen, ki kodira BMAL1 (drugo ime ARNTL)
BMAL1	protein BMAL1 (drugo ime ARNTL)
<i>Car</i>	gen <i>Nr1i3</i> , ki kodira konstitutivni androstanski receptor (CAR)
CAR	konstitutivni androstanski receptor
<i>Clock</i>	gen, ki kodira CLOCK
CLOCK	protein CLOCK
<i>Cry1</i>	gen, ki kodira protein kriptokrom 1
CRY1	protein kriptokrom 1
<i>Cry2</i>	gen, ki kodira protein kriptokrom 2
CRY2	protein kriptokrom 2
DMEM	ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium; medij za gojenje celic, vsebuje aminokislino, soli, glukozo, vitamine
DMSO	dimetilsulfoksid
FBS	serum govejega fetusa, ang. fetal bovine serum
HBS	pufer soli 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonske kisline, ang. HEPES-buffered saline
PDB ID	prepoznavna (identifikacijska) oznaka posameznega proteina
LB	Luria-Bertani (bakterijsko gojišče)
MQ (voda)	Milli-Q (registrirano ime podjetja Millipore Corporation) visoko prečiščena voda, pri kateri se z zaporednimi filtracijami in ionskimi izmenjavami doseže specifična upornost > 18,2 MΩ·cm in je v



	skladu s standardom ISO 3696
PBS	fosfatni pufer, ang. phosphate buffer solution
<i>Per1</i>	gen, ki kodira protein period 1
PER1	protein period 1
<i>Per2</i>	gen, ki kodira protein period 2
PER2	protein period 2
<i>Ppara</i>	gen, ki kodira peroksisomski proliferativni receptor alfa (PPAR $\alpha$ )
PPAR $\alpha$	peroksisomski proliferativni receptor alfa
<i>Rxr</i>	gen, ki kodira retinoidni X receptor
RXR	retinoidni X receptor
T25 (flask)	steklenička za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm <sup>2</sup>
T75 (flask)	steklenička za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm <sup>2</sup>
TBE	tris, borat, EDTA; pufer za elektroforezo, ki vsebuje tris bazo (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), borovo kislino in EDTA

## 5. UVOD

### 5.1. Cirkadiani ritem

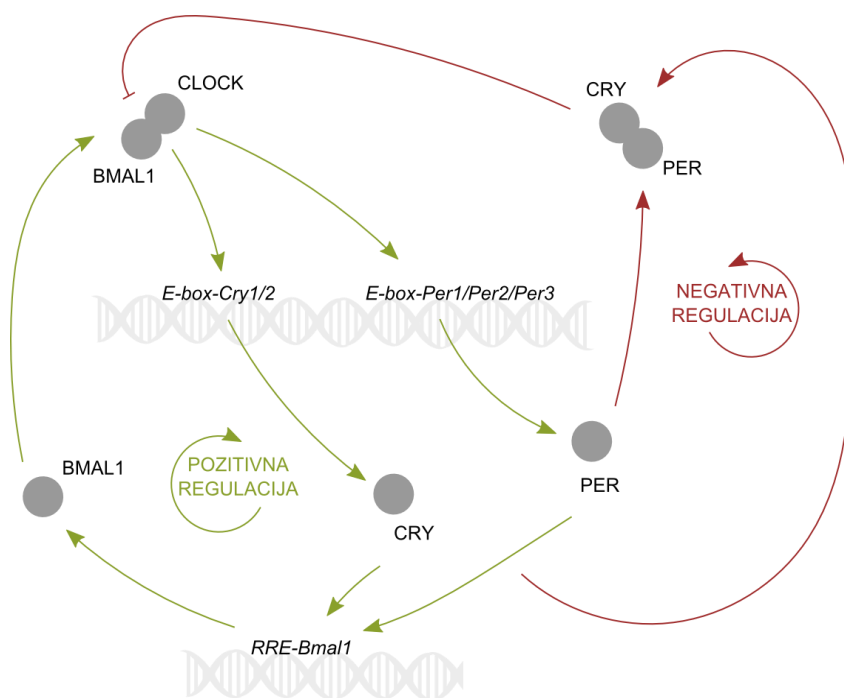
Cirkadiani (circa lat. približno, diem lat. dan) oz. dnevni ritem je endogen oscilirajoč biološki proces, ki je bil dokumentiran pri rastlinah, glivah, živalih in cianobakterijah. Pri sesalcih gre za večplasten sistem, ki je pod nadzorom suprakiazmatičnega jedra, dela hipotalamusa nad križiščem vidnih živcev. Ta pridobiva signale z mrežnice in prek avtonomnega živčnega sistema in humoralnih dejavnikov fino uravnava sicer grobo samouravnava povratno zanko, v kateri imajo glavno vlogo geni *Clock* (na periferiji; v centralnem živčevju njegov analog *Npas2*), *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* in *Cry2*.<sup>1,2</sup>

Vloga cirkadianega ritma je vzdrževanje homeostaze in usklajevanje prilagajanja zunanjim dražljajem. Suprakiazmatično jedro prek paraventrikularnega jedra vpliva na biosintezo melatonina iz triptofana v epifizi<sup>3,4</sup> in s tem na regulacijo spanca in budnosti. Znotraj dneva se z določenim vzorcem spreminjata tudi telesna temperatura, ki je najnižja v zgodnjih jutranjih urah, in krvni tlak, ki je najvišji sredi dneva. Produkcija hormonov je ne le infradiana (ponavljanje v daljših ciklih, kot npr. pri menstrualnem ciklu) ampak tudi cirkadiana, dneven ritem pa imajo še nekateri drugi humoralni dejavniki. Od cirkadianega ritma so odvisni tudi metabolizem ksenobiotikov, homeostaza ogljikovih hidratov in lipidov,<sup>5</sup> vnetje in delovanje imunskega sistema, tumorogeneza. Veliko raziskovalnih skupin se ukvarja prav s slednjo, saj motnje cirkadianega ritma povečajo tveganje za pojav rakavih obolenj debelega črevesa, prsi, prostate, jajčnikov, pljuč in jeter.<sup>6-8</sup>

Poskusi na glodalcih so pokazali, da spremenjen režim hranjenja, torej podnevi namesto ponoči, spremeni cirkadiane ritme v organih, udeleženi v metabolizmu.<sup>9</sup> To dokazuje močno povezanost med metabolizmom in cirkadianimi ritmi. Ravno povezava med dnevnim ritmom in metabolizmom je izjemno pomembna z vidika aplikacije zdravilnih učinkovin, saj metabolizem slednjih določa njihov koncentracijski profil v krvi in drugih tkivih. Časovno načrtovana aplikacija lahko zato zviša učinkovitost in zmanjša pogostost ter intenzivnost neželenih učinkov. Ravno zato bi bila izjemno primerna pri farmakoloških intervencijah z veliko kolateralno škodo, npr. pri aplikaciji citostatikov.

Poleg metabolizma cirkadiani procesi vplivajo tudi na procese absorpcije, distribucije in eliminacije, s čimer določajo farmakokinetiko učinkovine. Razlog leži v časovno odvisnem spreminjanju permeabilnosti bioloških membran in od cirkadianega ritma odvisnega izražanja receptorjev, encimov, transportnih proteinov.<sup>10–13</sup> Cirkadianost bioloških procesov se zato že pričinja upoštevati pri odmerjanju zdravil. Primer so statini. Ker zmanjšajo biosintezo holesterola, njihov neželen učinek pa je miopatija, se aplicirajo pred spanjem. S tem se zviša njihova učinkovitost, saj je biosinteza holesterola najbolj intenzivna ponoči, hkrati pa dosežemo njihovo najvišjo koncentracijo v času mišičnega mirovanja.

Molekulski nivo cirkadianega ritma sestavljajo s pozitivnimi in negativnimi povratnimi zankami regulirani procesi (slika 1). Pri osnovni zanki proteina CLOCK in BMAL1 heterodimerizirata in kot transaktivacijski heterodimerni kompleks z vezavo na regulatorne regije DNA pozitivno regulirata izražanje genov *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* in *Cry2*. Posledično nastali proteini se potem akumulirajo in dimerizirajo ter prenesejo v jedro, kjer z interakcijo s CLOCK-BMAL1 heterodimerom slednjemu zmanjšajo sposobnost pozitivne regulacije genov *Per* in *Cry*. PER in CRY na takšen način zavirajo svoje lastno prepisovanje. Za zaviranje kompleksa CLOCK-BMAL1 je najpomembnejši heterodimer CRY-PER.<sup>1,2,14–17</sup>



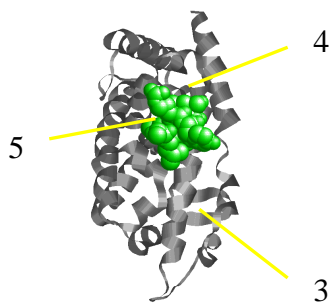
**Slika 1: Shematski prikaz poenostavljenega cirkadianega ritma – homologi PER in CRY vzpodbujajo prepisovanje *Bmal1*, hkrati pa zavirajo kompleks BMAL1-CLOCK in s tem tudi lastno prepisovanje**

Takšna regulacija koncentracije proteinov cirkadianega ritma, ki so pomembni transkripcijski regulatorji, je v perifernih tkivih ključna za cirkadiano izražanje 5%-10% transkriptoma.<sup>18</sup> Osnovna regulacija cirkadianega ritma tako vpliva npr. na koncentracijo antidiuretskega hormona, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHE3 črpalke, P-glikoproteina, Na<sup>+</sup>/glukozne črpalke SGLT1 idr.<sup>19</sup> Da regulacija na molekularnem nivoju ni tako preprosta, kažejo novejša dognanja. CRY1 in CRY2 sta ključna v negativni povratni zanki, saj močno zavirata s strani kompleksa CLOCK-BMAL1 inducirano transkripcijo različnih genov (tudi *Cry* in *Per*),<sup>14,16</sup> vendar hkrati spodbujata prepisovanje *Bmall*.<sup>17</sup> Glede na rezultate Takahashija in sodelavcev so imele miši z izbitima genoma *Cry1* in *Cry2* povišano izražanje *Per1*, a hkrati normalno izražanje *Per2*.<sup>14</sup> Na podoben način s CLOCK-BMAL1 inducirano transkripcijo zavirajo tudi homologi PER. Homo- in heterodimeri homologov PER šibko zavirajo aktivacijski potencial dimerov CLOCK-BMAL1, verjetno z interakcijo s CLOCK. Kot heterodimer s CRY imajo PER zvišano možnost zaviranja CLOCK-BMAL1,<sup>20</sup> takšna interakcija pa je najbrž tudi ključna pri zaviranju transaktivacijskega potenciala CLOCK-BMAL1. PER2 je poleg tega na regulatornih vezavnih mestih *Bmall* imunoprecipitiral z REV-ERB $\alpha$ , supresorjem *Bmall*,<sup>15</sup> kljub temu pa obstajajo eksperimentalno potrjena dognanja, da v splošnem PER2 spodbuja izražanje *Bmall*.<sup>17</sup> Celice, transfecirane s *Per2* in *Ppara*, kažejo povečano izražanje *Bmall*,<sup>15</sup> na pozitivno regulacijo s strani PER2 pa kaže tudi eksperiment z mišmi z izbitim genom *Per2*. Te so imele nižje nivoje PER1 in CRY1,<sup>21</sup> katerih prepisovanje vzpodbudi CLOCK-BMAL1. Nenavadno je tudi, da heterodimer CLOCK-BMAL1, ki je transaktivator, zavira prepisovanje *Bmall*.<sup>17</sup> Morda zaradi negativne povratne zanke, s katero CLOCK-BMAL1 prek PER-CRY zavre sam sebe. Velik vpliv na izražanje *Bmall* imata tudi REV-ERB $\alpha$  in ROR $\alpha$ . Prvi je močen transkripcijski represor, drugi pa aktivator transkripcije *Bmall*.<sup>15</sup> Zapleten mehanizem uravnavanja cirkadianega ritma je ključen za vzpostavitev robustnejšega ravnotežnega stanja. Kompleksnejša vloga CRY in PER homologov v cirkadianem ritmu je posledica tega, da imajo nekateri homologi večje število LXXLL zaporedij. To so zaporedja, ki določajo specifično interakcijo z jedrnimi receptorji. Večje število LXXLL zaporedij posameznega homologa CRY oz. PER pomeni, da lahko ta interagira z večjim številom jedrnih receptorjev, ki se povezujejo specifično s proteini z LXXLL zaporedji posameznega razreda.

Za interakcije med določenimi proteini cirkadianega ritma, kot so npr. homo- in heterodimerizacija sesalskih PER homologov, so ključne ti. PAS domene (PER-ARNT-SIM), ki so udeležene v zaznavanju, signaliziranju in proteinskih interakcijah. Običajno so dolžine 100-120 aminokislin in so s stališča aminokislinskega zaporedja zelo različne. Kljub temu imajo določene skupne strukturne elemente. Sestavljene so iz osrednje beta-ploskve iz petih peptidnih verig, poleg tega pa vsebujejo več alfa-heliksov. Čeprav so ključne za funkcijo proteinov, niso del efektorskih domen, z njimi so povezane prek njihovih N-terminalnih oz. redkeje C-terminalnih delov.<sup>22</sup> PAS domeno imajo npr. PER, BMAL1 in CLOCK.<sup>23</sup> To, da so omenjene domene ključne za dimerizacijo in posledično funkcionalnost proteinov cirkadianega ritma, dokazuje eksperiment, pri katerem so miši z mutacijo v omenjeni domeni gena *Per2* v temi izgubile cirkadiani ritem.<sup>21</sup>

## 5.2. Zaporedje LXXLL pri koaktivatorjih jedrnih receptorjev

LXXLL je značilno zaporedje koaktivatorjev jedrnih receptorjev (L predstavlja levcin, X pa poljubno aminokislino). S tem zaporedjem koaktivatorji interagirajo z jedrnimi receptorji. Ob vezavi receptorja na DNA so koaktivatorji pogosto ključni za transkripcijsko regulacijo. Zaporedje LXXLL se veže na jedrni receptor v območje vezave ligandov (LBD, ang. ligand binding domain), kjer interagira s heliksi 3-5 in 12 oz. 3-6 in 12 jedrnih receptorjev (slika 2).<sup>24,25</sup> Heliks 12 je gibljiv in se lahko po vezavi liganda postavi v ustrezen položaj za pomoč vezave koaktivatorja. Njegov položaj in možnost interakcije pri vezavi koaktivatorja sta odvisna od predhodno vezanega. Agonist poveča možnost interakcije heliksa 12 jedrnega receptorja s koaktivatorjem, medtem ko jo antagonisti zmanjšajo.<sup>25</sup>



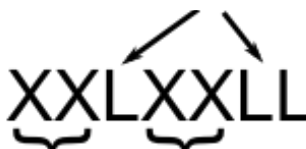
**Slika 2: LBD jedrnega receptorja CAR (siva) z vezanim koaktivatorjem NCoA2 (zelena) in prikazanimi heliksi 3, 4 in 5**

Začetni in končni levцин zaporedja LXXLL, torej levcina na mestih 1 in 5, se usidrata v hidrofobni žep LBD, levцин na mestu 4 pa s stransko verigo interagira s hidrofobno površino domene (LBD). Vmesni aminokislini na mestih 2 in 3 sta izpostavljeni topilu oz. vodi in ne vstopata v direktno interakcijo z vezavnim mestom na jedrnem receptorju (slika 3). To razloži razlikovanje vmesnih aminokislin med različnimi LXXLL zaporedji.<sup>24,25</sup> Aminokislini na mestih 2 in 3 sta torej relativno nepomembni za vezavo koaktivatorja na jedrni receptor.

Posebej pomemben za interakcijo z zaporedjem je lizin v heliksu 3 LBD jedrnih receptorjev, prav tako tudi glutaminska kislina heliksa 12 receptorjev. Ta dva tvorita **vodikove vezi z aminokislinami okrog LXXLL zaporedja** koaktivatorja.

Od aminokislin okrog LXXLL zaporedja sta najbolj pomembni aminokislini na mestih -2 in -1. Ob vezavi LXXLL na LBD receptorja sta postavljeni v bližino receptorjevega heliksa 5 in sta ključni za specifičnost vezave posameznega LXXLL zaporedja na točno določen jedrni receptor.

levcini interagirajo s hidrofobnimi deli LBD



aminokislini na mestih -2 in -1 sta ključni, saj specifično interagirata z jedrnimi receptorji

aminokislini na mestih 2 in 3 sta nepomembni, saj interagirata s topilom

**Slika 3: Shematski prikaz zaporedja LXXLL – aminokislini na mestih -2 in -1 sta ključni za interakcijo LXXLL zaporedja z jedrnim receptorjem**

**Aminokisliline okrog LXXLL zaporedja določajo specifičnost interakcij s posameznimi receptorji.** To pomeni, da so pomembne za razpoznavo posameznih jedrnih receptorjev. Zato so se LXXLL zaporedja razdelila v 4 skupine oz. razrede (pri tem + predstavlja pozitivno nabito aminokislino, p polarno aminokislino, S serin, T treonin,  $\phi$  pa aminokislino brez polarne stranske verige):<sup>25</sup>

- razred 1: +LXXLL
- razred 2: p $\phi$ LXXLL
- razred 3: (S/T) $\phi$ LXXLL
- razred 4: + $\phi$ LXXLL

Klasifikacija je pomembna za razumevanje in **predvidevanje možnosti vezave koaktivatorjev** na posamezne jedrne receptorje. Na posamezne **receptorje se vežejo samo koaktivatorji, ki imajo zaporedja posameznega razreda.**

Določeni koaktivatorji imajo v svoji strukturi več LXXLL zaporedij različnih razredov, kar jim omogoča interakcijo z več različnimi jedrnimi receptorji. Takšen primer je NCoA1. Spada v skupino koaktivatorjev jedrnih receptorjev (ang. nuclear receptor coactivator(s), NCoA). NCoA imajo zaradi interakcij z velikim naborom proteinov različne **biološke funkcije, ki pogosto sovpadajo s funkcijami jedrnih receptorjev**, s katerimi interagirajo. NCoA so med seboj strukturno različni. Primer koaktivatorja s samo enim LXXLL zaporedjem je koaktivator 1 alfa peroksisomskega proliferativnega receptorja gama (PGC1 $\alpha$ ), ki je udeležen predvsem v metabolnih procesih.

Primer koaktivatorja z dvema LXXLL zaporedjema je PER2. Dve LXXLL zaporedji mu omogočata interakcijo z večjim številom jedrnih receptorjev, zato je njegova vloga v cirkadianih ritmih kompleksnejša.

### 5.3. Period 2

Period 2 (PER2) je protein dolžine 1255 (človeški) oz. 1257 (mišji) aminokislin.<sup>26,27</sup> Nahaja se predvsem v celičnem jedru in tudi v citoplazmi celic centralnega živčevja, srca, skeletnih mišic, vranice, pljuč in jeter z najvišjo izraženostjo v mišicah in jetrih.<sup>28,29</sup> Nastaja cirkadiano z najvišjo koncentracijo ob času 12 h in najnižjo ob času 0 h, pri čemer je čas 0 prižiganje luči v okolju z 12 urami svetlobe in 12 urami teme.<sup>30</sup> Njegova koncentracija se zniža po interakciji s kazeinskimi kinazami in fosforilaciji, saj to vodi v razgradnjo. PER2 se nahaja pretežno v dimeriziranem stanju, kot homo- ali heterodimer.

Njegovi glavni vlogi sta sodelovanje v bioloških ritmih in transkripcijska regulacija. V cirkadianem ritmu kot dimer interagira s kompleksom CLOCK-BMAL1 (ki spodbuja izražanje *Per2*) in zavira njegovo transkripcijsko aktivacijo. Na takšen način PER2 zavira svoje lastno nastajanje. Dimeriziran PER2 hkrati spodbuja izražanje določenih genov, med drugim *Bmal1*.<sup>15,21</sup> Tako je Albrecht s sodelavci dokazal povišano izražanje *Bmal1* v celicah transfeciranih s *Ppara* in *Per2*.<sup>15</sup> Omenjena korelacija nam je pri eksperimentalnem delu služila kot pozitivna kontrola (za povečano izražanje *Bmal1*).

Poleg vloge v cirkadianem ritmu so dokazali tudi vpletenost v necirkadiane procese. Dokazano je bilo, da je *Per* pri *Drosophili melanogaster* pomemben za dolgoročen spomin,<sup>31</sup> miši z izbitim ali mutiranim genom za sesalski homolog *Per2* pa kažejo hitrejšo rast tumorjev in zmanjšanje apoptoze ter večjo dovzetnost za pojav neoplazem. *Per2* je tumor supresorski gen.<sup>8,32</sup> Motnje izražanja *Per2* vodijo tudi v večjo dovzetnost za pojav neoplazem pri izpostavljenosti  $\gamma$ -radiaciji.<sup>32</sup>

Vpleten je v regulacijo budnosti in spanca, saj mutacija v genu *Per2* povzroči ti. sindrom prezgodnjega spanca, za katerega je značilen prezgoden nastop spanca in budnosti. Pacienti imajo zamaknjen celoten cikel sproščanja melatonina in nihanja telesne temperature.<sup>33</sup>

Zaradi interakcije s PPAR $\gamma$ , ki je odgovoren za adipogenezo in inzulinsko občutljivost ter sodeluje pri vnetnih procesih, pomembno vpliva tudi na omenjene procese.<sup>15,34–36</sup>

Gre za velik protein z znanim aminokislinskim zaporedjem in nekaj znanimi naravnimi variacijami ter dvema isoformama pri človeškem proteinu; PER2S je krajša, dolga cca. 400 aminokislins. PER2 vsebuje 3 pomembne domene za dimerizacijo, in sicer 2 PAS domeni in 1 PAC domeno (PAS-associated C-terminal).<sup>26,27</sup>

Kristalna struktura z oznako 3GDI prikazuje del homodimera in izhaja iz mišjega proteina. Predstavlja del, ki je ključen za dimerizacijo s homologi PER (PAS domena; aminokislinske 170-473), medtem ko s CRY vstopa v interakcijo s C-terminalno domeno (aminokislinske 1155-1255), ki v strukturo ni vključena.<sup>23,26</sup>

Pomen PAS domene pri mišjem PER2 dokazujejo mutacije fenilalanina na mestu 415, triptofana na mestu 419 in izolevcina na mestu 427 v glutaminsko kislino, ki onemogočijo sposobnost dimerizacije.<sup>23</sup>

Na mestih 306-310 in 1056-1060 ima PER2 ti. LXXLL zaporedje (mišji 306-310 LCCLL in 1050-1054 LLNLL, človeški 308-312 LCCLL in 1056-1060 LLNLL).<sup>25,37</sup> To je značilno za koaktivatorje jedrnih receptorjev, med katere torej spada tudi PER2. Albrecht s sodelavci je ugotovil, da zamenjava levcinov z alanini pri LCCLL povzroči nezmožnost interakcije PER2 s PPAR $\alpha$ . Enaka sprememba na mestih 1056-1060 ne povzroči spremembe v dimerizaciji s PPAR $\alpha$ . Enako velja tudi za interakcijo z REV-ERB $\alpha$ .<sup>15</sup> Omenjene spremembe naj ne bi imele vpliva na interakcijo s CRY1.<sup>15</sup>

Specifičnost interakcij med LXXLL in jedrnimi receptorji naj bi bila med drugim posledica lizina v heliksi 3 LBD (ligand binding domain) jedrnih receptorjev.<sup>15,25</sup> Albrecht s sodelavci



je ugotovil, da zamenjava tega lizina z alaninom pri REV-ERB $\alpha$  zmanjša sposobnost vezave s PER2 za približno 60%, izbris celotne LBD pa za približno 90%. Podobna mutacija pri PPAR $\alpha$  je imela manjšo posledico, enako je veljalo tudi ob izbrisu celotnega heliksa 12 oz. aktivacijskega heliksa, ki pomembno vpliva na vezavo LXXL.<sup>15</sup>

Na mestih 462-470 ima PER2 korepresorsko zaporedje LXXXIXXXL (v tem primeru LTEQIHRL).<sup>26</sup> To zaporedje se usidra v isto mesto kot LXXLL, vendar dodaten zavoj daljšega zaporedja preprečuje, da bi C-terminalni aktivacijski heliks AF2 jedrnega receptorja prišel v položaj, ki povzroči aktivno konformacijo. Vezava agonista stabilizira AF2 heliks in promovira koaktivatorsko interakcijo z LXXLL. Antagonist prepreči AF2 heliksu aktivno postavitvev in promovira vezavo korepresorskega zaporedja.<sup>38</sup>

#### 5.4. Konstitutivni androstanski receptor

Konstitutivni androstanski receptor (CAR, NR1I3, konstitutivni aktivator retinoidnega odziva, jedrni receptor sirota MB67) je protein dolžine 352 (človeški) oz. 358 (mišji) aminokislin. Spada v poddružino NR1 jedrnih receptorjev. Nahaja se v citoplazmi in jedru celic gastrointestinalnega trakta, ledvic, testisov, nadledvičnih žlez, jeter in delov centralnega živčevja z najvišjo izraženostjo v tankem črevesu in jetrih.<sup>39,40</sup> V neinduciranem stanju je pretežno v citoplazmi, ob vezavi induktorjev pa se razmerje premakne v korist translokacije v jedro.<sup>41,42</sup> Zaradi povezanosti s cirkadianim ritmom, morda prek vezave [REV-ERB $\alpha$ ]-ROR heterodimera na vezavno mesto v promotorski regiji *Car*, njegova koncentracija niha cirkadiano in je najvišja ob času 20 h. REV-ERB $\alpha$ , ki je transkripcijski represor, je namreč transaktiviran s strani kompleksa CLOCK-BMAL1 in zaviran s strani CRY-PER.<sup>13</sup>

Podobnost človeškega proteina z mišjim je 74%,<sup>43</sup> obstajo pa določene razlike pri odzivih na ligande. Tako je aktivnost CAR ob odzivu na progesteron, glede na referenčni ksenobiotik, skoraj trikrat nižja pri mišjem kot pri človeškem receptorju.<sup>44</sup>

Njegovi endogeni agonisti so npr. bilirubin in estrogeni, eksogeni agonisti pa so npr. fenobarbital, paracetamol in nekateri flavonoidi.<sup>45</sup> Androstani so inverzni agonisti konstitutivnega androstanskega receptorja. Tudi brez vezave liganda je aktiven, torej ima konstitutivno aktivnost, iz česar izhaja njegovo ime.<sup>45-48</sup>

Vloga NR1I poddružine jedrnih receptorjev je transkripcijska aktivacija genov, udeleženih v metabolizmu in transportu.<sup>49,50</sup> CAR tako po heterodimerizaciji z RXR vzpodbudi

transkripcijo genov, ki vodijo v nastanek proteinov CYP3A, CYP2B, UGT1A, MRP2.<sup>50-52</sup> CAR prav tako zviša klirens žolčnih kislin in bilirubina,<sup>53</sup> s čimer zmanjša potencialen toksičen efekt slednjih, poleg tega pa njegova aktivacija dvigne nivo ščitničnih hormonov, kar vpliva na homeostazo in metabolizem.<sup>54</sup> Pomembno funkcijo ima tudi pri spremembi metabolizma ob stradanju. Njegova aktivacija zavira pojav debelosti in preprečuje nastanek diabetesa tipa 2.<sup>49</sup> CAR tudi transkripcijsko aktivira gene, ki kodirajo nastanek ALAS1, ki omejuje hitrost nastanka hema.<sup>13</sup>

Za omenjeno funkcionalnost CAR je večinoma potrebna dimerizacija z RXR. CAR vstopa v interakcijo z RXR s heliksi 7, 9 in 10, hkrati pa v interakcijo vstopa tudi zanka med heliksoma 8 in 9. N-terminalna dela heliksov 10 obeh receptorjev tvorita hidrofobno interakcijo, okrog nje pa so vodikove vezi. Za aktivnost jedrnih receptorjev je ključen tudi oz. predvsem C-terminalen aktivacijski heliks AF2, ki zapre LBD in povzroči aktivnost, hkrati pa njegovo zapiranje omogoči vezavo koaktivatorjev, saj prispeva pozitiven naboj (ang. charge clamp), ki stabilizira kompleks s koaktivatorji. Pri CAR je distančnik med heliksom 10 in AF2 krajši kot običajno, hkrati je tudi heliks 10 krajši za en zavoje oz. 4 aminokisliline. Eksperimentalni rezultati so pokazali, da je to ključ konstitutivne aktivnosti CAR in da podaljšanje distančnika med heliksoma 10 in AF2 zmoti njegovo konstitutivno aktivnost, ne pa tudi njegove aktivnosti po vezavi agonista.<sup>38,55</sup>

CAR ima sposobnost vezave na DNA. Vezavna mesta (ang. response elements) so pogosto sestavljena iz ponovljenih zaporedij šestih nukleotidov. Ponovitve, na katere se CAR veže, so ali enake (ang. direct repeat, kratko DR) ali pa obratne, ponovitev ima torej komplementarne nukleotide v nasprotni smeri (ang. everted repeat, kratko ER). V kolikor je v bližini več med seboj funkcionalno povezanih vezavnih mest za CAR, govorimo o ti. PBREM (ang. phenobarbital response enhancer module).<sup>56,57</sup>

Pogosto je za vezavo CAR-RXR heterodimera na DNA odgovorna DR ponovitev zaporedja AGTTCA (ali podobnega heksamera) z distančnikom 4 nukleotide med heksameroma (tj. DR4), torej AGTTCANNNAGTTCA. V nekoliko manjši meri se heterodimer veže na ponovitev heksamernega zaporedja z distančnikom 5 nukleotidov (tj. DR5). Poleg tega se CAR-RXR pogosto veže tudi na mesto ER ponovitve zaporedja z distančnikom dolžine 8 nukleotidov (tj. ER8), pa tudi na tiste z distančniki dolžine 7, 6, 9, 10 in 5 nukleotidov (ER7, ER6, ER9, ER10 in ER5), zapisane po padajoči verjetnosti. CAR je, sicer v manjši meri,

sposoben vezave na DNA tudi v monomerni obliki, na to pa vpliva samo heksamerno zaporedje, ki se ponovi, in aminokislina v okolici vezavnih mest za CAR. Tako se, če vzamemo v obzir pomembne aminokislina v okolici heksamernega zaporedja, v največji meri veže na AGAGTTCA oktamerno zaporedje.<sup>56,57</sup>

## 5.5. BMAL1

BMAL1 je protein dolžine 626 (človeški) oz. 632 (mišji) aminokislin. Nahaja se pretežno v jedru celic z najvišjo izraženostjo v možganih, skeletnih mišicah in srcu. Njegova koncentracija niha cirkadiano in je najvišja ob času 20-24 h in postopno pada do časa 12 h naslednjega cikla.<sup>13</sup>

Je transkripcijski faktor s funkcijo uravnavanja cirkadianih ritmov, udeležen pa je tudi v homeostazi krvnega tlaka in glukoze. Verjetno je vpleten v pojav diabetesa tipa 2.<sup>18,58</sup> Za miši z izbitim genom *Bmal1* so ugotovili, da imajo reproduktivne težave, so manjše, imajo težave s sklepi, mišicami, osteoporozo, kažejo zmanjšanje organov, zmanjšanje maščobnega tkiva, manjšo poraščenost z dlakami, katarakte, kronična vnetja roženice in spremembe v sestavi krvi ter se starajo hitro. Miši z izbitim *Bmal1* so bile ob poginu stare v povprečju 37 tednov +/- 12 tednov, »wild-type« miši pa 120 tednov. V miših brez BMAL1 proteina so opazili povišane nivoje reaktivnih kisikovih spojin.<sup>59-61</sup>

Kot pozitiven transkripcijski faktor deluje po heterodimerizaciji s CLOCK (oz. v centralnem živčevju njegovim analogom NPAS2). Ima eno »basic-helix-loop-helix« domeno, dve PAS (PER-ARNT-SIM) domeni, ki sta ključni za interakcijo z represorji CRY in PER ter cirkadian ritem (v kolikor PER z BMAL1 direktno interagira), in eno PAC (PAS-associated C-terminal) domeno.<sup>62</sup>

## 5.6. Peroksisomski proliferativni receptor alfa

Peroksisomski proliferativni receptor alfa (PPAR $\alpha$ , NR1C1) je protein dolžine 486 (človeški in mišji) aminokislin.<sup>63,64</sup> Tako kot CAR spada v poddružino NR1 jedrnih receptorjev. Nahaja se pretežno v jedru celic z najvišjo koncentracijo v jetrih, ledvicah, srcu in skeletnih mišicah. Funkcijsko je eden glavnih regulatorjev metabolizma lipidov. Regulira  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin v peroksisomih, poleg tega je transkripcijski aktivator za določene citokrome

in acil-koencim A oksidazo 1. Za transkripcijsko aktivacijo je potrebna dimerizacija, običajno dimerizira z retinoidnim X receptorjem  $\alpha$ .<sup>65-67</sup>

### **5.7. Peroksisomski proliferativni receptor gama**

Peroksisomski proliferativni receptor gama (PPAR $\gamma$ , NR1C3) je protein dolžine 505 (človeški in mišji) aminokislin.<sup>68,69</sup> Prav tako spada v poddružino NR1 jedrnih receptorjev. Najbolj je izražen v maščevju, manj v skeletnih mišicah, vranici, srcu in jetrih.<sup>70</sup>

Funkcijsko je eden glavnih regulatorjev metabolizma lipidov. Ker je tako kot PPAR $\alpha$  transkripcijski aktivator acil-koencim A oksidaze, regulira  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin v peroksisomih. Je ključni regulator diferenciacije adipocitov in homeostaze glukoze, poleg tega je udeležen v regulaciji vnetnih procesov. Tudi PPAR $\gamma$  dimerizira z retinoidnim X receptorjem  $\alpha$ .<sup>70-72</sup>

### **5.8. Retinoidni X receptor $\alpha$**

Retinoidni X receptor  $\alpha$  (receptor retinojske kisline, retinojski receptor  $\alpha$ , NR2B1) je protein dolžine 462 (človeški) oz. 467 (mišji) aminokislin. Spada v družino jedrnih receptorjev, poddružino NR2. Najbolj je izražen v jetrih. Je heterodimerizacijski partner številnih proteinskih makromolekul, kot so CAR, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  idr., s katerimi kot heterodimer deluje kot transkripcijski faktor.<sup>73,74</sup>

## 6. NAMEN DELA, NAČRT IN HIPOTEZE

Namen dela je preveriti, ali se spremeni izražanje *Bmall* ob kotransfekciji sesalskih celic s *Per2* in *Car*. Namen naloge je tudi preučiti zaporedja in strukturne elemente proteinov PER2 in CAR ter z *in silico* metodami predpostaviti njuno interakcijo.

### 6.1. Hipoteze:

- PER2 in CAR posredno ali neposredno interagirata, kar vodi do spremenjenega izražanja *Bmall* in predstavlja novo povezavo med metabolizmom in cirkadianim ritmom.
- PER2 in CAR imata strukturne elemente, prek katerih bi lahko neposredno interagirala, kar lahko prikažemo z *in silico* metodami.

### 6.2. Predhodni rezultati

Osnovo za delo so nam predstavljali neobjavljeni eksperimentalni rezultati dr. Uršule Prosenc Zmrzljak, ki je ugotovila možnost vpliva CAR in PER2 na izražanje *Bmall*. Pri svojem delu se je oprla na dognanja Albrechta in sodelavcev, ki so dokazali, da PER2 interagira z določenimi jedrnimi receptorji in z interakcijo vpliva na izražanje *Bmall*. Med drugim so ugotovili, da je njegovo izražanje povečano pri kotransfekciji s *Ppara* in *Per2*.<sup>15</sup>

Takahashi in sodelavci so z metodo sekvenciranja po kromatinski imunoprecipitaciji ugotovili, da je bil PER2 pogosto vezan na mestih DNA, ki veljajo za vezavna mesta za hormone receptorje, kar ponovno nakazuje na interakcijo PER2 z jedrnimi receptorji.<sup>75</sup>

### 6.3. Načrt dela

Izvajali bomo transfekcije mišjih hepatokarcinomskih Hepa 1-6 celic. Sesalske celice bomo transfecirali z *Bmall* sklopljenim z genom za luciferazo in s plazmidoma, ki prekomerno izražata gena *Per2* in *Car*. Rezultate bomo ovrednotili tudi s pomočjo pozitivnih in negativnih kontrol.

Sklopitev *Bmall* z genom za luciferazo bo omogočila meritev izražanja *Bmall*. Nastala luciferaza bo po lizi celic in dodatku substrata ta substrat encimsko razgradila, kar bo vodilo

do oddaje energije v obliki svetlobe, ki bo sorazmerna izraženemu *Bmal1*. Oddano svetlobo bomo kvantificirali z luminometrom.

Nastanek encima betagalaktozidaze bo služil za ugotavljanje uspešnosti transfekcij. Ob uspešni transfekciji bo po lizi celic in dodatku substrata prišlo do rumenega obarvanja, zaznavnega že *ad oculum*. Nastanek rumene barve bomo kvantificirali z UV/VIS spektrofotometrijo. Na nastanek obarvanja ne bomo vplivali z drugimi vstavljenimi geni, zato obarvanje predstavlja merilo uspešnosti transfekcije. Z merjenjem obarvanosti bomo normalizirali rezultate aktivnosti luciferaze.

Ob potrditvi spremenjenega izražanja *Bmal1* ob kotransfekciji sesalskih celic s *Per2* in *Car* bomo podrobno analizirali aminokislinska zaporedja proteinov PER2 in CAR, njune strukturne domene in znane interakcije. Na podlagi tega bomo izdelali predlog interakcije med PER2 in CAR. Za doseg cilja bomo uporabili prostorski pregled strukturnih delov proteinov, manipulacijo datotek kristalnih slik proteinov, 3D poravnavo, molekulske prilaganje in molekulske dinamike.

## 7. METODE IN MATERIALI

### 7.1. Raztopine

V kolikor ni drugače navedeno, smo pri svojem delu uporabljali reagente in surovine proizvajalcev Merck, Biolife in Sigma-Aldrich.

#### 2 × HBS (HEPES-buffered saline, ang. HEPES pufer)

HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonska kislina)		2,50 g
D-glukoza		0,50 g
kalijev klorid		0,18 g
natrijev klorid		4,00 g
dinatrijev hidrogenfosfat (brezvodni)		0,05 g
MQ voda	do	1,00 l
NaOH	do	pH 7,1

#### PBS (phosphate buffered saline, ang. fosfatni pufer)

tableta PBS proizvajalca Sigma-Aldrich, kataloška št. P4417-50TAB	1 tableta
MQ voda	200 ml

Po raztapljanju tablete v vodi smo raztopino avtoklavirali.

#### Fosfatni pufer

dinatrijev hidrogenfosfat (brezvodni)		2,33 g
natrijev dihidrogenfosfat dihidrat		0,50 g
MQ voda	do	0,50 l

#### 2 M kalcijev klorid

kalcijev klorid		28,9 g
MQ voda	do	0,20 l

#### ONPG založna raztopina

ortonitrofenil $\beta$ -galaktozid		0,10 g
------------------------------------	--	--------

fosfatni pufer do 25,0 ml

Mg<sup>2+</sup> založna raztopina z merkaptoetanolom

1 M magnezijev klorid 1,0 ml

2-merkaptoetanol 3,5 ml

MQ voda 5,5 ml

ONPG raztopina za test betagalaktozidazne aktivnosti

ONPG založna raztopina 33,0 µl

fosfatni pufer 100,5 µl

Mg<sup>2+</sup> založna raztopina z merkaptoetanolom 1,5 µl

5 × TBE (tris/borat/EDTA)

tris baza (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol) 54,0 g

borova kislina 27,5 g

0,5 M EDTA 20,0 ml

MQ voda do 1,00 l

## 7.2. Delo z bakterijami

### 7.2.1. Priprava tekočega LB (Luria-Bertani) gojišča

tripton 10,0 g

kvasni ekstrakt 5,0 g

natrijev klorid 10,0 g

voda do 1,00 l

Dodali smo 1000 mg ampicilina na 1,00 l gojišča.

### 7.2.2. Priprava trdnega LB (Luria-Bertani) gojišča

tripton 10,0 g

kvasni ekstrakt 5,0 g

natrijev klorid 10,0 g



agarosa	20,0 g
voda	do 1,00 l

Dodali smo 1000 mg ampicilina na 1,00 l gojišča. Raztopino smo vlili v petrijeve plošče premera 100 mm do višine 3 mm oz. 25 ml gojišča na posamezno ploščo.

### 7.2.3. Priprava kompetentnih bakterij

Uporabili smo bakterijske celice *E. coli* Library efficiency DH5 $\alpha$  Competent Cells proizvajalca Invitrogen, kataloška številka 18263-012. 300  $\mu$ l prekonočne kulture teh celic smo prenesli v 25 ml tekočega LB gojišča ter inkubirali na 37° C na stresalniku pri 220 obratih na minuto do optične gostote 0,4-0,6. Centrifugirko z bakterijami smo nato ohladili pod tekočo vodo in inkubirali na ledu 10 min. Sledilo je 10 min centrifugiranja pri 4000 obratih na minuto in 4° C. Po tem, ko smo odlili supernatant, smo pelet resuspendirali v 7 ml na ledu ohlajenega 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in ponovili inkubacijo 10 min na ledu in centrifugiranje 10 min pri 4000 obratih na minuto in 4° C. Po odlitju supernatanta smo pelet resuspendirali v 1,4 ml na ledu ohlajenega 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in suspenzijo razdelili v epice po 100  $\mu$ l ter temu dodali 23  $\mu$ l 87% glicerola. Alikvote smo zmrznili v tekočem dušiku in shranili na -80° C.

### 7.2.4. Plazmidi

Uporabili smo plazmide raziskovalne skupine Albrehta in sodelavcev, navedene v prilogi članka The mammalian clock component PERIOD 2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors.<sup>15</sup>

Reporterski plazmid je imel osnovni vektor pGL3-Basic podjetja Promega, kataloška številka E1751, vanj pa je bil vstavljen *Bmal1*. S tem je bila dosežena sklopitev *Bmal1* in gena za luciferazo, kar je pomenilo sočasno izražanje obeh genov.

Uporabili smo plazmide s sledečimi geni:

*Bmal1* sklopljen z genom za luciferazo (reporterski plazmid – v nadaljevanju besedila: *Bmal*)  
gen za betagalaktozidazo

*Per2*

*Car*

*Ppara*

Uporabili smo tudi »prazen« plazmidni vektor. Vektorji so vsebovali gen za penicilinsko rezistenco.

#### **7.2.5. Transformacija kompetentnih bakterij s plazmidi in inokulacija bakterij**

Alikvot kompetentnih celic, shranjene na  $-80^{\circ}\text{C}$ , smo odtalili na ledu in jim dodali približno 10 ng plazmidne DNA ter inkubirali na ledu 30 min. Po tem času smo celice v termobloku izpostavili  $42^{\circ}\text{C}$  za 45 s, nato pa smo jih dali najprej za 2 min na led ter nato dodali 300  $\mu\text{l}$  SOC medija, ogretega na  $37^{\circ}\text{C}$ . Sledila je inkubacija s stresanjem 1 h na  $37^{\circ}\text{C}$ , po kateri smo bakterije prenesli na trdno agarno gojišče z ampicilinom, s čimer smo zagotovili, da so zrasle le celice, ki so plazmid sprejele. Uporabljeni plazmidni vektorji so namreč vsebovali gen za penicilinsko rezistenco in gene interesa.

#### **7.2.6. Priprava prekonočnih kultur bakterijskih celic**

Prekonočne kulture bakterijskih celic smo pripravili tako, da smo dali v 15 ml centrifugirke 7 ml tekočega LB gojišča ter inokulirali z eno bakterijsko kolonijo s trdnega gojišča. Tako pripravljene centrifugirke smo postavili na stresalnik in stresali pri  $37^{\circ}\text{C}$  in 250 rpm preko noči.

### **7.3. Izolacija plazmidov iz prekonočnih kultur bakterijskih celic in njihovo vrednotenje**

Prekonočne kulture smo centrifugirali 10 min pri 12.000 G, odlili tekoče gojišče in centrifugirke postavili na papirnate brisače, da je preostanek gojišča odtekel.

Za izolacijo smo uporabili GenElute HP Plasmid Miniprep Kit proizvajalca Sigma-Aldrich, kataloška številka NA0160-1KT. Izolacijo smo izvedli skladno z navodili proizvajalca.

#### **7.3.1. Spektrofotometrično vrednotenje koncentracije in čistote plazmidov**

Meritve smo izvajali z aparaturo Nanodrop ND 1000 proizvajalca Thermo Scientific. Sistem je omogočal UV/VIS spektrofotometrično merjenje koncentracije plazmidov v 2  $\mu\text{l}$  vzorcu.

Koncentracijo smo določili s priloženo programsko opremo na podlagi izračuna iz absorbance pri 260 nm in uporabo ustrezne funkcije na podlagi zakona Beer Lambert ter ekstinkcijskega koeficienta dvoverižne DNA.

Čistoto smo ocenili na podlagi razmerja absorbanc pri 260 nm in 280 nm. Količnik, katerega želena vrednost je 1,8, se zviša pri kontaminaciji z RNA (čista RNA ima količnik okrog 2) in zniža pri kontaminaciji s proteini (čisti proteini imajo količnik okrog 0,6).

Za svoje nadaljnje delo smo uporabili plazmide, pri katerih je bil količnik 260 nm/280 nm 1,8 +/- 0,2.

### 7.3.2. Gelska elektroforeza

#### Gel

agarozna	0,70 g
TBE	100 ml
etidijev bromid	7,0 µl

#### Izvedba

Za izvajanje gelske elektroforeze smo uporabili gel z 0,7% agaroze. Na strjen gel smo nanegli vzorce plazmidov koncentracije 100 ng/µ, katere smo predhodno zmešali z barvilom v razmerju 6 : 1.

Elektroforezo smo izvajali pri 100 V do *ad oculum* ustrezno prepotovane razdalje plazmidov. Gel smo analizirali s pomočjo sistema za dokumentacijo gela Uvitec Uvipro Platinum in programske opreme UviPro Platinum 1.1. Gelska elektroforeza je služila pregledu ustreznosti plazmidov. V kolikor bi se na gelu pojavilo karkoli nepričakovanega, bi takšen plazmid zavrnili.

## 7.4. Delo s sesalskimi celicami

### 7.4.1. Priprava medija DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Uporabili smo DMEM z visoko vsebnostjo glukoze proizvajalca Sigma-Aldrich, kataloška številka D7777-10X1L. Prašek za pripravo litra medija smo raztopili v 1,00 l MQ vode, uravnali pH in v LAF komori sterilno filtrirali skozi 0,2 µm filter. K 450 ml tako pripravljenega medija smo dodali 50 ml sterilnega FBS. DMEM z 10% FBS nam je služil kot medij za gojenje sesalskih celic (v nadaljevanju besedila: medij).

#### 7.4.2. Priprava celic

Uporabili smo Hepa 1-6 celice Evropske zbirke celičnih kultur (ECACC, ang. European Collection of Cell Cultures), ki so bile po šesti pasaži zamrznjene v tekočem dušiku v raztopini 90% FBS in 10% DMSO. Celice smo odtajali na sobni temperaturi in iz krioviale prenesli v T25 flask ter dodali 10 ml medija.

Hepa 1-6 so mišje adherentne epitelijske celice hepatocelularnega karcinoma. Osnovni medij za celice je DMEM z 10% FBS, pogoji za rast pa 95% zrak in 5% CO<sub>2</sub> ter temperatura 37° C. Običajno se predlaga zamenjava medija 2-3-krat tedensko in redčenje celic v razmerjih od 1 : 3 do 1 : 8 ob dosegu 70-80% konfluentnosti. Celice se zamrznejo v 95% medija in 5% dimetilsulfoksida. Rastejo v enem sloju, njihovo število pa se ob ustreznih pogojih podvoji v 18 h.

#### 7.4.3. Precepljanje celic

Celice smo precepili, ko so dosegle navidezno konfluentnost (preraščenost površine flaska) 80-90%. Celice so se pri tem redčile v razmerjih 1 : 2, 1 : 3 ali 1 : 6, odvisno od eksperimentalnih potreb po celicah in navidezne konfluentnosti celic.

Na dno flaska prilepljenim celicam smo z aspiracijo odstranili medij, jih sprali s PBS in slednjega aspirirali. Odlepljanje celic smo dosegli z dodatkom tripsina. Za T25 flask smo uporabili 1 ml tripsina, za T75 flask pa 2 ml tripsina. Ko so se celice po nekaj minutah odlepili, smo tripsin nevtralizirali z 8 ml medija, celice resuspendirali in v ustreznih redčitvah prenesli v nove flaske ter jim dodali 10-30 ml medija, odvisno od redčitve in načrtovanih sledečih precepljanj.

#### 7.4.4. Štetje celic

Celice smo šteli z aparaturo ADAM MC proizvajalca Digital Bio. K 50 µl celic smo dodali 50 µl barvila AccuStain proizvajalca Digital Bio, kataloška številka AccuStain ADR-1000. Po dodatku barvila smo zmes vorteksirali in razpipetirali po 12 µl v posamezno okence čipa AccuChip 4x proizvalca Digital Bio, kataloška številka AccuChip 4X Kit AD4K-200, vstavili čip v aparaturo in pomerili koncentracijo celic v posameznem okencu.

#### **7.4.5. Transfekcija Hepa 1-6 celic**

Celice smo po štetju ustrezno redčili na koncentracijo  $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  ter jih razpipetirali na mikrotitrsko ploščico s 96 okenci, 100  $\mu\text{l}$  na okence. Uporabili smo plošče proizvajalca Greiner s prozornim dnom in belimi stenami, kataloška številka 655098. Celice na mikrotitrski plošči smo nato inkubirali preko noči oz. do 90-100% navidezne konfluentnosti. Ob dosegu ustrezne konfluentnosti smo jih tretirali s transfekcijsko raztopino.

Za tranfekcije celic smo uporabili reagent X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent proizvajalca Roche Applied Science, kataloška številka 06366236001.

DMEM (brez seruma), transfekcijski reagent X-tremeGene in plazmide koncentracije 100 ng/ $\mu\text{l}$  smo ogreli na sobno temperaturo ter predhodno izolirane plazmide in reagent pred uporabo povorteksirali. V epice smo za vsakih 10 okenc mikrotitrskeske plošče odpipetirali 177  $\mu\text{l}$  DMEM (brez seruma), dodali 2000 ng plazmidov v enakih deležih (različni plazmidi z različnimi geni) in povorteksirali. Dodali smo še 3  $\mu\text{l}$  X-tremeGene (brez dotikanja sten epic) in vse skupaj premešali s pipetiranjem ter inkubirali 30 min. Po inkubaciji smo tako pripravljeno transfekcijsko raztopino razpipetirali po 20  $\mu\text{l}$  na okence mikrotitrskeske plošče. Po tem smo v vsako okence dodali še po 50  $\mu\text{l}$  DMEM (brez seruma). Po transfekciji smo celice celice inkubirali 48 ur in nato izvedli analizo.

#### **7.4.6. Liza celic in priprava na analizo**

Pred lizo smo s plošče s 96 okenci odstranili gojišče, in sicer tako, da smo ga s plošče stresli in nato ploščo odprto obrnili okrog in postavili na papirnato brisačo ter počakali nekaj minut, da je odteklo vso gojišče. Ko je odteklo, smo v vsako okence napipetirali po 20  $\mu\text{l}$  ( $5 \times$  razredčenega) liznega pufra Passive Lysis Buffer  $5 \times$  proizvajalca Promega, kataloška številka E1941, in dali ploščo na stresalnik za 45 min.

#### **7.4.7. Analiza betagalaktozidazne aktivnosti**

Na posamezno okence smo napipetirali 135  $\mu\text{l}$  ONPG raztopine za analizo betagalaktozidazne aktivnosti, pripravljene tik pred uporabo. Ploščico smo nato inkubirali pri  $37^\circ \text{C}$  do rumenega obarvanja (približno 20-60 min) in pomerili absorbanco pri 420 nm z aparaturo Synergy H4 proizvajalca BioTek.

#### 7.4.8. Analiza luciferazne aktivnosti

Uporabili smo ONE-Glo Luciferase Assay System proizvajalca Promega, kataloška številka E6120.

Naš reporterski plazmid je imel vstavljen gen *Bmal1*, ki je bil (zaradi uporabe osnovnega vektorja pGL3) sklopljen z genom za luciferazo. V posamezno okence smo dodali 25  $\mu$ l vnaprej pripravljene in alikvotiranega ONE-Glo luciferaznega substrata in takoj pomerili luminiscenco z aparaturo Synergy H4 proizvajalca BioTek. Integracijski čas smo nastavili na 2 s, ojačanje signala pa na avtomatsko.

#### 7.5. Študij sprememb izražanja *Bmal1* v celicah, kotransfeciranih s *Per2* in *Car*

Zanimalo nas je, ali CAR in PER2 skupaj vplivata na izražanje *Bmal1*. Uporabili smo reporterski plazmid, kjer je bil *Bmal1* sklopljen z genom za luciferazo, tako da smo lahko glede na luciferazno aktivnost sklepali na izražanje *Bmal1*.

S plazmidnimi vektorji smo v celice vnašali sledeče gene: gen za betagalaktozidazo (*Bgal*), *Bmal1* sklopljen z genom za luciferazo (v nadaljevanju besedila: *Bmal*), *Period 2* (*Per2*), gen za CAR (*Car*), gen za PPAR $\alpha$  (*Ppara*), in »prazen« plazmidni vektor (v nadaljevanju besedila: *basic*).

»Prazen« plazmidni vektor smo uporabljali za dopolnjevanje količine plazmidne DNA do 200 ng na okence, medtem ko so bile količine ostalih plazmidov vedno enake.

Pri študiju izražanja *Bmal1* smo za ničelno kontrolo transfecirali celice z *Bgal*, *Bmal* in *basic*, za pozitivno kontrolo smo uporabili *Bgal*, *Bmal*, *Per2* in *Ppara*.<sup>15</sup> Pri študiju vpliva kotransfekcije celic s *Per2* in *Car* na izražanje *Bmal1* so bili vključeni *Bgal*, *Bmal*, *Per2* in *Car*, potem smo pa dodali še preizkus odziva pri dodanem *Per2* brez *Car* (*Bgal*, *Bmal*, *Per2* in *basic*) ter *Car* brez *Per* (*Bgal*, *Bmal*, *Car* in *basic*). Transfekcijski reagent izbire je bil XtremeGene.

**Tabela 1: Količina plazmidov v ng za posamezno transfekcijo (na okence mikrotitrne plošče)**

gen v plazmidu	ničelna kontrola ( <i>Bmal1</i> )	pozitivna kontrola ( <i>Bmal1</i> )	izražanje <i>Bmal1</i> s: PER2 CAR	izražanje <i>Bmal1</i> s: PER2	izražanje <i>Bmal1</i> s: CAR
<i>Bgal</i>	50	50	50	50	50
<i>Bmal</i>	50	50	50	50	50
<i>Ppara</i>		50			
<i>Per2</i>		50	50	50	
<i>Car</i>			50		50
<i>basic</i>	100			50	50

## 7.6. In silico metode

### 7.6.1. Izbira in priprava ustreznih kristalnih struktur proteinov za nadaljnje delo

Pri svojem študiju interakcije med PER2 in CAR smo uporabili kristalno strukturo PAS domene mišjega proteina PER2 (PDB ID 3GDI) in kristalne strukture mišjega in človeškega receptorja CAR (PDB ID 1XNX, 1XV9, 1XVP, 1XLS). Izbira je temeljila na dostopnosti (v času dela edina kristalna struktura sesalskega PER2) in velikosti kristaliziranega dela CAR (PDB ID 1XNX) ter prisotnosti koaktivatorjev ter ligandov v kristalnih strukturah s CAR (PDB ID 1XV9, 1XVP, 1XLS).

### 7.6.2. Pregled sorodnosti LXXLL zaporedij PER2 z zaporedji LXXLL koaktivatorjev CAR

PER2 smo najprej primerjali s koaktivatorji, ki so kristalizirani s CAR, nato pa še s tistimi koaktivatorji, za katere kristalna struktura s CAR ne obstaja.

V primeru, da imajo koaktivatorji več LXXLL zaporedij, smo poskušali iz literature ugotoviti, s katerim izmed njih najverjetneje interagirajo s CAR.

Obravnavane koaktivatorje smo nato poiskali v podatkovni bazi UniProtKB in si ogledali njihovo aminokislinsko zaporedje, v katerem smo poiskali vsa LXXLL zaporedja, te klasificirali in jih primerjali z obema LXXLL zaporedjema PER2.

### **7.6.3. Postavljanje drugega LXXLL zaporedja PER2 na CAR in pregled ter vrednotenje rezultatov**

Ker področje PER2, ki vsebuje drugo zaporedje LXXLL, ni kristalizirano, smo poskušali s spletnim orodjem BLAST<sup>43</sup> takšno zaporedje najti v kakšni drugi strukturi. Iskano zaporedje ni del nobene 3D strukture, zato smo se odločili poiskati predlogo, torej sorodno zaporedje, katerega bi spremenili v zaporedje SGLLNLL. Obstajajo zaporedja s po eno drugačno aminokislino ali pa takšna, ki imajo dodatno aminokislino vrinjeno v zaporedje, vendar so to nekoaktivatorska zaporedja, torej zaporedja pri proteinih, ki nimajo vloge koaktivatorjev jedrnih receptorjev.

Za predlogo smo zato izbrali zaporedji LXXLL pri človeškem PGC1 $\alpha$  (ID 3B1M) in podganjem NCoA2 (ID 1XLS). Najprej smo iz struktur 1XLS in 3B1M z urejevalnikom besedila ročno izbrisali vso vsebino razen vrstic z informacijami za atome obeh zaporedij interesa. Zaporedju iz PGC1 $\alpha$  smo nato najprej spremenili koordinate s pomočjo programa Hex 6.12.<sup>76</sup> Zaporedje ALLRYLL (NCoA2), ki je del kompleksa s CAR in ima torej pravilne koordinate, smo odprli kot »receptor«, zaporedje SLLKKLL pa kot »ligand«. Obe zaporedji smo približno ročno poravnali in nato v programu izbrali možnost »matching«, ki odprti molekuli 3D poravna. Dobljeno rešitev smo shranili kot koordinatno datoteko.

Tako 3D poravnane zaporedju SLLKKLL (PGC1 $\alpha$ ) smo s programom Swiss PDB Viewer<sup>77</sup> spremenili aminokislino na mestih -1, 2 in 3 v aminokislino, ki jih najdemo pri PER2. To smo naredili v programu z možnostjo »mutate«, izborom aminokislino interesa v grafičnem vmesniku in izborom ciljne aminokislino ter potrditvijo energijsko najugodnejšega rotamera. Enako smo naredili tudi z zaporedjem ALLRYLL. V obeh primerih smo s spremembami večinoma uvedli aminokislino z manjšimi stranskimi verigami.



Dobljeno strukturo smo dodali eksperimentalnemu modelu mišjega CAR (PDB ID 1XLS). Tako so bile začetne aminokisliline izdelanega zaporedja SGLLNLL (drugo LXXLL zaporedje PER2) v stiku s koncem heliksa 5 proteina CAR, končne pa s koncem heliksa 3.

Po končanem modeliranju smo kompleks CAR z zaporedjem LXXLL solvatirali in električno nevtralizirali. S pomočjo spletnega orodja CHARMM GUI<sup>78,79</sup> smo ga postavili v kocko iz 6561 molekul vode, 36 natrijevih kationov in 27 kloridnih anionov. Sistem smo nato relaksirali s 150 koraki optimizacije: po 50 korakov s.d., ABNR (ang. adopted basis Newton-Raphson method), d.l. (ang. descent lattice). Temu je sledilo 100 ps CPT (ang. constant pressure and temperature) simulacije dinamike (300 K, 1 bar, korak 1 fs), ki uporablja EWALD-ovo sumacijo za izračun elektrostatskih interakcij, in sicer z uporabo omejene restrikcije proteinskih delov kompleksa (ang. cons harm force 1.0). Ko je struktura postala stabilna s sprejemljivim strukturnim rezultatom v PROCHECK-u, smo modeliranje nadaljevali do 5 ns CPT molekulske dinamike, tokrat brez vsakršnih restrikcij. Vseskozi smo pri optimizacijah in dinamiki uporabljali program CHARMM in njegove strukturne parametre (ang. force fields).<sup>78-81</sup>

## 8. REZULTATI

### 8.1. Povišanje izražanja *Bmal1* po kotransfekciji mišjih hepatokarcinomskih celic s *Per2* in *Car*

Meritve smo izvedli na več ploščah, pri vsaki plošči pa smo imeli 5 različnih transfekcijskih mešanic (negativna kontrola, pozitivna kontrola s *Ppara* in *Per2*, eksperiment, kontrola s *Per2* in kontrola s *Car*).

Zaradi razlik v vrednostih med posameznimi ploščami smo za doseg primerljivosti rezultatov med ploščami izvedli normalizacijo glede na posamezno ploščo, in sicer na podlagi absorbance, pomerjene v okencih z dodanim substratom za betagalaktozidazo.

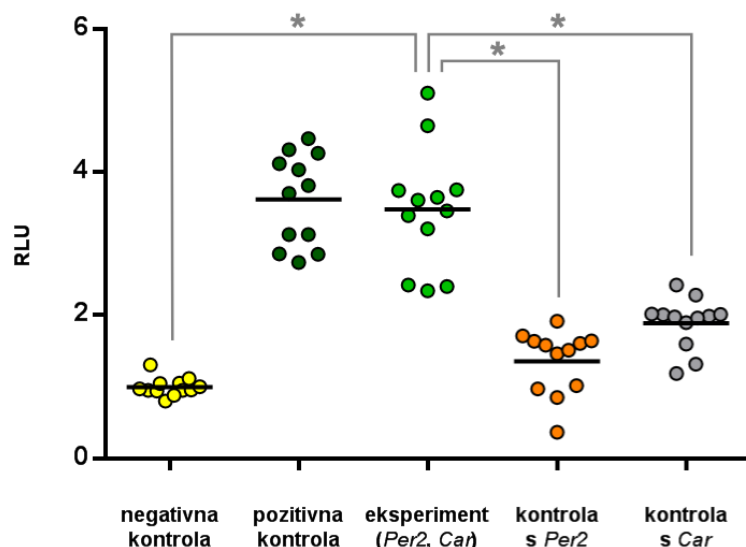
Luciferazno aktivnost smo nato za posamezno transfekcijsko mešanico normalizirali glede na povprečno absorbanco pri betagalaktozidazni meritvi iste transfekcijske mešanice.

Luciferazne aktivnosti na posamezni plošči smo normalizirali glede na povprečno luciferazno aktivnost pozitivne kontrole. Za doseg homogenosti varianc je bilo potrebno logaritmiranje rezultatov.

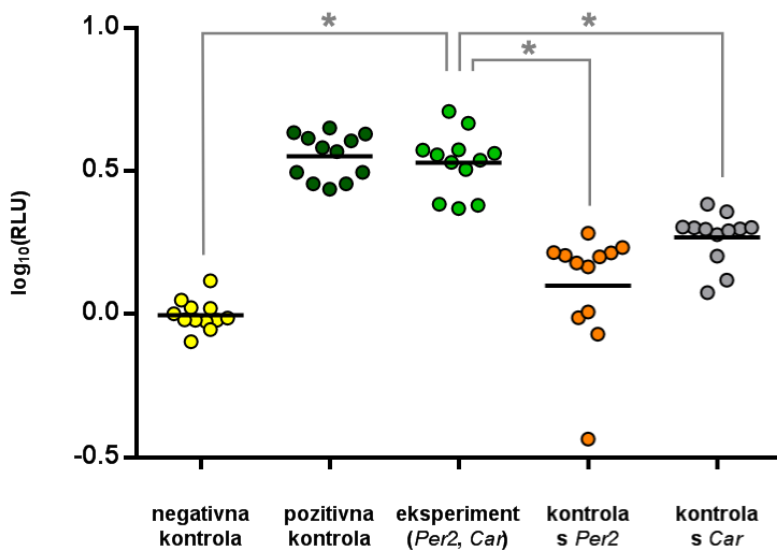
Normalizirane vrednosti relativne luciferazne aktivnosti (RLU) so pokazale primerljiv odziv med pozitivno kontrolo in kotransfekcijo celic s *Per* in *Car* (sliki 4 in 5). Med obema tretiranjema celic ne obstaja statističnih razlik ( $p < 0,01$ ).

Statističnih razlik prav tako ni bilo med negativno kontrolo in kontrolo s *Per2* ( $p < 0,01$ ), se je pa statistično od njiju in od eksperimenta s *Per2* in *Car* razlikovala kontrola s *Car* ( $p < 0,01$ ).

Rezultati so pokazali, da kotransfekcija celic s *Per2* in *Car* močno poveča izražanje *Bmal1*, povečanje pa je enako kot pri kotransfekciji s *Ppara* in *Per2*. Za PPAR $\alpha$  in PER2 je znano, da interagirata.<sup>15</sup>



Slika 4: Prikaz normaliziranih vrednosti relativne luciferazne aktivnosti (RLU) pokaže primerljiv odziv ( $p < 0,01$ ) pri pozitivni kontroli in eksperimentu s *Per2* in *Car* in primerljiv odziv ( $p < 0,01$ ) pri negativni kontroli in kontroli s *Per2*; \* – signifikantna razlika med kontrolo in eksperimentom s *Per2* in *Car*



Slika 5: Prikaz desetiških logaritmov normaliziranih vrednosti relativne luciferazne aktivnosti (RLU) pokaže primerljiv odziv ( $p < 0,01$ ) pri pozitivni kontroli in eksperimentu s *Per2* in *Car* in primerljiv odziv ( $p < 0,01$ ) pri negativni kontroli in kontroli s *Per2*; \* – signifikantna razlika med kontrolo in eksperimentom s *Per2* in *Car*

## 8.2. Sorodnost LXXLL zaporedij PER2 z zaporedji LXXLL znanih koaktivatorjev CAR

Namen pregleda sorodnosti LXXLL zaporedij PER2 z znanimi koaktivatorji CAR je bil najti koaktivatorju PER2 podobne značilnosti pri znanih koaktivatorjih receptorja CAR. To bi nakazalo na verjetnost, da PER2 neposredno interagira s CAR. Pomagali smo si z razdelitvijo zaporedij LXXLL v 4 skupine oz. razrede (pri tem + predstavlja pozitivno nabito aminokislino, p polarno aminokislino, S serin, T treonin,  $\phi$  pa aminokislino brez polarne stranske verige).<sup>25</sup>

- razred 1: +LXXLL
- razred 2: p $\phi$ LXXLL
- razred 3: (S/T) $\phi$ LXXLL
- razred 4: + $\phi$ LXXLL

### 8.2.1. Negativni rezultati pregleda koaktivatorjev, za katere je znana kristalna struktura s CAR

#### Podobnost koaktivatorskih zaporedij PER2 in NCoA1

Mišji PER2 ima na mestih 304-310 SQLCCLL in na mestih 1049-1055 SDLLNLL,<sup>27</sup> človeški pa ima na mestih 1055-1061 SGLLNLL namesto SDLLNLL.<sup>26</sup> Primerjava teh zaporedij z drugimi XXLXXLL zaporedji je pokazala ujemanje s koaktivatorjem NCoA1.

NCoA1 ima 7 XXLXXLL zaporedij in interagira s CAR (PDB ID 1XVP in 1XV9). Človeški NCoA1 ima na mestih 911-917 SQLDELL in na mestih 1433-1439 SLLQQLL.<sup>82</sup>

Zaporedja LXXLL smo klasificirali glede na razred. Zaporedji SGLLNLL (PER2) in SLLQQLL (NCoA1) spadata v razred 3 ((S/T) $\phi$ LXXLL), medtem ko sta zaporedji SQLCCLL (PER2) in SQLDELL (NCoA1) podobni razredu 3, a imata na mestu - 1 aminokislino s polarno stransko verigo.

Zaradi podobnosti zaporedij nas je zanimalo, ali NCoA1 s temi zaporedji interagira s CAR, saj bi potem podobno interakcijo pričakovali tudi med PER2 in CAR. Ob pregledu kristalnih struktur kompleksa človeških receptorjev CAR-RXR (PDB ID 1XVP in 1XV9), v katerih je del NCoA1, smo ugotovili, da omenjeni koaktivator v interakcijo s CAR ne vstopa z LXXLL

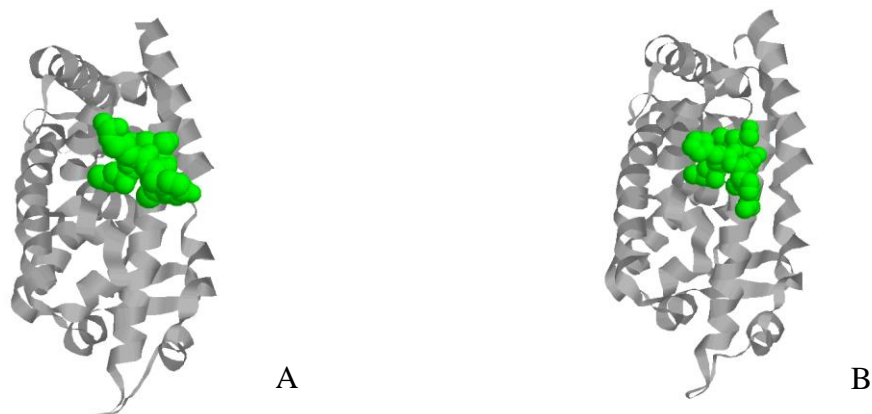
zaporedjema na mestih 911-917 in 1433-1439, ki sta podobna zaporedjema pri PER2. Interakcijo s CAR tvori z zaporedjem KILHRLI. Gre za zaporedje razreda 4 (+ $\phi$ LXXLL).

#### Podobnost koaktivatorskih zaporedij PER2 in NCoA2 (TIF2)

Podganji NCoA2 (TIF2) ne vstopa v interakcijo z mišjim CAR (PDB ID 1XLS) z zaporedjem XXLXXLL sorodnim tistima pri PER2. S CAR interagira z zaporedjem ALLRYLL. Gre za zaporedje s hidrofobnimi aminokislinami na mestih - 2 in - 1, ki ne spada v noben razred uporabljene klasifikacije.

S pregledom kristalnih struktur 1XLS (mišji CAR) in 1XV9 (človeški CAR), kjer CAR interagira s koaktivatorjema NCoA2 in NCoA1, smo ugotovili, kakšen položaj pri vezavi na CAR zasedeta levcina na mestih + 1 in + 5 zaporedja LXXLL.

Oba koaktivatorja (NCoA1 in NCoA2) se vežeta na mesti na CAR, ki sta eden blizu drugega. V obeh primerih je levcin na mestu + 1 v bližini konca heliksa 5 CAR, medtem ko je levcin na mestu +5 v bližini konca heliksa 3 (slika 6). Na podlagi te ugotovitve smo lahko sklepali, na kateri del CAR se zaporedja LXXLL vežejo.



**Slika 6: A (ID 1XLS) – Primerjava vezave LXXLL zaporedja NCoA2 na CAR in B (ID 1XV9) – LXXLL zaporedja NCoA1 na CAR; CAR je prikazan v sivi, LXXLL pa v zeleni barvi.**

### 8.2.2. Pozitivni rezultati pregleda koaktivatorjev, za katere ni znana kristalna struktura s CAR

Pregledali smo koaktivatorje, za katere kristalna struktura s CAR ni bila na voljo, obstajajo pa eksperimentalni podatki o interakcijah teh koaktivatorjev s CAR. Tako smo si podrobneje ogledali NCoA3, PGC1 $\alpha$  in NCoA6.

#### Podobnost koaktivatorskih zaporedij PER2 in NCoA3

Koaktivator NCoA3 ima zaporedja KKLLQLL (razred 1), RILHKLL (razred 4) in ALLRYLL (ne ustreza nobenemu razredu uporabljene klasifikacije, gre pa za enako zaporedje kot pri NCoA2, s katerim ta vstopa v interakcijo s CAR) in DQLHTLL.<sup>83</sup> Noben od teh ni podoben tistima pri PER2.

#### Podobnost koaktivatorskih zaporedij PER2 in PGC1 $\alpha$ (PPAR $\gamma$ C1A)

PGC1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$ C1A) v interakcijo s CAR vstopa z zaporedjem SLLKKLL,<sup>84</sup> ki je zaporedje razreda 3 ((S/T) $\phi$ LXXLL) tako kot drugo LXXLL zaporedje človeškega PER2 SGLLNLL.<sup>26</sup> Tako mišji kot človeški PGC1 $\alpha$  imata zaporedje SLLKKLL. PGC1 $\alpha$  ima samo eno zaporedje LXXLL, zato zagotovo vstopa v interakcijo s CAR s tem zaporedjem.

#### Podobnost koaktivatorskih zaporedij PER2 in NCoA6

NCoA6 ima dve LXXLL zaporedji, s CAR pa interagira s prvim,<sup>85</sup> to je SPLLVNLL, ki je podobno zaporedjem razreda 3, med katera spadata zaporedji SLLKKLL PGC1 $\alpha$  in SGLLNLL človeškega PER2.

Obstaja torej vsaj en koaktivator z zaporedjem LXXLL razreda 3, za katerega se ve, da s tem zaporedjem interagira s CAR. Hkrati pa je to zaporedje istega razreda kot drugo LXXLL zaporedje človeškega PER2. Zaradi podobnosti drugega LXXLL zaporedja PER2 z zaporedjem pri koaktivatorju CAR (PGC1 $\alpha$ ) je zelo verjetno, da PER2 in CAR neposredno interagirata z zaporedjem SGLLNLL (1056-1060).<sup>26</sup>

Na podlagi podobnosti lahko sklepamo, da je drugo zaporedje LXXLL verjetnejši kandidat za morebitno interakcijo s CAR od prvega zaporedja.

Ker ni kristalne strukture CAR s koaktivatorjem PGC1 $\alpha$ , pri nadaljnjem delu nismo mogli izhajati iz takšne strukture in si pomagati s 3D poravnavo. Obstaja pa nekaj kristalnih struktur PGC1 $\alpha$ , npr. s človeškim PPAR $\gamma$  (PDB ID 3B1M).

### Prvo LXXLL zaporedje PER2

Albrecht je s sodelavci z mutacijami obeh zaporedij PER2 pokazal, da prvo zaporedje interagira s PPAR $\alpha$  in REV-ERB $\alpha$ , lahko pa bi bilo odgovorno tudi za interakcijo z drugimi receptorji.<sup>15</sup> Zato smo pregledali tudi podobnost interakcijskih zaporedij znanih koaktivatorjev CAR s prvim zaporedjem PER2, vendar pri tem nismo naleteli na nobenega takšnega, ki bi bil podoben prvemu LXXLL zaporedju PER2.

Iz pregleda koaktivatorjev je razvidno, da je za interakcijo s CAR ugodno, da je na mestu -2 LXXLL zaporedja serin, kot je pri prvem in drugem LXXLL zaporedju PER2.

Možnost vezave PER2 na CAR s prvim LXXLL zaporedjem smo nato dodatno preverili tudi s proteinskim prileganjem dela mišjega PER2 (PDB ID 3GDI) s prvim LXXLL zaporedjem na mišji CAR (PDB ID 1XLS). S programom Hex 6.12<sup>76</sup> smo odprli CAR kot »receptor« in PER2 kot »ligand« ter izbrali možnost proteinskega sidranja. Ročno smo pregledali 500 energijsko najugodnejših struktur proteinskega sidranja s programom Hex 6.12<sup>76</sup> in z različnimi stopnjami pregleda izbrali 14 potencialno ugodnih struktur, ki pa ne izgledajo kot ustrezne rešitve.

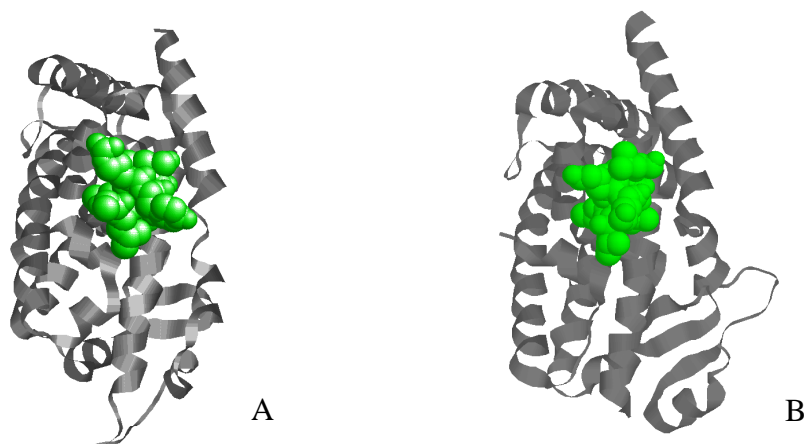
### **8.3. Rezultat pregleda drugemu LXXLL zaporedju PER2 sorodnega zaporedja pri PGC1 $\alpha$ in njegovega vezavnega mesta na PPAR $\gamma$**

PGC1 $\alpha$  ima LXXLL zaporedje razreda 3 ((S/T) $\phi$ LXXLL) tako kot človeški PER2. S tem zaporedjem interagira s CAR in PPAR $\gamma$ . Tudi PER2 interagira s PPAR $\gamma$ .<sup>36</sup>

Lahko sklepamo, da obstaja precejšnja verjetnost, da PER2 interagira s CAR podobno kot interagira s PPAR $\gamma$ . Hkrati lahko zaradi podobnosti LXXLL zaporedij sklepamo, da PER2 interagira s CAR tako kot PGC1 $\alpha$  interagira s CAR.

Primerjava kristalnih struktur CAR in PPAR $\gamma$  s koaktivatorji (CAR in NCoA2, PPAR $\gamma$  in PGC1 $\alpha$ ) nemudoma pokaže podobnost med mišjim CAR (PDB ID 1XLS) in človeškim PPAR $\gamma$  (3B1M), posebej pri heliksih 3-5, kamor se veže LXXLL zaporedje (slika 7).

Poleg tega v obeh primerih LXXLL obeh koaktivatorjev poteka od skrajnega konca heliksa 5 (levcin zaporedja na mestu +1) do konca heliksa 3 (levcin zaporedja na mestu +5) in je nekako prečno usidran v hidrofoben žep, ki ga tvorita oba heliksa.



**Slika 7: Primerjava vezave A (ID 1XLS) – LXXLL NCoA2 (zelena) na CAR (siva) in B (ID 3B1M) – LXXLL PGC1 $\alpha$  (zelena) na PPAR $\gamma$  (siva) je pokazala veliko podobnost med CAR in PPAR $\gamma$  na področju heliksov 3-5, hkrati pa se vidi, da se v obeh primerih levcin na mestu +1 zaporedja LXXLL postavi v bližino heliksa 5 LBD jedrnega receptorja**

Na koncu heliksa 3 je v obeh primerih skladno z literaturnimi podatki lizin, ki je ključen za interakcijo z aminokislinami po LXXLL.<sup>15,24,25</sup> Lizin je prav tako v obeh primerih prisoten v heliksu 5, kamor se usidra začetni del LXXLL. V primeru PGC1 $\alpha$  je na tistem mestu serin in v primeru NCoA2 asparagin. Tako serin kot asparagin bi lahko interagirala z lizinom v heliksu 5 receptorja. Lizin v heliksu 5 je na enakovrednem mestu pri CAR in PPAR $\gamma$  in ni zabeležen v pregledani literaturi.

#### Podobnosti v heliksih 3-5 CAR in PPAR $\gamma$

S programom RasMol<sup>86</sup> smo izmerili določene razdalje in kote, ki opisujejo predvideno vezavno mesto za LXXLL in primerjali obe koaktivatorski zaporedji in njun položaj glede na helikse 3-5 obeh receptorjev.

Obstaja velika podobnost v dimenzijah obeh receptorjev na območju heliksov 3-5. Pri CAR je razdalja od konca heliksa 3 do začetka heliksa 5 v kristalni strukturi 14,8 Å (merjena od  $\alpha$ -C-



atoma asparaginske kisline 188 do  $\alpha$ -C-atoma metionina 197), pri PPAR $\gamma$  pa je ta razdalja 14,7 Å (merjena od  $\alpha$ -C-atoma serina 302 do  $\alpha$ -C-atoma levcina 311).

Podobnost se nadaljuje pri kotih, ki določajo medsebojen položaj heliksov 3-5. Tako je kot med heliksoma 3 in 4 (ki ga pri CAR omejujejo treonin 196, asparaginska kislina 188 in glutamin 181) 99,4°, medtem ko je ekvivalenten kot pri PPAR $\gamma$  (ki ga omejujejo asparaginska kislina 310, serin 302 in glutaminska kislina 295) 99,6°. Kot med heliksoma 4 in 5 pri CAR (med asparaginsko kislino 188, treoninom 196 in serinom 202) je 83,3°, pri PPAR $\gamma$  (med serinom 302, asparaginsko kislino 310 in treoninom 316) pa 78,6°.

Razdalja med lizinoma na heliksih 3 in 5 je pri CAR (med lizinoma 187 in 205) 14,5 Å, pri PPAR $\gamma$  (med lizinoma 301 in 319) pa 14,8 Å.

Levcina +1 in +5 sta pri koaktivatorju CAR (NCoA2, zaporedje ALLRYLL) oddaljena 6,2 Å, pri koaktivatorju PPAR $\gamma$  (PGC1 $\alpha$ , zaporedje SLLKLL) pa 6,1 Å.

Zaradi podobnosti smo primerjali aminokislinski zaporedji obeh receptorjev na območju vezave LXXLL zaporedij. Primerjava zaporedja med -25 in +25 glede na lizin v heliksu 3 ni pokazala podobnosti.

#### Podobnosti CAR in PPAR $\gamma$ s PPAR $\alpha$

Želeli smo preveriti, ali obstaja strukturna podobnost tudi z receptorji, za katere se ve, da vežejo LXXLL zaporedja preostalih razredov. Idealen receptor za primerjavo je tako PPAR $\alpha$ , saj je Albrecht s sodelavci ugotovil, da se nanj veže PER2 s prvim LXXLL in ne z drugim.<sup>15</sup>

Človeški PPAR $\alpha$  (PDB ID 4BCR) ima razdaljo od konca heliksa 3 do začetka heliksa 5 14,7 Å (med alaninom 293 in levcinom 302), med lizinoma 292 in 310 (v heliksih 3 in 5) pa 14,1 Å.

Prva meritev se tako ujema s CAR in PPAR $\gamma$ , druga pa ne. **Lizin iz heliksa 3, ki je potrjeno pomemben za specifično interakcijo z LXXLL zaporedji, in lizin iz heliksa 5, ki se pojavlja na zanimivem mestu v heliksu 5, sta pri PPAR $\alpha$  bolj skupaj kot pri CAR in PPAR $\gamma$ .**

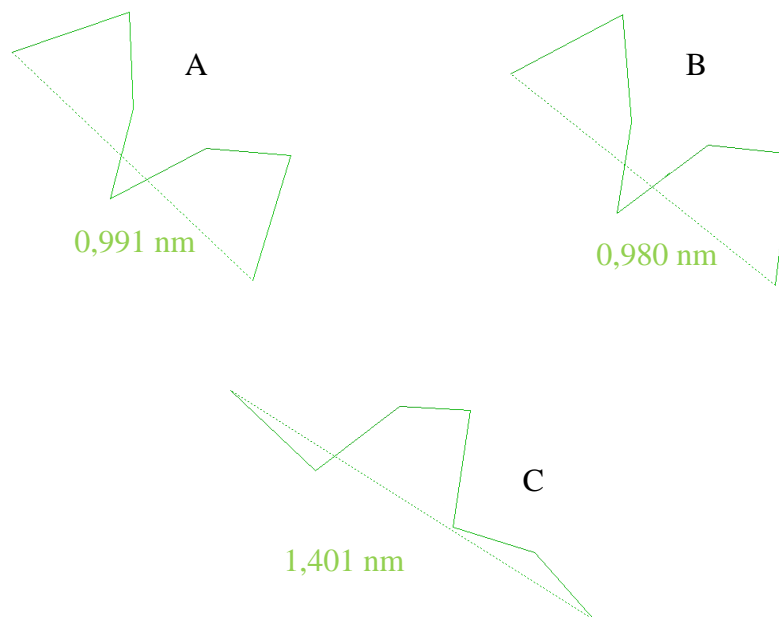
**Lizin v heliksu 5 je na mestu receptorjev CAR in PPAR $\gamma$ , kamor se usidrajo aminokislina -2 in -1 zaporedja LXXLL, ki so ključne za specifično interakcijo z jedrnimi receptorji.**

Podobnost med receptorji PPAR $\alpha$ , CAR in PPAR $\gamma$  je tudi v kotih. Kot med heliksoma 3 in 4 PPAR $\alpha$  (med glutaminom 286, alaninom 293 in asparaginom 301) je z 99,2° razmeroma

podoben enakovrednima kotoma pri CAR in PPAR $\gamma$ , kot med heliksoma 4 in 5 (med alaninom 293, asparaginom 301 in treoninom 307) pa je  $78,7^\circ$ , kar je praktično identično kot pri PPAR $\gamma$ .

#### 8.4. Izdelava drugega LXXLL zaporedja PER2 in njegova postavitve v vezavno mesto CAR

Pri iskanju podobnih zaporedij drugemu LXXLL zaporedju PER2 smo našli zaporedja s po eno drugačno aminokislino ali pa takšna, ki imajo dodatno aminokislino vrinjeno v zaporedje. Ta zaporedja se ponujajo kot smiselne predloge, vendar se izkaže, da je pri njih prostorska razporeditev aminokislin povsem drugačna od pričakovane, saj gre za nekoaktivatorska zaporedja, torej zaporedja, ki niso del koaktivatorjev jedrnih receptorjev in nimajo funkcije vezave na receptor. Obstajajo torej velike konformacijske razlike med LXXLL zaporedji koaktivatorjev jedrnih receptorjev in nekoaktivatorskimi LXXLL zaporedji (slika 8).

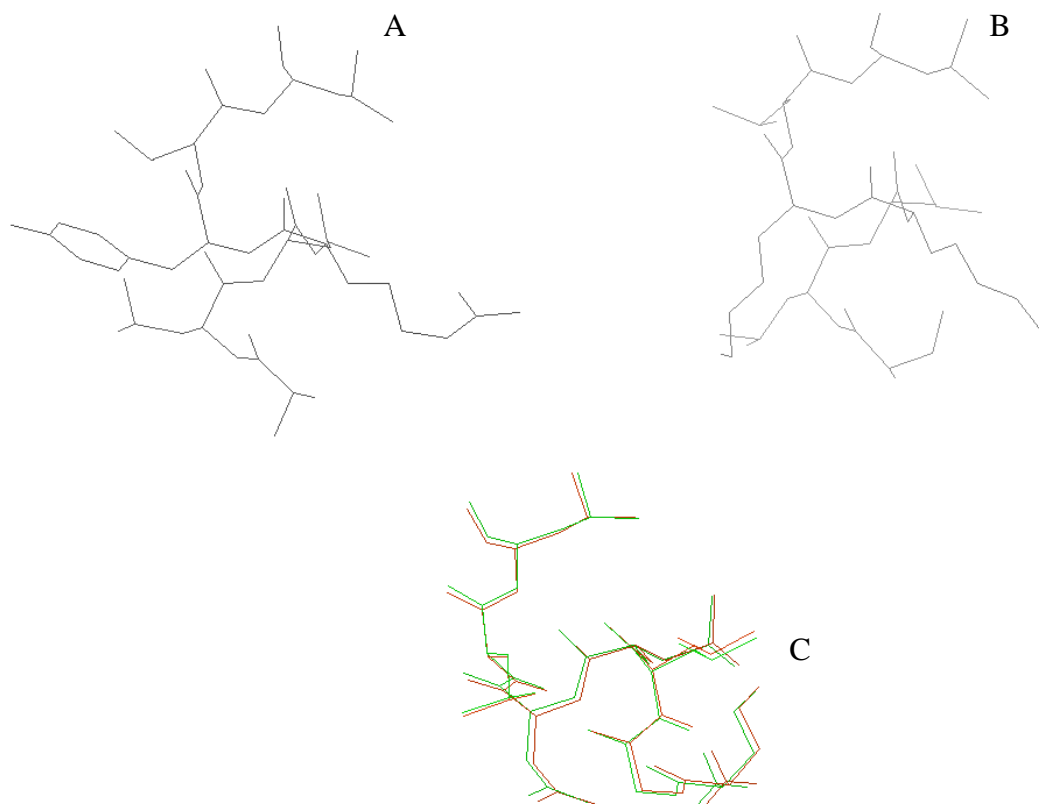


**Slika 8: Prikaz osnovnih verig zaporedij LXXLL in razdalj med aminokislinama -2 in 5: A – koaktivatorsko zaporedje ALLRYLL koaktivatorja NCoA2 (ID 1XLS); B – koaktivatorsko zaporedje SLLKKLL koaktivatorja PGC1 $\alpha$  (ID 3B1M); C – nekoaktivatorsko zaporedje SGLLSLL (ID 4DOY). Vidijo se velike konformacijske razlike med koaktivatorskimi in nekoaktivatorskimi zaporedji, kar nakazuje, da je morda oblika osnovne verige LXXLL zaporedij posledica njihove funkcije**

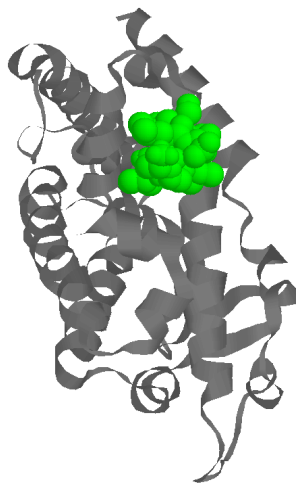
Kot predlogi smo vzeli koaktivatorja NCoA2 (ID 1XLS) in PGC1 $\alpha$  (ID 3B1M). NCoA2 je v strukturi 1XLS vezan na CAR in ima ustrezne koordinate za interakcijo z receptorjem, zato smo s programom Hex 6.12<sup>76</sup> LXXLL zaporedje PGC1 $\alpha$  3D poravnali z LXXLL zaporedjem NCoA2.

S programom Swiss PDB Viewer<sup>77</sup> smo obema koaktivatorjema spremenili aminokislinske XXLXXLL zaporedji v SGLLNLL. Na takšen način smo dobili dve zelo podobni peptidni verigi, ki predstavljata drugo LXXLL zaporedje PER2 (slika 9).

Zaporedje SGLLNLL, narejeno iz PGC1 $\alpha$ , smo nato kopirali v isto .pdb datoteko kot CAR iz strukture 1XLS. Na takšen način smo naredili kompleks drugega LXXLL zaporedja PER2 in CAR (slika 10).



**Slika 9: Prikaz XXLXXLL zaporedij: A – NCoA2 (ID 1XLS); B – PGC1 $\alpha$  (ID 3B1M); C – iz A in B narejen SGLLNLL (v zeleni iz NCoA2, v oranžni iz PGC1 $\alpha$ ), ki predstavlja drugo XXLXXLL zaporedje PER2**

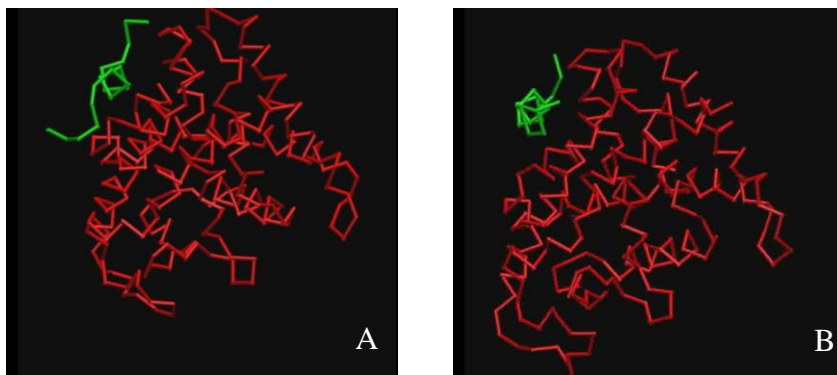


Slika 10: Rezultat postavljanja drugega LXXLL zaporedja (zelena) na CAR (siva)

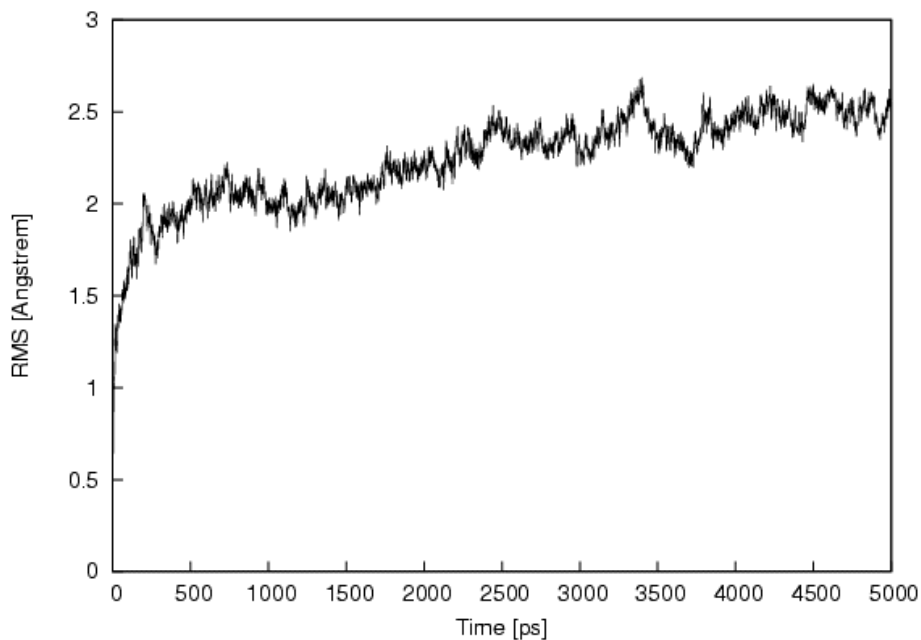
### 8.5. Preverjanje kompleksa drugega LXXLL zaporedja PER2 in CAR z molekulsko dinamiko

Kompleks peptida SGLLNLL in mišjega receptorja CAR, ki smo ga ročno pripravili in podvrgli solvataciji s spletnim orodjem CHARMM GUI,<sup>78,79</sup> smo preverili z metodo molekulskega modeliranja, in sicer z molekulsko dinamiko, s pomočjo programa CHARMM.<sup>78,79</sup> Simulacijo smo izvajali 5 ns.

V obdobju po cca. 2,5 ns se je pričela vrednost RMS (slika 12), ki je pri oscilirajoči funkciji konstantna, stabilizirati, kar kaže, da je peptid SGLLNLL zavzel na receptorju položaj, okrog katerega se je gibal.



**Slika 11: Primerjava začetne strukture (A) in strukture po 5 ns (B); RMS je približno 2,5 Å**



**Slika 12: Sprememba RMS v odvisnosti od časa**

Primerjava začetnega položaja in položaja po 5 nanosekundah (slika 11) nam je pokazala, da aminokislina peptida na mestih -2 in -1, ki predstavljajo del, odgovoren za specifičnost interakcije, ostanejo na predvidenem mestu. Levcina na mestih +4 in +5 se premakneta in globlje zasidrata v hidrofoben žep LBD domene CAR. Molekulska dinamika je dala rezultat, ki je v skladu s predvidevanjem, da drugo LXXLL zaporedje PER2 interagira s CAR.

## 9. RAZPRAVA

Namen našega dela je bil preveriti, ali obstaja kakšna povezava med PER2 in CAR ter ali ta povezava vpliva na izražanje *Bmal1*. V primeru potrditve povezave med PER2 in CAR smo želeli preveriti, ali pride do neposredne interakcije med omenjenima proteinoma, hkrati pa smo želeli preveriti, ali lahko takšno interakcijo razložimo.

Pokazali smo, da kotransfekcija mišjih hepatokarcinomskih celic s *Per2* in *Car* poviša izražanje *Bmal1* (sliki 4 in 5) do enake mere kot kotransfekcija celic s *Ppara* in *Per2* (pozitivno kontrolo).<sup>15</sup> Ugotovili smo tudi, da imata tako PER2 kot CAR strukturne elemente, prek katerih bi lahko interagirala. Predpostavili smo, da se PER2 veže na CAR kot koaktivator jedrnega receptorja s svojim LXXLL zaporedjem, za katerega smo ugotovili, da je enak LXXLL zaporedjem znanih koaktivatorjev CAR.<sup>27</sup> Na podlagi teh ugotovitev smo *in silico* ustvarili model vezave LXXLL zaporedja na CAR in z molekularno dinamiko pokazali, da se takšno zaporedje res lahko obdrži na CAR.

CAR se izraža cirkadiano z maksimumom pri 20 h. Vpliva na transkripcijsko aktivacijo genov, ki kodirajo v metabolizmu udeležene encime in preostale proteine, npr. citokrome P450, glikoprotein P-2 (MDR2, ang. multdrug resistance protein 2), glukuronoziltransferazo 1A1 (UGT1A1) idr.<sup>13</sup> To bi lahko nakazalo, da je primarni metabolizem učinkovin, ki interagirajo s CAR ali pa se metabolizirajo s proteini, katerih nastanek aktivira CAR, največji po času 20 h oz. da obstaja cirkadiana odvisnost metabolizma z zamikom faze glede na izražanje CAR. Takrat bi bil razpolovni čas krajši in eliminacija hitrejša. Upoštevati pa moramo tudi druge farmakokinetične in farmakodinamične parametre posamezne učinkovine. Poleg tega je lahko transkripcija *Car* spodbujena s ksenobiotiki, kot so barbiturati, paracetamol, steroidne učinkovine ali učinkovine, ki imitirajo steroiden skelet. Transkripcijo *Car* inducirajo tudi flavonoidi in katehini ter sorodni polifenoli.<sup>42,45,48,87</sup> Ker smo ugotovili, da CAR vpliva na izražanje *Bmal1*, se postavlja vprašanje, ali indukcija transkripcije *Car* s strani ksenobiotikov vpliva na transkripcijo *Bmal1* in tudi na cirkadiani ritem celic.

Pri *in silico* delu nam glavno oviro predstavljalo dejstvo, da je kristaliziran zelo majhen del PER2. V nobeno strukturo tudi ni vključeno drugo LXXLL zaporedje, ki je istega razreda, kot je zaporedje pri PGC1 $\alpha$ , znanem koaktivatorju CAR. Ker je bila ta ugotovitev o sorodnosti omenjenih zaporedij močen pokazatelj možnosti interakcije PER2 s CAR in ker kristalne

strukture drugega LXXLL zaporedja PER2 ni na voljo, smo iskali alternativne načine pregleda interakcije drugega LXXLL zaporedja PER2 s CAR, pri tem pa smo morali spoznati tudi značilnosti vezavnega mesta na CAR.

Primerjava strukturnih značilnosti jedrnih receptorjev je dala smiselne rezultate, saj smo pokazali strukturno podobnost področja heliksov 3-5. Ti heliksi so ključni za vezavo LXXLL zaporedij, ki se v prostorski razporeditvi med seboj bistveno ne razlikujejo. Variabilnost je vidna pri stranskih verigah aminokislin na mestih elektrostatskih interakcij, torej tam, kjer receptor interagira z aminokislinami -2 in -1 LXXLL zaporedij koaktivatorjev. Zaradi teh ugotovitev smo morali pri pregledu interakcij drugega LXXLL zaporedja PER2 s CAR upoštevati predvsem položaj elektrondonorskega elementa aminokislina na položaju -2 LXXLL in ne toliko sam položaj aminokislin 1-5 LXXLL zaporedja.

Poskusili smo s spremembo podobnih LXXLL koaktivatorskih zaporedij istega razreda v drugo LXXLL zaporedje PER2. Pri tem smo podrobno upoštevali tudi obliko verig koaktivatorskih LXXLL zaporedij. Dobili smo peptid, ki se je strukturno zelo dobro prilegal CAR. Molekulska dinamika je pokazala, da se ta peptid obdrži na predvidenem mestu CAR. Takšna interakcija je torej ne le možna, ampak je tudi zelo verjetna.

Pri molekularni dinamiki se je novo ustvarjen peptid obdržal na CAR vseh 5 nanosekund simulacije, pri eksperimentu pa se je videla tudi razlika med elektrostatskimi interakcijami (specifična interakcija XXLXXLL zaporedij, ki določa razred zaporedja in s tem specifičnost vezave na samo določene jedrne receptorje) in hidrofobnimi interakcijami. Aminokislina na mestih -2 in -1 zaporedja sta ostali povsem fiksno na svojih mestih, medtem ko so se aminokislina na mestih 1-5 malce premaknile proti notranjosti hidrofobnega žepa.

Rezultat molekularne dinamike, ki je služil kot dodatna indikacija sposobnosti neposredne interakcije med PER2 in CAR, bi lahko pojasnil povišano izražanje *Bmall* pri kotransfekciji sesalskih celic s *Per2* in *Car*.

Razlika v drugem LXXLL zaporedju PER2 med mišjim in človeškim proteinom, na mestu -1, ko je pri človeškem glicin in pri mišjem asparaginska kislina, morda ne igra funkcionalne vloge, saj so LXXLL zaporedja koaktivatorjev jedrnih receptorjev med sesalci zelo ohranjena.

Pri rezultatu molekularne dinamike se postavi vprašanje, ali pri interakciji jedrnega receptorja in koaktivatorja dejansko pride do premika aminokislin 1-5 LXXLL zaporedja proti notranjosti hidrofobnega žepa ali pa je do njega prišlo samo v našem primeru, ker peptid ni bil

vezan na večjo strukturo koaktivatorja. Vezava zaporedja LXXLL kot dela večje strukture bi prispevala k rigidnosti in s tem k zmanjšanju moči interakcije. To bi lahko bilo pomembno tudi za disociacijo, saj sta za signaliziranje pomembna tako interakcija med dvema proteinoma kot tudi možnost disociacije.

Ker drugo LXXLL zaporedje pri PER2 ni del katere izmed kristalnih struktur, smo poleg rigidnosti oz. fleksibilnosti LXXLL zaporedja tudi težko ovrednotili dostopnost do tega zaporedja samega kot dela večjega proteina in ustreznost okoliških struktur za interakcijo s CAR. Ko bo na voljo primerna kristalna struktura PER2, bi bilo vredno ponovno *in silico* preveriti omenjeno interakcijo.

To, da molekulska dinamika služi kot dodatna indikacija sposobnosti neposredne interakcije med drugim LXXLL zaporedjem PER2 in CAR, še ne izključuje možnosti, da PER2 interagira s CAR s prvim LXXLL zaporedjem.

V kolikor PER2 in CAR res neposredno interagirata na takšen način, bi to pojasnilo povišano izražanje *Bmal1* pri kotransfekciji z omenjenima proteinoma. Te ugotovitve so torej postavile dobre temelje za nadaljnje raziskovanje proteinske interakcije med PER2 in CAR in tudi za raziskovanje interakcij med drugimi koaktivatorskimi zaporedji in jedrnimi receptorji. Zaradi podobnosti med koaktivatorskimi zaporedji in ker so si LBD mesta določenih jedrnih receptorjev zelo podobna, bi lahko te metode direktno prenesli na študij drugih proteinskih interakcij med koaktivatorji in jedrnimi receptorji. Ne glede na velikost kristalne strukture koaktivatorja in receptorja bi lahko koaktivator postavili na receptor na podlagi položaja vezave znanega koaktivatorja ali pa na podlagi ponavljajočih se značilnosti vezave koaktivatorskih LXXLL zaporedij. Potem bi ali z molekulsko dinamiko ali pa z molekulskim prileganjem lahko z določeno verjetnostjo že *in silico* sklepali, ali pride do interakcije med koaktivatorjem in receptorjem. S tem bi se prihranila sredstva in čas, pregled možnih interakcij med koaktivatorji in receptorji pa bi bil lahko zelo obširen. Potencialnih kombinacij in možnih interakcij je še veliko.

Na podlagi ugotovitve, da PER2 najverjetneje s CAR interagira kot koaktivator, lahko sklepamo, da s svojo vezavo na CAR poviša aktivnost tega jedrnega receptorja.

Nadaljnje delo bi bilo potrebno usmeriti v naslednje smeri:

A) Preveriti bi bilo potrebno, ali ima lizin v heliksu 5 LBD jedrnih receptorjev CAR in PPAR $\gamma$  funkcijo stabilizacije vezave LXXLL zaporedja. Aminokislina na mestih -2 in -1 LXXLL



zaporedja so namreč ključne za specifično interakcijo z jedrnimi receptorji, postavijo pa se v bližino tega lizina v heliksu 5. Prvi korak bi lahko predstavljal natančen *in silico* pregled postavitve drugega LXXLL zaporedja PER2 na CAR po molekulski dinamiki. Pregledali bi, ali je iz postavitve lizina v heliksu 5 in atomov aminokislin -2 in -1 LXXLL zaporedja možno sklepati, da pride na tej relaciji do kakšne interakcije. V kolikor bi se nam zdela postavitve atomov zanimiva, bi lahko *in silico* mutirali lizin v heliksu 5 CAR v alanin in ponovili molekulsko dinamiko z mutiranim receptorjem ter primerjali rezultat dinamike z našim rezultatom molekulske dinamike, ki bi nam v tem primeru predstavljal kontrolo. Enako bi lahko ponovili za PGC1 $\alpha$  in PPAR $\gamma$  (ID 3B1M), kjer bi nam nemutiran PPAR $\gamma$  predstavljal kontrolo, PPAR $\gamma$  s spremenjenim lizinom v alanin pa eksperiment. Za potrditev pomena lizina v heliksu 5 bi izvedli eksperiment z mutagenozo *in vitro*, s čimer bi lizin v heliksu 5 zamenjali z drugo aminokislino.

B) Primerjati bi bilo potrebno strukturne značilnosti jedrnih receptorjev, predvsem razdalje in kote, ki jih omejujejo heliksi 3-5 v LBD. Preveriti bi bilo potrebno prisotnost lizina v heliksu 5 (na mestu vezave LXXLL zaporedja) pri ostalih jedrnih receptorjih. V primeru prisotnosti tega lizina bi bilo vredno primerjati, kako se njegov položaj spreminja med receptorji. V primeru spreminjanja položaja bi morali hkrati vpogledati tudi v to, kater razred LXXLL koaktivatorskega zaporedja se veže v LBD posameznega receptorja.

C) Smiselno bi bilo poskušati pregledati, ali obstaja kakršenkoli vzorec v strukturnih značilnosti heliksov 3-5 jedrnih receptorjev glede na to, katere razrede LXXLL sprejmejo, hkrati pa v obzir vzeti lizin iz heliksa 5, če je ta prisoten in če se ta ponovi pri drugih receptorjih.

Č) Neposredno interakcijo med PER2 in CAR bi bilo potrebno preveriti tudi eksperimentalno, in sicer s površinsko plazmonsko resonanco.

Rezultati našega dela nakazujejo eno pomembnih povezav med cirkadianim ritmom in metabolizmom ter predstavljajo novo možnost razumevanja in razlaganja empiričnih dognanj, še posebej na nivoju razumevanja povezave med cirkadianim ritmom in metaboličnimi procesi. Pri tem lahko izpostavimo metabolične procese v jetrih. CAR je namreč izjemno pomemben v primarnem metabolizmu lipofilnih spojin, med drugim tudi zdravilnih učinkovin, saj aktivira za primarni metabolizem ključne citokrome P450, vključno s CYP3A4, katerega je največ ravno v jetrih. Vloga citokromov je oksidacija lipofilnih molekul (primarni

metabolizem), ki se lahko potem konjugirajo s hidrofilnimi molekulami (sekundarni metabolizem) in izločijo iz organizma. CYP3A4 spada med citokrome P450 in je izmed vseh encimov najpogosteje udeležen v metabolizem zdravilnih učinkovin. S tem določa farmakokinetiko učinkovin, ki jih presnavlja, hkrati pa zaradi metabolizma številnih zdravilnih učinkovin s tem encimov ravno na nivoju primarnega metabolizma prihaja do interakcij med zdravili. V kolikor ena učinkovina močno inducira nastanek CYP3A4, se lahko druga učinkovina, ki se jemlje sočasno, prehitro metabolizira, kar vodi v prenizke koncentracije v plazmi. Do povečanega nastajanja CYP3A4 lahko pride v primeru, ko se učinkovina kot ligand veže v jedrni receptor, med drugim tudi CAR, kar poveča možnost vezave koaktivatorja, npr. PER2, na ta jedrni receptor. To vodi v nastanek transaktivacijskega kompleksa, ki spodbudi nastajanje citokromov. Ker povečan vnos določenih zdravilnih učinkovin ali lipidov poveča aktivnost CAR in ker povečana koncentracija CAR vpliva na povečano izražanje *Bmal1*, smo predstavili tudi možnost, da takšno zvišanje aktivnosti CAR vpliva na cirkadiani ritem.

## 10. SKLEPI

- Kotransfekcija celic s PER2 in CAR povzroči povišano izražanje *Bmal1*. To nakazuje na možnost, da PER2 in CAR v mišjih hepatocitih ali posredno ali neposredno interagirata.
- Obstaja vsaj en koaktivator, ki s CAR interagira prek LXXLL zaporedja istega razreda, kot je drugo LXXLL zaporedje človeškega PER2. To je močen indic za obstoj neposredne interakcije med PER2 in CAR. CAR in PER2 imata torej strukturne elemente, prek katerih bi lahko neposredno interagirala.
- *Z in silico* metodami, natančneje s študijem načina vezave koaktivatorskih zaporedij na LBD jedrnih receptorjev, smo predvideli, na kakšen način bi lahko PER2 in CAR interagirala. Molekulska dinamika je podkrepila možnost neposredne interakcije med PER2 in CAR.

## 11. LITERATURA

1. Ko, C. H. & Takahashi, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No**, R271–7 (2006).
2. Mohawk, J. A., Green, C. B. & Takahashi, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 445–62 (2012).
3. Panda, S. & Hogenesch, J. B. It's all in the timing: many clocks, many outputs. *J. Biol. Rhythms* **19**, 374–87 (2004).
4. Dallaspazia, S. & Benedetti, F. Melatonin, circadian rhythms, and the clock genes in bipolar disorder. *Curr. Psychiatry Rep.* **11**, 488–93 (2009).
5. Delezie, J. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J.* **26**, 3321–35 (2012).
6. Davis, S., Mirick, D. K. & Stevens, R. G. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1557–62 (2001).
7. Baan, R. *et al.* A review of human carcinogens--Part F: chemical agents and related occupations. *Lancet Oncol.* **10**, 1143–4 (2009).
8. Gu, X. *et al.* The circadian mutation PER2(S662G) is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **19**, 397–405 (2012).
9. Damiola, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950–61 (2000).
10. Baraldo, M. The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 175–92 (2008).
11. Okyar, A. *et al.* Circadian variations in exsorpive transport: in situ intestinal perfusion data and in vivo relevance. *Chronobiol. Int.* **29**, 443–53 (2012).
12. Reinberg, A. E. Concepts in chronopharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 51–66 (1992).
13. Kanno, Y., Otsuka, S., Hiromasa, T., Nakahama, T. & Inouye, Y. Diurnal difference in CAR mRNA expression. *Nucl. Recept.* **2**, 6 (2004).
14. Vitaterna, M. H. *et al.* Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12114–9 (1999).

15. Schmutz, I., Ripperger, J. A., Baeriswyl-Aebischer, S. & Albrecht, U. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev.* **24**, 345–57 (2010).
16. Langmesser, S., Tallone, T., Bordon, A., Rusconi, S. & Albrecht, U. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Mol. Biol.* **9**, 41 (2008).
17. Yu, W., Nomura, M. & Ikeda, M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 933–41 (2002).
18. Rudic, R. D. *et al.* BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* **2**, e377 (2004).
19. Balakrishnan, Anita, Tavakkolizadeh, Ali, Rhoads, D. B. Circadian clock genes and implications for intestinal nutrient uptake. *J Nutr Biochem* **23**, 417–422 (2012).
20. Kume, K. *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193–205 (1999).
21. Zheng, B. *et al.* The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**, 169–73 (1999).
22. Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* **17**, 1282–94 (2009).
23. Hennig, S. *et al.* Structural and functional analyses of PAS domain interactions of the clock proteins Drosophila PERIOD and mouse PERIOD2. *PLoS Biol.* **7**, e94 (2009).
24. Chang, C. y *et al.* Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8226–39 (1999).
25. Savkur, R. S. & Burris, T. P. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J. Pept. Res.* **63**, 207–12 (2004).
26. UniProtKB O15055 (PER2\_HUMAN). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/O15055>>
27. UniProtKB O54943 (PER2\_MOUSE). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/O54943>>
28. Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G. & Lee, C. C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* **91**, 1055–64 (1997).

29. Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F. & Reppert, S. M. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**, 1261–9 (1997).
30. Amir, S., Lamont, E. W., Robinson, B. & Stewart, J. A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.* **24**, 781–90 (2004).
31. Sakai, T., Tamura, T., Kitamoto, T. & Kidokoro, Y. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16058–63 (2004).
32. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. & Lee, C. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**, 41–50 (2002).
33. Toh, K. L. *et al.* An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040–3 (2001).
34. Carvas, J. M. *et al.* Period2 gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis. *Front. Physiol.* **3**, 337 (2012).
35. Sahar, S. & Sassone-Corsi, P. Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 1–8 (2012).
36. Grimaldi, B. *et al.* PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR $\gamma$ . *Cell Metab.* **12**, 509–20 (2010).
37. Hu, X. & Lazar, M. A. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402**, 93–6 (1999).
38. Suino, K. *et al.* The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol. Cell* **16**, 893–905 (2004).
39. Lamba, J. K. *et al.* Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 811–21 (2004).
40. Arnold, K. A., Eichelbaum, M. & Burk, O. Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor. *Nucl. Recept.* **2**, 1 (2004).
41. Kobayashi, K., Sueyoshi, T., Inoue, K., Moore, R. & Negishi, M. Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1069–75 (2003).

42. Kawamoto, T. *et al.* Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6318–22 (1999).
43. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–10 (1990).
44. Gray, M. A., Peacock, J. N. & Squires, E. J. Characterization of the porcine constitutive androstane receptor (CAR) and its splice variants. *Xenobiotica.* **39**, 915–30 (2009).
45. Yao, R. *et al.* Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2168–73 (2010).
46. Kawamoto, T., Kakizaki, S., Yoshinari, K. & Negishi, M. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1897–905 (2000).
47. Huang, W. *et al.* Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4156–61 (2003).
48. Zhang, J., Huang, W., Chua, S. S., Wei, P. & Moore, D. D. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science* **298**, 422–4 (2002).
49. Jie, Gao, Jinhan, He, Yonggong, Zhai, Taira Wada, Wen, X. The Constitutive Androstane Receptor Is an Anti-obesity Nuclear Receptor That Improves Insulin Sensitivity. *J Biol Chem* **284**, 25984–25992 (2009).
50. Thompson, E. E., Kuttab-Boulos, H., Krasowski, M. D. & Di Rienzo, A. Functional constraints on the constitutive androstane receptor inferred from human sequence variation and cross-species comparisons. *Hum. Genomics* **2**, 168–78 (2005).
51. Xie, W. *et al.* Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev.* **14**, 3014–23 (2000).
52. Kast, H. R. *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 2908–15 (2002).
53. Guo, G. L. *et al.* Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J. Biol. Chem.* **278**, 45062–71 (2003).
54. Maglich, J. M. *et al.* The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J. Biol. Chem.* **279**, 19832–8 (2004).

55. Dussault, I. *et al.* A structural model of the constitutive androstane receptor defines novel interactions that mediate ligand-independent activity. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5270–80 (2002).
56. Frank, C., Gonzalez, M. M., Oinonen, C., Dunlop, T. W. & Carlberg, C. Characterization of DNA complexes formed by the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 43299–310 (2003).
57. Sandelin, A. & Wasserman, W. W. Prediction of nuclear hormone receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* **19**, 595–606 (2005).
58. Woon, P. Y. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14412–7 (2007).
59. Boden, M. J. & Kennaway, D. J. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* **132**, 379–92 (2006).
60. Kondratov, R. V. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res. Rev.* **6**, 12–27 (2007).
61. Bungler, M. K. *et al.* Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus. *Genesis* **41**, 122–32 (2005).
62. UniProtKB O00327 (BMAL1\_HUMAN). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/O00327>>
63. UniProtKB Q07869 (PPARA\_HUMAN). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q07869>>
64. UniProtKB P23204 (PPARA\_MOUSE). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P23204>>
65. Sher, T., Yi, H. F., McBride, O. W. & Gonzalez, F. J. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* **32**, 5598–604 (1993).
66. Mukherjee, R., Jow, L., Noonan, D. & McDonnell, D. P. Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **51**, 157–66 (1994).
67. Juge-Aubry, C. E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. *J. Biol. Chem.* **270**, 18117–22 (1995).
68. UniProtKB P37231 (PPARG\_HUMAN). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P37231>>
69. UniProtKB P37238 (PPARG\_MOUSE). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P37238>>



70. Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G. E. & Paterniti, J. R. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR $\gamma$ 2 versus PPAR $\gamma$ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* **272**, 8071–6 (1997).
71. Park, S.-H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **285**, 35330–9 (2010).
72. Yin, Y. *et al.* 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and promotes adipocyte differentiation. *Mol. Endocrinol.* **20**, 268–78 (2006).
73. UniProtKB P19793 (RXRA\_HUMAN). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P19793>>
74. UniProtKB P28700 (RXRA\_MOUSE). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P28700>>
75. Koike, N. *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* **338**, 349–54 (2012).
76. Ritchie, D. W. & Venkatraman, V. Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors. *Bioinformatics* **26**, 2398–405 (2010).
77. Guex, N., P. M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723 (1997).
78. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–614 (2009).
79. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–65 (2008).
80. *Molekulska dinamika je bila narejena v komunikaciji s prof. dr. Juretom Stojanom, dr. med.*
81. Novak, M. *et al.* Oleic acid metabolism via a conserved cytochrome P450 system-mediated  $\omega$ -hydroxylation in the bark beetle-associated fungus *Grosmannia clavigera*. *PLoS One* **10**, e0120119 (2015).
82. UniProtKB Q15788 (NCOA1\_HUMAN). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q15788>>
83. Xia, J. *et al.* Redundant enhancement of mouse constitutive androstane receptor transactivation by p160 coactivator family members. *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 49–57 (2007).

84. Shiraki, T., Sakai, N., Kanaya, E. & Jingami, H. Activation of orphan nuclear constitutive androstane receptor requires subnuclear targeting by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha. A possible link between xenobiotic response and nutritional state. *J. Biol. Chem.* **278**, 11344–50 (2003).
85. Surapureddi, S., Rana, R., Reddy, J. K. & Goldstein, J. A. Nuclear receptor coactivator 6 mediates the synergistic activation of human cytochrome P-450 2C9 by the constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4alpha. *Mol. Pharmacol.* **74**, 913–23 (2008).
86. Sayle, R. A. & Milner-White, E. J. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374 (1995).
87. Tamasi, V., Juvan, P., Beer, M., Rozman, D. & Meyer, U. A. Transcriptional activation of PPARalpha by phenobarbital in the absence of CAR and PXR. *Mol. Pharm.* **6**, 1573–81

## 12. KAZALO SLIK

SLIKA 1: SHEMATSKI PRIKAZ POENOSTAVLJENEGA CIRKADIANEGA RITMA -- HOMOLOGI PER IN CRY VZPODBUJAJO PREPISOVANJE <i>BMAL1</i> , HKRATI PA ZAVIRAJO KOMPLEKS <i>BMAL1-CLOCK</i> IN S TEM TUDI LASTNO PREPISOVANJE	11
SLIKA 2: LBD JEDRNEGA RECEPTORJA <i>CAR</i> (SIVA) Z VEZANIM KOAKTIVATORJEM <i>NCOA2</i> (ZELENA) IN PRIKAZANIMI HELIKSI 3, 4 IN 5	13
SLIKA 3: SHEMATSKI PRIKAZ ZAPOREDJA <i>LXXLL</i> – AMINOKISLINI NA MESTIH -2 IN -1 STA KLJUČNI ZA INTERAKCIJO <i>LXXLL</i> ZAPOREDJA Z JEDRNIM RECEPTORJEM	14
SLIKA 4: PRIKAZ NORMALIZIRANIH VREDNOSTI RELATIVNE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI (RLU) POKAŽE PRIMERLJIV ODZIV ( $P < 0,01$ ) PRI POZITIVNI KONTROLI IN EKSPERIMENTU S <i>PER2</i> IN <i>CAR</i> IN PRIMERLJIV ODZIV ( $P <$ $0,01$ ) PRI NEGATIVNI KONTROLI IN KONTROLI S <i>PER2</i> ; * – SIGNIFIKANTNA RAZLIKA MED KONTROLO IN EKSPERIMENTOM S <i>PER2</i> IN <i>CAR</i>	35
SLIKA 5: PRIKAZ DESETIŠKIH LOGARITMOV NORMALIZIRANIH VREDNOSTI RELATIVNE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI (RLU) POKAŽE PRIMERLJIV ODZIV ( $P < 0,01$ ) PRI POZITIVNI KONTROLI IN EKSPERIMENTU S <i>PER2</i> IN <i>CAR</i> IN PRIMERLJIV ODZIV ( $P < 0,01$ ) PRI NEGATIVNI KONTROLI IN KONTROLI S <i>PER2</i> ; * – SIGNIFIKANTNA RAZLIKA MED KONTROLO IN EKSPERIMENTOM S <i>PER2</i> IN <i>CAR</i>	35
SLIKA 6: A (ID 1XLS) – PRIMERJAVA VEZAVE <i>LXXLL</i> ZAPOREDJA <i>NCOA2</i> NA <i>CAR</i> IN B (ID 1XV9) – <i>LXXLL</i> ZAPOREDJA <i>NCOA1</i> NA <i>CAR</i> ; <i>CAR</i> JE PRIKAZAN V SIVI, <i>LXXLL</i> PA V ZELENIM BARVI.	37
SLIKA 7: PRIMERJAVA VEZAVE A (ID 1XLS) – <i>LXXLL</i> <i>NCOA2</i> (ZELENA) NA <i>CAR</i> (SIVA) IN B (ID 3B1M) – <i>LXXLL</i> <i>PGC1A</i> (ZELENA) NA <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (SIVA) JE POKAZALA VELIKO PODOBNOST MED <i>CAR</i> IN <i>PPAR<math>\gamma</math></i> NA PODROČJU HELIKSOV 3-5, HKRATI PA SE VIDI, DA SE V OBEH PRIMERIH LEVCIN NA MESTU +1 ZAPOREDJA <i>LXXLL</i> POSTAVI V BLIŽINO HELIKSA 5 LBD JEDRNEGA RECEPTORJA	40
SLIKA 8: PRIKAZ OSNOVNIH VERIG ZAPOREDIJ <i>LXXLL</i> IN RAZDALJ MED AMINOKISLINAMA -2 IN 5: A – KOAKTIVATORSKO ZAPOREDJE <i>ALLRYLL</i> KOAKTIVATORJA <i>NCOA2</i> (ID 1XLS); B – KOAKTIVATORSKO ZAPOREDJE <i>SLLKLL</i> KOAKTIVATORJA <i>PGC1A</i> (ID 3B1M); C – NEKOAKTIVATORSKO ZAPOREDJE <i>SGLLSLL</i> (ID 4DOY). VIDIJO SE VELIKE KONFORMACIJSKE RAZLIKE MED KOAKTIVATORSKIMI IN NEKOAKTIVATORSKIMI ZAPOREDJI, KAR NAKAZUJE, DA JE MORDA OBLIKA OSNOVNE VERIGE <i>LXXLL</i> ZAPOREDIJ POSLEDICA NJIHOVE FUNKCIJE	42
SLIKA 9: PRIKAZ <i>XXLXXLL</i> ZAPOREDIJ: A – <i>NCOA2</i> (ID 1XLS); B – <i>PGC1A</i> (ID 3B1M); C – IZ A IN B NAREJEN <i>SGLLNL</i> (V ZELENIM IZ <i>NCOA2</i> , V ORANŽNIM IZ <i>PGC1A</i> ), KI PREDSTAVLJA DRUGO <i>XXLXXLL</i> ZAPOREDJE <i>PER2</i>	43
SLIKA 10: REZULTAT POSTAVLJANJA DRUGEGA <i>LXXLL</i> ZAPOREDJA (ZELENA) NA <i>CAR</i> (SIVA)	44
SLIKA 11: PRIMERJAVA ZAČETNE STRUKTURE (A) IN STRUKTURE PO 5 NS (B); RMS JE Približno 2,5 Å	45
SLIKA 12: SPREMEMBA RMS V ODVISNOSTI OD ČASA	45