

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Sledování dimerizace receptorů spřažených s G-proteiny
pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie

Bakalářská práce

Aneta Sládková

Školitel: Josef Lazar, Ph.D.

České Budějovice, 2018

Bakalářská diplomová práce:

Sládková A. (2018): Sledování dimerizace receptorů spřažených s G-proteiny pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie. [Investigating dimerization of G protein coupled receptor by two-photon polarization microscopy. Bc Thesis, in Czech] 35p. Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

Cílem této práce bylo zjistit, zda receptory spřažené s G-proteinem (GPCR) dimerizují pomocí metody dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM). K tomu bylo zapotřebí několika dílčích cílů, které zahrnovaly přípravu konstruktů, samotné pozorování metodou 2PPM a analýzu získaných výsledků. Kromě metody 2PPM jsou zde uvedeny i další metody, které slouží k detekci proteinových interakcí.

Annotation:

The aim of this work was to investigate whether G-protein coupled receptors (GPCR) dimerise using the method two-photon polarization microscopy (2PPM). This requires several partial goals, that they included preparation of constructs, observation of these constructs by the method 2PPM and analysis of acquired data. Except of the 2PPM, this work includes another methods that are used to detection of protein-protein interactions.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Aneta Sládková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Josefu Lazarovi za odborné vedení, rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Alexeyi Bondarovi a Karolíně Tošnerové za jejich ochotu a čas. Také děkuji své rodině za podporu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Buněčné membrány	1
1.2 Struktura a funkce membránových proteinů	2
1.3 Buněčná signalizace	3
1.4 G-proteinová signální kaskáda	3
1.4.1 Receptory spřažené s G-proteinem	4
1.4.2 G-proteiny	7
1.4.3 Efektory	8
1.5 Metody detekující proteinové interakce	9
1.5.1 Metody in vitro	10
1.5.2 Metody in vivo	11
1.5.3 Metody využívající fluorescentní proteiny	11
2. Cíle práce	17
2.1 Dílčí cíle	18
3. Materiál a metody	19
3.1 Výchozí konstrukty	19
3.2 Metodický postup	20
3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
4. Výsledky	28
5. Diskuze	31
6. Závěr	32
7. Seznam citované literatury	33

1. Úvod

1.1 Buněčné membrány

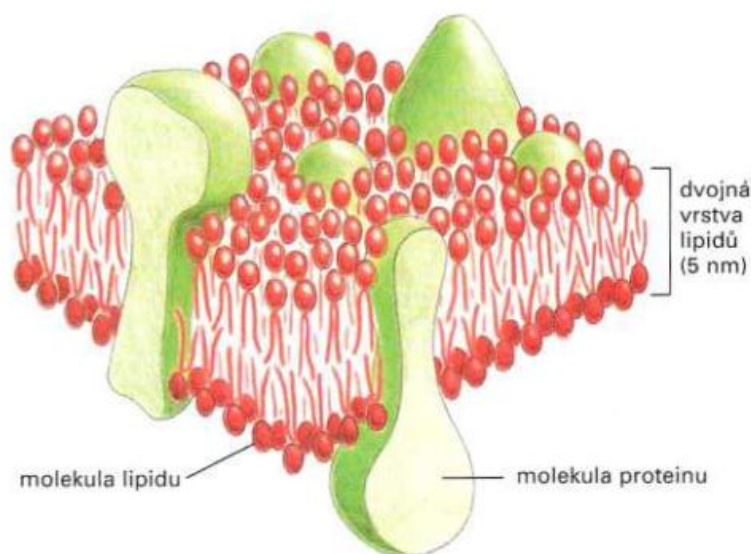
Buněčné membrány mohou být považovány za nejdůležitější strukturu v buňkách. Uzavírají buňku, oddělují ji od vnějšího prostředí a vytvářejí tak dva důležité kompartmenty, cytosol a extracelulární prostředí. Díky tomu jsou na obou stranách rozdílné vlastnosti, které jsou pro ně specifické

Navzdory jejich rozdílným funkcím mají všechny buněčné membrány podobnou strukturu (viz Obr. 1). Membránu tvoří tenká vrstva lipidů a proteinů, které jsou spojené převážně nekovalentními interakcemi. Buněčná membrána je tekutá a velmi dynamická struktura, která umožňuje pohyb molekul v rovině membrány.

Membránové lipidy jsou uspořádané do souvislé dvojvrstvy o tloušťce přibližně 5nm. Tato dvojvrstva poskytuje relativně nepropustnou bariéru pro průchod většiny molekul rozpustných ve vodě. Základním membránovým lipidem jsou fosfolipidy. Ty jsou obecně amfipatické, tedy mají hydrofilní, polární konec („hlavičku“) a dva hydrofobní, nepolární uhlovodíkové konce. Tyto nepolární konce jsou obvykle tvořeny mastnými kyselinami, které se liší v délce. Toto amfipatické uspořádání umožňuje lipidové molekule formovat požadovaný tvar ve vodním prostředí, v tomto případě lipidovou dvojvrstvu.

Součástí buněčné membrány jsou kromě molekul lipidů i molekuly proteinů. Tyto proteiny mohou vykonávat různé funkce, např. sloužit jako transportní molekuly nebo jako molekuly katalyzující určité reakce. Množství membránových proteinů se liší v závislosti na typu buněčné membrány. Například membrány, které slouží jako elektrický izolant pro axony nervových buněk (myelinová membrána) obsahují méně než 25 % proteinů. Naproti tomu membrány, které se účastní syntézy ATP (vnitřní membrány mitochondrií a chloroplastů) obsahují přibližně 75 % proteinů. Typická buněčná membrána obsahuje přibližně 50 % proteinů.

Lipidové molekuly jsou menší než molekuly proteinů, takže buněčné membrány vždy obsahují více molekul lipidů než proteinů. Membránové proteiny se značně liší strukturou a způsobem, jakým asociují s lipidovou dvojvrstvou. Z toho vyplývají jejich různé funkce¹.



Obr. 1: Struktura buněčné membrány².

1.2 Struktura a funkce membránových proteinů

Membránové proteiny jsou velmi důležité pro buněčné procesy. Poskytují buněčným membránám jejich charakteristické vlastnosti a funkce, které jsou specifické pro různé buněčné struktury. Membránové proteiny se rozdělují do dvou základních skupin, a sice periferní membránové proteiny a integrální membránové proteiny³.

Proteiny periferního typu, na rozdíl od integrálních membránových proteinů, jsou s membránou pouze volně asociovány. S membránou interagují buď nepřímo, kdy jsou navázány na jiný membránový protein, anebo přímo, kdy jsou kovalentně navázány na nepolární molekulu, jež je součástí lipidové dvojvrstvy. Periferní membránové proteiny lze od membrány oddělit využitím šetrných metod, jako je např. vystavením roztokům s vysokým nebo s nízkým pH. Patří sem například proteiny, které s buněčnou membránou asociují prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolu, které se nachází na vnější straně lipidové dvojvrstvy. Glykosylfosfatidylinositol je jakási kotva (GPI), která způsobí, že protein zůstane navázán na membráně¹.

Na rozdíl od periferních membránových proteinů, integrální membránové proteiny jsou pevně vázané na membránu, takže nemůže být využito předešlých způsobů k oddělení od membrány. Do této skupiny proteinů patří zejména transmembránové proteiny uspořádané

tak, že jejich hydrofobní část prochází lipidovou dvojvrstvou, kdežto hydrofilní části interagují na vnější straně membrány s vodou¹.

Membránové proteiny zastávají v buňkách mnoho různých funkcí, které ovlivňují výsledné chování buňky. Jsou zodpovědné za buněčný transport: např. vytvářejí iontový gradient. Dále jsou velmi důležité v buněčné signalizaci - fungují jako receptory, které reagují na vnější podněty¹.

1.3 Buněčná signalizace

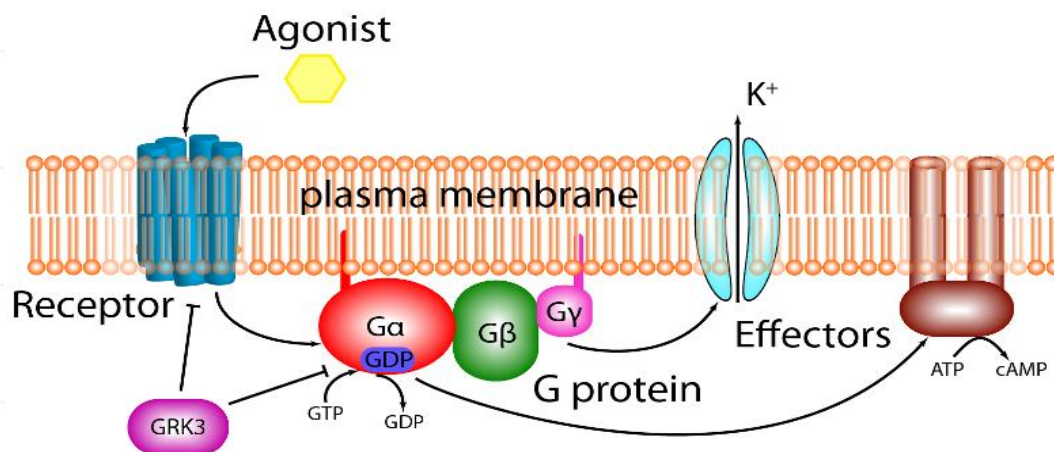
Buněčná signalizace je způsob, jakým spolu buňky komunikují. Zprostředkovává detekci extracelulárních signálních molekul, které jsou produkovány buňkami a jejichž prostřednictvím dochází ke komunikaci ať už mezi sousedními buňkami nebo mezi vzdálenými buňkami.

Základním prvkem, který rozpoznává extracelulární signální molekulu (podnět) je receptor. Na jeho základě vzniká informace, která je přenášena do nitra buňky prostřednictvím tzv. signálních transduktorů. Tyto vnitrobuněčné komplexy řídí uvolňování specifických druhých poslů, které aktivují cílovou buňku. Cílová buňka následně generuje intracelulární signál, který změní chování buňky. Série buněčných procesů spouštěných uvnitř buňky jako odpověď buňky na vnější podnět se nazývá signální kaskáda¹.

V eukaryotických buňkách existuje celá řada signálních kaskád. V naší studii jsme se zaměřili na jednu z nejdůležitějších signálních kaskád, a to G-proteinovou signální kaskádu.

1.4 G-proteinová signální kaskáda

G-proteinová signální kaskáda (Obr. 2) je klíčový proces, který zprostředkovává přenos signálů mnoha druhů hormonů, neurotransmiterů a dalších signálních faktorů. Tato kaskáda sestává z receptoru spřaženého s G proteinem, samotného G proteinu, různých druhých poslů (cAMP, cGMP, IP3, DAG) a efektorů.



Obr. 2: G-proteinová signální kaskáda.

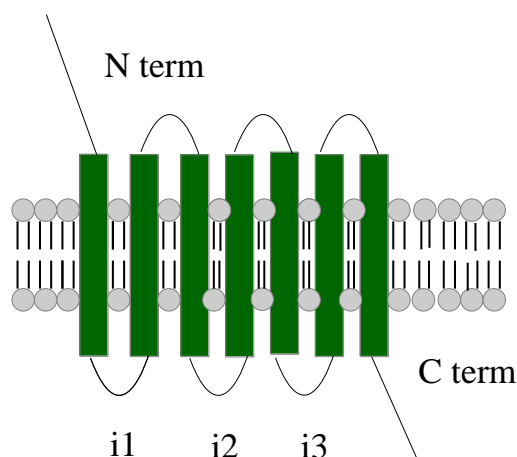
1.4.1 Receptory spřažené s G-proteinem

Receptory spřažené s G-proteinem tvoří největší genovou rodinu v savčích genomech⁴. Regulují intracelulární reakce mechanismem, který zahrnuje transdukční molekulu – G-protein (protein vázající GTP). U člověka bylo identifikováno asi 800 GPCR. Asi polovina z nich má senzoričnou funkci. Jsou to receptory čichu, chuti, vnímání světla a feromonové signalizace. Zbývající receptory mají nesenzoričnou funkci. Signalizace prostřednictvím GPCR je obecně spouštěna molekulou ligandu, které se velikostně pohybují od malých molekul, přes peptidy až po velké proteiny⁵.

1.4.1.1 Struktura GPCR

Všechny receptory spřažené s G-proteiny sdílejí významné strukturní rysy. Všechny jsou to membránové proteiny obsahující 7 transmembránových alfa- helikálních domén, které jsou vzájemně spojené 3 intracelulárními (i1, i2 a i3) a 3 extracelulárními (e1, e2 a e3) smyčkami. Na vnější straně membrány se nachází N-konec. C-konec molekul GPCR se nachází v cytosolu buňky. V cytosolu je přítomen i G-protein, který zprostředkovává již zmíněnou signální transdukcii a předávání signálu z molekul GPCR dál do buňky⁴.

Receptory spřažené s G-proteinem mohou existovat také jako dimery. U některých GPCR (např. metabotropní glutamátové receptory, receptory sekretinu) je známo, že fungují jako dimery. U jiných se soudí, že fungují jako monomery. U mnohých je otázka dimerizace v přirozených podmínkách buňky stále otevřena.



Obr. 3: Struktura receptoru spřaženého s G-proteinem.

1.4.1.2 Významné druhy GPCR

GPCR jsou považovány za nejdůležitější receptory v eukaryotních buňkách. Je známo několik druhů těchto receptorových proteinů, které se liší ve vazbě jejich extracelulárních signálních molekul, tzn. jednotlivé druhy GPCR reagují na rozdílné typy podnětů. Nicméně mechanismus předávání signálu je stejný. V této kapitole jsou tedy uvedeny nejvýznamnější typy GPCR a zda je u nich možný výskyt dimerizace.

- a. **receptory rhodopsinového typu** - Receptory rhodopsinového typu představují největší skupinu GPCR. Zahrnují mj. několik set čichových receptorů. Tyto receptory detekují přítomnost různých hormonů, či neurotransmiterů. Mohou sloužit i jako světelné receptory, neboť rhodopsin, tj. receptor, jehož jméno tato skupina nese, je světlem aktivovaný protein (pigment), který se nachází v oku obratlovců a umožňuje vidění⁷.

Dimerizace u tohoto druhu receptorů bývá v některých studiích značně zpochybněna, některé studie zase naznačují, že receptory rhodopsinového typu mohou existovat a

potencionálně fungovat jako dimery. Avšak funkční význam a povaha těchto komplexů je stále nejasná⁴.

- b. **metabotropní glutamátové receptory** - Metabotropní glutamátové receptory se účastní excitačních synapsí v centrálním nervovém systému savců. Vážou totiž glutamát, který je základním neurotransmiterem. Současné studie, které potvrdily mechanismus aktivace a působení glutamátových receptorů naznačují, že tyto receptory jsou důležité pro řadu neurologických a psychiatrických poruch, jako je Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, úzkost, deprese a schizofrenie⁸.

U metabotropních glutamátových receptorů na rozdíl od receptorů rhodopsinového typu je prokázáno, že existují a fungují jako stabilní dimery. Dimerizují prostřednictvím N-terminální domény, která je velmi dlouhá a umožňuje tak snadnější vznik dimerů⁴.

- c. **receptory sekretinu** - Receptory se sekretinem jsou velmi významné receptory, které se nacházejí u zvířat. Nebyly však pozorované u rostlin, hub či prokaryot. Váže a je aktivován peptidickým hormonem sekretinem a dalšími hormony jako je glukagon, kalcitonin a některými růstovými hormony. I u tohoto druhu receptorů byl prokázán vznik dimerů⁹.

- d. **adhezní receptory** - Adhezní receptory zahrnují asi 30 receptorů, které se nacházejí v genomech obratlovců. Hrají velkou roli v různých biologických procesech a jsou charakteristické velmi dlouhým N-koncem, který umožňuje adhezi a tím pádem i určit interakci mezi buňkami¹⁰. Adhezní receptory také ochotně podléhají dimerizaci¹¹.

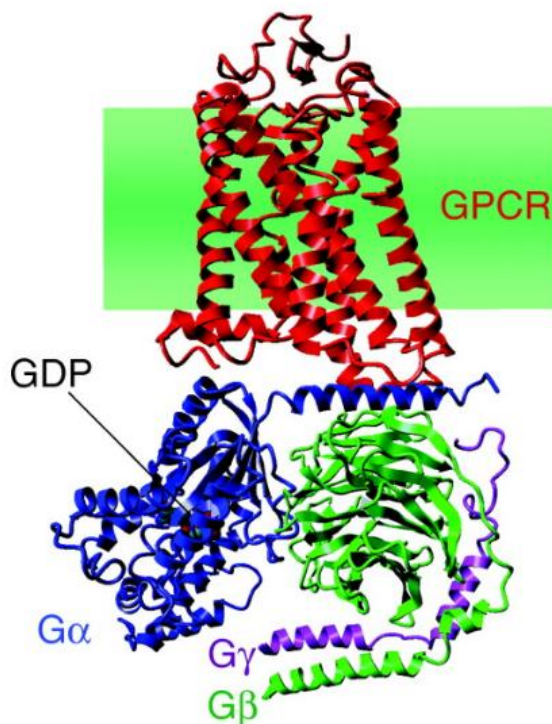
- e. **frizzled/taste 2 receptory** - Frizzled/taste 2 jsou receptory, které se účastní především při určování buněčné polarita a segmentace. Podílí se také na embryonálním vývoji. Stejně jako předešlé druhy, i u tohoto druhu receptorů byl prokázán vznik dimerizace¹².

- f. **feromonové receptory hub** – Tyto receptory se účastní zejména v signalizaci, která zprostředkovává vazbu feromonu na specifický receptor v buňkách hub, kde dochází k aktivaci transkripčního faktoru, který je potřebný pro expresi genů specifických pro páření¹³.

1.4.2 G-proteiny

G-proteiny jsou velmi důležité v buněčné signalizaci, neboť interagují s receptory spřaženými s G-proteiny. Přenášejí, modifikují a zesilují signál z těchto receptorů. G-proteiny jsou přítomny ve všech eukaryotních buňkách a jsou zapojeny do různých fyziologických funkcí, jako je vnímání smyslových informací, uvolňování hormonů, regulace buněčné migrace, buněčného růstu a diferenciaci. Nejvýznamnějšími G-proteiny jsou heterotrimerní G-proteiny. Významné jsou ale i tzv. monomerní G-proteiny, které jsou menší.

Heterotrimerní G-proteiny se skládají se tří podjednotek - $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$ (viz Obr. 4). Lidský genom obsahuje asi 16 genů kódujících různé podjednotky $G\alpha$ podjednotky, mezi nimiž jsou strukturální a funkční rozdíly. Na základě těchto rozdílů rozlišujeme 4 typy podjednotek $G\alpha$: $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, a $G\alpha_{12/13}$. Podjednotka $G\alpha$ je schopna vázat jak GTP, tak GDP. To zajišťuje GTPázová doména. Kromě GTPázové domény podjednotka $G\alpha$ obsahuje ještě helikální doménu, která stabilizuje vazbu GTP¹⁴.



Obr. 4: Struktura G-proteinu¹⁵.

V klidovém stavu je na podjednotce $G\alpha$ navázána molekula GDP. Po aktivaci receptorového proteinu navázáním ligandu dojde k aktivaci receptoru spojené s konformační změnou v molekule receptoru. Tato změna umožní interakci receptoru s G-proteinem, díky níž podjednotka $G\alpha$ vymění navázanou molekulu GDP za GTP. Tato změna způsobí to, že se heterotrimerní G-protein rozdělí na dvě části – na podjednotku $G\alpha$ a na komplex podjednotek $G\beta/\gamma$. Podjednotka $G\alpha$ i komplex $G\beta/\gamma$ poté mohou interagovat s různými efektory, na základě čehož vznikají různé odpovědi v cílových buňkách. Aktivace G-proteinu je reverzibilní proces. Podjednotka $G\alpha$ má GTPázovou aktivitu, takže po určité době zhydrolyzuje navázaný GTP zpět na GDP. Tím dojde k inaktivaci podjednotky $G\alpha$, jež umožní opětovnou asociaci s podjednotkami $G\beta/\gamma$ a vzniku neaktivovaného heterotrimerního G-proteinu¹⁴.

Kromě heterotrimerních G-proteinů existují též monomerní G-proteiny (někdy také nazývány malé GTPázy). Tyto monomerní G-proteiny jsou strukturně podobné α podjednotce heterotrimerního G-proteinu. Také obsahují vazebné místo pro GTP a mají také GTPázovou aktivitu. Na rozdíl od heterotrimerních G-proteinů fungují samostatně a při aktivaci G-proteinu nedochází k disociaci komplexu proteinů¹⁶.

1.4.3 Efekторы

Aktivovaný G-protein spouští funkci různých efektorů. Většina těchto efektorů jsou enzymy, které produkují intracelulární druhé posly, které pak spouští biochemické dráhy¹⁷.

Mezi efekторы G-proteinů patří například adenylátcykláza. Hlavní funkcí tohoto enzymu je katalýza syntézy cAMP. Koncentrace cAMP uvnitř buňky se v klidovém stavu pohybuje okolo 10^{-7} M. Extracelulární signál však může způsobit, že se hladina cAMP během několika sekund zdvojnásobí. Proto tato syntéza musí být vyvážena i jeho degradací. Za to je zodpovědný enzym cAMP fosfodiesteráza.

Dalším významným efektozem je fosfolipáza C. Tento enzym působí na fosfatidylinositol 4,5 – bisfosfátu, štěpí jej na inositol 1,4,5 – trisfosfát a diacylglycerol. Inositol 1,4,5 – trisfosfát se váže na kanály Ca^{2+} v endoplazmatickém retikulu, otevírá je a ionty Ca^{2+} unikají z endoplazmatického retikula po spádu svého koncentračního gradientu do cytosolu, kde se hromadí a narůstá zde jejich koncentrace. Diacylglycerol zůstává navázan v membráně, kde aktivuje protein kinázu C, která je Ca^{2+} dependentní¹.

1.5 Metody detekující proteinové interakce

Proteiny nacházející se v organismech zřídka fungují samostatně. Často se spojují do komplexů, které vykonávají různé biologické funkce na buněčné i systémové úrovni. Pro dobré porozumění molekulárním mechanismům je významným krokem právě mapování těchto proteinových interakcí. Kompletní mapa proteinových interakcí, která se nachází v živých organismech, se nazývá interactome¹⁶. Proteinové interakce jsou podstatou mnoha buněčných procesů: replikace DNA, transkripce, translace, signální transdukce a mnoha dalších procesů¹⁸.

Metody detekující proteinové interakce, buď pracují *in vitro*, nebo *in vivo*. Metody *in vitro* jsou prováděny v kontrolovaném prostředí mimo buňku. Patří sem metody jako je např. tandemová afinitní purifikace, koimunoprecipitace nebo afinitní chromatografie. Metody *in vivo* jsou naproti tomu prováděny v přirozených podmínkách buňky. Jednou z hlavních metod *in vivo* je tzv. dvou-hybridní systém (Yeast two-hybrid system). V současné době se stále více využívají i metody, které využívají fluorescentní proteiny, jako je FRET (Fluorescence resonance energy transfer) a BRET (Bioluminescence resonance energy transfer)¹⁹. V naší laboratoři byla mj. za účelem pozorování interakcí mezi proteiny vyvinuta nová technika, tzv. dvoufotonová polarizační mikroskopie, která má v porovnání s jinými technikami některé významné výhody.

1.5.1 Metody in vitro

1.5.1.1 Tandemová afinitní purifikace

Je to velmi účinná metoda, která umožňuje izolaci proteinů a proteinových komplexů za podmínek blízkých fyziologickým. Tato metoda závisí na expresi jedné proteinové komponenty fúzované N- nebo C- terminálně na TAP značku v požadovaném organismu²⁰. TAP značka se skládá z imunoglobulinu G, který se váže na protein A ze *Staphylococcus aureus* a dále obsahuje vazebnou doménu pro kalmomodulin²¹. Tato fúze usnadňuje purifikaci značeného proteinu ve dvou po sobě jdoucích vysokoafinitních chromatografických krocích. Kombinace těchto dvou kroků je velmi účinná a proteinový komplex může tak být purifikován bez nutnosti overexprese proteinu²⁰.

1.5.1.2 Koimunoprecipitace

V této metodě jsou buňky lyzovány v nedenaturujících podmínkách, takže proteinové interakce uvnitř buňky nejsou narušeny. Cílový protein je zachycen (imunoprecipitován) specifickou protilátkou, která je navázaná na agar. Po odstranění nespecificky vázaných proteinů opakovaným promytím se ko-immunoprecipitující interagující proteiny eluují z agaru za použití Laemmliho pufru, separují se pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-page) a následně se identifikují hmotnostní spektrometrií (MS)²².

1.5.1.3 Afinitní chromatografie

Tato metoda slouží k purifikaci specifických molekul nebo skupiny molekul ze směsi. Je založena na interakcích mezi dvěma molekulami, jako je interakce mezi enzymem a substrátem, receptorem a ligandem nebo protilátkou a antigenem. Tyto interakce, které jsou typicky reverzibilní, se používají k purifikaci jedné z interagujících molekul. Tato molekula se nazývá afinitní ligand a ta je ukotvena na pevnou matici za vzniku stacionární fáze, zatímco cílová molekula je v mobilní fázi²³.

1.5.2 Metody in vivo

1.5.2.1 Dvou-hybridní systém (Yeast two-hybrid systém)

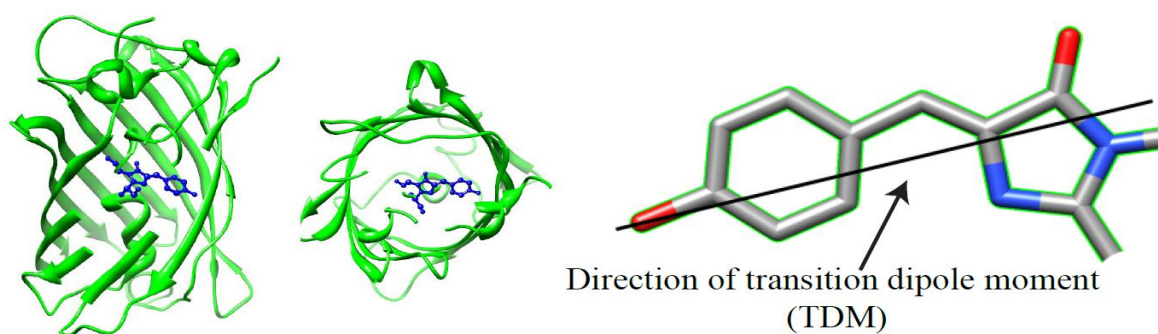
Tato metoda je založená na schopnosti detekovat proteiny, které interagují s jiným známým proteinem. Využívá plazmidy navržené tak, aby kódovaly dva hybridní proteiny. Jeden hybridní protein obsahuje DNA-vázací doménu např. kvasinkového transkripčního faktoru, která interaguje se známým proteinem. Druhý hybridní protein se skládá z aktivační domény, která interaguje s proteinovými sekvencemi kódovanými genomovou DNA kvasinek. Interakce mezi známým proteinem a proteinem kódovaným plazmidem z kvasinek vede k aktivaci transkripčního faktoru²⁴.

1.5.3 Metody využívající fluorescentní proteiny

Před objevem fluorescentních proteinů nebylo možné studovat buněčné procesy v konkrétních strukturách bez fixace buněk. Zásadní zlom přinesl právě až objev zeleného fluorescentního proteinu, který umožnil pozorování buněk v jejich přirozeném prostředí²⁵. Fluorescentní proteiny v současné době slouží jako významný nástroj, který umožňuje přímou vizualizaci struktur a procesů v živých buňkách a organismech²⁶. Fluorescentní proteiny umožňují i pozorování interakcí mezi proteiny, a to nejčastěji pomocí technik FRET a BRET, a nově i technikou dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM), vyvinutou v naší laboratoři.

1.5.3.1 Fluorescentní proteiny

Zelený fluorescentní protein má strukturu β -soudku, který se skládá z 11 vláken na povrchu soudku a má průměr 30 Å a délku ~ 40 Å. Uvnitř β -soudku se nachází fluorescenční centrum, tzv. fluorofor. Fluorofor GFP vzniká spontánní chemickou reakcí tří aminokyselin, které jsou součástí molekuly GFP: Ser65, Tyr66 a Gly67. Fluorofor GFP je součástí nepravidelné α -šroubovice procházející středem soudku. Struktura GFP je velmi pravidelná a stabilní. Přesto lze molekulu GFP denaturovat, teplem nebo denaturačními činidly. Po denuraci GFP ztrácí schopnost fluoreskovat. Denaturace (a ztráta fluorescence) bývá však často reverzibilní²⁷.



Obr. 5: Struktura GFP a lokalizace fluoroforu.

1.5.3.2 FRET (Fluorescence resonance energy transfer)

Fluorescenční rezonanční přenos energie je fyzikální proces, pomocí něhož je přenášena energie z excitované fluorescentní molekuly (donor) na jinou fluorescentní molekulu (akceptor). Je to nezářivý přenos. V důsledku FRET dochází ke snížení intenzity fluorescence donoru a ke zvýšení intenzity emise akceptoru. Tato hojně využívaná technika umožňuje pozorování struktury a konformace proteinů.

Na účinnost FRET má vliv několik faktorů. Donorová a akceptorová molekula musí být v těsné blízkosti (obvykle 10 – 100 Å) a excitační spektrum akceptoru se musí překrývat s emisním spektrem donoru²⁸. Změna ve vzdálenosti (či vzájemné orientaci) donoru a akceptoru vede ke změně intenzit jejich fluorescence, která může být pozorovatelná. Změny fluorescence v důsledku FRET lze využít k detekci interakcí mezi molekulami proteinů.

Výhodou techniky FRET je, že umožňuje pozorování proteinů a jejich interakcí v živé buňce za fyziologických podmínek. Účinnost této techniky je limitována ztrátou fluorescenčního signálu (photobleaching) a fluorescenčním pozadím (autofluorescencí)²⁹.

1.5.3.3 BRET (Bioluminescence resonance energy transfer)

Bioluminiscenční rezonanční přenos energie je alternativní metoda k FRET. Na rozdíl od techniky FRET se při BRET jako donoru využívá enzym který katalyzuje chemickou reakci během níž je emitováno světlo (bioluminiscence). Tato bioluminiscence excituje molekuly akceptoru, jimiž mohou být molekuly fluorescentního proteinu.

Podmínky nutné pro pozorování BRET jsou obdobné jako u FRET, tzn. molekuly donoru a akceptoru musí být od sebe v malé vzdálenosti a emisní spektrum donoru musí překrývat absorpční spektrum akceptoru³⁰.

Výhodou techniky BRET je, že umožňuje pozorování interakcí mezi proteiny bez vnější excitace donoru. Tudiž, přístroje využívající BRET jsou jednodušší a méně nákladné. Výhodou je i absence autofluorescence. Nevýhodou je, že signál, který daný protein vydává prostřednictvím luminiscenční reakce, bývá velmi slabý. Další nevýhodou je, že tato technika má tendenci detekovat i náhodné interakce mezi proteiny. Přesto se tato technika stala velmi používanou v buněčné biologii³⁰.

1.5.3.4 Dvoufotonová polarizační mikroskopie (Two – photon polarization microscopy, 2PPM)

Jako výhodná metoda k detekci proteinových interakcí se jeví dvoufotonová polarizační mikroskopie (2PPM), která byla nedávno vyvinuta naší laboratoří.

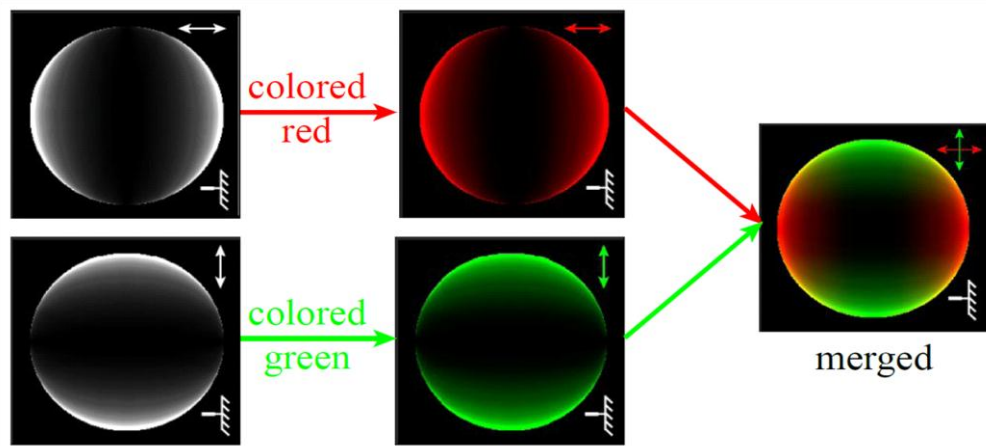
Princip 2PPM spočívá v osvětlování vzorku dvěma na sebe kolmými polarizacemi excitujícího světla. V závislosti na orientaci fluorescentních molekul (proteinů) vůči buněčné membráně potom různé části buňky vykazují pro jednotlivé použité polarizace excitačního světla nižší či vyšší intenzitu emitované fluorescence (tzv. lineární dichroismus). Změny v lineárním dichroismu umožňují detekci změny orientace fluorescentního proteinu vůči buněčné membráně. Pokud ke změně orientace fluorescentního proteinu dojde v důsledku interakce s jiným proteinem, lze techniku 2PPM uplatnit k detekci těchto interakcí.

Metodou 2PPM lze sledovat např. aktivaci G-proteinů (prostřednictvím pozorování interakcí mezi jednotlivými podjednotkami G-proteinů), změny vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů (prostřednictvím pozorování konformačních změn v proteinech citlivých na koncentraci vápenatých iontů) a dalších procesů, jichž se účastní membránové proteiny. Výhodami metody 2PPM jsou nutnost pouze jednoho fluorescentního proteinu (na rozdíl např. od metody FRET, která vyžaduje dva fluorescentní proteiny), možnost multiplexace či malý vliv bělení fluoroforu.

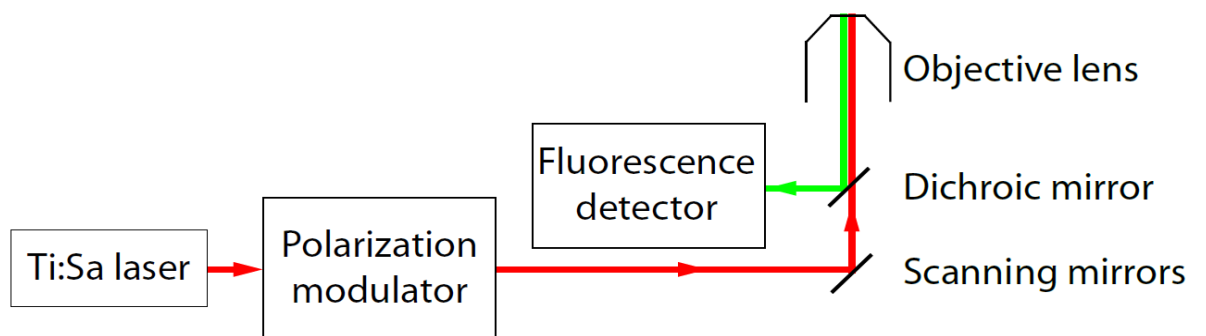
Metoda 2PPM je prováděna prostřednictvím dvoufotonového fluorescenčního mikroskopu, který využívá pulsní femtosekundový infračervený laser. Díky vysoké intenzitě infračerveného světla v průběhu velmi krátkých laserových pulsů může v ohnisku objektivu docházet k excitaci fluoroforu díky současné absorpci dvou fotonů. Dvoufotonová excitace je omezena pouze na fokální objem objektivu, a umožňuje tak vytváření optických řezů vzorku. Nutnost současné absorpce dvou fotonů zvýrazňuje projevy orientace absorbujících fluorescentních molekul³¹.

Dvoufotonový polarizační mikroskop funguje obdobně jako běžný dvoufotonový laserový skenovací mikroskop. Jeho důležitou součástí je však elektrooptický polarizační modulátor, který rychle mění polarizaci excitačního laserového svazku, v součinnosti s funkcí laserového skenovacího mikroskopu. Tato metoda je součástí českého patentu a také mezinárodních patentů (US patent č. 8,722,358 a EPO patent 10 801 109)³².

Dvoufotonový polarizační mikroskop umožňuje téměř současné získávání obrázků se dvěma různými polarizacemi excitačního svazku. Pro vizualizaci rozdílů mezi obrázky získávanými s oběma použitými polarizacemi je nejčastěji obrázek fluorescence získaný za použití horizontálně polarizovaného světla počítačově obarven červeně, obrázek získaný za použití vertikálně polarizovaného světla obarven zeleně, a oba obarvené obrázky jsou zkombinovány. Rozdíly mezi jednotlivými obrázky (tj. lineární dichroismus) se ve výsledném obrázku projeví červeným a zeleným zbarvením různých částí pozorovaných buněčných membrán. Pokud není přítomen lineární dichroismus, jeví se výsledný obrázek homogenně žlutý.



Obr. 6: Vizualizace lineárního dichroismu. Obrázek fluorescence získaný s horizontální polarizací excitace je počítačově obarven červeně, obrázek fluorescence získané s vertikální polarizací excitace je počítačově obarven zeleně. Oba obrázky jsou pak složeny v jeden. Přítomnost a intenzita červeno-zeleného obrazce vypovídá o orientaci přítomných fluorescentních značek vůči buněčné membráně



Obr. 7: Laserový svazek prochází polarizačním modulátorem, který mění jeho polarizaci. Laserový svazek je potom skenovacími zrcátky směřován tak, aby po průchodu dichroickým zrcátkem a objektivem mikroskopu osvětlil určitý bod zkoumaného vzorku. Fluorescence excitovaná v tomto bodě vchází do objektivu a po odrazu od dichroického zrcátka je detekována detektorem.

1.5.3.5 Využití 2PPM ke sledování dimerizace proteinů

Kromě využití 2PPM ke sledování interakcí mezi různými proteiny by technika 2PPM měla umožňovat i detekci interakcí mezi molekulami jednoho proteinu, tj. např. přítomnost dimerů. K detekci homomolekulárních dimerů pomocí techniky 2PPM jsou potřeba dvě pozorování: pozorování buněk exprimujících pouze fluorescentně značenou verzi zkoumaného proteinu, a pozorování buněk exprimujících jak fluorescentně značenou, tak neznačenou verzi zkoumaného proteinu. V principu pak mohou nastat tři možnosti:

1) Zkoumaný protein netvoří dimery

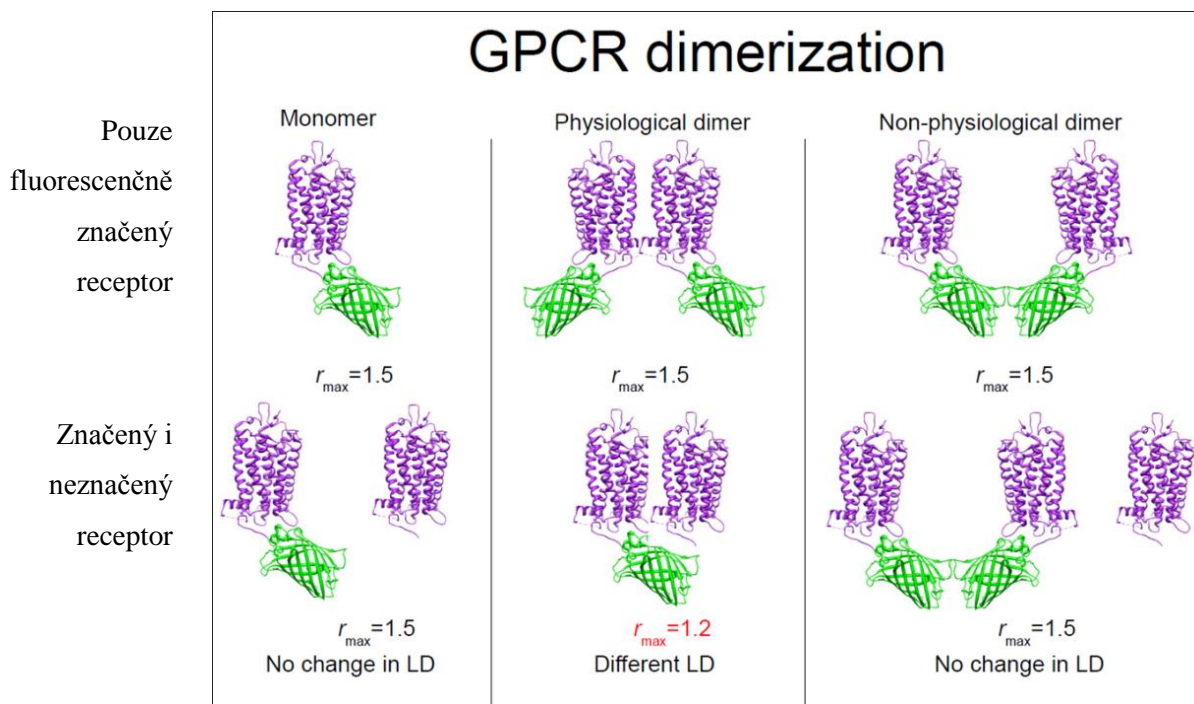
V tomto případě vykazují buňky exprimující pouze fluorescentně značený zkoumaný protein určitou úroveň lineárního dichroismu, reflektující orientaci fluorescentní značky vůči buněčné membráně. Vzhledem k tomu, že zkoumaný protein netvoří dimery, přítomnost (či absence) neznačené verze zkoumaného proteinu nemá vliv na lineární dichroismus fluorescentně značené verze zkoumaného proteinu. V obou případech je tak pozorována stejná úroveň lineárního dichroismu.

2) Zkoumaný protein tvoří dimery, avšak pouze v důsledku přítomnosti fluorescentní značky

V tomto případě je zkoumaným proteinem tzv. nefyziologický dimer. Podjednotky tohoto dimeru nejsou vzájemně spojené zkoumaným proteinem, ale dimerizují v důsledku interakce mezi fluorescentními proteiny navázanými na obou podjednotkách. Buňky exprimující tento fluorescenčně značený zkoumaný protein vykazují určitý lineární dichroismus, který poskytuje informace o orientaci fluorescentního proteinu. Přítomnost neznačené verze zkoumaného proteinu nemá žádný vliv na orientaci fluorescentního proteinu a je tak pozorována stejná úroveň lineárního dichroismu.

3) Zkoumaný protein tvoří dimery prostřednictvím fyziologické interakce

V tomto případě je zkoumaným proteinem tzv. fyziologický dimer, jehož podjednotky spolu interagují. Buňky exprimující tento fluorescenčně značený zkoumaný protein opět vykazují lineární dichroismus, který stejně jako v předešlých možnostech indikuje určitou orientaci fluorescentního proteinu vůči buněčné membráně. Přítomnost neznačené verze zkoumaného proteinu v tomto případě může ovlivnit lineární dichroismus fluorescentně značeného zkoumaného proteinu.



Obr. 8: Pokud je GPCR přítomen jako monomer, tak přítomnost neznačeného GPCR nemá žádný vliv na orientaci fluorescenční značky. Stejně je tomu i u nefyziologického dimeru. Pokud tvoří GPCR fyziologický dimer, může neznačený protein ovlivnit orientaci fluorescentního proteinu.

2. Cíle práce

Hlavním cílem našeho výzkumu bylo zjistit, zda lze techniku 2PPM využít k detekci dimerizace membránových proteinů, na modelovém systému metabotropního glutamátového receptoru. K dosažení hlavního cíle bylo zapotřebí dosažení několika dílčích cílů:

- 1) Příprava vhodných konstruktů DNA.
- 2) Mikroskopická pozorování technikou 2PPM.
- 3) Analýza zobrazovacích dat získaných technikou 2PPM.

2.1 Dílčí cíle

1) **Příprava vhodných konstruktů DNA.**

Cílem bylo získání konstruktů nutných pro pozorování dimerizace technikou 2PPM. Ke zjištění zda membránové receptory dimerizují či nikoliv je zapotřebí dvou konstruktů: jednoho bez fluorescenčního proteinu a jednoho konstruktů obsahující fluorescenční protein. Buňky exprimující pouze značený konstrukt pak mohou být porovnány s buňkami obsahujícími jak značený, tak neznačený konstrukt. Konstrukt bez fluorescenčního proteinu ale nebyl k dispozici, proto muselo být využito již existujícího konstruktů, který byl zkrácen o část kódující fluorescenční protein. Z tohoto důvodu musely být vhodně navrženy primery komplementární k požadovaným konstruktům. Tyto primery tak definují oblast DNA, která má být nasyntetizována a tedy i počátek replikace DNA, která je provedena pomocí metody polymerázová řetězová reakce. Dalším krokem v přípravě vhodných konstruktů bylo nasyntetizovanou DNA ligovat a transformovat do buněk E. coli. Z narostlých bakteriálních kolonií pak už snadno mohl být požadovaný konstrukt vyizolován a transfekován do eukaryotních buněk HEK 293.

2) **Mikroskopická pozorování technikou 2PPM.**

Cílem této části práce bylo pozorování buněk HEK 293 exprimující fluorescenčně značený konstrukt a směs neznačeného námi modifikovaného konstruktů (bez fluorescenčního proteinu) se značeným konstruktem pomocí 2PPM. Pokud neznačený konstrukt určitým způsobem ovlivňuje orientaci fluorescenčního proteinu značeného konstruktů, tak je ovlivněn i lineární dichroismus na membráně, což by mělo být viditelné touto technikou.

3) **Analýza zobrazovacích dat získaných technikou 2PPM.**

Cílem v této části práce bylo analyzovat data získaná technikou 2PPM. Na základě této analýzy pak mohlo být určeno, zda námi modifikované konstrukty dimerizují či nikoliv.

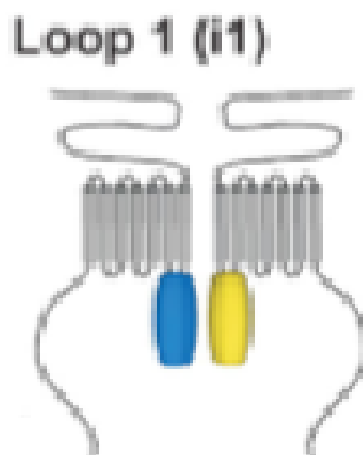
3. Materiál a metody

3.1 Výchozí konstrukty

V našem výzkumu byly využity konstrukty na bázi metabotropních glutamátových receptorů poskytnuté laboratoří Biofyziky a Neurobiologie, Národního institutu pro fyziologické vědy v Japonsku³³. Tyto konstrukty měly fluorescenční protein navázán na první a druhé intracelulární smyčce. Tyto konstrukty byly následně porovnány s modifikovaným konstruktem bez fluorescenčního proteinu.

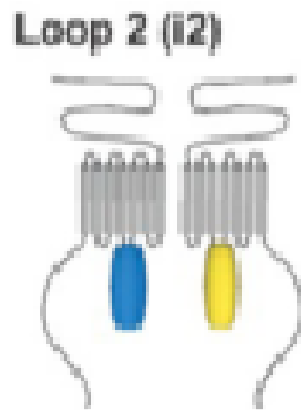
Fluorescentně značené konstrukty:

- **mGluR1-i1-YFP** – fluorescenční protein navázán na první intracelulární smyčce (i1).



Obr. 9: Konstrukt mGluR1-i1-YFP.

- **mGluR1-i2-YFP** – fluorescenční protein navázán na druhé intracelulární smyčce (i2).



Obr. 10: Konstrukt mGluR1-i2-YFP.

3.2 Metodický postup

V následujícím textu je podrobně popsán náš postup při provádění následujících metod:

- 1) Polymerázová řetězová reakce (PCR)
- 2) Purifikace DNA
- 3) Ligace
- 4) Bakteriální transformace
- 5) Izolace plazmidu
- 6) Transfekce savčích buněk
- 7) Pozorování vzorků pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tato metoda byla využita pro získání lineární DNA. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' katalyzovaná DNA – polymerázou. Požadovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA. Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se využívají polymerázy z termofilních mikroorganismů, které jsou termostabilní – např. *Taq* DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus*. Tato DNA – polymeráza tak odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Syntéza DNA probíhá opakovaně v cyklech, ve kterých se střídají tři kroky – denaturace dvouřetězcové DNA (při teplotě blízké bodu varu), navázání primerů k odděleným řetězcům DNA (při teplotě vhodné pro navázání primerů na vlákna templátové DNA) a syntéza nových řetězců DNA (při teplotě optimální pro danou DNA polymerázu).

Tyto kroky probíhají v tzv. termocykleru, ve kterém se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech³⁴.

Pro vykonání PCR reakce bylo potřeba navrhnout vhodné primery:

a) Design primerů

Za účelem pozorování dimerizace proteinu mGluR1 bylo potřeba získat konstrukt neobsahující fluorescentní protein. Cílem bylo tento konstrukt připravit pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), pro kterou bylo potřeba navrhnout vhodné primery kompatibilní s výchozími konstrukty.

- **mGluR1-i1-YFP** - oblast kódující žlutý fluorescentní protein je vymezena sekvencí aminokyselin Pro621 a Val622. V těchto místech nasedají navržené primery a nasyntetizovaná DNA už nebude obsahovat oblast vymezenou těmito primery. Zelená šipka znázorňuje primer R a červená šipka znázorňuje primer F.

1701	tettgagtgg	agtgacatag	aatetateat	agcaatagcc	ttttcttggc
1751	tgggcatect	cgtagcgtg	ttgtcacc	tcattcttct	ttgtaccgg
1801	gacacaccca	gcaagggcga	ggagcctgtc	accggggtgg	tycccatcct
1851	ggtcgagctg	gacggcgacg	taaacggcca	caagtttagc	gtgtccggcg
1901	agggcgaggg	cgatgcccac	taoggaagc	tgaccctgaa	gattatctgc
1951	accacggcca	agetgcccgt	gcctggccc	accctcttja	ccaccctcgg
2001	ctacggcgtg	cagtgtctcg	cccctacc	cgaccatag	aagcagcacg
2051	acttcttcaa	gtccgccatg	cccgaaggct	acttccagga	gpcaccatc
2101	ttcttcaagg	acgaaggcaa	ctacaagacc	cgagccaggg	tjaagtctga
2151	gggcgacacc	ctggtgaacc	gcaccgagct	gaagggcacc	gacttcaagg
2201	aggacggcaa	catcctgggg	cacaagctgg	agtacaacta	caacagccac
2251	aacgtctata	tcatggccga	caagcagaag	aaagccatca	aggtgaactt
2301	caagatccgc	cacaacatcg	aggacggcag	cgtgcagctc	gpcgaccact
2351	accagcagaa	caccccatc	ggcgacggcc	ccgttctgct	gpcgacaa
2401	cactacctga	gctaccagtc	cgcccagagc	aaagaccca	acgagaagcg
2451	cgatcacatg	gtcctgctgg	agtccgtgac	cgccgcccgg	atcactctcg
2501	gcattggaaga	gctggtcaaa	tcctccagta	ggtagctctg	ctatatcatt
2551	ctggctggtg	tttctctcgg	ctatggtg	cccttcacc	tcacgcaa

Obr. 11: Nukleotidová sekvence modifikovaného konstrukt mGluR1-i1-YFP.

- **mGluR1-i2-YFP** - oblast kódující žlutý fluorescentní protein je u tohoto konstrukt vymezena aminokyselinami Leu686 a Ile685. Způsob nasedání primerů je stejný jako u předešlého konstrukt.

1901	ctactaccac	atcctgttac	ctccagccgc	tcttagtggg	cctctctct
1951	gccatgtgct	actctgcttt	agtjaccaaa	accaatcgta	ttgcacgcat
2001	gagcaagggc	gaggagctgt	tcacgggggt	ggtgcccatc	ctggctgagc
2051	tgcacggcga	cgtaaacggc	cacaagttca	gogtgtccgg	cgagggcgag
2101	gccgatgcc	ctacggcaa	gctjaccctg	aagcttatct	gcaccaccgg
2151	caagctgccc	gtcccctggc	ccaccctcgt	gaccaccttc	ggtccggcg
2201	tccagtgtct	cgcccgtacc	cccjaccaca	tgaagcagca	cgacttcttc
2251	aagtcogcca	tgcccgaagg	ctatgtccag	gagcgcacca	tcttcttcaa
2301	gacgacggc	aactacaaga	cccjcgccga	ggtgaagtcc	gagggcgaca
2351	ccctgggtgaa	ccgcatcgag	ctgaagggca	tcgactcaa	ggagcagggc
2401	aacatcctgg	ggcacaagct	ggagtacaac	tacaacagcc	acaacgtcta
2451	tatcatggcc	gacaagcaga	agaacggcat	caaggtgaac	ttcaagatcc
2501	gccacaacat	cgagcagggc	agcgtgcagc	tcgcccagca	ctaccagcag
2551	aacaccccga	tcggcgacgg	cccgtgctg	ctgcccagca	accactacct
2601	gegctaccag	tccgcccctga	gcaagacc	caacgagaag	cgcgatcaca
2651	tggctcctgct	ggagtctgtg	accjccggcg	ggatcaactc	cggcattggac
2701	gegctggctg	gcagcaagaa	gaagatctgc	accgggaagc	ccagattcat
2751	gegctgctgg	gcccgaagta	tcatagcctc	cattctgatt	agtgtacagc

Obr. 12: Nukleotidová sekvence modifikovaného konstrukt mGluR1-i2-YFP.

b) Sekvence navržených primerů

Tab. I: Sekvence primerů komplementární k výchozím konstruktům.

mGluR1-i1-YFP	
primer F	5'GTGGTCAAATCCTCCAGTAGGGAG 3'
primer R	5'GGGTGTGTCCCGGTACAGAACG 3'
mGluR1-i2-YFP	
primer F	5'CTGGCTGGCAGCAAGAAGAAGATC 3'
primer R	5'GATGCGTGCAATACGATTGGTTTT 3'

Tab. II: Složení reakční směsi.

Reagencie	Objem
DNA	1 μ l
dNTPs	0,4 μ l
HF/GC	4 μ l
primer F	0,2 μ l
primer R	0,2 μ l
DMSO	0,6 μ l
H ₂ O	14 μ l/13,4 μ l
Phusion polymerase	0,2 μ l
Celkem	20 μl

Tab. III: Protokol reakce PCR.

Celkem 28 cyklů	Denaturace	98° C	10 s
	Nasedání primerů	68° C	20 s
	Elongace	72° C	120 s

2) Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza se využívá k separaci DNA fragmentů různé velikosti v rozmezí od 10 bp do 25 kb. Využívá se agarózový gel, který vytváří síť pórů, skrz které prochází jednotlivé molekuly. DNA se naplní do předem odlitých jamek v gelu a je aplikováno elektrické napětí. Záporně nabitě fosfátové skupiny ve struktuře DNA v elektrickém poli způsobí pohyb molekul DNA směrem ke kladně nabitě elektrodě. Podle velikosti jednotlivých fragmentů dochází k jejich separaci.

Gelová elektroforéza byla použita k separaci produktů reakce PCR.

Tab. IV: Složení gelu pro elektroforetickou separaci.

Reagencie	Množství
agaróza	0,5g
pufř TAE	50 ml

Příprava gelu:

- smíchali jsme 0,5 g agarózy a 50 ml TAE pufřu (Tris-acetát-EDTA)
- tuto směš jsme zahřáli, dokud se agaróza dobře nerozpustila
- tento roztok jsme nalili do přístroje, kde probíhá elektroforéza, vytvořili jsme jamky a nechali jsme vše ztuhnout
- do jamek jsme poté naplnili vzorky DNA a aplikovali napětí 100 V, po dobu 40 min.

3) Extrakce získané DNA z gelu

Tato metoda byla využita k získání DNA z agarózového gelu, prostřednictvím komerčně dostupného purifikačního kitu. Ten se skládá z chaotropního pufřu, který způsobí rozpuštění agarózového gelu a umožní vazbu DNA na křemennou membránu. Kit dále obsahuje promývací pufř na bázi alkoholu, který zbaví DNA nečistot. DNA je z kolonky eluována pomocí vody nebo promývacího pufřu a centrifugace.

K extrakci DNA požadovaného produktu reakce PCR jsme použili kit QIAgen Plasmid Miniprep a následujícího postupu.

Postup:

- gel s příslušným vzorkem jsme nejprve zvážili a podle jeho váhy jsme přidali pufr QG.
- poté jsme to nechali inkubovat při teplotě 50° C, dokud se gel nerozpustil.
- k této směsi jsme opět podle váhy gelu přidali isopropanol, a vše jsme promíchali a přepipetovali na kolonku s křemennou membránou
- dále jsme to centrifugovali 1 min
- do kolonky jsme přidali 750 µl pufru PE a opět jsme to dvakrát centrifugovali
- ke vzorku jsme poté přidali 50 µl H₂O nebo 30 µl pufru EB a opět jsme to centrifugovali
- výsledným produktem roztok obsahující extrahovanou DNA.

4) Ligace

Tato metoda slouží ke spojení fosforylovaných konců DNA. Enzym T4 DNA ligáza spojuje části DNA fosfodiesterovými vazbami. V našem případě byla ligace využita k cirkularizaci produktu reakce PCR a tím k vytvoření kruhového plasmidu.

Tab. V: Reagencie použité k metodě ligace.

Reagencie	Objem
Plasmid	2 µl
H ₂ O	2 µl
Reakční pufr pro T4 DNA ligázu	0,5 µl
PNK	0,25 µl
T4 DNA ligáza	0,25 µl

Postup:

- DNA jsme smíchali s H₂O, s reakčním pufrům pro T4 DNA ligázu a enzymem PNK.
- tuto směs jsme poté nechali inkubovat 30 min ve 37° C
- po 30 minutách jsme ke směsi přidali enzym T4 DNA ligázu a směs jsme nechali 2 hodiny při laboratorní teplotě.

5) Bakteriální transformace

Tato metoda umožňuje kompetentním bakteriálním buňkám E. Coli přijmout cizorodou DNA, což může být chromozomální DNA nebo plasmid. Cizorodá DNA se v bakteriálních buňkách namnoží a z buněčných kolonií lze napěstovat kapalnou kulturu, ze které lze pak snadno vyizolovat požadovaný plasmid. V našem případě jsme používali bakteriální transformaci k přípravě většího množství výchozích konstruktů a k přípravě nových konstruktů.

Postup:

- na ledu jsme smíchali 10 µl kompetentních buněk a 1 µl přečištěného plasmidu a tuto směs jsme ponechali 20 minut na ledu
- poté jsme tuto směs zahřáli na 45 s ve vodní lázni o teplotě 42 °C a poté jsme to ponechali opět 10 minut na ledu
- po 10 minutách jsme ke směsi přidali 150 µl LB media a nechali jsme to inkubovat ve 37 °C na 60 minut
- poté jsme 50 µl směsi přenesli na Petriho misku s agarem a příslušnými antibiotiky a opět jsme to nechali inkubovat na 10 – 18 hodin ve 37 °C

6) Izolace plasmidů

Cílem této metody je izolace plasmidů z bakteriálních buněk *E. coli*.

Plasmid byl z buněk *E. coli* vyizolován pomocí komerčně dostupného kitu High-speed Plasmid Mini kit od firmy Geneaid, metodou zvanou miniprepce.

Postup:

- kapalnou bakteriální kulturu jsme centrifugovali 10 min
- k bakteriální peletě jsme přidali 200 μ l pufru PD1 a směs jsme přesuspendovali pipetou
- dále jsme ke směsi přidali 200 μ l pufru PD2 a otáčeli jsme ependorfkou dnem vzhůru, dokud nevznikla sraženina, poté jsme ke směsi přidali 300 μ l pufru PD3, načež jsme ji opět centrifugovali 3 min
- po centrifugaci jsme pomocí pipety odpipetovali požadované množství tekutiny, kterou jsme přenesli na kolonku
- kolonku jsme dvakrát centrifugovali 30 s
- poté jsme ke kolonce přidali 600 μ l čistícího pufru a opět jsme stáčeli 30 s
- ke směsi jsme přidali 50 μ l vymývacího pufru, centrifugovali jsme 2 min a výsledným produktem byl roztok DNA

7) Transfekce

Transfekce je proces, který umožňuje do eukaryotních buněk vložit cizorodou DNA. Tato metoda může být provedena buď elektroporací, mikroinjekčně nebo chemicky. V našem výzkumu jsme využili eukaryotní buňky HEK 293 a jako hlavní reakční látku jsme využili Lipofectamine 2000 od firmy Fisher Scientific.

8) Pasážování buněk

Pasážování buněk se využívá k udržování buněčné kultury. Během tohoto procesu jsou buňky uvolněny z podkladového materiálu a část jich je přenesena do nové nádoby vhodné k jejich pěstování. Pasážování je nutné k udržování podmínek vhodných pro růst buněk, neboť bez pasážování množící se buňky po určité době pokryjí celý povrch kultivační nádoby a začnou růst v několika vrstvách. Nedostatek kyslíku a živin vede k umírání buněk ve spodních vrstvách a k uvolňování toxických produktů.

Postup:

- z kultivační nádoby jsme odsáli médium DMEM a přidali k buňkám sterilní PBS pufr
- buňky jsme opláchli a přebytečný pufr jsme zase odsáli
- dále jsme přidali trypsin, díky kterému byly buňky uvolněny z podkladu
- buňky jsme přenesli do nové kultivační nádoby s novým živným médiem

4. Výsledky

1) Příprava vhodných konstruktů DNA.

Pro modifikaci konstruktů kódující fluorescenční protein byly navrženy dva páry primerů pomocí počítačového programu Genetool.

Přes vynaložené úsilí se konstrukt mGluR1 nepodařilo získat pomocí molekulárně-biologických metod. Byl proto získán jako dar od N. Lamberta, Georgia Medical University, v USA.

2) Mikroskopická pozorování technikou 2PPM.

Poté co byl získán požadovaný konstrukt, byly provedeny transfekce do eukaryotních buněk HEK 293, a pozorování technikou 2PPM.

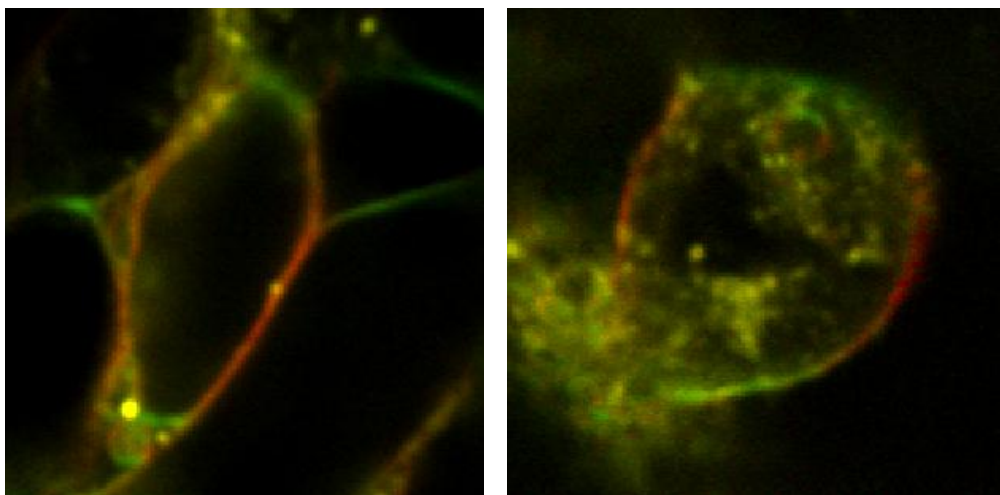
Nejdříve byly pozorovány buňky exprimující pouze fluorescenčně značené konstrukty (Obr. 13, 14). Byla získána data, která nám poskytla informace o orientaci fluorescentního proteinu vůči buněčné membráně v původních výchozích konstruktech.

Následně byly pozorovány buňky HEK 293 exprimující směs modifikovaného konstruktů mGluR1 bez fluorescentního proteinu a konstruktů s navázaným fluorescentním proteinem. Ze získaných dat byla provedena analýza, na jejímž základě jsme usilovali o zjištění, zda metoda 2PPM umožňuje detekci dimerů u metabotropních glutamátových receptorů.

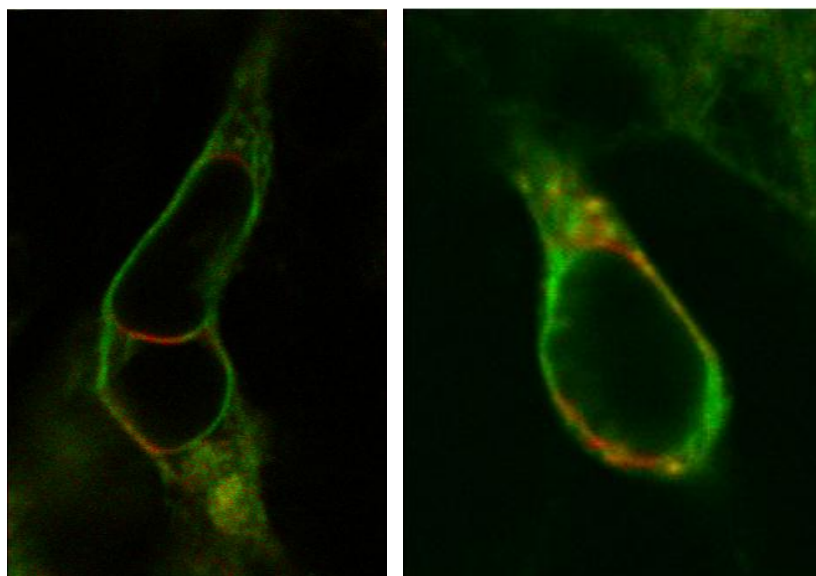
3) Analýza zobrazovacích dat získaných technikou 2PPM.

- Pozorování fluorescenčně značených konstruktů

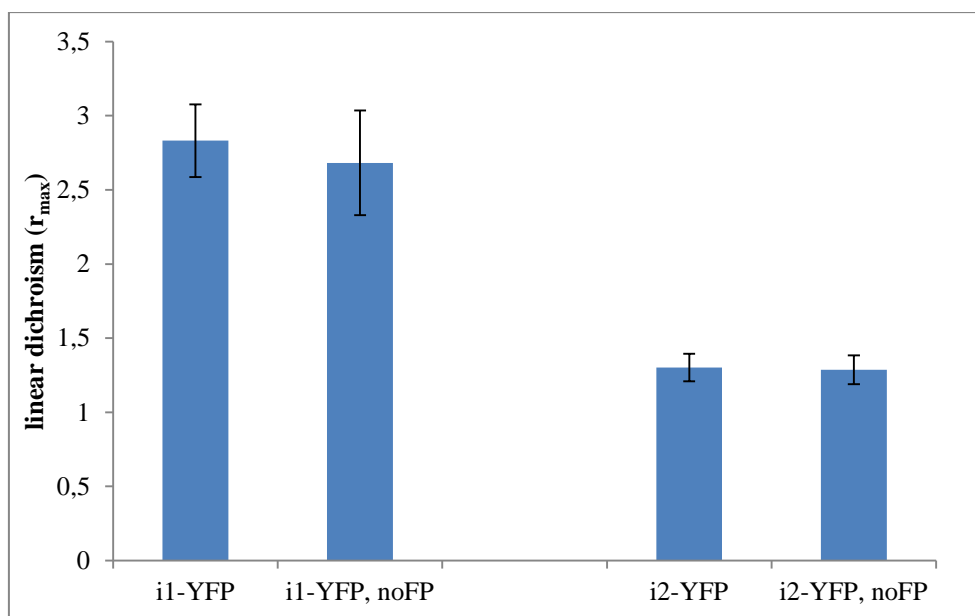
U těchto konstruktů byl pozorován lineární dichroismus, který indikoval omezení volné rotace fluorescentní značky.



Obr. 13: Buňky HEK 293 exprimující konstrukt mGluR1-i1-YFP, zobrazené technikou 2PPM. Nalevo, buňka exprimující pouze konstrukt mGluR1-i1-YFP. Napravo, buňka exprimující konstrukt mGluR1-i1-YFP spolu s neznačeným konstruktem mGluR1. Obě buňky vykazují lineární dichroismus podobné velikosti ($r_{\max} = \sim 2.5$).



Obr. 14: Buňky HEK 293 exprimující konstrukt mGluR1-i2-YFP, zobrazené technikou 2PPM. Nalevo, buňka exprimující pouze konstrukt mGluR1-i2-YFP. Napravo, buňka exprimující konstrukt mGluR1-i2-YFP spolu s neznačeným konstruktem mGluR1. Obě buňky vykazují lineární dichroismus podobné velikosti ($r_{\max} = \sim 1.3$).



Obr. 15: Lineární dichroismus buněk exprimujících konstrukty mGluR1-i1-YFP a mGluR1-i2-YFP za absence a přítomnosti neznačeného proteinu mGluR1. Graf ukazuje průměrnou hodnotu dichroického poměru (r_{\max}) \pm interval 95% jistoty.

5. Diskuze

Receptory spřažené s G-proteinem (GPCR) jsou velmi důležité v buněčné signalizaci. Tyto transmembránové proteiny reagují na široké spektrum podnětů a zprostředkovávají tak specifické odpovědi na přijatý signál³⁵. Publikované studie ukazují, že některé GPCR existují ve formě dimerů nebo oligomerů vyššího stupně. Jiné GPCR jsou však považovány za monomerní, interagující pouze s heterotrimerním G-proteinem po aktivaci ligandu³⁶. Otázka dimerizace mnoha GPCR je však nevyřešená či kontroverzní³⁷. My jsme se pokusili k výzkumu dimerizace GPCR využít techniku dvoufotonové polarizační mikroskopie. Jako testovací systém jsme použili metabotropní glutamátové receptory, které jsou velmi důležité v centrálním nervovém systému, a o kterých je známo, že tvoří dimery.

Cílem našeho výzkumu bylo zjistit, zda lze techniku 2PPM uplatnit ke zjištění, zda GPCR existují jako dimery. K tomuto zjištění bylo zapotřebí dvou pozorování. Jednak byly pozorovány buňky exprimující pouze fluorescentně značený protein a poté byly pozorovány buňky exprimující jak fluorescenčně značený protein, tak námi modifikovaný protein bez fluorescenční značky. Pokud zkoumaný protein (mGluR1) vytváří fyziologické dimery, tak přítomnost neznačeného proteinu ve směsi se značeným proteinem může ovlivnit orientaci fluorescentního proteinu vůči buněčné membráně, což by se mělo projevit změnou lineárního dichroismu, který jsme schopni vidět pomocí techniky 2PPM. Pokud GPCR netvoří dimery, přítomnost neznačeného proteinu by neměla ovlivnit orientaci fluorescentního proteinu ve značeném konstruktu.

Přes vynaložené úsilí se nám nepodařilo získat neznačený konstrukt mGluR1 pomocí technik molekulární biologie. Bylo to nejspíš způsobeno při ligaci, kdy byly neúplně spojeny fosforylované konce DNA, a tudíž nebyly získány bakteriální kolonie, které by obsahovaly požadovanou DNA. Neznačený konstrukt mGluR1 se však podařilo získat jako dar z laboratoře N. Lamberta. Fluorescentně značené i neznačené konstrukty jsme transfekovali do eukaryotních buněk HEK 293. Buňky HEK 293 exprimující tuto směs pak byly pozorovány pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie.

Naměřená data neprokázala statisticky signifikantní rozdíl v lineárním dichroismu způsobený přítomností neznačeného konstruktu mGluR1. Toto může mít několik důvodů. Nejpravděpodobnějším důvodem je, že orientace fluorescentního proteinu ve značených

konstruktech není ovlivněna přítomností neznačeného konstruktů, přestože konstrukty vytvářejí dimery. Další možností je, že nedošlo k transfekci neznačeným konstruktem, což nelze snadno odhalit fluorescenční mikroskopií. Také je možné, že protein mGluR1 tvoří fyziologické dimery. To je však nepravděpodobné, protože to odporuje publikovaným datům³³. V dalším průběhu práce se pokusíme zjistit, zda je neznačený protein mGluR1 přítomen v transfekovaných buňkách pomocí Westernovy detekce, a pokusíme se získat přesnější měření lineárního dichroismu. V současnosti se však nepodařilo ukázat využitelnost techniky 2PPM k detekci homodimerizace v živých buňkách. To je škoda, neboť možnost prokázat dimerizaci za pomoci pouze z poloviny fluorescentně značených zkoumaných bílkovin by představovala detekci dimerizace za podmínek bližších přirozeným, než v současnosti umožňují jiné techniky.

6. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, zda techniku 2PPM lze využít pro detekci dimerizace membránových proteinů. Ze získaných dat a jejich následné analýzy se nepodařilo prokázat existenci dimerů receptoru mGluR1, které byly v minulosti zjištěny jinými technikami. Nepodařilo se tak prokázat vhodnost techniky 2PPM pro zjišťování homodimerů v živých buňkách.

7. Seznam citované literatury

1. **Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P.** (2002). Molecular biology of the cell, 4th edition. Garland Science. New York. 1462
2. **Alberts B.; Bray D.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P.** (1998). Základy Buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, s.r.o. Ústí nad Labem. s. 348
3. **Lodish H.; Berk A.; Zipursky SL. et al.** (2000). Molecular Cell Biology, 4th edition. Section 3.4. Membrane proteins. W. H. Freeman. New York. 973
4. **Gurevich V. V.; Gurevich V. E.** (2008). How and why do GPCRs dimerize?. Trends farmacol Sci. 29(5):234 – 240
5. **Alexander SPH.; Christopoulos A.; Davenport APOD.; Kelly E.; Marrion NV.; Peters JA.; Faccenda E.; Harding SD.; Pawson AJ.; Sharman JL.; Southan C.; Davies JA; CGTP Collaborators.** (2017) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. Br J Pharmacol. **174** Suppl 1: S17-S129.
6. **Hollmann M. W.; Strumper D.; Herroeder S.; Durieux M. E.** (2005). Receptor, G Proteins, and their Interactions. Anesthesiology. 11(103):1066-1078
7. **Palczewski K.** (2006). G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. Annu Rev Biochem. 75: 743-767
8. **Niswender C. M.; Conn P. J.** (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 50:295-322
9. **Miller L. J.; Dong M.** (2011). Secretin receptor. [online]. [cit. 17. 11. 2017]. Dostupné z: <https://www.pancreapedia.org/molecules/secretin-receptor>
10. **Paavola K. J.; Hall R. A.** (2012). Adhesion G Protein-Coupled Receptors: Signaling, Pharmacology, and Mechanisms of Activation. Mol Pharmacol. 82(5):777-783
11. **Wu. Y.; Honig B.; Ben-Shaul A.** (2013). Theory and simulations of adhesion receptor dimerization on membrane surfaces. Biophys J. 104(6):1221-9
12. **Huang H. Ch.; Klein P. S.** (2004). The frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. 5(7):234
13. **Liu H.; Styles C. A.; Fink R. G.** (1993). Elements of the yeast feromone response pathway required for filamentous growth of diploids. Science. 262(5140):1741-1744
14. **Tuteja N.** (2009). Signaling through G protein coupled receptors. Plant Signal Behav. 4(10):942-947

15. **Vilardaga J-P.; Afganati F. L.; Fuxe K.; Ciruela F.** (2010). G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J Cell Sci.* 123:4215-4220
16. **Yang Z.** (2002). Small GTPases. *Plant Cell.* 14(Suppl):375-388
17. **Lodish H.; Berk A.; Zipursky SL. et al.** (2000). *Molecular cell biology.* 4th edition. Section 20.3. G Protein-Coupled Receptors and Their Effectors. W. H. Freeman. New York. 973
18. **Phizicky E. M.; Fields S.** (1995). Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiological Reviews.* 59(1): 94-123
19. **Srinivasa R. V.; Srinivas K.; Sujini G. N.; Kumar G. N. S.** (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics.* 2014:12
20. **Günzl A.; Schimanski B.** (2009). Tandem affinity purification of proteins. Chapter 19. *Curr protoc Protein Sci.* 1919-1955
21. **Bürckstümmer T.; Bennett L. K.; Preradovic A. Schütze G.; Hantschel O.; Superti-Furga G.; Bauch A.** (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nature methods.* 3(2):1013-1019
22. **Huang B. X.; Kim H-Y.** (2013). Effective Identification of Akt Interacting Proteins by Two-Step Chemical Crosslinking, Co-Immunoprecipitation and Mass Spectrometry. *PLoS ONE.* 8(4):e61430
23. **Uhr M.; Simpson D.; Zhao K.** (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol.* 463:417-38
24. **Chien C. T.; Bartel P. L.; Sternglanz R.; Fields S.** (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Biochemistry.* 88(21): 9578-9582
25. **Černý J.** (2009). Zelený fluorescenční protein. *Vesmír.* 88(228)
26. **Chudakov D. M.; Matz M. V.; Lukyanov S.; Lukyanov K. A.** (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews.* 90(3): 1103-1163
27. **Remington S. J.** (2011). Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Sci.* 20(9):1509-1519
28. **R. B.; Periasamy A.** (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *Journal of Cell Biology.* 160(5):629-633

29. **Xu Y.; Piston W. P.; Johnson H. C.** (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) systém: Application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(1): 151-156
30. **Xie Q.; Soutto M.; Xu X.; Zhang Y.; Johnson H. C.** (2011). Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Imaging in Plant Seedlings and Mammalian Cells. *Methods Mol Biol.* 680: 3-28
31. **Lazar J.; Bondar A.; Timr S.; Firestein J. S.** (2011). Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nature methods.* 8:684-690
32. **Lazar J.;** Způsob získávání strukturních a funkčních informací o proteinech na bázi polarizační fluorescenční mikroskopie a zařízení k provádění tohoto způsobu. Patent č. 302233 ÚPV ČR
33. **Tateyama M.; Abe H.; Nakata H.; Saito O.; Kubo Y.** (2004) Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1 α . *Nature structure & Molecular biology.* 7:637-642
34. **Šmarda J.; Doškař J.; Pantůček R.; Růžičková V.; Koptíková J.** (2005). *Metody molekulární biologie.* 1. vydání. Masarykova univerzita. Brno. 171s
35. **Kobilka K. B.;** (2007). G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim Biophys Acta.* 1768(4):794-807
36. **Angers S.; Salathour A.; Bouvier M.** (2002) Dimerization: An emerging concept for G-protein-coupled receptor Ontogeny and Function. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 42:409-435
37. **Milligan G.** (2007). G protein-coupled receptor dimerisation: Molecular basis and relevance to function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1768(4):825-835