

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vývoj konstruktů umožňujícího sledování veškerých G proteinů
v buňce pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie**

Bakalářská práce

Karolína Svobodová

Školitel: Josef Lazar, Ph.D.

České Budějovice 2017

Bakalářská diplomová práce:

Svobodová K. (2017): Vývoj konstruktů umožňujícího sledování veškerých G proteinů v buňce pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie. [Development of a universal genetically encoded probe of G protein activation and observation by two-photon polarization microscopy. Bc. Thesis, in Czech] 24p, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem této práce bylo vytvoření konstruktů, který je schopen fungovat jako univerzální senzor aktivace G proteinů. Práce zahrnovala navržení vhodných konstruktů, jejich přípravu, expresi v savčích buňkách a následné pozorování pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie. Jsou zde uvedeny současné způsoby zjišťování proteinových interakcí, vysvětlení techniky dvoufotonové polarizační mikroskopie, molekulárně biologické metody použité pro přípravu konstruktů a výsledky našeho mikroskopického pozorování.

Annotation

The aim of this work was creation of a construct that could act as a universal sensor of G proteins activation. The work included construct design and preparation, as well as expression in mammalian cells and observations by two-photon polarization microscopy. The thesis includes a summary of current ways of protein interaction detection, an explanation of two-photon microscopy, a description of molecular-biological methods used for construct preparation, and outcomes of our microscopy observations.

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

.....

Karolína Svobodová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Josefu Lazarovi za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále bych tímto chtěla poděkovat Alexeyi Bondarovi a Karolíně Tošnerové za jejich pomoc a ochotu.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Komunikace mezi buňkami	1
1.1.1 Význam signálních kaskád	1
1.2 G proteinová signální kaskáda	1
1.2.1 Receptory spřažené s G proteiny.....	2
1.2.2 Struktura a funkce G proteinů.....	3
1.3 Metody zobrazující proteinové interakce	6
1.3.1 Metody detekce in vitro	6
1.3.2 Metody detekce in vivo	7
1.4 Metody využívající fluorescentní proteiny k detekci proteinových interakcí in vivo..	7
1.4.1 Fluorescentní proteiny	7
1.4.2 FRET (Fluorescence resonance energy transfer)	8
1.4.3 BRET (Bioluminescence resonance energy tranfer)	9
1.5 Dvofotonová polarizační mikroskopie (2PPM)	10
2. Cíle práce	12
2.1 Dílčí specifické cíle	12
3. Materiál a metody.....	13
3.1 Výchozí konstrukty	13
3.2 Metodický postup.....	14
3.3 Použité metody.....	15
4. Výsledky	15
5. Diskuze.....	21
6. Závěr.....	22
7. Seznam citované literatury.....	23

1. Úvod

1.1 Komunikace mezi buňkami

K přenosu informace mezi buňkami slouží různé formy signálů; kritickými místy v přenosu informace jsou body, kdy se jedna forma informace převádí v druhou. Tato přeměna se nazývá transdukce signálů. Signalizující buňka obvykle produkuje specifický typ molekul, jež jsou předávány cílové buňce prostřednictvím receptorového proteinu, který rozpozná signální molekulu a specificky na ni odpovídá. Receptorový protein zajišťuje první krok v řadě transdukčních procesů v cílové buňce, při němž je přicházející extracelulární signál převáděn na intracelulární signály, jež řídí chování buňky¹. Komplex membránových komponent zajišťujících přenos a zpracování extracelulárního signálu dovnitř buňky se označuje jako signální kaskáda.

1.1.1 Význam signálních kaskád

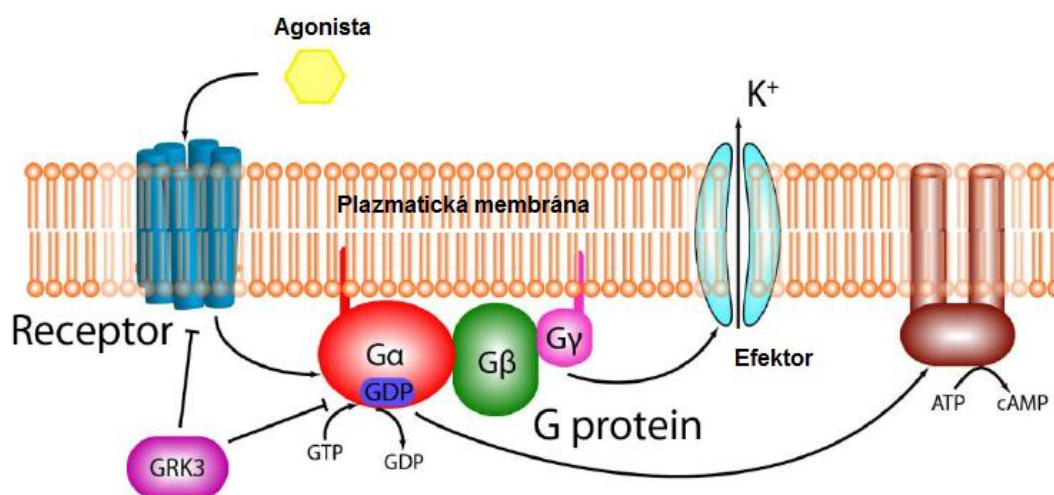
Podle způsobu působení kaskády na buněčný signál můžeme určit v zásadě tři významy signálních kaskád:

- 1) Amplifikace signálu – postupným připojováním stále zvětšujícího se počtu signálních molekul může i velmi slabý signál vyvolat významnou změnu buněčného chování.
- 2) Divergence signálu – jeden aktivovaný receptor může ovlivnit více buněčných funkcí.
- 3) Konvergence signálu – více slabých signálů různého původu může vyvolat změnu koncentrace určité signální molekuly dostačující pro vyvolání specifického účinku².

1.2 G proteinová signální kaskáda

Jednou z nejvýznamnějších buněčných signálních kaskád je tzv. G proteinová signální kaskáda (viz Obr. 1). Tato kaskáda hraje klíčovou roli v buněčné signální transdukcii a v komunikaci mezi buňkou a extracelulárním prostředím. Realizuje transdukcii signálů získaných např. zrakovými a čichovými vjemy, hormonální a neurotransmiterovou signalizaci s mnohými efekty, včetně enzymů a iontových kanálů³. G proteinová signální kaskáda zahrnuje tři složky. První je receptor spřažený s G proteinem (anglicky G-protein coupled receptor, GPCR), druhou je G protein a třetí samotný efektor.

Obr. 1: G proteinová signální kaskáda



1.2.1 Receptory spřažené s G proteiny

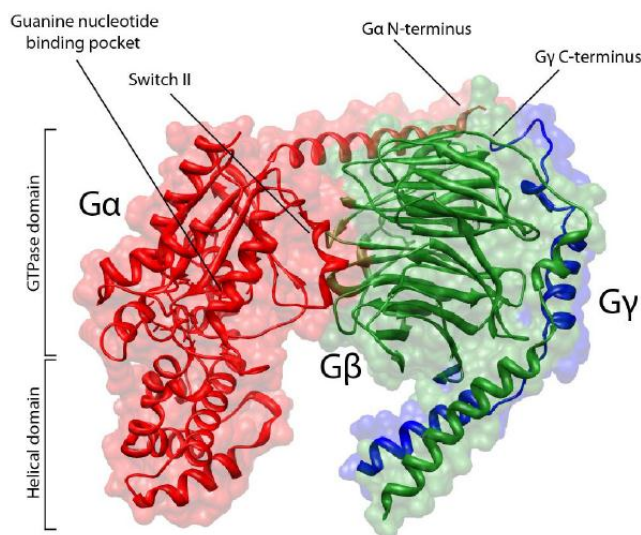
Receptor spřažený s G proteinem se skládá ze sedmi transmembránových domén spojených třemi extracelulárními a třemi intracelulárními kličkami a z N-koncové a C-koncové domény. Podle tradičního receptorového modelu se receptory mohou nacházet ve dvou stavech: v klidovém stavu (též zvaném inaktivní stav) vykazuje receptor nízkou afinitu ke G proteinu, zatímco v aktivním stavu je afinita receptoru vůči G proteinu vysoká. Vazba aktivujícího ligandu na receptor mění rovnováhu mezi oběma stavy tak, že ji posouvá směrem k aktivnímu stavu. Míra biologické odpovědi vyvolaná stupněm afinity ligandu vůči receptoru a jeho vazbou na receptor se označuje jako tzv. „ligand efficacy“⁴. Schopnost ligandu vyvolat měřitelnou funkční změnu se označuje jako potence. Aktivita receptorů může být buď zvýšena, nebo snížena, v závislosti na typu ligandu, a vazba ligandu je reverzibilní⁵. Vysoce afinní ligand, stimulující specifickou fyziologickou odpověď, se označuje jako agonista. Vazba agonisty na receptor způsobí konformační změnu, která je prvním krokem ke vzniku výsledné odpovědi. Na receptor se může navázat i tzv. inverzní agonista, vyvolávající protichůdný účinek než agonista. Ligand, inhibující buněčný receptor, tzn. nevyvolávající žádnou biologickou odpověď, se nazývá antagonist.

1.2.2 Struktura a funkce G proteinů

Nejvýznamnějšími G proteiny jsou tzv. heterotrimerní G proteiny. Heterotrimerní G proteiny se skládají ze tří podjednotek (Obr. 2) – z podjednotek $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$.

Komplex $G\beta/G\gamma$ je vesměs shodný u většiny G proteinů, zatímco různých podjednotek $G\alpha$ je u savců asi 20 a jsou často specializované (např. $G\alpha_{olf}$ na čich). Podjednotky $G\alpha$ se podle aminokyselinové sekvence řadí do 4 tříd: $G\alpha$ stimulační ($G\alpha_s$), inhibiční/jiné ($G\alpha_i/o$), $G_q/11$ a $G_{12/13}$.

Obr. 2: Struktura G proteinu.

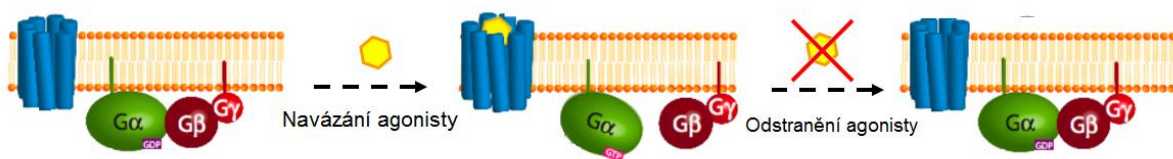


$G\alpha$ podjednotky jsou schopné vázat GTP i GDP. G protein s navázaným GTP má jinou konformaci a jiné vlastnosti než G protein s navázaným GDP. V klidovém stavu je díky GTPázové aktivitě $G\alpha$ podjednotky na ni navázaný GDP. Po interakci s aktivovaným receptorem však dochází k výměně navázaného GDP za GTP. Vazbou GTP se konformace G proteinu dočasně mění v aktivní, dokud nedojde k hydrolyze na GDP, čímž se $G\alpha$ podjednotka vrátí v konformaci inaktivní (Obr. 3). Změna konformace G proteinu z inaktivní formy na aktivní je doprovázena překonáním určité energetické bariéry. Disociace GDP z G proteinu je katalyzována schopností aktivovaného receptoru fungovat jako tzv. faktor guanin-

nukleotidové výměny (GEF, „guanine nucleotide exchange factor“); k vazbě GTP pak dochází samovolně v důsledku jeho vyšší koncentrace v cytoplasmě. Hydrolyza GTP je ireverzibilní, a tak cyklus probíhá pouze jedním směrem⁵. Rychlost hydrolyzy GTP závisí mimo jiné na aktivitě proteinu GAP, „GTPase-accelerating protein“, který může také reagovat na extracelulární signály⁶.

Kromě heterotrimerických G proteinů popsaných výše existuje i skupina tzv. malých G proteinů, které jsou tvořeny pouze α podjednotkou a patří do tzv. rodiny Ras malých GTPáz⁷.

Obr. 3: Aktivace a inaktivace G proteinu.



Změnu neaktivního stavu proteinu na aktivní následuje kaskáda dějů dále propagující původní extracelulární signál dovnitř buňky. Podle způsobu působení na syntézu tzv. druhých posílů rozeznáváme tři druhy G proteinů:

- 1) G_s -proteiny – stimulují aktivitu enzymu adenylátcyklázy štěpící ATP za vzniku cAMP. Vzrůstající koncentrací cAMP vzrůstá aktivita cAMP-dependentních proteinkináz, které způsobují fosorylaci dalších kináz a tím ovlivňují cílovou tkáň
- 2) G_i -proteiny – inhibují aktivitu enzymu adenylátcyklázy, což vede k postupnému klesání koncentrace cAMP a aktivity cAMP-dependentních proteinkináz
- 3) G_q -proteiny – působí na enzym fosfolipázu C přeměňující fosfatidilinositolbisfosfát za vzniku inositoltrifosfátu a diacylglycerolu. Inositoltrifosfát uvolňuje vápenaté ionty z endoplasmatického retikula a tím spouští kalcium-kalmodulinovou kaskádu. Protein kalmodulin nese čtyři vazebná místa pro vápenaté ionty, a pokud jsou alespon tři z nich zaplněna, změní svou konformaci a tím aktivuje kalmodulin-dependentní proteinkinázy. Ty spouští kaskádu fosforylací dalších kináz, které tak mění svou enzymatickou aktivitu, čím je specificky ovlivněna cílová tkáň.

$G_{i/o}$ rodina G proteinů hraje významnou roli v regulačních mechanismech srdce, gastrointestinálního traktu, sensorických orgánů a centrálního nervového systému. V minulosti proběhlo již mnoho výzkumů zabývajících se studií G proteinů, avšak molekulární mechanismy a význam interakcí mezi $G_{i/o}$ proteiny a komponenty lipidové

membrány nejsou dosud zcela známy. Naším pracovištěm byla vyvinuta technika dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM), pomocí které se snažíme tyto mechanismy objasnit.

1.3 Metody zobrazující proteinové interakce

Většina proteinů vyskytujících se v živých organismech jsou plně funkční pouze při spolupráci s jinými proteiny ve formě komplexů prostřednictvím proteinových sítí („interactome“), kde jejich vzájemné interakce reverzibilně vznikají a zanikají. Přítomnost proteinových komplexů lze detekovat in vitro, např. tandemovou afinitní purifikací, ko-imunoprecipitačními metodami či separací pomocí afinitních ligandů. Vhodnější však je studovat tyto interakce přímo v živých buňkách a organismech. Častým způsobem detekce in vivo je tzv. two-hybrid system, který byl vyvinut za použití kvasinkových buněk (Yeast two-hybrid system) a později modifikován i pro živočišné buňky (Mammalian two-hybrid system). Jako velmi účinné se ukázaly metody využívající geneticky kódované optické značky, zejména pak fluorescentní proteiny⁸.

1.3.1 Metody detekce in vitro

1.3.1.1 Tandemová afinitní purifikace

O tandemové afinitní purifikaci hovoříme, když jsou k proteinu připojeny dvě či více fúzních sekvencí. Fúzní protein je nejprve purifikován pomocí jedné fúzní sekvence, která je posléze odstraněna proteolytickým štěpením. Tím dojde k odhalení druhé fúzní sekvence využitelné pro další purifikaci, čímž jsou významně omezeny falešně pozitivní výsledky. Protein je syntetizován s připojenou doménou proteinu A ze *Staphylococcus aureus* vůči imunoglobulinu G. Ta je následována další afinitní značkou, zpravidla peptidem vázícím protein kalmodulin. Komplexy fúzních proteinů s interakčními partnery jsou z buněčného lyzátu izolovány pomocí imunoglobulinového a kalmodulinového nosiče⁹.

1.3.1.2 Ko-imunoprecipitace

Během této metody dochází k šetrné lýze buněk a k navázání protilátek rozpoznávajících testovaný protein na nepoškozené proteinové komplexy. Poté je komplex interagujících proteinů a dané protilátky imunoprecipitován částicemi sepharosy či agarosy s navázanou sekundární protilátkou a precipitované proteiny jsou analyzovány¹⁰.

1.3.1.3 Separace pomocí afinitních ligandů (Pull-down)

Princip této metody spočívá v připojení afinitního ligandu pro navázání, nebo identifikaci proteinu. V současnosti je využívána celá řada fúzních ligandů, např. hexahistidinová kotva či hemaglutinin¹¹.

1.3.2 Metody detekce in vivo

1.3.2.1 Dvouhybridní systém (Two-hybrid system)

Jedná se o metodu založenou na rekonstituci funkčního transkripčního faktoru, sestávajícího z DNA-vazebné domény, který zajišťuje lokalizaci faktoru na specifickém místě DNA a aktivační domény, která je katalyticky aktivní doménou pro transkripci. Rozdělení DNA-vazebné domény a aktivační domény reverzibilně inaktivuje transkripční faktor. Touto metodou lze identifikovat protein, který zajistí opětovné spojení obou domén a tím aktivuje transkripční faktor¹².

1.4 Metody využívající fluorescentní proteiny k detekci proteinových interakcí in vivo

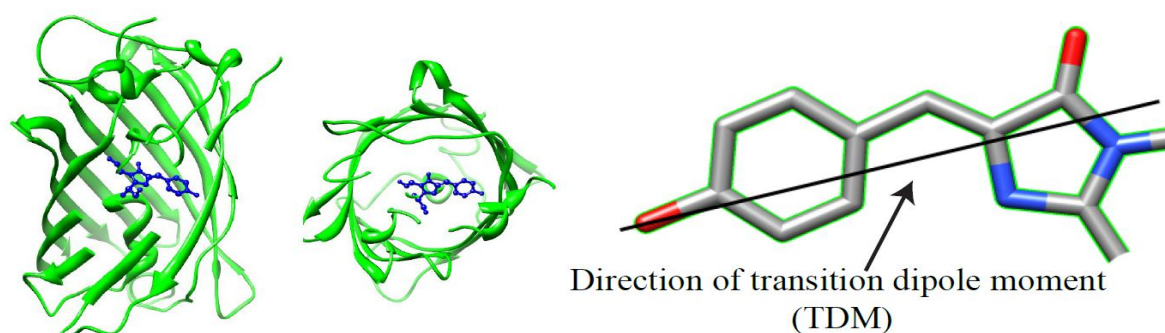
1.4.1 Fluorescentní proteiny

Fluorescentní proteiny jsou proteiny, které po absorpci fotonu jedné vlnové délky emitují foton delší vlnové délky. Historicky prvním identifikovaným fluorescentním proteinem je tzv. zelený fluorescentní protein (green fluorescent protein, GFP), který byl objeven při výzkumu medúzy *Aequorea victoria*. GFP je schopen produkovat fluorescenci i po vložení do jiných organismů. Poprvé byl použit pro zjištění genové exprese u bakterií a sensorických neuronů u hlístice *C.elegans*¹³. Od té doby jsou fluorescentní proteiny hojně využívány zejména v molekulární a buněčné biologii, kde se používají pro označování jiných proteinů a tím umožňují jejich lokalizaci v živých organismech. Za objev fluorescentních proteinů a za vývoj jejich variant a aplikací byla vědcům Osamuovi Shimomurovi, Martinovi Chalfiemu a Rogerovi Y. Tsienovi udělena v roce 2008 Nobelova cena za chemii.

Fluorescentní proteiny mají strukturu tzv. β -barelu, který se skládá z 11 vláken β -skládaných listů s jednou α -šroubovicí, která prochází nitrem proteinu. Ze tří aminokyselin této šroubovice spontánní chemickou reakcí vzniká chromofor, který je tak na šroubovici kovalentně navázán. Nachází se přibližně ve středu barelové struktury, kde je chráněn před molekulami vody, které by mohly zhaset jeho fluorescenci¹⁴. Změny aminokyselinového složení chromoforu umožňují úpravy jeho optických vlastností, např. excitačních a emisních

spekter. Genetické mutace GFP umožnily vznik modrým fluorescentním proteinům (např. CFP nebo mTurquoise2) žlutým fluorescentním proteinům (např. YFP) či červeným fluorescentním proteinům (např. mCherry, dsRed, mKate). Oba konce aminokyselinového řetězce molekul fluorescentních proteinů jsou přítomny na povrchu struktury proteinu, a proto lze fluorescentní proteiny snadno připojit k jiným proteinům. Tyto konce jsou také poměrně blízko u sebe, což někdy dovoluje vložit fluorescentní protein doprostřed jiného proteinu bez poškození funkce tohoto proteinu¹.

Obr. 4: Struktura GFP a lokalizace chromoforu.



Mezi nejpoužívanější techniky využívající fluorescentní proteiny k pozorování protein-proteinových interakcí, jako např. interakcí mezi jednotlivými podjednotkami G proteinů, patří techniky FRET a BRET. Naše pracoviště však nedávno vyvinulo novou mikroskopickou techniku, dvoufotonovou polarizační mikroskopii (2PPM), která přináší oproti jiným technikám významné výhody.

1.4.2 FRET (Fluorescence resonance energy transfer)

Jedná se o proces, při kterém dochází k přenosu energie z excitovaného donorového fluoroforu na akceptorový fluorofor. Donorová molekula je absorpcí světelného záření o určité vlnové délce excitovaná do vyššího energetického stavu. Přenosem energie z donoru dochází k excitaci molekuly akceptoru, která poté vyzařuje záření o delší vlnové délce než záření donorové molekuly. Tento přenos energie je možný, pouze když se donorová a akceptorová molekula nachází ve vzájemné vzdálenosti 10 – 100 Å. FRET je velmi účinná metoda pro detekci změn konformace a asociace či disociace molekul proteinů v živých buňkách¹⁵.

Výhodami techniky FRET je možnost provádění v živé buňce za fyziologických podmínek, a také velká citlivost na změny vzdálenosti mezi donorem a akceptorem. Proto metoda FRET poskytuje cenné informace o interagujících proteinech v buňce. Techniky využívající FRET mají tu nevýhodu, že jsou limitovány poměrně vysokým pozadím způsobeným buněčnou autofluorescencí a přímou excitací fluorescenčního akceptoru. Tyto nevýhody mohou být odstraněny použitím metody BRET.

1.4.3 BRET (Bioluminescence resonance energy transfer)

Bioluminiscenční rezonanční přenos energie (Bioluminescence resonance energy transfer – BRET) je obdobou metody FRET. Oproti FRET je však primárním zdrojem světelné energie bioluminiscence vznikající enzymatickou reakcí katalyzovanou donorovou molekulou. To vede k mnohonásobnému snížení nežádoucího měřeného signálu pozadí a tím umožňuje detekci až 40krát menšího množství proteinu při dosažení stejné intenzity signálu¹⁶. Donorovou molekulou je enzym, který konvertuje specifický substrát a přitom uvolňuje světelnou energii, excitující vhodnou akceptorovou fluorescenční molekulu. Ta následně, stejně jako u FRET, emituje světlo o delší vlnové délce, a to je finálně zachyceno detektorem¹⁷. Podmínky pro přenos energie jsou podobné jako u FRET – molekuly musí být v dostatečné vzdálenosti (méně než 10 nm) a emisní spektrum donoru a excitační spektrum akceptoru se musí překrývat. Interagují-li zkoumané proteiny značené donorem a akceptorem, dojde k přenosu energie z donoru na akceptor a následně k emisi světla akceptorem. Tak je možné detekovat interakce mezi různými nebo i stejnými proteiny či strukturní a konformační změny proteinu¹⁸. Nevýhodou techniky BRET jsou časté falešné pozitivní výsledky v důsledku vysoké citlivosti techniky a nedostatku vhodných negativních kontrol.

1.5 Dvoufotonová polarizační mikroskopie (2PPM)

Vhodnou metodou pro pozorování G proteinů v živých buňkách a organismech se ukázala i dvoufotonová polarizační mikroskopie (2PPM).

Při použití této mikroskopické techniky je fluorescentně značený vzorek střídavě vystaven osvětlení s dvěma na sebe kolmými polarizacemi. V závislosti na orientaci přítomných fluorescentních molekul potom různé části vzorku fluoreskují více nebo méně při jedné či druhé orientaci polarizace excitačního světla (tzv. lineární dichroismus). Prostřednictvím lineárního dichroismu lze získat informace o orientaci fluorescentní molekuly vůči biologické membráně. Pokud se tato orientace změní v důsledku interakce zkoumaného proteinu s jiným proteinem, lze pomocí techniky 2PPM sledovat interakce mezi proteiny.

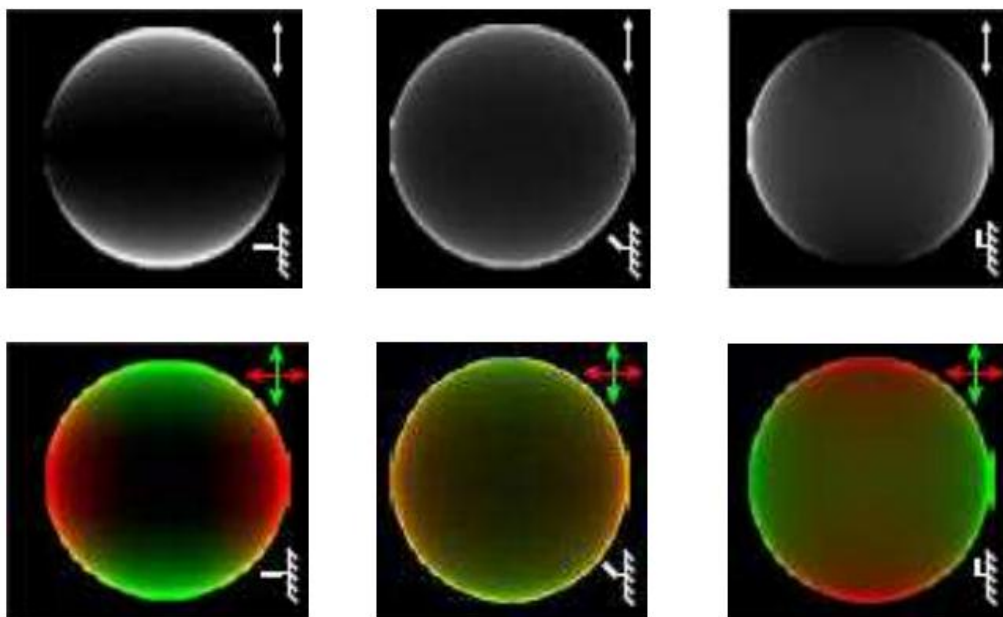
Technika 2PPM je implementována na tzv. dvoufotonovém fluorescenčním mikroskopu, který pro excitaci využívá pulsního (femtosekundového) infračerveného laseru. Po fokusaci objektivem mikroskopu dochází v ohnisku objektivu v důsledku vysoké intenzity infračerveného světla k absorpci dvou fotonů infračerveného světla, která se projeví fluorescencí, obdobně jako absorpce jednoho fotonu modrého světla. Pro provádění citlivých a rychlých měření technikou 2PPM je výhodné rychlé střídání jednotlivých polarizací pomocí elektrooptického polarizačního modulátoru synchronizovaného s funkcí laserového skenovacího mikroskopu tak, že polarizace je střídána po akvizici jednotlivých pixelů. Technika 2PPM byla vyvinuta v naší laboratoři²⁰ a je předmětem českého patentu¹⁹ a také mezinárodních patentů (US patent č. 8,722,358 a EPO patent 10 801 109).

Naše laboratoř ukázala, že metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie je schopna poskytovat mnoho informací o fyziologických procesech v živé buňce, a to v reálném čase. Dvoufotonová polarizační mikroskopie umožňuje např. citlivé sledování aktivace G-proteinů, změn v nitrobuňčné koncentraci vápenatých iontů a sledování dalších procesů, jichž se účastní membránové proteiny. Výhodami této mikroskopie jsou zejména vysoká citlivost, nutnost pouze jednoho fluorescentního proteinu (jednoduchost konstruktů, nedochází ke kontaminaci signálu např. druhou molekulou FP), využití celkové fluorescence jakožto signálu, a vysoké rychlosti odezvy sond²⁰.

Po zpracování obrázků získaných technikou 2PPM se lineární dichroismus projevuje jako přítomnost zelených a červených odstínů a absence žluté.

Při kolmém dopadu polarizovaného světla vertikální směrem na fluorofor se objeví červená barva, při kolmém dopadu horizontálním směrem zase zelená (Obr. 5). Žlutá barva znamená, že paprsky polarizovaného světla nedopadly kolmo na fluorofor, a proto lineární dichroismus chybí.

Obr. 5: Zobrazení lineárního dichroismu v závislosti na orientaci fluorescentní molekuly vůči membráně.



Obr. 6: Schéma dvoufotonového polarizačního mikroskopu.



2. Cíle práce

Hlavním cílem našeho výzkumu bylo vytvořit konstrukt, který umožňuje současné pozorování aktivace různých $G\alpha$ podjednotek v buňce. K tomu je zapotřebí dosažení následujících dílčích specifických cílů.

- 1) Návrh vhodných konstruktů na bázi proteinů $G\beta/G\gamma$.
- 2) Příprava navržených konstruktů.
- 3) Zjištění schopností vytvořených konstruktů fungovat jako senzory aktivace G proteinů pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie.

2.1 Dílčí specifické cíle

1) **Návrh vhodných konstruktů na bázi proteinů $G\beta/G\gamma$.**

Cílem bylo navrhnout primery modifikující již existující, ale nevyhovující konstrukt. Sledování původního konstruktů pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie ukázalo, že linker spojující $G\beta/G\gamma$ dimer a fluorescentní protein je příliš dlouhý, fluorescentní protein tak není pevně ukotven, a proto buňky HEK 293 exprimující tento konstrukt nevykazovaly lineární dichroismus. Cílem modifikace tedy bylo rigidnější ukotvení fluorescentního proteinu, který by tak měl výrazněji měnit svou orientaci vůči buněčné membráně v závislosti na aktivaci G podjednotky. Tato úprava zahrnovala zkrácení linkeru spojujícího Venus a $G\beta/G\gamma$ dimer o tři aminokyseliny

2) **Příprava navržených konstruktů.**

Cílem této části práce bylo pomocí navržených primerů a polymerázové řetězové reakce získat DNA o požadované velikosti, zbavit ji kohézních konců a cirkularizovat ji a dále transformovat do buněk *E.Coli*. Poté z narostlých bakteriálních kolonií izolovat DNA, analyzovat ji pomocí elektroforézy a sekvenování. Poslední součástí tohoto cíle bylo transfekcí vložit plazmidovou DNA do eukaryotických buněk HEK 293.

3) **Zjištění schopností vytvořených konstruktů fungovat jako senzory aktivace G proteinů pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie.**

Posledním cílem této práce bylo pozorovat buňky HEK 293 exprimující modifikovaný konstrukt pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie a zjistit, zda jsou schopny fungovat jako univerzální senzory aktivace G proteinů.

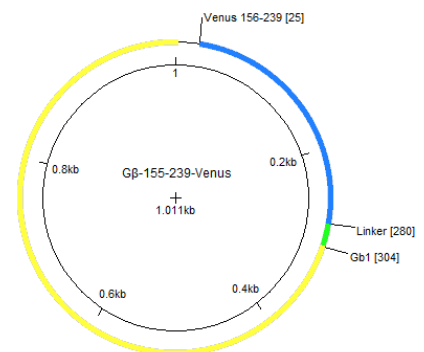
3. Materiál a metody

3.1 Výchozí konstrukty

Výchozími konstrukty byly dva plazmidy. Jeden z nich byl fúzní konstrukt $G\beta$ podjednotky s připojenou částí žlutého fluorescentního proteinem Venus (aminokyseliny 102 až 337). Druhý konstrukt kódoval podjednotku $G\gamma$ s připojenou zbylou částí fluorescentního proteinu Venus (aminokyseliny 250 až 320). Tyto plazmidy byly získány z laboratoře Farmakologie a Toxikologie, Medical College of Georgia a vytvořil je Nevin A. Lambert²².

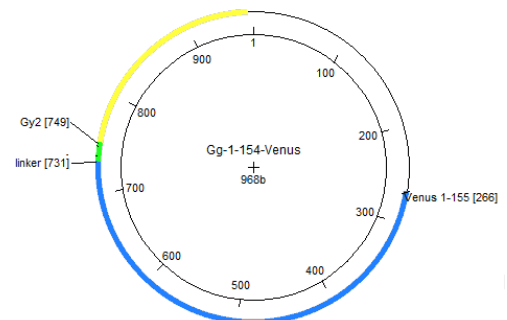
1) $G\beta$ -155-239-Venus

- plasmid kódující podjednotku $G\beta$, část florescentního proteinu Venus a linker spojující tyto dva proteiny
- rezistence na ampicilin

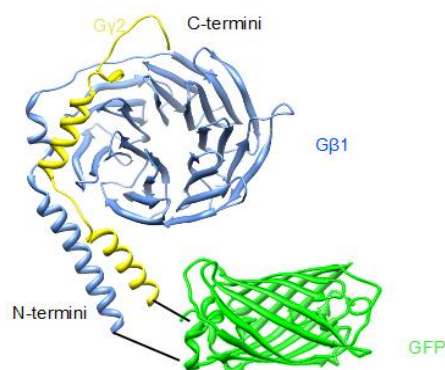


2) $G\gamma$ -1-154-Venus

- plasmid kódující podjednotku $G\gamma$, část fluorescentního proteinu Venus a linker spojující tyto dva proteiny
- rezistence na ampicilin



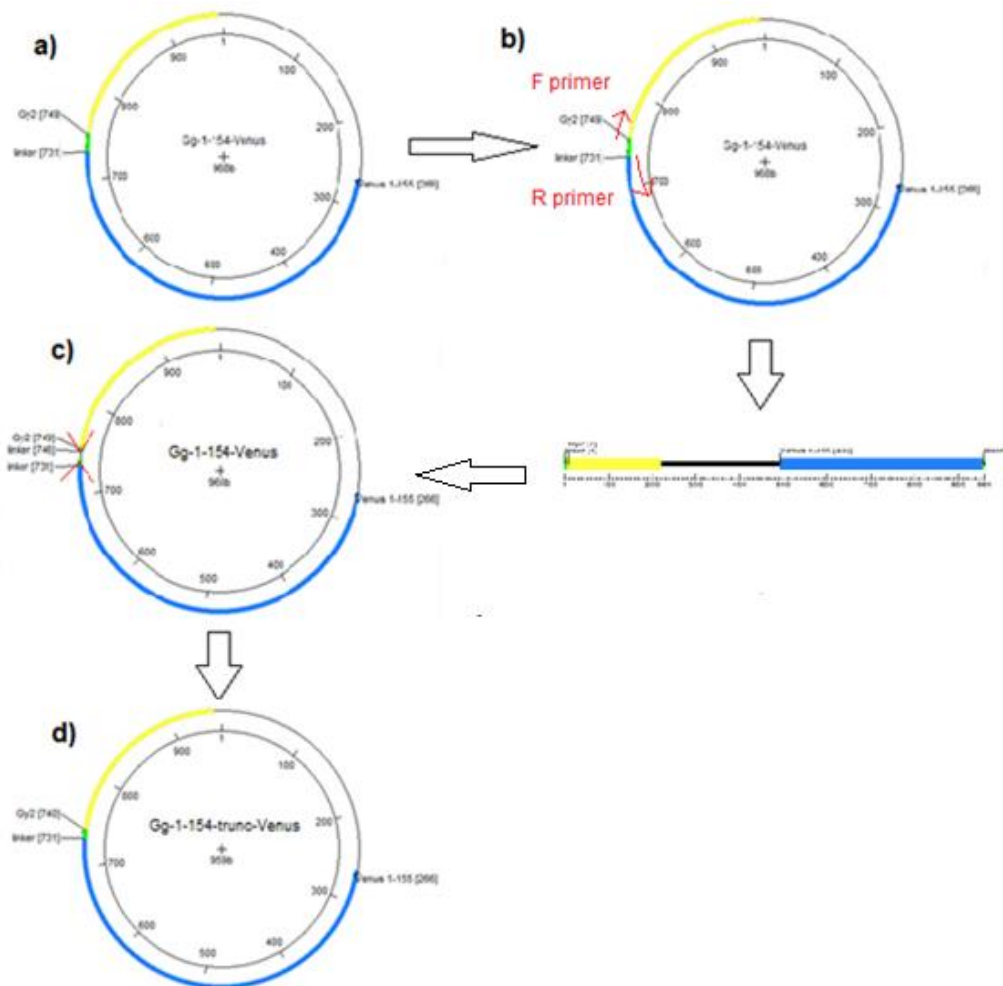
Obr. 7: Struktura připojení fluorescentního proteinu na $G\beta/\gamma$ dimer.



3.2 Metodický postup

- Výchozí plasmid
- Delece zvolených sekvencí – pomocí vhodně navržených primerů a polymerázové řetězové reakce zkrácení plasmidu o báze kodující 3 aminokyseliny v místě spojení G β / G γ podjednotek a fluorescentního proteinu Venus
- Ligace – kovalentní spojení konců a cirkularizace DNA působením enzymu T4 DNA ligázy
- Transformace – vnesení plasmidů do kompetentních buněk *E. Coli* za účelem izolace plasmidů s požadovanou sekvencí
- Transfekce – vložení modifikovaných plasmidů do eukaryotních buněk HEK 293
- Mikroskopování pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie

Obr. 8: Schéma molekulárního provedení.



3.3 Použité metody

1) PCR – polymerázová řetězová reakce

Tato metoda byla použita pro modifikaci výchozích konstruktů.

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy. Požadovaný úsek DNA je vymezen pomocí dvou krátkých, synteticky připravených oligonukleotidu (tzv. primerů), které se vážou (hybridizují) na protilehlá vlákna DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymerázy a směsi nukleotidů probíhá syntéza nových vláken DNA na obou původních vláknech protisměrně. V závislosti na teplotě reakční směsi se pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu: denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94°C), připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30 – 65°C), syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA polymerázy (65 – 75 °C).²¹

Tab. I.: Použité reagensie pro metodu PCR.

Reagensie	Objem
dNTPs	0,4 µl
Pufir HF/GC	4 µl
Primer F	0,2 µl
Primer R	0,2 µl
H ₂ O	14 µl/13,4 µl
Phusion polymeráza	0,2 µl
DMSO	0,6 µl
Celkem	20 µl

Tab. II.: Průběh PCR.

		98°C 60 sek.
28x	Denaturace (Denaturation)	98°C 10 sek.
	Nasedání primerů (Annealing)	64°C 20 sek.
	Prodlužování primerů (Elongation)	72°C 120 sek.
		72°C 5 min.

2) Gelová elektroforéza

K analýze vytvořené DNA byla použita gelová elektroforéza.

Gelová elektroforéza je metoda, při které dochází k separaci fragmentů DNA na základě jejich velikosti a náboje. Tento druh elektroforézy využívá elektrické napětí, kdy záporně nabitě makromolekuly nukleových kyselin migrují skrz agarozový gel směrem ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Rychlost této migrace se liší podle velikosti jednotlivých fragmentů.

3) Purifikace získané DNA

DNA byla purifikována použitím purifikačního kitu podle protokolu výrobce.

4) Ligace

Pomocí enzymu T4 DNA ligázy, který kovalentně spojuje kohezní konce nukleových kyselin, byla námi vytvořená DNA cirkularizována.

Tab. III.: Použité reagensie a jejich objemy pro provedení ligace.

Reagensie	Objem
Plasmid	2 μ l
Ligase buffer	0,5 μ l
PNK enzyme	0,25 μ l
T4 DNA ligase	0,25 μ l

5) Transformace

Transformace je metoda, která umožňuje vnesení plasmidu do buněk bakterií, jeho namnožení a izolaci v požadovaném množství. Kompetentní buňky *E. Coli* přijmou cizorodou DNA, rozmnoží se a ze vzniklých bakteriálních kolonií je poté možné vytvořit kapalně kultury a z nich pak izolovat příslušný plasmid ve vysoké koncentraci.

Postup:

- Na ledu bylo smícháno 10 μ l kompetentních buněk *E. coli* DH 5 alpha s 0,4 μ l přečištěného plasmidu či ligační směsi a ponecháno na ledu 20 minut.
- Směs byla na 45 sekund zahřáta na 42 °C a poté přenesena na 10

minut na led.

- Do směsi bylo přidáno 150 µl LB media a následně se 60 minut inkubovala ve 37°C.
- 50 µl směsi bylo nanášeno na agarovou plotnu.
- Vzorke se 10 až 18 hodin inkubovaly při 37°C a poté byly vyhodnoceny.

6) Izolace plasmidů

Požadované plasmidy byly z bakteriálních kolonií izolovány metodou minipreparace za použití kitu High-Speed Plasmid Mini Kit od firmy Geneaid podle protokolu výrobce.

7) Analýza velikosti plasmidů a sekvence nukleotidů plasmidové DNA

Pro analýzy vytvořených plasmidů byla použita gelová elektroforéza. Sekvence DNA vytvořených plasmidů byly zjištěny pomocí komerčního DNA sekvenování od firmy LGC Genomics.

8) Pasážování savčích buněk

Pravidelná pasáž savčích buněk pěstovaných ve formě tkáňové kultury je potřebná pro zabránění přerůstání a nadměrnému městnání buněk. Používá se i před samotnou transfekcí. Buňky byly pomocí trypsinu uvolněny z podkladu a přeneseny do nového média D – MEM od firmy Invitrogen.

9) Transfekce

Transfekce je proces vnášení cizorodé DNA do eukaryotických buněk. Cizorodá DNA může být do buněk přenášena různými způsoby - mikroinjekčně, elektroporací nebo prostřednictvím liposomů. Při naší práci byl jako transfekční agens použit Lipofectamine 2000 od firmy Fisher Scientific dle protokolu výrobce.

4. Výsledky

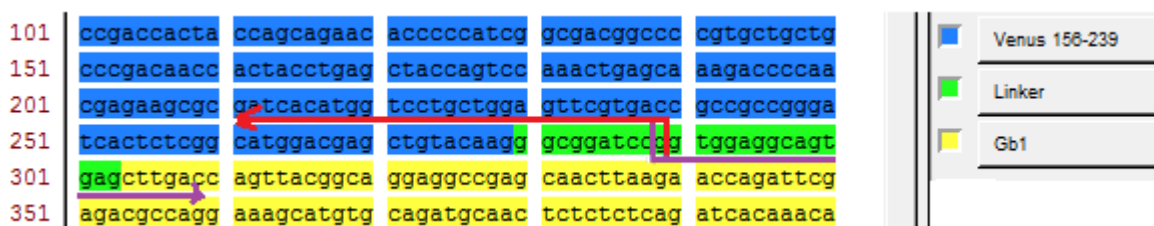
1) Návrh vhodných konstruktů na bázi proteinů Gβ/Gγ.

Pro modifikaci plasmidů kódujících podjednotku Gβ a podjednotku Gγ byly pomocí počítačového programu Genetool navrženy dva páry primerů.

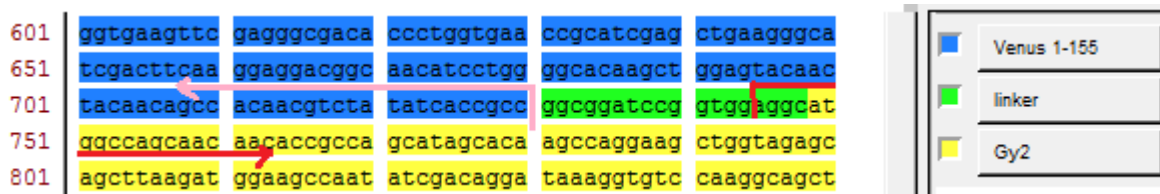
Tab. IV.: Primery použité pro modifikaci plazmidů.

Podjednotka Gβ:	
Gβ1-156-239-V-cut-F	5'-GGTGGAGGCAGTGAGCTTGAC
Gβg-FP-Nt-5aa-cut-R	5'-CATGCCGAGAGTGATCCCG
Podjednotka Gγ:	
Gγ2-1-155-V-cut-F	5'-AGGCATGGCCAGCAACAAC
Gγ2-1-155-V-cut-R	5'-CCGGCGGTGATATAGACGTTG

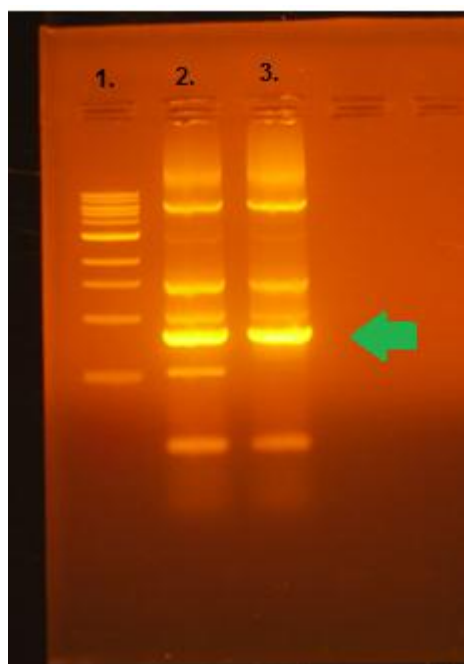
Obr. 9: Komplementarita primerů s plasmidem Gβ1-156-239-Venus. Červenou šipkou je znázorněn F primer, fialovou šipkou R primer.



Obr. 10: Komplementarita primerů s plasmidem Gγ2-1-155-Venus. Červenou šipkou je vyznačen F primer, růžovou šipkou R primer.



Obr. 11: Fotografie agarozového gelu s elektroforeticky rozdělenými produkty PCR.



Na gelu je znázorněn:

1. marker-1kb DNA ladder (New England Biolabs)
2. G β 1-156-239-trunc-Venus s přidavkem HF buffer
3. G β 1-156-239-trunc-Venus s přidavkem GC buffer.

Bandy požadované velikosti (6100 pb) jsou označeny šipkou.

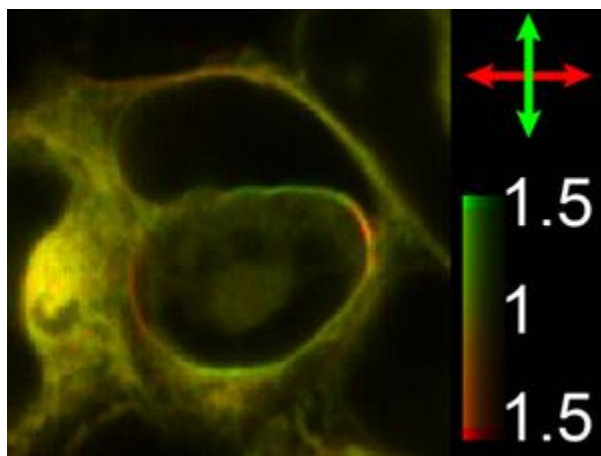
2) Příprava navržených konstruktů.

Sekvence vytvořených plasmidů ukázaly, že požadovaný plasmid pro G γ podjednotku (G γ 2-1-155-trunc-Venus) byl úspěšně vytvořen. Avšak při přípravě modifikované G β podjednotky (G β 1-156-239-trunc-Venus) se i přes vyvinuté úsilí plasmid s požadovanou sekvencí nukleotidů izolovat nepodařilo. Nejspíše zde docházelo k neúplnému spojení konců, a proto nebyla DNA cirkulována, nebo k opakované kontaminaci reakční směsi při transformaci plasmidu do bakteriálních buněk. Izolovaný modifikovaný plasmid pro G γ podjednotku byl dále zpracován.

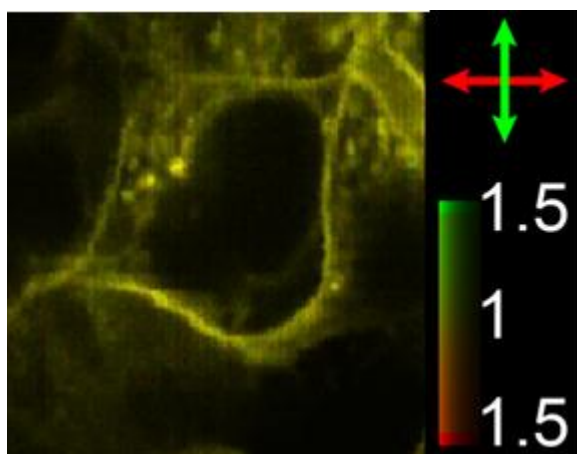
3) Zjištění schopností vytvořených konstruktů fungovat jako senzory aktivace G proteinů pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie.

Plasmidová DNA G γ podjednotky byla transfekcí vložena do eukaryotických buněk HEK 293 a pozorována pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie. Zjistilo se, že buňky transfekované tímto plasmidem vykazují lineární dichroismus (Obr. 8).

Obr. 12: Buňka HEK 293 transfekovaná plazmidy $G\alpha$ LAK(wt), $G\beta$ 1-156-239-Venus a $G\gamma$ -1-154-trunc-Venus. Je patrný slabý lineární dichroismus.



Obr. 13: Buňka HEK 293 transfekovaná původními plasmidy $G\alpha$ LAK(wt), $G\beta$ 1-156-239-Venus, $G\gamma$ -1-154-Venus. Lineární dichroismus se zde neobjevuje.



5. Diskuze

Sledování aktivace G proteinů je možné různými technikami in vitro nebo in vivo s možností použití fluorescentních proteinů. Avšak vhodnou metodou je i dvoufotonová polarizační mikroskopie, která se díky své nenáročnosti na pozorované konstrukty a přesnosti zjišťování orientace fluorescentních molekul vůči membráně jeví jako velmi výhodná.

Cílem této práce bylo vytvoření konstruktů, který je schopen fungovat jako univerzální senzor aktivace G proteinů. Kompletní modifikovaný konstrukt se zatím vytvořit nepodařilo, ale z dosavadních výsledků je zřejmé, že navržené a provedené úpravy mají vliv na orientaci přítomného fluorescentního proteinu. Lineární dichroismus, který byl naměřen při pozorování buněk HEK 293 transfekovaných plazmidem $G\gamma$ -1-154-trunc-Venus dokazuje rigidnější ukotvení fluorescentního proteinu, a proto lze předpokládat, že po izolování a připojení plasmidu $G\beta$ -155-239-trunc-Venus bude vytvořen funkční senzor aktivace G proteinů vykazující silný lineární dichroismus. Navržená cesta se proto jeví jako slibná, a pokračování v navrženém směru by mělo umožnit získání univerzální sondy aktivace G proteinové signalizace.

6. Závěr

Výsledkem práce je získání cíleně upraveného konstruktů podjednotky $G\gamma$. Tento konstrukt vykazuje z pohledu aplikací techniky 2PPM zlepšené vlastnosti, avšak zatím nemůže sloužit jako senzor aktivity G proteinů. Výsledky mé práce jsou však slibným základem pro budoucí pokračování tohoto výzkumu.

7. Seznam citované literatury

1. **ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.:** *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 482-630 s., ISBN 80-902906-2-0.11. (1998)
2. **MAĎA P., FONTANA J.**, Funkce buňek a lidského těla [online]. [cit. 27. 2. 2017]. Dostupné z:<http://fb.lt.cz/skripta/iii-bunecna-a-tkanova-signalizace/prehled-bunecne-a-tkanove-signalizace/>
3. **LAMBERT N. A.**, Dissociation of heterotrimeric g proteins in cells. *Sci Signal* 1(25), re5 (2008).
4. **NEUBIG R. R., SIDEROVSKI D. P.:** *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 187 (2002).
5. **VILARGADA J. P.:** *Methods Mol. Biol.* 756, 133 (2011).
6. **ETIENNE-MANNEVILLE S., HALL A.:** *Nature* 420, 629 (2002).
7. **RALL T. W.:** Formation and Degradation of Cyclic Nucleotides: An Overview v knize: 10. Cyclic Nucleotides, Part I: Biochemistry (Nathanson J. A. and Kebabian J. W. ed.), str. 3-16. Springer-Verlag, Berlin 1982.
8. **WILDOVÁ M., RUMLOVÁ V.** (2008) Metody studia vzájemných interakcí proteinů. *Chem. Listy* 102, 28-34 s.
9. **RIGAUT G., SCHEVCHENKO A., RUTZ B., WILM M., MANN M., SERAPHIN B.:** *Nat. Biotechnol.* 17, 1030 (1999).
10. **GOLEMIS E. A., ADAMS P.D.:** *Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbor Academic Press, Cold Spring Harbor, New York 2005.
11. **TERPE K.:** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 523 (2003).
12. **KURODA K., KATO, MIMA J., UEDA M.:** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 127 (2006)
13. **SHIMOMURA O., JOHNSON F. H., SAIGA Y.:** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59, 223-239. (1962).
14. **TSIEN, R.Y.:** The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, s. 509-544 (1998).
15. **PALMER, A.E. , et al.:** Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs . *Chemistry & Biology.*, 13, s. 521-530, (2006).

16. **ARAI R., NAKAGAWA H., TSUMOTO K., et al. ARAI R., NAKAGAWA H., TSUMOTO K., et al:** Demonstration of a homogeneous noncompetitive immunoassay based on bio luminescence resonance energy transfer. *Anal Biochem* 2001; 289(1): 77–81
17. **XIA Z., RAO J.:** Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(1): 37–44. doi: 10.1016/j.copbio.2009.01.001.
18. **BACART J., CORBEL c., JOCKERS R., et al:** The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* 2008; 3(3): 311–324. doi: 10.1002/biot.200700222
19. **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.
20. **LAZAR J., et al.** Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. Manuskript v druhém kole reviews, *Nature Methods*.
21. **ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J.:** *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 1. vydání. Str. 73, ISBN 80-210-3841-1.
22. **DIGBY G. J., LOBER R.M., SETHI P. R., LAMBERT N. A.:** Some G proteins heterotrimers physically dissociate in living cells, *PNAS*, 103(47), str. 17789-17794, (2006)