

## **Oponentský posudek disertační práce**

Advanced fluorescence techniques applied on biomolecules  
(lipid membranes and DNA)

Pokročilé fluorescenční metody aplikované ve výzkumu biomolekul  
(lipidových membrán a DNA)

**Autorka práce: Lenka Beranová**

Disertační práce se zabývá použitím specifických fluorescenčních technik v biofyzice. Konkrétní aplikace se týkají tří odlišných oblastí - detailního průběhu kondenzace DNA, vlivu oxidovaných fosfolipidů na membrány a chování fosfolipidové membrány v přítomnosti těžké vody. Práce je založena na pěti publikacích, z nichž tři se týkají výsledků výzkumů a dvě jsou rešeršní zabývající se experimentálními technikami.

V první části práce autorka vysvětluje principy fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) včetně jejích experimentálních odnoží (časově rozlišená FCS, Z-Scan FCS apod.) a metodu časově závislého posunu fluorescenčního spektra (TDFS).

V experimentální části se nejprve věnuje použití fluorescenční korelační spektroskopie při výzkumu kondenzace lineární lambda DNA (48,5 kbp). Autorka použila metodu nedávno vyvinutou v její skupině, specifickou modifikaci časově rozlišené FCS aplikovatelnou i v případě, kdy není znám časový průběh fluorescence všech fluoreskujících částic vzorku. Použitím této metody byla možné nahlédnout do procesu kondenzace na úrovni molekul. Kondenzace polykationtem sperminem probíhala procesem "all or non" (při určité koncentraci kondenzačního činidla byla část molekul úplně sbalená a část úplně nesbalená), oproti tomu při kondenzaci amfifilním cetyltrimethylamoniumbromidem se molekuly DNA sbalovaly postupně.

V oblasti výzkumu biologických membrán ovlivněných přítomností oxidovaných fosfolipidů popisuje autorka použití několika fluorescenčních metod. TDFS prokázala zvýšení hydratace a mobility membrány na specifickém místě v oblasti lipidových hlaviček, pokud byly do membrány přidány oxidované fosfolipidy se zkráceným řetězcem zakončeným polární skupinou. Také byla zkoumána laterální difuze lipidů pomocí Z-Scan FCS.

Poslední část se věnuje vlivu těžké vody na uspořádání fosfolipidové membrány. Metodou TDFS bylo ukázáno, že přítomnost těžké vody ovlivňuje vlastnosti membrány - v oblasti lipidových hlaviček způsobila snížení pohyblivosti molekul a také její hydratace. Výzkum byl doplněn

kalorimetrickým měřením, fluorescenční anizotropií a měřením laterální difuze dvojohňiskovou FCS.

Chtěl bych konstatovat, že předkládaná disertační práce obsahuje řadu cenných a nesporně originálních výsledků v oblasti membránové biofyziky, jejichž současný význam lze ocenit a budoucí význam spatřit jako vytváření exaktního základu pro porozumění funkce biologických membrán. Jedná se především o buněčnou neboli plasmatickou membránu která vyděluje buňku vzhledem k okolí a která obsahuje mnoho bílkovinných molekul zajišťujících informační komunikaci mezi buňkou a okolím. Příkladně, v oblasti výzkumu membránových receptorů spřažených s trimerními G proteiny (GPCR), byla již před řadou let prováděna měření funkční aktivity receptorů v těžké vodě. Jejich interpretace byla však nejednoznačná díky i) heterogenitě chemického složení lipidových molekul přítomných v biologické membráně a ii) různé míře „síly“ vazby ( $\Delta G$ ) na molekuly GPCR. Lipidy v biologické membráně existují nejen v „bulk membrane phase“, tedy kontinuu hydrofobní zóny membrány, ale jsou i pevně vázány na povrch (lipid annulus) a v nitru membránových bílkovin. Právě v dnešní době je význam této problematiky akcentován udělením Nobelovy ceny za Chemii v roce 2012 americkým vědcům R.J. Lefkowitzovi a B. Kobilkovi. Studie GPCR krystalů s vysokou mírou rozlišení (1.8 Å) ukazují na funkční význam molekul vody ( $H_2O$ ), cholesterolu a fosfolipidů které jsou pevně vázány ve struktuře GPCR (podrobná dokumentace viz. příloha - Liu a spol., 2012). Po vazbě hormonu dochází k vypuzení sodných iontů, které jsou v klidovém stavu pevně vázány v nitru vazebného místa pro hormon, dramatickému zmenšení pro vodu přístupného prostoru v molekule receptoru z 200Å na 70 Å a celkové změně konformace receptorové molekuly.

Podobné konstatování platí studium vlivu peroxidovaných lipidů, lipoperoxidací a poškození kyslíkatými radikály na membránově vázané enzymy, napříkladně Na,K-ATPasu (sodíkem a draslíkem aktivovaná, na hořečnatých iontech závislá adenosinetrifosfatáza, E.C. 3.6.1.3), která je vůči tomuto typu poškození velmi citlivá.

Vzhledem k výše uvedeným důvodům je možno jednoznačně prohlásit, že předkládaná práce odpovídá plně nárokům kladeným na doktorskou disertační práci a doporučuji ji k obhajobě.

Doc. RNDr Petr Svoboda, DrSc

Fyziologický ústav AV ČR

## Příloha

## Vyjmuto z práce Liu a spol. (2012)

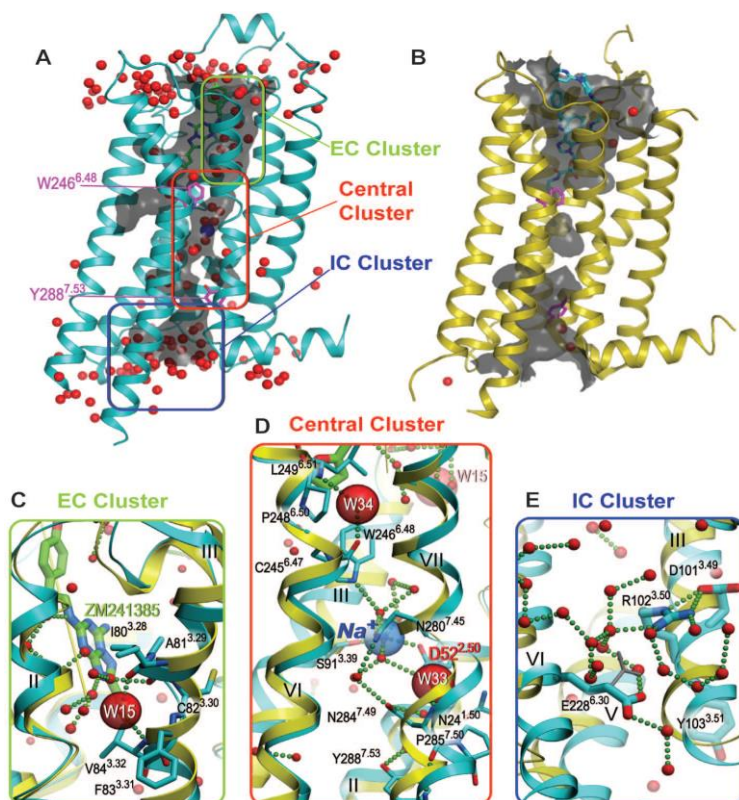
Wei Liu, Eugene Chun, Aaron A. Thompson, Pavel Chubukov, Fei Xu, Vsevolod Katritch, Gye Won Han, Christopher B. Roth, Laura H. Heitman, Adriaan P. IJzerman, Vadim Cherezov, Raymond C. Stevens (2012) Structural Basis for Allosteric Regulation of GPCRs by Sodium Ions. *Science* 337, 232-236

During the past 40 years, allosteric modulation by Na<sup>+</sup> has been observed for many GPCRs and was linked to motifs in helix II, including the highly conserved Asp2.50. Mutation of this residue has been the subject of many studies on a multitude of receptors; in the GPCR database (28), Asp 2.50 is mentioned more than 100 times for dozens of receptors of human origin and from other species. Asp2.50 has not been mutated in the A2AAR, but in the closely homologous A1 and A3 adenosine receptors, the Na<sup>+</sup> effect was largely abrogated when the residue was mutated to alanine or asparagine, respectively (29, 30). Despite this indirect evidence, the nature of Na<sup>+</sup> interactions with GPCRs remained hypothetical (31, 32), and the sodium ion remained undetected in crystal structures of GPCRs solved at medium resolution.

29. H. Barbhaiya, R. McClain, A. Ijzerman, S. A. Rivkees, *Mol. Pharmacol.* 50, 1635 (1996).

30. Z. G. Gao et al., *Mol. Pharmacol.* 63, 1021 (2003).

**Fig. 1** Struktura vazebného miesta pro sodné ionty a distribuce molekul vody (H<sub>2</sub>O) v nitru receptoru pro adenosin A<sub>2A</sub>AR

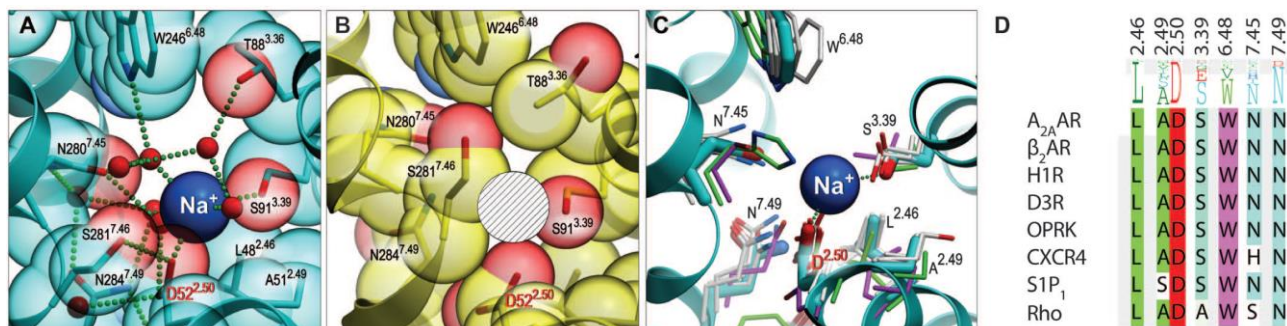


Distribution of ordered waters in A<sub>2A</sub>AR. In all panels, the antagonist-bound, high-resolution structure is shown in light blue, the agonist-bound structure in the active-like state is shown in yellow, waters are represented as small green spheres, and salt bridges and hydrogen bonds are depicted as small green spheres.

**(A)** Interior water molecules in the A<sub>2A</sub>AR structure form an almost continuous water channel [gray] containing three major water clusters. **(B)** The channel is disrupted in the structure in the active-like state. **(C)** Close-up view of the EC water cluster deep in the ligand-binding pocket. The water molecule W15 (shown as a large red semitransparent sphere) stabilizes the kink in helix III. I, Ile; A, Ala; C, Cys; V, Val; F, Phe. **(D)** Close-up view of the central cluster, which includes waters and a sodium ion (blue transparent sphere). Water molecules W34 and W33 stabilizing the proline-induced kinks in helices VI and VII are shown as large red semitransparent spheres. L, Leu; P, Pro; N, Asn; S, Ser. **(E)** Close-up view of the IC cluster around the D[E]RY motif in helix III.

Despite their close proximity, Arg1023.50 and Glu2286.30 do not form an ionic interaction; instead both amino acids form hydrogen bonds with neighboring waters.

In this high-resolution A<sub>2A</sub>AR structure, we were able to determine the precise location of Na<sup>+</sup>, as well as to resolve the complete network of **water molecules** around the sodium ion and conformations of all residues involved in direct or water-mediated coordination. The central water cluster harboring Na<sup>+</sup> is surrounded by and engaged in hydrogen bonding with several highly conserved residues, including Asn24 1.50, Asp52 2.50, Ser913.39, Trp246 6.48, Asn280 7.45, Asn284 7.49, and Tyr288 7.53 (**Fig. 2A**). Structural alignment of these residues from known GPCR structures reveals a well-preserved site capable of binding Na<sup>+</sup> along with several water molecules (**Fig. 2C and D**).



The central water cluster with Na<sup>+</sup> likely plays an important role in receptor activation. Comparison between the inactive and active-like states A<sub>2A</sub>AR suggests that, upon activation, the inward movement of helix VII in this **region collapses the pocket from 200 Å to 70 Å and shifts it toward helix VI (Fig. 2B)**. The resulting pocket in the active-like state can accommodate a maximum of three water molecules and does not provide sufficient coordination for Na<sup>+</sup>. This comparison suggests that high-affinity agonist binding and the presence of Na<sup>+</sup> in this site are mutually exclusive, which is consistent with the observed negative allosteric effects of Na<sup>+</sup> on binding of agonists (16, 20).

16. V.-P. Jaakola et al., *Science* 322, 1211 (2008)

20. F. Xu et al., *Science* 332, 322 (2011)

The 1.8 Å structure includes **23 ordered lipid chains and three cholesterols per receptor**. Together, they form an almost-complete lipid bilayer around each protein molecule, mediating crystal contacts. Lipids on the EC side have stronger electron densities and appear to be more ordered. All three cholesterols in this structure are bound to the EC half of the receptor and have low average B-factors (25 to 27 Å<sup>2</sup>) in comparison to other lipids (41 to 61 Å<sup>2</sup>). Two of these cholesterols (CLR1 and CLR3) are bound to symmetry-related receptors and mediate crystal-lattice packing by forming face-to-face interactions. The third cholesterol molecule (CLR2) does not participate in crystal contacts. Interestingly, CLR2 and CLR3 occupy hydrophobic grooves along helix VI and form extensive contacts with the aromatic ring of Phe2556.57, which is sandwiched between these cholesterol molecules (Fig. 4C and fig. S10). In the adenosine family of receptors, position 6.57 is conserved as Ile, Val, or Phe: hydrophobic residues that all could support the type of stacking interaction observed in this structure. In addition, CLR2 forms a hydrogen bond (2.7 Å) with the main-chain carboxyl of Ser263, and the hydroxyl of CLR3 has a polar interaction with sulfur of Cys259 (3.8 Å) in ECL3, the loop that is stabilized by the Cys259-Cys262 disulfide bond. Specific binding and conformational stabilization of this region of helix VI by cholesterols may play a functional role in A<sub>2A</sub>AR by fixing the position of Asn2536.55 in the ligand-binding pocket of the receptor. This key residue exists in all adenosine receptors and anchors the exocyclic amine of the ligand's central core in both agonist and antagonist complexes (20). Such direct cholesterol binding to A<sub>2A</sub>AR is also consistent with observations that addition of cholesterol hemisuccinate increases the thermostability of the receptor purified in detergent micelles.

Although most lipid chains form nonspecific hydrophobic contacts filling grooves on the protein surface, several interactions of lipids with A<sub>2A</sub>AR may be specific: for example, interactions between the lipids' polar groups and the main-chain and side-chain polar groups of ECL1 and ECL3. In addition, one lipid (OLA) intercalates inside the TM bundle between helices I and VII, thereby protruding into the

ligandbinding pocket. This lipid molecule apparently stabilizes the conformation of the first eight N-terminal residues of helix I, which do not make any direct contacts with the rest of the helical bundle.

It is intriguing to speculate that GPCRs are allosteric machines (35–37), controlled in part by ions like sodium, membrane components such as lipids and cholesterol, and also water molecules. Although this concept of allostery exceeds its common definition, with increased-resolution eukaryotic membrane protein structures and complementary biophysical studies, it seems likely that we will start to observe the control of membrane proteins, not only by pharmacological ligands, but also by endogenous small molecules at specific binding sites. The small molecules mentioned here can dramatically affect a protein's stability and function, which can have a pronounced effect on the physiological signaling of GPCRs in very important ways.