

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



Bc. Michaela Dvořáková

**Strukturně funkční studie N-koncové domény MP endocytického proteinu SGIP1**

*Structure-function study of N-terminal domain of protein SGIP1*

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Jaroslav Blahoš, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. MUDr. Jaroslava Blahoše, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, 8. 5. 2014

.....  
Bc. Michaela Dvořáková

## **Poděkování**

Děkuji Doc. MUDr. Jaroslavu Blahošovi, Ph. D., že mi umožnil podílet se na velmi zajímavém projektu, vždy mě ve všem podpořil a poskytoval mi různé možnosti, jak se něco nového naučit. Děkuji také svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., za cenné rady a pomoc. Dále děkuji RNDr. Pavlíně Řezáčkové, Ph. D., a jejímu týmu (zejména RNDr. Magdaléně Hořejší) za rady a pomoc týkající se přípravy proteinu pro krystalografii. Poděkování patří také celému kolektivu Oddělení molekulární farmakologie za to, že u nás v laboratoři vytváří příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i mé rodině, za neustálou podporu.

Tato práce vznikla na oddělení Molekulární farmakologie Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky v Praze. Byla finančně podpořena grantem GAČR P303/12/2408.

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
Abstrakt.....	9
Abstract.....	10
1 Úvod.....	11
1.1 Obezita .....	11
1.2 Kontrola příjmu potravy centrálním nervovým systémem.....	11
1.3 „Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“ (SGIP1).....	12
1.3.1 MP-doména proteinu SGIP1 .....	14
1.4 Endocytóza.....	15
1.4.1 Endocytóza zprostředkovaná klathrinem .....	16
1.4.2 Adaptorové proteiny.....	17
1.5 Vliv endocytózy na signalizaci .....	22
1.6 Endokanabinoidní signalizace.....	23
2 Cíl práce .....	28
3 Materiál a přístroje .....	29
3.1 Chemikálie .....	29
3.2 Pufry a roztoky .....	31
3.2.1 Agarosová elektroforéza, PCR, ligace a restriční pufry .....	31
3.2.2 Přečištění DNA („QIAquick Gel Extraction Kit“).....	31
3.2.3 Izolace DNA („Quiagen Plasmid Midi Kit“) .....	31
3.2.4 Izolace inkluzí, afinitní chromatografie a dialýza .....	32
3.2.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE), příprava a barvení gelů.....	32
3.2.6 Fluorescenční mikroskopie .....	32
3.3 Gely, standardy molekulových hmotností a matrice pro afinitní chromatografii.....	33
3.4 Kultivační média a reakční činidla pro transfekci.....	33
3.4.1 Kultivace bakterií .....	33
3.4.2 Kultivace lidských buněčných linií .....	34
3.4.3 Transfekce lidských buněčných linií.....	34

3.5	Oligonukleotidy.....	34
3.6	Použitá DNA .....	34
3.7	Restrikční endonukleasy a další enzymy.....	35
3.8	Bakteriální kmeny .....	35
3.9	Lidské buněčné linie.....	35
3.10	Přístroje .....	36
3.11	Ostatní materiál .....	37
3.12	Software .....	37
4	Metody .....	38
4.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA v roztoku.....	38
4.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu v roztoku .....	38
4.3	Horizontální agarosová elektroforéza .....	38
4.4	Polymerasová řetězová reakce („polymerase chain reaction“, PCR).....	38
4.5	Přečištění DNA .....	39
4.6	Štěpení restrikčními endonukleázami .....	39
4.7	Ligace.....	40
4.8	Transformace kompetentních bakterií Escherichia coli .....	40
4.9	Maloobjemová izolace DNA.....	40
4.10	Velkoobjemová izolace DNA .....	41
4.11	Uskladňování bakteriálních kultur (glycerolové stoky) .....	42
4.12	Sekvenování DNA.....	42
4.13	Expresce proteinu v bakteriích Escherichia coli .....	42
4.14	Izolace a purifikace proteinu za nativních podmínek.....	42
4.14.1	Izolace buněčného lyzátu .....	42
4.14.2	První afinitní chromatografie za nativních podmínek .....	43
4.14.3	První dialýza a štěpení proteasou TEV .....	43
4.14.4	Druhá afinitní chromatografie .....	43
4.14.5	Ošetření a uskladnění matrice Ni-NTA.....	43
4.14.6	Druhá dialýza .....	44
4.15	Izolace a purifikace proteinu za denaturačních podmínek .....	44
4.15.1	Izolace inkluzních tělísek .....	44
4.15.2	Izolace proteinu z inkluzních tělísek .....	44

4.15.3	Afinitní chromatografie za denaturačních podmínek .....	45
4.15.4	Renaturace proteinu.....	45
4.16	Vazba proteinů na liposomy in vitro .....	45
4.17	Zahuštění proteinového roztoku.....	45
4.18	Gelová permeační chromatografie .....	46
4.19	Kultivace lidských buněčných linií a manipulace s nimi .....	46
4.19.1	Rozmrazování buněk.....	46
4.19.2	Zamrazování buněk .....	46
4.19.3	Pasáž buněk.....	47
4.20	Fluorescenční mikroskopie .....	47
4.20.1	Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii .....	47
4.20.2	Snímání obrázků fluorescenčním mikroskopem .....	48
4.21	SDS-PAGE.....	49
4.21.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	49
4.21.2	Elektroforéza SDS-PAGE .....	49
4.22	Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant blue R 250.....	49
5	Výsledky .....	50
5.1	Příprava rekombinantních DNA.....	50
5.2	Expres MP-domény v bakteriích Escherichia coli .....	53
5.3	Purifikace MP-domény .....	54
5.4	Vazba MP-domény na liposomy in vitro .....	56
5.5	Gelová permeační chromatografie a analýza pomocí SDS-PAGE .....	58
5.6	Dimerizace MP-domény .....	60
5.7	Zahuštění proteinu.....	61
5.8	Vazba MP-domény do membrán in vivo .....	61
6	Diskuze.....	63
7	Závěr .....	66
8	Seznam použité literatury .....	67

## Seznam použitých zkratek

%obj.	objemová procenta
AEA	N-arašidonoylethanolamin
2-AG	2-arašidonoylglycerol
AP	adaptorový protein (z anglického „adaptor protein“)
APS	peroxodisíran amonný (z anglického „ammonium persulphate“)
ARH	z anglického „autosomal recessive hypercholesterolemia“
BAR	z anglického „Bin/amphiphysin/Rvs“
BSA	z anglického „hovězí sérový albumin“
CALM	z anglického „clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia“
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CB	kanabinoidní (z anglického „cannabinoid“)
Dab2	z anglického „disabled ( <i>Drosophila</i> ) homolog 2“
DABCO	1,4-Diazobicyklo[2.2.2]oktan
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMEM	médium pro kultivaci buněk „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DOC	deoxycholová kyselina
DTT	dithiothreitol
Eps15	z anglického „epidermal growth factor pathway substrate 15“
F-BAR	z anglického „Fer/Cip4 homology domain only-Bin/amphiphysin/Rvs“
FBS	fetální hovězí sérum (z anglického „fetal bovine serum“)
FCHO	z anglického „Fer/Cip4 homology domain only“
GPCR	receptor/y spřažené s G-proteiny (z anglického „G-protein coupled receptor/s“)
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buňek (z anglického „human embryonic kidney cells“)
HeLa	buněčná linie odvozená z maligního karcinomu děložního čípku
I-BAR	inverzní BAR doména
IMD	z anglického „IRSp53 and MIM (missing in metastases) homology domain“
IRSp53	z anglického „insulin receptor substrate p53“
MAPK	mitogeny-aktivovaná proteinkinasa

MP-doména	doména vázající fosfolipidy (z anglického „membrane phospholipid-binding domain“)
PBS	fosfátový pufr (z anglického „phosphate buffered saline“)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z anglického „polymerase chain reaction“)
PKA	proteinkinasa A
Rvs161/167	z anglického „reduced viability upon starvation 167/167“
SDS	dodecylsírán sodný (z anglického „sodium dodecylsulphate“)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (z anglického „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“)
SGIP1	z anglického „src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“
SH3	z anglického „src homology region 3“
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA (z anglického „Tris-acetate-EDTA“)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin (z anglického „tetramethylethylenediamine“)
TEV	z anglického „Tobacco etch virus“
tkH <sub>2</sub> O	voda pro tkáňové kultury
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan



## Abstrakt

Buňky spolu komunikují pomocí působků ovlivňujících aktivitu receptorů umístěných nitrobuněčně a nebo v buněčných (plazmatických) membránách. Tyto receptory rozeznávají rozličné ligandy a přenosem informací kontrolují nitrobuněčnou signalizaci a tím ovlivňují energetickou homeostázu, růst buňky, její vývoj, diferenciaci, migraci atd. Většina takových receptorů je dynamicky vyměňována mezi plazmatickou membránou a vnitřními endosomálními kompartmenty pomocí exo- a endocytózy. Nejlépe prozkoumána je endocytóza zprostředkovaná klathrinem.

V procesu endocytózy je zapojeno mnoho proteinů a důležitá je souhra mezi nimi. Existuje mnoho takzvaných adaptorových proteinů, které napomáhají správnému výběru „nákladu“ – molekul, které mají být staženy z povrchu dovnitř buňky. Některé molekuly se uplatňují při zakřivování membrány a následné tvorbě váčku nebo naopak mohou tvorbě váčku bránit. Mezi takové proteiny by se mohl řadit i protein „Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“ (SGIP1), který ovlivňuje kanabinoidní signalizaci pravděpodobně svým vlivem na endocytózu kanabinoidních receptorů. SGIP1 byl objeven poměrně nedávno při hledání genů zapojených do vzniku obezity. Prokázána byla jeho zvýšená hladina v hypothalamu obézních pískomilů a myši s injikovanými virálními částicemi kódujícími SGIP1.

Cílem této práce je odhalit strukturu a funkci N-terminální „membrane phospholipid-binding domain“ (MP-domény) proteinu SGIP1. Jde o doménu, kterou se tento protein odlišuje od jemu jinak velmi podobných proteinů „Fer/Cip4 homology domain only 1/2“ (FCHO1/2), o kterých je známo že se podílí na tvorbě váčků v raných stádiích endocytózy. U proteinů FCHO1/2 je ovšem intarekce s lipidickou membránou zajištěna tzv. „Bin/amphiphysin/Rvs“ (BAR) doménou, která je u proteinu SGIP1 nahrazena MP-doménou. Ta je pravděpodobně velmi důležitá při vazbě proteinu SGIP1 do membrány a je tedy nejspíš velmi důležitým článkem v mechanismu endocytózy, ve které je tento protein zapojen.

**Klíčová slova:** endocytóza, internalizace receptorů, regulace synaptické signalizace

## Abstract

The cells are communicating with each other using membrane-bound receptors. These receptors can recognize various ligands. Signalling via receptors allows the cell to control energy homeostasis, cell growth, differentiation, signalling and migration. Many of membrane-bound receptors are dynamically exchanged between plasma membrane and internal endosomal compartments by exo- and endocytosis. The most studied mechanism of endocytosis is clathrin-mediated endocytosis.

There are many proteins involved in the sophisticated endocytic machinery. So called adaptor proteins allow and/or facilitate proper selection of cargo, which should be internalized. Some of them help to curve the membrane and form a vesicle, some of them may have opposite effect. „Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“ (SGIP1) might fall in this category. This protein influences endocannabinoid signalling probably via its effect on cannabinoid receptors endocytosis. SGIP1 was recently identified as a gene involved in regulation of energy metabolism with overexpression leading to obesity.

The aim of this work is structural and functional analysis of SGIP1 membrane phospholipid-binding domain (MP-domain). This domain shares no sequence homology with any of known proteins. In this domain SGIP1 differs from „Fer/Cip4 homology domain only 1/2“ (FCHO1/2) proteins, which are otherwise highly homologous to SGIP1. MP-domain is important for binding SGIP1 to membrane. Therefore it could be a very important component of endocytosis provided by SGIP1. (In Czech)

**Key words:** endocytosis, receptor internalization, synaptic signalling regulation

# 1 Úvod

## 1.1 Obezita

Obezita je jedním z hlavních zdravotních problémů lidstva tohoto století. Za poslední dobu dramaticky stoupl počet obézních lidí<sup>1</sup>. Dle Světové Zdravotnické Organizace („World Health Organization“) je na světě více než 1 miliarda dospělých s nadváhou<sup>2</sup>. Tato epidemie se vztahuje ke změnám v životním stylu – stravovací návyky se posunují ve směru vyšší konzumace jídla s vysokým obsahem tuků a sacharidů a zároveň se velmi snižuje fyzická aktivita<sup>1, 3-5</sup>. Obezita je úzce spojována se zvýšenými riziky chronických onemocnění včetně kardiovaskulárních chorob, hypertenze a diabetu typu 2 (tzv. metabolický syndrom)<sup>6, 7</sup>.

Nadváha a obezita vznikají díky ukládání nadbytečných kalorií ve formě tělesného tuku následkem dlouhodobě trvající nerovnováhy mezi příjmem potravy (konzumovanými kaloriemi) a výdejem energie<sup>8, 9</sup>. Současná věda věnuje velké úsilí studiu příčin této nemoci.

V poslední době byly objeveny některé mutace způsobující obezitu. Tyto bodové mutace narušující hypothalamickou regulaci metabolismu mohou způsobovat závažné monogenní formy obezity<sup>10</sup>. Byly však nalezeny jen u velmi malého procenta obézních lidí a obezita jimi způsobená je poměrně vzácná<sup>11</sup>. Běžná obezita je geneticky mnohem komplikovanější. Zásadní podstata této choroby ještě nebyla na molekulární úrovni objasněna a ještě mnoho doposud neidentifikovaných genů je pravděpodobně zapojeno do hypothalamické kontroly energetické rovnováhy.

Přestože k plnému propuknutí této choroby je zapotřebí dlouhodobého narušení energetické rovnováhy, existuje velmi široká individuální variabilita v predispozicích pro zvyšování tělesné váhy. Nynější epidemie obezity je tedy nejspíše výsledkem souhry mezi multigenetickými, behaviorálními a environmentálními faktory<sup>12, 13</sup>.

## 1.2 Kontrola příjmu potravy centrálním nervovým systémem

Příjem potravy je vysoce regulovaný u všech živočichů, ale může být ovlivněn řadou faktorů jako je individuální aktivita, rozložení příjmu energie v čase, stres a podobně<sup>14</sup>. V důsledku toho je denní příjem energie proměnný a ne vždy koreluje s výdejem energie. Dlouhodobě jsou

však tyto nerovnosti mezi výdejem a příjmem sníženy procesy zodpovídajícími za udržení energetické homeostázy.

Srovnáváním myších mutací s mutacemi lidskými byly objeveny monogenní formy obezity (viz výše)<sup>15-18</sup>. Tyto monogenní formy jsou vzácné, ale právě díky nim se prokázala jistá podobnost v organizaci systému regulujícím hmotnost u studovaných savců. Vznikly tak i nové cíle pro léčbu obezity.

Známo je několik signálních molekul, které ovlivňují příjem potravy a jsou tedy důležité pro energetickou rovnováhu v těle. Energetická rovnováha je udržována například pomocí signálů vznikajících během jídla<sup>14</sup>. Mezi tyto signály patří peptidy uvolňované z gastrointestinálního traktu, které poskytují mozku informace vedoucí k potlačení nebo ukončení příjmu potravy.

Prvním hormonálním signálem, který byl spojen s kontrolou tělesné váhy centrálním nervovým systémem, je insulin<sup>19</sup>. Jde o pankreatický hormon, který vstupuje do krevního řečiště a do mozku, kde potlačuje příjem energie. Jedním z dalších hormonů ovlivňujících příjem potravy je leptin uvolňovaný z adipocytů<sup>20</sup>. Mutace v genu pro leptin způsobuje přejídání a následnou obezitu u myších modelů obezity<sup>21</sup>.

Mozek shromažďuje veškeré signály pocházející z periferních orgánů a řídí dle nich další metabolické funkce. Hlavním centrem pro regulaci energetické rovnováhy v mozku je hypothalamus. Zpracovává mnoho signálů z periferních systémů a vydává pokyny pro změny v energetickém výdeji a příjmu<sup>14, 22</sup>. Jako výsledek zůstává hmotnost většiny lidí po velkou dobu jejich života relativně stálá<sup>8</sup>.

Určení hypothalamu jako hlavního centra regulace energetického příjmu a výdeje vedlo k tomu, že klíčové molekuly zapojené v kontrole příjmu potravy jsou hledány právě v této části mozku.

### **1.3 „Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“ (SGIP1)**

Pro hledání nových genů důležitých pro vývoj obezity byl použit polygenní zvířecí model obezity, insulinové rezistence a diabetu typu 2 pískomil tlustý (*Psammomys obesus*)<sup>23</sup>. Pískomil tlustý (nazývaný také jako Izraelská pouštní myš) žije přirozeně v pouštních oblastech středního východu, kde se živí převážně nepříliš výživnou lebedou z čeledi laskavcovitých a zůstává štíhlý a s ideální hladinou glukosy v krvi<sup>24</sup>. Pokud je ovšem tento pískomil krměn

*ad libitum* stravou, která je běžná pro jiné hlodavce, vyvíjí se u něj spontánně metabolický fenotyp, který odráží celou škálu syndromů pozorovaných před rozvinutím obezity a diabetu typu 2 u pacientů<sup>25</sup>.

Poznatky o roli hypothalamu v regulaci příjmu potravy a vyhodnocení příjmu tlustého jako vhodného modelu obezity vedly ke klíčovému experimentu. Porovnáním exprese hypothalamické mRNA u obézního pískomila tlustého a pískomila s normální tělesnou hmotností se zjistilo, že jeden transkript mRNA je výrazně více exprimován u obézních jedinců<sup>23</sup>. Tomuto transkriptu odpovídá do té doby nepopsaný protein SGIP1. Zvýšená exprese proteinu SGIP1 byla sledována i u dalších modelů obezity a diabetu typu 2<sup>23</sup>. Takovýmto modelem je i myš „lethal yellow agouti“, u které se vyvíjí obezita a diabetes typu 2 díky mutaci způsobující nadměrnou ektopickou expresí proteinu „agouti“. Hladina mRNA kódující protein SGIP1 je u těchto zvířat krmených *ad libitum* zvýšena. Zvýšená hypothalamická exprese genu pro SGIP1 je tedy společným znakem v několika odlišných modelech obezity u hlodavců.

Dle posledních výzkumů se mRNA kódující protein SGIP1 vyskytuje téměř výhradně v mozku<sup>23</sup>. Taková lokalizace poukazuje na to, že jde o protein regulační. V rámci mozku se SGIP1 vyskytuje difuzně.

Endogenní protein SGIP1 je fyziologickým stimulem pro příjem potravy<sup>23</sup>. To potvrzuje i fakt, že snížení hladiny hypothalamické mRNA pro SGIP1 u pískomila tlustého vede ke sníženému příjmu potravy a následnému poklesu tělesné váhy. Podobné výsledky byly získány také u potkanů, nejde tedy o jev typický jen pro pískomily. Hladina mRNA pro SGIP1 je zvýšena také u hladovějících potkanů. Fyziologickou rolí proteinu SGIP1 je podpora pozitivní energetické bilance a přibývání na váze v neuronálních systémech hypothalamu.

Lidský protein SGIP1 čítající 828 AMK je z 94% totožný se svým ortologem z pískomila tlustého (827 AMK)<sup>23</sup>. U myši má tento protein 806 AMK. Nalezena byla i jeho delší sestřihová varianta tvořena 854 AMK, která je označována jako SGIP1 $\alpha$ <sup>26</sup>.

I v kvasinkách byl nalezen protein odpovídající proteinu SGIP1<sup>27</sup>. Jde o protein Syp1p, který má velmi podobné rozložení domén jako protein SGIP1 nebo „Fer/Cip4 homology domain only protein 1/2“ (FCHO1/2), a má zřejmě stejnou funkci jako tyto proteiny v mnohobuněčných živočiších. Jde o proteiny zapojené do mechanismu endocytózy zprostředkované klathrinem. Protein Syp1p interaguje s dalším kvasinkovým endocytickým proteinem Ede1p, což je

homolog proteinu „epidermal growth factor pathway substrate 15“ (Eps15, interakční partner proteinu SGIP1).



*Obr. 1 Předpokládané doménové rozložení delší sestřihové varianty proteinu SGIP1 $\alpha$  (*Mus musculus*). Prvních 97 AMK tvoří MP-doménu. Střední část s vysokým počtem prolinů je označována jako doména bohatá na prolin (Polyprolinová doména). Lidský SGIP1 má celkem 854 AMK. Upraveno dle<sup>26</sup>.*

Rozložení jednotlivých domén proteinu SGIP1 $\alpha$  je znázorněno na obr. 1. Protein SGIP1 je charakteristický poměrně vysokou četností prolinů (13%)<sup>23</sup>. Proliny jsou soustředěny především ve střední části proteinu. Tato doména bohatá na proliny obsahuje velké množství potencionálních vazebných míst pro domény „src homology region 3“ (SH3) a WW-domény a poskytuje tak možnost protein-proteinových interakcí. Polyprolinová doména se podílí i na interakci proteinu SGIP1 s endofilinem-3 a 1<sup>23</sup>. Endofiliny jsou důležitými regulátory endocytózy zprostředkované klathrinem<sup>28</sup>. Účastní se recyklace synaptických váček<sup>29, 30</sup> a internalizace receptorů jako součást velkého komplexu proteinů spolu se synaptojaninem<sup>31, 32</sup>, amfifysinem<sup>33</sup> a dynaminem. Způsob, jakým SGIP1 přesně ovlivňuje energetickou homeostázu, není zatím zcela prostudován, s velkou pravděpodobností ale SGIP1 ovlivňuje signalizaci receptorů v nervovém systému svou interakcí s endofiliny<sup>23</sup> a ovlivněním endocytózy zprostředkované klathrinem.

### 1.3.1 MP-doména proteinu SGIP1

Krom typické polyprolinové domény, zajímavé zejména z hlediska protein-proteinových interakcí, má SGIP1 ještě další doménu – N-koncovou „membrane phospholipid-binding domain“ (MP-doménu). Kde přesně v sekvenci proteinu SGIP1 MP-doména končí není zatím známo. Literatura se na toto téma poněkud rozchází. Zatímco jeden článek uvádí, že MP-doména je dlouhá 97 AMK<sup>26</sup>, jiný zase popisuje MP-doménu s 239 AMK<sup>34</sup>.

MP-doména proteinu SGIP1 je zodpovědná za vazbu membrán a jejich tubulaci<sup>26</sup>. Díky této vlastnosti byla doména nazvána jako doména vážící fosfolipidy membrán. Tato doména

postrádá jakoukoli sekvenční homologii s proteiny, které nám jsou doposud známy. Jisté vlastnosti má však MP-doména podobné vlastnostem domén „BIN („bridging interactor“)/amphiphysin/Rvs („reduced viability upon starvation““ (BAR) a „Fer/Cip4 homology domain only-Bin/amphiphysin/Rvs“ (F-BAR) proteinů FCHO1/2<sup>35-40</sup>. První z těchto vlastností je, že ani jedna z těchto domén nevykazuje přílišnou specifitu ve vazbě derivátů fosfoinositolu. Váží se relativně nespecificky ke všem negativně nabitým fosfolipidům. Další společnou vlastností těchto domén je oligomerizace<sup>41</sup>. Je prokázáno, že oligomerizace domén BAR a EFC je důležitá pro tubulaci membrán<sup>35, 37, 40</sup>. Doména BAR může zakřivovat membrány, aby se následně mohly tvořit endocytické váčky<sup>36, 39</sup>. MP-doména je taktéž schopna deformovat membrány a účastnit se tak tvorby váček během endocytózy<sup>26</sup>. Trojrozměrné struktury zástupců BAR a EFC domén jsou již známy a je z nich také odvozována jejich funkce<sup>36, 42, 43</sup>. Struktura MP-domény však ještě známa není.

Deformace membrán nejspíš ale nebude jedinou rolí proteinu SGIP1 během endocytózy. Důležitá bude i jeho interakce s dalšími adaptorovými proteiny (AP) endocytózy zprostředkované klathrinem Eps15, komplexem AP-2 a dalšími.

## 1.4 Endocytóza

Buněčné membrány jsou velmi dynamické útvary, které se mohou ohýbat, dělit se nebo se spojovat podle toho, jaký osud čeká buňku. Buňka však dokáže upravovat také například proteinové složení membrán. Jedním nástrojem, který může buňka využít k remodelaci membrán, je endocytóza. Endocytóza, proces využívaný všemi eukaryotními organismy, je charakterizována jako děj, při kterém jsou internalizovány (jinými slovy staženy) molekuly z buněčného povrchu do vnitrobuněčných membránových kompartmentů<sup>44</sup>. Endocytóza je nezbytná pro existenci organismu, jelikož je důležitá pro regulaci mnoha aktivit probíhajících na buněčné membráně<sup>44</sup>. Má nespočet funkcí, mezi které se řadí: regulace povrchové exprese proteinů jejich odstraněním z povrchu buňky, přívod živin do buňky, kontrola aktivace signálních drah, obnova proteinů na povrchu membrány, změna složení membránových proteinů odesláním jednotlivých složek k degradaci v lysosomech a další. Endocytóza však není využívána jen pro fyziologické procesy, ale díky ní se do buněk dostávají i některé bakterie a viry.

Jejím hlavním principem je vchlípení membrán a následná tvorba intracelulárních váčků<sup>45</sup>. Může být spuštěna vazbou ligandu na receptory, ale může také být konstitutivní. Endocytovaný náklad je v buňce dále tříděn do endosomů nebo odeslán zpět na buněčný povrch. Endocytóza může probíhat tzv. klasickým způsobem – zprostředkováním klathrinem, ale také dalšími, méně obvyklými, způsoby nezávislymi na klathrinu<sup>46-49</sup>.

### 1.4.1 Endocytóza zprostředkovaná klathrinem

Klathrinem zprostředkovaná endocytóza umožňuje vstup nákladu do buňky přes plazmatickou membránu ve formě vesikulu s klathrinovým obalem<sup>45</sup>. Váčky obalené klathrinem se vyskytují téměř ve všech buňkách od buněk kvasinek po buňky lidské<sup>46</sup>. Endocytóza zprostředkovaná klathrinem se účastní nejen běžného vychytávání membrán a živin, ale také internalizace některých receptorů, kanálů a transportérů<sup>50</sup>. Je to zatím nejlépe prostudovaná endocytická dráha.

Klathrin se neváže přímo ani na membránu ani na receptory nákladu, a proto jsou potřeba cytoplazmatické adaptorové proteiny a komplexy<sup>44</sup>. Vazba klathrinu na plazmatickou membránu je zprostředkována adaptorovými proteiny interagujícími se specializovanými cytoplazmatickými motivy transmembránových proteinů a s fosfolipidy (viz kapitola 1.4.2)<sup>41, 51, 52</sup>.

Tvorba klathrinového vesikulu má několik stádií: iniciace, nukleace, propagace – tvorba klathrinové sítě, kompletace sítě a odškrcení váčku, transport váčku dále do buňky, odstranění klathrinového obalu z váčku<sup>45, 46</sup>. Celý tento cyklus probíhá velmi rychle – do jedné minuty. Iniciační fáze endocytózy zahrnuje tvorbu nukleačního modulu s adaptorovými proteiny, který určuje, v kterých místech membrány se bude klathrin hromadit a kde se budou tvořit vesikuly. Samotná nukleace (iniciace tvorby obaleného váčku) je nejspíš spuštěna navázáním adaptorového proteinu na membránu. Nukleační modul obsahuje proteiny FCHO1/2, Eps15 a intersticiny<sup>45</sup>. Deplece těchto proteinů inhibuje vznik klathrinových váčků. Například domény F-BAR proteinů FCHO1/2 se váží na zakřivenou membránu a jejich schopnost ohýbat membránu je důležitá pro tvorbu klathrinových váčků.

Po výběru nákladu a iniciaci tvorby prohlubně/váčku („pit“) začnou polymerizovat klathrinová triskelia díky antiparalelním interakcím jednotlivých nožiček<sup>46</sup>. Triskelia jsou základními jednotkami klathrinové sítě<sup>53</sup>. Každý triskelion je složen ze tří těžkých řetězců



klathrinu a tří lehkých řetězců klathrinu. N-koncové domény těžkých řetězců („nožičky“) jsou tvořeny pravotočivými superhelixy, které tvoří rohy klathrinové sítě<sup>54</sup>. Polymerizující triskelia se skládají do sítí na cytoplazmatické straně membrány složených z pěti- a šestiúhelníků tvořených molekulami klathrinu.

Tvorbu klathrinového obalu doprovází rozsáhlá komplexní síť interakcí, která kontroluje a upravuje tvorbu klathrinové sítě. Na každé N-koncové doméně klathrinu je  $\beta$ -otáčka, která se váže na peptidové motivy mezi jednotlivými „lopatkami“ dalších  $\beta$ -otáček<sup>55</sup>. Četné „lopatky“  $\beta$ -otáček poskytují místo pro různé další protein-proteinové interakce. Tím je umožněna potenciální vazba mnoha různých adaptorových proteinů, na kterých je závislý výběr nákladu, a proteinů vážících membrány<sup>56-60</sup>.

## 1.4.2 Adaptorové proteiny

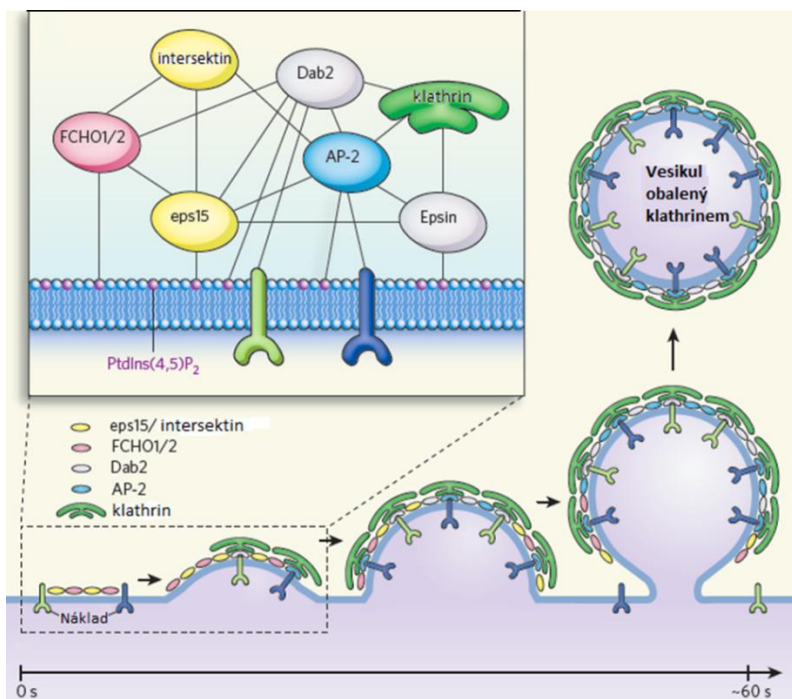
Adaptorovým proteinem nazýváme takovou bílkovinu, která propojuje klathrinovou strukturu (lešení) s komponenty membrány, což mohou být fosfolipidy, transmembránové proteiny (potenciální náklad) nebo obojí najednou<sup>61</sup>. Adaptorových proteinů je velký počet (nejméně 20 různých proteinů<sup>41</sup>), který tak odpovídá rozmanitosti endocytovaných nákladů<sup>45</sup>. Zprostředkovávají selektivní vchlípení proteinů vázaných v membráně. Při jejich vysoké rozmanitosti si ale zachovávají podobné strukturní rozložení – obsahují kompaktní složené domény a dlouhé nestrukturované úseky, kterými se vážou na N-koncové domény klathrinu a také na sebe navzájem<sup>61</sup>. Takové protein-proteinové interakce velmi často zprostředkovávají krátké lineární motivy, které interagují se složenými doménami.

Hlavními adaptorovými proteiny jsou AP-komplexy (AP1 a AP2)<sup>62-64</sup>. Jejich název pocházel původně ze zkrácení slov „assembly polypeptides“, protože podněcují skládání purifikovaných klathrinových triskelií do klathrinových plášťů<sup>61</sup>. Dnes se však zkratka AP popisující tentýž protein používá spíše pro zkrácení slov „adaptor protein“, jelikož AP-komplexy fungují jako adaptory/spojky mezi membránou a klathrinem. Adaptorový komplex AP-2 se skládá z adaptinů  $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\sigma$ 2 a  $\mu$ 2 a doplňují ho další adaptorové proteiny, které regulují tvorbu váčku a jeho proteinové složení, jako je amfifysin,  $\beta$ -arrestin, epsin a Eps15<sup>41, 51, 52</sup>. Tyto adaptorové proteiny mohou také interagovat spolu navzájem a s dalšími komponenty endocytózy zprostředkované klathrinem (např. dynamin). Vazba adaptorových proteinů na membránu způsobuje její zakřivení a následnou tvorbu obaleného váčku („coated pit“)<sup>50</sup>. Tato vazba může

být zprostředkována endocytickými motivy na cytoplazmatických koncích receptorů nebo vazbou na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, který je lipidem specifickým pro plazmatickou membránu.

Adaptorové komplexy mají domény nazývané „ears“ nebo „appendages“. Pomocí flexibilní spojky jsou tyto domény adaptorových komplexů připevněny k hlavnímu jádru AP-komplexu<sup>44</sup>. Výše uvedené domény váží a sdružují proteiny potřebné k polymeraci klathrinu a vchlípení nascentního vesikulu. Komplexy AP-2 vážou také epsin 1, který je zapojen v řízení ohýbání membrány a napomáhá při spuštění polymerace klathrinu<sup>59</sup>. Proteiny interagující s doménami „appendage“ mají krátké peptidové motivy postrádající sekundární strukturu (tzv. „motif domains“), kterými je zprostředkována zmíněná protein-proteinová interakce. Tyto vazebné motivy se vyskytují hned v několika kopiích. Nestruturovaná povaha motivů velmi zvyšuje pravděpodobnost nalezení interakčního partnera. Mnohočetné kopie vazebných motivů adaptorových proteinů a jejich nízká afinita naznačují, že vazební partneři se váží snáze k adaptorovým komplexům, když jsou koncentrovány polymerizací klathrinu. Tvoří se tak velmi komplexní síť proteinů spojených slabými protein-proteinovými interakcemi (viz obr. 2, str. 19). Síla těchto interakcí není příliš velká ( $K_d = 1-100 \mu\text{M}$ ) a poločas jejich života je relativně krátký ( $t_{1/2} = 1-10 \text{ s}$ ). Pokud není klathrinová klec/síť složena a adaptorové proteiny jsou rozptýleny, tyto nízkoafinitní interakce se rozpadají<sup>44</sup>.

Endocytóza tedy jistě není jednoduchým dějem vyžadujícím pouze jeden efektorový protein. K vytvoření váčku je potřeba mnoha proteinů a protein-proteinových interakcí, které navíc musí proběhnout synchronizovaně ve velmi malém časovém úseku.



**Obr. 2 Znárodnění protein-proteinových interakcí při tvorbě váčku obaleného klathrinem.** Tvorbu klathrinového váčku iniciují malé shluky proteinů FCHO1/2. Přibližně ve stejnou dobu se přidávají proteiny eps15 a intersektin. Po navázání Dab2, AP-2 a klathrinu se začíná tvořit váček. Váček je následně vchlípen dovnitř buňky a odškrcen jako vesikul obalený klathrinem. Během jedné minuty je celý proces od iniciace až uvolnění odškrceného váčku kompletní. Upraveno dle<sup>65</sup>.

Některé z proteinů asociovaných s klathrinem mohou měnit tvar membrány anebo slouží jako senzory zakřivení membrán<sup>66</sup>. Hrají tak společně s dynaminem podstatnou roli při stabilizaci a dalším vchlípení membrán a oddělení vesikulu obaleného klathrinem<sup>50</sup>. Zakřivení může být způsobeno tvorbou asymetrií mezi dvěma vrstvami membrány, které jsou ovlivněny proteinovými adaptory vážícími se přímo nebo nepřímo na membránu. Některé z nich přímo interagují s deriváty fosfatidylinositolu v membráně svými doménami vážícími fosfolipidy. Takovou doménou je například u amfifysinu doména BAR<sup>37</sup>. Změny tvaru membrány mohou způsobovat také cytoskeletární elementy.

Mechanismy deformace membrán jsou různé. Jisté endocytické proteiny mají amfipatické helixy, které částečně pronikají do cytosolární vrstvy membrány a způsobují tak asymetrii. Jiné mají zakřivenou doménu vážící lipidy jako je třeba doména BAR, která tvoří konkávní pozitivně nabitě homo nebo heterodimery vážící se na negativně nabitý povrch membrány,

který je nucen kopírovat tvar této domény. Další proteiny způsobují změny ve tvaru membrány nepřímo působením na aktinová vlákna.

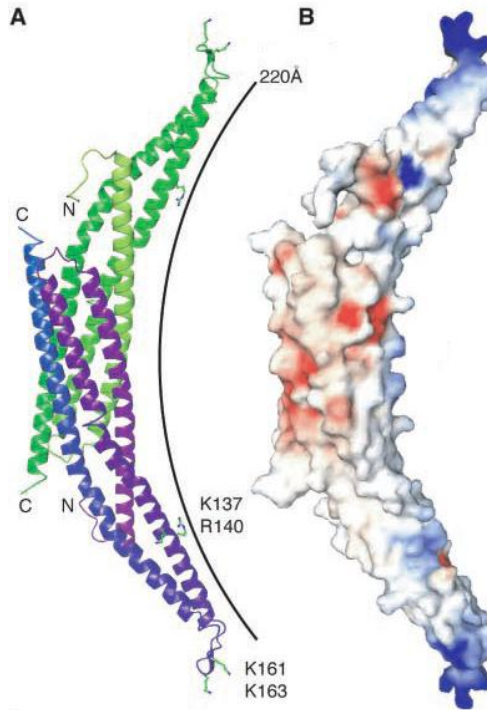
Důležité jsou také proteiny, které dokáží „vycítit“ zakřivení membrány (tzv. „membrane curvature sensing proteins“)<sup>66</sup>. Takové proteiny se váží mnohem efektivněji k membráně, která je alespoň částečně deformovaná. Zakřívování membrán a „vycítění“ zakřivených membrán je velmi těžké od sebe oddělovat<sup>67</sup>. Malé deformace způsobené jedním proteinem vyvolají vazbu dalších takových proteinů a vytvoří se tak pozitivně zpětnovazebný cyklus, kterým je vyvolána rozsáhlejší změna tvaru membrány membrány.

Interakce adaptorových proteinů s membránami se dá pozorovat také *in vitro*. Některé adaptorové proteiny (např. epsin a amfifysin) se *in vitro* přímo váží na liposomy a deformují je v tubuly<sup>35, 36, 52, 59</sup>.

### 1.4.2.1 Adaptorové proteiny s doménou BAR

Tyto proteiny mající ve své struktuře doménu BAR spadají do třídy cytosolárních proteinů se schopností deformovat membrány. Mohou zakřívovat membrány *de novo*, stabilizovat tvary vytvořené jinými silami nebo detekovat zakřivení a dopravovat cytosolární faktory k místům, kde má membrána definovaný tvar<sup>67</sup>. Jejich další doména – SH3 zajišťuje interakce s dalšími proteiny, především s dynaminem a synaptojaninem<sup>37</sup>.

Doména BAR je N-koncová doména bohatá na  $\alpha$ -helixy<sup>68</sup>. Jde o doménu, která je konzervovaná od kvasinek po savce. Je součástí proteinu amfifysinu u obratlovců a kvasinkového proteinu „reduced viability upon starvation 167/167“ (Rvs161/167)<sup>69</sup>. Struktura dimerní BAR domény amfifysinu byla vyřešena již v roce 2004 (viz obr. 3, str. 21)<sup>36</sup>. Doména BAR má tvar banánu s pozitivně nabitým konkávním povrchem. Každý monomer má strukturu superšroubovice („coiled-coil“) složené ze zalomených  $\alpha$ -šroubovic. Zakřivení celého dimeru je způsobeno částečně díky způsobu, jakým se monomery protínají a částečně díky ohybu ve šroubovicích 2 a 3. Rozhraní mezi monomery je velmi hydrofobní. Pozitivně nabitý povrch se účastní interakce s fosfolipidy plazmatické membrány. Předpokládaným mechanismem, kterým doména BAR mění tvar membrán je přímá interakce s membránou a protein-proteinové interakce v rámci dimeru.



**Obr. 3** *Struktura domény BAR proteinu amfifysinu z *Drosophily*. A- stužkový model antiparalelního homodimeru. Jednotlivé monomery jsou značeny zeleně a fialově. Vyznačeny jsou aminokyseliny důležité pro tvorbu pozitivně nabitého povrchu. B- Model povrchového elektrostatického potenciálu (červená -10 kTe, modrá +10 kTe). Upraveno dle<sup>36</sup>.*

Amfifysiny jsou proteiny, které se hojně nalézají v savčím mozku a účastní se endocytózy synaptických váčků<sup>36</sup>. Váží klathrin, komplex adaptorových proteinů 2, dynamin a synaptojanin. Jediným konzervovaným prvkem amfifysinů je právě doména BAR.

Doménu BAR mají ve své struktuře také proteiny z rodiny FCHO1/2<sup>70</sup>. Je pro ně typická doména F-BAR. Domény BAR a F-BAR obecně stabilizují nebo indukují tvorbu zakřivení membrán. Na rozdíl od BAR domén, které preferují vysoce zakřivené membrány, domény F-BAR obvykle stabilizují membránové struktury s větším průměrem<sup>37, 71, 72</sup>.

Kromě N-terminálních domén jsou proteiny FCHO1/2 a SGIP1 $\alpha$  vysoce homologní<sup>73</sup>. FCHO1/2 obsahují F-BAR doménu vážící lipidy, zatímco N-terminální sekvence SGIP1 $\alpha$  tvoří tzv. MP-doménu, jejíž struktura není známa. Tato doména váže především fosfatidylserin a deriváty fosfatidylinositolu a deformuje membrány a liposomy do tvaru úzkých tubulů. Proteiny FCHO1/2 se účastní mnoha procesů, které jsou závislé na zakřivení membrán. Podílí se na tvorbě organel, membránovém transportu, buněčném dělení a buněčné migraci<sup>67</sup>. Krom

N-koncové domény vážící fosfolipidy mají tyto proteiny také doménu SH3, která je tak zapojuje do složitého komplexu protein-proteinových interakcí. Doménu F-BAR má také další rodina eukaryotních proteinů – paksiny<sup>74</sup>.

Poslední členem superrodiny BAR domén je doména „IRSp53-MIM (missing in metastases) homology domain“ (IMD) nazývaná také jako inverzní BAR-doména (I-BAR)<sup>75-77</sup>. Struktura této domény je velmi podobná struktuře klasických domén BAR. Doména I-BAR taktéž tvoří tři  $\alpha$ -helixy, které ochotně dimerizují<sup>78</sup>. Dimer ale není tolik zahnutý jako dimer domén BAR. Zajímavou vlastností proteinu s doménou I-BAR – IRSp53 (insulin receptor substrate p53) je to, že ektopická exprese tohoto proteinu v buňce vede k tvorbě filopodií. Zatímco domény BAR způsobují tvorbu membránových vchlípenin, domény I-BAR pracují zcela opačně a indukují tvorbu vychlípenin.

Společným znakem všech rodin domén BAR je jejich dimerizace v pozitivně nabitě dimerní útvary. Proteiny obsahující domény BAR a F-BAR jsou kódovány v klastrech eukaryotického genomu<sup>74</sup>. Zatím není znám funkční význam takové komplexity. Studium molekulárních mechanismů funkce těchto proteinů by mělo osvětlit jejich roli v membránovém transportu a endocytóze.

Ačkoliv MP-doména nesdílí sekvenční homologii s doménami BAR, je možné, že její struktura by se mohla podobat struktuře těchto domén, alespoň co se týká obsahu  $\alpha$ -helixů.

## 1.5 Vliv endocytózy na signalizaci

K udržení rychlé komunikace mezi neurony je zapotřebí na presynaptické membráně recyklovat váčky, z nichž se uvolňují neurotransmitery<sup>79</sup>. Synaptické váčky jsou základní jednotkou rychlé komunikace mezi neurony. Většina synaptických zakončení v mozku neobsahuje více než 100 až 200 těchto váček, takže udržení komunikace mezi neurony je závislé na jejich recyklaci z buněčného povrchu ihned po jejich vylití<sup>80, 81</sup>. Na nervových zakončeních se vyvinul výkonný endocytický mechanismus, jakým lze synaptické membrány znovu zachytit a připravit k opětovnému použití<sup>66</sup>. Časový průběh endocytózy se liší na různých synapsích a liší se také v závislosti na intenzitě stimulace. Mechanismus, jakým k obnově váček dochází, není zatím zcela objasněn. Endocytóza probíhající v buňkách mimo nervový systém je poměrně detailně popsána. Endocytóza v nervových buňkách je ale mnohem rychlejší a více regulovaná, než ta běžná. Doposud jsou známy tři základní mechanismy

internalizace váčků a proteinů: endocytóza malých váčků obalených klathrinem, recyklace velkých částí membrán a rychlé zachycení váčků, které plně nesplývají s membránou (tzv. mechanismus „kiss-and-run“). Ze všech tří mechanismů je endocytóza zprostředkovaná klathrinem nejlépe prozkoumána. Je to také mechanismus, který je klíčový v recyklaci synaptických váčků.

Předpokládá se, že některé synaptické váčky by mohly vznikat přímo z váčků obalených klathrinem po rozpadu jejich obalu, ačkoliv klasický pohled na osud váčku je jeho splynutí s ranným endosomem ihned po rozpadu obalu<sup>66</sup>. Váčky obalené klathrinem mají přesně definované molekulární složení, díky tomu, že součásti klathrinového obalu mohou sloužit jako molekulární „třídiče“. Klathrinem obalené váčky na synapsi jsou také velmi podobné svou velikostí synaptickým váčkům. Tato vlastnost je velmi odlišná v ostatních tkáních, kde se klathrinem obalené váčky svou velikostí od sebe velmi liší (tato odlišnost je patrná i v neuronech mimo synaptické membrány).

Obecné principy jsou však na synapsi stejné jako kdekoli jinde<sup>66</sup>. Nukleace je zahájena interakcí adaptorových proteinů s lipidovou dvojvrstvou a tak dále. Avšak některé vlastnosti jsou odlišné. Mezi nimi je to například velká specifita pro výběr nákladu a specifita v rychlosti procesu. Pro takovou kontrolu musí existovat speciální mechanismy, o kterých je toho však známo velmi málo. Některé endocytické faktory se zde vyskytují jako isoformy specifické pro neurony. Takovým je například protein AP180, který je synaptickým homologem proteinu „clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia“ (CALM). Mezi synaptické adaptorové proteiny se řadí i proteiny FCHO1/2 s doménou F-BAR, proteiny „disabled (*Drosophila*) Homolog 2“ (Dab2), „autosomal recessive hypercholesterolemia“ (ARH),  $\beta$ -arrestiny a také námi studovaný protein SGIP1. To vše jsou proteiny s vlastnostmi endocytických adaptorů.

Je patrné, že endocytóza všeobecně ovlivňuje signalizaci. Dle výsledků z naší laboratoře byl její vliv prokázán při endokanabinoidní signalizaci a to právě přes protein SGIP1.

## 1.6 Endokanabinoidní signalizace

Endokanabinoidní systém je důležitý zejména pro modulaci bdělosti, poznávání, imunosuprese<sup>11</sup> pohybu a nasycení<sup>82</sup>. Tento systém je mimo jiné zapojený do neurogeneze a tvorby synapsí<sup>83</sup>. Poruchy v endokanabinoidním systému jsou spojovány s neuropsychiatrickými problémy jako jsou deprese a úzkost<sup>84, 85</sup> a také s obezitou<sup>86</sup>.

Endokanabinoidní systém je signální kaskádou skládající se z kanabinoidních (CB) receptorů CB1<sup>2</sup>, CB2<sup>87</sup> a GPR55<sup>88</sup>, a také z enzymů účastnících se syntézy a degradace endogenních ligandů těchto receptorů<sup>82</sup>. Všechny receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Receptory CB1 se účastní udržování energetické homeostázy v lidském těle. Receptory CB2 jsou nejspíš důležité při imunitních a zánětlivých reakcích vzhledem k jejich četnému výskytu v lymfocytech a makrofázích<sup>87</sup>. Receptor CB1 je jedním z nejhojněji se vyskytujících GPCR v centrálním nervovém systému<sup>89</sup>. Vyskytuje se především v mozkové kůře, hipokampu, bazálních gangliích a mozečku. Periferně je exprimován ve varlatech, prostatě, srdci, plicích a kostní dřeni.

Jako endogenní ligandy tohoto receptoru byly indentifikovány dvě sloučeniny odvozené od fosfolipidů s dlouhými polynenasycenými mastnými kyselinami: N-arašidonylethanolamin (AEA, anandamid<sup>90</sup>) a 2-arašidonoylglycerol (2-AG). Tyto sloučeniny se nazývají endokanabinoidy a jsou syntetizovány diacylglycerollipasami a N-acyl-fosfatidylethanolaminfosfolipasou D. Za degradaci endokanabinoidů jsou zodpovědné monoacylglycerollipasa a hydrolasa amidů mastných kyselin. Díky těmto metabolickým drahám je endokanabinoidní systém schopný vykonávat svou činnost s prostorovou a časovou specifitou.

Oba typy kanabinoidní receptorů, CB1 i CB2, přenášejí signál přes G-proteiny rodiny G<sub>ai/0</sub>, které mají v buňce hned několik efektů včetně inhibice adenylátcyklasy a některých typů napětím ovládaných vápníkových kanálů<sup>91, 92</sup>. Dále aktivují některé draslíkové kanály a mitogeny-aktivovanou proteinkinasu (MAPK). Vliv agonistů kanabinoidních receptorů na tok vápenatých iontů je ale také závislý na daném buněčném typu a na typu receptoru.

Na rozdíl od běžných neurotransmiterů nejsou endokanabinoidy produkovány a ukládány ve vesikulech, ale jsou syntetizovány dle potřeby z lipidů postsynaptické membrány<sup>93</sup>. Předpokládá se, že difundují synaptickou štěrbinou a působí na receptory CB1 v presynaptické membráně, kde inhibují přechodně nebo dlouhodobě výlev jak excitačních, tak inhibičních neurotransmiterů.

Aktivace receptorů CB1 inhibuje výlev neuropřenašečů dvěma hlavními mechanismy<sup>94-96</sup>. V případě krátkodobé plasticity, kdy jsou receptory aktivovány pouze na pár sekund, jsou přímo inhibovány presynaptické vápníkové kanály nejspíše pomocí  $\beta\gamma$  podjednotek G-proteinů. Pro dlouhodobou plasticitu je hlavním mechanismem působení inhibice adenylátcyklasy



a potlačení signální kaskády cyklický adenosinmonofosfát/proteinkinasa A (cAMP/PKA) pomocí podjednotky  $\alpha_{i/o}$  G-proteinu. Tímto způsobem moduluji excitační a inhibiční nervový přenos v centrálním i periferním nervovém systému<sup>93</sup>.

Přílišná aktivita endokanabinoidního systému vede ke zvýšení tělesné hmotnosti, snížené citlivosti na insulin a intoleranci glukosy<sup>86</sup>. Podání rostlinných či endogenních kanabinoidů stimuluje příjem potravy i u sytých zvířat<sup>97-99</sup>. Naopak blokace receptorů CB1 vede ke snížení váhy zvýšenou sekrecí anorexigenních signálů a zvýšenou citlivostí na insulin<sup>100-102</sup>.

Nejvyšší hladina endokanabinoidů je během hladovění a nejnižší během konzumace jídla<sup>103</sup>. V hypothalamu jsou tyto změny v množství endokanabinoidů přesně opačné než změny v hladině leptinu v krvi, což je stěžejní pro regulaci hypothalamických orexigenních a anorexigenních signálů.

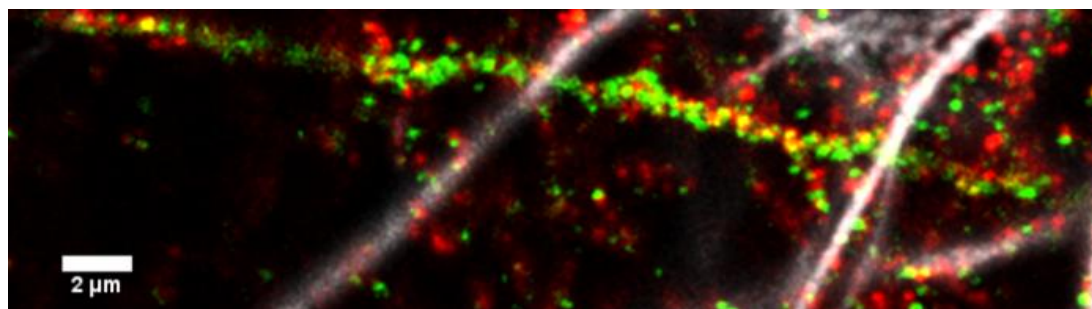
Endokanabinoidní systém kontroluje příjem potravy na dvou úrovních<sup>86</sup>. Za prvé posiluje motivaci k vyhledání a konzumaci jídla s vysokou motivační hodnotou nejspíše cestou mesolimbických drah, které jsou zapojeny do mechanismu odměn. Druhý způsob aktivace endokanabinoidního systému je aktivace „na požádání“ v hypothalamu, která následuje po krátkodobém hladovění. Takto aktivovaný systém přechodně reguluje hladinu ostatních orexigenních a anorexigenních prostředků tak, aby se zvýšila chuť k jídlu.

Některé složky endokanabinoidního systému byly objeveny v tukové tkáni hlodavců i lidí<sup>104</sup>. Potvrzen byl vliv endokanabinoidního systému na lipogenezi de novo v těchto tkáních. Endokanabinoidní systém podporuje ukládání tuků působením přímo na tukovou tkáň nezávisle na množství požitého jídla. Aktivace periferního endokanabinoidního systému u lidí vede k adipogenezi, lipogenezi, hepatitické steatoze a zvýšené insulinové resistenci<sup>105</sup>.

Podání selektivního antagonisty receptorů CB1, rimonabantu (SR141716), způsobuje u hlodavců pokles příjmu potravy a ztrátu tělesné hmoty<sup>101, 106</sup>. Rimonabant nepůsobí pouze anorexigenním mechanismem, ale působí také změny v metabolismu periferních orgánů. Rimonabant se prokázal jako účinný lék proti obezitě i v klinických testech<sup>107</sup>. U obézních lidí podporuje úbytek váhy a zlepšuje metabolismus lipidů a glukosy. Naneštěstí se objevily nežádoucí vedlejší účinky rimonabantu. Šlo o vedlejší účinky psychického rázu (deprese, suicidiální tendence) a proto byla rimonabantu zrušena certifikace pro klinické používání (v Evropě, v USA nikdy nebyl povolen) a další antagonisté receptoru CB1 byly staženy z klinických zkoušek.

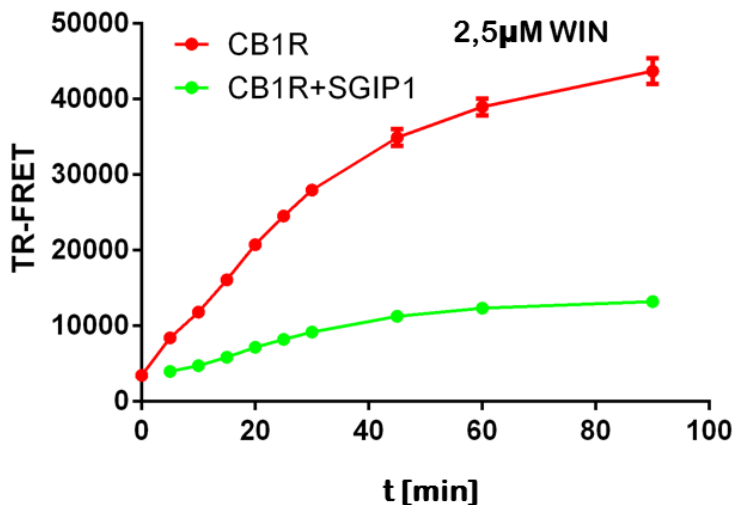
Vědci se tedy snaží ovlivňovat endokanabinoidní systém i na dalších úrovních signalizace a oddělit tak od sebe žádoucí a nežádoucí účinky. Signalizace kanabinoidních receptorů může být ovlivněna například na úrovni internalizace receptoru. Internalizace receptorů spřažených s G-proteiny, která je spuštěna vazbou agonisty, je důležitým regulačním mechanismem přenosu signálu přes plazmatickou membránu. Stejně jako některé z ostatních GPCR CB1 receptory jsou z plazmatické membrány odstraňovány konstitutivní nebo agonistou-indukovanou endocytózou<sup>108-110</sup>. Jak přesně endocytóza receptorů CB1 probíhá, to dosud není zcela jisté. Avšak zapojena je jistě endocytóza zprostředkovaná klathrinem a také transport pomocí caveol<sup>111</sup>. Po aktivaci a desensitizaci jsou receptory internalizovány a jsou následně buď degradovány v lysozomech nebo recyklovány a dopraveny zpět na membránu.

Tyto dva proteiny spolu kolokalizují na membráně s výrazným pre-synaptickým překrývajícím se značením viz obr. 4 (nepublikovaná data, Ing. Šárka Techlovská) a jsou i podobně exprimovány – nejvíce v hladovějším organismu.



*Obr. 4 Kolokalizace receptoru CB1 a proteinu SGIP1 v primárních kortikálních neuronech. Receptor CB1 je značen zeleně, SGIP1 červeně. Bílou barvou je značen dendritický protein MAP2. Receptor CB1 a SGIP1 jsou kolokalizovány na axonu. (Nepublikovaná data, Ing. Šárka Techlovská)*

Dle poznatků získaných v naší laboratoři se ukazuje, že protein SGIP1 zabraňuje internalizaci receptoru CB1 viz obr. 5 (nepublikovaná data, Mgr. Alena Hájková).



*Obr. 5 Vliv proteinu SGIP1 na internalizaci receptoru CB1 (CB1R) po stimulaci agonistou (WIN). Naměřený signál TR-FRET odpovídá míře internalizace receptoru. V přítomnosti proteinu SGIP1 je internalizace receptoru CB1 snížena. (Nepublikovaná data, Mgr. Alena Hájková).*

Další studium proteinu SGIP1 v naší laboratoři odhalilo jeho vliv na signalizaci aktivovaného receptoru CB1 (nepublikovaná data). Zatímco signalizace receptoru CB1 přes G-proteiny není ovlivněna proteinem SGIP1, signalizace zprostředkovaná  $\beta$ -arrestinovou interakcí je jím výrazně modulována. SGIP1 je tedy proteinem, který intracelulárně způsobuje signální selektivitu CB1 receptoru.

SGIP1 ovlivňuje signalizaci CB1 receptoru a možná i dalších receptorů. Mechanismem, který zprostředkuje tuto funkční diverzifikaci je pravděpodobně interference s endocytózou aktivovaného receptoru. MP-doména je jedinou doménou proteinu SGIP1, která jej odlišuje od jinak velmi podobných proteinů FCHO1/2, které naopak internalizaci receptorů podporují. Proto jsme se rozhodli studovat strukturu MP-domény proteinu SGIP1.

## **2 Cíl práce**

Hlavním cílem této práce je vyřešení trojrozměrné struktury MP-domény endocytického proteinu SGIP1 a studium funkce této domény. Dílčími cíly jsou pak příprava vhodné rekombinantní DNA pro expresi požadované domény, nalezení vhodných purifikačních podmínek pro přípravu nativní MP-domény o vysoké čistotě a krystalizace MP-domény.

### 3 Materiál a přístroje

#### 3.1 Chemikálie

Agarosa	Serva, SRN
Akrylamid 99%	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
1-butanol	Penta, ČR
Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Blue R)	Serva, SRN
1,4-Diazobicyklo[2.2.2]oktan (DABCO)	Sigma-Aldrich, USA
Dithiothreitol (DTT) 99%	Sigma-Aldrich, USA
Disodná sůl kyseliny ethylendiaminooctové (Na <sub>2</sub> EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Deoxycholát (DOC) 97%	Sigma-Aldrich, USA
Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs)	Top Bio, ČR
Dodecylsírán sodný (SDS) 99%	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol (96%)	Penta, ČR
Ethidium bromid	Top Bio, ČR
Ethylendiaminooctová kyselina (EDTA) 99%	Sigma-Aldrich, USA
Fenyl-methyl sulfoniumfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
Fetální hovězí sérum (FBS)	Invitrogen, USA
Folchova frakce I	Sigma-Aldrich, USA
Glycerol (bezvodý) 98%	Duchefa Biochemie, Nizozemí
Glycin 98%	Sigma-Aldrich, USA
Hovězí sérový albumin (BSA) 10 mg/ml	New England Biolabs, Velká Británie
Hydroxid sodný 98%	Penta, ČR

Chlorid sodný 99,5%	Sigma-Aldrich, USA
Imidazol	Serva, SRN
Inhibitory proteas (IP) Complete Mini	Roche, Švýcarsko
Isopropanol 99%	Sigma-Aldrich, USA
Isopropyl $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková 35%	Penta, ČR
Kyselina octová 99% (ledová)	Lachner, ČR
Methanol	Penta, ČR
N,N'-methylenbiskarylamid 98%	Sigma-Aldrich, USA
Močovina	Sigma-Aldrich, USA
3-(N-morfolín)propansulfonová kyselina (MOPS)	Sigma-Aldrich, USA
Mowiol	Calbiochem, SRN
Octan draselný	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldehyd 32%	Electron Microscopy Sciences, USA
PCR $H_2O$	Top Bio, ČR
Peroxodisíran amonný (APS) 98%	Serva, SRN
N-propyl galát	Sigma-Aldrich, USA
Poly-L-ornitin (0,01%, 10x koncentrovaný)	Sigma-Aldrich, USA
Sacharosa 99,5%	Sigma-Aldrich, USA
N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trizma <sup>®</sup> base (tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin (2,5%)	Gibco, USA
YT microbial medium (Y2T)	Sigma-Aldrich, USA

## 3.2 Pufry a roztoky

### 3.2.1 Agarosová elektroforéza, PCR, ligace a restriční pufry

Ligační pufr (složení výrobcem neuvedeno; Thermo Scientific, USA)

Nanášecí pufr pro horizontální elektroforézu (40% sacharosa, 0,25% bromfenolová modř v pufru TAE)

Reakční pufr pro PCR (složení výrobcem neuvedeno; Agilent, USA)

Restriční pufr 1 (0,1 M bis-Tris-propan-HCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 7.0; New Englands Biolabs, Velká Británie)

Restriční pufr 2 (0,5 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 7.9; New Englands Biolabs, Velká Británie)

Restriční pufr 3 (0,1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 7.9; New Englands Biolabs, Velká Británie)

Restriční pufr 4 (0,5 M octan draselný, 0,2 M Tris-octan, 0,1 M octan hořečnatý, 1 mM DTT, pH 7.9; New Englands Biolabs, Velká Británie)

Tris-acetátový pufr s EDTA (pufr TAE) (40 mM Tris, 20 mM octová kyselina, 1 mM EDTA, pH 8,4; Thermo Scientific, USA)

### 3.2.2 Přečištění DNA („QIAquick Gel Extraction Kit“)

Pufr QG (složení výrobcem neuvedeno; QIAGEN, SRN)

Pufr PE (složení výrobcem neuvedeno; QIAGEN, SRN)

### 3.2.3 Izolace DNA („Quiagen Plasmid Midi Kit“)

Pufr pro izolaci DNA P1 (50 mM Tris, 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, 0,1 mg/ml RNAsa A, pH 8.0; komerčně dodávaný firmou QIAGEN, SRN)

Pufr pro izolaci DNA P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS; komerčně dodávaný firmou QIAGEN, SRN)

Pufr pro izolaci DNA P3 (1 M octan draselný, pH 5.5 (upravené 99% kyselinou octovou); komerčně dodávaný firmou QIAGEN, SRN)

Pufr pro izolaci DNA QBT (0,75 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% obj. isopropanol, 0,15 % obj. Triton X-100, pH 7.0; komerčně dodávaný firmou QIAGEN, SRN)

Pufr pro izolaci DNA QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15%obj. isopropanol, pH 7.0; komerčně dodávaný firmou QIAGEN, SRN)

Pufr pro izolaci DNA QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 15%obj. isopropanol, pH 8.5; komerčně dodávaný firmou QIAGEN, SRN)

### **3.2.4 Izolace inkluzí, afinitní chromatografie a dialýza**

Dialyzační pufr 1 (0,5 M NaCl, 5% glycerol, 20 mM Tris.Cl, pH 7.5)

Dialyzační pufr 2 (0,25 M NaCl, 20 mM Tris.Cl, pH 7.5)

Lyzační pufr (0,5 M NaCl, 5% glycerol, 50 mM Tris.HCl, 5 mM imidazol, pH 7.5)

Promývací pufr (0,5 M NaCl, 5% glycerol, 50 mM Tris.HCl, 30 mM imidazol, pH 7.5)

Pufr pro izolaci inkluzí (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0)

Eluční pufr (0,5 M NaCl, 5% glycerol, 50 mM Tris.HCl, 0,2/0,3/0,4/0,5 M imidazol, pH 7.5)

### **3.2.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE), příprava a barvení gelů**

Akrylamidový roztok (2,1 M akrylamid, 52 mM N,N'-methylenbiskarylamid)

Barvicí roztok (0,025% Coomassie Brilliant blue R250, 40%obj. methanol, 7%obj. octová kyselina)

Elektroforetický pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3)

Odbarvovací roztok (40%obj. methanol, 7%obj. octová kyselina)

Pufr pro separační gel (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8)

Pufr pro zaostřovací gel (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8)

Vzorkový pufr (TB) (0,25 M Tris-Cl, 8% SDS, 20%obj. glycerol, 0,02% bromfenolová modř, 0,2 M DTT, pH 6,8)

### **3.2.6 Fluorescenční mikroskopie**

Fixační roztok (4% paraformaldehyd v PBS, pH 7,4)

Mowiol (130 mM Tris, 130 g/ml mowiol, 2,5% DABCO, 12,5%obj. glycerol, 5 mg/ml N-propyl galát, pH 8,5)

Fosfátový pufr (PBS) (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Média ÚMG)



### 3.3 Gely, standardy molekulových hmotností a matrice pro afinitní chromatografii

Agarosový gel (1% agarosa, 1 µg/ml ethidiumbromid, v pufru TAE)

Gely pro SDS-PAGE (příprava viz tab.1)

*Tab. 1 Příprava separačních gradientových gelů a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE. Gradientové gely byly připravovány 4-20%. Více koncentrovaný gel (20%) obsahoval vždy ještě 4 g sacharosy.*

	Složení 4% gelu [ml]	Složení 20% gelu [ml]	Složení zaostřovacího gelu [ml]
Akrylamidový roztok	3,33	16,67	2,53
Pufr pro separační gel	6,25	6,25	-
Pufr pro zaostřovací gel	-	-	1,88
10% SDS	0,25	0,25	0,15
dH <sub>2</sub> O	15,17	0	10,2
10% APS	0,085	0,085	0,15
TEMED	0,0085	0,0085	0,015

Matrice Ni-NTA (Quiagen, SRN)

Proteinový standard molekulových hmotností (Standard Spectra Multicolor High Range Ladder; Thermo Scientific, USA)

Standard velikosti DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder 250 bp - 10 000 bp; Thermo Scientific, USA)

### 3.4 Kultivační média a reakční činidla pro transfekci

#### 3.4.1 Kultivace bakterií

Luria-Bertani (LB) agar (Média, ÚMG)

Luria-Bertani (LB) médium (Média, ÚMG)

Pro selekci se do médií přidává ampicilin (100 µg/ml)

Transformační médium Y2T (mícháno z „YT microbial medium“ dle návodu)

### 3.4.2 Kultivace lidských buněčných linií

Dulbeccos modified Eagle's medium-high glucose medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA)

Médium DMEM ++ (DMEM + 1% penicilin a streptomycin, 10% obj. FBS)

Médium DMEM +/- (DMEM + 10% obj. FBS)

Zamrazovací médium (DMEM + 40% FBS, 20% DMSO)

Médium OMEM (Invitrogen, USA)

### 3.4.3 Transfekce lidských buněčných linií

Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen, USA)

FuGene<sup>®</sup> 6 (Promega, USA)

## 3.5 Oligonukleotidy

Oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich, USA.

Seznam použitých oligonuklotidů je uveden v tab.2.

*Tab. 2 Seznam použitých oligonukleotidů včetně jejich sekvence.*

Název	Sekvence
MP_up	CGCGCTAGCATGGAAGGACTGAAAAAAC
MP_low_97 AMK	GGAATAGAATTCCTTTTCATTTGG
MP_low_104 AMK	CGCGTCGAATTCCTTAACCTTGAGGAATAAACTGC
MP_low_120 AMK	GCGAATTCCTTTTCACGACTCTTCTTCTCT
MP_low_200 AMK	CGTAAGAATTCTCAAAGAGGGGAGCAAGG
MP_low_224 AMK	GTTTCATGAATTCGCCTCACCCCATATCTC
GFP_up	GATTGCTAGCATGGTGAGCAAGG
GFP_low	TCCGGCCAGAATTCGGATCAACTTGTACAG
p905_up (pro sekvenování)	CATCATCATCATCATTCTTCTGGTGTA
p905_low (pro sekvenování)	TGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGT

## 3.6 Použitá DNA

p905 (Plazmid nesoucí ampicilinovou resistenci pro bakteriální produkci proteinu s promotorem T7, připraven z původního plazmidu pMCSG7; Laboratoř strukturní biologie, UOCHB, v. v. i.)

pcDNA3.1(-) (Plazmid nesoucí ampicilinovou resistenci pro produkci proteinu v lidských buněčných liniích s promotorem CMV; Invitrogen, USA)

pRK5\_GFP\_SGIP1 (eGFP (v textu dále uváděno jen jako GFP), SGIP1 sekvence z *Mus musculus*; DNA připravena v naší laboratoři)

### 3.7 Restrikční endonukleasy a další enzymy

*BsrGI* – rozpoznávaná sekvence T/GTACA (10 U/μl; New England Biolabs, Velká Británie)

*EcoRI* – rozpoznávaná sekvence G/AATTC (20 U/μl; New England Biolabs, Velká Británie)

*NdeI* – rozpoznávaná sekvence CA/TATG (20 U/μl; New England Biolabs, Velká Británie)

*NheI* – rozpoznávaná sekvence G/CTAGC (5 U/μl; New England Biolabs, Velká Británie)

*StuI* – rozpoznávaná sekvence AGG/CCT (10 U/μl; New England Biolabs, Velká Británie)

*SphI* – rozpoznávaná sekvence GCATG/C (10 U/μl; New England Biolabs, Velká Británie)

Ligasa T4 (1 U/μl; Thermo Scientific, USA)

Polymerasa *Pfu* Cloned (2,5 U/μl; Agilent, USA)

Proteasa TEV („*Tobacco etch virus*“, s His-tagem, 0,29 mg/ml, izolovaná v Laboratoři strukturní biologie, UOCHB)

RNasa A (100 mg/ml; QIAGEN, SRN)

### 3.8 Bakteriální kmeny

*Escherichia coli*

DH5α (Invitrogen, USA)

BL21 (DE3) (Agilent, USA)

### 3.9 Lidské buněčné linie

Buněčná linie HEK293T/17 (dále uváděny jen jako HEK293, buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinových buněk s insertovaným SV40 T-antigenem, klon 17; ATTC, Rockefeller University)

Buněčná linie HeLa (buněčná linie odvozená z maligního karcinomu děložního čípku, linie získána z Oddělení biologie RNA, ÚMG, AV ČR, v. v. i.)

### 3.10 Přístroje

Aparatura pro horizontální elektroforézu MJ 105	Major Science, USA
Centrifuga Optima MAX Ultracentrifuge (Rotor TLA 100.3)	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Mikro 120 (Rotor 1212)	Hettich Zentrifugen, SRN
Centrifuga Z 383 K (Rotor C0383-75)	Hermle, SRN
Cyklér MJ Research PTC-200	GMI, USA
Elektroforetická aparatura Hoefer Mighty small II for 8x9cm gels	Amersham Biosciences, USA
Fluorescenční mikroskop DMI 4000B	Leica, SRN
Fluorescenční mikroskop IX81	Olympus, USA
Gradientový mixer Hoefer Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster	Amersham Biosciences, USA
Inkubátor 4000 series	Contherm Scientific, Nový Zéland
Inkubátor Raven 2	LTE Scientific, Velká Británie
Laminární box Bio-II-A	Telstar, Španělsko
Magnetická míchačka Big Squid	IKA Labortechnik, SRN
Peristaltická pumpa PCD 32.2	Ilabo, ČR
pH metr MP225	Metler Toledo, USA
Předvážky	Boeco, SRN
Přístroj na gelovou permeační chromatografii	Amersham Biosciences, USA
Sonikátor Ikasonic U 50 control	IKA Labortechnik, SRN
Spektrofotometr Biowave II (Xe lampa, 190-1100nm)	Biochrom, Velká Británie

Tiskárna monochromatická PD1	Mitsubishi Electric, Japonsko
Třepačka Orbi Safe TS	Schoeller,
UV transluminátor MUVB20	Ultra-Lum, USA
Vodní lázeň TW12	Julabo, USA
Zdroj napětí E143	Consort, Belgie

### 3.11 Ostatní materiál

Centrikony Amicon 3000 MWCO/ cut-off 3000 (Merck Millipore, SRN)

Kolony 5 ml (Quiagen, SRN)

Kolony pro přečištění DNA „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen, SRN)

Kolony pro velkoobjemovou izolaci DNA „Quiagen Plasmid Midi Kit“ (Quiagen, SRN)

Kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Velká Británie)

Kultivační nádoby pro buněčné linie (TPP, Švýcarsko)

Termopapír K65HM-CE (Mitsubishi Electric, Japonsko)

Zamrazovací kontejner Nalgene® (VWR, USA)

### 3.12 Software

DNASTAR 10 Core Suite (MegAlign, PrimerSelect, SeqBuilder; Life Technologies; Lasergene, USA)

Gimp 2.6 (gimp.org)

ProtParam (Protein Identification and Analysis Tools, Expasy Server)

ScanR Acquisition (Olympus, USA)

## 4 Metody

Pokud není uvedeno jinak, vycházejí použité metody z protokolů uvedených v příručce „Current Protocols in Molecular Biology“<sup>112</sup>. Dále jsou proto uvedeny jen stručné postupy a případné změny v nich. Pokud není uvedena jiná teplota, probíhají experimenty při 20 °C.

### 4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA v roztoku

Koncentrace vhodně naředěné DNA byla určována spektrofotometricky. DNA byla před stanovením 100x naředěna do tkH<sub>2</sub>O. Použit byl program pro stanovení koncentrace DNA (stanovení při 260 nm).

### 4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu v roztoku

Koncentrace proteinu v roztoku byla určována spektrofotometricky. Použit byl program pro stanovení koncentrace proteinu (stanovení při 260/280 nm). V Laboratoři strukturní biologie byl pro měření koncentrace proteinu použit přístroj NanoDrop a měření probíhalo s využitím teoretické 0,1% absorbance (1,018 pro GFP\_MP-doména (97 AMK); ProtParam, ExPASy).

### 4.3 Horizontální agarosová elektroforéza

Do jamek agarosového gelu ponořeného do pufru TAE v horizontální elektroforetické aparatuře byla nanesena směs DNA (5 µl) a nanášecího pufru pro horizontální elektroforézu (1 µl). Nanesen byl také standart pro určení velikosti DNA. Horizontální elektroforéza pak probíhala 20-30 minut za konstantního napětí 90 V.

Vizualizace elektroforetogramu probíhá pod UV transluminátorem a snímky gelů byly zaznamenány na termopapír pomocí tiskárny.

### 4.4 Polymerasová řetězová reakce („polymerase chain reaction“, PCR)

Nejprve byly navrženy vhodné primery tak, aby vzniklý produkt z PCR odpovídal požadované délce MP-domény nebo aby vzniklá DNA kódovala protein GFP a fúzní GFP\_MP-doménu. Primery byly následně vyrobeny a dodány firmou Sigma-Aldrich, USA. Teplota nasedání primerů byla zvolena tak, že byla o cca 10 °C nižší, než teplota tání uvedená u syntetizovaných oligonukleotidů. V případě potřeby byla ještě empiricky upravena.

Složení reakční směsi (50 µl) bylo následující:

reakční pufr pro PCR 5  $\mu$ l  
oligonukleotid horní (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l  
oligonukleotid dolní (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l  
dNTPs (10 mM) 1  $\mu$ l  
DNA templát (200 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l  
*Pfu* DNA polymerasa 1  $\mu$ l  
Zbytek objemu byl doplněn  $_{PCR}H_2O$ .

Následně byla směs umístěna do cykléru a spuštěn byl následující program:

krok 1	94°C, 1 min	
krok 2	94°C, 45 s	opakování 20x
krok 3	55-58 °C (dle $T_m$ nasedání oligonukleotidů) 1 min	
krok 4	72°C, 1 min	
krok 5	72°C, 10 min	
krok 6	4°C, neomezeně dlouho	

Přítomnost produktu byla dále ověřena na agarózovém gelu.

#### 4.5 Přechištění DNA

Pro přechištění DNA po polymerasové řetězové reakci a po štěpení restričními endonukleasami byla použita komerční sada „QIAquick Gel Extraction Kit“.

K 20 – 50  $\mu$ l roztoku DNA bylo přidáno 300  $\mu$ l pufru QG a 100  $\mu$ l isopropanolu. Tato směs byla převedena na kolonu. Následovala centrifugace (18600 x g) po dobu 2 min. Dále bylo na kolonu nanášeno 700  $\mu$ l pufru PE a opět následovaly 2 minuty centrifugování. Nakonec bylo na kolonu nanášeno 30  $\mu$ l  $_{PCR}H_2O$ , kolona se nechala 2 minuty stát a poté následovala centrifugace (eluát byl zachycen do zkumavky, ve které byla umístěna kolona). Čistota produktu byla kontrolována pomocí agarosové elektroforézy.

#### 4.6 Štěpení restričními endonukleázami

Štěpení vektorů probíhalo v 50  $\mu$ l reakčních směsích. Reakční směs obsahovala 1  $\mu$ g DNA, 0,5 mg BSA, 5  $\mu$ l komerčního restričního pufru (NEB1-4) vybraného na základě parametrů

použitého enzymu, dva restrikční enzymy (1-5 U každý). Reakce byla doplněna  $\text{PCRH}_2\text{O}$  do 50  $\mu\text{l}$ . Štěpení probíhalo 16 hodin při 37 °C.

Štěpení inzertů (přečištěné produkty řetězové polymerasové reakce) a kontrolní štěpení DNA z maloobjemové izolace probíhalo ve 20  $\mu\text{l}$  reakčních směsích. Směs obsahovala 1  $\mu\text{g}$  DNA, 0,2 mg BSA, 2  $\mu\text{l}$  komerčního restrikčního pufru (NEB1-4) vybraného na základě parametrů použitého enzymu, dva restrikční enzymy (1-5 U každý). Reakce byla doplněna  $\text{PCRH}_2\text{O}$  do 20  $\mu\text{l}$ . Štěpení probíhalo 4 hodiny při 37 °C.

#### **4.7 Ligace**

Ligace byla prováděna v celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$ . Reakční směs byla tvořena 2  $\mu\text{l}$  ligačního pufru, 200 ng vektoru naštěpeného restrikčními endonukleasami a následně přečištěného (viz kapitola 4.5), 200 ng inzertu naštěpeného restrikčními endonukleasami a následně přečištěného a 1  $\mu\text{l}$  ligasy T4. Směs byla doplněna  $\text{PCRH}_2\text{O}$ . Reakční směs byla 1 hodinu inkubována při 20 °C.

#### **4.8 Transformace kompetentních bakterií *Escherichia coli***

Bakterie *E.coli* (kmen DH $\alpha$  nebo BL21 (DE3) uchovávané v -80 °C byly ponechány na ledu než roztály. Následně bylo 50 $\mu\text{l}$  bakterií převedeno do sterilní vychlazené zkumavky, přidán byl 1  $\mu\text{g}$  DNA nebo 5  $\mu\text{l}$  směsi z ligace (viz kapitola 4.7) a výsledná směs byla ponechána 30 minut na ledu. Dále byl proveden teplotní šok, zkumavka byla umístěna na 45 vteřin do lázně o teplotě 42 °C, následně byla umístěna na 2 minuty zpět do ledu. Dále bylo přidáno 450  $\mu\text{l}$  média Y2T a kultivovalo se 1 hodinu při 37 °C za stálého třepání. Nakonec bylo 100  $\mu\text{l}$  kultury převedeno na agarovou plotnu (ampicilin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a rozetřeno sterilní hokejkou. Agarové plotny byly inkubovány v 16 hodin dnem vzhůru při 37 °C.

#### **4.9 Maloobjemová izolace DNA**

Pro izolaci DNA byly použity roztoky z reakční sady „Quiagen Plasmid Midi Kit“ nebo roztoky jim odpovídající připravené v naší laboratoři.

Do 2 ml média LB (ampicilin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) byla inokulována bakteriální kolonie vyjmutá špičkou z agarové plotny. Směs byla kultivována při 37 °C 16 hodin v třepačce. Následně byla kultura centrifugována 7 minut (18600 x g), peleta byla resuspendována v 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného



(4 °C) roztoku P1. Následně bylo přidáno 200 µl roztoku P2, směs byla zamíchána převrácením zkumavky a inkubována 2 minuty při 20 °C. Dále bylo přidáno 200 µl vychlazeného (4 °C) roztoku P3. Opět byla směs zamíchána převrácením zkumavky a inkubována 2 minuty při 20 °C. Následovala centrifugace při 18600 x g 10 minut. Supernatant byl převeden do 400 µl vychlazeného isopropanolu. Po promíchání byla směs opět 10 minut centrifugována. Supernatant byl odsán a přidáno bylo 100 µl 70% obj. ethanolu. Opět se centrifugovalo 10 minut. Peleta se nechala 2 hodiny schnout pod lampičkou a následně se k ní přidalo 30 µl  $\text{PCRH}_2\text{O}$  a peleta se nechala rozpouštět ve 4 °C. Správnost izolace byla ověřována agarosovou elektroforézou a restriční a případně sekvenční analýzou.

#### **4.10 Velkoobjemová izolace DNA**

Pro izolaci DNA byly použity roztoky z reakční sady „Quiagen Plasmid Midi Kit“ nebo roztoky jim odpovídající připravené v naší laboratoři.

Do 100 ml média LB (ampicilin 100 µg/ml) byla inokulována bakteriální kolonie vyjmutá špičkou z agarové plotny nebo z glycerolové stoky. Směs byla kultivována 16 hodin při 37 °C v třepačce. Následně byla kultura centrifugována 15 minut (8000 x g, 4 °C), peleta byla resuspendována v 5 ml vychlazeného (4 °C) roztoku P1. Následně bylo přidáno 5 ml roztoku P2, směs byla zamíchána převrácením zkumavky a inkubována 2 minuty při 20 °C. Dále bylo přidáno 5 ml roztoku P3 (vychlazený na 4 °C). Opět byla směs zamíchána převrácením zkumavky a inkubována 2 minuty při 20 °C. Následovala centrifugace při x g 20 minut. Supernatant byl nanesen na kolonu, která byla předem ekvilibrována 5 ml roztoku QBT. Kolona byla po prokapání supernatantu promyta 2x 10 ml roztoku QC. DNA byla eluována 5 ml roztoku QF do připravené falkonky. K eluátům byl přidán isopropanol (3,5 ml isopropanolu na 5 ml eluátu). Následovala centrifugace po dobu 30 min (8000 x g, 4 °C). Supernatant byl odsán a přidáno bylo 2,5 ml 70% obj. ethanolu. Následovala centrifugace po dobu 5 minut za stejných podmínek. Supernatant byl odsán. Peleta se nechala 2 hodiny schnout a následně se k ní přidalo 100 µl  $\text{PCRH}_2\text{O}$ . Peleta byla rozpouštěna ve vodě 16 hodin při 4 °C. Správnost izolace byla ověřována restriční analýzou (viz kapitola 4.6) a agarosovou elektroforézou (viz kapitola 4.3).

#### **4.11 Uskladňování bakteriálních kultur (glycerolové stoky)**

Z LB média s narostlou kulturou bakterií bylo převedeno 700  $\mu$ l do zkumavky, dále bylo přidáno 300  $\mu$ l 50% obj. vodného roztoku glycerolu. Směs byla promíchána a uchovávána při  $-80$  °C.

#### **4.12 Sekvenování DNA**

Sekvenování DNA bylo prováděno firmou SEQme s.r.o. Směs pro sekvenaci byla naředěna v celkovém objemu 10  $\mu$ l  $_{PCR}H_2O$ . Obsahovala 200 ng DNA a 25 pmol příslušného sekvenačního primeru.

#### **4.13 Expres proteinu v bakteriích *Escherichia coli***

Bakterie byly nasazeny do 100 ml LB média (+ 100  $\mu$ g/ml ampicilin, 5% glycerol) vyjmutím špičkou z glycerolové stoky (nebo agarové plotny) s příslušným kmenem bakterií transformovaných rekombinantní DNA a vložením této špičky do kultivačního média. Bakterie byly kultivovány 16 hodin ve 37 °C za stálého třepání. Následně byla kultura naředěna do daného množství LB média tak, aby  $OD_{550nm}$  měla hodnotu 0,1. Dále byly bakterie kultivovány při 25 °C za stálého třepání a v hodinových intervalech byla měřena  $OD_{550nm}$ . Při  $OD_{550nm} \sim 0,5$  byla kultivační teplota snížena na 20 °C. Při  $OD_{550nm} \sim 0,8$  následovala indukce přidáním IPTG (0,25 mM). Indukované buňky byly za stávajících podmínek kultivovány 16 hodin. Po této době byly bakterie z kultury odděleny centrifugací (8000 x g, 30 min, 4 °C).

#### **4.14 Izolace a purifikace proteinu za nativních podmínek**

##### **4.14.1 Izolace buněčného lyzátu**

Buněčná peleta oddělená z bakteriální kultury (1L) centrifugací byla resuspendována v 30 ml lyzačního pufru (0,05 mM PMSF). Následně byla suspenze 3x zmražena ( $-80$  °C) a rozmražena na ledu. Rozmražená suspenze byla podrobena sonikaci v 30 s intervalech při 80% výkonu sonikátoru po dobu 2 minut. Sonikovaná směs byla centrifugována (8000 x g, 30 min) a získán tak byl buněčný lyzát (supernatant obsahující rozpustný protein) a peleta. Proteinové vzorky byly připraveny z bakteriální kultury resuspendované v lyzačním pufru (označeno T), z lyzátu (označeno L) a z pelety resuspendované v původním množství lyzačního

pufu (označeno P). Protein z lyzátu byl purifikován za nativních podmínek (viz kapitola 4.14.2).

#### **4.14.2 První afinitní chromatografie za nativních podmínek**

Z každé proteklé frakce bylo odebráno 50  $\mu$ l vzorku, který byl následně zpracován (viz kapitola 4.21.1) a analyzován metodou SDS-PAGE (viz kapitola 4.21.2). Celý proces probíhal při 4 °C.

Lyzát byl před použitím centrifugován (8000 x g, 30 min, 4 °C). Supernatant byl nalit na kolonu s 5 ml matrice Ni-NTA, která byla předem promyta 20 ml lyzačního pufu. Proteklá frakce (označeno FT) byla jímána do falkonky. Následně byla kolona promyta 40 ml promývacího pufu. Proteklá frakce (označeno WB) byla opět jímána do falkonky. Protein byl eluován buď 10 ml elučního pufu o 0,4 M koncentraci imidazolu (označeno EB) nebo postupně po 5 ml elučními pufry s 0,2 M a 0,3 M imidazolem. Do eluátů byla přidána EDTA tak , aby její výsledná koncentrace byla 1mM.

#### **4.14.3 První dialýza a štěpení proteasou TEV**

K eluátu z první afinitní chromatografie (viz kapitola 4.14.2) byla přidána proteasa TEV (0,03 mg/5 ml proteinového vzorku) a směs byla přenesena do dialyzačního střívka. Dialýza probíhala proti 4 L dialyzačnímu roztoku 16 hodin při 20 °C. Štěpení proteasou TEV bylo ukončeno přidáním PMSF (celková koncentrace 1 mM).

#### **4.14.4 Druhá afinitní chromatografie**

K dialyzátu (viz kapitola 4.14.3) bylo přidáno 6 ml matrice Ni-NTA, která byla předem třikrát promyta 30 ml lyzačního pufu. Směs se míchala 1 hodinu při 4 °C. Následně byla přelita do malé kolony. Proteklá frakce byla jímána do falkonky (označeno FT2). Následně byla kolona promyta 20 ml lyzačního pufu, proteklá frakce byla označena jako BB2.

#### **4.14.5 Ošetření a uskladnění matrice Ni-NTA**

Po každém použití byla matrice Ni-NTA 30 minut promývána v 0.5M NaOH. Promývací roztok byl po sednutí matrice na dno falkonky odsán a matrice byla dále uskladňována

v 30% obj. ethanolu ve 4 °C. Před každým purifikačním krokem byla takto uskladněná matrice nejprve 3x promyta v lyzačním pufru.

#### **4.14.6 Druhá dialýza**

Frakce FT2 a BB2 z druhé afinitní chromatografie (viz kapitola 4.14.4) byly dialyzovány proti 4 L dialyzačního pufru (DB2) 16 hodin při 4 °C. Následně byl proteinový roztok podroben testu vazby proteinu na liposomy (viz kapitola 4.16), zahuštěn (viz kapitola 4.17) a analyzován gelovou permeační chromatografií (viz kapitola 4.18).

### **4.15 Izolace a purifikace proteinu za denaturačních podmínek**

#### **4.15.1 Izolace inkluzních tělísek**

Bakteriální kultura byla centrifugována (8000 x g, 30 min, 4 °C). Peleta byla zvážena a resuspendována v pufru pro izolaci inkluzí (na 1g pelety 10 ml pufru). Do buněčné suspenze byl přidán PMSF tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,05 mM. Suspenze byla 3x zmrazena a rozmrazena. Rozmrazování probíhalo ve vodní lázni (40 °C). Následně byl k suspenzi přidán DOC (celkově 0,05 %) a směs byla míchána 20 minut v ledové lázni. Suspenze byla následně sonikována při výkonu 60% 1 minutu. Následně byla směs centrifugována (8000 x g, 20 min, 4 °C). Peleta byla resuspendována v původním objemu použitého pufru s 0,1% Tritonem X-100. Následovala sonikace a centrifugace (stejně podmínky jako předchozí). Peleta byla opět resuspendována v původním objemu pufru. Následovala poslední centrifugace. Výsledná peleta obsahovala inkluzní tělíška. V každém kroku bylo odebráno 50 µl vzorku, který byl následně zpracován (viz kapitola 4.21.1) a analyzován metodou SDS-PAGE (viz kapitola 4.21.2).

#### **4.15.2 Izolace proteinu z inkluzních tělísek**

Peleta obsahující inkluzní tělíška byla resuspendována v 30 ml denaturujícího lyzačního pufru s 0,05 mM PMSF. Suspenze byla 60 minut míchána při 25 °C a průběžně jemně vortexována. Následně byla směs centrifugována (8000 x g, 30 min, 4 °C). Ze supernatantu byl izolován protein za denaturačních podmínek (viz kapitola 4.15.3).

V každém kroku bylo odebráno 50  $\mu$ l vzorku, který byl následně zpracován (viz kapitola 4.21.1) a analyzován metodou SDS-PAGE (viz kapitola 4.21.2).

### **4.15.3 Afinitní chromatografie za denaturačních podmínek**

Afinitní chromatografie za denaturačních podmínek probíhala stejným způsobem jako nativní (viz kapitola 4.14.2) jen s tím rozdílem, že ve všech roztocích byla navíc 8M močovina a purifikace probíhala při 20 °C.

### **4.15.4 Renaturace proteinu**

Protein byl renaturován ředěním do pufru DB2 bez močoviny v poměru 1:1 a následně dialýzou proti 4L pufru bez močoviny (dialyzační pufr 2) 16 hodin při 4 °C. His-tag byl na proteinu ponechán (ověřeno bylo, že u nativně připraveného proteinu neovlivňuje vazbu na liposomy).

### **4.16 Vazba proteinů na liposomy *in vitro***

Liposomy byly připraveny ředěním v pufru DB2 na koncentraci 5 mg/ml. Suspenze byla následně sonikována 2-3 minuty při 60% výkonu sonikátoru. Dále byly liposomy inkubovány 2 hodiny na třepačce při 37 °C.

Proteinový roztok byl centrifugován 30 min (150000 x g, 25 °C). Proteinový roztok byl následně smíchán v poměru 1:1 s připravenou suspenzí liposomů. Směs byla inkubována 1 hodinu při 25 °C na třepačce.

Následovala centrifugace (150000 x g, 25 °C, 30 min). Supernatant byl odebrán a vzniklá peleta byla naředěna v původním objemu pufru DB2. Ze supernatantu i pelety byly připraveny proteinové vzorky (viz kapitola 4.21.1) a přítomnost proteinu v peletě a supernatantu byla ověřována metodou SDS-PAGE (kapitola 4.21.2).

### **4.17 Zahuštění proteinového roztoku**

Zahuštění proteinu probíhalo centrifugací v centrikonu.

Nejprve byla do centrikonu nalita voda tak, aby se navlhčila membrána centrikonu. Následovala centrifugace při 5000 x g a 4 °C než se všechna voda dostala do rezervoáru. Do centrikonu byl poté převeden proteinový vzorek a byl po centrifugován vždy 15 minut

(5000 x g, 4 °C), následně byl vzorek trochu protřepán a znovu centrifugován dokud se v roztoku nezačaly tvořit viditelné proteinové agregáty. Roztok byl těchto agregátů zbaven centrifugací (10000 x g, 15 min, 4 °C) a následně byl uskladněn v -4 °C.

#### **4.18 Gelová permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie byla prováděna v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. Použit byl chromatografický přístroj od firmy Amersham Biosciences (Monitor pH/C-900, monitor UV-900, monitor p-900). Použita byla kolona Superdex 200 10/300 GL. Nastavena byla průtoková rychlost 0,5 ml/min, maximální tlak v koloně 1,5 MPa a vlnová délka 280 nm pro zaznamenávání protékajícího proteinu spektrofotometrem.

Předem kalibrovaná kolona byla nejprve ekvilibrována odvzdušněným pufrem (DB2), který byl také použit jako mobilní fáze pro samotné dělení složek proteinového roztoku. Následně byl pomocí Hamiltonovy stříkačky nanesen na kolonu proteinový roztok, který byl před nanesením centrifugován (10000 x g, 15 min, 4 °C). Proběhlo chromatografické dělení proteinového roztoku, chromatogram byl zaznamenán počítačem a frakce obsahující protein byly ručně jímány do zkumavek. Proteklé frakce byly dále analyzovány metodou SDS-PAGE.

#### **4.19 Kultivace lidských buněčných linií a manipulace s nimi**

##### **4.19.1 Rozmražování buněk**

Na misku o průměru 10 cm bylo převedeno 10 ml média DMEM+/- . Z kapalného dusíku byla vytažena zamrazovací zkumavka s buňkami a na 2 minuty byla ponořena do vodní lázně o teplotě 37 °C. Následně byl obsah zkumavky převeden na misku s médiem DMEM+/- . Po úplném rozmražení byla buněčná suspenze z misky převedena do falkonky a 5 minut centrifugována při 1000 x g. Buněčná peleta byla resuspendována v 1 ml média a buňky byly vysety na misky v několika ředěních (1:1, 1:2, 1:4).

##### **4.19.2 Zamražování buněk**

Z misky s buňkami s cca 90% pokryvností (tzn.  $25 \cdot 10^6$  buněk na kultivační misce o průměru 15 cm) bylo odsáno médium. Buňky byly 2x promyty roztokem PBS a následně vystaveny

působení 0,25% roztoku trypsinu v PBS po dobu 2 minut (37 °C). Buňky byly následně převedeny do média DMEM +/- a centrifugovány (1000 x g ), peleta byla znovu resuspendována v médiu DMEM +/- a suspenze byla znovu centrifugována. Výsledná peleta byla rozpuštěna v 0,5 ml média DMEM +/- . Buněčná suspenze byla převedena do předchlazené zamrazovací zkumavky a bylo k ní přidáno 0,5 ml zamrazovacího média. Zkumavka byla umístěna do zamrazovacího kontejneru umístěného v -70 °C, ve které probíhalo postupné vychlazení na tuto teplotu. Následně byla zkumavka s buňkami přemístěna do tekutého dusíku, kde byly buňky skladovány až do rozmražení.

### **4.19.3 Pasáž buněk**

Z misky s buňkami se zhruba 90% pokryvností (tzn.  $25 \cdot 10^6$  buněk na kultivační misce o průměru 15 cm) bylo odsáno medium. Buňky byly následně 1x promyty PBS a vystaveny působení 0,25% roztoku trypsinu v PBS po dobu 2 minut. Po uvolnění buněk do suspenze bylo k trypsinu přidáno medium DMEM +/+ (vytemperováno na 37 °C) v objemovém poměru 1:1 k roztoku trypsinu, buňky byly resuspendovány pipetou a následně centrifugovány 5 minut při 1000 x g.

Supernatant byl odsán a buněčná peleta resuspendována v mediu DMEM +/+. Takto byly buňky pasážovány 2x týdně v ředění 1:5. Pro experimenty byly využívány do pasáže č. 20. Udržovány byly v inkubátoru s atmosférou 5% CO<sub>2</sub> a přesnou termoregulací (37 °C).

## **4.20 Fluorescenční mikroskopie**

### **4.20.1 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii**

Na destičku s 12 jamkami byla použita sklíčka o průměru 18 mm. Ta byla nejprve namočena v ethanolu (96%) a následně sterilizována opálením nad kahanem. Takto upravená sklíčka byla vložena do jamek a do každé jamky bylo přidáno 250 µl poly-L-lysinu. Sklíčka se inkubovala s poly-L-lysinem 30 minut v 37 °C. Poté byla 3x opláchnuta tkH<sub>2</sub>O.

Do každé jamky s takto ošetřeným sklíčkem bylo převedeno 0,5 ml média DMEM +/- a 0,5 ml suspenze buněk (cca  $25 \cdot 10^4$  buněk). Destičky s buňkami byly inkubovány 16 hodin při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.20.1.1 Transfekce buněk pomocí činidla FuGene**

Uváděné objemy a hmotnosti jsou pro jamku z 12-jamkové destičky.

1 den před transfekcí byly buňky nasazeny za média DMEM+/- (viz kapitola 4.20.1). Přípraveny byly dvě reakční směsi. V první reakční směsi byla smíchána DNA v celkovém množství 0,3  $\mu\text{g}$  s 10  $\mu\text{l}$  média OMEM. V druhé reakční směsi bylo smícháno 0,8  $\mu\text{l}$  činidla FuGene s 10  $\mu\text{l}$  média OMEM. Tyto dvě reakční směsi byly po 5 min smíchány dohromady a ponechány 20 min při 20 °C. Takto vzniklá reakční směs byla nakapána na buněčnou kulturu a inkubována 16 hod při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.20.1.2 Transfekce buněk lipofectaminem**

Uváděné objemy a hmotnosti jsou pro jamku z 12-jamkové destičky.

1 den před transfekcí byly buňky nasazeny za média DMEM+/- (viz kapitola 4.20.1). Přípraveny byly dvě reakční směsi. V první reakční směsi byla smíchána DNA v celkovém množství 1,6  $\mu\text{g}$  se 100  $\mu\text{l}$  média OMEM. V druhé reakční směsi byly smíchány 4  $\mu\text{l}$  Lipofectaminu se 100  $\mu\text{l}$  média OMEM. Tyto dvě reakční směsi byly po 5 min smíchány dohromady a ponechány 20 min při 20 °C. Takto vzniklá reakční směs byla nakapána na buněčnou kulturu a inkubována 14-16 hod v prostředí 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.20.1.3 Fixace sklíček**

Z jamek se sklíčky s buňkami (viz kapitola 4.20.1.1-2) bylo odsáno médium. Následně bylo do jamek nakapáno 0,5 ml fixačního roztoku a destička byla 10 minut inkubována při 20 °C přikrytá alobalem. Fixační roztok byl odsán a sklíčka s buňkami byly 3x promyty roztokem PBS. Na podložní sklíčko bylo nakapáno 10  $\mu\text{l}$  mowiolu a na tuto kapku bylo položeno sklíčko s buňkami tak, že buňky byly ponořeny do mowiolu. Preparáty se nechaly schnout 16 hod. při 20 °C přikryté alobalem.

#### **4.20.2 Snímání obrázků fluorescenčním mikroskopem**

Snímky preparátů byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX81, objektiv UPLSAPO 60x) a programu Scan R Acquisition. Využita byla excitace GFP (457 – 487 nm) a snímána byla jeho fluorescence při 502 – 538 nm.



## **4.21 SDS-PAGE**

### **4.21.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE**

Proteinové vzorky (z buněčného lyzátu a různých stádií purifikace) byly připraveny ředěním vzorků v poměru 1:1 s pufrem TB.

Vzorky byly 5 minut zahřáty ve vodní lázni (90 °C). Následně byly vzorky centrifugovány 10 minut při 18600 x g. Uchovávány byly v -20 °C.

### **4.21.2 Elektroforéza SDS-PAGE**

Metoda SDS-PAGE byla upravena dle laboratorního manuálu firmy Hoefer<sup>113</sup>.

Elektroforetická aparatura s gradientovými gely byla naplněna elektroforetickým pufrem. Do jamek v zaostřovacím gelu byly nanášeny proteinové vzorky (obvykle 15 µl/ jamka, při testování vazby na liposomy 25 µl/ jamka), které byly předem zahřáty 5 minut ve vodní lázni (60 °C) a centrifugovány při 18600 x g 10 minut. Pro možnost určení přibližné velikosti dělených proteinů byl na každý gel nanášen také komerční proteinový standard.

Putování proteinů v elektrickém poli probíhalo za konstantního napětí 100 mV po dobu 4 hodin. Po ukončení elektroforetického dělení byly gely ihned dále zpracovávány barvením proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue R250.

## **4.22 Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant blue R 250**

Po ukončení elektroforézy byly gely barveny v barvicím roztoku 30 minut na míchačce<sup>113</sup>. Po obarvení byly gely ponechány v odbarvovacím roztoku než se úplně odmylo nenavázané barvivo. Odbarvené gely byly uchovávány zalité do celofánu ve směsi glycerolu a vody (1:1).

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava rekombinantních DNA

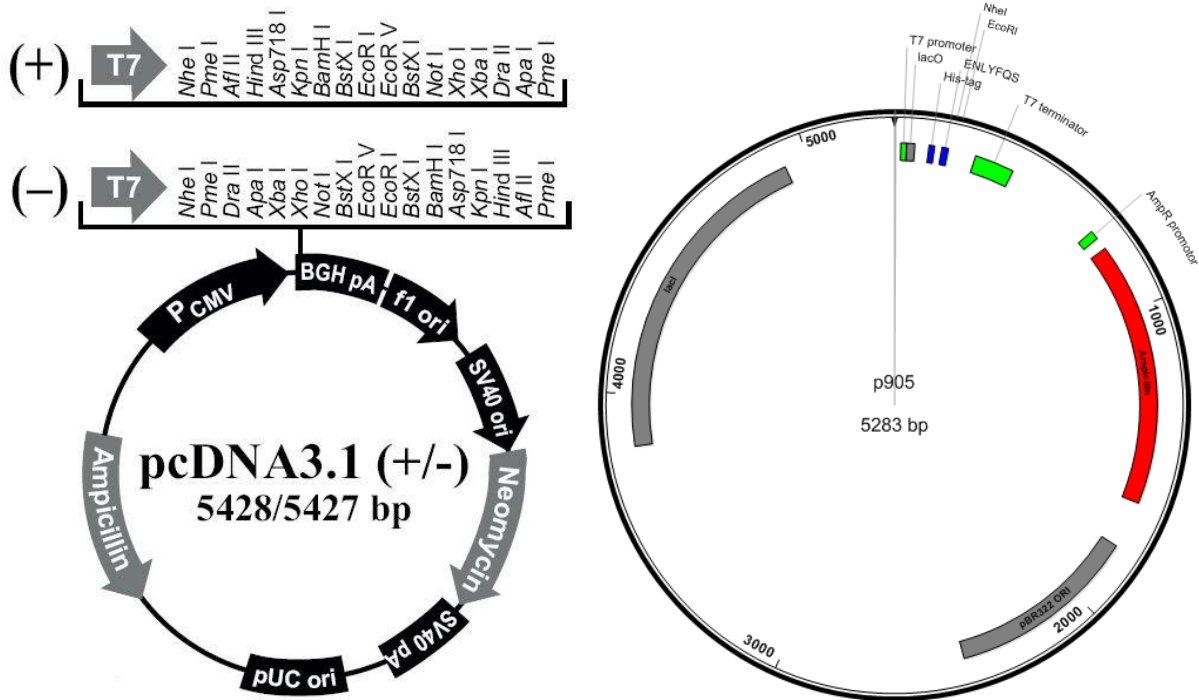
Délka rekombinantních DNA kódující MP-domény (produktů PCR) byla zvolena tak, abychom získali několik různě dlouhých DNA kódující peptidy, které by mohly tvořit strukturu MP-domény. Nejkratší peptid má 97 AMK. MP-doména o délce 97 AMK byla popsána v literatuře<sup>26</sup>, šlo však o doménu z delší sestřihové varianty SGIP1 $\alpha$ , která má v dané N-koncové oblasti vložených ještě 28 AMK navíc. My jsme pracovali s DNA odpovídající kratší sestřihové variantě SGIP1. Zvolili jsme však jako nejkratší úsek taktéž prvních 97 N-koncových AMK, abychom tak získali jistý přesah. Přesná hranice, kde končí MP-doména, totiž nebyla zatím definována a literatura se na toto téma poněkud rozchází, MP-doména byla popsána také jako N-koncový úsek proteinu SGIP1 čítající 239 AMK<sup>34</sup>. Další rekombinantní DNA byly navrženy tak, abychom získali různé delší úseky proteinu SGIP1 až po oblast, kde se v sekvenci objevuje velká četnost prolinů (polyprolinová doména). Jelikož přítomnost prolinu v primární struktuře zabraňuje tvorbě rigidních sekundárních struktur, jako je  $\alpha$ -helix nebo  $\beta$ -skládaný list, je jasné, že v tomto úseku bude mít protein tzv. nestrukturovaný charakter.

Připravena byla taktéž DNA kódující zelený fluorescenční protein (GFP) ve stejných plazmidech, které byly použity pro přípravu MP-domény.

Rekombinantní DNA byly připraveny pomocí technik polymerasová řetězová reakce (PCR), štěpení restričními endonukleasami a ligace za využití ligasy T4. Produkty PCR štěpené restričními endonukleasami se vkládaly do vektoru taktéž štěpeného restričními endonukleasami. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby nasedaly na templátovou DNA (prk5\_GFP\_SGIP1) na začátku MP-domény a na námi stanovených „koncích“ MP-domény, eventuálně na začátku a na konci DNA kódující GFP nebo tak, aby výsledná DNA kódovala fúzní protein GFP\_MP-doména. V sekvenci oligonukleotidů byla navržena štěpící místa pro restriční endonukleasy *EcoRI* a *NheI*, pomocí kterých se produkty PCR vkládaly do plazmidů. Na spodních oligonukleotidech byl navržen také stop kodon.

Pro přípravu navržených rekombinantních DNA byly použity dva typy plazmidů, do kterých se vkládaly produkty PCR pomocí restričních endonukleas *EcoRI* a *NheI*. Pro produkci

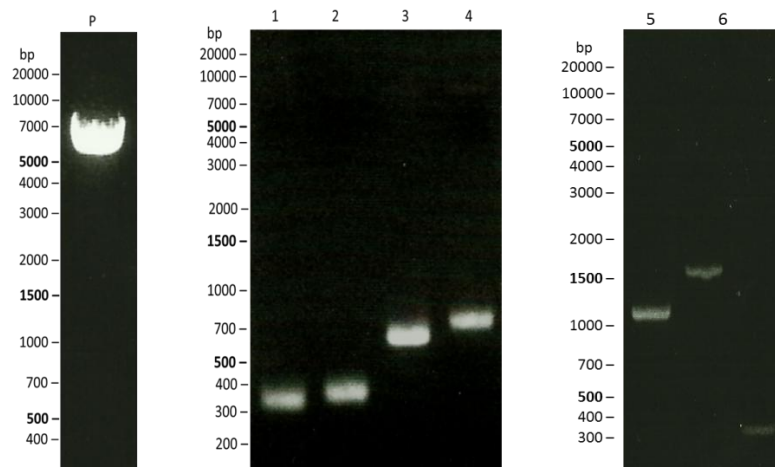
proteinu v bakteriích *E. coli* byl použit plazmid p905 s promotorem T7 a pro produkci proteinu v buňkách HEK293 a HeLa byl použit plazmid pcDNA3.1(-) s promotorem CMV. Oba plazmidy nesou ampicilinovou resistenci (viz obr. 6).



**Obr. 6** Mapy použitých plazmidů pcDNA3.1 (vlevo) a p905 (vpravo). Vyznačeny jsou promotory ( $P_{CMV}$ , T7), počátky replikace (ori), polyadenylová sekvence (pA), polyrestrikční místa s restrikčními enzymy (*NheI*, *EcoRI*) a sekvence zodpovědné za rezistenci (Ampicilin, Neomycin). U plazmidu p905 je navíc vyznačen lac operon (*lacO*) a lac represor (*lacI*) a sekvence kódující His-tag a proteinovou sekvenci ENLYFQS.

Na plazmidu p905 je navíc vhodně umístěna sekvence histidinové kotvy (His-tagu), kterou následuje sekvence kódující aminokyselinovou sekvenci rozpoznávanou a štěpenou proteasou TEV a dále restrikční místa pro endonukleasy *EcoRI* a *NheI*.

Na obr. 7 (str. 52) jsou snímky gelů, na kterých je plazmid p905 naštěpený restrikčními endonukleasami *EcoRI* a *NheI*. Na dalším gelech jsou produkty PCR odpovídající různě dlouhým úsekům MP-domény a také úseky kódující fúzní proteiny GFP\_MP-doména o různých délkách.



**Obr. 7 Snímky gelů s vektorem a inzerty pro přípravu rekombinantních DNA.** Vlevo je plazmid p905 (P) naštěpený restrikcí endonukleasami *EcoRI* a *NheI*. Následují různé inzerty vzniklé PCR a restrikcí štěpením.

1 – MP-doména (104 AMK), 2 – MP-doména (120 AMK), 3 – MP-doména (200 AMK), 4 – MP-doména (224 AMK), 5 – GFP\_MP-doména (97 AMK), 6 – GFP\_MP-doména (224 AMK), 7 – MP-doména (97 AMK).

Připravené rekombinantní DNA jsou shrnuty v tab. 3. Proteinové sekvence odpovídající rekombinantní DNA kódující fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK) a proteinová sekvence SGIP1 jsou uvedeny v přílohách (příloha 1,2).

**Tab. 3 Připravené rekombinantní DNA.**

Označení DNA	Počet AMK odpovídajícího genového produktu
p905_MP-doména (97 AMK)	97
p905_MP-doména (104 AMK)	104
p905_MP-doména (120 AMK)	120
p905_MP-doména (200 AMK)	200
p905_MP-doména (224 AMK)	224
p905_GFP_MP-doména (97 AMK)	339
p905_GFP_MP-doména (224 AMK)	466
p905_GFP	239
pcDNA3_GFP_MP-doména (97 AMK)	339
pcDNA3_GFP_MP-doména (224 AMK)	466

## 5.2 Exprese MP-domény v bakteriích *Escherichia coli*

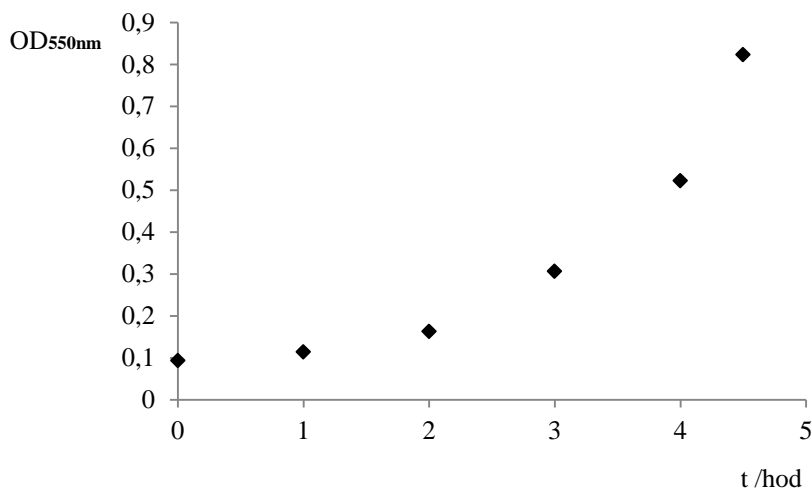
Peptidy odpovídající různým délkám MP-domény byly exprimovány v bakteriích *Escherichia coli* BL21 (DE3). Dále jsou uváděny pouze výsledky experimentů, ve kterých byl použit vybraný konstrukt kódující fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK).

Na obr. 8 je schematicky znázorněn příklad proteinového produktu, který je kódován jednou z připravených rekombinantních DNA, a který byl připraven expresí v *E. coli*. Jedná se o proteinový produkt vzniklý z DNA vložené do plazmidu p905. V našich dalších experimentech jsme se zaměřili především na tento fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK).



**Obr. 8 Grafické zobrazení rekombinantního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK).** Výsledný protein je značen pomocí His-tagu, který je odštěpitelný díky sekvenci rozpoznávané specificky proteasou TEV vložené mezi His-tag a požadovaný protein. Místo štěpení je vyznačené lomítkem.

Empiricky byly nalezeny nejvhodnější podmínky pro kultivaci bakterií tak, aby exprese peptidů byla co nejvyšší. Osvědčila se poměrně nízká teplota pro růst bakterií – 25 °C a ještě nižší (20 °C) pro kultivaci bakterií s indukovanou expresí peptidů. Na obr. 9 (str. 54) je vyznačen průběh růstu bakteriální kultury před indukcí IPTG, která byla započata v exponenciální fázi růstu bakteriální kultury ( $OD_{550\text{ nm}} \sim 0,8$ ). Pro indukci byl použit IPTG o nízké výsledné koncentraci (0,25 mM), který indukuje expresi T7 polymerasy.



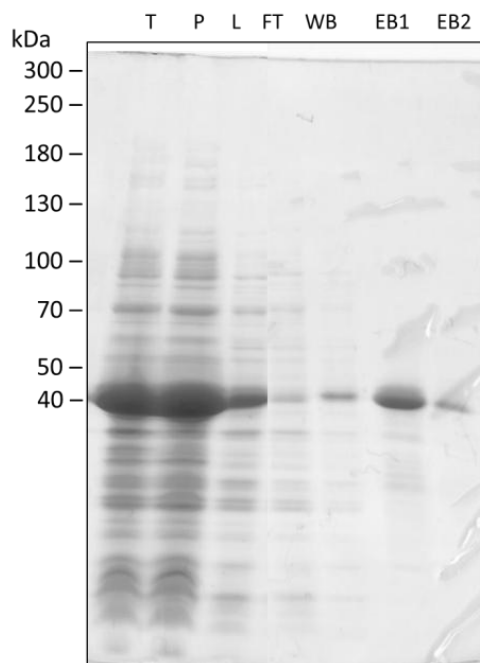
**Obr. 9 Průběh kultivace bakterií *E.coli*.** Optická denzita měřená při 550 nm ( $OD_{550\text{ nm}}$ ) v hodinových intervalech. Kultura byla naředěna na  $OD_{550\text{ nm}} \sim 0,1$ , kultivována při 25 °C a při  $OD_{550\text{ nm}} \sim 0,8$  proběhla indukce exprese proteinu pomocí IPTG (0,25 mM).

Nízká teplota byla zvolena proto, aby příliš rychlá exprese nezpůsobovala nadměrné ukládání produkovaného proteinu do inkluzních tělísek. I přes mírné podmínky indukce byla však velká část proteinu po sonikaci a centrifugaci bakteriální kultury přítomna spíše v buněčné peletě než v buněčném lyzátu (viz obr. 10, str. 55). Pro další experimenty je však množství proteinu v bakteriálním lyzátu dostačující.

Spojení MP-domény s GFP vedlo ke zvýšení exprese požadovaného proteinu a k usnadnění manipulace s proteinem v dalších krocích. Proteinový roztok získal díky GFP viditelnou zelenou barvu.

### 5.3 Purifikace MP-domény

Jako ideální postup pro purifikaci MP-domény z bakteriální kultury byla zvolena purifikace proteinu z bakteriálního lyzátu pomocí chelatační afinitní chromatografie za nativních podmínek. Využit byl His-tag na N-konci rekombinantních proteinů, který chelatuje nikelnaté ionty zakotvené v matrici Ni-NTA v koloně. Vyzkoušena byla taktéž purifikace za denaturačních podmínek z inkluzních tělísek, jelikož většina proteinu při expresi v bakteriích zůstávala v nerozpustné buněčné frakci. Jednotlivé kroky purifikace za denaturačních podmínek jsou na obr. 10.



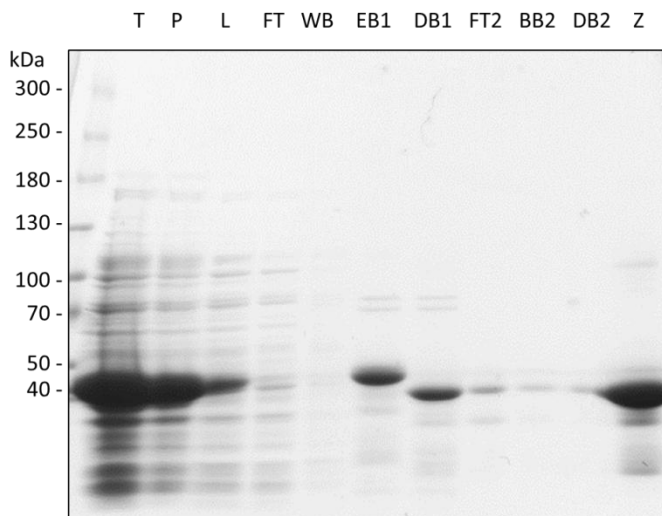
**Obr. 10 Purifikace fúzního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK) za denaturačních podmínek.**

*T – sonikovaná bakteriální suspenze, P – peleta po centrifugaci bakteriální suspenze, L – supernatant po centrifugaci bakteriální suspenze (lyzát), FT – frakce proteklá kolonou po nanesení lyzátu, WB – frakce proteklá kolonou po promytí omývacím pufrem (WB), EB1 – frakce proteklá kolonou po eluci elučním pufrem EB1 (0,2 M imidazol), EB2 – frakce proteklá kolonou po eluci elučním pufrem EB2 (0,3 M imidazol).*

Výtěžek této purifikace byl sice vyšší než u nativní purifikace (cca 1 mg/ml), ale většina proteinu po následné renaturaci tvořila agregáty. Agregáty se po centrifugaci při 150000 x g vyskytovaly v peletě. Množství takto vyrobeného proteinu použitelného pro krystalizaci tedy nebylo vyšší než u nativní purifikace. Proto byla pro další přípravu MP-domény zvolena metoda nativní purifikace, která byla méně náročná na provedení. Protein byl připraven nativní a nemusel podstupovat složitou renaturaci.

Na obr. 11 (str. 56) je zobrazen gel z SDS-PAGE se vzorky z jednotlivých kroků purifikace za nativních podmínek. Pro pufrů používané pro purifikaci bylo zvoleno pH 7.4. Isoelektrický bod fúzního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK) je 6,04, proto bylo zvoleno pH o něco vyšší a především co nejvíce podobné fyziologickému pH, aby byly AMK proteinu stejně nabitě, jako za fyziologických podmínek a nebyly tak narušeny případné elektrostatické interakce s fosfolipidovou dvouvrstvou.

Tímto postupem byl získán proteinový roztok o koncentraci 0,2 mg/ml, který byl následně zahuštěn na koncentraci 0,8 mg/ml.



**Obr. 11 Purifikace fúzního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK) za nativních podmínek.**

*T – sonikovaná bakteriální suspenze, P – peleta po centrifugaci bakteriální suspenze, L – supernatant po centrifugaci bakteriální suspenze (lyzát), FT – frakce proteklá kolonou po nanesení lyzátu, WB – frakce proteklá kolonou po promytí omývacím pufrem (WB), EB1 – frakce proteklá kolonou po eluci elučním pufrem (0.4 M imidazol), DB1 – vzorek po dialýze a štěpení proteasou TEV, FT2 – frakce proteklá kolonou při 2. afinitní chromatografii, BB2 – frakce po vymytí kolony lyzačním pufrem, DB2 – vzorek po druhé dialýze, Z – zahuštěný proteinový roztok.*

## 5.4 Vazba MP-domény na liposomy *in vitro*

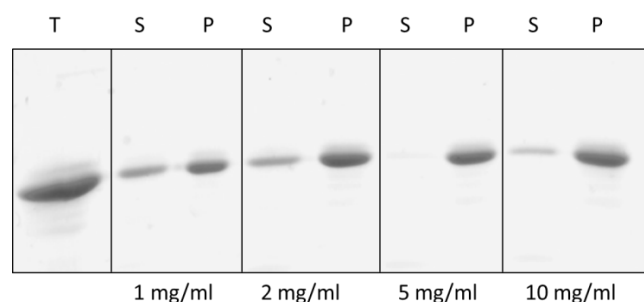
Pro ověření nativního stavu proteinu a jeho správného složení po purifikaci byla využita analýza vazby proteinů na liposomy sedimentační metodou. Liposomy jsou připravovány z Folchovy frakce I, směsi různých fosfolipidů (fosfatidylinositol, fosfatidylserin a další) izolovaných z mozku kravy, ředěním v pufru a sonikací. Lipidy tak vytvoří malé vesikuly – liposomy – tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou.

Vzhledem k tomu, že jedinou známou charakteristikou MP-domény je její schopnost vázat membrány, využili jsme této vlastnosti. Ověřována byla vazba rekombinantní MP-domény do membrán *in vitro*. Proteinový roztok byl centrifugován před přidáním liposomů za stejných podmínek jako následně s liposomy proto, abychom nezískali falešně pozitivní výsledek, kdy by byly v peletě detekovány proteinové agregáty. Takto připravené peptidy v roztoku se



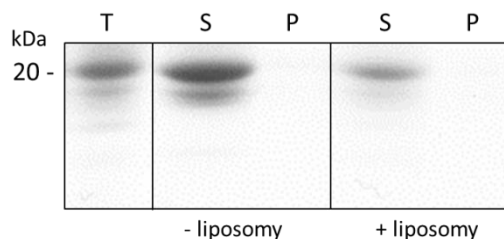
nechaly navázat na liposomy (2 hod., 25 °C) a po centrifugaci (150000 x g, 25 °C, 30 min) byla tato vazba detekována v peletě tvořené sedimentovanými liposomy.

Celá metoda musela být optimalizována. Jako příklad může sloužit použitá koncentrace liposomů. Ačkoliv se v literatuře uvádí různé používané koncentrace liposomů na experimenty podobné našemu<sup>38, 42, 71, 114</sup>, pro náš experiment se osvědčila koncentrace liposomů 5 mg/ml a na cca 100 µg proteinu bylo použito 2,5 mg liposomů (viz obr. 12).



**Obr. 12 Optimalizace koncentrace liposomů pro test vazby proteinu na liposomy.** Při použití stejného množství proteinu se jako nejvhodnější koncentrace liposomů pro maximální vazbu proteinu ukázala koncentrace 5 mg/ml. T – proteinový roztok po centrifugaci (150000 x g, 30 min, 25 °C); S – supernatant (centrifugace při 150000 x g, 30 min, 25 °C po 2 hod inkubaci s liposomy), P – peleta.

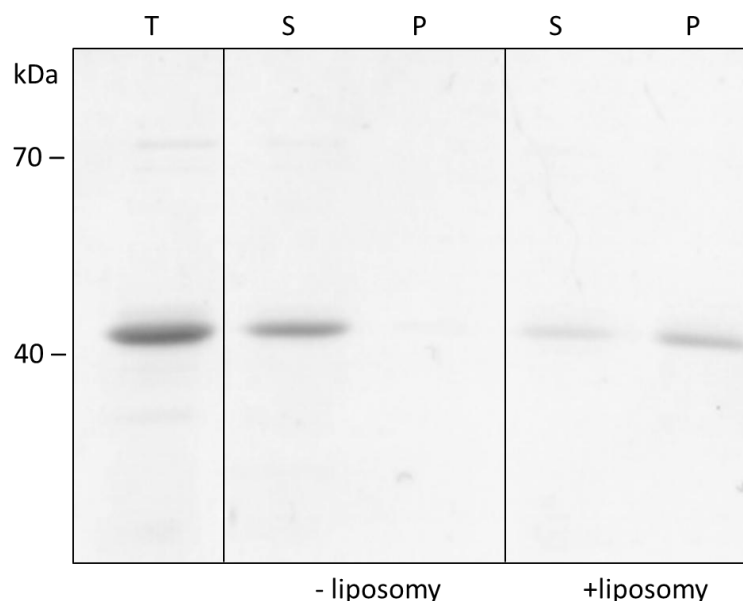
Jelikož byly použity fúzní peptidy MP-domény a GFP, bylo možné vidět pozitivní výsledek pouhým okem, peleta obsahující protein byla zelená. Jako negativní kontrola byl použit samotný protein GFP. Ten však i po druhé centrifugaci s liposomy zůstával v supernatantu a peleta obsahující liposomy zůstávala bílá (viz obr. 13).



**Obr. 13 Testování vazby GFP na liposomy.** GFP se neváže na liposomy a po centrifugaci je protein detekovatelný v supernatantu..

T – proteinový roztok po centrifugaci (150000 x g, 30 min, 25 °C); S – supernatant (centrifugace při 150000 x g, 30 min, 25 °C po inkubaci s liposomy nebo bez nich), P – peleta..

Jako další kontrola byl použit proteinový roztok, který byl inkubován za stejných podmínek jako ostatní vzorky, avšak bez přidání liposomů (byl jen naředěn na polovinu dialyzačním pufrům DB2), a následně centrifugován. Po centrifugaci zůstal tento protein v supernatantu (viz obr. 14).



**Obr. 14 Testování vazby GFP\_MP-domény na liposomy.** Jak je vidět, fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK) se váže na liposomy a po centrifugaci je většina proteinu detekovatelná právě v peletě obsahující liposomy. Pokud se k proteinovému roztoku liposomy nepřidají, zůstává protein po centrifugaci v supernatantu.

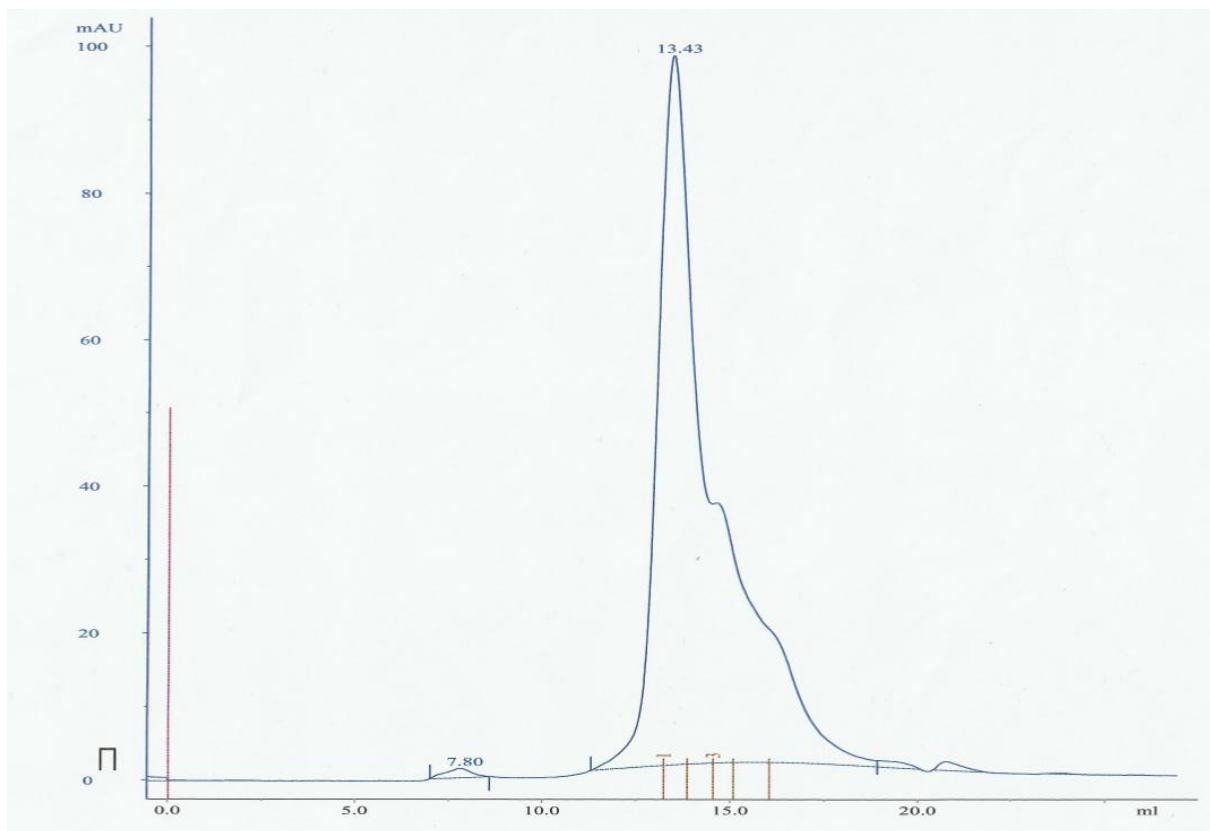
*T* – proteinový roztok po centrifugaci (150000 x g, 30 min, 25 °C); *S* – supernatant (centrifugace při 150000 x g, 30 min, 25 °C po inkubaci s liposomy nebo bez nich), *P* – peleta.

Tímto testem byla ověřena vazba membrán MP-doménou *in vitro*. Dá se předpokládat, že peptid, který je schopný této vazby, je správně složen a nativní. Navíc se tímto experimentem potvrdilo, že fúze s proteinem GFP nebrání vazbě MP-domény do membrán, jak bylo dokázáno také v lidských buněčných liniích HEK293 a HeLa (viz kapitola 5.8).

## 5.5 Gelová permeační chromatografie a analýza pomocí SDS-PAGE

Nepřítomnost agregátů v proteinovém roztoku byla ověřována gelovou permeační chromatografií (provedeno v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie

a biochemie AV ČR, v. v. i.). Na chromatogramu (viz obr. 15) je patrné, že množství agregátů v roztoku (elučním objem 7,8 ml) je velmi nízké.

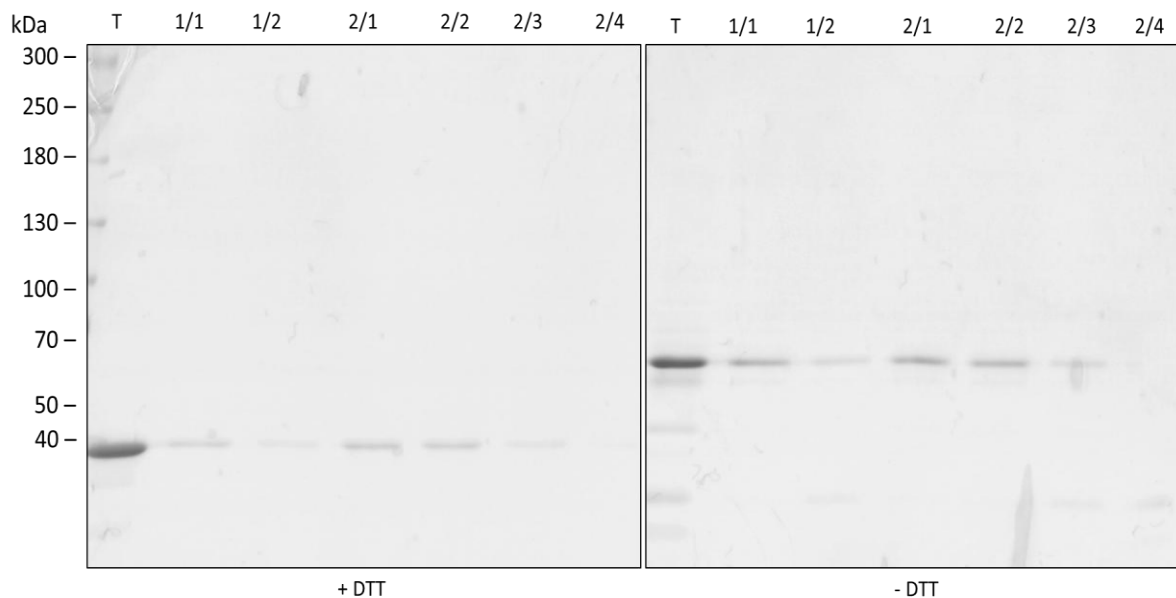


**Obr. 15 Chromatogram z gelové permeační chromatografie fúzního proteinu GFP\_MP97. Hlavní eluční maximum (13,43 ml) odpovídá dle kalibrace molekulové hmotnosti cca 70 kDa. Velmi malá absorbance při elučním objemu 7,8 ml představuje proteinové agregáty.**

*Osa x – eluční objem [ml], osa y – absorbance.*

Hlavní eluční maximum (13,43 ml) odpovídá molekulové hmotnosti cca 70 kDa. Monomerní fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK) by měl mít cca 38 kDa, takže 70 kDa je velikost, která by mohla odpovídat dimeru.

Jednotlivé eluované frakce z gelové permeační chromatografie byly dále analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz obr. 16, str. 60). Při naředění vzorků puřem neobsahujícím redukující činidlo DTT odpovídalo putování proteinů z jednotlivých eluátů gelem velikosti cca 70 kDa. S přídavkem DTT potom proučky na gelu odpovídaly velikosti cca 40 kDa.



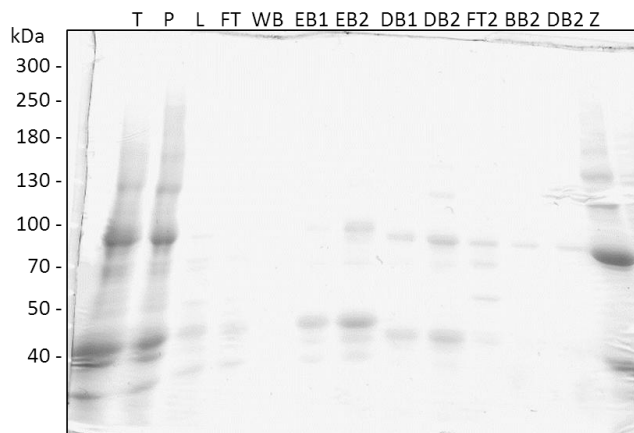
**Obr. 16 SDS-PAGE analýza eluátů z gelové permeační chromatografie.** Na gelu vlevo jsou vzorky připravované ředěním pufrům s DTT Na vpravo jsou vzorky připravené ředěním s pufrům bez DTT,.

T – vzorek zahuštěného proteinu, který byl nanášen na kolonu; 1/1, 1/2 – eluáty z 1. chromatografie; 2/1-4 – eluáty z 2. chromatografie.

## 5.6 Dimerizace MP-domény

Proteinový roztok analyzovaný gelovou permeační chromatografií byl připravován v neredukujícím pufru. Aby byla vyloučena arteficiální dimerizace v důsledku oxidace cysteinů a tvorby cysteinových můstků, následující purifikace proteinu byla provedena v přítomnosti 1 mM DTT. Na gelech z předchozích purifikací nebyly dimery viditelné, protože proteinové vzorky byly připravovány ředěním pufrům s poměrně vysokou koncentrací DTT (0,2 M).

Jak je patrné z obr. 17 (str. 61), v přítomnosti 1 mM DTT, který by měl zabránit tvorbě arteficiálních cysteinových můstků, jsou na gelu z celého procesu purifikace patrné dimery MP-domény.



**Obr. 17 Purifikace fúzního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK) za nativních podmínek v prostředí 1 mM DTT.**

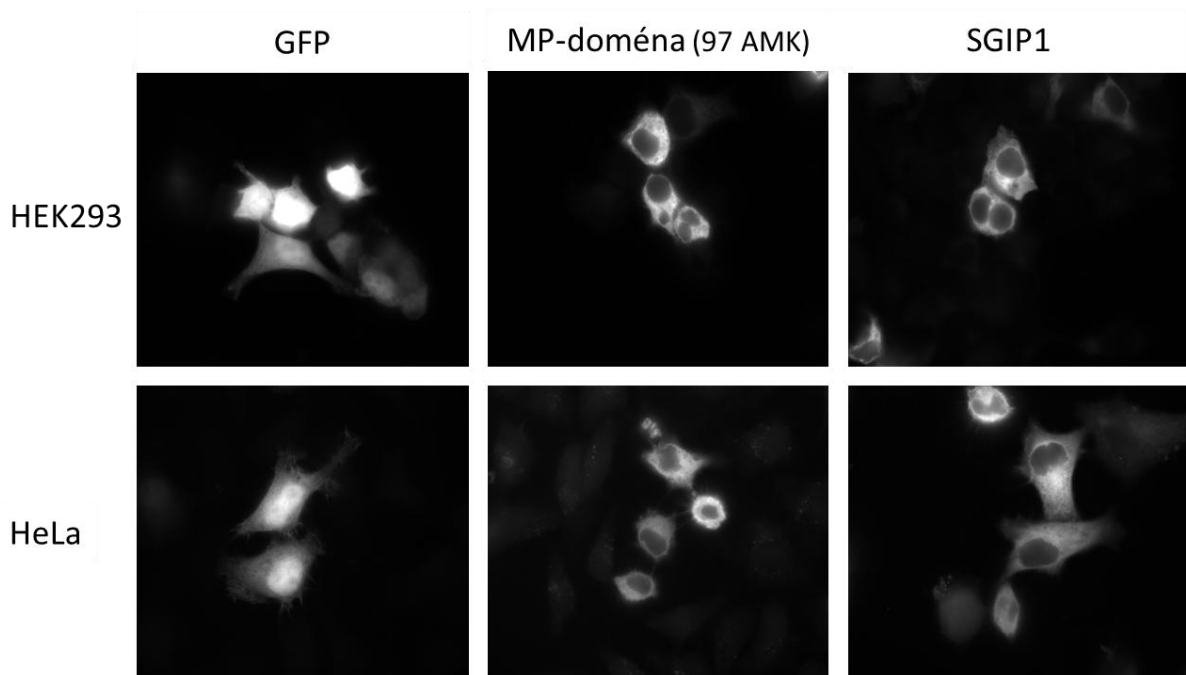
*T – sonikovaná bakteriální suspenze, P – peleta po centrifugaci bakteriální suspenze, L – supernatant po centrifugaci bakteriální suspenze (lyzáát), FT – frakce proteklá kolonou po nanesení lyzáátu, WB – frakce proteklá kolonou po promytí omývacím pufrem (WB), EB1 – frakce proteklá kolonou po eluci elučním pufrem EB1 (0,2 M imidazol), EB2 – frakce proteklá kolonou po eluci elučním pufrem EB2 (0,3 M imidazol), DB1, DB2 – vzorek po dialýze a štěpení proteasou TEV, FT2 – frakce proteklá kolonou při 2. afinitní chromatografii, BB2 – frakce po vymytí kolony lyzačním pufrem, DB2 – vzorek po druhé dialýze, Z – zahuštěný proteinový roztok.*

## 5.7 Zahuštění proteinu

Pro krystalizaci proteinu je potřeba získat roztok o koncentraci proteinu zhruba 1 mg/ml. Při zahušťování proteinu připraveného výše popsaným postupem byl proteinový roztok zahuštěn z koncentrace 0,2 mg/ml na 0,8 mg/ml. Při koncentraci 0,8 mg/ml se začaly v roztoku tvořit precipitáty a zahušťování bylo ukončeno. Po úpravě podmínek purifikace proteinu a zahuštění na požadovanou koncentraci budou následovat prekrystalizační zkoušky.

## 5.8 Vazba MP-domény do membrán *in vivo*

Na obrázcích z fluorescenční mikroskopie lze snadno porovnat intracelulární lokalizaci proteinu GFP a fúzních proteinů GFP\_MP-doména (97 AMK) a GFP\_SGIP1, kterými byly transfekovány buňky HEK293 a HeLa (viz obr. 18, str. 62). Zatímco samotný protein GFP je lokalizován difuzně v celé buňce, spojení tohoto proteinu s 97 aminokyselinami MP-domény proteinu SGIP1 způsobuje změnu lokalizace tohoto proteinu. Fúzní protein GFP\_MP-doména je lokalizován výhradně v plazmatické membráně. Stejně tak je tomu u fúzního proteinu GFP\_SGIP1, který v tomto experimentu sloužil jako pozitivní kontrola.



**Obr. 18 Snímky z fluorescenční mikroskopie.** V horní řadě jsou buňky HEK293, ve spodní potom HeLa. V levém sloupci jsou buňky transfekované rekombinantní DNA kódující protein GFP, uprostřed buňky produkující fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK) a vpravo buňky produkující celý protein fúzní protein GFP\_SGIP1.

Tento experiment potvrzuje, že MP-doména proteinu SGIP1 (přesněji: prvních 97 N-koncových aminokyselin) je zodpovědná, za jeho vazbu do plazmatické membrány. Také je patrné, že fúzní protein GFP na N-konci MP-domény této vazbě nijak nebrání.

## 6 Diskuze

Sekvenční odlišnost MP-domény proteinu SGIP1 od všech doposud známých proteinů přímo vybízí k jejímu studiu. Zajímavým faktem je, že proteiny FCHO1/2, až na N-koncovou doménu velmi podobné proteinu SGIP1, jsou známy tím, že iniciují endocytózu. Dle výsledků z naší laboratoře (nepublikovaná data, viz kapitola 1.6) je však patné, že protein SGIP1 naopak brání internalizaci receptoru CB1. Je tato vlastnost vyvolána právě odlišností N-terminální domény? K zodpovězení této otázky by měla pomoci mimo jiné odhalení struktury této domény. Popsány již byly domény z rodiny BAR (domény I-BAR), které nezpůsobují vchlipování membrány do buňky, ale naopak podněcují tvorbu membránových výběžků<sup>78</sup>. Podobnou vlastnost má i MP-doména<sup>26</sup>. Strukturně jsou domény I-BAR velmi podobné klasickým doménám BAR (tři  $\alpha$ -helixy od každé podjednotky tvořící dimer), avšak tvar jejich dimeru je spíše podobný rovnému válci na rozdíl od konkávně zahnutého dimeru domén BAR.

Rozdílná funkce SGIP1 a FCHO1/2 však může být také způsobena vazbou různých dalších adaptorových proteinů na tyto proteiny. Endocytóza je způsobena mnoha protein-proteinovými interakcemi mezi řadou adaptorových proteinů. Výsledný efekt tak není způsoben jen jediným proteinem, ale právě souhrou interakcí mnoha molekul. To, že SGIP1 zabraňuje internalizaci receptoru CB1 tak nemusí být nutně způsobeno pouze MP-doménou. Nicméně MP-doména zůstává stále zajímavým předmětem bádání právě díky své naprosté sekvenční odlišnosti od doposud známých proteinů. Proto jsme se rozhodli vyřešit její trojrozměrnou strukturu. Je známo, že mnoho proteinů, jež nemají homologní sekvence, přesto sdílí určité podobné strukturní prvky. Je proto možné, že i MP-doména by mohla být tvořena třemi  $\alpha$ -helixy stejně jako domény z rodiny BAR.

Příprava proteinu pro krystalizaci je velmi náročná. Je důležité získat protein o vysoké čistotě a v poměrně vysoké koncentraci, což jsou podmínky velmi odlišné od prostředí, kde se tyto molekuly přirozeně nacházejí.

Vzhledem k doposud nedefinovaným hranicím MP-domény jsme se rozhodli připravit několik rekombinantních proteinů o různé délce, které by mohly tvořit strukturu této domény. Všechny námi připravené proteiny jsou exprimovány v *E.coli*. Pro optimalizaci purifikačního protokolu a další experimenty jsme vybrali fúzní protein GFP\_MP-doména (97 AMK). Tento

protein byl vybrán za základě potvrzení jeho schopnosti vázat se na membrány *in vitro* (viz kapitola 5.4) a *in vivo* (viz kapitola 5.8).

Podařilo se nám připravit relativně čistý protein, jak je patrné z výsledků SDS-PAGE i z chromatogramu z gelové permeační chromatografie. Avšak nepodařilo se nám zatím proteinový roztok zahustit na takovou koncentraci (1 mg/ml), která je potřebná pro krystalizaci. Protein precipituje při koncentracích vyšších než 0,8 mg/ml. Tento nedostatek se nyní snažíme řešit změnou složení pufru, ve kterém byl protein připravován. Chování proteinu v roztoku může ovlivňovat mnoho faktorů jako je pH, iontová síla a přídatné složky (aditiva). Při záměně pufrující složky Tris za fosfátový pufr docházelo téměř k okamžité precipitaci proteinu. Další změny se budou týkat spíše množství soli v purifikačních roztocích. Tím bude ovlivněna iontová síla roztoku a elektrostatické interakce mezi proteiny. Dále je možné měnit pH a složení purifikačních prufů i přidávkem dalších chemikálií jako je například polyethylenglykol a mnoho dalších.

Do budoucna by bylo vhodné připravit také peptid přesně odpovídající popsané MP-doméně s 97 AMK z delší sestřihové varianty<sup>26</sup> – tedy peptid, který má v MP-doméně 28 inzertovaných AMK a je tak o 28 AMK posunutý od námi připravené MP-domény s 97 AMK z kratší sestřihové varianty SGIP1. Těchto 28 inzertovaných AMK by mohlo tvořit například proteinovou kličku, která by však neměla mít vliv na vazbu do membrány. Jak jsme ukázali *in vitro* (viz kapitola 5.4) a *in vivo* (viz kapitola 5.8) i N-koncová doména (přesněji 97 N-koncových AMK) kratší sestřihové varianty SGIP1 váže membrány. Pokud se povede vyřešit strukturu MP-domény i s jistým aminokyselinovým přesahem, mělo by být vidět, kde je přesná hranice MP-domény, například kde končí poslední strukturovaný úsek (např.  $\alpha$ -helix). Tím by se vyřešil nesoulad v popisu této domény, kdy jsou v literatuře uváděné různé délky MP-domény<sup>26, 34</sup>.

Přesný mechanismus vazby MP-domény do membrány zatím nebyl popsán. Protein SGIP1 je klasifikován jako intracelulární protein a proto by se dalo předpokládat, že vazba MP-domény na membránu bude mít charakter povrchových elektrostatických interakcí s fosfolipidy, avšak nemůžeme vyloučit, že MP-doména zasahuje hlouběji do fosfolipidové dvouvrstvy. Jak bylo popsáno v kapitole 1.4.2, adaptorové proteiny mohou tvar membrány ovlivňovat hned několika způsoby. Zajímavé by bylo využití nukleární magnetické rezonance k řešení různých strukturních hybridů MP-domény například v přítomnosti a nepřítomnosti



liposomů. Taková studie by mohla být dalším krokem k objasnění mechanismu působení proteinu SGIP1 na umělé membrány.

Zdá se, že N-koncové peptidy proteinu SGIP1 odpovídající MP-doméně dimerizují, a to nejspíše na základě elektrostatických interakcí a hydrofobního efektu. Vyplyvá to z výsledků purifikace v přítomnosti 1 mM redukčního činidla DTT. I proteiny purifikované v tomto redukujícím odpovídají velikostí dimeru těchto proteinů. Tato vlastnost bude muset být ověřena strukturální studií. Byla by to však další vlastnost, která by MP-doména sdílela s doménami BAR.

Tato strukturální a funkční studie MP-domény je součástí rozsáhlejšího studia funkce proteinu SGIP1 na několika úrovních. Navazující studie popisují molekulární interakce SGIP1 s endocytickými adaptorovými proteiny za účelem objasnění mechanismu interference s endocytózou. Studium vlivu proteinu SGIP1 na kanabinoidní signalizaci je součástí projektu zaměřeného na odhalení role této molekuly při udržování energetické homeostázy.

## 7 Závěr

Připraveny byly rekombinantní DNA, které kódují různě dlouhé N-koncové úseky proteinu SGIP1 odpovídající MP-doméně. Všechny peptidy exprimované v *E. Coli* měly na svém N-konci His-tag oddělený od MP-domény sekvencí rozpoznatelnou proteasou TEV. Tyto peptidy byly připraveny i ve variantě značené zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), taktéž s His-tagem na N-konci. Připraven byl taktéž samotný protein GFP opatřený touto značkou.

Dále byly nalezeny takové podmínky pro expresi a purifikaci fúzního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK), aby byl získán nativní a správně složený protein, který netvoří v roztoku agregáty a je proto vhodný pro krystalizaci a následné strukturní studie. Nepřítomnost agregátů v proteinovém roztoku byla ověřena gelovou permeační chromatografií.

Zaveden byl také test nativního stavu proteinu a správného poskládání sekundárních struktur – vazba proteinu na liposomy a její ověření sedimentační metodou. Tímto testem byla ověřena vazba MP-domény do membrány *in vitro*. Tato vazba byla také potvrzena při heterologní expresi těchto konstruktů *in vivo* v lidských buněčných liniích HEK293 a HeLa.

Protein připravený zmíněnými postupy a zahuštěný na požadovanou hustotu bude moci podstoupit prekrytalizační zkoušky. Pokud budou tyto zkoušky úspěšné, bude následovat krystalizace a vyřešení struktury MP-domény. Na základě výše zmíněných faktů věříme, že odhalení této struktury pomůže objasnit mechanismus působení MP-domény v rámci proteinu SGIP1 a vysvětlit jeho odlišnou roli v endocytóze od proteinů FCHO1/2.

## 8 Seznam použité literatury

1. C. L. Ogden, M. D. Carroll, L. R. Curtin, M. A. McDowell, C. J. Tabak, K. M. Flegal, *J. Am. Med. Assoc.*, **2006**, 295, 1549-1555.
2. Report of a WHO Consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **2000**, 894, 1-253 cit. dle. J. V. van Vliet-Ostaptchouk, M. H. Hofker, Y. T. Van der Schouw, C. Wijmenga, N. C. Onland-Moret, *Obes. Rev.*, **2009**, 10, 593-609.
3. A. M. Prentice, *Br. Med. Bull.*, **1997**, 53, 229-237.
4. J. O. Hill, J. C. Peters, *Science*, **1998**, 280, 1371-1374.
5. J. Erlichman, A. L. Kerbey, W. P. James, *Obes. Rev.*, **2002**, 3, 273-287.
6. K. F. Adams, A. Schatzkin, T. B. Harris, V. Kipnis, T. Mouw, R. Ballard-Barbash, A. Hollenbeck, M. F. Leitzmann, *N. Engl. J. Med.*, **2006**, 355, 763-778.
7. B. Balkau, J. E. Deanfield, J. P. Despres, J. P. Bassand, K. A. Fox, S. C. Smith, Jr., P. Barter, C. E. Tan, L. Van Gaal, H. U. Wittchen, C. Massien, S. M. Haffner, *Circulation*, **2007**, 116, 1942-1951.
8. C. Broberger, *J. Intern. Med.*, **2005**, 258, 301-327.
9. G. J. Morton, D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh, M. W. Schwartz, *Nature*, **2006**, 443, 289-295.
10. I. S. Farooqi, S. O'Rahilly, *Ann. Rev. Med.*, **2005**, 56, 443-458.
11. I. S. Farooqi, J. M. Keogh, G. S. Yeo, E. J. Lank, T. Cheetham, S. O'Rahilly, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, 348, 1085-1095.
12. C. G. Bell, A. J. Walley, P. Froguel, *Nat. Rev. Genet.*, **2005**, 6, 221-234.
13. R. J. Loos, C. Bouchard, *J. Intern. Med.*, **2003**, 254, 401-425.
14. M. W. Schwartz, S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, D. G. Baskin, *Nature*, **2000**, 404, 661-671.
15. C. T. Montague, I. S. Farooqi, J. P. Whitehead, M. A. Soos, H. Rau, N. J. Wareham, C. P. Sewter, J. E. Digby, S. N. Mohammed, J. A. Hurst, C. H. Cheetham, A. R. Earley, A. H. Barnett, J. B. Prins, S. O'Rahilly, *Nature*, **1997**, 387, 903-908.
16. K. Clement, C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gourmelen, C. Dina, J. Chambaz, J. M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougneres, Y. Lebouc, P. Froguel, B. Guy-Grand, *Nature*, **1998**, 392, 398-401.
17. C. Vaisse, K. Clement, B. Guy-Grand, P. Froguel, *Nat. Genet.*, **1998**, 20, 113-114.
18. G. S. H. Yeo, I. S. Farooqi, S. Aminian, D. J. Halsall, R. C. Stanhope, S. O'Rahilly, *Nat. Genet.*, **1998**, 20, 111-112.
19. S. C. Woods, E. C. Lotter, L. D. McKay, D. Porte, *Nature*, **1979**, 282, 503-505.
20. Y. Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J. M. Friedman, *Nature*, **1994**, 372, 425-432.
21. C. J. Hong, P. J. Tsai, C. Y. Cheng, C. K. Chou, H. F. Jheng, Y. C. Chuang, C. N. Yang, Y. T. Lin, C. W. Hsu, I. H. Cheng, S. Y. Chen, S. J. Tsai, Y. J. Liou, Y. S. Tsai, *PLoS One*, **2010**, 5, 1-11.

22. G. S. Barsh, M. W. Schwartz, *Nat. Rev. Genet.*, **2002**, 3, 589-600.
23. J. Trevaskis, K. Walder, V. Foletta, L. Kerr-Bayles, J. McMillan, A. Cooper, S. Lee, K. Bolton, M. Prior, R. Fahey, K. Whitecross, G. J. Morton, M. W. Schwartz, G. R. Collier, *Endocrinology*, **2005**, 146, 3757-3764.
24. E. Shafrir, A. Gutman, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **1993**, 4, 83-99.
25. K. R. Walder, R. P. Fahey, G. J. Morton, P. Z. Zimmet, G. R. Collier, *Int. J. Exp. Diabetes Res.*, **2000**, 1, 177-184.
26. A. Uezu, A. Horiuchi, K. Kanda, N. Kikuchi, K. Umeda, K. Tsujita, S. Suetsugu, N. Araki, H. Yamamoto, T. Takenawa, H. Nakanishi, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 26481-26489.
27. H. E. M. Stimpson, C. P. Toret, A. T. Cheng, B. S. Pauly, D. G. Drubin, *Mol. Biol. Cell*, **2009**, 20, 4640-4651.
28. K. R. Schuske, J. E. Richmond, D. S. Matthies, W. S. Davis, S. Runz, D. A. Rube, A. M. van der Blik, E. M. Jorgensen, *Neuron*, **2003**, 40, 749-762.
29. N. Ringstad, H. Gad, P. Low, G. Di Paolo, L. Brodin, O. Shupliakov, P. De Camilli, *Neuron*, **1999**, 24, 143-154.
30. A. Schmidt, M. Wolde, C. Thiele, W. Fest, H. Kratzin, A. V. Podtelejnikov, W. Witke, W. B. Huttner, H. D. Soling, *Nature*, **1999**, 401, 133-141.
31. N. Ringstad, Y. Nemoto, P. De Camilli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, 94, 8569-8574.
32. P. Verstreken, T. W. Koh, K. L. Schulze, R. G. Zhai, P. R. Hiesinger, Y. Zhou, S. Q. Mehta, Y. Cao, J. Roos, H. J. Bellen, *Neuron*, **2003**, 40, 733-748.
33. K. D. Micheva, A. R. Ramjaun, B. K. Kay, P. S. McPherson, *FEBS Lett.*, **1997**, 414, 308-312.
34. H. D. Li, W. X. Liu, M. Michalak, *PLoS One*, **2011**, 6, 1-11.
35. K. Takei, V. I. Slepnev, V. Haucke, P. De Camilli, *Nat. Cell Biol.*, **1999**, 1, 33-39.
36. B. J. Peter, H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. G. Butler, P. R. Evans, H. T. McMahon, *Science*, **2004**, 303, 495-499.
37. T. Itoh, K. S. Erdmann, A. Roux, B. Habermann, H. Werner, P. De Camilli, *Dev. Cell*, **2005**, 9, 791-804.
38. K. Tsujita, S. Suetsugu, N. Sasaki, M. Furutani, T. Oikawa, T. Takenawa, *J. Cell Biol.*, **2006**, 172, 269-279.
39. T. Itoh, P. De Camilli, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.*, **2006**, 1761, 897-912.
40. Y. Kamioka, S. Fukuhara, H. Sawa, J. Nagashima, M. Masuda, M. Matsuda, N. Mochizuki, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 40091-40099.
41. D. J. Owen, B. M. Collins, P. R. Evans, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2004**, 20, 153-191.
42. M. Masuda, S. Takeda, M. Sone, T. Ohki, H. Mori, Y. Kamioka, N. Mochizuki, *EMBO J.*, **2006**, 25, 2889-2897.

43. A. Reider, S. L. Barker, S. K. Mishra, Y. J. Im, L. Maldonado-Baez, J. H. Hurley, L. M. Traub, B. Wendland, *EMBO J.*, **2009**, 28, 3103-3116.
44. I. G. Mills, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2007**, 18, 459-470.
45. H. T. McMahon, E. Boucrot, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2011**, 12, 517-533.
46. T. Kirchhausen, *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 699-727.
47. J. S. Bonifacino, J. Lippincott-Schwartz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, 4, 409-414.
48. B. J. Nichols, J. Lippincott-Schwartz, *Trends Cell Biol.*, **2001**, 11, 406-412.
49. B. Nichols, *J. Cell Sci.*, **2003**, 116, 4707-4714.
50. S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature*, **2003**, 422, 37-44.
51. T. Kirchhausen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2000**, 1, 187-198.
52. V. I. Slepnev, P. De Camilli, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2000**, 1, 161-172.
53. C. J. Smith, B. M. F. Pearse, *Trends Cell Biol.*, **1999**, 9, 335-338.
54. J. A. Ybe, F. M. Brodsky, K. Hofmann, K. Lin, S. H. Liu, L. Chen, T. N. Earnest, R. J. Fletterick, P. K. Hwang, *Nature*, **1999**, 399, 371-375.
55. E. ter Haar, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, 97, 1096-1100.
56. M. T. Drake, L. M. Traub, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 28700-28709.
57. S. K. Mishra, M. J. Hawryluk, T. J. Brett, P. A. Keyel, A. L. Dupin, A. Jha, J. E. Heuser, D. H. Fremont, L. M. Traub, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 46191-46203.
58. G. J. Praefcke, M. G. Ford, E. M. Schmid, L. E. Olesen, J. L. Gallop, S. Y. Peak-Chew, Y. Vallis, M. M. Babu, I. G. Mills, H. T. McMahon, *EMBO J.*, **2004**, 23, 4371-4383.
59. M. G. Ford, I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans, H. T. McMahon, *Nature*, **2002**, 419, 361-366.
60. M. G. Ford, B. M. Pearse, M. K. Higgins, Y. Vallis, D. J. Owen, A. Gibson, C. R. Hopkins, P. R. Evans, H. T. McMahon, *Science*, **2001**, 291, 1051-1055.
61. M. A. Edeling, C. Smith, D. Owen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2006**, 7, 32-44.
62. K. A. Beck, J. H. Keen, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 4437-4441.
63. J. E. Murphy, I. T. Pleasure, S. Puszkin, K. Prasad, J. H. Keen, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 4401-4408.
64. J. Hirst, N. A. Bright, B. Rous, M. S. Robinson, *Mol. Biol. Cell*, **1999**, 10, 2787-2802.
65. L. M. Traub, B. Wendland, *Nature*, **2010**, 465, 556-557.
66. Y. Saheki, P. De Camilli, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2012**, 4, 1-30.
67. A. Frost, V. M. Unger, P. De Camilli, *Cell*, **2009**, 137, 191-196.
68. M. Masuda, N. Mochizuki, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2010**, 21, 391-398.
69. C. David, M. Solimena, P. De Camilli, *FEBS Lett.*, **1994**, 351, 73-79.
70. W. M. Henne, E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal, H. T. McMahon, *Science*, **2010**, 328, 1281-1284.
71. W. M. Henne, H. M. Kent, M. G. Ford, B. G. Hegde, O. Daumke, P. J. Butler, R. Mittal, R. Langen, P. R. Evans, H. T. McMahon, *Structure*, **2007**, 15, 839-852.

72. A. Shimada, H. Niwa, K. Tsujita, S. Suetsugu, K. Nitta, K. Hanawa-Suetsugu, R. Akasaka, Y. Nishino, M. Toyama, L. Chen, Z. J. Liu, B. C. Wang, M. Yamamoto, T. Terada, A. Miyazawa, A. Tanaka, S. Sugano, M. Shirouzu, K. Nagayama, T. Takenawa, S. Yokoyama, *Cell*, **2007**, 129, 761-772.
73. A. Uezu, K. Umeda, K. Tsujita, S. Suetsugu, T. Takenawa, H. Nakanishi, *Genes Cells*, **2011**, 16, 868-878.
74. Q. Wang, M. V. Navarro, G. Peng, E. Molinelli, S. L. Goh, B. L. Judson, K. R. Rajashankar, H. Sondermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2009**, 106, 12700-12705.
75. H. T. McMahon, J. L. Gallop, *Nature*, **2005**, 438, 590-596.
76. T. Itoh, T. Takenawa, *Prog. Lipid Res.*, **2009**, 48, 298-305.
77. S. Suetsugu, K. Toyooka, Y. Senju, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2010**, 21, 340-349.
78. J. C. de Groot, K. Schluter, Y. Carius, C. Quedenau, D. Vingadassalom, J. Faix, S. M. Weiss, J. Reichelt, C. Standfuss-Gabisch, C. F. Lesser, J. M. Leong, D. W. Heinz, K. Bussow, T. E. Stradal, *Structure*, **2011**, 19, 1294-1306.
79. S. J. Royle, L. Lagnado, *Traffic*, 2010, **11**, 1489-1497.
80. S. J. Royle, L. Lagnado, *J. Physiol.*, **2003**, 553, 345-355.
81. J. Dittman, T. A. Ryan, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2009**, 25, 133-160.
82. C. Li, P. M. Jones, S. J. Persaud, *Pharmacol. Therapeut.*, **2011**, 129, 307-320.
83. T. Harkany, K. Mackie, P. Doherty, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2008**, 18, 338-345.
84. C. J. Hillard, K. M. Weinlander, K. L. Stuhr, *Neuroscience*, **2012**, 204, 207-229.
85. R. Mechoulam, L. A. Parker, *Annu. Rev. Psychol.*, **2013**, 64, 21-47.
86. V. Di Marzo, I. Matias, *Nat. Neurosci.*, **2005**, 8, 585-589.
87. S. Munro, K. L. Thomas, M. Abushaar, *Nature*, **1993**, 365, 61-65.
88. M. Begg, P. Pacher, S. Batkai, D. Osei-Hyiaman, L. Offertaler, F. M. Mo, H. Liu, G. Kunos, *Pharmacol. Therapeut.*, **2005**, 106, 133-145.
89. M. L. De Jesus, J. Salles, J. J. Meana, L. F. Callado, *Neuroscience*, **2006**, 140, 635-643.
90. W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, *Science*, **1992**, 258, 1946-1949.
91. K. Mackie, W. A. Devane, B. Hille, *Mol. Pharmacol.*, **1993**, 44, 498-503.
92. A. C. Porter, C. C. Felder, *Pharmacol. Ther.*, **2001**, 90, 45-60.
93. C. Quarta, R. Mazza, S. Obici, R. Pasquali, U. Pagotto, *Trends Mol. Med.*, **2011**, 17, 518-526.
94. V. Chevaleyre, K. A. Takahashi, P. E. Castillo, *Ann. Rev. Neurosci.*, **2006**, 29, 37-76.
95. T. F. Freund, I. Katona, D. Piomelli, *Physiol. Rev.s*, **2003**, 83, 1017-1066.
96. M. Kano, T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimotodani, M. Uchigashima, M. Watanabe, *Physiol. Rev.*, **2009**, 89, 309-380.
97. C. M. Williams, P. J. Rogers, T. C. Kirkham, *Physiol. Behav.*, **1998**, 65, 343-346.
98. C. M. Williams, T. C. Kirkham, *Psychopharmacology*, **1999**, 143, 315-317.
99. S. Hao, Y. Avraham, R. Mechoulam, E. M. Berry, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 392, 147-156.

100. J. Simiand, M. Keane, P. E. Keane, P. Soubrie, *Behav. Pharmacol.*, **1998**, 9, 179-181.
101. G. Colombo, R. Agabio, G. Diaz, C. Lobina, R. Reali, G. L. Gessa, *Life Sci.*, **1998**, 63, 113-117.
102. N. E. Rowland, M. Mukherjee, K. Robertson, *Psychopharmacology*, **2001**, 159, 111-116.
103. T. C. Kirkham, C. M. Williams, F. Fezza, V. Di Marzo, *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 136, 550-557.
104. I. Matias, L. Cristino, V. Di Marzo, *J. Neuroendocrinol.*, **2008**, 20 Suppl 1, 100-109.
105. B. Horvath, P. Mukhopadhyay, G. Hasko, P. Pacher, *Am. J. Pathol.*, **2012**, 180, 432-442.
106. V. Di Marzo, S. K. Goparaju, L. Wang, J. Liu, S. Batkai, Z. Jarai, F. Fezza, G. I. Miura, R. D. Palmiter, T. Sugiura, G. Kunos, *Nature*, **2001**, 410, 822-825.
107. A. J. Scheen, N. Paquot, *Best Pract. Res. Cl. En.*, **2009**, 23, 103-116.
108. C. Hsieh, S. Brown, C. Derleth, K. Mackie, *J. Neurochem.*, **1999**, 73, 493-501.
109. C. Leterrier, D. Bonnard, D. Carrel, J. Rossier, Z. Lenkei, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 36013-36021.
110. L. Martini, M. Waldhoer, M. Pusch, V. Kharazia, J. Fong, J. H. Lee, C. Freissmuth, J. L. Whistler, *FASEB J.*, **2007**, 21, 802-811.
111. O. Keren, Y. Sarne, *Brain Res.*, **2003**, 980, 197-205.
112. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons: USA, **2001**.
113. *Protein electrophoresis applications guide*; Hoefer Scientific Instruments: USA, **1994**.
114. K. Farsad, N. Ringstad, K. Takei, S. R. Floyd, K. Rose, P. De Camilli, *J. Cell Biol.*, **2001**, 155, 193-200.

## Příloha 1

Proteinová sekvence fúzního proteinu GFP\_MP-doména (97 AMK). Zeleně je vyznačena proteinová sekvence GFP.

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPV  
PWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEV  
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI  
EDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGI  
TLGMDELYKWIRMMEGLKKRTRKAFGIRKKEKDTDSTGSPDRDGMQSPHEPPYHSK  
AECAREGGKKASKKSNAPNGFYAEIDWERYNSPELDEEGYSIRPEEPGSTK



## Příloha 2

Proteinová sekvence SGIP1 (*Mus musculus*) dle databáze NCBI.

MMEGLKKRTRKAFGIRKKEKDTDSTGSPDRDGMQPSPEPPYHKAECAREGGKKASKKSNAPNGFYAE  
IDWERYNSPELDEEGYSIRPEEPGSTKGKHFYSSSESEEEEEESHKKFNKIKPLQSKDVLKNAATVDELK  
ASIGNIALSPSPVRKSPRRSPGAIKRNLSSSEVARPRRSTPTPELTSKKPLDDTLALAPLFGPPLESADF  
EQKTEVLLDQPEIWGSGQPMNPSTESPELARPFPTGTPPPLPPKTVPATPPRTGSPPLTVATGNDQAATEA  
KIEKLPSISDLDSIFGPVLSPKSVAVNTEEKWVHFSASPEHVTPELTPREQVVTPPAASDIPADSPAPA  
PPGPTGSAGPPGPPGPRHVPSPLNLEEVQKKVAEQTFIKDDYLETLSSPKECGLGQRATPPPPPPPTYRT  
VVSSPGPGSGSGTGTTSGASSPARPATPLVPCSTTPPPPPRPPSRPKLPPGKPGVDVSRPFSPPIHSS  
SPPPIAPLARAESTSSISSTNSLSAATTPTVGSSRGPSPMTMGAQDTLPVAAAFTETVNAYFKGADPSKC  
IVKITGEMVLSFPAGITRHFANNPSPAALTFRVVNSSRLEHVLNPNQLCCDNTQNDANTKEFWVNMPNL  
MTHLKKVSEQKPQATYYNVDMMLKYQVSAQGIQSTPLNLAVNWRCEPASTDLRIDYKYNTDAMSTAVALLN  
VQFLVPIDGGVTKLQAVLPPAVWNAEQQRILWKIPDISQKSENGGVGSLLARFQLSEGPSKPSPLVVQFT  
SEGSTLSGCDIELVGAGYRFSLIKRRFAAGKYLDN

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka