

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetik eukaryot



**Bc. Lenka Chlupisová**

**Funkcia proteínu SGIP1 v regulácii Kanabinoidného receptora 1**

*The role of protein SGIP1 in regulation of Cannabinoid Receptor 1*

Diplomová práca

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

Ústav molekulárnej genetiky Akadémie vied Českej republiky, v.v.i.

Praha 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Lenka Chlupisová

## **Pod'akovanie:**

Chcela by som poďakovať v prvom rade celému kolektívu Oddelenia molekulárnej farmakologie za cenné rady, podporu a vytváranie príjemnej atmosféry na pracovisku. Ďalej by som chcela poďakovať môjmu školiteľovi Doc. MUDr. Jaroslavu Blahošovi, Ph. D. za to, že mi umožnil podieľať sa na takom zaujímavom projekte. Na záver ďakujem môjmu priateľovi Peťovi, mojej rodine a kamarátom, že tu boli stále pre mňa a bola mi poskytnutá obrovská podpora z ich strany, bez ktorej by som to len ťažko zvládla.

# Obsah

Zoznam použitých skratiek	7
Abstrakt	9
Abstract	10
Úvod	11
1. Literárny prehľad	13
1.1 Bunková signalizácia	13
1.2 Rceptory asociované s G proteínmi (GPCR)	15
1.2.1 G proteínová signalizácia	18
1.2.2 Funkčná selektivita	19
1.2.3 Desenzitizácia GPCR	20
1.2.4 Internalizácia GPCR	20
1.2.4.1 Klathrínová endocytóza	21
1.2.5 Konštitutívna aktivita GPCR	25
1.3 Endokanabinoidný systém	25
1.3.1 Štruktúra kanabinoidného receptora (CB1R)	28
1.3.2 Signalizácia CB1R	28
1.4 Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like (endophilin) interacting protein 1 (SGIP1)	30
2. Cieľ práce	33
3. Materiál	34
3.1 Chemikálie	34
3.2 Kultivačné médiá	35
3.2.1 Kultivácia ľudských bunkových línií (HEK 293)	32
3.2.2 Kultivácia baktérií (Dh $\alpha$ )	32
3.2.3 Kalcium-fosfát tranfekcia ľudských bunkových línií	32
3.3 Bunkové kmene	36
3.4 Protilátky	36
3.5 Pufre a roztoky	36
3.5.1 Izolácia DNA („Qiagen Plasmid Midi Kit“)	36
3.5.2 Pufre pre restričné štiepenie, PCR, ligáciu a agarózovú elektroforézu	37
3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovom gély v prítomnosti	

dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) a blotting na nitrocelulóзовú membránu	37
3.5.4 Transfekcia ľudských bunkových línií	38
3.6 Gély pre horizontálnu agarózovú elektroforézu a SDS-PAGE	38
3.7 Oligonukleotidy	39
3.8 Restričné endonukleázy a iné enzýmy	39
3.9 Použité expresné vektory	40
3.10 Prístroje	40
4. Metódy	42
4.1 Transformácia baktérií <i>Escherichia coli</i> (DHα)	42
4.2 Glycerové stoky	42
4.3 Maloobjemová a veľkoobjemová izolácia DNA	42
4.3.1 Maloobjemová izolácia DNA	42
4.3.2 Veľkoobjemová izolácia DNA	43
4.4 Purifikácia DNA	44
4.5 Restričné štiepenie endonukleázami	44
4.6 Polymerázová rešazová reakcia (PCR)	44
4.7 Horizontálna agarózovú elektroforéza	45
4.8 Vyhodnotenie koncentrácie DNA v roztoku spektrofotometrom	46
4.9 Ligácia	46
4.10 Sekvenovanie DNA	46
4.11 Transfekcia buniek	46
4.12 Pasáž buniek	47
4.13 Western blott (Imunoblott)	47
4.13.1 Príprava proteínových vzoriek	47
4.13.2 SDS-PAGE	48

4.13.3 Western transfer blott	48
4.14. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	49
5. Výsledky	50
5.1 Vytvorenie rekombinantných DNA konštruktov	50
5.1.1 Použitá DNA a postup klonovania	51
5.2 Western Blott	55
5.3 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	57
6. Diskusia	60
7. Záver	63
8. Použitá literatúra	64

## Zoznam použitých skratiek:

%obj.	objemové percentá
AMK	aminokyselina
AC	adenylcykláza
AP2	názov proteínu z angl. assembly polypeptide 2
APS	peroxodisíran amonný (z anglického „ammonium persulphate“)
BAR	z anglického „Bin/amphiphysin/Rvs“
BSA	hovädzie sérum albumín
cAMP	cyklický adenosinmomofofšát
CB1R	kanabinoidný receptor 1
CNS	centrálna nervová sústava
DAG	diacylglycerol
DMEM	kultivačné médium „Dulbecco´s Modified Eagle Medium“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
eps15	epidermálny rastový faktor 15
F-BAR	z angl. Fer/Cip4 homology domain only-Bin/amphiphysin/Rvs
FCHO	z anglického „Fer/Cip4 homology domain only“
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GDP	guanosindifosfát
GPCR	receptory asociované s G-proteínami
G-proteín	proteín viazajúci di(tri)fosfát
GRK	kináza asociovaná s G-proteínami
GTP	guanosintrifosfát
HEK293	ľudské embryonálne obličkové bunky
LB	kultivačné médium (názov podľa Luria-Bertani)
M	molárny (mol/l)
MAPK	mitogénmi aktivovaná proteín kináza
mRNA	mediátorová RNA
PBS	fosfátový pufor ( z angl. „phosphate buffered saline“)
PCR	polymerázová reťazová reakcia

PKA	proteínkináza A
PKC	proteínkináza C
PLC	fosfolipáza C
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minútu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovom gély v prítomnosti SDS
SGIP1	z anglického „src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“
TAE	Tris-acetátový pufor s EDTA (z anglického „Tris-acetate-EDTA“)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin
THC	$\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WIN	WIN 55,212-2; (R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate



## **Abstrakt:**

Vzájomná komunikácia buniek v ľudskom organizme zabezpečuje správny chod základných mechanizmov nevyhnutných pre život jedinca a zachovanie homeostázy celého organizmu. Takáto komunikácia je zabezpečená rôznymi typmi prenosu signálu z recipientnej bunky do bunky donorovej v závislosti od miesta výskytu a typu komunikujúcich buniek. Jedným z takýchto typov je signalizácia prostredníctvom receptorových molekúl nachádzajúcich sa na povrchu alebo vnútri bunky prijímajúcej signál. Takéto receptory prijímajú a viažu na seba signálnu molekulu vo forme ligandu pričom dochádza k aktivácii receptora a následnému spusteniu intracelulárnych signálnych dráh. Medzi najpočetnejšie zastúpené receptory v eukaryotickom organizme patria receptory asociované s G-proteínami, kedy sa jedná o signalizáciu zabezpečenú aktiváciou intracelulárneho G-proteínového komplexu a ide o jeden z hlavných mechanizmov vyskytujúcich sa v neuronálnej signalizácii a prenosu signálu vo forme neurotransmiteru. Reguláciu množstva receptorov na povrchu bunky a transport signálnej molekuly do intracelulárnych priestorov bunky je zabezpečený mechanizmom endocytózy, kedy dochádza k internalizácii receptora s naviazaným ligandom do cytoplazmy. Jedným z najpreštudovanejších mechanizmov je endocytóza sprostredkovaná klathrínom, kedy sa do procesu endocytózy zapájajú rozličné intracelulárne molekuly a dochádza k ich vzájomnej interakcii. Medzi takéto molekuly patria aj takzvané adaptorové proteíny, ktoré sa uplatňujú pri správnej tubulácii membrány alebo zabezpečujú špecifickú väzbu k receptoru s naviazaným ligandom. Nedávno bol objavený proteín s názvom „Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor- Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“ (SGIP1), o ktorom sa predpokladá že ovplyvňuje priebeh endocytózy kanabinoidného receptora 1 (CB1R) a teda môže byť súčasťou endokanabinoidného systému v mozgových bunkách. Po tom, ako bola dokázaná jeho zvýšená hladina v hypothalamu pieskomila trpiaceho obezitou, sa stal tento proteín zaujímavým kandidátom na možné terapeutické využitie v liečbe aj tohto extrémne rozšíreného ochorenia. Cieľom tejto práce je podrobnejšie preskúmanie vplyvu proteínu SGIP1 na endokanabinoidnú signalizáciu a jeho potenciálne zapojenie sa v mechanizme endocytózy. Preto budú vytvorené rekombinantné konštrukty SGIP1 s obmenami jeho rozličných motívov čo nám napomôže presnejšie charakterizovať ich funkciu vo vplyve na internalizáciu CB1R.

**Kľúčové slová:** Endokanabinoidná signalizácia, internalizácia, GPCR

## **Abstract:**

Mutual cell communication in the human body ensures the proper functioning of the essential mechanisms necessary for the life of the individual and preserving the homeostasis of the whole organism. Such communication is established by various types of signal transmission from the recipient cell to the donor cell, depending on the location and type of communicating cells. One such type is signalization through receptor molecules found on the surface or within the cell receiving the signal. These receptors receive the signal molecule in the form of a ligand and bind it to themselves, while activating the receptor and then triggering the intracellular signaling pathways. The most widely represented receptors in the eukaryotic organism include G-protein-coupled receptors, which represent signaling ensured by activation of the intracellular G-protein complex, and one of the main mechanisms occurring in neuronal signaling and signal transmission in the form of a neurotransmitter. Regulation of the amount of receptors on the surface of the cell and transport of the signal molecule into the intracellular spaces of the cell is ensured by the mechanism of endocytosis, whereby internalization of the ligand-bound receptor in the cytoplasm occurs. One of the most researched mechanisms is clathrin-mediated endocytosis where various intracellular molecules are involved in the endocytosis process and interact with each other. Such molecules include so-called adaptor proteins that are useful for correct membrane tubulation or provide specific binding to the ligand-bound receptor. Recently-found protein called "Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1" (SGIP1) is believed to affect the course of cannabinoid receptor 1 (CB1R) endocytosis, and therefore could be a component of endocannabinoid system in brain cells. After its elevated level in hypothalamic of gerbil suffering from obesity has been proven, this protein has become an interesting candidate for possible therapeutic use in the treatment of this extremely widespread disease. The aim of this thesis is to examine in more detail the influence of SGIP1 protein on endocannabinoid signaling and its potential involvement in the mechanism of endocytosis. Therefore, recombinant constructs SGIP1 with variations of its various motifs will be created to help us more accurately characterize their function in the effect of CB1R internalization.

**Key words:** Endocannabinoid signaling, internalization, GPCR

# 1 ÚVOD

Nevyhnutnou súčasťou zdravého fungovania každého organizmu je jeho správna regulácia bunkových procesov, ktoré sa v ňom odohrávajú. K takejto regulácii je nutná vzájomná komunikácia medzi jednotlivými bunkami organizmu, ktorá im umožňuje následne správne reagovať na signály z okolitého prostredia a na aktuálne podmienky. Schopnosť buniek správne odpovedať na vonkajší stimulus je potrebná pre životu dôležité deje v organizme, ako je napríklad regenerácia poškodeného tkaniva, imunitná odpoveď, proliferácia buniek ale aj celková homeostáza organizmu (Vlahopolous S.A. a kol., 2015).

Bunky medzi sebou komunikujú rôznymi mechanizmami v závislosti od konkrétneho typu bunky a jej výskytu v organizme. Pokiaľ sú bunky fyzicky spojené a priliehajú svojimi membránami k sebe, je signalizujúca bunka schopná priamo integrovať signál do vnútra cieľovej bunky cez plazmatickú membránu. Ak ale bunky spojené nie sú a majú medzi sebou určitú vzdialenosť, signalizujúca bunka vysiela signál vo forme chemickej molekuly (ligandu) do extracelulárneho priestoru, ktorým táto signálna molekula putuje k cieľovej bunke, kde sa viaže na špecifickú bielkovinu označovanú ako receptor. Po vytvorení komplexu ligand-receptor cieľová bunka odpovedá na signál formou aktivácie kaskády dejov vo svojom intracelulárnom prostredí (Greenwald a kol. 1998).

Medzi najpočetnejšie sa vyskytujúce receptory v eukaryotickom organizme patria receptory asociované s G-proteínami (GPCR). Tento typ receptorov má charakteristickú štruktúru pozostávajúcu z extracelulárneho N-terminálneho konca, siedmych transmembránových domén a intracelulárneho C-terminálneho konca (Bjarnadóttir a kol., 2006). Po ich aktivácii špecifickým ligandom sa následne viažu s G-proteínami v intracelulárnom priestore bunky, cez ktoré sú schopné aktivovať kaskádu dejov a previesť signál až k efektorovým molekulám (Trzaskowski a kol., 2012). Po podrobnejšom pochopení mechanizmu signálneho prenosu cez GPCR sa tento typ receptorov rýchlo stal predmetom veľkého množstva terapeutických cieľov.

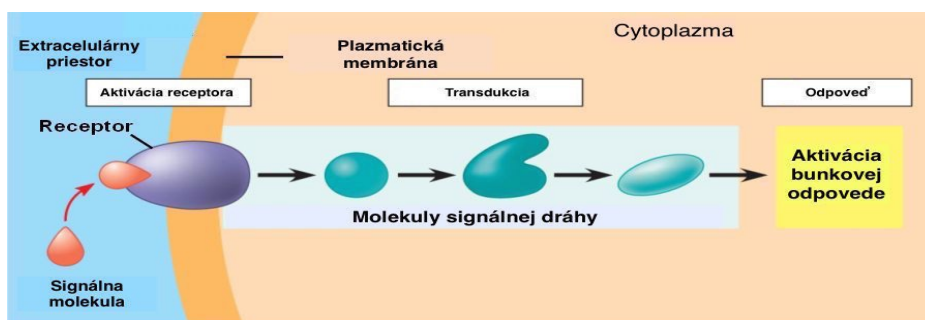
Z tejto rodiny receptorov je jedným z vhodných kandidátov na terapeutické využitie receptor pre pomerne známu psychoaktívnu zložku rastliny Konope siate (*Cannabis sativa*), s názvom D9-tetrahydrocannabinol (D9-THC). Vďaka jeho ligandu dostal pomenovanie kanabinoídny receptor 1 (CB1R), pričom bolo zistené, že je jeho expresia hlavne lokalizovaná v centrálnom nervovom systéme (CNS) ale aj v niektorých

periférnych orgánoch. CB1R patrí medzi hlavné komponenty endokanabinoidného systému (ECS) aj spolu s druhým receptorom pre kanabinoidy, ktorý dostal názov kanabinoidný receptor 2 (CB2R). Po objavení endokanabinoidného systému bola veľkým prelomovým bodom vo vede následná identifikácia komponent zúčastňujúcich sa tejto signalizácie (Walsh *akol.*, 2003). Medzi hlavné zložky ECS boli zaradené endokanabinoidy a enzýmy pre ich degradáciu a syntézu, gény kódujúce kanabinoidné receptory 1 a 2 (CB1R a CB2R), kanabinoidy a marihuana. Tento systém sa stal zaujímavým pre terapeutické ciele aj z toho dôvodu, že práve rôzne varianty génov pre CB1R boli lokalizované u pacientov trpiacich radou ochorení ako sú osteoporóza, posttraumatická stresová porucha (PTSD), porucha pozornosti sprevádzaná hyperaktivitou (ADHD), depresia, drogová závislosť alebo obezita (Aizpurua-Olaizola, 2016). Preto je v našom záujme čo najpodrobnejšie preskúmať endokanabinoidnú signálnu dráhu a hlavne ligandy, ktoré túto signalizáciu aktivujú aby sme ich neskôr vedeli využiť pre terapeutickú liečbu.

# 1 Literárny prehľad

## 1.1 Bunková signalizácia

Dávno pred tým, ako sa na zemi objavili mnohobunkové organizmy, si jednobunkové organizmy vyvinuli mechanizmy, akými boli schopné reagovať na fyzikálne a chemické zmeny svojho prostredia. Okrem zmien prostredia si bunky museli nevyhnutne vytvoriť aj mechanizmy, ktorými reagovali na prítomnosť inej bunky vo svojom okolí. Medzibunková komunikácia alebo komunikácia bunky s okolitým prostredím je najčastejšie umožnená pomocou extracelulárnych signálnych molekúl (Vlahopolous S.A. a kol., 2015). V prípade mnohobunkového organizmu je väčšina buniek schopná signál prijímať ale aj vysílať. Takýto signál vo forme extracelulárnej molekuly vie bunka rozoznať obvykle pomocou receptorov, ktoré sa nachádzajú vo väčšine prípadov na jej povrchu a na ktoré sa špecificky viažu signálne molekuly z vonkajšieho prostredia. Signálne molekuly sú najčastejšie proteíny, malé peptidy, nukleotidy, aminokyseliny, steroidy, retinoidy, deriváty mastných kyselín alebo plyny. Po interakcii receptora so signálnou molekulou, ktorá je ligandom pre daný receptor, dochádza k aktivácii receptora. Takýto aktivovaný receptor môže následne spustiť ďalšie signálne dráhy bunky, cez ktoré sa signál dostáva až k cieľovým intracelulárnym molekulám nazývaným aj efektorové molekuly (Obr.1). Podľa toho o aký extracelulárny signál ide, môžu byť takéto efektoary napríklad iónové kanály, regulačné proteíny alebo komponenty metabolickej dráhy (Greenwald a kol. 1998).



**Obr.1:** Schématické zobrazenie všeobecného mechanizmu prenosu signálu pomocou aktivácie receptora na povrchu bunky. Po naviazaní signálnej molekuly (ligandu) na receptor dochádza k jeho aktivácii a následne k stimulácii molekúl signálnej dráhy, ktoré v

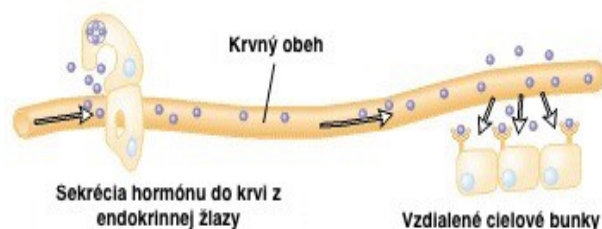
závere spúšťajú konkrétnu odpoveď bunky na stimulus (1).

Medzibunková komunikácia môže prebiehať tak ako na krátke, tak aj na dlhé vzdialenosti. Na krátku vzdialenosť medzi sebou komunikujú bunky, ktorých signalizácia je závislá na ich priamom kontakte a nachádzajú sa v úzkej blízkosti. Takto bunky komunikujú napríklad počas ich proliferácie alebo pokiaľ sa jedná o bunky imunitnej odpovede (Duester, 2008).

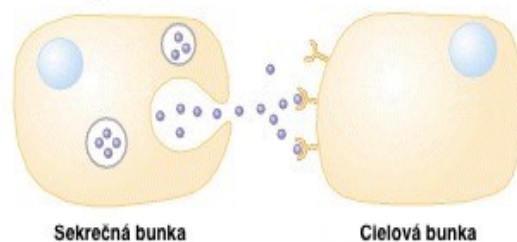
Pokiaľ medzi sebou bunky nemajú priamy kontakt, zvyčajne vysielajú signálne molekuly do extracelulárneho priestoru, ktorým takáto molekula putuje k cieľovej bunke, pri čom sa väčšinou jedná o bunky iného typu, akou sú signalizujúce bunky. Takáto signalizácia je označovaná ako parakrinná signalizácia a ide o častý typ komunikácie rakovinových buniek, vďaka čomu sú schopné prežitia a proliferácie. Pokiaľ bunka vysielala signál a následne ho aj sama prijíma, hovoríme o autokrinnnej signalizácii (Alberts a kol., 2002).

Pokiaľ sa jedná o veľké, zložitejšie mnohobunkové organizmy, musia byť bunky schopné aj komunikácie na veľké vzdialenosti vrámci organizmu. Takúto komunikáciu označujeme ako endokrinnú signalizáciu a je sprostredkovaná pomocou hormónov uvoľnených zo špecifických endokrinných buniek do krvného obehu, ktorým je transportovaná k cieľovým bunkám. Endokrinná signalizácia je charakteristická pomalou ale za to dlho trvajúcou odpoveďou cieľových buniek. Takáto komunikácia je nevyhnutná pre kontrolu a koordináciu správania buniek v jednotlivých tkanivách a pre celkovú homeostázu organizmu (obr. 2).

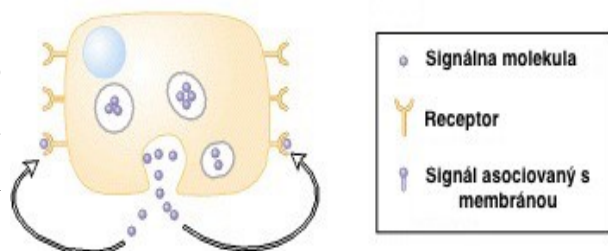
a: Endokrinná signalizácia



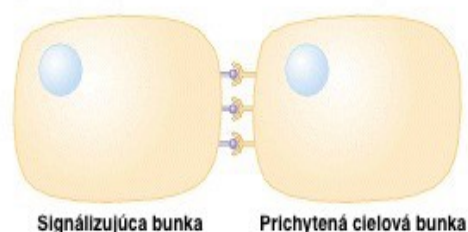
b: Parakrinná signalizácia



c: Autokrinná signalizácia



d: Signalizácia závislá na priamom kontakte buniek



**Obr. 2: Znárodnenie jednotlivých možností bunkovej signalizácie v závislosti od typu prenosu signálu (Lodish a kol., 2000).**

Do samostatnej kategórie sa radí signalizácia sprostredkovaná nervovými bunkami. Neuróny sú charakteristické tým, že obsahujú výbežok - axon, zakončený synapsiami, cez ktoré sú schopné uvoľňovať neurotransmitter. Po aktivácii neurónu signálnou molekulou z prostredia alebo signálom od druhého neurónu, dochádza k vysielaniu elektrických impulzov vrámci aktivovaného neurónu, ktoré sa šíria cez axón a po dosiahnutí synapsií dochádza k sekrécii chemického signálu z neurónu zvanom neurotransmitter. Vďaka špecifickej štruktúre synaptického zakončenia neurónu sa neurotransmitter špecificky viaže k receptorom postsynaptického neurónu (Cooper, 2000).

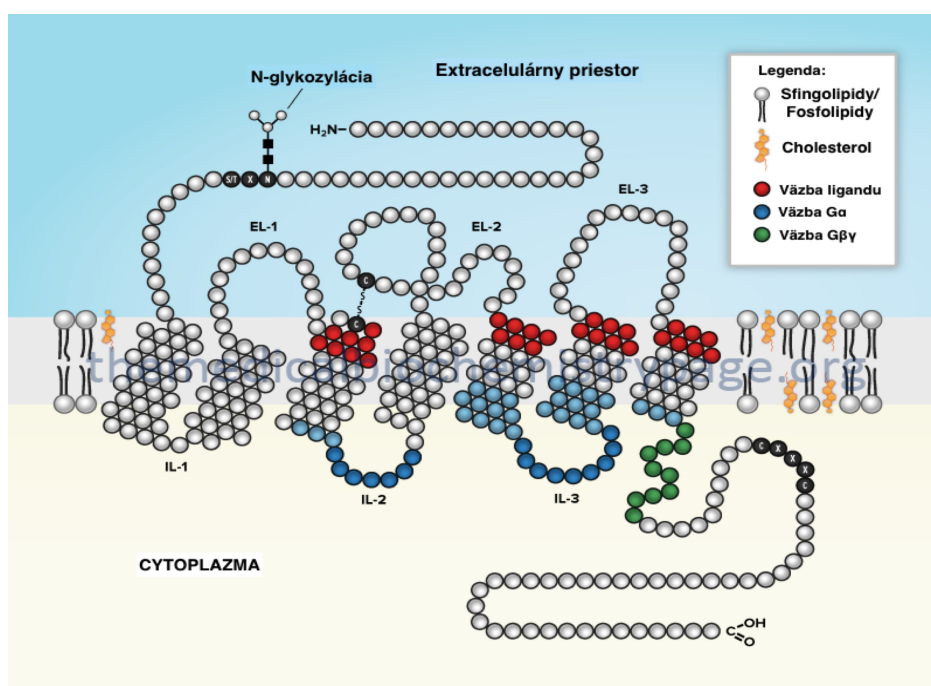
Počas neuronálnej signalizácie je pre jej správny chod nevyhnutná regulácia množstva receptorov na presynaptickej membráne a recyklácia váčkov uvoľňujúcich neurotransmitter (Yap a Winckler, 2012). Synaptické zakončenia neurónov v mozgu obsahujú obmedzený počet týchto váčkov a preto pre rýchlu neuronálnu odpoveď je nevyhnutná okamžitá recyklácia váčkov na membráne. Takáto recyklácia je umožnená pomocou už spomínanej endocytózy, pri ktorej dochádza k internalizácii váčkov a receptorov do intracelulárneho priestoru bunky (Hupalowska a Miaczynska, 2012). Jeden z typov endocytózy zodpovednej za správny chod neuronálnej signalizácie je endocytóza sprostredkovaná klathrínom, ktorý tieto váčky obaluje pri čom následne dochádza k ich odštiepeniu od membrány a tvorbe vezikúl. Vytvorenie klathrinom obaleného váčku je zabezpečené pomocou adaptorových proteínov, ktoré sú nevyhnutné pre špecifickú vazbu klathrínu s váčkom. Medzi takéto adaptorové proteíny patrí už zmienený FCHO1/2 proteín s F-BAR doménou ale aj proteín nášho záujmu SGIP1 (Rao a kol., 2012). Práve SGIP1 by mohol podľa našich predpokladov hrať dôležitú úlohu v endokanabinoidej signalizácii.

## **1.2 Receptory asociované s G proteínmi (GPCR)**

Receptory asociované s G proteínmi patria medzi najväčšiu a najrozmanitejšiu rodinu membránových receptorov u eukaryotov. Tieto receptory sú schopné zaznamenať signál na povrchu bunky a aktivovať vnútrobunkovú dráhu a teda odpoveď bunky na extracelulárny signál. Presná veľkosť GPCR super rodiny je zatiaľ neznáma ale zo

sekvenčných analýz sa predpokladá že sú kódované asi 800 ľudskými génmi, čo tvorí asi 4% celkového proteín kódujúceho genómu (Bjarnadóttir a kol., 2006).

Všetky GPCR sú charakteristické ich sedem transmembránovou doménou (7TM), ktorú tvorí sedem alfa helixov prechádzajúcich cez cytoplazmatickú membránu spojených tromi intracelulárnymi a tromi extracelulárnymi slučkami (Lagerstrom a kol., 2008) . V intracelulárnej oblasti bunky sú zakončené C-terminálnym koncom a na druhej strane do extracelulárneho priestora vyčnievajú N-terminálnym koncom. Ďalším ich spoločným znakom je ich aktivácia intracelulárnymi G proteínov. Jedná sa o proteíny, ktoré sú schopné viazať guanosin trifosfát (GTP) a sú zložené z troch podjednotiek. (Trzaskowski a kol., 2012).



**Obr. 3: Schématické zobrazenie všeobecnej štruktúry GPCR.**

Biele, červené, modré a zelené oblasti predstavujú aminokyseliny. Štruktúrnú charakteristiku zahŕňajú tri extracelulárne slučky (EL-1, EL-2, EL-3) a tri intracelulárne slučky (IL-1, IL-2, IL-3). Typickou post-translačnou modifikáciou GPCR je ich glykozylácia na extracelulárnom N-terminálnom konci. Zafarbené oblasti predstavujú časti receptora, na ktorých dochádza k väzbe vybraných molekúl tak ako je popísané v legende k obrázku (2).

Rodina GPCR je známa zatiaľ iba u eukaryotov a je schopná viazať množstvo rôznych ligandov. Medzi tieto ligandy patria napríklad fotóny svetla, ióny, lipidy, feromony, neurotransmitery, glykoproteínové hormóny, malé peptidy ale aj veľké proteíny. Práve pre



ich rozmanitosť sú GPCR vhodné pre liečbu veľkého množstva ochorení a sú cieľom až 40% moderných liekov (Overington a kol., 2006).

Čo sa týka klasifikácie sa tieto receptory u stavovcov delia na päť základných skupín. Prvú skupinu tvoria receptory Rodopsínovej rodiny (trieda A), kam patria receptory, ktoré sú značne podobné prvému objavenému GPCR Rodopsínu.. Ide o najväčšiu rodinu receptorov a patria medzi ne receptory pre ióny, malé molekuly, neurotransmitery, peptidy, feromóny a chuťové, zrakové a čuchové receptory. Do tejto skupiny patria aj tzv. syrotčie receptory (orphan receptory), čo sú receptory, ktorých prirodzený ligand ešte nie je známy (Schioth a Fredriksson, 2005).

Do ďalšej triedy patrí Sekretínová rodina receptorov (trieda B). Ide o malú rodinu, ktorá sa skladá iba z 15 členov a ich ligandy tvoria prevažne peptidové hormóny ako napríklad Sekretín, Calcitonín alebo Glukagon. Sú charakteristické veľkou N-terminálnou doménou stabilizovanou disulfidickými mostíkmi. Táto rodina receptorov je veľmi dôležitá pre udržanie celkovej homeostázy organizmu a má veľký potenciál pre vývoj liekov. Napríklad pri liečbe hypoglykémie, osteoporózy a hyperkalcémie sa využívajú ligandy týchto receptorov ako glukagon, parathyroidný hormón a kalcitonín.

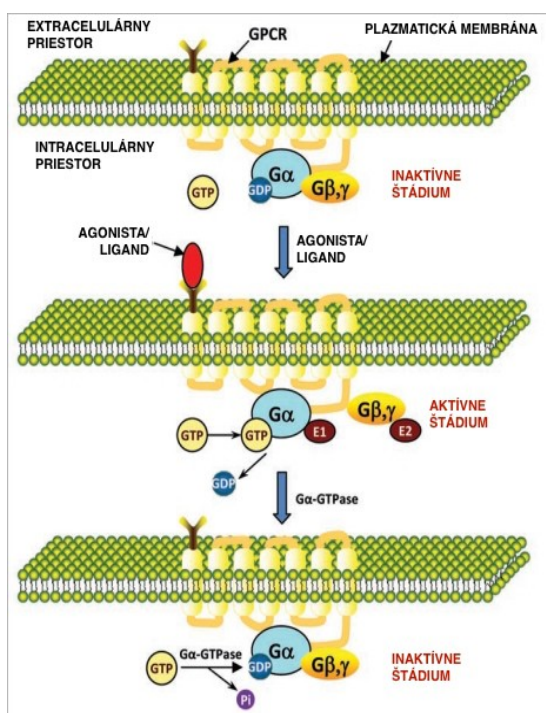
Do triedy C patria receptory Glutamánovej rodiny a ich charakteristický znak je veľká N-terminálna doména pripomínajúca mäsožravú rastlinu mucholapku divnú. Táto rodina má 23 členov, medzi ktorých patria napríklad glutamánové metabotropné receptory (mGlu), ktoré hrajú významnú úlohu v centrálnej nervovej sústave. Ďalej sem patria GABAB receptory, receptory citlivé na vápnik (CaS receptory) a chuťové receptory (TAS1).

Ďalšiu skupinu tvorí Adhezívna rodina receptorov. Táto rodina má dlhý N-koniec, ktorý je proteoliticky oddelený od transmembránových domén. Ligandy tejto rodiny sú zatiaľ pomerne málo známe ale predpokladá sa, že receptory zohrávajú dôležitú úlohu pri medzibunkovej komunikácii a interakcii bunky s extracelulárnym prostredím.

Poslednou skupinou je rodina Frizzled receptorov, pri čom ide o receptory kriticky dôležité pri embryogenéze. Ich ligandami sú malé glykoproteíny (Wnt) nevyhnutné pre reguláciu tkanivovej homeostázy (Fredriksson a kol. 2003), .

## 1.2.1 G proteínová signalizácia

GPCR sú aktivované extracelulárnym signálom vo forme ligandu alebo iným signálnym mediátorom. Po naviazaní takejto molekuly na receptor dochádza ku konformačným zmenám receptora, čo umožní naviazanie G proteínu. G proteíny sú heterotriméry a skladajú sa z troch podjednotiek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Majú schopnosť hydrolyzovať naviazaný guanosin trifosfát (GTP), čo zabezpečí prenos extracelulárneho signálu cez GPCR až k efektorovým molekulám. Po aktivácii receptora a následne G proteínu sa zmenou konformácie receptora mení na alfa podjednotke naviazaný guanosin difosfát (GDP) za guanosin trifosfát (GTP). Aktivovaná alfa podjednotka s naviazaným GTP následne disociuje od  $\beta\gamma$  podjednotiek, ktoré sú spolu viazané pevne vo väzbe a vytvárajú komplex.  $G\alpha$  a  $G\beta\gamma$  majú následne po disociácii od seba rozdielne efektorové molekuly (E1 a E2) a teda sú zodpovedné za iniciáciu rôznych bunkových odpovedí na signál.  $G\alpha$  je po odovzdaní signálu inaktivovaná GTPázou aktivujúcimi proteínami (RGS proteíny) a po hydrolýze GTP znovu vytvára komplex s  $\beta\gamma$  podjednotkami (Brass, 2003).



**Obr. 4: Stručný mechanizmus aktivácie G proteínovej dráhy.** Po aktivácii receptora naviazaním ligandu, dochádza ku konformačným zmenám receptora. Tieto zmeny

zabezpečia možnosť receptora chovať sa ako GEF (guanine nucleotide exchange factor), ktorý vymieňa GDP za GTP na  $G\alpha$  podjednotke. Táto zmena vedie k disociácii  $G\alpha$  od  $G\beta\gamma$  a od receptora a následnej aktivácii ďalších intracelulárnych molekúl signálnej dráhy (Narendra, 2009).

Alfa podjednotku kóduje dokopy 16 génov a delíme ju do štyroch rodín podľa podobnosti. Prvá rodina je  $G\alpha_s$  a jej funkciou je aktivácia adenylát cyklázy,  $K^+$  kanálov, Src tyrozinkináz a GTPázy tubulínu. Po aktivácii adenyl cyklázy (AC)  $G\alpha_s$  podjednotkou dochádza ku konverzii ATP na molekulu cAMP, ktorá má funkciu ako druhý posol. Podľa koncentrácie cAMP v cytoplazme sa aj priamoúmerne mení aktivita proteinkinázy A (PKA). Aktivácia tejto proteinkinázy je nevyhnutá pre značné množstvo základných funkcií bunky, ako je proliferácia alebo diferenciácia. Ďalšou rodinou je  $G_i/o$ , ktorá naopak inhibuje adenyl cyklázu a tým znižuje množstvo cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) v bunke. Rodina  $G_q/11$  stimuluje fosfolipázu  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), ktorá hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP3 je po aktivácii odštiepený z membránových fosfolipidov a voľne difuzibilný, čo mu umožňuje sa viazať na IP3 receptory endoplazmatického retikula, kde následne dochádza k otvoreniu kanálov na ER a uvoľňovaniu vápniku do cytoplazmy. Druhá molekula, ktorá vzniká po aktivácii PLC $\beta$  je diacylglycerol (DAG), ktorý je pevne viazaný na membránu a spolu s iónmi vápnika aktivuje proteinkinázu C (PKC). PLC $\beta$  teda funguje ako GTPázu aktivujúci proteín (GAP) pre  $G_q$  a hydrolýzu GTP urýchľuje 1000x. Ako posledná je rodina  $G_{12/13}$ , ktorá aktivuje  $Na^+/K^+$  kanály, fosfolipázu D (PLD) alebo Rho guanin nukleotid vymenné faktory (RhoGEF) (Svoboda a kol., 2004).

### 1.2.2 Funkčná selektivita

Aktivácia rozdielnych dráh pri stimulácii agonistom môže byť pre bunku ako výhodná tak aj nevýhodná. Niektorí agonisti sú schopní selektívne aktivovať buď G proteínovú dráhu alebo  $\beta$ -arrestinovú dráhu. Táto schopnosť agonistu sa volá funkčná selektivita (ang. biased agonism) a je využívaná pri množstve klinických liekov (Rask-Andersen a kol., 2011). Po naviazaní takéhoto agonistu prebehnú konformačné zmeny na cytoplazmatickej doméne receptora a práve tie rozhodnú o aktivácii jednej zo signalizačných dráh.

Ligandy so schopnosťou funkčnej selektivity sa napríklad viažu k  $\beta_1$  a  $\beta_2$

adrenergným receptorom, D1 a D2 dopamínovým receptorom alebo k receptorom pre parathyroidný hormón (Zheng a kol. 2010).

### 1.2.3 Desenzitizácia GPCR

Po aktivácii GPCR agonistom môže nastať jav, ktorému hovoríme desenzitizácia. Ide o proces, pri ktorom dochádza k znižovaniu odpovedi receptora na stimulus. Nadmerná stimulácia receptora môže spôsobiť jeho desenzitizáciu a teda vytvorenie tolerancie organizmu k množstvu liečiv pôsobiacich cez GPCR signalizáciu. Desenzitizáciu spôsobí ako aj dlhodobá stimulácia receptora tak aj častá a opakovaná stimulácia v periódach. Naopak pokiaľ na receptor pôsobí stimulus málo, dochádza k zvyšovaniu citlivosti receptora (senzitivácia) (Hausdorff a kol., 1990). Ak dochádza k desenzitizácii receptora po jeho väzbe s agonistom hovoríme o homológnej desenzitizácii. Receptor ale môže byť desenzitivovaný aj aktiváciou vedľajšieho receptora, ktorý je schopný stimulovať intracelulárne kinázy schopné ovplyvniť citlivosť receptora. Pri takomto jave hovoríme o heterológnej desenzitizácii.

Hlavnou podmienkou desenzitizácie je fosforilácia receptora na jeho intracelulárnej časti a to na intracelulárnych slučkách (il-1, il-2, il-3) a C-terminálnom konci. Pri homológnej desenzitizácii to zabezpečujú kinázy asociované s G-proteínami (GRKs), ktoré fosforilujú threoníny a seríny na tretej intracelulárnej slučke a na C konci aktivovaného receptora. Na takto fosforilovaný receptor na následne môžu viazať  $\beta$ -arrestíny čo spôsobí sterickej blokáciu stimulácie G proteínov. Po naviazaní  $\beta$ -arrestínu následne receptor internalizuje do cytoplazmy bunky. Pri heterológnej desenzitizácii fosforilujú receptor kinázy závislé na druhých posloch, ako sú napríklad PKA a PKC. Aktiváciou receptora, ktorý stimuluje aktivitu PKA alebo PKC, dochádza k nešpecifickej fosforilácii receptora bez ohľadu na jeho obsadenie agonistom. Napríklad  $\beta$ -adrenergný receptor pomocou svojej Gsa podjednotky aktivuje AC a pomocou cAMP dochádza k stimulácii PKA, ktorá je schopná späťne receptor fosforilovať (Hamm a kol., 1996).

### 1.2.4 Internalizácia GPCR

Pod pojmom internalizácia rozumieme proces, pri ktorom receptor s naviazaným ligandom preniká a putuje z bunkového povrchu do vnútrobunkového priestoru. Takýto internalizovaný receptor môže byť následne recyklovaný, pri čom sa obnoví jeho funkcia

(resenzitizácia) alebo môže dôjsť k jeho degradácii v lyzozómoch (downregulácia) (Bohm, 1997). Na resenzitizáciu GPCR je ale potrebná najskôr jeho defosforilácia a disociácia od ligandu. Tento proces sa odohráva v acidifikovaných endozomálnych vezikulách, odkiaľ sa v ďalšom kroku defosforilované receptory vracajú na povrch bunky. K downregulácií a teda k degradácií receptora dochádza, pokiaľ receptor stimulujeme dlhodobo (hodiny až dni) jeho agonistom, pri čom dôjde k zníženiu celkového počtu receptorov. K degradácii receptorov dochádza v endocytozových vezikulách (endozómoch).

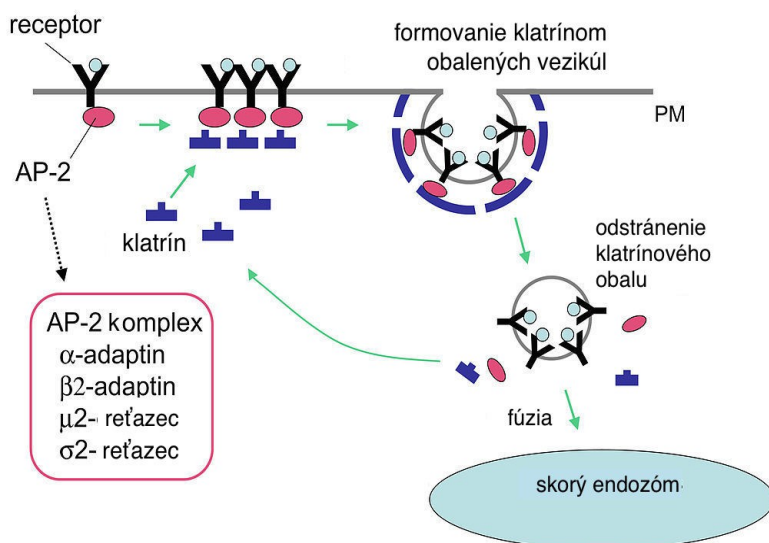
Mechanizmus internalizácie je zahájený vchlípením membrány smerom do cytoplazmatického priestoru a vytvorením vaku, ktorý sa následne oddelí od plazmatickej membrány a ako transportná vezikula putuje do vnútrobunkových priestorov. Týmto spôsobom sú bunky schopné absorbovať metabolity, hormóny, proteíny a v niektorých prípadoch aj vírusy (Ghosh, 2015). Najviac preštudovaným mechanizmom internalizácie GPCR je klathrinom sprostredkovaná endocytóza.

#### **1.2.4.1 Klathrinová endocytóza:**

Počas neuronálnej signalizácie je pre jej správny chod nevyhnutná regulácia množstva receptorov na presynaptickej membráne a recyklácia vaku uvoľňujúcich neurotransmiter. Synaptické zakončenia neurónov v mozgu obsahujú obmedzený počet týchto vaku a preto pre rýchlu neuronálnu odpoveď je nevyhnutná okamžitá recyklácia vaku na membráne neurónu (Royle, 2003). Takáto recyklácia je umožnená pomocou už spomínanej endocytózy, pri ktorej dochádza k internalizácií vaku a receptorov do intracelulárneho priestoru bunky. Jeden z typov endocytózy zodpovednej za správny chod neuronálnej signalizácie je endocytóza sprostredkovaná klathrinom, kedy dochádza k tvorbe klathrinom obalených vaku, k ich následnému odštiepeniu od membrány a tvorbe vezikúl v intracelulárnej oblasti bunky. Vytvorenie klathrinom obaleného vaku je zabezpečené pomocou adaptorových proteínov, ktoré sú nevyhnutné pre špecifickú väzbu klathrínu s vekom (Edeling a kol., 2006).

Prvým krokom pre zahájenie klathrinom sprostredkovanej endocytózy je naviazanie ligandu na receptor, po čom dochádza k deformácii plazmatickej membrány. Následne nastáva tvorba vaku, ktorý sa oddelí od membrány a vytvára klathrinom obalené vezikuly schopné transportovať ich obsah do cytoplazmy bunky. V cytoplazme takto obalená vezikula ďalej rýchlo stráca klathrinový plášť a fúzuje do skorého endozómu. Po fúzii môže byť receptor s naviazaným ligandom v endozóme ďalej recyklovaný, degradovaný v

lyzozómoch alebo môže podliehať iným dejom (Dittman, 2009).



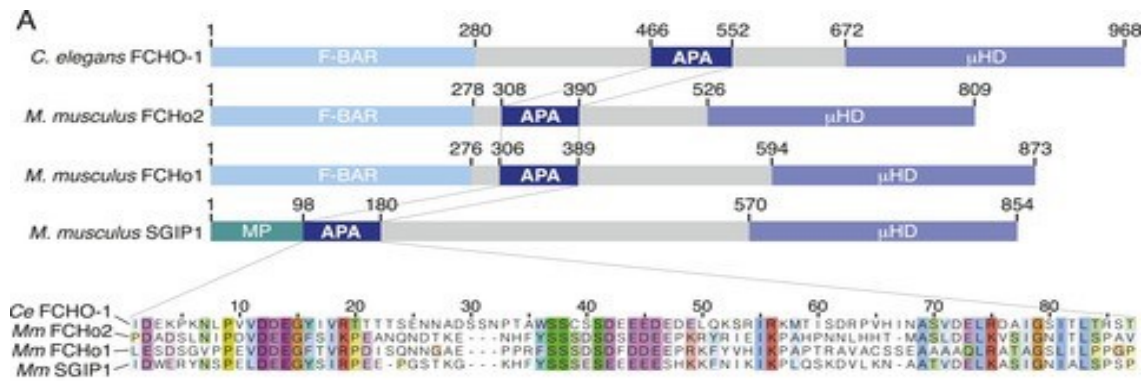
**Obr. 5: Mechanizmus klathrínom sprostredkovanej endocytózy.** Klathrín s receptormi a ich ligandmi vytvárajú klathrínom obalené vačky na plazmatickej membráne spolu s adaptorovým komplexom (AP-2), ktorý viaže klathrín s transmembránovými receptormi čo vedie k formovaniu klathrínom obalených vezikúl. Tie sú následne aktívne zbavené klathrínového obalu a transportované do skorého endozómu (Barth, 2006).

Klathrín je proteínový komplex tvoriaci trojšpirálovitý útvar nazývaný aj ako triskelion. Triskelion sa skladá z troch ľahkých a troch ťažkých reťazcov vytvárajúcich niečo ako lešenie. Tento komplex vytvára akýsi obal na transportných vezikulách a to spôsobom takým, že sa viaže na cieľové receptory na membráne ešte pred formovaním vačkov a vytvára s nimi neskôr vačky a vezikuly. Klathrín však nieje schopný priamej väzby na receptory alebo na membránové fosfolipidy a preto je nevyhnutná prítomnosť tzv. adaptorových proteínov označovaných aj ako AP-2, ktoré túto väzbu sprostredkujú a vytvárajú druhú vrstvu formujúceho vačku. Ich funkcia je teda viazať klathrin k membráne a k transmembránovým proteínom, vrátane receptorov s naviazaným „nákladom“ (cargo). Po tejto väzbe sa môže úspešne vytvoriť transportná vezikula obalená klathrínom obsahujúca receptor s naviazanou molekulou záujmu, ktorá putuje do cytoplazmy. Tieto adaptorové proteíny sa líšia v závislosti od rôznych typov receptorov a ich ligandov (Alberts a kol., 2002).

Pre iniciáciu tvorby klathrinových váčkov je nevyhnutné aby bol adaptorový proteín AP-2 v aktívnej forme. K zahájeniu internalizácie dochádza až potom ako inaktívny AP-2 prejde konformačnou zmenou, čo spôsobí prechod z inaktívnej uzavretej formy na formu otvorenú a aktívnu. Čo reguluje prechod zatvorenej konformácie na otvorenú však nieje ešte doposiaľ úplne objasnené. Jednou z teórií je, že AP2 komplex môže byť otvorený jednoduchým naviazaním ligandu a fosfatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) na plazmatickú membránu (Honing a kol. 2005). Ďalším predpokladom je teória, predpokladajúca že otvorená forma AP2 je indukovaná fosforiláciou (Fingerhut a kol., 2001). Možný je však aj predpoklad aktivácie AP2 jedným z mnohých proteínov asociovaných s klathrínom. Najpravdepodobnejšie sa bude jednať o proteíny interagujúce s AP2 počas endocytózy. Medzi takéto proteíny napríklad patrí intersectín, epsin, eps 15 (epidermálny rastový faktor 15), FCHO 1 a 2 (z ang. Fer/Cip4 homology domain only), NECAP (z angl. adaptin ear-binding coat-associated protein), CALM (z angl. clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia),  $\beta$ -arrestin ale aj nami študovaný SGIP1 proteín. (Henne a kol., 2010)

Proteíny FCHO hrajú dôležitú úlohu pri konformačných zmenách membrány a formovaní váčkov, čo znamená že sa aktívne zúčastňujú skorého štádia endocytózy. FCHO proteíny patria do rodiny muniscínov a ich štruktúra pozostáva z viacerých domén medzi ktoré patrí aj F-BAR doména (z angl. Fer/Cip4 homology domain only-Bin/amphiphysin/Rvs), o ktorej sa predpokladá že práve ona má funkciu ohýbať plazmatickú membránu a je nevyhnutná pre iniciáciu endocytózy. (Henne a kol., 2007) Nadexpresia FCHO 1/2 vedie k dramatickému vzrastu počtu klathrinom obalených váčkov. (Macia kol., 2006) Zároveň „knockout“ FCHO v kultúre tkanivových buniek viedol k zlyhaniu väzby AP2 k plazmatickej membráne (Henne a kol., 2010). Tieto zistenia potvrdili že FCHO pravdepodobne regulujú s AP2 počas formovania klathrínom obalených váčkov na plazmatickej membráne.

Proteíny FCHO1 a FCHO2 sú do značnej miery homológne (50% zloženia aminokyselín) a zhodujú sa aj v organizácii domén. Na svojom C-konci majú uhomológnu doménu (uHD) za ktorou nasleduje doména bohatá na prolin, AP2 aktivačná doména a na N-konci leží už spomínaná F-BAR doména.



**Obr. 6: Zobrazenie a porovnanie homologických oblastí APA domény proteínov FCHO a SGIP1 u *Caenorhabditis elegans* a *Mus musculus*.** Na obrázku je zobrazený rozdiel štruktúry jednotlivých proteínov v organizmoch no zároveň sa dá pozorovať značná homológia v sekvenciách kódujúcej APA domény. Je však možné, že v prípade proteínov FCHO2 a SGIP1 u *M. musculus* budú práve ich nehomologické oblasti aminokyselínovej sekvencie APA domény zodpovedné za rôzne vlastnosti týchto proteínov, konkrétne pri mechanizme endocytózy a internalizácie receptora do vnútrobunkových priestorov (Hollopeter a kol., 2014).

Medzi ďalšie spomínané proteíny potenciálne interagujúce s AP2 komplexom počas endocytózy patria arrestíny. Ide o malú rodinu proteínov dôležitých pre signálnu transdukciiu a G proteínovú signalizáciu. Táto rodina sa skladá zo 4 skupín (arrestin-1, arrestin-2, arrestin-3 a arrestin-4). Ako prvý bol klonovaný arrestín-2, ktorý bol tiež pomenovaný aj ako  $\beta$ -arrestín. Jeho názov vznikol na základe jeho prvej identifikácie pri receptore rodopsínu a  $\beta_2$ -adrenergného receptora.  $\beta$ -arrestín slúži v G proteínovej signalizácii ako multifunkčný adaptorový proteín s funkciou viazať a aktivovať rozsiahlu skupinu intracelulárnych signálnych proteínov. Viaže sa napríklad s tyrozínkinázou zo skupiny Src, čo je dôležitá väzba pre uľahčenie endocytózy GPCR. Ďalej arrestíny vytvárajú komplex aj s ERK1/2 a JNK3, čím aktivujú MAP kinázovú dráhu nevyhnutnú pre diferenciáciu, proliferáciu a apoptózu buniek (Ghosh, 2015).



### **1.2.5 Konštitutívna aktivita GPCR**

Bolo zistené, že GPCR sú schopné štádia, v ktorom dochádza k stimulácií signálnej transdukcie aj bez prítomnosti agonistu. Niekoľko typov GPCR sú teda schopné aktivovať signálnu kaskádu dejov v bunke aj v prípade, že nie sú aktivované ligandom. Pri takomto jave hovoríme o konštitutívnej aktivite receptora. Mutanti s bodovou mutáciou vykazujú zvýšenú hladinu konštitutívnej aktivity, no k zvýšeniu dochádza aj u nemutantných formách. Hladina aktivity sa nemení po naviazaní neutrálneho antagonistu vzhľadom k tomu, že blokuje miesto pre naviazanie agonistu alebo inverzného agonistu. Inverzný agonista receptor stabilizuje v inaktívnej forme, čo znamená, že znižuje bazálnu aktivitu receptora (Seifert *et al.*, 2002). Receptory sú v aktívnej forme desenzitizované a internalizované do vnútra bunky, no pri stimulácií inverzným agonisom ostávajú receptory na povrchu bunky. Zvýšenie konštitutívnej aktivity receptora spôsobuje obrovské množstvo rozličných ochorení a porúch. Menej často má patogénne účinky aj zníženie hladiny konštitutívnej aktivity. Znalosti o inverzných agonistoch jednotlivých receptorov sú preto nevyhnutné pre liečbu ochorení spôsobených zmenou bazálnej aktivity receptorov. V prípade konštitutívne aktívnych receptorov je teda výhodnejšie využitie inverzných agonistov oproti využitiu neutrálnych antagonistov, ktorý nemajú schopnosť znížiť hladinu aktivity receptora (Refetoff *et al.*, 2001).

## **1.3 Endokanabinoidný systém**

Endogénny kanabinoidný systém, pomenovaný podľa rastliny, ktorá viedla k jeho objavu, je pravdepodobne najdôležitejší fyziologický systém podieľajúci sa na vytváraní a udržiavaní ľudského zdravia. Endokanabinoidy a ich receptory sú obsadené po celom ľudskom tele vrátane mozgu, orgánov alebo buniek imunitnej odpovede. V každom tkanive má endokanabinoidný systém rozdielne úlohy ale jeho cieľ je všade rovnaký a tým je homeostáza, udržanie stabilného vnútorného prostredia napriek kolísaniu a zmenám vo vonkajšom prostredí. Endokanabinoidný systém sa zapája do dôležitých procesov ako napríklad regulácia chuti do jedla, citlivosť na bolesť, pamäť alebo nálada. (Aizpurua-Olaizola, 2016).

Celý systém sa skladá z kanabinoidných receptorov, endogénnych kanabinoidov (endokanabinoidov) a enzýmov schopných tieto endokanabinoidy syntetizovať alebo naopak ich rozkladať a degradovať. Okrem toho sa podieľa na tvorbe synapsií a

neurogenéze v nervovom systéme. Metabolické hormóny a peptidy regulujú hladinu endokanabinoidov v organizme, čím zabezpečujú kontrolu nad aktivitou kanabinoidných receptorov. Naopak pokiaľ na organizmus pôsobí stres alebo organizmus krátkodobo hladuje, endokanabinoidy slúžia ako modulatory exprese a pôsobia na neurotransmitery a hormóny zapojené do metabolickej regulácie organizmu. Pokiaľ dochádza k poruche endokanabinoidnej signalizácie, môžu nastať rôzne neuropsychiatrické problémy, depresia alebo poruchy v energetickej rovnováhe spojené s obezitou, hyperglykémiou a dyslipidémiou (Pertwee, 2006).

Počas histórie objavenia endokanabinoidov sa predpokladalo, že sa v mnohých ohľadoch podobajú endorfínom. Prelomový objav bol v polovici šesdesiatych rokov, kedy bola identifikovaná hlavná psychoaktívna zložka rastliny Konope siate (*Cannabis sativa*), ktorou je D9-tetrahydrocannabinol (D9-THC). (Gaoni a Mechoulam, 1964) Ďalším prelomovým pokrokom bolo zistenie, že D9-THC sa viaže na špecifické membránové proteíny, ktoré podľa neho dostali pomenovanie kanabinoidné receptory.

Napriek tomu, že vďaka farmakologickým údajom bola potvrdená existencia viacerých D9-THC receptorov a syntetických analógov, úspešne naklonované boli iba dva a to kanabinoidný receptor 1 (CB1R) a kanabinoidný receptor 2 (CB2R). CB1 receptory sú hlavne lokalizované v mozgu a v nervovom systéme no sú obsiahnuté aj periférnych tkanivách a orgánoch, ako sú napríklad srdce, pľúca vaječníky a mnoho ďalších. Zároveň patrí CB1R medzi najpočetnejšie sa vyskytujúci GPCR v centrálnom nervovom systéme. CB1R sa stal zaujímavým terapeutickým cieľom pre liečbu veľkého množstva ochorení, medzi ktoré patrí aj liečba anorexie u pacientov liečených na AIDS, ktorý trpeli nevoľnosťou a zvracaním po pôsobení chemoterapie (Walsh *akol.*, 2003).

Okrem CB1R bol o trochu neskôr identifikovaný aj kanabinoidný receptor 2 (CB2R), ktorého prirodzeným ligandom je hlavne 2-arachidonoyl glycerol (2 AG) a zohráva dôležitú úlohu v imunitnom systéme. Proteínová sekvencia CB1 a CB2 je na 44% zhodná pri čom najpodobnejšia je ich transmembránová oblasť.

S objavením kanabinoidných receptorov prišla aj identifikácia ich prirodzených ligandov vyskytujúcich sa v organizme, ktorý boli pomenovaný ako endokanabinoidy. Endokanabinoidy dostali tento názov vďaka ich schopnosti aktivovať a viazať sa na rovnaký receptor ako kanabinoidy (THC) vyskytujúce sa v Konope siatom (Mackie, 2006). THC sa však bežne v ľudskom tele nevyskytuje a preto pre podrobnejšie preskúmanie CB1R bolo nevyhnutné objavenie prirodzeného ligandu CB1R-endokanabinoidu. Ako prvý identifikovaný endokanabinoid bol arachidonoyl ethanolamide

(anandamide; AEA), pri čom sa jedná o amid kyseliny arachidonovej s ethanolaminom. Neskôr bolo dokázané že všetky endokanabinoidy obsahujú metabolity kyseliny arachidonovej. Ako druhým identifikovaným endokanabinoidom je 2-arachidonoyl glycerol (2AG), čo je ester kyseliny arachidonovej a glycerolu pričom je v mozgu do značnej miery koncentrovanejší ako anandamid (Howlett a kol., 2002). AEA aj 2-AG však nie sú hromadené v sekrečných vezikulách ako väčšina ligandov, ale sú syntetizované de novo po tom ako dôjde k zvýšeniu koncentrácie intracelulárneho vápnika v neuróne po metabolickej reakcii prekursorov fosfolipidov. Dá sa teda povedať že tvorba priamych prekursorov pre AEA a 2-AG a ich premena na endokanabinoidy je katalizovaná enzýmami citlivým na koncentráciu vápnika v bunke. (Di Marzo a kol., 2004) Po systéze endokanabinooidov dochádza k ich okamžitému uvoľneniu z bunky, čím je im umožnené aktivovať ich cieľové receptory. Po aktivácii cieľových molekúl sú endokanabinoidy okamžite odstránené z extracelulárneho priestoru pomocou selektívneho bunkového mechanizmu spätného vychytania do neurónu, kde dochádza k ich hydrolýze. Pre využitie laboratórnych metód boli nasyntetizované aj syntetické endokanabinoidy, medzi ktoré napríklad patrí aj WIN55,212-2.

Po objasnení všeobecného mechanizmu, v ktorom je endokanabinoidný systém v mozgu dočasne aktivovaný počas akútnych alebo chronických stresových a škodlivých podmienok, pričom sa jedná o adaptívnu reakciu s cieľom obnoviť prirodzenú rovnováhu iných mediátorov v mozgu, boli navrhnuté ďalšie teórie fungovania tejto signalizácie. (Hill a kol., 2006) Vďaka tomu bolo dokázané, že po krátkodobom hladovaní organizmu je cez aktiváciu CB1R regulovaná hladina orexigénnych a anorexigénnych mediátorov, ktoré stimulujú chuť do jedla a zvyšujú príjem potravy. (Hill a kol., 2006)

Tento fakt dokazuje aj experiment, v ktorom boli merané hladiny endokanabinooidov v hypotalame potkanov lebo práve hypothalamus je oblasť mozgu kontrolujúca príjem potravy a regulujúca odpoveď organizmu na stresové podmienky. U potkanov trpiacich niekoľko hodín na hladovanie bola hladina endokanabinooidov výrazne vyššia ako u potkanou s pravidelným príjmom potravy. (Kirkham a kol., 2002) Pomerne krátko po objavení endokanabinoidného systému sa začali testovať rôzne varianty liečiv pôsobiace na túto signálnu dráhu v snahe o liečbu metabolických ochorení a obezity.

### 1.3.1 Štruktúra kanabinoidného receptora 1 (CB1R)

CB1R má typickú štruktúru pre GPCR, čo znamená že pozostáva zo siedmych transmembránových domén, ktoré sú spojené tromi extracelulárnymi a tromi intracelulárnymi slučkami. Zakončený je extracelulárnym N-terminálnym koncom na vonkajšej strane membrány a intracelulárnym karboxylovým C-terminálnym koncom nachádzajúcim sa vo vnútri bunky (Pertwee a kol., 2006). CB1R sa skladá zo 471 aminokyselín, no zatiaľ nieje úplne objasnená jeho konformačná štruktúra. Podľa porovnania štruktúry s inými GPCR, ktorých funkcia aminokyselín je už známa, sa predpokladá, že hlavne karboxylový koniec a intracelulárne slučky slúžia na prenos signálu do vnútra bunky. Cytoplazmatické časti receptora sú teda zodpovedné za väzbu s G-proteínami, desenzitizáciu a väzbu s  $\beta$ -arestínmi. Čo sa týka stavby karboxylového C-konca, sa táto štruktúra skladá zo 73 aminokyselín. Z toho obsahuje tri cysteínové zvyšky, pri ktorých pokiaľ dôjde k ich palmitoylácii, môžu slúžiť ako membránová kotva. Ďalej sa na C-terminálnom konci nachádza 11 serínových a 5 threonínových zvyškov a po ich posforylácií interagujú s regulačnými proteínami a sekundárnymi signálnymi molekulami.

Miera a miesto expresie kanabinoidných receptorov závisí od konkrétneho druhu organizmu a od účinku kanabinoidov na správanie jedinca. To znamená, že napríklad u hlodavcov je najvyššia koncentrácia kanabinoidných receptorov v bazálnom gangliu a v mozochku, pričom sa jedná o oblasti zodpovedné za koordináciu a iniciáciu pohybu. U ľudí sa v týchto oblastiach vyskytuje oveľa nižšia koncentrácia kanabinoidných receptorov, čo vysvetľuje fakt, že kanabinoidy sú schopné ovplyvniť motoriku hlodavcov s oveľa vyššou účinnosťou ako sú schopné ovplyvniť motoriku ľudí. (Refetoff a kol., 2001)

### 1.3.2 Signalizácia CB1

Receptory CB1 aj CB2 signalizujú prostredníctvom inhibičných G proteínov Gi and Go (16). Aktivácia CB1R teda vedie k inhibícii adenyl cyklázy, čo vedie k zníženiu koncentrácie intracelulárneho cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a vápnikových kanálov. Zároveň ale aktívny CB1R aktivuje mitogen aktivačné proteín kinázy (MAP kinázy) a draslíkové kanály. Aktivácia CB1 receptorov pomocou stimulácie endokanabinoidami a ich vysoká miera expresie v presynaptických zakončeníach vedie k supresii neuronálnej excitácie a k inhibícii neurotransmisie. (Freund, 2003)

Endokanabinoidy hrajú teda dôležitú úlohu v regulácii neuronálnej plasticity. CB1 receptor sa vyskytuje tak ako v GABAergných tak aj v glutaergných či dopaminergných interneurónoch, čo znamená, že aktivácia tohto receptora môže viesť excitačnému aj inhibičnému efektu (Elphick a kol., 2001). Pomocou myších delečných modelov bolo však dokázané, že hlavnú neuroprotektívnu úlohu má CB1 receptor v gabaergných interneurónoch. CB1R je ko-lokalizovaný s receptormi pre dopamin a serotonín v subpopuláciách neurónov v rôznych oblastiach myšieho mozgu, ktoré sa podieľajú na funkciách ako je motorika, kognitívne myslenie, závislosť alebo príjem potravy. Ako už sme spomínali, endokanabinoidy nie sú počas neurosignalizácie ukladané vo vačkoch v presynaptickom neuróne ale sú syntetizované v postsynaptickom neuróne z membránových prekursorov. Znamená to, že po depolarizácii postsynaptického neurónu dochádza k syntéze a následnému uvoľneniu endokanabinoïdov do synaptickej štrbiny a k naviazaniu na kanabinoïdné receptory obsiahnuté na membráne presynaptického neurónu. Takáto interakcia vedie k inhibícii uvoľňovania neurotransmiteru GABA a teda sa jedná o reverzný mechanizmus tlmiaci neurotransmisiu (Pertwee, 2008).

Naklonovanie CB1R umožnilo ďalší vývin potenciálnych, metabolicky stabilných selektívnych agonistov a antagonistov CB1R a zároveň vytvorenie transgénnych zvierat s deléciou CB1R. Práve vďaka tomuto kroku vpred bolo dokázané zvýšenie chuti do jedla po pôsobení THC na organizmus pričom podobný efekt vykazovala aj aktivácia CB1R endokanabinoïdami. (Kirkham a kol., 2002)

Kanabinoïdná signalizácia sa stala veľmi významným mechanizmom pre rôzne farmakologické stratégie, pri ktorých však bolo nevyhnutné najskôr dôkladne porozumieť ako potenciálne liečivá interagujú s kanabinoïdnými receptormi. Tieto liečivá môžu mať funkciu čiastočného agonistu ale aj inverzného agonistu. Zároveň receptor vykazuje funkčnú selektivitu, čo znamená že nie všetky ligandy viažúce sa na receptor aktivujú rovnakú signálnu dráhu. Ako dôkaz funkčnej selektivity CB1R je napríklad regulácia syntézy tyrozín hydroxylázy (TH). V tomto prípade agonista CB1R známy ako HU210 stimuluje transkripciu tyrozín hydroxylázy. Pokiaľ sa však na receptor viaže agonista CP55,947, dochádza k inhibícii transkripcie TH mRNA a teda k opačnému deju (Bosier a kol., 2007). Čo sa týka vplyvu inverzného agonistu, najlepšie je pozorovateľný na regulácii konštitatívnej aktivity receptorov. Receptory sú schopné byť aktívne aj pokiaľ nedôjde k interakcii s agonistom, čo znamená, že rovnováha medzi ich aktívnym a inaktívnym stavom je posunutá k aktívnej forme. Pokiaľ sa na receptor naviaže neutrálny antagonist, rovnováha sa nemení. Po naviazaní inverzného agonistu však dochádza k

inaktivácií receptora, čo znamená že rovnováha medzi aktívnym a inaktívnym stavom je posunutá smerom k inaktívnej forme (Ortega-Gutiérrez a kol., 2005).

#### **1.4 Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like (endophilin) interacting protein 1 (SGIP1)**

V roku 2005 bol prvý krát zmieneny nový neuronálny proteín, ktorý dostal názov Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like (endophilin) interacting protein 1 (SGIP1). O tomto proteíne je zatiaľ veľmi málo známych faktov ale bolo potvrdené, že hrá nezanedbateľnú úlohu v regulácii energetickej homeostázy. Zistilo sa to na základe výskumu na modele pieskomila tlstého (*Psammomys obesus*), pri ktorom išlo o snahu identifikácie konkrétnych génov zodpovedných za reguláciu energetickej homeostázy. U hlodavcov sa proteín SGIP1 nachádza takmer výlučne v CNS pričom expresia CB1R aj SGIP1 sa líši podľa typu bunky a rôznej oblasti v mozgu. (Trevaskis a kol., 2005) Počas tohto výskumu sa zistilo, že nameraná hladina mRNA pre SGIP1 v hypothalamu pieskomila trpiaceho obezitou, bola asi štvornásobne vyššia ako u jedinca s normálnou váhou. Pokiaľ sa ale cielene znížila pomocou siRNA hladina SGIP1 proteínu obezným jedincom, bol u nich pozorovaný úbytok hmotnosti súvisiaci so zníženou chuťou do jedla. Okrem toho že nadexpresia SGIP1 u zvierat má za následok energetickú nerovnováhu a obezitu, rôzne genetické obmeny v géne pre SGIP1 u ľudí môžu spôsobovať taktiež poruchy v energetickej rovnováhe a problémy so zdravím (Cummings a kol., 2012).

Po overení ko-lokalizácie proteínu SGIP1 a CB1 receptora v neurónoch prefrontálneho kortexu, bolo zistené, že cieľovou oblasťou kde je SGIP1 prednostne koncentrovaný je oblasť axónu a presynaptického zakončenia. (Wihelm a kol., 2014) Následné štúdie dokázali, že v prítomnosti SGIP1 dochádza k zníženiu hladiny internalizácie CB1 receptorov do bunky aj počas neprítomnosti agonistu a zároveň prispieva k stabilite bunkového povrchu s aktivovaným CB1R. Počas výskumu liečby chronických chorôb pomocou THC bolo ďalej zistené, že znižovanie koncentrácie CB1R na membráne je bunkovo špecifické a teda sa predpokladá že aj expresia SGIP1 bude rôzna v závislosti na type bunky (Dudok a kol., 2015). Po aktivácii CB1R pomocou syntetického agonistu WIN, sa dokázalo že dochádza k väzbe  $\beta$ -arrestínu 2 k receptoru no  $\beta$ -arrestin 1 sa k aktivovanému receptoru neviazal. Okrem toho v prítomnosti SGIP1 dochádza k posilneniu väzby medzi receptorom a  $\beta$ -arrestínom 2. Toto zistenie vyvráca možnosť, že zníženie množstva internalizujúcich CB1R je spôsobené kompetíciou SGIP1 s

$\beta$ -arestínmi pri väzbe na fosforilovaný C-terminálny koniec receptora. Zatiaľ čo signalizácia CB1R cez  $\beta$ -arestínovú dráhu je ovplyvnená proteínom SGIP1, bolo dokázané že tento proteín nemá vplyv na CB1R signalizáciu sprostredkovanú cez G-proteínovú dráhu. Môžeme teda tvrdiť, že v prítomnosti SGIP1 dochádza k intracelulárnej signálnej selektivitě CB1R. Zvýšenie väzby  $\beta$ -arestínu k receptoru v prítomnosti SGIP1 môže byť spôsobené rôzne. Možné vysvetlenie môže byť napríklad také, že po zvýšení množstva receptorov na bunkovom povrchu, k čomu dochádza pri zabránení internalizácie v prítomnosti SGIP1, sa zvyšuje aj množstvo vytvorených komplexov CB1R s  $\beta$ -arestínom (Shukla a kol., 2011). Inou možnosťou je teoreticky zmena konformácie molekuly  $\beta$ -arestínu v závislosti od prítomnosti SGIP1 čo spôsobuje rozdielnu afinitu k C-koncu CB1R. (Shukla a kol., 2008)

SGIP1 proteín teda nepochybne ovplyvňuje klathrínom sprostredkovanú endocytózu, pri ktorej dochádza k internalizácií CB1R. Do tohto deja sa bezprostredne zapájajú aj už nami spomínané proteíny FCHO1/2 (membrane-curvature-associated FCH domain only proteins). Proteíny SGIP1 aj FCHO1/2 patria do rodiny muniscinov. Táto rodina proteínov je charakteristická štruktúrou domén, ktoré sa zapájajú do klathrínovej endocytózy. Na ich N-konci je lokalizovaná u-homológna doména (uHD), ktorej úloha je pravdepodobne rozpoznávať krátke repetitívne sekvencie adaptorového proteínu počas klathrínovej endocytózy. Centrálnu časť muniscinov následne tvorí doména bohatá na prolín označovaná aj „proline-rich region“. Táto oblasť je nevyhnutná pre interakcie protein-protein lebo práve ju rozpoznávajú proteíny obsahujúce SH3 ( z angl. src homology region 3) doménu. Za doménou bohatou na prolín sa nachádza AP2 aktivačná doména, ktorá pravdepodobne mení zatvorenú inaktívnu konformáciu AP2 komplexu na konformáciu otvorenú a aktívnu, čím umožňuje tvorbu klathrínom obalených váčkov na plazmatickej membráne (Taylor a kol., 2011). N-terminálna časť proteínov SGIP1 a FCHO1/2 je však odlišná. Na N-konci proteínu SGIP1 sa nachádza „membrane phospholipid-binding domain“ (MP-doména) pričom FCHO1/2 proteín je na tomto konci zakončený F-BAR doménou (Uezu a kol., 2011). Predpokladá sa, že práve tento rozdiel v N-koncovej oblasti a nehomologické oblasti sekvencií pre APA doménu sú zodpovedné za rôzny vplyv SGIP1 a FCHO1/2 na klathrínovú endocytózu. Doména MP aj F-BAR majú niekoľko spoločných vlastností, medzi ktoré patrí aj ich schopnosť viazať sa na membránové fosfolipidy. Ich ďalšou spoločnou vlastnosťou je ich schopnosť oligomerizovať pričom je dokázané že práve táto vlastnosť je dôležitá pre tubuláciu membrán. F-BAR doména je teda schopná deformovať membránu tak, aby bola umožnená tvorba váčkou počas endocytózy. Túto

vlastnosť preukázala aj MP-doména a preto je pravdepodobné, že aj ona sa podieľa na tvorbe endocytických včkov (Hollopeter a kol., 2014).

Narozdiel od F-BAR domény, presná štruktúra MP-domény ešte nieje úplne objasnená. Je však preukázané, že prítomnosť SGIP1 bráni internalizácií CB1 a naopak FCHO1/2 slúžia ako proteíny nevyhnutné pre tvorbu klathrínových včkov a iniciáciu klathrínovej endocytózy (Straiker 2012). Zároveň MP-doména nepreukazuje štruktúrnú homológiu s F-BAR doménou. Z týchto tvrdení sme schopný predpokladať, že SGIP1 interferuje klathrínovú endocytózu kompetíciou s FCHO1/2 pričom dochádza k zníženiu internalizovaných receptorov z povrchu bunky. Zatiaľ čo FCHO1/2 je schopný svojou F-BAR doménou ohýbať bunkovú membránu pre tvorbu klathrínových včkov, je možné že MP-doména zo SGIP1 po interakcii s membránou spôsobuje úplne odlišný charakter deformácie membrány.

Pokiaľ by sme teda boli schopný farmakologicky ovplyvniť dráhu kanabinoidej signalizácie u obéznych ľudí s tým, že by sme sa vyhli pôsobeniu na dráhy zapojené do navodenia mentálnej a duševnej pohody, boli by sme schopný vytvoriť bezpečný liek na boj proti obezite. Ako potenciálnym liekom sa v klinických testoch v roku 1994 preukázal rimonabant (SR141716A) (Sam, 2011). Táto látka je selektívny agonista pre CB1R a po podaní hlodavcom u nich dochádza k poklesu telesnej hmotnosti a zníženiu príjmu potravy (Fong, 2009). Okrem týchto účinkov spôsobuje aj metabolické zmeny v periférnych orgánoch jedinca. Napriek tomu že toto liečivo zabezpečilo zníženie hmotnosti a zrýchlenie metabolizmu obéznych ľudí, neskôr došlo k nástupu vedľajších účinkov ako je depresia a psychické poruchy duševného zdravia a rimonabant bol okamžite stiahnutý z trhu pre klinické využitie (Moreira, 2009). Následne boli zrušené klinické skúšky aj ostatným antagonistom CB1R. Preto pre ďalší vývin podobného liečiva a zároveň aj liečiv proti ďalším ochoreniam je nevyhnuté podrobné preskúmanie CB1R signalizácie a molekúl, ktoré sa do nej zapájajú a sú schopné ju ovplyvňovať.



## **2 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom práce je charakterizovať vplyv proteínu SGIP1 na endokanabinoidnú signalizáciu. Hlavným cieľom tejto práce je objasniť možnú interakciu proteínu SGIP1 a AP-2 komplexu počas klathrínom sprostredkovanej endocytózy a zistiť potencionálny vplyv tejto interakcie na internalizáciu kanabinoidného receptora 1(CB1R). Proteín SGIP1 bráni internalizácií CB1R a cieľom tejto práce je podrobnejšia identifikácia a charakterizácia motívov SGIP1 , ktoré sú zodpovedné práve za blokáciu internalizácie CB1R.

### **3 MATERIÁL:**

#### **3.1 Chemikálie:**

Okrem nižšie uvedených, boli všetky ostatné chemikálie dodané firmou Sigma-Aldrich, USA.

##### Serva, SRN:

Imidazol

Agaróza

Peroxodisíran amonný (APS) 98%

Akrylamid

Tween 20

Tris-HCl

Triton X-100

dithiothreitol (DTT)

N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)

##### Penta, ČR:

Hydroxid sodný 98%

1-butanol

Methanol

Ethanol 96%

Kyselina chlorovodíková 35%

##### Ostatné:

Fetálne hovädzie sérum (FBS) - Invitrogen, USA

Hovädzi sérový albumín (BSA) - New England Biolabs, GB

Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs) – Top Bio, ČR

Ethydium bromid<sub>PCR</sub>H<sub>2</sub>O - Top Bio, ČR

<sub>PCR</sub>H<sub>2</sub>O - Top Bio, ČR

Paraformaldehyd 32% - Electron Microscopy Sciences, USA

SuperSignal™ West Femto chemiluminescent substrate - ThermoScientific

SuperSignal™ ELISA Femto maximum sensitivity substrate - ThermoScientific

WIN 55,212-2 – Tocris

HBSS pufor (10x) – Gibco

Milchpulver, Blotting grade – Carl Roth

## **3.2 Kultivačné média**

### 3.2.1 Kultivácia ľudských bunkových línií (HEK 293):

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

DMEM médium +/- (DMEM + 10%obj. FBS)

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

### 3.2.2 Kultivácia baktérií (Dhα)

Y2T transformačné médium (miešané z YT microbial medium)

Agar: Luria-Bertani (LB) (ÚMG)

Médium: Luria-Bertani (LB) (ÚMG)

Do oboch LB bol pre selekciu pridaný ampicilín (100 g/ml)

### 3.2.3 Kalcium-fosfát tranfekcia ľudských bunkových línií

2xHBS

CaCl - Sigma-Aldrich, USA

Poly-L-ornithin - Sigma-Aldrich, USA

### 3.3 Bunkové kmene

Bakteriálne kmene:

DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA)

Ľudské bunkové línie:

HEK293T/17 (z angl. human embryonic kidney cells 293): bunková línia odvodená od ľudských embryonálnych obličkových buniek i inzertovaným SV40 T.antigénom, klon17 (ATTC, Rockefeller University)

### 3.4 Protilátky:

Primárne:

Proti CB1R: králičia, polyklonálna (Alomone Labs)

Proti SGIP1: morčacia (vyrobená u nás v laboratóriu)

Sekundárne:

Proti králičím IgG, kozia, konjugovaná s HRP ( Promega, USA)

Proti morčacím IgG, kozia, konjugovaná s HRP ( vyrobená v našom laboratóriu)

### 3.5 Pufre a roztoky:

#### 3.5.1 Izolácia DNA („Qiagen Plasmid Midi Kit“)

Pufre:

P1 (50mM Tris, 20mM Na<sub>2</sub>EDTA.H<sub>2</sub>O, 0,1 mg/ml RNAsa A, pH 8.0)

P2 (0,2 M naOH, 1% SDS)

P3 (1 M octan draselný, pH 5.5 (upravené 99% kyselinou octovou)

QBT (0,75 M NaCl, 50 mM MOPS, 15%obj. isopropanol, 0,15 %obj. Triton X-100, pH 7.0)

QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15%obj. isopropanol, pH 7.0)

QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris, 15%obj. isopropanol, pH 8.5)

(Všetky pufre boli komerčne dodané firmou QIAGEN, SRN)

### 3.5.2 Pufre pre restričké štípenie, PCR, ligáciu a agarózovú elektroforézu

Restriččný pufo CutSmart (50mM octan draselný, 20mM Tris-octan, 10mM octan horečnatý, 100µg/ml BSA, pH 7.9, New Englands Biolabs)

Restriččný pufo 1 - NEBuffer 1.1 (10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100µg/ml BSA, pH 7.0, New Englands Biolabs)

Restriččný pufo 2 - NEBuffer 2.1 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100µg/ml BSA, pH 7.9, New Englands Biolabs)

Restriččný pufo 3 - NEBuffer 3.1 (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100µg/ml BSA, pH 7.9, New Englands Biolabs)

Pfu reakčný pufo pre PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL BSA, Stratagene)

DreamTaq reakčný pufo pre PCR (zloženie výrobcom neuvedené)

Pufo TAE ((40 mM Tris, 20 mM octová kyselina, 1 mM EDTA, pH 8,4, Thermo Scientific)

### 3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovom gély v prítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE), farbenie gélov a blotting na nitrocelulóзовú membránu:

Roztok na zafarbenie ( 0,025% Coomassie Brilliant blue R250, 40%obj. methanol, 7%obj. kyselina octová)

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

Akrylamidový roztok (2,1 M akrylamid, 52 mM N,N' – methylenbisakrylamid)

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

Pufo pre zaostrovačí gély (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8)

Pufo pre separačny gély (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8)

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

Pufo pre blotting - TOWBIN: (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% MetOH, 0,1% SDS)

Premývaci roztok TBST: (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)

Prečistenie DNA (“QIAquick Gel Extraction”)

QG pufo (QIAGEN, SRN)

PE pufo (QIAGEN, SRN)

Zloženie pufov nebolo uvedené výrobcom.

### 3.5.4 Transfekcia ľudských bunkových línií:

2x HBS (274 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 42 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina), pH 7.0)

2M CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)

## 3.6 Gély pre horizontálnu agarózovú elektroforézu a SDS-PAGE:

### Agarózový gél:

1% agaróza

Pufo TAE 0,5x

1 µg/ml ethidiumbromid

### SDS-PAGE:

	8% SEPARAČNÝ GÉL [ml]	ZAOSTROVACÍ GÉL [ml]
H <sub>2</sub> O	9,2	6,8
AKRYLAMIDOVÝ ROZTOK	5,4	1,7
P U F O R P R E SEPARAČNÝ GÉL	5	-
P U F O R P R E ZAOSTROVACÍ GÉL	-	1,25

10% SDS	0,2	0,1
10% APS	0,2	0,1
TEMED	0,012	0,01
	20ml	10ml

**Tabuľka 1: Zloženie reakčnej zmesi pre prípravu gélov pre SDS-PAGE.**

### 3.7 Oligonukleotidy:

NÁZOV	T <sub>m</sub> °	Sekvencia (5'-3')
REV EcoNI APA	75.1	GCGCCCTCCATAGAAGACACCGG
FOR BamHI APA	78.7	GCGCAGATCTTTCTGCATAAAATCCATTTG GTGC
FOR SacII MP	81.8	GCGCGGATCCCCTGATGCAGATTCGCTTA AT
REV BglII	78.4	GCGCGAGCCTGTTCGAGGCG
REV XbaI F-BAR	73.6	GCGCTCTAGAAGGGTCACACTCTTCAAAT TC

**Tabuľka 2: Zoznam použitých oligonukleotidov**

Všetky oligonukleotidy boli vyrobené a objednané od firmy Sigma-Aldrich, USA.

### 3.8 Enzýmy:

NÁZOV	ROZPOZNÁVACIA SEKVENCIA	JEDNOTKA NA MIKROLITER (U/μl)
BamHI	G/GATCC	20
EcoNI	CCTNN/NNNAGG	10
SacII	CCGC/GG	20
BglII	A/GATCT	10
XbaI	T/CTAGA	10

**Tabuľka 3: Zoznam použitých restriktčných endonukleáz.**

Enzým XbaI bol objednaný od firmy Fermentas. Zvyšné restriktčné endonukleázy boli objednané od firmy New England Biolabs.

### Ostatné enzýmy:

Pfu DNA polymeráza: 2,5 U/μl (Agilent)

Dream Taq DNA polymeráza: 5 U/μl (Thermo Scientific)

T4 DNA ligáza: 1 U/μl (Thermo Scientific)

CIAP fosfatáza: 1 U/μl (Fermentas)

### **3.9 Použité expresné vektory:**

pRK5\_FLAG SGIP1 (plazmid pRK5 s vloženou sekvenciou SGIP1 získanou z mus musculus)

p905\_FCHO2 (plazmid p905 s vloženou sekvenciou FCHO2 získanou z mus musculus)

Oba konštrukty boli vytvorené v našom laboratóriu.

### **3.10 Prístroje:**

Centrifúga Optima MAX Ultracentrifuge (Rotor TLA 100.3) - Beckman Coulter, USA

Centrifúga Mikro 120 (Rotor 1212) - Hettich Zentrifugen, SRN

Centrifúga Z 383 K (Rotor C0383-75) - Hermle, SRN

Blotovacia aparátúra Hoefer Mighly small transpher TE22 - Amersham Bioscience, USA

Elektroforetická aparátúra Hoefer Mighly small II for 8x9cm gels - Amersham Bioscience, USA

Infinite F500 microplate reader - Tecan group Ltd.

Trepačka Orbi Safe TS - Mitsubishi Electric, Japonsko

Sonikátor Ikasonic U 50 control - IKA Labortechnik, SRN

Spektrofotometer Biowave II (Xe lampa, 190-1100nm) - Biochrom, Veľká Británia

Inkubátor Raven 2 - LTE SCIENTIFIC, Veľká Británia

Inkubátor 4000 series - Contherm Scientific, Nový Zéland



Magnetická miešačka Big Squid - IKA Labortechnik, SRN

Laminárny box Bio-II-A - Telstar, Španielsko

pH meter MP225 - Metler Toledo, USA

LAS-3000 imager - Fujifilm

Gradientový mixér Hoefer Mighty Small SE 245 - Amersham Bioscience, USA

Cyklér MJ Research PTC-200 - GMI, USA

Aparatúra pre horizontálnu elektroforézu MJ 105 - Major Science, USA

**Ostatný materiál a vybavenie:**

96-jamkové doštičky - Greiner BioOne, SWZ

Kolony pre veľkoobjemovú izoláciu DNA „Qiagen Plasmid Midi Jit“ - Qiagen,SRN

Kolony na prečistenie DNA „QIAquick Gel Extraction Kit“ - Qiagen,SRN

Kultivačný materiál pre bunkové línie - TPP, SWZ

Nitrocelulózová membrána BioTrace™NT – PALL

## 4 Metódy

### 4.1 Transformácia baktérií *Escherichia coli* (DH $\alpha$ )

Baktérie DH $\alpha$  sa uchovávajú pri -80 °C a preto bolo potrebné ich pred transformáciou najskôr nechať rozpustiť na ľade. Následne sme do vychladených sterilných skúmaviek previedli 50  $\mu$ l baktérií ku ktorým sme pridali 1  $\mu$ g DNA popřípade 5  $\mu$ l ligačnej zmesi. Zmes baktérií s DNA bola inkubovaná na ľade 30 minút, po čom nasledoval tepelný šok. Znamená to, že baktérie boli vložené do vodného kúpela s teplotou 42 °C kde boli ponechané 45 sekúnd. Následne boli ihneď na 2 minúty vložené do ľadu. Po prevedení tepelného šoku bolo k baktériám pridaných 450  $\mu$ l vyhriatého Y2T media (37°C), s ktorým boli kultivované 1 hodinu pri 37°C v trepačke. Na záver bolo 200  $\mu$ l tejto zmesi nanesených sterilnou hokejkou na agarózovú misku s ampicilínom (ampicilin 100 g/ml). Agarózové misky s nanesenou bakteriálnou kultúrou boli inkubované v 37 °C po dobu 16 hodín.

### 4.2 Glycerové stoky

Pre uskladnenie baktérií s transformovanou DNA boli vytvorené glycerové stoky. Po inokulácii kolonie špičkou z agarovej misky a vložení špičky s kolóniou do LB média, bola táto zmes inkubovaná v trepačke po dobu 16 hodín pri 37 °C. Následne bolo k 700  $\mu$ l tejto zmesi pridaných 300  $\mu$ l 50%obj. vodného roztoku glycerol a po premiešaní bola zmes uchovaná v -80 °C.

### 4.3 Maloobjemová a veľkoobjemová izolácia DNA

Pre obe izolácie DNA bol použitý „Quiagen Plasmid Midi Kit“ a roztoky k nemu určené.

#### 4.3.1 Maloobjemová izolácia DNA

Bakteriálna kolónia bola inokulovaná vypichnutím špičkou z agarózovej misky, na ktorú bola pred tým transformovaná. Špička s vypichnutou kolóniou bola vhodená do 2 ml

LB s pridaným ampicilínom (ampicilin 100 g/ml) a takto inkubovaná pri 37 °C, 16 hodín v trepačke (250 rpm). Po tomto čase bola suspenzia centrifugovaná 5 minút pri 18600 x g a peleta bola rozsuspendovaná v 100 µl vychladeného roztoku P1. Po dôkladnom rozsuspendovaní bolo pridaných 200 µl roztoku P2, zmes bola zamiešaná prevrátením a inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote. Následne bolo do zmesi pridaných 200 µl vychladeného roztoku P3, s ktorým bola znova premiešaná a inkubovaná 5 minút. Po inkubácii bola zmes centrifugovaná 15 minút pri 18600 x g a supernatant bol prevedený do 400 µl vychladeného isopropanolu. Po premiešaní bola zmes 15 minút centrifugovaná v 4 °C pri 18600 x g. Po odsatí supernatantu bolo k pelete pridaných 200 µl 70%obj. ethanol, s ktorým bola znova 5 minút centrifugovaná (4 °C, 18600 x g). Supernatant bol odsatý a peleta sa nechala 30-60 minút sušiť pod lampičkou, po čom k nej bolo pridaných 30 µl PCRH<sub>2</sub>O, v ktorej sa nechala rozpúšťať pri 4 °C. Úspešnosť izolácie bola overená restričným štiepením a následnou agarózovou elektroforézou alebo sekvenačnou analýzou.

#### **4.3.2 Veľkoobjemová izolácia DNA**

Z agarózovej misky alebo glycerovej stoky boli baktérie inokulované vypichnutím špičkou, ktorá bola následne vhozená do 100 ml LB s pridaným ampicilínom (ampicilin 100 g/ml). Zmes bola inkubovaná pri 37 °C, 16 hodín v trepačke (250 rpm). Následne bola centrifugovaná v 4 °C 15 minút pri 45 000 rpm, po čom bola peleta rozsuspendovaná v 5 ml vychladeného P1 roztoku. K takejto zmesi bolo potom pridaných 5 ml P2 roztoku, s ktorým bola zmes premiešaná prevrátením a inkubovaná 2 minúty pri izbovej teplote. V tejto fáze zmes nadobudla modré zafarbenie. Následne sa k zmesi pridalo 5 ml vychladeného P3 roztoku a bola inkubovaná 2 minúty pri izbovej teplote. Ďalej bola zmes centrifugovaná 20 minút (18600 x g) a následne bol supernatant prevedený na kolonku s filtrom. Ešte pred prevedením supernatantu bola táto kolonka ekvilibrovaná 5 ml roztoku QBT. Po prekvapnutí supernatantu, bola kolonka 2x premytá 10 ml premývacím roztokom QC. Následne bola DNA zo zmesi eluovaná 5 ml roztoku QF do čistej falkony. K eluátu bolo pridaných 3,5 ml vychladeného isopropanolu a po premiešaní bola zmes 30 minút centrifugovaná v 4°C pri 8000 x g. Po odstránení supernatantu bolo k pelete pridaných 5 ml 70%obj. ethanolu a znova nasledovala centrifugácia po dobu 5 minút (4°C, 8000 x g). Supernatant bol odstraný a peleta sa nechala sušiť po lampičkou. K vysušenej pelete bolo pridaných 100 µl PCRH<sub>2</sub>O, v ktorej sa rozpúšťala 16 hodín v 4°C. Úspešnosť

izolácie bola overená restriktčným štiepením a následnou agarózovou elektroforézou alebo sekvenačnou analýzou.

#### **4.4 Purifikácia DNA**

DNA bola prečistená po restriktčnom štiepení endonukleázami, po polymerázovej reťazovej reakcii a po horizontálnej agarózovej elektroforéze pri izolácii z agarózového gélu. Pre purifikáciu bol využitý „QIAquick Gel Extraction Kit“ a postupovalo sa presne podľa protokolu výrobcu. 50  $\mu$ l roztoku zmiešaných so 150  $\mu$ l QG pufru a 50  $\mu$ l isopropanolu. Po premiešaní bola zmes prevedená na kolonku a centrifugovaná po dobu 1 min. pri 8600 x g. Následne sa na kolonku pridalo 500  $\mu$ l QG pufru a kolonka sa centrifugovala znova 1 minútu. Potom sa na kolonku pridalo 700  $\mu$ l PE pufru a opäť sa kolonka zcentrifugovala po rovnaký čas. Následne bola kolonka premiestnená do novej čistej skúmavky. Pre uvoľnenie DNA z kolonky sa na ňu nanieslo 30  $\mu$ l PCRH<sub>2</sub>O s ktorou sa nechala kolonka inkubovať 1-2 minúty a potom sa centrifugovala 1 minútu. Výsledná koncentrácia DNA bola zmeraná fotometricky a jej čistota skontrolovaná horizontálnou agarózovou elektroforézou.

#### **4.5 Restriktčné štiepenie endonukleázami**

Klonovacie vektory aj inzerty po PCR boli štiepené príslušnými endonukleázami uvedenými v zozname enzýmov. Reakčná zmes obsahovala 2  $\mu$ g DNA, 5  $\mu$ l príslušného reakčného pufru podľa použitých enzýmov (CutSmart, NEB1-4), dva restriktčné enzýmy (2-5 U) a do zmesi bolo pridaných 0,2 mg BSA pokiaľ to parametre enzýmu vyžadovali. Do reakčnej zmesi bola pridaná PCRH<sub>2</sub>O tak, aby celkový objem bol 50  $\mu$ l. Takáto zmes bola následne inkubovaná v 37 °C po dobu 16 hodín.

#### **4.6 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)**

Pre naklonovanie požadovaných konštruktov s obmenami domén v proteíne SGIP1

bolo potrebné vytvoriť vybrané fragmenty pre úspešné klonovanie. Takéto fragmenty boli vytvorené vďaka presne navrhnutým oligonukleotidom, ktoré následne vytvorila a dodala firma Sigma-Aldrich. Reakčná zmes pre polymerázovú reťazovú reakciu obsahovala (tab. 1):

Pfu reakčný pufor	5 $\mu$ l
Horný oligonukleotid (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Dolný oligonukleotid (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Pfu DNA polymeráza	1 $\mu$ l
DNA templát	100 ng (1 $\mu$ l)
pcrH <sub>2</sub> O	40 $\mu$ l
	50 $\mu$ l

**Tabuľka 4: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu**

PCR reakcia prebiehala v cykléry, na ktorom bol nastavený nasledovný program:

1. krok 94 °C, 1 min
2. krok 94 °C, 45 s
3. krok 55 °C, ( teplota nastavená podľa nasadenia T<sub>m</sub> oligonukleotidov) 1 min
4. krok 72 °C, 1 min
5. krok 72 °C, 10 min
6. krok 4 °C, bez obmedzenia dlho

Úspešnosť PCR reakcie bola následne kontrolovaná pomocou agarózovej elektroforézy .

#### 4.7 Horizontálna agarózová elektroforéza

Agarózový gél bol ponorený v elektroforetickej aparatúre do pufru TAE a následne sa do jamiek naniesla vorka DNA nášho záujmu, do ktorej bol pridaný nanášací pufor obsahujúci farbičku pre vizualizáciu. Pre porovnanie veľkosti DNA vzoriek bol do jednej

jamky nanosený aj štandard s určenou veľkosťou fragmentov. Priebeh horizontálnej elektroforézy trval približne 25-35 minút za stáleho napätia 90 V. Gél so vzorkami DNA bol vizualizovaný v transluminátore pod UV svetlom.

#### **4.8 Vyhodnotenie koncentrácie DNA v roztoku spektrofotometrom**

Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometrom s meraním absorpcie pri 260 nm. DNA bola nariadená podľa potreby do tkH<sub>2</sub>O.

#### **4.9 Ligácia**

Ligované boli vektory naštiepené restriktčným štiepením a následne defosforilované s inzertami vytvorenými pomocou PCR a taktiež nasledovným restriktčným štiepením. Pomer vektora k inzertu bol 1/3 (vektor/inzert), pričom do ligačnej zmesi išlo 100 ng vektora. Zvyšný objem bol do 10 µl doplnený PCRH<sub>2</sub>O. Ligačná zmes bola inkubovaná 1 hodinu pri 20 °C a následne zatransformovaná do baktérií.

#### **4.10 Sekvenovanie DNA**

Všetky vzorky boli sekvenované firmou GATC-Biotech. Sekvenačná zmes obsahovala 2,5 µg DNA, 25 µM vybraného primeru a doplnená bola do 10 µl PCRH<sub>2</sub>O. Výsledné sekvenácie boli následne zobrazované pomocou programu SnapGene.

#### **4.11 Transfekcia buniek**

Bunky HEK 293 (ľudské embryonálne obličkové bunky) boli kultivované v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) s obsahom glukózy a L-glutamínu s 10% fetálnym hovadzím sérom (FBS) v 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Tranzientná transfekcia buniek prebehla v 96-jamkových platničkách alebo 10cm miskách, pokiaľ išlo o prípravu proteínových vzoriek pre Western blott. Povrch na 96-jamkových platničkách bol pred

transfekciou pokrytý poly-L-ornithinom (0,001% poly-L-ornithin v PBS, 30-60 min, 37 °C). Pred transfekciou DNA bolo do každej jamky umiestnených 150 000 buniek, ktoré boli následne inkubované po dobu 2 hodín v 37 °C. Transfekcia prebehla metódou kalcium-fosfát transfekcie podľa presných inštrukcií dodávateľa. Celkové množstvo DNA na jednu jamku bolo 2,5 ug, pričom ako kontrolnú vzorku bol zatransfekovaný prázdny vektor. K DNA bolo ďalej pridané CaCl<sub>2</sub> a 2xHBS (2X HEPES Buffered Saline). Po 24 hodinách bol následne prevedený experiment na bunkách.

## **4.12 Pasáž buniek**

Bunky boli pasážované pre zachovanie ich vitality a zvýšenie množstva proliferujúcich buniek výmenou média a zvýšením ich okolitého priestoru na miske. Pasáž prebehla bežným a teda:

Bunkám bolo odsaté staré médium a následne boli ešte premyté 1xPBS. Po ich premytí bol k bunkám pridaný Trypsín, s ktorým boli inkubované v 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 5 minút. Po inkubácii, potom ako sa bunky odlepili od dna misky, k nim bolo pridané DMEM médium, v ktorom sa spolu s trypsinom zhomogenizovali a boli rozbité pipetou o dno misky. Takýto homogenát sa následne naniesol na nové misky s čerstvým médium.

## **4.13 Western blott (Imunoblott)**

### **4.13.1 Príprava proteínových vzoriek**

Proteínové vzorky boli robené dva dni po transfekcii DNA do buniek. Po uplynutí tejto doby boli misky s bunkami na ľade premyté 1xPBS a následne k nim bola pridaná 0,32 M sucroza, do ktorej boli bunky zoškrabané. Bunky v sucrose boli centrifugované v chlade (10 minút, 13000 x g) a následne po odsatí supernatantu boli sonikované v TB (treatment buffer) s pridaným DTT. Vzorky boli po sonikácii inkubované 10 minút v 85 °C vodnom kúpeli a ihneď centrifugované 10 minút pri 18600 x g. Proteínové vzorky boli uchované v 4 °C.

#### **4.13.2 SDS-PAGE**

Pre SDS-PAGE boli vytvorené 8% gradientové gély, ktoré boli nasadené na elektroforetickú aparatúru firmy Hoefer. Aparatúra bola naplnená elektroforetickým pufrom TANK a do jednej jamky bolo nanesených 5 µl proteínovej vzorky. Pre porovnanie vzoriek a približné určenie veľkosti proteínu bol na gél nanesený aj komerčný proteínový štandard. Elektroforéza prebiehala za konštantného napätia 330 mV po dobu asi 3 hodín. Po tejto dobe boli gély okamžite blotované na nitrocelulózovú membránu pomocou metódy Western transfer blott.

#### **4.13.3 Western transfer Blott (Imunoblot)**

Po ukončení SDS-PAGE bol gél preblotovaný na nitrocelulózovú membránu pomocou western blotu pre následovnú imunodetekciu vybraných proteínov. Do roztoku Towbin transfer buffer 1x sme ponorili blotovaciu sieťku, na ktorú sme následne položili zvyšok blotovacieho aparátu v poradí: blotovacia špongia, filtračný papier, nitrocelulózová membrána, gél z SDS-PAGE, filtračný papier a blotovacia špongia. Takto zoskladanú aparatúru sme uzavreli do sieťky a vložili do do blotovacej nádoby tak, aby transfer prebiehal od katódy k anóde. Samotný bloting prebiehal pri konštantnom napätí 330 mA po dobu 1,5 hodiny. Po blote sa membrána inkubovala na preklapacej plošine v 3% mlieku (v PBS 1x) 16 hodín v 4 °C. Po tejto inkubačnej dobe bola membrána 4 krát premytá roztokom TBST 1x tak, aby membrána bola v roztoku 1 minútu, 5 minút, 10 minút a na záver 15 minút. Po premytí bola k membrane pridaná primárna protilátka anti-Sgip1 s koncentráciou 1:500, pričom roztok s protilátkou obsahoval aj 0,5% mlieko (v PBS1x). S primárnou protilátkou bola membrána premývaná 2 hodiny na preklapacej plošine. Po tejto dobe bola membrána znova premytá 4 krát roztokom TBST1x (1 min; 5 min; 10 min; 15 min;). Následne bola membrána 2 hodiny premývaná sekundárnou protilátkou anti-guinea pig s koncentráciou 1:5000 a po tejto dobe znova premytá 4x TBST 1x rovnakým postupom. Následne bolo na membránu nanesených 1500 µl roztoku SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific) a signal bol detekovaný na prístroji Fujifilm LAS-3000 Imager.



#### 4.14 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Na to, aby sme mohli pozorovať vlastnosti vytvorených rekombinantných konštruktor DNA s upravenými doménami proteínu SGIP1, bolo potrebné zistiť do akej miery ovplyvňujú internalizáciu CB1R. Vzhľadom na to, že konštrukty boli vytvorené tak aby mali rozdielne domény vrátane domén z FCHO2, vieme predpokladať aj vplyv jednotlivých domén na internalizáciu CB1R.

Metódou ELISA vieme na základe chemiluminiscenčného signálu pozorovať množstvo receptorov značených protilátkou nachádzajúcich sa na povrchu bunky.

Bunky boli spásávané na 96-jamkovú doštičku pokrytú poly-L-ornithinom, pričom na jednu jamku bolo nanosených približne 150 000 buniek. Po dvoch hodinách boli bunky transientne transfekované vybranou DNA a negatívnou kontrolou. 24 hodín po transfekcii boli bunky stimulované pomocou 2,5  $\mu$ M WIN pridaného do kultivačného media DMEM a inkubované po dobu 30 minút. Po inkubácii boli bunky ihneď 5 minút fixované 4% PFA v PBS a následne 2x premyté 1xPBS. Po premytí boli 30 minút blokované blokačným pufrom (1% FBS v PBS) a po tejto dobe k nim bola pridaná primárna protilátka anti-CB1R v koncentrácií 1:500. Bunky boli s primárnou protilátkou znova inkubované 30 minút a následne premyté 2 krát blokačným pufrom. Potom boli inkubované so sekundárnou protilátkou anti-rabbit (1:5000) 30 minút a premyté blokačným pufrom a samotným 1xPBS. Po premytí sa do každej jamky pridalo 70  $\mu$ l 1xPBS a 100  $\mu$ l chemiluminiscenčného roztoku Super-Signal® ELISA Femto maximum sensitivity substrate a signal bol detekovaný na prístroji Infinite F500 microplate reader.

## 5 Výsledky:

### 5.1 Vytvorenie rekombinantných DNA konštruktov:

Pre podrobnejšie objasnenie vlastností proteínu SGIP1 bolo najskôr nevyhnutné preštudovanie jeho štruktúry a domén, ktoré tento proteín obsahuje. Preto bolo prvým krokom pomocou restriktívneho klonovania vytvorenie konštruktov so zmenenou štruktúrou pôvodného SGIP1 tak, aby bolo neskôr možné ďalšími metódami predpokladať vlastnosti jednotlivých domén. V našom laboratóriu bolo vytvorených niekoľko rekombinantných konštruktov SGIP1 proteínu a to nasledovných:

- s deléciou MP domény (del. MP)
- s deléciou MP a APA domény (del. MP,APA)
- s deléciou APA domény (del. APA)
- namiesto MP domény bola vložená F-BAR doména z FCHO2 (+F-BAR)
- namiesto MP a APA domény bola vložená F-BAR a APA doména z FCHO2 (+F-BAR,APA)

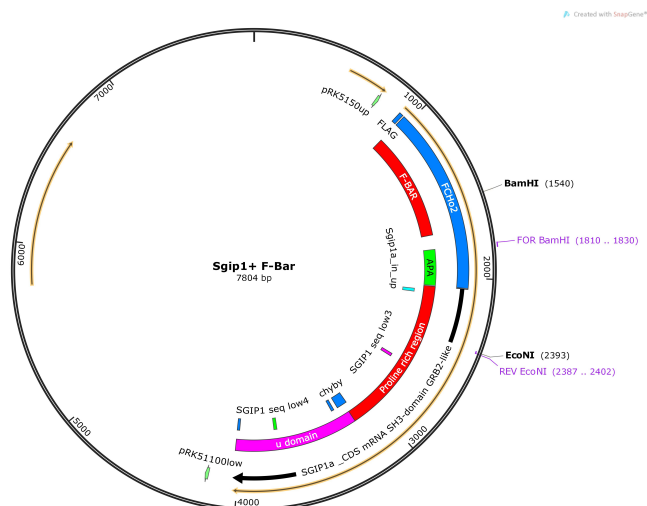
Jedným z cieľov tejto práce bolo vytvoriť šiesty rekombinantný konštrukt SGIP1 proteínu s deléciou APA domény a následným vložením APA domény z proteínu FCHO2 na miesto delécie (obr. 7).



**Obr. 7: Grafické zobrazenie štruktúry použitých a vytvorených rekombinantných konštruktov.**

### 5.1.1 Použitá DNA a postup klonovania:

Pre naklonovanie cieľovej rekombinantnej DNA bola použitá už vytvorená rekombinantná DNA s deléciou MP domény a vloženou F-BAR doménou na miesto delécie (+F-BAR) pričom celá sekvencia rekombinantného SGIP1 bola vložená do plazmidu pRK5 (Obr.8).

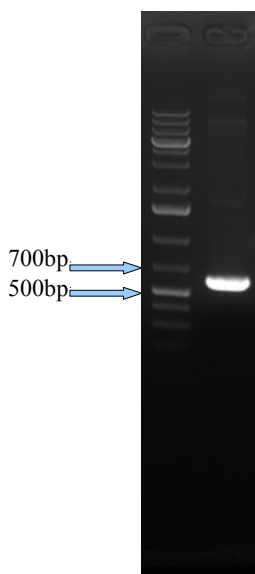


**Obr. 8: Mapa použitého plazmidu s vloženou sekvenciou rekombinantného SGIP1 s F-BAR doménou.**

Na tento konštrukt boli navrhnuté oligonukleotidy tak, aby naamplifikovaný úsek pomocou PCR reakcie obsahoval na svojom okraji celú APA doménu a ďalej časť prolín bohatej oblasti, pričom bol fragment ďalej štiepený restriktčnými endonukleázami BamHI a EcoNI (Obr. 9).

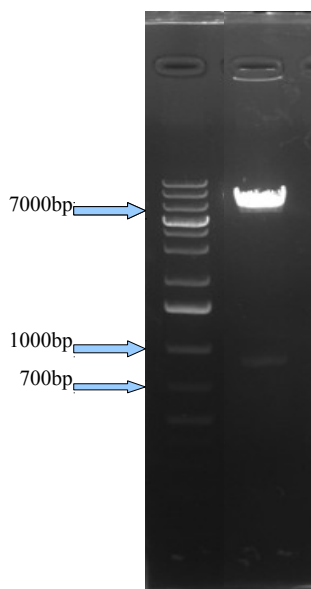


**Obr. 9: Mapa naamplifikovaného PCR produktu s vyznačenými štiepnymi miestami pre BamHI a EcoRI restriktčné endonukleázy a miestami nasadnutia oligonukleotidov FOR BamHI a REV EcoNI.**



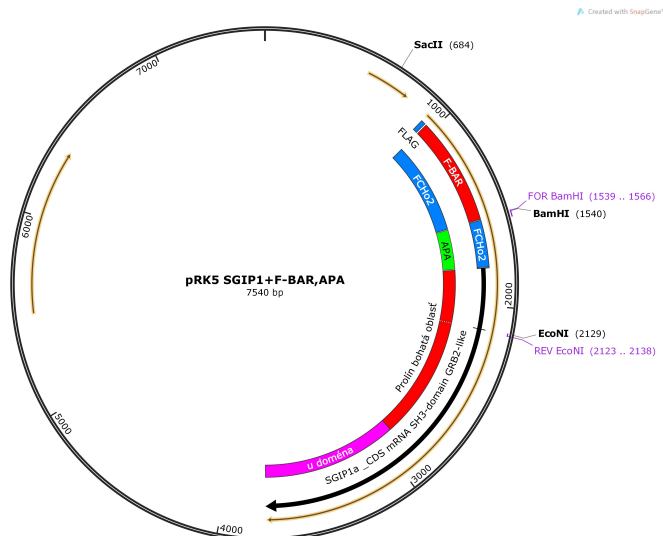
**Obr. 10: Mapa PCR produktu a snímka gélu po restričnom štiepení naamplifikovaného fragmentu.** Horný obrázok predstavuje mapu PCR produktu s obsahom APA domény a časti prolín bohatej oblasti. Na mape sú fialovým písmom vyznačené navrhnuté oligonukleotidy a čiernym písmom je popísaný začiatok a koniec fragmentu a enzýmy štiepiace na jeho koncoch.

Okrem vytvorenia inzertu bol pripravený zároveň vektor, do ktorého bol inzert ligovaný. Vektor vznikol restričným štiepením z rovnakej východzej DNA a teda konštruktom s vloženou F-BAR doménou (Sgip1+F-BAR). Konštrukt bol štiepený taktiež restričnými endonukleázami BamHI a EcoNI tak, aby boli konce inzertu kompatibilné s naštiepeným vektorom. Naštiepený vektor bol ďalej nanosený na gél pre agarózovú elektroforézu z ktorého bol následne vypurifikovaný a použitý pre ligáciu.

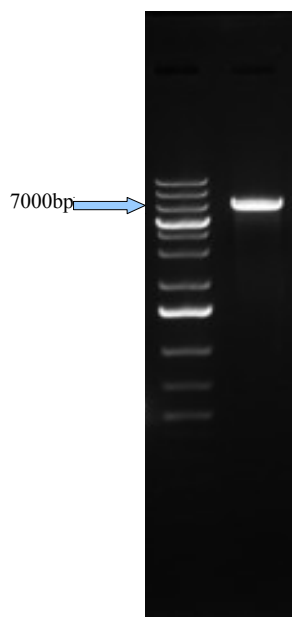


**Obr. 11: Snímka gélu s naštiepeným vektorom enzýmami BamHI a EcoNI.** Z pôvodnej DNA bol vyštiepený fragment o veľkosti 853bp pričom zvyšok sekvencie, ktorý sme použili ako vektor mal veľkosť 6951bp. Vektor bol následne vyrezaný a vpurifikovaný z gélu a použitý pre ligáciu. Takto vytvorený inzert a vektor boli následne ligované za vzniku rekombinantnej DNA, ktorá obsahovala aminokyselinovú sekvenciu rozpoznávanú a štiepenú restričnou endonukleázou BamHI pričom štiepenie a ligácia boli navrhnuté tak, aby sa nachádzalo toto štiepne miesto presne na okraji APA domény tak ako je znázornené na obr.

Vytvorená rekombinantná DNA slúžila ako medzikrok pre ďalší postup. V nasledovnom kroku bola táto DNA využitá ako vektor pre ďalšiu ligáciu a teda bola ďalej štiepená restriknými endonukleázami SacII a BamHI. Vyštiepený tak bol fragment so sekvenciou kódujúcou F-Bar doménu (obr. 12).

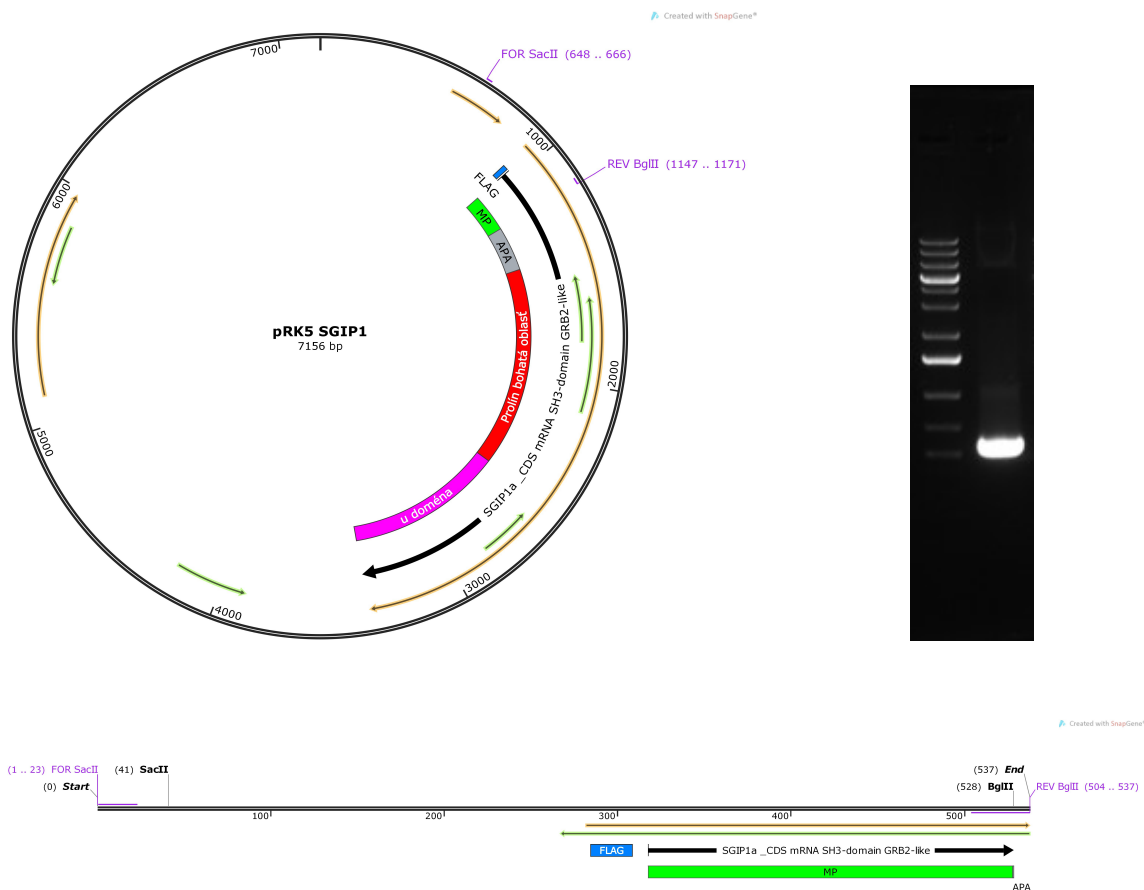


**Obr. 12: Mapa vytvoreného konštruktú, z ktorého bol následne vyštiepený fragment s F-BAR doménou.**



**Obr. 13: Snímka agarózového gélu s naneseným naštiepeným vektorom, ktorý má po štiepení celkovú veľkosť 6685bp.**

Pre vytvorenie inzeru sme využili sekvenciu proteínu SGIP1 vloženú do plazmidu pRK5. PCR reakciou a následným restrikným štiepením pomocou restrikných endonukleáz SacII a BglII bol vytvorený fragment tak, aby výsledný obsahoval celú aminokyselinovú sekvenciu kódujúcu MP doménu z proteínu SGIP1.

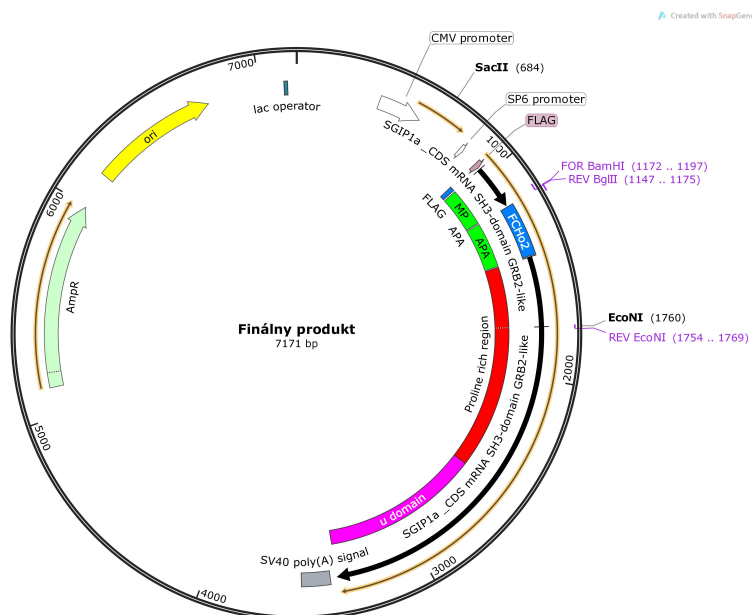


**Obr.14: Názorná mapa použitého vektora so SGIP1 sekvenciou a z neho naamplifikovaného fragmentu PCR reakciou s priloženou snímkou gélu pre kontrolu úspešnosti PCR reakcie.** Na kruhovej mape je znázornený vektor s vloženou sekvenciou pre proteín SGIP1, na ktorom sú vyznačené fialovým písmom navrhnuté oligonukleotidy pre PCR reakciu (FOR SacII a REV BglIII). Na lineárnej mape je zobrazený naamplifikovaný fragment s vyznačenými oligonukleotidmi a štiepnymi miestami rozpoznávanými restriktívnymi endonukleázami SacII a BglIII. Zároveň je zelenou farbou znázornena oblasť pre sekvenciu kódujúcu MP doménu.

PCR produkt bol následne ligovaný do vytvoreného vektora (SGIP1+F-BAR,APA), do miesta kde z neho bol vyštiepený fragment pomocou SacII a BamHI restriktívných endonukleáz. DNA inzer bol štiepený pomocou SacII a BglIII, pričom BamHI a BglIII sú navzájom kompatibilné a čo znamená že konce sú schopné sa zligovať.

Takáto druhá ligácia vrámci postupu dala vzniku cieľovému rekombinantnému

konštruktu DNA, ktorý na záver obsahoval zhodnú aminokyselinovú sekvenciu ako pôvodný proteín SGIP1 ale s tým rozdielom, že jeho APA doménu tvorila sekvencia získaná z príbuzného proteínu FCHO2.



**Obr. 15: Mapa cieľovej rekombinantnej DNA s vyznačenými doménami.**

Na názornej mape sú vyznačené farebne rôzne motívy proteínu SGIP1 (MP, APA, prolín bohatá oblasť a  $\mu$ -doména). Ďalej sú fialovým písmom označené miesta nasadenia použitých oligonukleotidov (FOR BamHI, REV BglII, REV EcoNi) a čiernym písmom označené štiepne miesta pre použité restriktčné endonukleázy (SacII a EcoNI). Pred samotnou sekvenciou pre rekombinantnú DNA proteínu SGIP1 je umiestená sekvencia kódujúca FLAG oblasť, ktorá slúži na prípadnú imunodetekciu pomocou protilátok. Ďalej mapa obsahuje sekvencie pre promótor (CMV promótor a SP6 promótor), vyznačený je aj lac operón (lacO), miesto počiatku replikácie (ori), sekvencia kódujúca rezistenciu na ampicilín (AmpR) a polyadenylová sekvencia (poly(A)).

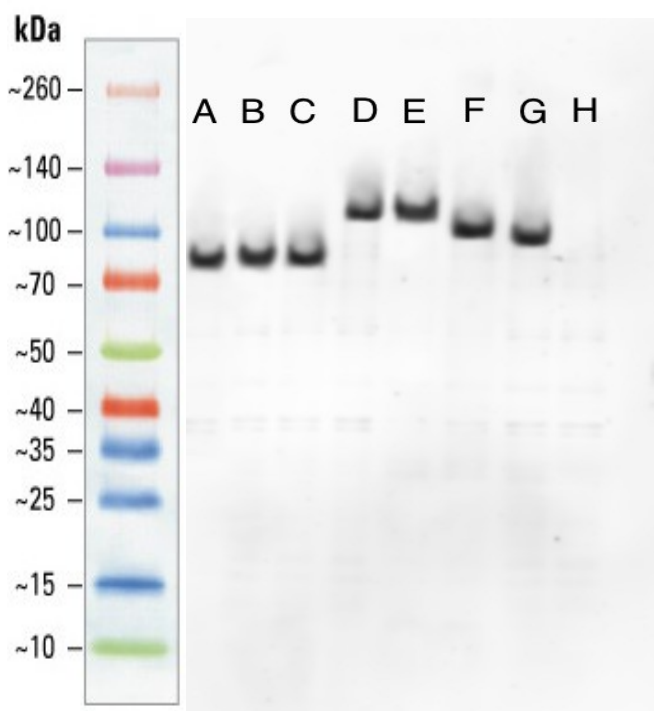
## 5.2 WESTERN BLOTT

Po vytvorení rekombinantnej DNA vložení sekvencie pre APA doménu z proteínu FCHO2 bolo ďalším cieľom overiť expresiu DNA v ľudských bunkách a to konkrétne v

embryonálnych obličkových bunkách (HEK293). Expresia DNA bola overená metódou Western blott, pri ktorej boli vytvorené proteínové vzorky pomocou transfekcie vytvoreného konštruktú do ľudských buniek a následne nanosené na polyakrylamidový gél a preblotované na nitrocelulóзовú membránu.

Okrem nami vytvoreného konštruktú so zámenou APA domény, bola touto metódou overená aj expresia už existujúcich rekombinantných DNA s pozmenenou sekvenciou pôvodného SGIP1 proteínu, ktoré už vytvorené v našom laboratóriu. Po rozdelení jednotlivých proteínov v každej proteínovej vzorke v polyakrylamidovom gély počas horizontálnej elektroforézy (SDS-PAGE), bola expresia overená pomocou porovnania proteínovej molekulovej hmotnosti jednotlivých proteínov v každej vzorke, pričom ich veľkosť bola určená vďaka porovnaniu s naneseným štandardom. Takto sme boli schopní overiť, či sa vybraná rekombinantná DNA transfekovala do ľudských buniek HEK293 a teda sa jej transkript nachádza medzi ostatnými proteínami obsiahnutými v bunkách.

Molekulové hmotnosti (v kDa) jednotlivých proteínov rekombinantných konštruktov boli porovnávané s kontrolnými vzorkami s divým typom SGIP1 proteínu a negatívnou kontrolou v podobe prážneho vektora pRK5, do ktorého bol zároveň vložený aj zelený fluorescenčný proteín (GFP) pre kontrolu transfekcie aj pomocou fluorescenčného mikroskopu (obr. 16).

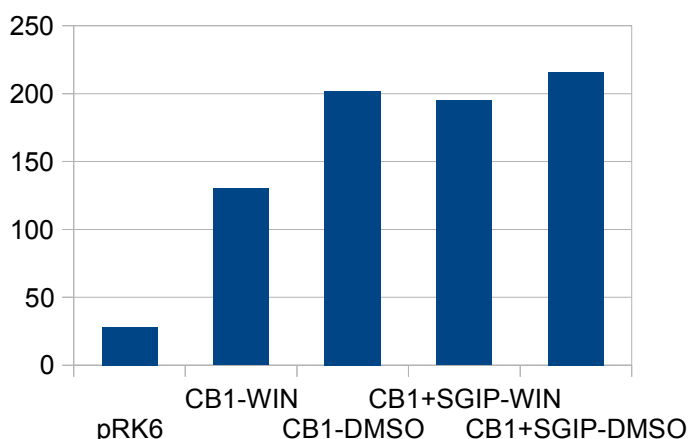


**Obr. 16: Snímka nitrocelulóзовej membrány s imunodetekovanými proteínmi vybraných konštruktov. A:** delécia MP domény (del. MP) – 82kDA **B:** delécia MP a APA (del. MP,APA) – 73 kDA **C:** delécia APA (del. APA) – 80 kDA **D:** delécie MP a APA a vloženie F-BAR a APA z FCHO2 (del. MP,APA+F,BAR, APA) – 113 kDA **E:** delécia MP a vloženie F-BAR (del.MP+F-BAR) – 108,7 kDA **F:** delécia APA a vloženie APA z FCHO2 (APA z FCHO2) – 88,1 kDA **G:** divý typ SGIP1 – 90 kDA **H:** negatívna kontrola prážny vektor pRK5



### 5.3 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Po potvrdení expresie rekombinantných konštruktov v HEK293 sme boli schopný ďalej experimentálne pozorovať ich rozdielny vplyv na endokanabinoidnú signalizáciu, konkrétne na priebeh internalizácie kanabinoidného receptora 1 (CB1). Pre pozorovanie takéhoto vplyvu sme použili metódu ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Táto metóda funguje na princípe merania chemiluminiscenčného signálu vysielaného z protilátkou značených receptorov. Znamená to, že pokiaľ za prítomnosti vybraného rekombinantného konštruktu dochádza k internalizácii CB1R z bunkového povrchu do cytoplazmy, je nameraný nižší signál vzhľadom k tomu že nieje detegovateľný pokiaľ je receptor vo vnútri bunky. Pre overenie správnosti fungovania metódy sme použili vzorky CB1R v prítomnosti pôvodného proteínu SGIP1, o ktorom vieme, že bráni internalizácii CB1R. Vzorku s obsiahnutým CB1R a SGIP1 proteínom sme porovnávali so vzorkou s CB1R bez prítomnosti SGIP1 a bola použitá aj negatívna kontrola v ktorej bol do buniek zatransfekovaný prázdny vektor (graf 1).



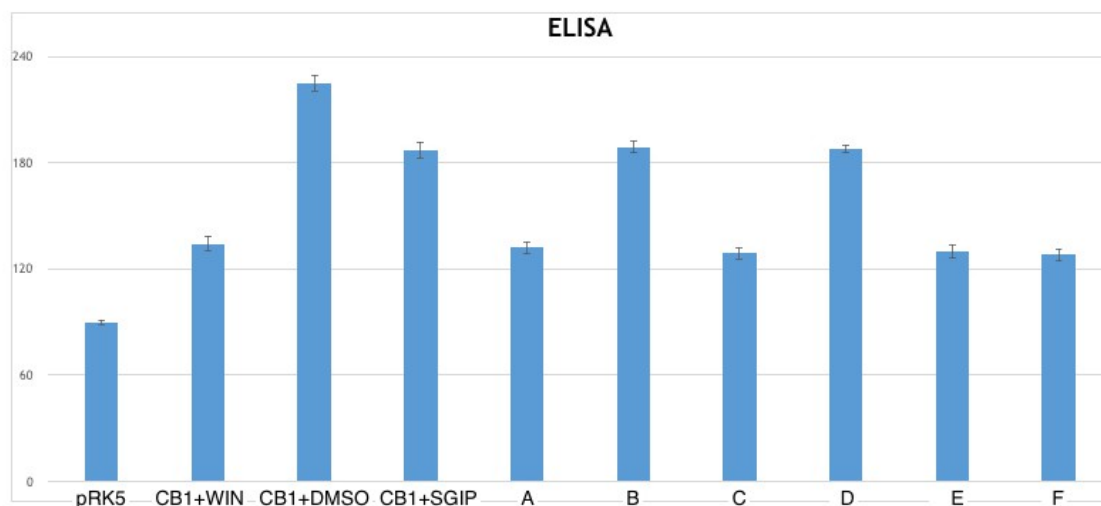
**Graf 1: Porovnanie stimulovaného CB1R pomocou agonistu WIN a nestimulovaného CB1R pomocou DMSO v prítomnosti a neprítomnosti SGIP1.** Na grafe je v prvom stĺpci znázornená negatívna kontrola pomocou prázdneho vektora pRK6 kde sa vo vzorke nenachádza CB1R. V druhom stĺpci je vorka kde je CB1R stimulovaný a dochádza k jeho internalizácii do cytoplazmy bunky (CB-WIN). Pokiaľ však CB1R stimulovaný nieje ako tomu je v treťom stĺpci (CB-DMSO), receptor neinternalizuje a ostáva na povrchu bunky čo znamená že sme schopný detegovať vyššiu hladinu signálu. Ak sa v bunke nachádza SGIP1, dochádza k inhibícii internalizácie aj za podmienok stimulácie receptora (CB+SGIP-WIN). Pokiaľ receptor nieje stimulovaný a zároveň je prítomný SGIP1,

hladina bioluminescenčného signálu bude najvyššia, lebo receptor nieje aktivovaný a zároveň internalizáciu inhibuje SGIP1 (CB1R+SGIP-WIN).

Po overení správnosti fungovania metódy, sme experiment zopakovali aj s rekombinantnými DNA vytvorenými v našom laboratóriu vrátane nového vytvoreného konštruktú so zamenenou APA doménou. Použitých bolo teda celkom šesť rekombinantných konštruktov proteínu SGIP1:

- s deléciou MP domény (del. MP)
- s deléciou MP a APA domény (del. MP,APA)
- s deléciou APA domény (del. APA)
- namiesto MP domény bola vložená F-BAR doména z FCHO2 (del. MP+F-BAR)
- namiesto MP a APA domény bola vložená F-BAR a APA doména z FCHO2 (del. MP,APA+F-BAR,APA)
- namiesto APA domény bola vložená APA doména z proteínu FCHO2 (APA z FCHO2) (vytvorenie tohoto nového konštruktú bolo jedným z cieľov práce)

Do buniek sa transfekovalo šesť rekombinantných DNA spolu s CB1R a zároveň boli transfekované aj kontrolné vzorky pre porovnanie a to CB1R s pôvodným SGIP1 proteínom, samotný CB1R a negatívna kontrola v podobe prázdneho vektora pRK5 s vloženým zeleným fluorescenčným proteínom (GFP) pre overenie úspešnosti tranfekcie pomocou fluorescenčného mikroskopu. Vzorky so samotným CB1R boli vytvorené celkom dve, z toho dôvodu že jedna vzorka bola stimulovaná syntetickým agonistom WIN a druhá negatívnou kontrolou s DMSO (dimetyl sulfoxid), kedy k stimulácii nedošlo. Všetky ostatné vzorky boli stimulované agonistom WIN, ktorý slúži pre aktiváciu receptora.



**Graf 2: Graf znázorňuje výsledné hodnoty výšky bioluminiscenčného signálu imunologicky značených CB1R v prítomnosti vybraných rekombinantných konštruktov.** Prvý stĺpec je kontrola s transfekovaným prázdny vektorom pRK5, ktorý zároveň nesie GFP pre overenie transfekcie ešte pred začiatkom metódy. Signál má najnižšiu hodnotu vzhľadom k neprítomnosti CB1R. Ďalší stĺpec vyjadruje výšku signálu počas stimulácie samostatného CB1R jeho agonistom WIN. Po stimulácii dochádza k aktivácii CB1R čo následne spôsobí jeho internalizáciu do cytoplazmy odkiaľ už nie sme schopný signál detekovať (CB1+WIN). Keď však CB1R nieje aktivovaný ako tomu je po pridaní čistého DMSO, receptor ostáva na bunkovom povrchu a teda sme schopný pozorovať vyššiu hodnotu signálu ako je znázornené v treťom stĺpci (CB1+DMSO). Všetky ďalšie stĺpce na grafe vyjadrujú vzorky stimulované pomocou WIN a teda CB1R je v nich aktivovaný. V prítomnosti SGIP1 dochádza k inhibícii internalizácie preto sú hodnoty signálu vyššie v porovnaní s hodnotami samotného CB1R (CB1+SGIP). Stĺpce A-F sú vzorky s CB1R v prítomnosti vybraných konštruktov a to nasledovne: **A:** APA z FCHO2 **B:** del. MP+F-BAR **C:** del. MP,APA+F-BAR,APA **D:** del. MP **E:** del. MP,APA **F:** del. APA

Najvyššie hodnoty dosahovali konštrukty s APA doménou zo SGIP1 (B, D), kedy došlo k inhibícii internalizácie CB1R približne rovnako ako v prítomnosti SGIP1 proteínu. Naopak ostatné konštrukty neboli schopné brániť internalizácii CB1R do cytoplazmy bunky a teda ich prítomnosť spôsobovala pokles bioluminiscenčného signálu na povrchu bunky.

## 6. DISKUSIA

Hlavným cieľom tejto práce bolo podrobnejšie objasniť vplyv proteínu SGIP1 na internalizáciu kanabinoidného receptora 1 (CB1R). Preto boli pre tento účel vytvorené rekombinantné konštrukty DNA SGIP1 proteínu, ktoré boli následne aplikované v metóde ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Touto metódou bola potvrdená teória, v ktorej divý typ proteínu SGIP1 bráni internalizácií CB1R do intracelulárnych priestorov bunky (graf 1). Ďalšie výsledky ukázali, že rekombinantné konštrukty SGIP1 nesúce APA doménu z proteínu FCHO2 blokovali internalizáciu CB1R do značne vyššej miery ako konštrukty s APA doménou ponechanou z proteínu SGIP1 (graf 2).

Podľa už potvrdených zistení bolo dokázané, že proteín SGIP1 bráni internalizácií CB1R do vnútrobunkových priestorov s značne takto ovplyvňuje mechanizmus endocytózy v mozgových bunkách (Uezu a kol., 2007). Naše výsledky potvrdili túto teóriu keď bola do ľudských embryonálnych obličkových buniek (HEK293) transfekovaná DNA pre CB1R a SGIP1 pričom pre porovnanie boli bunky transfekované aj samostatnou DNA pre CB1R. Vo vzorkách so SGIP1 bol jasne pozorovateľný úbytok internalizujúcich receptorov z povrchu buniek (graf 1).

SGIP1 má pomerne výraznú sekvenčnú homológiu a fylogenetickú príslušnosť s adaptorovými proteínmi FCHO1/2. Rovnako ako SGIP1 sa aj FCHO1/2 zapájajú do klathrínom sprostredkovanej endocytózy (CME) a sú schopné vplývať na tubuláciu plazmatickej membrány počas tohto mechanizmu. Aj napriek ich značnej štruktúrnej homológii, ukázalo sa že zatiaľ čo FCHO1/2 sa podieľajú na iniciácii počiatočných fáz klathrínom sprostredkovanej endocytózy (Cocucci akol., 2012), SGIP1 skôr bráni tomuto mechanizmu a funguje ako inhibítor CME (Uezu a kol., 2007). SGIP1 a FCHO1/2 patria do rodiny proteínov nazývaných ako munisciny. Štruktúra muniscínov je homológna na ich C-konci kde sa nachádzajú domény v poradí: medium  $\mu$ - doména, prolín bohatá oblasť, AP2 aktivačná doména (APA) (Henne a kol., 2010). Na ich N- konci sa nachádzajú domény cez ktoré dochádza k väzbe na membránové fosfolipidy, no nedá sa však tvrdiť že by niesli vzájomné homologické oblasti. FCHO1/2 majú na svojom N-konci F-BAR doménu zatiaľ čo SGIP1 má v tejto oblasti doménu MP. Muniscíny interagujú s proteínmi zapojenými do CME ako sú napríklad intersectin, Eps15 alebo AP2 komplex.

Nevyhnutné pre iniciáciu CME je prechod AP2 komplexu zo zatvorenej inaktívnej konformácie na konformáciu otvorenú a aktívnu. Nedávno bolo potvrdené, že AP2 je aktivovaný práve APA doménou z FCHO1/2 vďaka ich vzájomnej interakcii pred zahájením endocytózy (Hollopeter a kol., 2014). SGIP1 a FCHO1/2 sú do veľkej miery homológne v aminokyselinovej sekvencii kódujúcej APA doménu no ako sme tvrdili už skôr, SGIP1 pôsobí ako inhibítor CME. Vzhľadom na to, že MP doména a F-BAR doména sú absolútne unikátne, bolo by možné tvrdiť že práve tieto oblasti sú zodpovedné za rozdielne vlastnosti SGIP1 a FCHO1/2 v CME. Naše výsledky však ukazujú že práve rekombinantné konštrukty nesúce APA doménu zo SGIP1 bránia internalizácií CB1R a pri konštruktoch s APA doménou z FCHO2 k internalizácií dochádzalo rovnako ako vo vzorkách so samotným CB1R v neprítomnosti SGIP1. Preto sme schopný predpokladať, že rozdielny vplyv SGIP1 a FCHO2 na internalizáciu CB1R nebude spôsobený samotným rozdielom v ich N koncovej časti a teda MP doménou a F-BAR doménou. Pravdepodobne bude na túto vlastnosť vplývať aj presná štruktúra aminokyselinovej sekvencie APA domény vzhľadom k tomu, že SGIP1 a FCHO2 nesú aj malé časti aminokyselinových sekvencií kódujúcich APA doménu, medzi ktorými nedochádza k ich vzájomnej homológii (obr. 6). Z toho sa dá predpokladať že rôzne vlastnosti SGIP1 a FCHO2 sú určené konkrétnym úsekom aminokyselinovej sekvencie vrámci APA domény. Tento úsek môže mať vplyv na aktiváciu AP2 komplexu pomocou zmeny jeho konformácie z uzavretej formy na otvorenú formu alebo môže dochádzať vďaka nemu k interakcií s ďalšími adaptorovými proteínmi zapojenými do CME. V prítomnosti SGIP1 dochádza k vychlípeniu plazmatickej membrány smerom do extracelulárneho priestoru, zatiaľ čo FCHO2 iniciuje tvorbu klathrínom obalených vačkov a teda dochádza k vchlípeniu membrány smerom to cytoplazmy. Tento rozdielny spôsob tubulácie plazmatickej membrány je pravdepodobne taktiež spôsobený odlišnosťami v aminokyselinovej sekvencii APA domén proteínov SGIP1 a FCHO2. Preto sa dá predpokladať že práve táto odlišnosť je zodpovedná za interakciu s rozdielnymi proteínmi zapojenými do skorej fázy endocytózy. Pre ďalší výskum je teda nutná charakterizácia konkrétnych oblastí aminokyselinovej sekvencie APA domén pre lepšie pochopenie ich rozdielných vlastností pri SGIP1 a FCHO2.

Nadexpresia SGIP1 v mozgových bunkách zvierat vedie k narušeniu energetickej rovnováhy a k obezite (Trevaskis a kol., 2005). Zároveň u ľudí spôsobujú rôzne genetické variácie génu pre SGIP1 poruchy v energetickej homeostáze (Cummings a kol., 2012). Ak

by sme boli schopný podrobnejšie porozumieť mechanizmu vplyvu SGIP1 na endokanabinoidnú signalizáciu, boli by sme schopný potenciálne využiť tieto poznatky na možné terapeutické ciele a vývin liečiv proti ochoreniam súvisiacim napríklad s poruchou energetickej rovnováhy. Pre elimináciu nežiadúcich účinkov ako to bolo napríklad v prípade lieku Rimonabant, je nevyhnutné podrobné preskúmanie endokanabinoidnej signalizácie a úlohy SGIP1 na túto signálnu dráhu.

## 7 ZÁVER

Pre dosiahnutie výsledkov boli pripravené rekombinantné DNA konštrukty nesúce rôzne kombinácie motívov z proteínov SGIP1 a FCHO2. Tieto konštrukty boli následne transfekované do buniek HEK293 kde bola ich expresia overená metódou Western blott. Pre porovnanie sme v tejto metóde použili ako negatívnu kontrolu prázdny vektor pRK6 a divý typ SGIP1. Po potvrdení expresie rekombinantných DNA v HEK293 sme následne pomocou metódy ELISA pozorovali ich vplyv na internalizáciu kanabinoideho receptora 1 (CB1R). Do HEK293 sme teda ko-transfekoali DNA pre CB1R a DNA pre vybraný rekombinantný konštrukt. Po stimulácii agonistom WIN sme pomocou chemiluminiscenčného signálu na receptore vedeli porovnať množstvo receptorov nachádzajúcich sa na bunkovom povrchu v prítomnosti vybraných rekombinantných konštruktov. Vzhľadom na to, že konštrukty nesúce APA doménu zo SGIP1 výraznejšie bránili internalizácii CB1R, sme schopný predpokladať že práve táto oblasť je zodpovedná za inhibíciu klathrínom sprostredkovanej endocytózy počas endokanabinoidej signalizácie. Na základe týchto zistení, veríme že podrobnejšie preskúmanie štruktúry aminokyselínovej sekvencie APA domény SGIP1 proteínu objasní jeho rozdielny vplyv na internalizáciu CB1R v porovnaní s proteínmi FCHO1/2.

## 8 POUŽITÁ LITERATÚRA

Aizpurua-Olaizola, Oier; Elezgarai, Izaskun; Rico-Barrio, Irantzu; Zarandona, Iratxe; Etxebarria, Nestor; Usobiaga, Aresatz. (2016) "Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies". Drug Discovery Today.

Alberts, Bruce, et al.. (2002) The Molecular Biology of the Cell. [s.l.] : Garland Science. (4th. ed). ISBN 0-8153-3218-1

A Uezu, K Umeda, K Tsujita, S Suetsugu, T Takenawa, H Nakanishi. (2011): Characterization of the EFC/F-BAR domain protein, FCHO2. Genes To Cells, 16:868-878.

Barth D. Grant , Miyuki Sato (2006) „Intracellular trafficking“ Department of Molecular Biology and Biochemistry, Rutgers University, Piscataway, NJ 08854 USA

Bjarnadóttir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schiöth HB (2006). "Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse". Genomics. 88 (3): 263–73.

Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signaling by G-protein-coupled receptors. Biochem. J. 322: 1–18

Bosier B, Tilleux S, Najimi M, Lambert DM, Hermans E. (2007) Agonist selective modulation of tyrosine hydroxylase expression by cannabinoid ligands in a murine neuroblastoma cell line. J Neurochem; 102: 1996–2007

Brass LF (2003). "Thrombin and platelet activation". Chest. 124 (3 Suppl): 18S–25S.

Bruce Alberts; et al. (2002). "General Principles of Cell Communication". In NCBI bookshelf. Molecular biology of the cell (4th ed.). New York: Garland Science. ISBN 0815332181



Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., Kirchhausen, T., (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* 150: 495-507.

Cooper, GM (2000). [Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Functions of Cell Surface Receptors.

Cummings, N., Shields, K.A., Curran, J.E., Bozaoglu, K., Trevaskis, J., Gluschenko, K., Cai, G., Comuzzie, A.G., Dyer, T.D., Walder, K.R., Zimmet, P., Collier, G.R., Blangero, J., Jowett, J.B., (2012). Genetic variation in SH3-domain GRB2-like (endophilin)-interacting protein 1 has a major impact on fat mass. *Int. J. Obes.* 36:201-206.

Di Marzo, V. et al. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:771–784

Dittman J, Ryan TA. (2009) Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* ;25:133–160.

Duester G (2008). "Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis". *Cell.* 134 (6): 921–31.

Edeling MA, Smith C, Owen D. (2006) Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;7(1):32–44.

Elphick MR, Egertová M (2001). "The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 356 (1407): 381-408.

Eshan Ghosh, Punita Kumari, Deepika Jaiman & Arun K. Shukla (2015). Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution *Nature Reviews Molecular*

Fingerhut, A., K von Figura, Honing, (2001) S., Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation

The Journal of Biological Chemistry, 276: 5476-5482

Fong TM, Heymsfield SB (2009). "Cannabinoid-1 receptor inverse agonists: current understanding of mechanism of action and unanswered questions". *Int J Obes (Lond)*. 33 (9): 947–55.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*;63:1256–72.

Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* ; 83: 1017–1066

Gaoni, Y. and Mechoulam, R. (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646–1647

Greenwald I (1998). "LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies". *Genes Dev.* 12 (12): 1751–62.

Hamm HE, Gilchrist A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 189–96

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990). Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 4: 2881–89

Henne WM, Kent HM, Ford MG, Hegde BG, Daumke O, Butler PJ, Mittal R, Langen R, Evans PR, McMahon HT. (2007) Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature.

Structure.; 15(7):839-52.

Henne, W. M. et al. (2010) FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 328: 1281–1284

Henstridge, C.M., Balla, G.Y., Nyilas, R., Varga, C., Lee, S.H., Matolcsi, M., Cervenak, J., Kacs Kovics, I., Watanabe, M., Sagheddu, C., Melis, M., Pistis, M., Soltesz, I., Katona, I., 2015. Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat. Neurosci.* 18: 75-86.

Hill, M.N. et al. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*

Honing, S., Ricotta, D., Krauss, M, Spate, K, Spolaore, B, Motley, A, Robinson, C, Robinson, V, Haucke, DJ Owen (2005) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2  
*Molecular Cell*, 18: 519-531

Hollopeter, G., Lange, J.J., Zhang, Y., Vu, T.N., Gu, M., Ailion, M., Lambie, E.J., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Florens, L., Jorgensen, E.M., (2014). The membrane-associated proteins FCHO and SGIP are allosteric activators of the AP2 clathrin adaptor complex. *eLife* 3.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* ; 54: 161–202.

Hupalowska A, Miaczynska M 2012. The new faces of endocytosis in signaling. *Traffic* 13: 9–18

Kirkham, T.C. et al. (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 136:550–557

Lagerstrom MC, Schiöth HB. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:339–57.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edition.

Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* 2006 Jun; 10(6):839-50.

Mackie K. (2006) Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* ; 46: 101–122.

Moreira, FA; Crippa, JA (2009). "The psychiatric side-effects of rimonabant.". *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*. 31 (2): 145–53.

Narendra Tuteja (2009) „**Signaling through G protein coupled receptors**“*Plant Signal Behav.* 2009 Oct; 4(10): 942–947.

Ortega-Gutiérrez, S.; López-Rodríguez, M.L. (2005), "CB1 and CB2 Cannabinoid Receptor Binding Studies Based on Modeling and Mutagenesis Approaches", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5 (7): 651–658,

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* ;5:993–6.

Pertwee RG (2006). "The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview". *International Journal of Obesity*. 30 Suppl 1: S13–8.

Pertwee RG (2008). "The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin". *Br. J. Pharmacol.* 153 (2): 199–215.

Rao Y, Ruckert C, Saenger W, Haucke V (2012). The early steps of endocytosis: From cargo selection to membrane deformation. *Eur J Cell Biol* 91: 226–233

Rask-Andersen M., M.S. Almen, H.B. Schioth. (2011)*Nat. Rev. Drug Disc.*, 10, p. 579

Refetoff S, Dumont J, Vassart G. Thyroid disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill. pp. 4029–4075.  
*The EMBO Journal*, 16:2240-2250

Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., B Duckworth, LC Cantley, S Shoelson, T Kirchhausen (1997) Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes

Royle SJ, Lagnado L. (2003) Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol.* ;553(Pt 2):345–355.

Sam, AH; Salem, V; Ghatei, MA (2011). "Rimonabant: From RIO to Ban.". *Journal of obesity*. 2011: 432607.

Schioth & Fredriksson, (2005), G protein-coupled receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 142 (1-2), 94-101)

Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002 Nov; 366(5):381-416.

Shukla, A.K., Violin, J.D., Whalen, E.J., Gesty-Palmer, D., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:9988-9993.

Shukla, A.K., Xiao, K., Lefkowitz, R.J., (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* 36:457-469.

Straiker, A., Wager-Miller, J., Mackie, K., (2012). The CB1 cannabinoid receptor C-terminus regulates receptor desensitization in autaptic hippocampal neurones. *Br. J. Pharmacol.* 165: 2652-2659.

Svoboda P, Teisinger J, Novotný J, Bourová L, Drmota T, Hejnová L, Moravcová Z, Lisý V, Rudajev V, Stöhr J, Vokurková A, Svandová I, Durchánková D (2004). "Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins". *Physiol Res.* 53 Suppl 1:141–52.

Taylor, M.J. Perrais, D. Merrifield, C.J. (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLOS Biology*, 9,:1000604

Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S (2012). "Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies". *Current Medicinal Chemistry.* 19 (8): 1090–10

Trevaskis, J., Walder, K., Foletta, V., Kerr-Bayles, L., McMillan, J., Cooper, A., Lee, S., Bolton, K., Prior, M., Fahey, R., Whitecross, K., Morton, G.J., Schwartz, M.W., Collier, G.R., (2005). Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like (endophilin) interacting protein 1, a novel neuronal protein that regulates energy balance. *Endocrinology* 146:3757-3764.

Vlahopoulos S.A. et. al. (2015). "Dynamic aberrant NF- $\kappa$ B spurs tumorigenesis: A new model encompassing the microenvironment". *Cytokine Growth Factor Rev.* 26: 389–403.

Uezu, A., Horiuchi, A., Kanda, K., Kikuchi, N., Umeda, K., Tsujita, K., Suetsugu, S., Araki, N., Yamamoto, H., Takenawa, T., Nakanishi, H., (2007). SGIP1alpha is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15. *J. Biol. Chem.* 282: 26481-26489.

Walsh D, Nelson KA, Mahmoud FA (2003). Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. *Support Care Cancer.* ;11:137–143.

Wilhelm, B.G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Krohnert, K., Schafer, C., Rammner, B., Koo, S.J., Classen, G.A., Krauss, M., Haucke, V., Urlaub, H., Rizzoli, S.O., (2014). Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* 344:1023-1028.

Yap CC, Winckler B 2012. Harnessing the power of the endosome to regulate neural development. *Neuron* 74: 440–451.

Zheng H, Loh HH, Law PY (2010) Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. *IUBMB Life* 62: 112-119.

### **Iné zdroje:**

1: Obrázok 1: [http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch11/cell\\_signaling.html](http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch11/cell_signaling.html)

2: Obrázok 3: <http://themedicalbiochemistrypage.org/signal-transduction.php>





