

Mikroskopija proteinskih interakcija

Manenica, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:507121>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Martina Manenica

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

MIKROSKOPIJA PROTEINSKIH INTERAKCIJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2018. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	7
§ 1.UVOD.....	8
1.1.Protein-protein interakcije.....	8
<i>1.1.1.Tipovi protein-protein interakcija.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.2.Metode pručavanja protein-protein interakcija.....</i>	<i>9</i>
§ 2.PRIKAZ ODABRANE TEME.....	11
2.1.Fluorescencijska mikroskopija.....	11
<i>2.1.1.Princip fluorescencije</i>	<i>12</i>
<i>2.1.2.Fluorescencijski mikroskopi i način rada.....</i>	<i>13</i>
2.2.Försterov prijenos rezonantne energije –FRET i primjena u mikroskopiji.....	16
<i>2.2.1.Uvjeti za FRET.....</i>	<i>17</i>
<i>2.2.2.Kvantitativna fluorescencijska mikroskopija-FLIM metoda za kvantifikaciju FRET-a.....</i>	<i>18</i>
2.3.Primjer analize konkretnog biološkog sustava pomoću FLIM-a i računalnog modeliranja. .	20
<i>2.3.1.Kreiranje računalnog modela.....</i>	<i>20</i>
<i>2.3.2.Nuklearni transport kao primjer računalnog modeliranja.....</i>	<i>21</i>
§ 3.LITERATURNI IZVORI.....	28

§ Sažetak

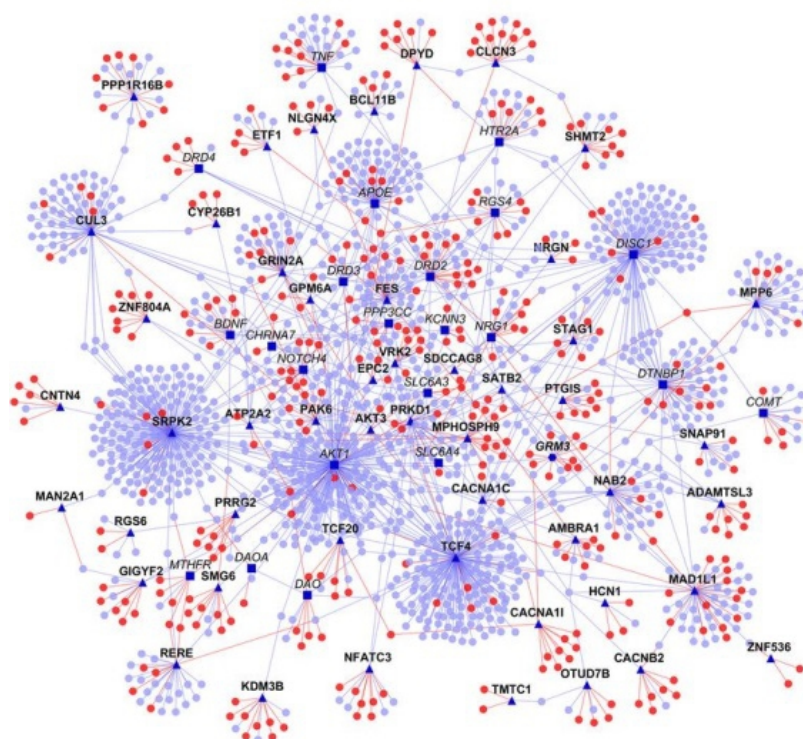
Proteinske strukture dio su okosnice dosad poznatog biološkog svijeta, a njihove interakcije omogućuju niz procesa poput replikacije DNA, sinteze novih proteina i regulacije metaboličkih putova. Međusobni odnosi proteina iznimno su važni za razumijevanje funkcije i aktivnosti cijelog organizma te se poznate činjenice sabiru u karte protein-protein interakcija. Za proučavanje istih koriste se razne metode, a jedna od najznačajnijih koja je omogućila uvid u svijet na mikro- i nano-skali svakako je fluorescencijska mikroskopija. Fenomen neradijativnog transfera energije (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) s pobuđenog fluorofora-donora na drugi fluorofor-akceptor opisan je 1946. godine. Fenomen se uskoro pokazao kao vrlo koristan način za kvantificiranje protein-protein interakcija u živim sustavima s pomoću fluorescencijskih mikroskopa. Ukoliko se mjeri trajanje fluorescencije donora (engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) moguće je dobiti podatke za računalnu analizu. Iz dobivenih parametara saznaje se udaljenost i vrsta protein-protein interakcija. Podatci se implementiraju u računalni model sustava koji se kasnije koristi za postavljanje preciznijih hipoteza za eksperimente. Cijeli proces u ovom radu objašnjen je na primjeru prijenosa proteina i RNA kroz pore jezgrine ovojnice u eukariotskoj stanici.

§ 1. UVOD

1.1. Protein-protein interakcije

Protein-protein interakcije (engl. *protein-protein interactions*, PPI) opisuju se kao visoko specifične interakcije između dva ili više proteina koji nastaju kao rezultat biokemijskih procesa. Jedna od osnovnih uloga interakcija je regulacija proteina, tj. njihovih funkcija i aktivnosti. Mnogi molekularni procesi potaknuti su proteinskim strukturama povezanim s PPI, pa tako mogu uzrokovati aberacije u stanici. Predmet su mnogih istraživanja jer je dokazano da agregati nastaju zbog PPI i time uzrokuju bolesti poput Alzheimerove, Creutzfeld-Jakobove, kao i nekih vrsta raka.^{1,2}

Protein-protein interakcije proučavaju se iz više raznih perspektiva poput biokemije, molekularne dinamike, prijenosa signala i slično. Sva nova saznanja o protein-protein interakcijama potom se sabiru u mreže proteinskih reakcija koje olakšavaju shvaćanje međusobno povezanih procesa (slika 1) i podsjećaju na metaboličke i genetske karte. Time se dodatno produbljuju znanja o biokemijskim kaskadama i podrijetlu bolesti, čime se može pospješiti liječenje ciljanjem ključnih proteina.²



Slika 1. Mreža dosad otkrivenih protein-protein interakcija koje utječu na shizofreniju.²

1.1.1. Tipovi protein-protein interakcija

Proteini mogu međusobno reagirati u kratkom vremenskom periodu kako bi proizveli specifičan trenutni efekt i takva PPI naziva se '**tranzijentnom**' (engl. *transient*). Proteinski kompleksi nastaju '**stabilnim**' PPI i mogu biti homo-oligomerni i hetero-oligomerni.¹

Stabilne PPI uključuju proteine koji ostaju u interakciji duže vremena i omogućuju nastajanje trajnih kompleksa povezujući više podjedinica. Primjer takvog proteina je ATP sintaza koja je građena od dvije regije F₁ (5 različitih podjedinica) i F₀ (3 glavne i 6 dodatnih podjedinica).¹

Kratke, 'tranzijentne' interakcije su reverzibilne i uključuju prijenos aktivnih skupina (poput fosforilacije). Karakteristične su za tip stanice, dio staničnog ciklusa, vanjske faktore i krucijalan dio biokemijskih kaskada. Primjerice, G-proteine (GTP-vezne proteine) aktiviraju membranski receptori izmjenom svoje konformacije nakon interakcije sa signalnim molekulama. Aktivirani G-proteini započinju kaskadu signala koji na kraju rezultiraju promjenom u stanici. Na takav način regulirani su metabolički enzimi, ionski kanali, transportni proteini, transkripcija, translacija i sl.^{1,3}

U definiranju protein-protein interakcije ključan je i kemijski tip veze kojima se interakcija ostvaruje. Rijetke su **kovalentne veze** i uglavnom uključuju disulfidne veze. Riječ je većinom o posttranslacijskim modifikacijama i specifičnim obilježavanjima poput (poli)ubikvitinacije. Dominiraju **nekovalentne veze**: ion-ion interakcije među bočnim ograncima amino-kiselina u peptidnoj vezi, vodikove veze, Van der Waalove sile i sl.²

1.1.2. Metode pručavanja protein-protein interakcija

Pročišćavanje proteinskih kompleksa spregnuto s masenom spektroskopijom jedna je od najčešće korištenih metoda pručavanja protein-protein interakcija. Protein od interesa označi se metodama genetičkog inženjerstva 'privjeskom' koji ima odgovarajuće antitijelo. Kromatografskim metodama može se izdvojiti protein od interesa zajedno s proteinima u interakciji i potom ih se detektira masenom spektroskopijom.¹

Metoda dvostrukog hibrida kod kvasca (engl. *yeast two-hybrid analysis*) predstavlja genetički pristup istraživanja PPI. Metoda se temelji na tome da će interakcija dva proteina od interesa omogućiti vezanje transkripcijskog faktora za gen. Transkripcijom i translacijom određenog gena nastaje signalna molekula koja se lako detektira: npr. kvasac se nasadi na

podlogu bez leucina, a aktivirani gen omogućuje sintezu leucina i preživljavanje kolonija kvasca.^{1,3}

Mnogo isplativiji pristup u detektiraju PPI su **text-mining metode** koje je omogućio napredak Interneta i računala. Danas poznate metode prema ključnim riječima pretražuju baze podataka, a mnogi programi dostupni su za široku uporabu. Metode se zbog jednostavnosti i uštede vremena koju nude razvijaju i kombiniraju filogenetsko profiliranje.²

Razvojem tehnologije javlja se sve više i više progresivnih metoda. Primjeri su koimunoprecipitacija, analitičko ultracentrifugiranje, kalorimetrija, razne metode genetičkog inženjerstva kao i fluorescencijska mikroskopija. Mikroskopija predstavlja vrlo učinkovitu metodu kako bi se sustavi promatrali *in vivo*. Zahvaljujući današnjoj tehnologiji, moguće je zapaziti interakcije na mikroskali, snimiti ih i kvantificirati.^{1,2}

U ovom radu objašnjena je fluorescencijska mikroskopija kao metoda proučavanja protein-protein interakcija. Pokazana je jedna od metoda za kvantifikaciju eksperimentalnih podataka koja se zasniva na fizikalnom fenomenu neradijativnog transfera energije (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET). Dobiveni podatci mogu se implementirati u računalni model i time dobiti potpunija slika sustava, a rezultati dodatno povezati u dotad poznate mreže PPI. Na samom kraju prikazan je cijeli proces na primjeru konkretnog biološkog sustava - prijenosa proteina i RNA kroz jezgrinu ovojnicu eukariota.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Fluorescencijska mikroskopija

Izreka 'Seeing is believing' (engl. 'vjerujem što vidim'-slobodni prijevod) najčešće se koristi za isticanje važnosti mikroskopije u molekularnim istraživanjima. Prvi uvid u mikrosvijet napravio je Antony van Leeuwenhoek na početku 18. stoljeća. Jednostavni mikroskop koristio je sustav leća vezanih na metalni držač koje su se fokusirale pomoću metalnog vijka (slika 2). 'Otac mikrobiologije' tako je mogao prvi vidjeti bakterije, kvasce, stanice krvi i male organizme koji su plivali u kapljici vode. Dva parametra osobito su važna u mikroskopiji: uvećanje i rezolucija. **Uvećanje** je mjera koliko mikroskop učini objekt većim, dok se **rezolucija** odnosi na najmanju udaljenost između dvije točke koje se mogu uočiti kao različiti objekti. Što je manja vrijednost rezolucije, veća je rezolucijska moć mikroskopa i moguće je bolje uočiti detalje. U posljednjih 200 godina tehnologija je omogućila uvid na skali reda veličine desetak Ångstroma (10-1000 Å).^{4,6}

Jedna od najznačajnijih inovacija bila je **fluorescencijska mikroskopija**. Fluorescentni indikatori (fluorofori) omogućili su obilježavanje proteina i lipida od interesa i njihovo praćenje u *in vivo* sustavima u realnom vremenu. Iako se nametnula kao jedan od glavnih alata u istraživanjima, njezin glavni limit je rezolucija. Iz dana u dan razvijaju se tehnike koje korištenjem difrakcije svjetlosti unutar optičkih sistema pokušavaju postići rezoluciju.^{4,5}



A

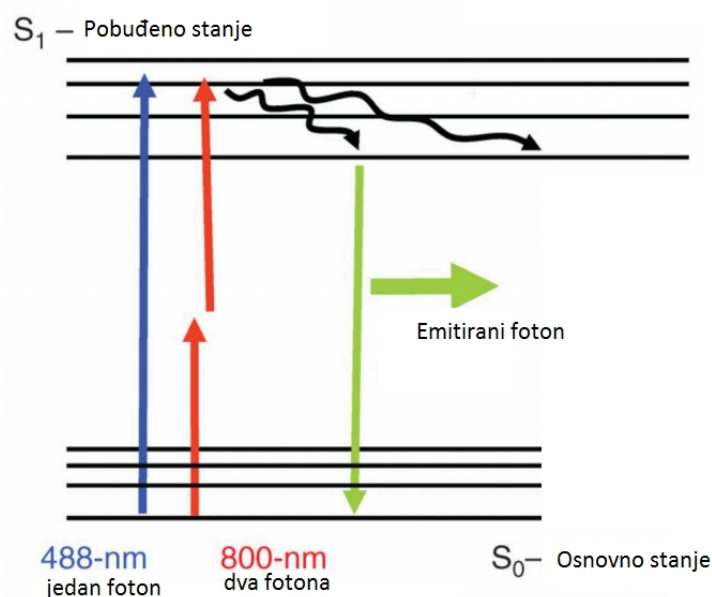


B

Slika 2. A) Model prvog mikroskopa iz 18. Stoljeća koji se sastojao od sustav leća vezanih na metalni držač koje su se fokusirale s pomoću metalnog vijka. Preuzeto iz ref. 6. B) Moderni fluorescencijski konfokalni mikroskop. Preuzeto iz ref. 7.

2.1.1. Princip fluorescencije

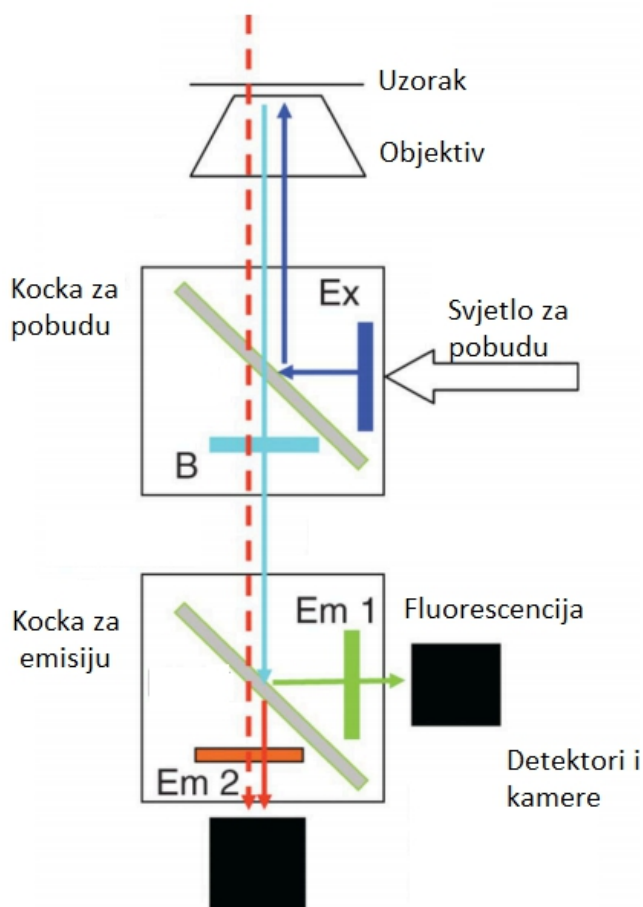
Da bi se primijenila napredna metoda istraživanja, nužno je poznavati sam princip. **Fluorescencija** uključuje apsorpciju elektromagnetnog vala u obliku fotona određene energije kojoj slijedi emisija fotona niže energije nekoliko nanosekundi kasnije. Emitirani val ima veću valnu duljinu od apsorbiranog, a sami fenomen opisan je kao Stokesov efekt. Dijagram Jablonskog predstavlja jednostavni prikaz tog fenomena (slika 3).⁵



Slika 3. Dijagram Jablonskog prikazuje elektronske promjene prilikom pobude fotonom fluorescentnog indikatora i posljedično emisiju zračenja. Pobuda laserskom zrakom valne duljine 488 nm (plava strelica) zahtjeva jedan foton, a pobuda s 800 nm dva fotona (crvena strelica). Nakon relaksacije (crna strelica) dolazi do emisije energije veće valne duljine (zeleno, Emitirani foton) što se opaža kao fluorescencija. Preuzeto i obrađeno prema ref. 5.

2.1.2. Fluorescencijski mikroskopi i način rada

U fluorescencijskoj mikroskopiji iznimno je važno odvojiti emitirano od transmitiranog zračenja. Zato se koriste brojni filtri. Konvencionalni element brojnih fluorescencijskih mikroskopa je **filterska kocka** (engl. *filter cube*) koja se sastoji od filtra za pobuđenje, interferentnog, dikromatskog zrcala (engl. *dichroic mirror*) pod 45° i emisijskog filtra, te usmjerava zraku od izvora preko uzorka do detektora (slika 4). Za funkcionalnost filtra iznimno je bitna orijentacija, koja se u novijim mikroskopima može mijenjati. Filtri su smješteni na automatizirani izmjenjivač gdje se mogu rapidno mijenjati i time omogućuju snimanje više različitih fluorescirajućih objekata. Monokromatori i akusto-optički modulatori (engl. *acousto-optic modulator (AOM)*, *Bragg cell*) omogućili su pak biranje odgovarajućih valnih duljina za pobuđivanje.⁴

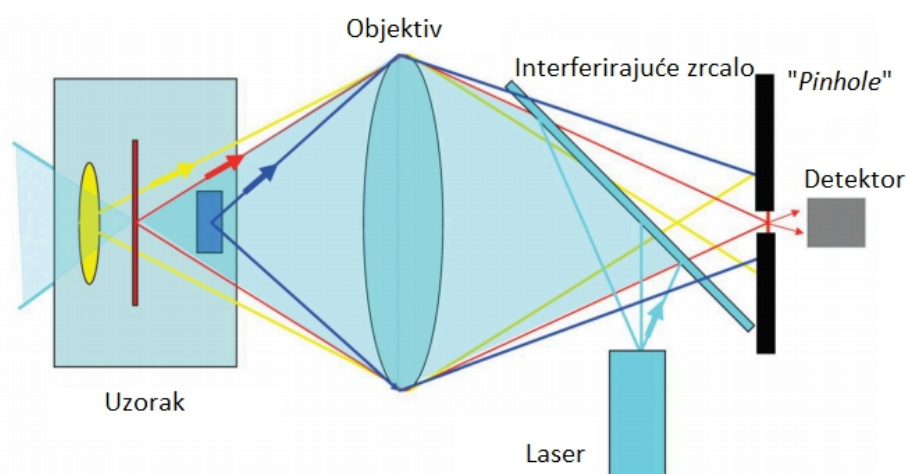


Slika 4. Smjer zrake elektromagnetskog vala i dijelovi fluorescencijskog mikroskopa. Svjetlo sa izvora (žarulja ili laser) filtrira se preko ekscitacijskog filtra (plavo) i lomi na uzorak kroz kocku za pobudu. Uzorak emitira fluorescenciju (crveno), a filter B predstavlja barijeru za prolazak ekscitiranog zračenja na emisijski filter. Kocka za emisiju može imati više filtra (Em 1 i Em 2). Preuzeto i obrađeno prema ref. 4.

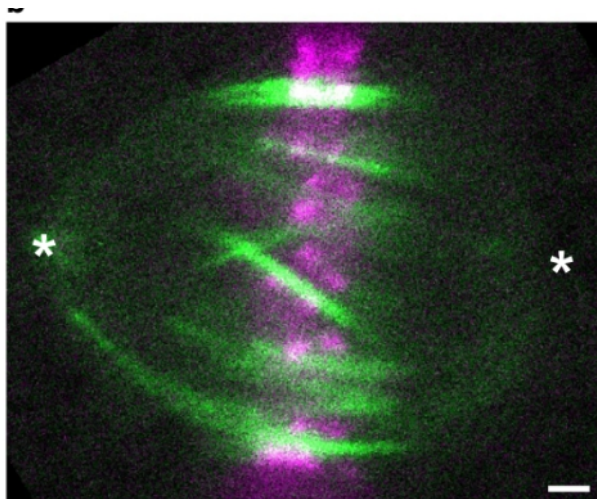
Sam izvor je tradicionalno živina ili ksenonska visokotlačna lampa, a noviji mikroskopi koriste LED (engl. *light emitting diodes*) izvore. U **mikroskopiji širokog polja** snima se cijeli uzorak jednim snopom zračenja i slika se može lako snimiti kamerom. Upravo zbog jednostavnosti snimanja u sprezi s limitiranom optikom i neizbježnom projekcijom snopa van fokusa, snimke imaju nizak kontrast i slabu rezoluciju. Danas se mahom koristi za snimanje tankih uzoraka i pretraživanje uzorka 'okom' pomoću okulara kako bi se pronašao odgovarajući motiv za snimanje.⁴

Snimanje vrlo tankih uzoraka limitirajuće je za brojna istraživanja (posebno snimanja tkiva ili staničnih kultura). Srećom razvila se **laserska pretražna konfokalna mikroskopija**

(engl. *laser-scanning confocal microscopy*). Gotovo svi principi su isti kao i kod mikroskopije širokog polja, osim što je izvor laser i što je razvijen sustav fokusiranja snopa kako bi se smanjilo raspršenje zračenja (slika 5). To je postignuto pomoću aparature s malim kružnim otvorom (engl. *pinhole aperture*) koja osigurava da svjetlo do detektora dolazi samo iz ekvivalentne (konfokalne) točke uzorka gdje je bio fokusiran ekscitacijski snop. Na takav način slika se dobiva piksel po piksel i bilježi se intenzitet fluorescencije u svakoj točki. Laser i *pinhole* su nepomični, ali snop se usmjerava s pomoću oscilatornih zrcala.⁴ Na slici 6. prikazan je primjer stanične strukture-diobenog vretena ljudske stanice snimljen pomoću konfokalne mikroskopije.



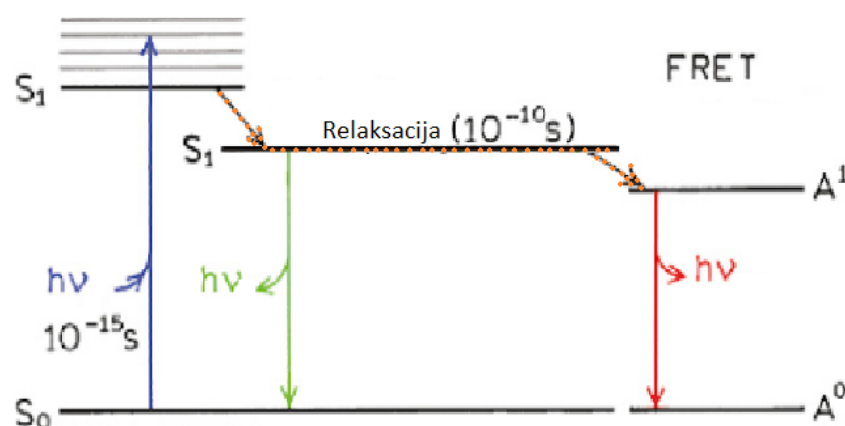
Slika 5. Princip rada laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa. Laserska zraka fokusira se na debljem uzorku refleksijom s interferencijskog zrcala i leća objektivna. Mali otvor omogućuje prolazak snopa koji je došao s konfokalne ravnine na detektor. Preuzeto i obrađeno prema ref. 4



Slika 6. Diobeno vreteno modelne stanice HeLa snimljeno konfokalnom mikroskopijom. Fluorescentni proteini su PRC1-GFP (zeleno) i CENP-B-mRFP (ljubičasto). Skala je 1 mikrometar (bijela linija). Preuzeto i obrađeno prema ref. 8.

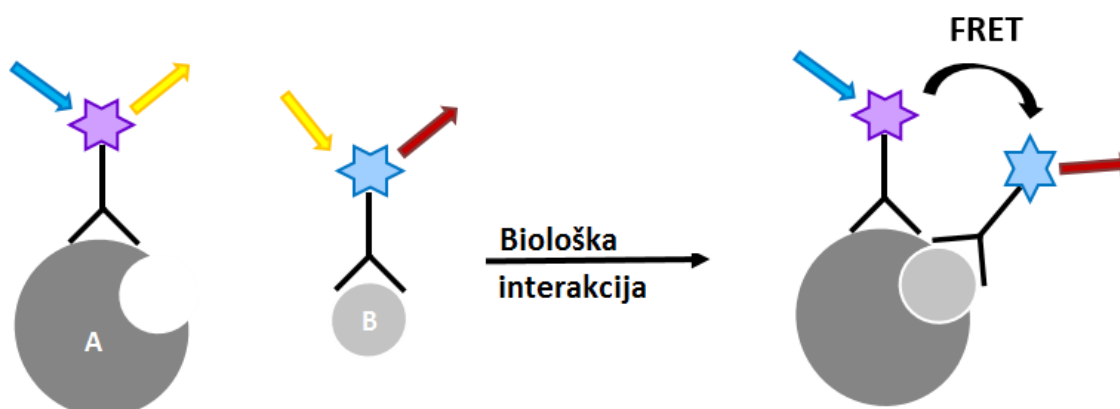
2.2. Försterov prijenos rezonantne energije –FRET i primjena u mikroskopiji

Njemački fizikalni kemičar, Theodor Förster, 1946. godine objasnio je fenomen **neradijativnog transfera energije** (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) s fluorofora u pobuđenom stanju na fluorofor u blizini. Sam proces umanjuje energiju donora za vrijednost kojom pobuđuje akceptora, a razlika se može mjeriti (slika 7).⁵



Slika 7. Dijagram Jablonskog koji prikazuje ekscitaciju donora (plava strelica) i neradijativni prijenos energije na akceptor koji posljedično emitira zračenje (crvena strelica)-efekt poznat kao FRET. Preuzeto i obrađeno prema ref. 5 i 9.

Budući da se takav neradijativni prijenos može dogoditi na manje od 100 Å, sustav se pokazao vrlo korisnim za proučavanje protein-protein interakcija kao što je prikazano shematski na slici 8.^{10,11}



Slika 8. Protein od interesa (A) ima spregnut fluorescentni protein koji se pobuđuje plavom svjetlošću i emitira žutu, a supstrat (B) protein koji se pobuđuje žutom i emitira crvenu svjetlost. Sustav se pobudi plavom svjetlošću i ukoliko dođe do interakcije, može se opaziti crvena emitirana svjetlost zbog prijenosa rezonantne energije. Preuzeto i obrađeno prema ref. 9.

2.2.1. Uvjeti za FRET

Da bi se FRET mogao dogoditi, sustav mora zadovoljiti određene uvjete:

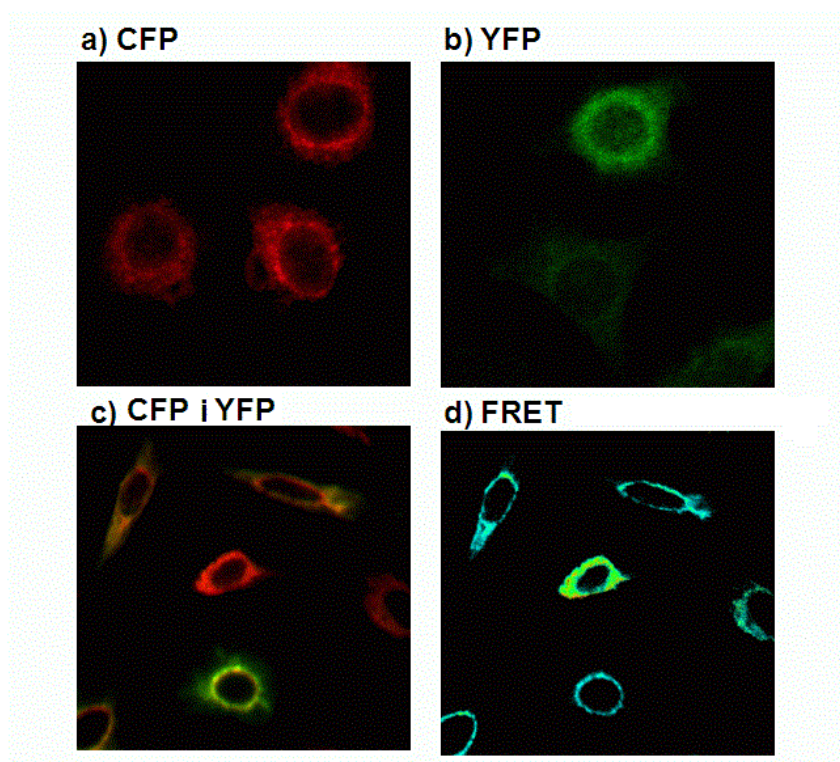
- **Udaljenost:** efikasnost FRET-a E definirana je izrazom:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2.3.1.)$$

gdje je r stvarna udaljenost između fluorofora, a R_0 Försterov radius – udaljenost na kojoj je 50 % ekscitirane energije preneseno s donora na akceptor i obično iznosi 10-70 Å. Za istraživanja se obično preferiraju veće vrijednosti R_0 jer se mogu uočiti udaljenije protein-protein interakcije.

- **Spektralno preklapanje:** emisijski spektar donora mora se preklapati s apsorpcijskim spektrom akceptora i što je bolje preklapanje, FRET je izraženiji.
- **Orijentacija dipola:** sam prijenos događa se preko dipol-dipol sprege između donora i akceptora. Kutna ovisnost dipolne interakcije opisana je orijentacijskim faktorom κ^2 i ima vrijednost od 0 (okomiti dipoli) do 4 (paralelni dipoli). Budući da molekule u otapalu stalno rotiraju, vrijednost se aproksimira s $2/3$.¹¹

Sama metoda zasniva se na unošenju rekombinantnih plazmida s genom za ekspresiju transfekcijom u željene stanice. Time se dobivaju proteini od interesa s fluorescirajućom domenom. Najčešće korišteni par proteina za FRET su cijanoplavi fluorescentni protein (engl. *cyan fluorescent protein*, CFP) i žuti fluorescentni protein (engl. *yellow fluorescent protein*, YFP).^{12,13}



Slika 9. Slike prikazuju iste stanice kojima se proteini od interesa nalaze na membrani. Slika d) prikazuje izračunati FRET nakon detekcije emitiranog zračenja. Preuzeto i obrađeno prema ref. 14.

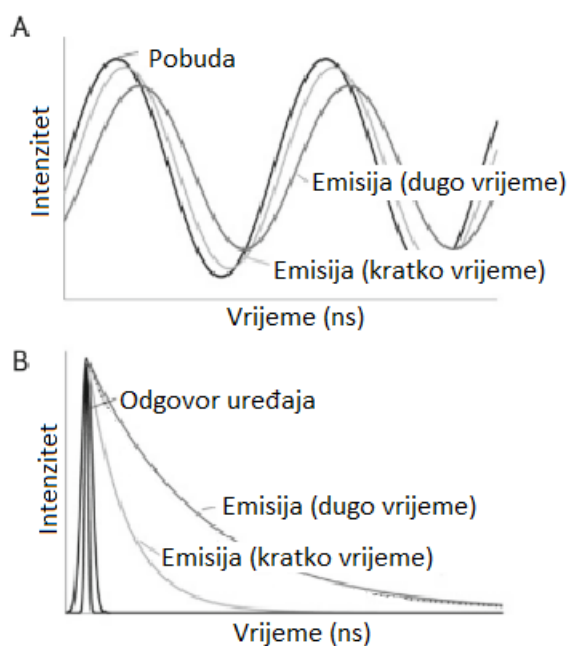
2.2.2. Kvantitativna fluorescencijska mikroskopija-FLIM metoda za kvantifikaciju FRET-a

Intenzitet zračenja koji se prenese s donora na akceptor potrebno je izmjeriti kako bi se dobila informacija o udaljenosti proteina. Jedan od načina je **mjerenje trajanja fluorescencije donora mikroskopijom** (engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) koje se značajno smanjuje ovisno o blizini akceptora. FLIM se snima konfokalnim mikroskopom, a snimke kasnije analiziraju računalnim metodama kako bi se kvantificiralo smanjenje intenziteta.^{11,12}

Sami fluorofori imaju vrijeme fluorescencije između 1 i 5 nanosekundi. Stoga je skala za uočavanje relevantnih promjena zapravo u pikosekundama što zahtjeva iznimno precizno mjerenje vremena fluorescencije.¹³

Postoje dva pristupa za mjerenje trajanja fluorescencije donora: **FLIM u vremenskoj i FLIM frekvencijskoj domeni**. U frekvencijskoj domeni cijeli uzorak se pobudi širokim rasponom frekvencija. Za pobudu se mogu koristiti razni izvori poput dioda, lasera i lampa, a iz pada amplitude zračenja za pobuđivanje računa se točno trajanje. Za samu metodu potrebni su jako svijetli uzorci i mjeri se tek mala frakcija fotona, no sama metoda je brža i istovremeno se osvjetljava cijeli uzorak kao u fluorescencijskoj mikroskopiji širokog polja. Jedna od većih prednosti ovog pristupa je cijena i mogućnost prilagodbe većine konfokalnih mikroskopa na snimanje FLIM-a u frekvencijskoj domeni.¹³

FLIM u vremenskoj domeni preciznija metoda, a jedna od najčešće korištenih je vremenski korelirano brojanje jednog fotona (engl. *time correlated single photon counting*, TCSPC). Mjeri se vrijeme potrebno da dođe prvi foton s donora na detektor. Od tog trenutka detektor je 'slijep' za ostale fotone. Pritom se dobiva krivulja ovisnosti intenziteta o vremenu (slika 10) i usporedbom s poznatom krivuljom donora kada nema akceptor u blizini preračunava se udaljenost fluorofora.¹³



Slika 10. A) FLIM u frekvencijskoj domeni. Uzorak se pobudi zračenjem svih frekvencija. Što je veća faza na grafu to je dulje vrijeme fluorescencije. B) FLIM u vremenskoj domeni. Uzorak se pobudi korištenjem pulsnog izvora i odgovor fluorescentnog donora bilježi se trenutno. Brži pad krivulje ukazuje na kraće vrijeme fluorescencije. Preuzeto i obrađeno prema ref. 13.

Opisana mjerenja pokazala su se jako korisnima za fluorofore koji slabo emitiraju poput proteina. Kako bi se zabilježilo trajanje fluorescencije proteina u nanosekundama, potreban je vrlo kratki laserski puls kao izvor u pikosekundama. Zasad su najčešće korišteni Ti-safir laseri. 'Usko grlo' ove metode čini period u kojem se individualni fotoni broje jedan po jedan, piksel po piksel.¹³

2.3. Primjer analize konkretnog biološkog sustava pomoću FLIM-a i računalnog modeliranja

Da bi se detaljnije razumio odgovor stanice na stimulacije i perturbacije, često je nedovoljno proučavati samo kvalitativni opis sustava. Prethodno opisane kvantitativne metode postale su iznimno bitne u istraživanjima, no biološki sustavi, a time i mreže protein-protein interakcija sve su kompleksniji i gotovo ih je nemoguće proučavati bez računalnih metoda. Posljedica je razvoj **računalne systemske biologije** (engl. *computational systems biology*) koja kombinira

dva pristupa: identifikaciju uzoraka ponašanja iz velike količine eksperimentalnih podataka i hipotetski pristup koji se bazira na simulacijama i matematičkom modeliranju iz prethodno poznatih podataka o sustavu.¹³

2.3.1. Kreiranje računalnog modela

Da bi se kreirao računalni model, potrebno je slijediti određene korake:

1. Za početak, važno je naglasiti da se računalni model gradi za sustav u ravnotežnom stanju. Model uključuje minimalni skup definiranih bioloških komponenti, njihovih regulatornih poveznica, koncentracija i kinetičkih parametara samih reakcija. Podatci se preuzimaju iz literature. Parametri koji još nisu opisani prilagođavaju se kako bi sustav odgovarao ravnotežnom.
2. Informaciju u eksperimentu davat će molekularni senzori-donori i akceptori fluorescencije. Za FRET se dizajniraju genetički kodirani fluorescentni proteini na proteinima od interesa (poglavlje 2.2.). Sustav se kalibrira *in vitro* kako bi se dobile informacije o parametrima: **konstanta disocijacije liganda i senzora, K_d** , i vrijeme **fluorescencije slobodnog senzora-donora, τ_{DA}** .
3. Sada se senzor može unijeti u neperturbirani biološki sustav koji predstavlja ravnotežno stanje i snimi se FLIM. Potom se parametri dobiveni *in vitro* u koraku 2. Koriste za preračunavanje frakcijskog zasićenja senzora s ligandom *in vivo* i time se definira ravnotežno stanje. U *in vivo* sustav uvode se dodatne perturbacije poput inhibitora i aktivatora ili promjene koncentracija liganda. Time se dobivaju dodatne informacije o sustavu.
4. Bezdimenzijski računalni model može se koristiti za analiziranje kvantitativnih podataka dobivenim FLIM-om u drugim eksperimentima. Također, dobiveni model može se spregnuti s drugim modelima kako bi se dobila potpunija slika proteinskih mreža u stanici.¹³

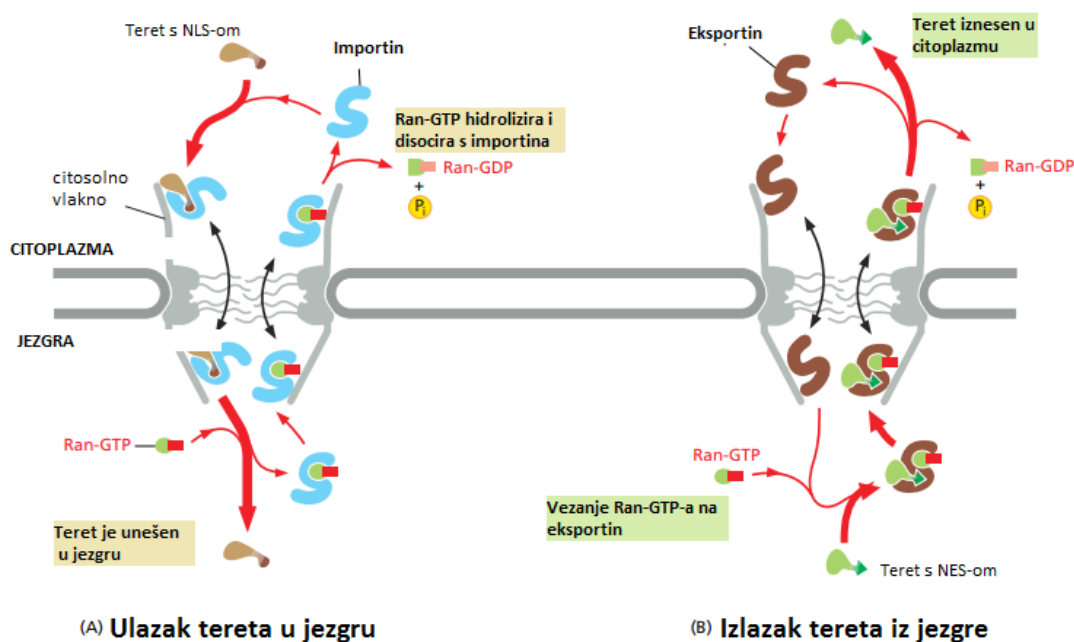
Kako bi se potpunije razumio proces rješavanja biološkog problema od literaturnog pregleda, do eksperimenta i kreiranja računalnog modela, u ovom radu ukratko će se predstaviti primjer prijenosa tvari kroz membranu jezgrine ovojnice.

2.3.2. Nuklearni transport kao primjer računalnog modeliranja

Da bi se detaljnije proučio primjer primjene FRET-a i računalnog modeliranja na sustav, potrebno je proučiti problematiku sustava iz biokemijske perspektive, u ovom slučaju prijenos proteina i RNA kroz dvostruku jezgrinu ovojnicu. Prijenos tvari iz jezgre u citoplazmu stanice i obratno kontroliran je kompleksima jezgrinih pora (engl. *nuclear pore complexes*, NPCs). Manje nepolarne molekule mogu proći pasivnim prijenosom, dok RNA i proteini trebaju transportne faktore poput **karioferina: importina** za ulazak i **eksportina** za izlazak.^{13,15}

Proteini koji trebaju ući u stanicu predstavljaju *teret*. Oni imaju nuklearne lokalizacijske signale (engl. *nuclear localization signals*, NLS) koje čine sljedovi aminokiselina najčešće s hidrofobnim bočnim ograncima. Slično je i za izlazak, proteini i RNA nose nuklearne signale za izlazak (engl. *nuclear export signals*, NES). Oba prijenosa zahtijevaju energiju što je omogućeno s malim Ras proteinom s GTPaznom aktivnošću, Ran-om.^{13,15}

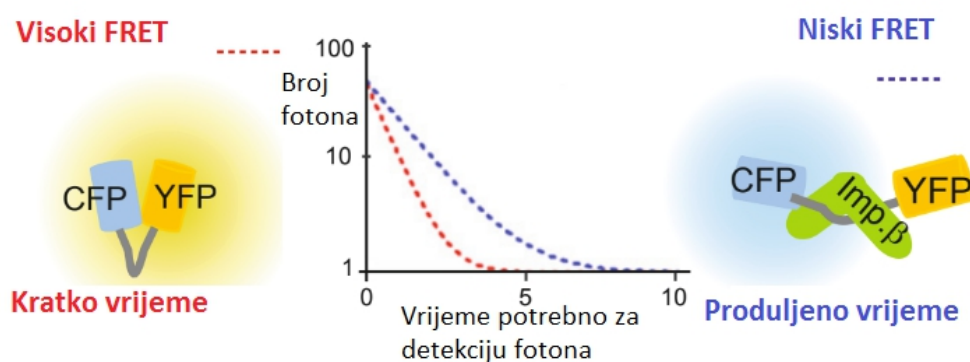
GTPaze su enzimi koji vežu gvanozin trifosfat, GTP i hidroliziraju ga u gvanozin difosfat, GDP, pri čemu se oslobađa energija. Kada je na Ran vezan GDP on ima veliki afinitet za karioferine. Importini otpuštaju teret prilikom vezanja Ran-GTP-a, dok eksportini rade kompleks s teretom i Ran-GTP-om, a hidrolizom u GDP otpuštaju teret (slika 11). Stanje Ran-a ovisi je li lokaliziran u jezgri (Ran-GTP) ili u citoplazmi (Ran-GDP) i time se stvara gradijent ključan za reguliranje prijenosa kroz membranu.^{13,15}



Slika 11. Prijenos tereta kroz pore jezgrine ovojnice. A) Unos tereta u jezgru. Teret označen s nuklearnim lokalizacijskim signalom veže se na importin. Vežanjem Ran-GTP-a teret se otpušta unutar jezgre, a importin se regenerira u citoplazmi disocijacijom i hidrolizom Ran-GTP-a. B) Iznošenje tereta iz jezgre. Teret je označen signalom za izlazak i uz pomoć Ran-GTP-a vezan na eksportin. Kao takav prolazi kroz poru i u citoplazmi se teret otpušta disocijacijom i hidrolizom Ran-GTP-a. Preuzeto i obrađeno prema ref. 15.

Eksperimentalno dobiveni podatci FRET metodom o prijenosu tvari kroz jezgrinu ovojnicu mogu se upotrijebiti za razvoj računalnog modela za Ran sustav:

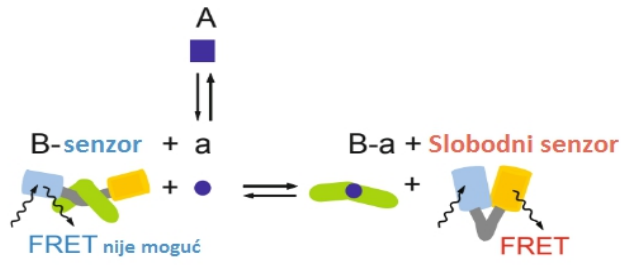
1. Minimalni skup varijabli potrebnih za opis sustava čine reakcije koje kontroliraju vezanje GTP-a na Ran i hidrolizu GTP-a, te sprežanje Ran-GTP-a i tereta kojeg treba prenijeti. Pritom su uzeti parametri poznati u literaturi, a ostali parametri su prilagođeni kako bi početni sustav matematički odgovarao ravnotežnom.
2. Kreiran je biosenzor koji se temelji na FRET-u nazvan **Rango** (engl. *Ran-regulated importin β cargo*). Za potpunu aktivnost sustava potrebno je vezivanje importina β s importinom α koji nosi teret. Na importin α spregnuti su fluorescentni proteini (slika 12). Vežanjem importina β dolazi do njihova udaljevanja i smanjuje se FRET.



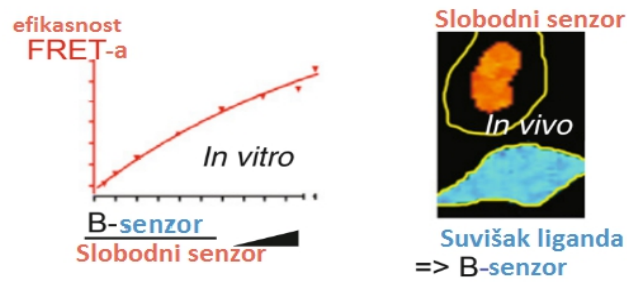
Slika 12. Sustav *Rango* sa spregnutim fluorescentnim proteinima. Fluorescentni proteini pokazuju FRET ukoliko su blizu jedan drugom (prilikom izostanka importina β) i kratko je vrijeme potrebno za detektiranje fluorescencije. Vežanje importina β mijenja konformaciju *Rango*-a i fluorescentni proteini su predaleko za FRET. Vrijeme detekcije fluorescencije znatno se produžuje. Preuzeto i obrađeno prema ref. 13.

3. Sustav je kalibriran *in vitro* mjerenjem efikasnosti FRET-a za *Rango* prilikom povećanja koncentracije liganda-pročišćenog importina β . Iz izmjerene konstante disocijacije $K_d = 2 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ za disocijaciju *Rango*-importin β sustava računom je dobivena kalibracijska krivulja koja prikazuje ovisnost FRET-a o koncentraciji liganda (slika 13 B).
4. Da bi se kvantificirala količina tereta kojeg sustav importina β otpusti u citoplazmu, u modelnu mitotsku staničnu liniju (ekstrakti oplodjenih jajašaca žabe *Xenopus laevis*) s *Rango*-m dodan je Ran-GTP mutant koji ne može hidrolizirati u GDP (RanQ69L). U takvim uvjetima importin β disocira, što je popraćeno s povećanjem FRET-a na senzoru, *Rango*-u. U drugom pokusu povećanje koncentracije importina β dovelo je do smanjenja FRET-a. Time su dobiveni podatci za *in vivo* sustav. Koncentracija slobodnog Ran-GTP-a izračunata je iz kalibracijske krivulje. Izmjerene perturbacije uvedene su u računalni model i time je model postao bliži realnom sustavu i time precizniji za hipoteze.¹³

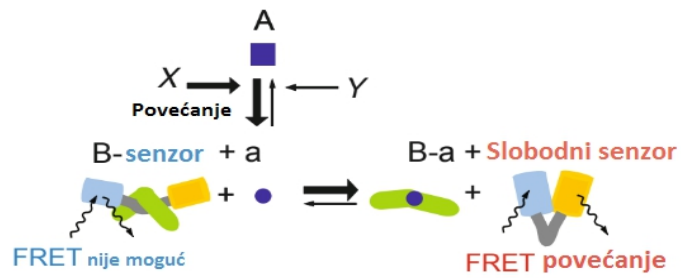
A



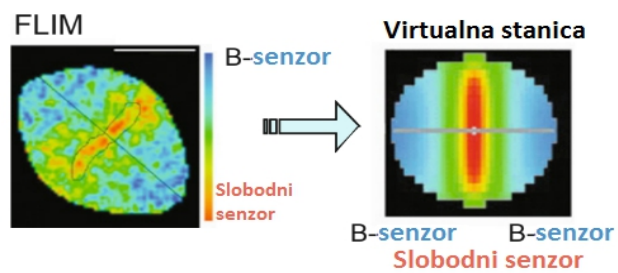
B



C

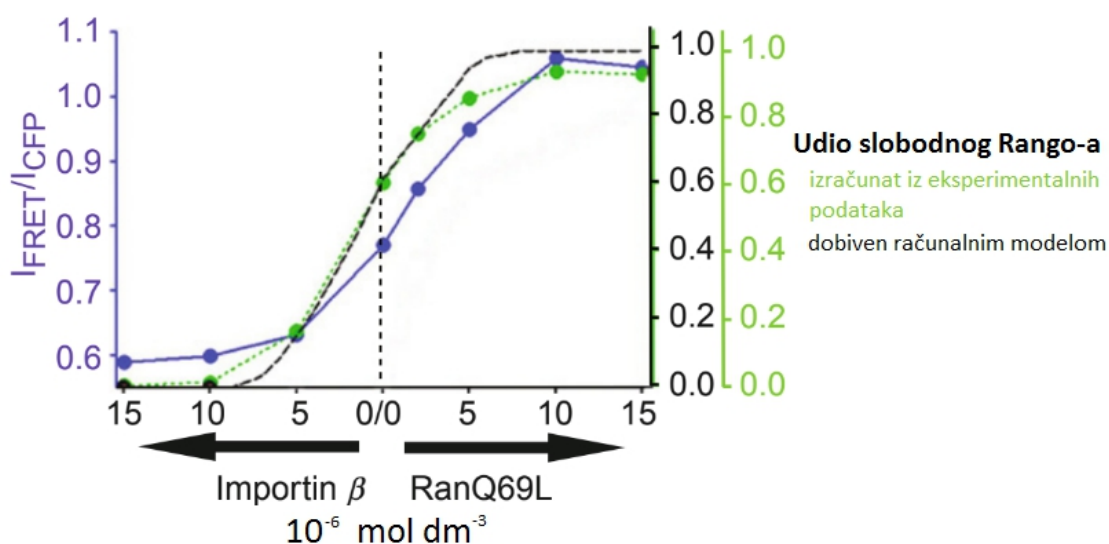


D



Slika 13. Shema postupka kreiranja računalnog modela za Ran-sustave pomoću eksperimentalnih podataka dobivenih razvojem fluorescentnih biosenzora i snimanjem FRET-a. Legenda: *a*-Ran-GTP, *A*-RanGDP, *B*- Importin β , *senzor*-Rango. A) Postavljanje minimalnog seta varijabli za računalni model. Unose se parametri za reakcije: vezanje GTP-a na Ran i hidroliza GTP-a, te sprezanje Ran-GTP-a i tereta kojeg treba prenijeti. B) Kalibracija sustava *in vivo* i *in vitro*. Dobivena je kalibracijska krivulja koja prikazuje ovisnost FRET-a o koncentraciji liganda. C) Dodatkom inhibitora X smanjuje se mogućnost vezanja liganda i FRET je izraženiji. Povećanjem koncentracije liganda FRET se smanjuje do krajnje granice kada više nije moguć. D) Koncentracije slobodnog senzora i senzora koji ima vezan ligand dobivene su pokusom poslužile su za kreiranje računalnog modela-virtualne stanice. Preuzeto i obrađeno prema ref. 13.

Moguće je bilo usporediti odgovor mitotskih stanica *Xenopus laevis* s *Rango*-m na otpuštanje tereta prilikom bioloških perturbacija s računalnom simulacijom odgovarajuće situacije. Koncentracija slobodnog Ran-GTP-a kontrolirana je dodacima različitih koncentracija RanQ69L i importina β . FRET na *Rango* sustavu je izražen kao omjer intenziteta FRET-a i fluorescencije cijanoplavog proteina slobodnog *Rango*-a. Na slici 14. jasno se vidi da podatci dobiveni iz eksperimenata odgovaraju računskim podatcima.¹³



Slika 14. FRET u *Rango* sustavu u ovisnosti o dodatku importina β (liganda koji uzrokuje slabljenje FRET-a) i mutiranog Ran-GTP-a koji ne može hidrolizirati GTP (RanQ69L, inhibitor). Signal FRET-a (plava krivulja) raste povećanjem koncentracije RanQ69L i

smanjuje se povećanjem koncentracije importina β . Također, poklapaju se računalni i eksperimentalni podatci za udio slobodnog *Rango*-a (zeleni i crni krivulji). Preuzeto i obrađeno prema ref. 13.

Prikazani sustav modeliran je u 2D stanici. Konfokalna mikroskopija omogućuje snimanje slojeva stanica, tako da bi se potencijalno mogla stvoriti 3D stanica i onda impregnirati podatci za 2D stanicu. Dosada se pokazalo dobro slaganje između 2D i 3D sustava.¹³

Opisana metoda doprinijela je istraživanju kojim je pokazano da gradijent Ran-GTP-a regulira nastanak diobenog vretena, strukture koja veže kromosome i brine da nastanu dvije stanice-kćeri u mitozu s diploidnim brojem kromosoma. Ran-GTP utječe na održavanje odgovarajućih koncentracija aktivatora i inhibitora potrebnih za kreiranje diobenog vretena.¹⁶

Drugi proteini, kao i manje molekule koje se kroz jezgrinu ovojnicu gibaju difuzijom, utječu na koncentracijski gradijent Ran-GTP-a. Stoga će za detaljno objašnjenje sustava biti potrebna daljnja istraživanja i naprednija tehnologija poput snimanje FLIM-a s puno većim brzinama uz pomoć konfokalnog mikroskopa s rotirajućim diskom i osjetljivijim biosenzorima.¹³

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition, W. H. Freeman and company, New York, 2013, str. 330-341.
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Protein-protein_interaction (datum pristupa: 20. lipnja 2018.)
3. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 6th edition, Garland Science, New York, 2014, str. 520-528.
4. M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M.D. Bootman, *Cold Spring Harb Protoc* **10** (2014), str. 526-541.
5. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition, Springer, New York, 2006, str. 3-23.
6. <http://www.visioneng.com/resources/history-of-the-microscope> (datum pristupa: 24. lipnja 2018.)
7. <http://www.irb.hr/Istrazivanja/Kapitalna-oprema/Laserski-pretrazni-konfokalni-mikroskop-s-mogucnoscu-laserske-ablacije> (datum pristupa: 24. lipnja 2018.)
8. I.M. Tolić, *Eur Biophys J* **47** (2018), str. 191-203.
9. <https://www.expedeon.com/resources/applications/fret/> (datum pristupa: 1. srpnja 2018.)
10. A. K. Kenworthy, *Methods* **24** (2001), str. 289-296.
11. Y. Sun, N. M. Hays, A. Periasamy, M. W. Davidson, R. N. Day, *Methods Enzymol* **504** (2012), str. 371-391.
12. R. N. Day, *J Biomed Opt.* **13(3)** (2008), str. 12021-12026.
13. P. Kalab, A Pralle, *Methods Cell Biol*, **89** (2008), str. 541-568.
14. <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/fret/sortingfret/index.html> (datum pristupa: 1. Srpnja 2018.)

15. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Molecular Biology of the Cell, 6th edition, Garland Science, New York, 2014, str. 653-655.
16. P. Kalab, R. Heald, *J. Cell Sci* **121(10)** (2008), str. 1577-1586.