

## Abstrakt:

Proteinové komplexy se obtížně studují, obzvláště pokud vznikají jen v membránovém prostředí a na velmi krátkou dobu. Toto je problematické například v případě fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF2), což je protein s mnoha fyziologickými i patologickými funkcemi v lidském organismu. Hraje zásadní roli v rozvoji různých nádorových onemocnění, protože brání apoptóze buněk pomocí autokrinní signalizace a také stimuluje angiogenezi. Zároveň je v současné době zkoumána možnost jeho uplatnění v léčbě zranění periferního nervstva. Přestože je důkladně zkoumán již řadu let, mechanismus jeho translokace do mezibuněčného prostoru, kde vykonává svou funkci, nebyl zcela objasněn.

Pro studium komplexních systému, jako jsou membránové póry tvořené FGF2, jsme vyvinuli jednoduchou a efektivní metodu fluorescenční mikroskopie. Tato metoda se jmenuje dvojitá permeabilizační esej jednotlivých vezikulů (DLSGA). Využívá lipidové vezikuly (GUVs) pro simulaci buněčné membrány. V jediném experimentu je možné sledovat až 300 jednotlivých vezikulů a tvorbu pórů v jejich membráně. Během třech měření za různých podmínek získáváme detailní informaci o dynamice otevírání pórů na každém vezikulu. Na základě těchto měření je možné jednotlivé vezikuly rozdělit do šesti skupin podle toho, jestli se na nich tvořili póry a jak byly dané póry stabilní. Tento přístup umožňuje získat hlubší porozumění mechanismu translokace FGF2 přes buněčnou membránu.

Konkrétně se nám podařilo potvrdit roli Y81 v urychlování inserce FGF2 oligomerů do membrány. Navíc jsme pozorovali rozdíl v tvorbě pórů u variant s mutovanými cysteiny. Výsledky pro cysteinové mutanty jsou velmi zajímavé v kombinaci se zjištěnými oligomerizačními stavy těchto mutantů, které byly získány pomocí Dual-color FCS. Ukázalo se, že C77-C77 disulfidový můstek slouží ke tvorbě FGF2 dimerů, zatímco C95-C95 můstek umožňuje tvorbu vyšších oligomerizačních stavů. Experimenty pomocí TIRF mikroskopie ukázaly, že dimery FGF2 hrají klíčovou roli v mechanismu translokace FGF2 přes membránu. Spekuluje se, že tyto dimery jsou meziprodukty pro tvorbu vyšších oligomerů, které se záhy poté translokují přes membránu. Experimenty v této práci ukazují, že C95A mutant, který dokáže vytvářet pouze dimery, je schopen vytvářet stabilní póry do podobné míry jako nemutované varianty. To znamená, že pro zanoření FGF2 do membrány není potřeba vyšších oligomerizačních stavů, které toho jsou ale také schopny.

Díky sérii DLSSGA experimentů za použití 4 KDa dextranových fluorescenčních barev se podařilo odhadnout průměr FGF2 pórů na 2,34 nm. Tyto experimenty také ukázaly, že GFP, které se často využívá pro tvorbu fluorescenčních fúzních proteinů, zvyšuje velikost FGF2 pórů.