

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Biochemistry Department**

Doktorský studijní program: Biochemie
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Studium modelových membrán, proteinů a protein-membránových interakcí
pomocí různých fluorescenčních technik

The Study of Membrane Model Systems, Proteins and Protein-Membrane
Interactions Using Various Fluorescence Techniques

Martin Štefl

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: Prof. Dr. Martin Hof, DSc.

Praha, 2012

Table of Contents/Obsah

Abstract.....	2
Abstrakt.....	3
Introduction.....	4
Aims of the study.....	5
Materials and Methods.....	6
Results and Discussion.....	8
Question No 1:.....	8
Characterization of the excited state processes using phasor plot approach.....	8
Phasor plot monitors proteins conformation, protein-ligand binding and protein kinetics.....	10
Question No 2:.....	11
Conceptual limitations in energy transfer for membrane nanodomain size and surface area determination revealed by molecular dynamics.....	11
Characterization of nanodomain structures in terms of mechanism of formation and sizes in GUVs.....	13
Question No. 3.....	15
Characterization of prothrombin interaction with negatively charged model membranes.....	15
Conclusion.....	17
Úvod.....	18
Cíle studie.....	19
Materiály a metody.....	20
Výsledky a diskuse.....	22
Otázka číslo 1:.....	22
Charakterizace procesů spojených s excitovanými stavy pomocí fázorové analýzy.....	22
Fázorová analýza jako metoda k monitorování konformace proteinů, interakcí mezi proteiny a ligandy a kinetiky proteinů.....	24
Otázka číslo 2:.....	25
Molekulová dynamika ukazuje koncepční limitace při určování velikosti nanodomén v membránách pomocí metody přenosu energie.....	25
Charakterizace velikosti a mechanismu vzniku membránových nanodomén v GUVs... ..	26
Otázka číslo 3.....	29
Charakterizace interakce proteinu prothrombinu s negativně nabitými modelovými membránami.....	29
Závěr.....	31
References/Seznam použité literatury.....	32
Curriculum Vitae.....	33
List of Publications Related to the Thesis/Seznam publikací použitých v disertační práci.....	36
Other Publications/Ostatní publikace.....	36

Abstract

Membrane rafts (also referred as nanodomains) are membrane structures responsible for many cell processes. Their characterization is challenging because of the transparency, dynamics and small size of those structures. Moreover, high variability of cells makes their study even more complicated. In order to simplify the studies of membrane processes including the formation of those rafts often model membranes like Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) and Supported Phospholipid Bilayers (SPBs) are used. In this Thesis new fluorescent tools for studying such membrane processes were developed, tested, or improved.

Specifically, the phasor plot an approach applicable to the analysis of the fluorescence lifetime data, was theoretically and experimentally tested and afterwards applied to the characterization of the membrane nanodomains in GUVs. First, we introduced the phasor plots to the excitation state processes like solvent relaxation and Förster resonance energy transfer (FRET) in lipid vesicles. We also employed the phasor plots in protein-ligand interaction, protein folding and denaturation studies. Finally, the phasor plot analysis of FRET data in combination with Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) was used in characterization of membrane nanodomains in terms of the size, mobility and mechanisms of formation. We succeeded for the first time to determine the size and dynamics of nanodomains in GUVs smaller than 20 nm in radius. Our findings allowed us to make general conclusion on the mechanism of raft formation. The lateral diffusion on SPBs of a weakly bound blood coagulation protein was the second membrane process being studied. By developing a 2-color z-scan FCS approach using pulsed interleaved excitation, we were able to simultaneously characterize this protein diffusion and lipid diffusion. Although the protein diffusion is about two times slower than the lipid diffusion, the lipid composition and protein concentration dependencies suggest that both processes are to some extent coupled.

Abstrakt

Membránové rafty (také často uváděny jako nanodomény) jsou membránové struktury, které jsou zodpovědné za spoustu buněčných procesů. Jejich charakterizace je velice složitá, protože nanodomény jsou opticky průhledné, jejich velikost je pod rozlišením optických mikroskopů a dynamika je velická. Navíc vysoká různorodost buněk ještě více komplikuje jejich studium. Pro zjednodušení buněk jsou velice často používány membránové modelové systémy jako obrovské unilamelární vezikuly (GUVs) nebo podporované fosfolipidové dvojvrstvy (SPBs). V mé disertační práci byly vyvinuty, testovány a vylepšovány různé fluorescenční techniky ke studiu těchto membránových domén v modelových systémech.

Fázorová analýza, metoda pro analýzu dat dob dohasínání fluorescence, byla teoreticky a experimentálně testována a následně použita k charakterizaci membránových nanodomén v GUVs. Nejdříve jsme využili fázorovou analýzu v lipidových vezikulech ke studiu procesů excitovaných stavů, jako je jev relaxace rozpouštědla a Försterův rezonanční přenos energie (FRET). Dále jsme aplikovali fázorovou analýzu k charakterizaci interakcí mezi proteiny a ligandy, ke studiu sbalování a denaturace proteinů. Nakonec jsme použili fázorovou analýzu dat z FRET v kombinaci s fluorescenční korelační spektroskopií (FCS) k charakterizaci membránových nanodomén z hlediska velikosti, mobility a mechanismu tvorby. Jako první jsme uspěli v určování velikosti a dynamiky nanodomén v GUVs, které jsou menší než je rozlišení optického mikroskopu. Z našich poznatků jsme nakonec byli schopni udělat obecné závěry ohledně mechanismu tvorby nanodomén. Laterální difúze slabě vázaných proteinů koagulační kaskády na podporovaných membránách byla druhým membránovým procesem, který jsme studovali. Vyvinuli jsme metodu z-scan FCS v dvoubarevném v alternačním modu excitace, pomocí které jsme byli schopni současně charakterizovat laterální difúzi proteinu a lipidu. Ačkoliv difúze proteinu je dvakrát pomalejší ve srovnání s lipidy v membráně, koncentrační závislosti ukazují jistou spojitost těchto dvou difúzních procesů.

Introduction

Biological membranes play a crucial role in living organisms. Their function is very broad and heterogeneous and is closely related to the structure organization and molecular composition. The membranes are responsible for maintaining of non-equilibrium state between inner and outer space of the cell as well as ion, energy, information and metabolites transport between intracellular and extracellular environment. In living cells, biological membrane is organized to the phospholipid bilayer composed of two leaflets in which hydrophobic lipid acyl chains are oriented towards the centre of the bilayer and hydrophilic headgroups are exposed to the cytosol or extracellular matrix. Biological membranes are not composed only of lipids, but also many proteins are associated with them and form protein-lipid complexes, membrane channels and membrane receptors. In 1972, Singer and Nicolson [1] published their famous work about membrane organization principle which described the membrane as lipid bilayer with significant amount of proteins associated with the membrane. They also stated that the proteins are moving freely in the membrane. Later on Simons et al. [2] came up with the idea of membrane rafts, rigid lipid structures in the membrane which serve as a support for selected proteins to help them fulfil their role and function. They also found out that membrane rafts are cholesterol and sphingolipid dependent structures with sizes lower than resolution of optical microscopes ($< 200\text{nm}$). According to the authors, membrane rafts were stable structures with low dynamics. It was few years later when membrane rafts started to be interpreted as membrane structures/domains with high dynamics [3].

In order to answer basic questions about membrane organization principle, the knowledge about influence and role of individual lipids is highly important. However, biological membranes are very complex systems with extreme number of variables and, thus, the quantification of cell processes is very complicated. For this reason, simplification using model membrane systems like Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) [4] and Supported Phospholipid Bilayers (SPBs) have been developed. SPBs are model membranes attached to the solid support, which gives them an advantage of simple preparation and handling, however, the solid support has an impact on the mobility of the membrane and the formation of raft-like (ordered) domains. In contrary, GUVs are free standing model membranes with sizes similar to the living cells. They are also highly suitable to the phase separation studies.

Fluorescence techniques are very useful tools in the biological studies because of their high sensitivity, selectivity and non-invasiveness. For the determination of membrane

dynamics (lateral mobility, rigidity, binding), fluorescence correlation or tracking methods are often used (FCS, SPT, RICS) [5-7]. The fluorescence lifetime is very sensitive to the microenvironment around the fluorophore, thus, it brings insights to the local polarity, viscosity or heterogeneity. Moreover, the donor/acceptor energy transfer methods (usually monitored by fluorescence lifetime) provide valuable information about relative distances between the donor and the acceptor molecules, which can be related to the protein conformation, protein-ligand binding or, as in our case, to the sizes of membrane nanostructures.

In my Thesis, I will be focused on fluorescence techniques (Steady-state Fluorometry, Fluorescence Correlation Spectroscopy, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Förster Resonance Energy Transfer, Harmonic Response Lifetime Fluorimetry), which provide the information about the membranes, membrane-protein interactions as well as proteins. More specifically, I was interested in developing phasor plots as a very simple analytical tool in the fluorescence lifetime measurements. I introduced the phasor plots to protein and membrane biochemistry showing examples of possible use. Next, I used the FCS and FLIM-FRET combined with the phasor plot analysis to characterize membrane nanodomains in terms of the mechanism of formation and sizes. I also discuss protein-lipid or protein-membrane interactions.

Aims of the study

The aim of this work was to contribute to better understanding of the role of lipids in membrane organization and membrane-protein interactions by means of fluorescence techniques (mainly fluorescence microscopy techniques). More specifically, my work was focused on developing of fluorescence methods applicable to the model membranes, and mainly on using of such methods to characterize membrane dynamics, influence of individual lipids on the membrane organization and to the study of protein-lipid interaction and their interplay. For simplicity, this work is structured into three main parts according to the questions I wanted to answer:

- 1) Is phasor plot analysis of fluorescence lifetime data applicable to model membrane organization and protein conformation studies? Does phasor plot analysis bring new insights into biochemistry of proteins and lipid membranes?
- 2) In relation to the membrane rafts, using our basic fluorescence techniques are we able to monitor and characterize membrane nanodomains in GUVs? If so, can we say anything about the formation of such domains and make any general conclusion?

- 3) Related to the protein-lipid interactions, is FCS good tool in description of dynamics of weakly bound peripheral proteins?

Materials and Methods

All the lipids used in my Thesis were purchased from Avanti Polar Lipids (AL, USA), the fluorescent dyes were purchased from Invitrogen (CA, USA), most of the chemicals and some proteins were obtained from Sigma (MO, USA). The bovine prothrombin was obtained from Synapse BV (Maastricht, The Netherlands), thrombin and antithrombin III were purchased from Hematologic Technologies (VT, USA).

The SPBs were prepared by spreading of small unilamellar vesicles on freshly cleaned mica surface. The mica was attached to a holder 200 μ m above the bottom of the cuvette [8]. The GUVs were prepared by gentle hydration method described elsewhere [9] and immobilized to the glass surface using streptavidin-biotin binding. All the measurements were performed on the top of each GUV.

The bovine prothrombin was labelled by Alexa 633 dye through the NH₂ amino acid residues according to the standard labelling protocol. Labelled protein was purified from the free dye using gel size-exclusion chromatography using Sephadex G-25 and the concentration of the labelled protein was determined using the absorption spectrometry.

There are two basic methods used in the fluorescence lifetime determination, time-domain and frequency domain, respectively. In the time domain, a time the photon takes to be emitted is recorded and the lifetime of such event is subsequently determined (using fitting procedure). On the other hand, in the frequency domain is the fluorophore excited using sinusoidally modulated light and the difference between phase and modulation of excited and emitted light is recorded. The fluorescence lifetime is determined using the fitting procedure as well.

The principle of the fluorescence lifetime imaging microscopy is in pixel by pixel scanning of studied sample. In every pixel of the image is determined the lifetime information. A resulted image contains not only the information about the fluorescence intensity, but also the map of fluorescence lifetimes spatially related to the studied material. Such map of images can provide valuable information about local environment of the fluorophore as already discussed in the Introduction.

The phasor plot is a new analytical approach used in the fluorescence lifetime analysis [10; 11]. Since fitting procedure is not needed, it is an artefact-free method. In principle, the phasor plot is a graphical representation of the fluorescence lifetime data and, thus, the

differences between different samples can be easily recognized and analysed. In the phasor plot are the lifetime data transformed to G and S functions according to:

$$G = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

$$S = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

where $I(t)$ is the fluorescence intensity in time t and ω corresponds to $\omega = 2\pi f$, where f can be repetition frequency of the laser or any other frequency. The values for G and S functions are plotted to the Cartesian coordinates. Single-exponential lifetimes create so called universal circle with the centre at $[0.5, 0]$ and any other multi-exponential lifetimes or the mixture of two single-exponentials falls inside the circle. Moreover, the mixture of two single exponentials is located on the connecting line between the positions of the individual single-exponentials.

The Förster resonance energy transfer takes an advantage from the overlap between the emission spectra of the donor and the absorption spectra of the acceptor. In the case of an overlap, a part of the energy of the donor is used for the excitation of the acceptor. The loss of the donor energy is accompanied by a decrease in the fluorescence intensity or a shortening of the fluorescence lifetime. The efficiency of the energy transfer (changes in the fluorescence lifetime) is mainly dependent on the distance between the donor and the acceptor molecules, and is often used in structural biochemistry and biology.

The fluorescence correlation spectroscopy is based on the observation of fluorescence intensity fluctuations in a very small detection volume (confocal microscopy). Recorded signal is correlated and resulted autocorrelation function is analysed using an appropriate mathematical model (2D, 3D, 2D3D diffusion models). Parameters of interest are mainly a diffusion time (the time a molecule spends in the detection volume) and a number of fluorescence particles in the detection volume (note that from the principle of the method can be in the detection volume only 1-10 particles at once). The values of diffusion times are closely related to the diffusion coefficients.

Results and Discussion

Question No 1:

Is phasor plot analysis of lifetime data applicable to model membrane organization and protein conformation studies? Does phasor plot analysis bring new insights into biochemistry of proteins and lipid membranes?

Characterization of the excited state processes using phasor plot approach

The purpose of this contribution was to develop a method that could be used to study mixtures of fluorophores for analytical purposes, that is, to be able to facilely compare different mixtures in such a way that differences in the fluorophore composition would be readily apparent. A mixture of two monoexponential fluorophores with different fluorescence lifetimes, or a fluorophore characterized by a multiexponential decay, will produce a phasor point within the universal circle, indicating lifetime heterogeneity. The theoretical basis of the phasor plot analysis indicates that this measured phasor point will be located on a line between the points of the individual fluorophores or single-exponential components. Therefore, when three dyes are combined in solution, the resulting phasor point should be found constrained within a triangle that has vertices defined by the location of the phasor of the individual dyes. Binary and tertiary fluorophore mixtures were studied using fluorophores in ethanol with widely separated lifetimes, namely DENS (fluorescence lifetime $\tau = 29.9$ ns), IAEDANS ($\tau = 5.3$ ns), and Rhodamine B ($\tau = 1.7$ ns). We show the phasor data of each individual fluorophore, solutions containing a mixture of two dyes (DENS/IAEDANS, DENS/Rhodamine B, and IAEDANS/Rhodamine B), and a mixture of all three dyes. As expected, the individual fluorophore's phasor points are located along the universal circle, whereas the phasor points corresponding to mixtures of any two dyes fall on a line between the points on the universal circle corresponding to the individual dyes. For the mixture of the three dyes, the phasor point is located within the triangle defined by the three dual fluorophore mixture lines.

We have also employed phasor plot analysis in the excited state processes like Förster resonance energy transfer and dipolar solvent relaxation, respectively. In the case of dipolar solvent relaxation the excitation changes the dipole moment of the fluorophore resulting in the reorganization of solvent molecules in the vicinity of the dye. The reorganization rate (between so called non-relaxed to relaxed state) depends on the rigidity of environment and non-covalent interactions and is valuable quantity in membrane or protein characterization.

Because the phase delay of the emission of relaxed state (in solvent relaxation) or acceptor's lifetime after energy transfer (in FRET) is increased in comparison to non-relaxed or non-transferred state, those processes can fall in phasor plot outside the universal circle.

Figure 1, left is an example of the energy transfer in EGFP and shows the phasor points associated with the visible emission (>525 nm) from EGFP, excited with both visible (471 nm) and ultraviolet (UV, 280 nm) excitation, as a function of modulation frequency (16–300 MHz). As is evident for the phasor plot, 471 nm excitation results in phasor points corresponding to single-exponential decays; that is, the points are all on the universal circle. On the other hand, 280 nm excitation, which will directly excite the single tryptophan residue (as well as the tyrosine residues) in addition to some direct excitation of the EGFP chromophore, results in phasor points that are all outside of the universal circle. Hence, although some of the visible chromophores may be directly excited at 280 nm, there is enough tryptophan-to-chromophore energy transfer to move the phasor point outside of the universal circle.

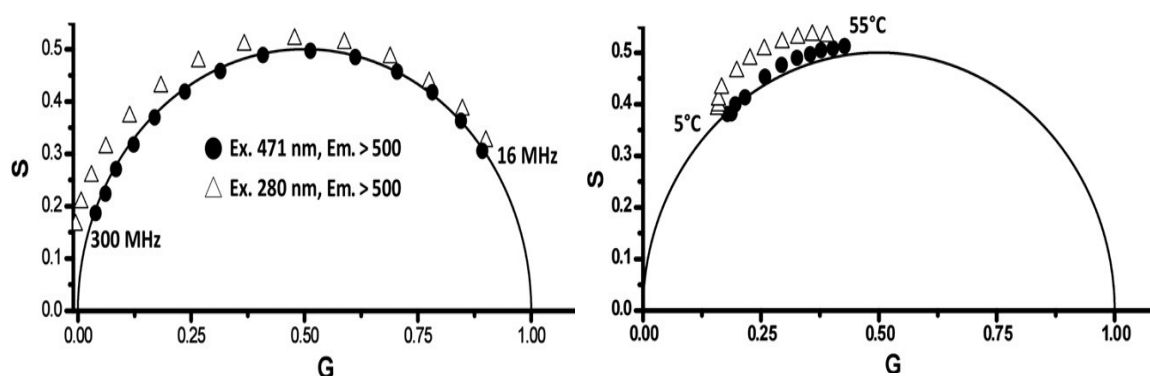


Figure 1 Left: Decay data of EGFP excited at 471nm and 280nm, emission was recorded at 500nm and higher. All of the data recorded with 280nm excitation fall outside the universal circle, an indication of an excited state process. Right: LAURDAN in DMPC vesicles. Circles and triangles represent data collected for temperatures between 5°C and 55°C with 5°C interval. Excited at 375nm; emission was viewed through 420-nm (circles) and 470-nm (triangles) longpass filters.

Similarly, inspection of the temperature dependence (from 5°C to 55°C) of the LAURDAN/DMPC vesicles' phasor plot shows that the phasor points corresponding to data collected using the 470-nm filter are completely outside of the universal circle, indicative of a dipolar solvent relaxation mechanism (Fig. 1, right). When the entire LAURDAN emission is collected using the 420-nm longpass filter, the phasor points lay along or very close to the universal circle, indicating that the non-relaxed emission dominates the observed decay. Using the 470-nm longpass filter, the collected emission is weighted primarily from the molecules that undergo dipolar relaxation and the location of the phasor points outside of the

universal circle is more pronounced. However, the points above 25°C show a clear trend above the universal circle, indicating the presence of an excited state event.

In conclusion, we have demonstrated that the extension of the phasor method from FLIM to cuvette measurements provides a method that complements other approaches and that, in some cases, provides insights that would otherwise be difficult to obtain. In particular, the method allows facile analysis of sample heterogeneity and ready identification of excited state processes such as dipolar relaxation and FRET.

Phasor plot monitors proteins conformation, protein-ligand binding and protein kinetics

In this paper mainly intrinsic fluorescence of tryptophane has been used to characterize proteins such as lysozyme, dynamin 2, human serum albumin and human serum transferrin. The changes in protein conformations were explored by quenching and temperature studies and analyzed using the phasor plot. Briefly, the fluorescence quencher acrylamide rapidly decreases fluorescence lifetime of the protein lysozyme in dependence on the quencher concentration suggesting changes in the protein folding. The temperature experiments revealed two steps in lysozyme denaturation. At 40°C, the decreasing trend of lifetime heterogeneity is stopped which, according to the literature, corresponds to the reversible unfolding of the protein. At 70°C, the lifetime heterogeneity starts to increase indicating crossing of barrier where protein unfolding starts to be irreversible.

We show a set of data (acquired with 280 nm excitation) for thrombin, antithrombin, lysozyme, and mixtures therein. Antithrombin and lysozyme are not predicted to interact, therefore a solution containing the two proteins should produce a phasor point that falls directly on a line between their individual points (see Materials and Methods). This outcome is clearly observed for the phasor plot of a 1:1 mixture of the two proteins. On the other hand, thrombin/antithrombin is known to form a tight complex and may be expected to produce a distinct phasor point away from the linear combination. The phasor point of the thrombin/antithrombin (1:1) indeed shifts inward away from the line connecting the points corresponding to the two pure proteins, indicating a change in intrinsic fluorescence on protein interaction. This demonstration shows how phasor plots can provide a facile indication of protein interaction.

Protein denaturation mechanisms are a hot topic in protein science, however their studies are very complicated. Typical protein denaturants such as the urea or the guanidin hydrochloride (GdHCl) are often used in the protein unfolding studies. We have monitored

intrinsic fluorescence of the lysozyme when urea and GdHCl were stepwise added to the solution (Fig. 2). The sequence of denaturants' concentrations was like follows; 0 M, 1 M, 2 M and 6/8 M GdHCl and urea, respectively. Initial additions of denaturants cause similar changes, however higher concentration of urea or GdHCl follows totally different directions. The final points in phasor plot are dramatically different indicating unique unfolded forms of lysozyme.

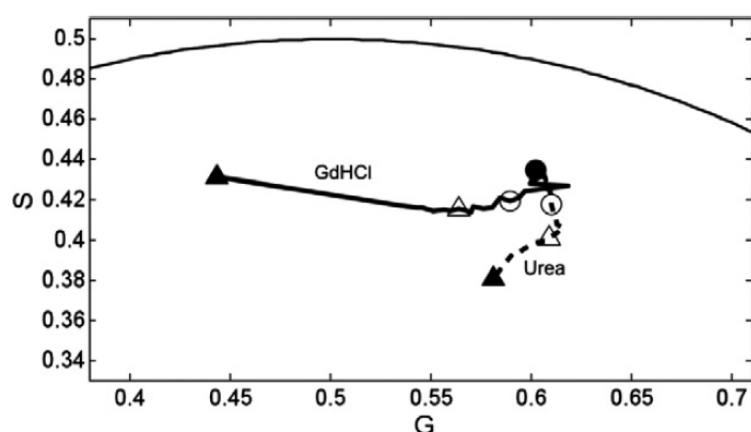


Figure 2 Denaturation studies of lysozyme were analyzed by phasor plot. Concentrations of denaturants were 0 M (closed circles), 1 M (opened circles), 2 M (opened triangles) and 6/8 M (closed triangles).

In this article, we have described the application of the phasor method to time-resolved studies on intrinsic protein fluorescence. Using this approach, the complex decay of protein fluorescence, due to either multiple emitting tryptophan residues or excited state reactions such as tyrosine-to-tryptophan energy transfer, can be reduced to a single point on a phasor plot. Activities such as ligand or protein binding and protein denaturation, which result in changes in the microenvironment of the tryptophan residue(s), lead to movements of the phasor point. The trajectory of the phasor point in response to a physical or chemical perturbation can be followed to provide insights into the processes under investigation.

Question No 2:

Can we monitor and characterize membrane nanodomains in GUVs? If so, can we say anything about the formation of such domains and make any general conclusions?

Conceptual limitations in energy transfer for membrane nanodomain size and surface area determination revealed by molecular dynamics

Förster resonance energy transfer is often employed in characterization of membrane nanodomains, also due to the fact that FRET can report on nanodomains even if they are

formed transiently. The size determination of these nanodomains by FRET requires knowledge about partitioning of donors (D) and acceptors (A) between nanodomains and the remaining liquid-disordered (L_d) bilayer. In this work we mainly discuss the partition coefficients of individual fluorophores between liquid ordered and disordered phases in model membranes and their relation to the domain size determination by FRET. There are three possible cases; I) both dyes are located in L_o nanodomains, II) D/A pairs are excluded from nanodomains and III) donor and acceptor have increased affinity to different phases. By means of molecular dynamics we have calculated the probabilities of the ability to detect membrane domains and related them to the domains' sizes and domains' surface area. The probability is expressed by the ratio of steady-state intensity obtained from donors (F_d) to the intensity of donors when D/A pairs are distributed uniformly in the bilayer ($F_d(\text{uni})$). Note that ratio higher than 1.2 is suitable for membrane size and area determination. Although first two cases seem to be most useful in the energy transfer studies, we have revealed that relevant results can be obtained only when distribution constants K_d and K_a (defined as $K_i = [i]_{L_o} / [i]_{L_d}$, $i = D$ or A) are both higher than 5 (case I) or lower than 0.01 (case II), respectively. However, we found out that the case III is ideal in membrane characteristic studies, especially when $K_d > 3$ and $K_a < 0.01$.

We also discuss four FRET pairs (which we found in the literature) and their real use in nanodomain characterization. The FRET pairs were;

- I) NBD-PE/Rhodamine-PE with $K_d = 4.3$, $K_a = 0.37$ and $R_0 \sim 5$ nm [12],
- II) BODIPY-PC/fast-DiI with $K_d = 0.1$, $K_a = 0.1$ and $R_0 \sim 6.5$ nm [13],
- III) Alexa Fluor 647 cholera toxin subunit B/DiD with $K_d = 11$ (6), $K_a = 0.004$ and $R_0 \sim 5.4$ nm, and,
- IV) Perylene/fast-DiI with $K_d = 0.8$ (3), $K_a = 0.01$ and $R_0 \sim 5$ nm [14].

All the FRET pairs were examined in systems with different lipid compositions which explains small discrepancies in distribution coefficients. According to our simulations, best FRET pair was Alexa Fluor 647 cholera toxin subunit B/DiD followed by Perylene/fast-DiI, especially when $K_d = 3$ was used in calculations. Unfortunately obvious disadvantage of the cholera toxin is its cross-linking ability, which changes the local lipid composition in the membrane as reported by Hammond et al. [14].

Characterization of nanodomain structures in terms of mechanism of formation and sizes in GUVs

Changes of membrane organization upon cross-linking of its components trigger cell signaling response to various exogenous factors. Cross-linking of raft gangliosides GM1 with cholera toxin (CtxB) was demonstrated to cause microscopic phase separation in model membranes and the CtxB-GM1 complexes forming a minimal lipid raft unit are subject of ongoing cell membrane research. Direct observation of such nano-scaled heterogeneities in plasma membrane by means of optical microscopy fails either due to its poor resolution, or anticipated transient character of rafts. From these reasons, those subdiffraction sized rafts have never been described in terms of size and dynamics. In this work, we aimed to investigate early stages of the CtxB induced phase separation in model membranes (GUVs) composed of Sph/DOPC/Chol, e.g. formation, size and dynamic properties of nanodomains by means of z-scan FCS and FLIM-FRET.

The lipid compositions mostly investigated in this research are very close to the microscopic phase coexistence boundary and are summarized in Table 1. The cross-linker CtxB was added in two steps, here presented as the low loading and the high loading (marked with apostrophe, e.g. **B** and **B'**). We should stress out that under our conditions the micrometer sized domains (optically resolvable) were not observed in both, composition **B** and **C**. These microdomains were not seen even at high CtxB loading too. We show results from CtxB-Alexa647 measured by z-scan FCS and analyzed by the Wawrezinieck's apparent diffusion law [15]. We also performed FLIM-FRET measurements of energy transfer from CtxB-Alexa488 (donor) to DiD (acceptor), a lipid tracer preferentially residing in L_d phase, and monitored by phasor plot approach the changes in a fluorescence decay histogram of the donor.

Table 1 Molar fractions of lipids in GUV lipid composition discussed in this work

	DOPC	Sph	Chol	DOPG	GM1
A	0.68	0	0.25	0.05	0.02
B	0.49	0.19	0.25	0.05	0.02
C	0.44	0.24	0.25	0.05	0.02

Composition A is a Sph free lipid mixture which serves as a blank experiment (no lipid segregation occurs). Diffusion behavior of the CtxB is independent on its load and the apparent diffusion law suggests free diffusion (no intercept) for the cross-linker molecules.

FLIM-FRET results show the maximal energy transfer suggesting homogeneous distribution of the donors and the acceptors molecules in the membrane.

Compositions' B and B' diffusion behavior significantly differs from Sph free system. First, this composition is dependent on the cross-linker load and, second, the apparent diffusion law for high loads shows a significant positive temporal offset suggesting the presence of a nanometer sized domains in which the diffusion is considerably slowed down. Moreover, decreased efficiency of the energy transfer in composition **B** in comparison to composition **A** indicates the separation of the donor and the acceptor molecules and, thus, the presence of the domains. This effect was even more pronounced when high load of CtxB was added implying the enlargement of the domains (Fig. 3). The analytical Baumann and Fayer model [16] was applied on fluorescent lifetime decays of the donor providing a mean domain radius. We have determined that the average domain radius in the compositions **B** and **B'** is 5 nm and 8 nm, respectively.

Composition C dramatically differs from composition **B** in three aspects; 1) no concentration dependence of the cross-linker loading was observed, 2) although it contains higher amount of Sph compared to composition **B**, the CtxB-Alexa647 transition time was slower than in **B'** but longer in comparison to **B** and 3) the temporal offset in the apparent diffusion law is significantly lower (or even equal to 0) when compared to **B'**. The high decrease of the efficiency of the energy transfer suggests large domains and Baumann and Fayer model confirms those hypotheses when determining the radius of the domains ($R=24$ nm).

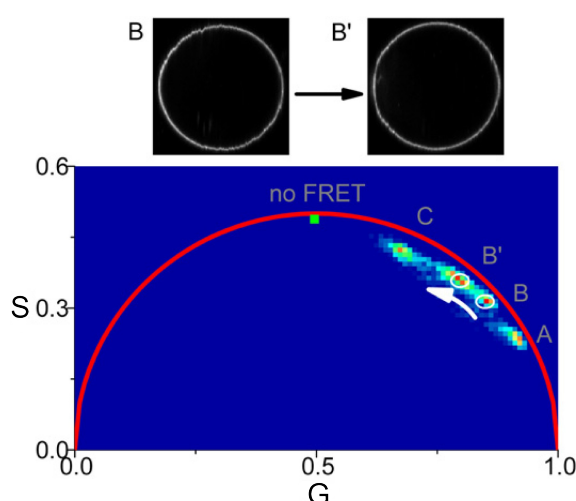


Figure 3 Lower part: Phasor plot analysis of fluorescence donor's lifetime (CtxB-488) influenced by energy transfer. Upper part: Intensity images of GUVs measured at lower and higher CtxB-488 loading. Note that even at higher loading no visual phase separation is observable.

In conclusion we have found two different types of subwavelength domains. Since in **B**, the diffusion character changes at increased cross-linker load, we propose that these nanodomains are transiently constituted upon collision of CTxB-GM1 complexes. In **B** the domain formation is therefore initiated exclusively by the cross-linker and consequently stabilized by Sph. In contrast, our data indicate that small lipid domains are formed in the composition **C** already before the cross-linker is added and their existence is attributed mainly to lipid-lipid interactions. We hypothesize that the addition of the cross-linker induces further coalescence into larger membrane assemblies that eventually leads to microscopic phase separation.

Question No. 3

Related to the protein-lipid interactions, is FCS a good tool in description of dynamics of weakly bound peripheral proteins?

Characterization of prothrombin interaction with negatively charged model membranes

Several enzymatic processes involving proteins containing γ -carboxyglutamic acid residues require the association of those proteins with negatively charged membrane surfaces. As a paradigm for such processes serves the membrane binding of the blood coagulation protein prothrombin followed by lateral diffusion to the prothrombinase enzyme complex. Since those proteins are only weakly binding to relevant membrane surfaces (apparent equilibrium dissociation constants K_d are in the μM range), at physiological protein concentrations there is a considerable amount of unbound protein and, thus, the lateral protein diffusion coefficients are difficult to access. We show that z-scan FCS is a simple method for the determination of 2D diffusion coefficients of those weakly bound proteins. Moreover, together with pulsed interleaved excitation (PIE) we are able to simultaneously monitor lipid and protein diffusion and thus obtain direct information on possible coupling of both diffusion processes. Specifically, we investigated the calcium-dependent binding of Alexa633 labeled bovine prothrombin (BP) to SPBs composed of DOPC and DOPS. The SPBs of different lipid composition were labeled by DOPE-Atto488.

Comparison of lateral diffusion coefficients (D_2) values for BP and lipids shows that BP diffuses significantly slower. However, BP and lipid diffusion display qualitatively the same trends suggesting that both lateral diffusion processes are strongly related with each

other. At low (10 %) DOPS content and low BP concentration the difference between protein and lipid diffusion is considerably smaller than at higher DOPS contents.

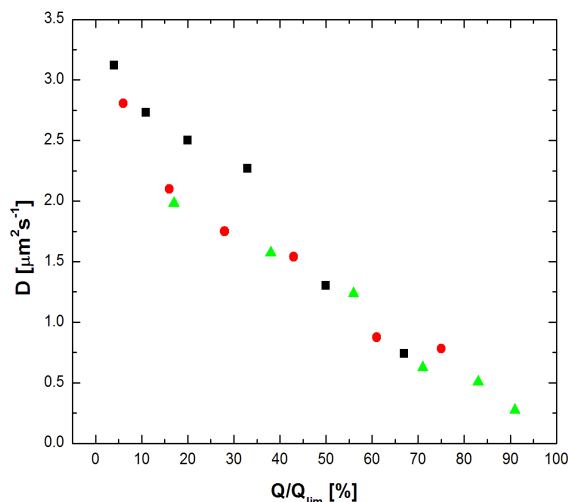


Figure 4 Dependence of BP lateral diffusion coefficients on the relative amount of bound BP Q/Q_{lim} . Data were determined for 10 mol % of DOPS (black), 20 mol % of DOPS (red) and 30 mol % of DOPS (green) containing DOPC SPBs.

From the dependencies of the particle numbers on the axial sample positions at different protein concentrations phosphatidylserine-dependent equilibrium dissociation constants are derived confirming literature values. Moreover, number of bound BP molecules Q and limiting value of bound BP proteins Q_{lim} are also parameters of interest. Our data show that with increasing Q (e.g. with increasing amount of DOPS or BP used) protein D_2 values decrease (Fig. 4). Above 30 % Q/Q_{lim} the D_2 values obtained for three different DOPS contents overlap perfectly. In this range the observed dependency might be explained by a model based on bound BP molecules acting as impermeable diffusion obstacles. Interestingly, in the physiological relevant range ($Q/Q_{lim} < 30$ %) the BP diffusion weakly bound to 10 % DOPS SPBs appears to be faster than on SPBs with higher DOPS content, indicating that at the same surface coverage the increasing amount of available DOPS headgroups is slowing down BP lateral diffusion.

In summary, we found that the lateral diffusion of BP is coupled with the diffusion of DOPE-Atto488. However, BP is diffusing considerably slower than the lipids. No differences in the lateral diffusion within both layers of the used SPBs were observed. Thus, there is no evidence for significantly faster diffusion within the layer facing the support compared to diffusion within the lipid layer binding BP, suggesting that the reason for the difference in D_2 values between BP and lipids might be connected with the mechanism of BP diffusion. However, explanations based on hydrophobic interactions between the non-fragment part of

BP and the SPBs or a possible exchange of DOPS molecules bound to BP with unbound ones appear at that point as too speculative.

Conclusion

In conclusion we have demonstrated that the phasor plot is suitable, useful and helpful approach in the analysis of fluorescence data obtained by cuvette as well as microscopy measurements. We have shown that

- ✓ the phasor plot is perfect tool in monitoring of excited state reactions (solvent relaxation and energy transfer)
- ✓ the phasor plot helps in classical protein studies (protein denaturation, folding, conformation, kinetics, interactions with ligand, influence of temperature and quenchers)

In relation to the membranes we have used phasors as well as various fluorescence techniques to monitor and characterize membrane nanostructures. Specifically, we say that

- ✓ data quality of the structure size determination using energy transfer is highly dependent on partition coefficients of individual donors and acceptors
- ✓ membrane nanostructures are very heterogeneous in terms of size, rigidity and dynamics
- ✓ external cross-linkers are not necessary in nanodomains formation, the nanodomains are more sphingolipids dependent

When characterizing weakly bound peripheral protein prothrombin, we have demonstrated that

- ✓ z -scan FCS in combination with 2D3D analytical model is very powerful tool in weakly bound protein dynamics
- ✓ unless there is obvious coupling between the prothrombin and the membrane, the protein diffuses twice slower, which is most likely related to the binding mechanism

Úvod

Biologické membrány jsou důležitou součástí živých organismů. Jejich funkce je velice různorodá a je blízce spjata se strukturou a molekulárním složením. Membrány udržují nerovnovážený stav a zajišťují přepravu iontů, energie, informací a metabolitů mezi vnitřním a vnějším buněčným prostředím. Biologické membrány jsou uspořádány do fosfolipidové dvojvrstvy. Jednotlivé vrstvy se skládají z velice hydrofobních acylových řetězců orientovaných do středu membrán a hydrofilních polárních hlaviček, které míří do cytosolu či do mezibuněčného prostoru. Membrány nejsou tvořeny jen pomocí lipidů, ale z veliké části i z proteinů, které společně s lipidy tvoří membránové kanály, komplexy a receptory. V roce 1972 pánové Singer a Nicolson [1] publikovali svou práci v níž popisovali membránu jako lipidovou dvojvrstvu s velkým podílem proteinů. Navíc autoři také uvedli, že membrány jsou velice mobilní a že proteiny a lipidy se v membránách pohybují naprosto volně. Později Simons a spoluautoři [2] uveřejnili myšlenku membránových raftů, velice rigidních struktur, které slouží určitým proteinům jako podpůrné elementy membrán a napomáhají jim plnit jejich funkci. Autoři ještě zdůraznili, že membránové rafty jsou tvořeny převážně molekulami cholesterolu a sfingolipidů a jejich velikost je menší než je rozlišení optických mikroskopů (< 200nm). Navíc mluvili o raftech jako o stabilních strukturách s nízkou dynamikou. Toto tvrzení bylo s postupem času poopraveno, jelikož nová zjištění naopak vykazují vysokou dynamiku raftů [3].

K lepšímu porozumění principu organizace membrán je velice důležité pochopit vliv jednotlivých lipidů. Buněčné membrány jsou komplexní systém, který ovlivňuje mnoho faktorů. Z tohoto důvodu je jejich studium velice komplikované. Modelové membrány, obrovské jednovrstevné vezikuly (GUVs) [4] a podporované membrány (SPBs), jsou dobrá zjednodušení umožňující kvantitativní studie membrán. Podporované membrány jsou vytvářeny na pevných podkladech, tudíž manipulace s nimi je značně jednoduchá. Nevýhodou podporovaných membrán je vliv podkladu na mobilitu a fázovou separaci membrán. Naopak GUVs jsou nijak neovlivňované membrány o velikosti podobné buňkám. Navíc jsou velice vhodné pro studium fázových separací.

Fluorescenční techniky jsou velmi užitečným nástrojem v biologických studiích, protože jsou vysoce citlivé, selektivní a neinvazivní. Pro stanovení membránové dynamiky (laterální pohyblivost, rigidita, vazba) jsou často používány fluorescenční korelační nebo sledovací metody (FCS, SPT, RICS) [5-7]. Doba dohasínání fluorescence je velmi citlivá na změny mikroprostředí v okolí fluoroforů. Přináší tedy informace ohledně lokální polarity,

viskozity nebo heterogenity. Navíc přenos energie mezi donorem a akceptorem (obvykle sledováno pomocí doby dohasínání fluorescence) poskytuje cenné informace o relativních vzdálenostech mezi molekulami donoru a akceptoru, které mohou souviset s konformací proteinu, vazbou ligandu na protein nebo, jako v našem případě, na velikosti membránových nanostruktur.

Ve své diplomové práci se zaměřím na fluorescenční techniky (emisní spektroskopii, Försterův rezonanční přenos energie, fluorescenční korelační spektroskopii, zobrazování dob dohasínání fluorescence pomocí mikroskopie, harmonické určování dob dohasínání fluorescence), které poskytují informace o membránách, membráno-proteinových interakcích a proteinech. Přesněji řečeno se budu zabývat vývojem fázorů, které jsou velmi jednoduchým analytickým nástrojem při vyhodnocování dob dohasínání fluorescence. Ukazují příklady biochemických aplikací fázorů při studiu membrán i proteinů. Dále použiji FCS a FLIM-FRET v kombinaci s fázorovou analýzou k popisu membránového nano-okolí z hlediska mechanismu vzniku a velikosti. Také se budu věnovat popisu a charakterizaci interakcí mezi bílkovinami a lipidy či bílkovinami a celými membránami.

Cíle studie

Cílem této práce bylo přispět pomocí fluorescenčních technik (převážně fluorescenčních mikroskopických technik) k lepšímu porozumění role lipidů v membránové organizaci a v interakcích mezi proteiny a membránami. Přesněji řečeno, moje práce byla zaměřena na vývoj fluorescenčních metod aplikovatelných na modelové membrány a dále pak na použití těchto metod k popisu membránové dynamiky, vlivu individuálních lipidů na membránovou organizaci a studii protein-lipidových interakcí a jejich ovlivňování se. Pro jednoduchost je tato práce strukturovaná do tří hlavních částí v souladu a otázkami, na které jsem hledal odpovědi:

- 1) Je fázorová analýza dob dohasínání fluorescence aplikovatelná pro studium organizace modelových membrán a proteinových struktur? Přináší fázorový diagram nové pohledy do biochemie proteinů a lipidových membrán?
- 2) Jsou základní fluorescenční metody užitečné pro charakterizaci a monitorování membránových nanodomén v modelových membránách vzhledem k membránovým raftům? Pokud ano, můžeme udělat obecné závěry o mechanismu tvoření těchto domén?
- 3) Pokud popisujeme protein-lipidové interakce, je FCS dobrý nástroj k popisu dynamiky slabě vázaných periferních proteinů?

Materiály a metody

Všechny lipidy použité v mé práci byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (AL, USA), fluorescenční barviva od firmy Invitrogen (CA, USA) a většina chemikálií a část proteinů od firmy Sigma Aldrich (MO, USA). Hovězí prothrombin jsem získal od Synapse BV (Maastricht, Nizozemí) thrombin a antithrombin III od Hematologic Technologies (VT, USA).

Podporované dvojvrstvy byly připraveny pomocí malých unilamelárních vezikulů na velmi čistém povrchu slídy. Slída byla připevněna k držáku a umístěna 200 mikrometrů nad dnem kyvety [8]. Obrovské unilamelární vezikuly (GUVs) byly připraveny metodou jemné hydratace popsanou v literatuře [9] a imobilizovány na skleněný povrch pomocí streptavidin-biotinové vazby. Všechna měření byla provedena na vrcholku každé GUV.

Hovězí prothrombin byl označen barvivem Alexa 633 přes NH₂ skupiny aminokyselin podle standardního značícího návodu. Označený protein byl vyčištěn od přebytečného volného barviva pomocí gelové chromatografie na Sephadexu G-25 a koncentrace značeného proteinu byla určena pomocí absorpční spektrometrie.

Existují dvě základní metody používané pro určení dob života dohasínání fluorescence, časově rozlišená a frekvenční. V časově rozlišené metodě je měřena doba, za jakou je foton emitován. Následně je pomocí fitovací metody určena doba dohasínání fluorescence. U frekvenční metody je vzorek excitován sinusoidně modulovaným světlem a rozdíl mezi fází a modulací excitovaného a emitovaného světla je zaznamenán. Doba dohasínání fluorescence je opět stanovena pomocí fitování křivek.

Metoda zobrazování fluorescenčních dob životnosti (FLIM) je založena na skenování jednotlivých pixelů zkoumaného vzorku, přičemž v každém pixelu je stanoven fluorescenční lifetime. Výsledný obrázek tedy neobsahuje pouze informace o intenzitě fluorescence, ale také mapu závislosti fluorescenčních dob života dohasínání na poloze ve vzorku/obrázku. Takováto mapa poskytuje cenné informace o lokálním prostředí kolem fluoroforů, jak již bylo uvedeno v úvodu.

Fázorová analýza je nový přístup pro vyhodnocování dob života dohasínání fluorescence [10; 11]. Ve fázorové analýze se nepoužívá žádného fitování, tudíž se nevnaší do výsledků žádné umělé chyby. Fázorová analýza je grafickým znázorněním dob života dohasínání fluorescence, ve kterém jsou rozdíly v dobách dohasínání velice snadno rozpoznány a analyzovány. Principem metody je převedení naměřených dat do tzv. G a S funkcí podle následujících rovnic:

$$G = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

$$S = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

kde $I(t)$ je intenzita fluorescence v daném čase a ω odpovídá $\omega = 2\pi f$, f je repetiční frekvence laseru nebo jakákoliv jiná frekvence. Hodnoty pro G a S funkce jsou vyneseny do kartézské soustavy souřadnic. Chromofory s jednou hodnotou doby života dohasínání fluorescence (jednoexponenciální) vytvářejí univerzální kruh se středem v $[0.5, 0]$ a všechny ostatní fluorofory s více hodnotami dob dohasínání fluorescence nebo směsi dvou jednoexponenciálních fluoroforů spadají dovnitř univerzálního kruhu. Navíc směs dvou jednoexponenciál tvoří hypotetickou spojovací čáru mezi polohami jednotlivých jednoexponenciál na univerzálním kruhu.

Fluorescenční rezonanční přenos energie využívá překryvu emisního spektra jednoho fluoroforu (donor) a absorpčního spektra jiného fluoroforu (akceptor). V případě tohoto překryvu je část energie donoru použita pro excitaci akceptoru. Ztráta energie donoru je doprovázena snížením intenzity fluorescence nebo zkrácením doby života dohasínání fluorescence. Účinnost přenosu energie (změny doby dohasínání fluorescence) je hlavně závislá na vzdálenosti molekul donoru a akceptoru, čehož je využíváno v strukturní biochemii a biologii.

Fluorescenční korelační spektroskopie je založena na sledování intenzitních fluktuací fluorescence ve velmi malém detekčním objemu (konfokální mikroskopie). Tyto fluktuace jsou následně korelovány a výsledné autokorelační funkce jsou vyhodnocovány pomocí vhodného matematického modelu (model pro dvourozměrnou nebo třírozměrnou difúzi). Důležité parametry jsou difúzní čas (doba, jakou fluorofor stráví v detekčním objemu) a počet fluorescenčních molekul v detekčním objemu (z principu metody je možné sledovat pouze velmi malé množství fluorescenčních molekul najednou, 1-10 molekul). Hodnoty difúzních časů jsou přímo spjaty s difúzními koeficienty.

Výsledky a diskuse

Otázka číslo 1:

Je fázorová analýza dob dohasínání fluorescence aplikovatelná pro studium organizace modelových membrán a proteinových struktur? Přináší fázorový diagram nové pohledy do biochemie proteinů a lipidových membrán?

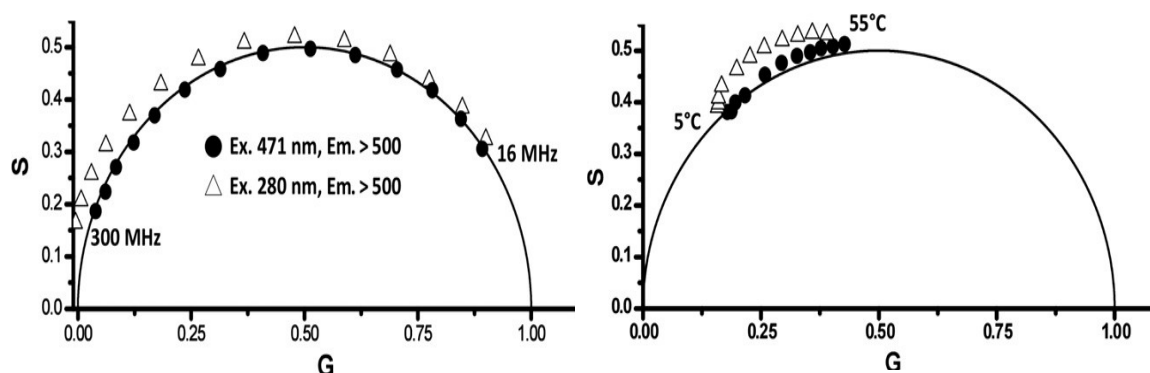
Charakterizace procesů spojených s excitovanými stavy pomocí fázorové analýzy

Motivací této práce byl vývoj metody, která by byla využitelná k analytickému studiu směsí fluoroforů, tedy pomocí které by bylo možno jednoduše a zřetelně porovnat různé směsi. Ve fázorové analýze je pozice směsi dvou fluoroforů, které dohasínají monoexponenciálně a které mají odlišnou dobu dohasínání fluorescence, nebo jediného fluoroforu s multiexponenciální dobou dohasínání fluorescence, uvnitř tzv. univerzálního kruhu. Pozice uvnitř univerzálního kruhu (souřadnice středu [0.5, 0]) indikuje heterogenitu vzorku z hlediska dob dohasínání fluorescence. Podle teorie fázorové analýzy, tato pozice je umístěna na hypotetické přímce spojující pozice jednotlivých fluoroforů nebo jednoexponenciálních komponent. Následně směs tří fluoroforů bude ve fázoru umístěna uvnitř trojúhelníku, jehož vrcholy odpovídají pozicím jednotlivých fluoroforů. My jsme studovali směsi dvou a tří fluoroforů, jejichž doby dohasínání fluorescence jsou značně odlišné, přesněji řečeno jsme použili značky DENS (doba dohasínání fluorescence $\tau = 29.9$ ns), IAEDANS ($\tau = 5.3$ ns), a Rhodamine B ($\tau = 1.7$ ns). Ukazujeme fázorové pozice jednotlivých fluoroforů, kombinace směsi dvou fluoroforů (DENS/IAEDANS, DENS/Rhodamine B, and IAEDANS/Rhodamine B) a směsi všech tří fluoroforů. Podle očekávání jsou směsi dvou fluoroforů lokalizovány na spojnici pozic jednotlivých značek a směs všech tří značek leží uvnitř hypotetického trojúhelníku a její pozice záleží na zastoupení jednotlivých fluoroforů ve směsi.

Následně jsme využili fázorovou analýzu ke studiu procesů spojených s excitovaným stavem jako jsou Försterův rezonanční přenos energie nebo jev relaxace rozpouštědla. V případě relaxace rozpouštědla dochází po procesu excitace ke změnám v dipólovém momentu fluoroforu a následně k reorganizaci molekul (dipólových momentů) rozpouštědla v blízkosti značky. Rychlost této reorganizace záleží na rigiditě okolního prostředí a nekovalentních interakcích a je velice cennou informací při charakterizaci membrán a proteinů. Kvůli fázovému zpoždění emise relaxovaného stavu (v relaxaci rozpouštědla) nebo zpoždění doby

dohasínání života akceptoru při přenosu energie může být pozice u těchto procesů ve fázoru za hranicemi univerzálního kruhu.

Studovali jsme přenos energie uvnitř EGFP a ukázali pozice ve fázorech, které odpovídaly emisi nad 525nm při excitaci 471nm nebo 280nm (Obr. 1, vlevo). Je evidentní, že při excitaci 471nm pozice ve fázoru odpovídá dohasínání monoexponenciálního fluoroforu uvnitř EGFP, tedy že je na univerzálním kruhu. Na druhou stranu excitace pomocí 280nm excituje aminokyselinové zbytky tyrosinu a tryptofanu, přičemž dochází k přenosu energie mezi těmito zbytky a chromoforem v EGFP. Výsledkem je pozice fázorových bodů za hranicemi univerzálního kruhu.



Obrázek 1 Vlevo: Fázorové grafy pro EGFP, které bylo excitované pomocí vlnových délek 471nm a 280nm, emisní data zaznamenána pro vlnové délky vyšší než 500nm. Všechna data excitovaná vlnovou délkou 280nm jsou vně kruhu, což je důkazem procesů excitovaných stavů. Vpravo: LAURDAN ve vezikulách vytvořených z DMPC lipidů. Kruhy a trojúhelníky odpovídají teplotní závislosti od 5°C do 55°C s 5°C intervalem. Značka byla excitovaná 375nm; emise byla sbírána skrz 420-nm (kruhy) a 470-nm (trojúhelníky) „longpass“ filtry.

Podobně studium pomocí fázorové analýzy teplotní závislosti (od 5°C do 55°C) vezikulů složených z LAURDAN/DMPC ukazuje, že data pořízená emisním filtrem nad 470 nm jsou kompletně venku z univerzálního kruhu (Obr. 1, vpravo). Pokud je analyzováno celé spektrum (pomocí 420nm „longpass“ filtru), body ve fázorové analýze leží podél univerzálního kruhu, což ukazuje, že nerelaxovaný stav převládá nad relaxovaným. V případě použití 470nm „longpass filtru“, sbíraná emise pochází převážně z molekul, kolem nichž jsou molekuly rozpouštědla relaxovány, a tudíž je proces relaxace více patrný ve srovnání s experimentem, kdy jsou sbírána data z většího spektra.

Ukázali jsme, že využití fázorové analýzy při měřeních v kyvetě je komplementární metoda k ostatním analytickým přístupům a že ve spoustě případů poskytuje informace, které jsou pomocí ostatních metod velice obtížně získatelné. Přesněji řečeno, fázorová analýza umožňuje jednoduchou kvantifikaci heterogenity vzorků, dále pak přináší jednoduchý přístup k procesům excitovaných stavů.

Fázorová analýza jako metoda k monitorování konformace proteinů, interakcí mezi proteiny a ligandy a kinetiky proteinů

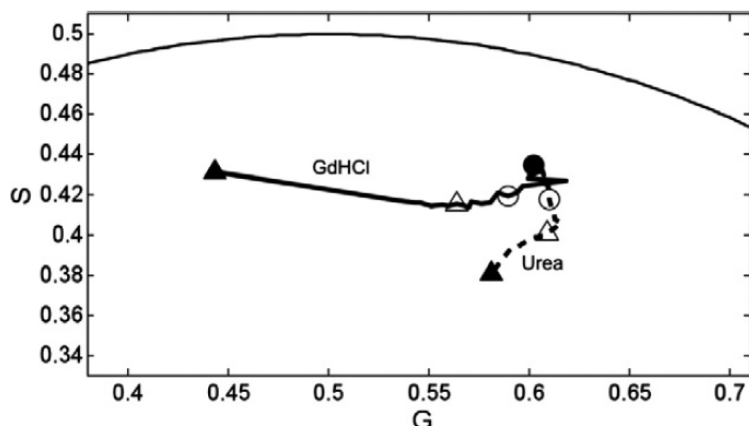
V této práci jsme využili převážně fluorescence tryptofanu k popisu a charakterizaci proteinů lysozymu, dynaminu 2, lidského serového albuminu a transferinu. Změny v konformaci proteinů byly studovány pomocí zhášecích a teplotních experimentů a výsledná data byla analyzována pomocí fázorové analýzy. Stručně řečeno, zhášec fluorescenc akrylamid značně snižuje dobu dohasínání fluorescence proteinu lysozymu v závislosti na koncentraci zhášedla. Tato změna doby dohasínání fluorescence odráží změny ve sbalení proteinu.

Teplotní experimenty ukazují dvě cesty v denaturaci proteinu lysozymu. Při teplotě 40°C je snižující se trend v heterogenitě doby dohasínání fluorescence zastaven. Tento trend odpovídá vratnému rozbalování konformace proteinu. Při teplotě nad 70°C začíná heterogenita doby dohasínání fluorescence opět růst a od této hodnoty začíná být proces denaturace ireverzibilní.

Ukazujeme také data (pořízená při excitaci o vlnové délce 280nm) pro jednotlivé proteiny thrombin, antithrombin a lysozym a pro jejich směsi. Proteiny antithrombin a lysozym spolu neinteragují, tudíž směs obsahující tyto dva proteiny leží ve fázorové analýze přesně na spojnici pozic pro jednotlivé proteiny (viz Materiály a Metody). Toto bylo experimentálně ověřeno ve fázorové analýze pro směs obsahující tyto dva proteiny v poměru 1:1. Na druhou stranu, pokud spolu dva proteiny interagují a tato interakce ovlivňuje doby dohasínání fluorescence jednotlivých proteinů, pak směs těchto dvou proteinů se odchyluje od spojnice pozic pro jednotlivé proteiny. Proteiny thrombin a antithrombin spolu tvoří pevný komplex, který ovlivňuje dobu dohasínání fluorescence, tudíž ve fázorové analýze není pozice této směsi lineární kombinací dob dohasínání fluorescence jednotlivých proteinů, jak jsme experimentálně ověřili. Tato demonstrace ukazuje jakým způsobem je fázorová analýza užitečným nástrojem při studiu interakcí proteinů.

Denaturace proteinů je velice důležitým tématem v proteinové vědě, nicméně její studium je velice komplikované. Typickými denaturačními činidly jsou močovina a guanidin chlorid (GdHCl). My jsme sledovali vnitřní fluorescenci proteinu lysozymu za podmínek, kdy byla postupně přidávána tato dvě denaturační činidla (Obr. 2). Koncentrace denaturačních činidel v jednotlivých krocích byly; 0 M, 1 M, 2 M a 6/8 M GdHCl a močoviny. Koncentrace v počátečních podmínkách způsobují pouze malé odlišnosti v denaturaci proteinu, ovšem vyšší koncentrace močoviny a GdHCl ukazují úplně odlišné směry v denaturaci lysozymu.

Konečné body ve fázoru jsou dramaticky odlišné a ukazují dvě unikátní denaturované formy lysozymu.



Obrázek 2 Denurační studie proteinu lysozymu analyzovaná pomocí fázorového grafu. Koncentrace denaturantů GdHCl a močoviny byly; 0 M (plný kruh), 1 M (prázdné kruhy), 2 M (prázdné trojúhelníky) and 6/8 M (plné trojúhelníky).

V tomto článku jsme popsali a ukázali možné aplikace fázorové analýzy při studiu vnitřní fluorescence proteinů. Pomocí této metody, velice komplexní parametr, jímž doba dohasínání fluorescence je, může být převeden pouze do jednoho bodu ve fázoru. Vnější faktory jako vázání ligandu k proteinu nebo denaturace proteinu způsobují změny v okolí aminokyselinových zbytků a změny pozic fázorových bodů.

Otázka číslo 2:

Jsou základní fluorescenční metody užitečné pro charakterizaci a monitorování membránových nanodomén v modelových membránách vzhledem k membránovým raftům? Pokud ano, můžeme udělat obecné závěry o mechanismu tvoření těchto domén?

Molekulová dynamika ukazuje koncepční limitace při určování velikosti nanodomén v membránách pomocí metody přenosu energie

Försterův rezonanční přenos energie je velice často využíván při charakterizaci membránových nanodomén také kvůli tomu, že FRET může přinést informace o nanodoménách, a to i v případě, že vznikají pouze na přechodnou dobu. Určování velikosti těchto nanodomén pomocí FRET vyžaduje znalost rozdělovacích koeficientů mezi nanodoménami (L_o) a okolním prostorem membrány (L_d) pro donory (D) a akceptory (A). V této práci převážně diskutujeme rozdělovací koeficienty jednotlivých fluoroforů a jejich vztah k určování velikosti nanodomén pomocí FRET. Existují tři možné případy; I) obě dvě značky

jsou lokalizovány v L_o fázi, II) D/A pár je vyloučen z L_o nanodomén a III) donor a akceptor jsou lokalizovány v odlišných fázích. Pomocí molekulové dynamiky jsme spočítali pravděpodobnosti schopnosti detekovat membránové domény a vztáhnout je k velikosti a zastoupení těchto domén. Tato pravděpodobnost byla vyjádřena pomocí poměru steady-state intenzity donoru (F_d) k intenzitě donoru v případě, když D/A jsou rovnoměrně rozmístěné v membráně ($F_d(\text{uni})$). Všimněte si, že poměr vyšší než 1.2 je vhodný pro určování velikosti a zastoupení nanodomén v membráně. V prvních dvou případech studium pomocí FRET je nejužitečnější pouze když rozdělovací konstanty K_d a K_a (definovány jako $K_i = [i]_{L_o} / [i]_{L_d}$, $i = D$ nebo A) jsou obě vyšší než 5 (v prvním případě) nebo naopak nižší než 0.01 (v druhém případě). Nicméně jsme zjistili, že třetí případ je nejindeálnější pro určování membránových charakteristik, zvláště pak když $K_d > 3$ a $K_a < 0.01$.

V této práci také diskutujeme čtyři FRET páry (které jsme našli v literatuře) a jejich využití při charakterizaci membránových nanodomén. Tyto páry jsou;

- I) NBD-PE/Rhodamine-PE s $K_d = 4.3$, $K_a = 0.37$ a $R_0 \sim 5$ nm [12],
- II) BODIPY-PC/fast-DiI s $K_d = 0.1$, $K_a = 0.1$ a $R_0 \sim 6.5$ nm [13],
- III) Alexa Fluor 647 cholera toxin podjednotka B/DiD s $K_d = 11$ (6), $K_a = 0.004$ a $R_0 \sim 5.4$ nm, a,
- IV) Perylene/fast-DiI s $K_d = 0.8$ (3), $K_a = 0.01$ a $R_0 \sim 5$ nm [14].

Všechny tyto uvedené FRET páry byly studovány v systémech o různém lipidovém složení, což vysvětluje jemné rozdíly v rozdělovacích koeficientech donorů a akceptorů. Podle výsledků z našich simulací vychází, že nejlepší FRET pár byl Alexa Fluor 647 cholera toxin podjednotka B/DiD. Druhý nejvhodnější pár byl Perylene/fast-DiI, obzvláště když je v simulacích použita hodnota $K_d = 3$. Bohužel zřejmá nevýhoda použití cholera toxinu je jeho vlastnost vázání pěti GM1 lipidů dohromady. Toto spojování mění lokální lipidové složení v membránách [14].

Charakterizace velikosti a mechanismu vzniku membránových nanodomén v GUVs

Změny v organizaci membrány po zesíťování jejích částí spouští signalizační buněčnou odpověď na různé vnější faktory. Zesíťování gangliosidů GM1 pomocí cholera toxinu (CtxB) způsobuje mikroskopickou fázovou separaci v modelových membránách. Komplexy CtxB-GM1 tvořící minimální lipidovou jednotku jsou předmětem právě probíhajícího membránového studia. Přímé pozorování těchto malých (řádově nanometrových) membránových heterogenit pomocí optické mikroskopie není možné kvůli nízké rozlišovací schopnosti a díky rychlé dynamice vzniku a rozpadu raftů. Z těchto důvodů

tyto velice malé membránové struktury nikdy nebyly charakterizovány z hlediska velikosti a dynamiky. V této práci jsme se zaměřili na studování této počáteční fáze fázové separace indukované CtxB v modelových membránách (GUVs), které obsahují lipidy Sph/DOPC/Chol.

Lipidové složení studované v této práci (shrnuje Tabulce 1) je velice blízko oblasti, ve které dochází k mikroskopické fázové separaci. Zesíťovač CtxB byl přidáván ve dvou krocích což je v této práci označováno jako malé a velké množství cholera toxinu (označováno apostrofem, např. **B** a **B'**). Zdůrazňujeme, že za našich podmínek domény o mikrometrové velikosti nebyly pozorovány v obou studovaných lipidových kompozicích (**B** a **C**), a to ani když bylo přidáno velké množství cholera toxinu. Ukazujeme výsledky pro CtxB-Alexa647, které byly naměřeny pomocí z-scan FCS a analyzovány difúzním zákonem teoreticky odvozeným Wawrezinieckem a jeho kolegy [15]. Provedli jsme také FLIM-FRET měření přenosu energie mezi CtxB-Alexa488 (donorem) a DiD (akceptorem). DiD je lipidová značka, která je převážně lokalizovaná v L_d fázi. Pomocí fázorové analýzy jsme monitorovali změny v době dohasínání fluorescence donoru.

Tabulka 1 Molární frakce lipidů použité na tvorbu GUVs

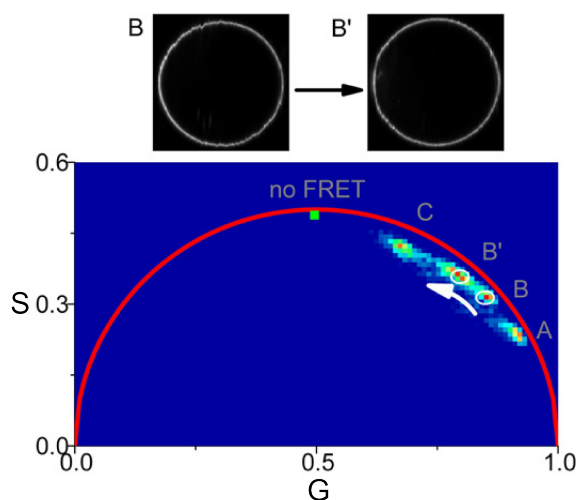
	DOPC	Sph	Chol	DOPG	GM1
A	0.68	0	0.25	0.05	0.02
B	0.49	0.19	0.25	0.05	0.02
C	0.44	0.24	0.25	0.05	0.02

Kompozice A neobsahuje žádný Sph a naměřené experimenty slouží jako srovnávací vzorek, ve kterém nedochází k žádné segregaci lipidů do domén. Laterální difúze CtxB je nezávislá na množství přidaného CtxB a analýza difúzního zákona ukazuje volnou a ničím nebráněnou difúzi (s nulovým úsekem na ose y). Výsledky z FLIM-FRET měření ukazují maximální přenos energie, což odpovídá homogennímu rozdělení molekul donoru a akceptoru v membráně.

Kompozice B a B' se z hlediska laterální difúze chová velice odlišně od kompozice s nulovým množstvím Sph. Za prvé, chování této kompozice je závislé na množství přidaného CtxB. Za druhé, analýza pomocí difúzního zákona ukazuje významný pozitivní úsek pro velké množství CtxB, což nepřímo ukazuje na přítomnost membránových nanodomén, ve kterých je laterální difúze proteinu značně zpomalována. Navíc snížená účinnost přenosu energie při FLIM-FRET experimentech pro kompozici **B** ve srovnání s kompozicí **A** signalizuje také separaci donoru a akceptoru a tedy i přítomnost membránových domén (Obr. 3). Tento efekt byl ještě více zřejmý při použití velkého množství CtxB, což naznačuje zvětšení těchto

domén. Dále pak jsme použili analytický model navržený pány Baumannem a Fayerem [16] pro analýzu křivek dohasínání dob života fluorescence donoru a vypočítali průměrné poloměry domén. Výsledkem jsou poloměry 5 nm a 8 nm pro kompozice **B** a **B'**.

Kompozice C se dramaticky liší od kompozice **B** ve třech aspektech; 1) nepozorovali jsme žádnou koncentrační závislost při přidávání zesítovače CtxB, 2) ačkoliv tato kompozice obsahuje vyšší množství Sph ve srovnání s kompozicí **B**, čas, po který se CtxB-Alexa647 pohybuje po membráně v této kompozici, je nižší ve srovnání s kompozicí **B'**, ale vyšší než v kompozici **B** a 3) pozitivní časový úsek určený z difúzního zákona je významně nižší (nebo dokonce roven nule) ve srovnání s kompozicí **B'**. Vysoký pokles v účinnosti přenosu energie ukazuje velké domény. Baumannův a Fayerův model potvrzuje tyto hypotézu a určuje průměrnou velikost poloměru těchto domén ($R=24$ nm).



Obrázek 3 Spodní část: Fázorový graf dob dohasínání fluorescence donoru (CtxB-488), které jsou ovlivněny přenosem energie. Horní část: Obrázky intenzit fluorescence v GUVs měřené pro malé a velké koncentrace CtxB-488. Všimněte si, že i pro vysoké hodnoty CtxB nejsou zjevně viditelné žádné fázové separace.

V této práci jsme ukázali dva různé typy membránových domén s velikostí pod optickým rozlišením mikroskopů. Jelikož v kompozici **B** se difúzní charakter domén mění s množstvím použitého zesítovače CtxB, navrhuje, že tyto domény jsou tvořeny na přechodnou dobu kolizí CTxB-GM1 komplexů. V kompozici **B** jsou tedy domény tvořeny výhradně pomocí zesítovače a následně stabilizovány pomocí Sph. Na druhou stranu naše data ukazují, že v kompozici **C** jsou malé lipidové domény vytvořeny už před přidáním zesítovače a možnost jejich existence je připisována interakcím mezi jednotlivými lipidy.

Otázka číslo 3

Pokud popisujeme protein-lipidové interakce, je FCS dobrý nástroj k popisu dynamiky slabě vázaných periferních proteinů?

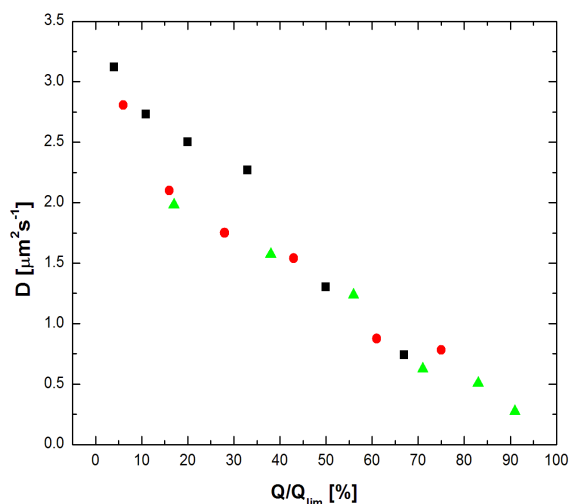
Charakterizace interakce proteinu prothrombinu s negativně nabitými modelovými membránami

Spousta enzymatických procesů, kterých se účastní proteiny obsahující zbytky kyseliny γ -karboxyglutamové, vyžadují vazbu těchto proteinů na záporně nabitě membrány. Jako příklad těchto procesů slouží protein koagulační kaskády krve prothrombin, který se pomocí laterální difúze spojuje s dalšími proteiny a tvoří prothrombinázový komplex. Jelikož tyto proteiny jsou vázány na membránu velice slabě (rovnovážná disociační konstanta K_d je řádově μM), za fyziologických koncentrací proteinu existuje stále nezanedbatelné množství proteinu nenavázaného na membránu, což studium laterální difúze prothrombinu značně ztěžuje. Ukazujeme, že z-scan FCS je jednoduchá metoda pro určování 2D difúzních koeficientů těchto slabě vázaných proteinů. Navíc s použitím tzv. “pulsed interleaved excitation” (PIE) jsme schopni současně monitorovat difúzi proteinů a lipidů, tudíž můžeme získat přímé informace o možném propojení obou difúzních procesů. Přesněji řečeno jsme studovali vázání proteinu prothrombinu značeného pomocí fluorescenční značky Alexa633 na modelové membrány SPBs složené z DOPC a DOPS. Modelové membrány o různém lipidovém složení byly značeny pomocí DOPE-Atto488.

Porovnání hodnot laterálních difúzních koeficientů (D_2) pro prothrombin a lipidy ukazuje, že protein se pohybuje významně rychleji. Překvapivě laterální difúze proteinu a lipidů ukazuje kvalitativně podobný trend, což napovídá o jistém vztahu (vazbě) těchto dvou difúzních procesů. U membrán s nízkým zastoupením (10%) DOPS a nízkou koncentrací proteinu je rozdíl mezi difúzí proteinu a lipidů značně menší než u membrán s vyšším zastoupením DOPS.

Ze závislosti počtu částic na koncentraci proteinu prothrombinu jsme určili rovnovážné disociační konstanty. Hodnoty těchto konstant odpovídají hodnotám dříve publikovaným v literatuře. Navíc jsme získali hodnoty pro počet molekul prothrombinu navázaných na membránu Q a pro limitní hodnoty navázaného prothrombinu Q_{lim} . Naše data ukazují, že se stoupající hodnotou Q (např. se stoupajícím množstvím DOPS nebo prothrombinu) klesají hodnoty laterální difúze prothrombinu (Obr. 4). Nad 30 % Q/Q_{lim} se hodnoty D_2 získané pro tři různé koncentrace DOPS v membráně plně překrývají. Tato závislost může být vysvětlena neprostupnými zábranami v membráně způsobenými velkým

množstvým proteinu prothrombinu navázaným na membránu. Za fyziologicky relevantních hodnot ($Q/Q_{lim} < 30\%$) se rychlost difúze pro membránu s 10 % DOPS jeví vyšší ve srovnání s membránami s vyšším množstvím lipidu DOPS. Toto ukazuje, že za stejné hodnoty pokrytí membrány prothrombinem je difúze zpomalována přímou závislostí na množství DOPS v membráně.



Obrázek 4 Závislost laterálních difúzních koeficientů prothrombinu na relativním množství navázanosti (zaplněnosti) membrány Q/Q_{lim} . Data byla naměřena pro SPB membrány obsahující 10 mol % DOPS (černá), 20 mol % DOPS (červená) a 30 mol % DOPS (zelená).

Touto prací jsme ukázali, že laterální difúze prothrombinu je svázána s laterální difúzí DOPE-Atto488, nicméně prothrombin se pohybuje po membráně značně rychleji. Je třeba připomenout, že nebyly pozorovány žádné rozdíly v laterální difúzi mezi jednotlivými vrstvami v modelové membráně (SPBs). Vysvětlení tohoto rozdílu v difúzi by mohlo být založeno na hydrofóbních interakcích mezi prothrombinem a SPBs nebo na možné výměně molekul lipidů DOPS vázaných k prothrombinu za molekuly nevázané. Tyto hypotézy jsou však velice spekulativní.

Závěr

Závěrem bych chtěl jasně zdůraznit, že fázorová analýza je velice užitečná metoda při vyhodnocování dat spojených s dobou životnosti dohasínání fluorescence, získaných jak pomocí mikroskopů, tak i čistě spektroskopicky v kyvetách. Ukázali jsme, že

- ✓ fázorová analýza je skvělý nástroj pro studium a monitorování reakcí excitovaných stavů, jako je přenos energie a relaxace rozpouštědla
- ✓ fázorová analýza je využitelná v klasických studiích proteinů (denaturace proteinů, sbalování, změna konformace, kinetika, interakce proteinu a ligandu, vliv teploty a fluorescenčních zhasedel).

Při studiu membrán jsme použili fázorovou analýzu spolu se spoustou fluorescenčních metod k charakterizaci membránových nanodomén. Na základě výsledků konstatujeme, že

- ✓ kvalita dat pro určování membránových struktur pomocí přenosu energie je silně závislá na partičním koeficientu donorů a akceptorů
- ✓ membránové nanodomény jsou velice heterogenní co se týče velikosti, rigidity a dynamiky
- ✓ tvorba nanodomén je hlavně závislá na přítomnosti a množství sfingolipidů v membráně.

Při charakterizaci membránové interakce slabě vázaného proteinu prothrombinu jsme ukázali, že

- ✓ z-scan FCS v kombinaci s vhodným matematickým modelem pro analýzu je velice užitečná metoda pro určování dynamiky slabě vázaného proteinu
- ✓ ačkoliv je zřejmé, že protein je vázán na membránu, laterální pohyb prothrombinu je dvakrát pomalejší, což pravděpodobně souvisí s mechanismem vazby.

References/Seznam použité literatury

- [1] Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972). *Science* **175**, 720-731.
- [2] Simons, K. & Ikonen, E. (1997). *Nature* **387**, 569-572.
- [3] Lingwood, D. & Simons, K. (2010). *Science* **327**, 46-50.
- [4] Angelova, M.I. & Dimitrov, D.S. (1986). *Faraday Discuss* **81**, 303-+.
- [5] Magde, D., Elson, E.L. & Webb, W.W. (1974). *Biopolymers* **13**, 29-61.
- [6] Saxton, M.J. (1997). *Biophys J* **72**, 1744-1753.
- [7] Rossow, M.J., Sasaki, J.M., Digman, M.A. & Gratton, E. (2010). *Nat Protoc* **5**, 1761-1774.
- [8] Benda, A., Benes, M., Marecek, V., Lhotsky, A., Hermens, W.T. & Hof, M. (2003). *Langmuir* **19**, 4120-4126.
- [9] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. & Kinoshita, K.J. (1996). *Biophys J* **71**, 3242-3250.
- [10] Jameson, D.M., Gratton, E. & Hall, R.D. (1984). *Applied Spectroscopy Reviews* **20**, 55-106.
- [11] Digman, M.A., Caiolfa, V.R., Zamai, M. & Gratton, E. (2008). *Biophys J* **94**, L14-6.
- [12] de Almeida, R.F.M., Loura, L.M.S., Fedorov, A. & Prieto, M. (2005). *J Mol Biol* **346**, 1109-1120.
- [13] Heberle, F.A., Wu, J., Goh, S.L., Petruzielo, R.S. & Feigenson, G.W. (2010). *Biophys J* **99**, 3309-3318.
- [14] Hammond, A.T., Heberle, F.A., Baumgart, T., Holowka, D., Baird, B. & Feigenson, G.W. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6320-6325.
- [15] Wawrezynieck, L., Rigneault, H., Marguet, D. & Lenne, P.F. (2005). *Biophys J* **89**, 4029-4042.
- [16] Baumann, J. & Fayer, M.D. (1986). *J Chem Phys* **85**, 4087-4107.

Curriculum Vitae

Martin Štefl

Jakubská 294/IV
Jindřichův Hradec 37701
Czech Republic
E-mail: martin.stefl@jh-inst.cas.cz
Phone: +420 775 382 356

Education

- 2003 Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic B.Sc.
- Republic
- 2006 Biochemistry
Bachelor work: Kinetics of cytochrome P450 interaction with carbon monoxide
- 2006 Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic M.Sc.
- Republic
- 2008 Biochemistry
Diploma work: Time-resolved FCS – potential for study of protein interactions
- 2008 PhD student,
- Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic
now Biochemistry

Relevant courses

- Biochemistry and advanced labs
- Molecular Biology and basic labs
- Microbiology and basic labs
- Physical Chemistry and basic labs
- Analytical Chemistry and basic labs
- Inorganic Chemistry and basic labs
- Organic Chemistry and basic labs

Awards

- Master's of Science with Honours

Practical Skills

- Advanced laboratory practise and safety
- Using confocal fluorescence microscopes and other fluorescence techniques
- Fluorescence dyes (protein and lipid labelling, purification)
- Work with proteins and lipids
- Knowledge in basic biochemical techniques (electrophoresis, gel chromatography, thin-layer chromatography, dialysis,

Related experiences

- Participation in projects:
Prothrombin and its interaction with anionic lipids within the membrane - a fluorescence study
Project of the Grant Agency of Charles University in Prague, Registration No. GAUK 3130/2011
- Courses:
Raman spectroscopy and microscopy
Prague Center for Innovations in Analytical Chemistry,
Prague, Czech Republic
2006

Course of Protein Crystallography (Bentley&Bentley)
Physical chemistry Department, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic
2008
- Research fellowship
6 months fellowship in David Jameson's fluorescence laboratory on the University of Hawaii at Manoa, Department of Cell and Molecular Biology, Hawaii, USA, 2009
- International conferences
4th Wroclaw-Prague Seminar on Biophysics of Lipids, Wroclaw, Poland, 2008. Lecture on: Characterization of prothrombin binding to SPBs by Z-scan FCS.

Biophysical Society, 54th Annual Meeting, San Francisco, California, 2010, Poster: Application of Phasor Plots to Analysis of Fluorophore Heterogeneity, Excited State Reactions and Protein Conformations, James, N.G., Štefl, M., Ross, J.A. and Jameson D.M. Presented by N.G. James.

8th International Weber Symposium on Innovative Fluorescence Methodologies in Biochemistry and Medicine, Lihue, Kauai, 2011, Poster: Phasor FRET, z-scan FCS: Lipid Rafts in GUV's Liquid Disordered Phase have 8 nm in Radius, Štefl, M., Humpolíčková, J., Šachl, R., Macháň, R., Cebecauer, M., Hof, M.

Biophysical Society, 56th Annual Meeting, San Diego, California, 2012, Poster: Dynamics and Size of Crosslinking-Induced Lipid Nanodomains in Model Membranes, Štefl, M., Šachl, R., Humpolíčková, J., Cebecauer, M., Macháň, R., Kolářová, M., Johansson, L.B.-A., Hof, M.. Presented by J. Humpolíčková.

Membrane Dynamics in Physiology and Disease, Basel, Switzerland, 2012, Poster: Crosslinking-Induced Nanodomains in Model Membranes Have 8nm in Radius, Štefl, M., Šachl, R., Humpolíčková, J., Cebecauer, M., Macháň, R., Kolářová, M., Johansson, L.B.-A., Hof, M.

- Teaching experiences

Tutor in the practical session: *Dynamic fluorescence studies of proteins in model systems and cells: fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS)*, presented on Workshop Physical Chemistry of Biointerfaces, San Sebastian, Spain, 2012

List of Publications Related to the Thesis/Seznam publikací použitých v disertační práci

Applications of Phasors to In Vitro Time-Resolved Fluorescence Measurements: Štefl, M., James, N.G., Ross, J.A., Jameson, D.M., *Analytical Biochemistry*, 410(1), 62-69, 2011

Applications of Phasor Plots to in Vitro Protein Studies: James, N.G., Ross, J.A., Štefl, M., Jameson, D.M., *Analytical Biochemistry*, 410(1), 70-76, 2011

Limitations of Electronic Energy Transfer in the Determination of Lipid Nanodomain Sizes: Šachl, R., Humpolíčková, J., Štefl, M., Johansson, L.B. -A., Hof, M., *Biophysical Journal*, 101(11), L60-L62, 2011

Dynamics and Size of Crosslinking-Induced Lipid Nanodomains in Model Membranes: Štefl, M., Šachl, R., Humpolíčková, J., Cebecauer, M., Macháň, R., Kolářová, M., Johansson, L.B.-A., Hof, M., *Biophysical Journal*, 102(9), 2104-2113, 2012

Simultaneous Characterization of Lateral Lipid and Prothrombin Diffusion Coefficients by z-scan Fluorescence Correlation Spectroscopy: Štefl, M., Kulakowska, A., Hof, M., *Biophysical Journal*, 97(3), L1-L3, 2009

Other Publications/Ostatní publikace

Z-scan Fluorescence Correlation Spectroscopy – A Powerful Tool for Determination of Lateral Diffusion in Biological Systems: Štefl, M., Macháň, R., Hof, M., In Geddes C (ed.) *Reviews in Fluorescence 2009*, Springer, New York, 321-344, 2011