



Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině biologicko-ekologické vědy

**Fyziologické regulace transmembránových signálních
systémů řízených trimérními G-proteiny**

Komise pro obhajoby doktorských disertací
v oboru zoologie a fyziologie živočichů

RNDr. Jiří Novotný, CSc.

Fyziologický ústav AV ČR v Praze

Praha, duben 2005

Obsah

ÚVOD	2
PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY	3
ZÁKLADNÍ CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	8
METODICKÉ PŘÍSTUPY	10
NEJDŮLEŽITĚJŠÍ VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE	11
Trimerní G-proteiny a jejich signální systémy v myokardu	11
Studium G-proteiny řízení signalizace v centrálním nervovém systému	15
Změny v subcelulární distribuci receptorů a G-proteinů vyvolané hormonální stimulací	19
ZÁVĚRY	24
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27
PŮVODNÍ PUBLIKACE AUTORA DISKUTOVANÉ V DISERTAČNÍ PRÁCI	32
SUMMARY	34

ÚVOD

Podkladem pro vypracování této disertační práce je soubor patnácti odborných publikací vztahujících se k různým fyziologickým aspektům transmembránové signalizace řízené trimérodními G-proteiny. Tyto články publikované v mezinárodních recenzovaných časopisech byly podle svého tématického zaměření rozděleny do tří skupin. V prvním souboru prací (publikace I-IV) jsme zkoumali signální systém adenylcyklasy (AC) v myokardu potkana a jeho změny v průběhu dospívání, ale také vliv thyroideálních hormonů, nadměrné tlakové zátěže nebo hypoxie. Druhý soubor prací (publikace V-IX) se týká výzkumu AC a G-proteinů ve vybraných oblastech potkaního mozku během postnatálního ontogenetického vývoje. Ve třetím souboru prací (publikace X-XV) jsme se zabývali především monitorováním změn v G-proteiny řízené signalizaci, které jsou důsledkem prodloužené hormonální stimulace buněk exprimujících příslušné receptory a trimérodní G-proteiny.

PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

Transmembránové signální systémy řízené trimérodními G-proteiny zprostředkují přenos informací z vnějšího prostředí do buněk a hrají tak významnou úlohu při regulaci mnoha fyziologických procesů. Mnoho různých patologických stavů přímo nebo nepřímo nějak souvisí s narušenou funkcí signálních systémů a porozumění molekulárním mechanismům podílejícím se na transmembránové signalizaci je proto z medicínského hlediska velmi důležité.

Bylo zjištěno, že srdeční dysfunkce nebo selhání tohoto životně důležitého orgánu jsou zpravidla doprovázeny vážně zhoršeným fungováním transmembránových signálních systémů. Kritická je v této souvislosti zejména snížená citlivost k β -adrenergní stimulaci způsobená úbytkem β -adrenergních receptorů a dalšími změnami v AC signálním systému [1-5]. Ke změnám v transmembránové signalizaci myokardu dochází také během normálního ontogenetického vývoje [6-9].

V našich studiích jsme se zaměřili na zkoumání G-proteiny řízeného signálního systému adenylylcyklasy (AC) během postnatálního vývoje myokardu a sledovali jsme přitom změny vyvolané nedostatkem nebo nadbytkem thyroideálních hormonů (TH), ale také důsledky chronické hypoxie nebo hypertrofie (kardiomegalie) navozené podvazem aorty. Ví se, že hormony štítné žlázy (thyroxin a trijodthyronin) významně působí na kardiovaskulární systém, neboť mohou měnit počet a afinitu β -adrenergních receptorů v srdci, ale ovlivňují i expresi některých trimérodních G-proteinů [10-12]. Studium modelu chronické hypoxie, společně s blízce příbuzným tzv. preconditioningem, představuje potenciálně velmi významný přístup z hlediska možnosti účinného omezení následků akutního ischemického poškození myokardu [13]. Je poměrně dobře známo, že chronická hypoxie vyvolaná vysokou nadmořskou

výškou vede hypertrofii pravé srdeční komory a ke snížení citlivosti k β -adrenergní stimulaci [14,15]. Doposud však nebyla podrobnějším způsobem analyzována funkce AC signálního systému za těchto okolností a zejména možná reverzibilita změn vyvolaných adaptací na chronickou hypoxii. Dalším významným modelem, který se často uplatňuje při studiu myokardu, je zvýšenou zátěží vyvolaná hypertrofie. Mnohé dřívější výzkumy naznačily, že transmembránové signální systémy řízené trimérodními G-proteiny zřejmě hrají důležitou roli při vývoji hypertrofie, která může vyústit až do srdečního selhání [16-18]. V současné době však není dostatek informací o možných změnách na úrovni G-proteinů a signalizace AC, ke kterým může s velkou pravděpodobností docházet také při abnormálním vývoji srdce během časného postnatálního vývoje. Rozhodli jsme se proto zabývat analýzou AC signálního systému v potkaním myokardu ovlivněném zvýšenou tlakovou zátěží, která byla krátce po narození navozena podvazem aorty.

Některé patofyziologické procesy v mozku mohou souviset se změnami na úrovni transmembránových signálních systémů. K významným změnám této signalizace dochází např. v důsledku Parkinsonovy choroby, ale také alkoholismu nebo jiných drogových závislostí [19-22]. Různé části mozku vykazují významnou heterogenitu v množství různých G-proteinů a jejich exprese se může měnit během ontogenetického vývoje [23-26].

Velmi důležitou roli v modulaci mnoha buněčných procesů probíhajících v CNS hraje transmembránový signální systém adenylcyklasy (AC) a byla zde nalezena mRNA prakticky všech dosud známých isoform AC [27-29]. Distribuce AC je však poměrně různorodá – zatímco některé isoformy (ACII a VII) se vyskytují téměř všude, jiné (ACIII a V) jsou jen v určitých oblastech mozku. Pomocí *in situ* hybridizace a analýzy mRNA (Northern blot) bylo zjištěno, že množství některých isoform AC se během vývoje mozku může

výrazně měnit [30,31]. Exprese AC na proteinové úrovni nebyla však vzhledem k nedostupnosti specifických protilátek a relativně obtížné imunochemické detekovatelnosti dříve příliš sledována.

Jedním z nejvýznamnějších inhibičních neurotransmiterů v CNS je γ -aminomáselná kyselina (GABA), která moduluje nejen funkci ionotropních GABA_A a GABA_C receptorů, ale působí také na metabotropní GABA_B receptory spojené s G_{i/o} proteiny [32-34]. Vzhledem k různým vlastnostem jednotlivých isoformů AC může být podle konkrétní situace aktivita tohoto enzymu prostřednictvím GABA_B receptorů a G_{i/o} proteinů (a G $\beta\gamma$ podjednotek) inhibována nebo naopak zvyšována [35,36]. GABA_B receptory jsou příkladem receptorů, které tvoří funkční heterodimery složené ze dvou odlišných podjednotek (GABA_B-R1 a GABA_B-R2) v poměru 1:1 [33]. Tyto receptory jsou široce zastoupeny v celém CNS, ale vyskytují se i v periferních tkáních [37]. Distribuce GABA_B je odlišná v různých částech mozku a byly zaznamenány poměrně značné rozdíly v expresi těchto receptorů během vývoje [38,39].

Při hormonální stimulaci dochází k postupnému zeslabení buněčné odpovědi na vyvolávající podnět, tedy k desenzitizaci. Již poměrně dlouho se ví, že proces desenzitizace se odehrává především na úrovni receptorů [40,41]. Z novějších výzkumů vyplývá, že při dlouhodobější aktivaci transmembránových signálních kaskád může docházet i k buněčné redistribuci a případně celkovému úbytku (down-regulaci) trimérních G-proteinů, které jsou v příslušném přenosu signálů zapojeny [42]. Studium G-proteinů bylo však v těchto souvislostech dosud věnováno poměrně málo pozornosti, přestože je možné si snadno představit, že např. dlouhodobé podávání některých léků působících na GPCRs by mohlo vést také ke změnám na úrovni příslušných G-proteinů a významným způsobem tak případně ovlivňovat funkci transmembránové signalizace i v širším měřítku.

Na základě několika prací publikovaných počátkem 90. let minulého století se obrátila v posledním desetiletí pozornost mnoha badatelů k tzv. membránovým (mikro)doménám a kaveolám [43-46]. Podle původní definice vycházející z odolnosti těchto útvarů k neiontovým detergentům při nízkých teplotách jsou označovány také jako tzv. detergent-rezistentní membrány (DRM) nebo detergent-insenzitivní membrány (DIM). Membránové domény, nazývané někdy též lipidické rafty, jsou ostrůvkovité útvary o průměru asi 50-300 nm, které se od většinové membránové fáze liší svým lipidovým složením a fyzikálními vlastnostmi [47-49]. Hlavními komponentami membránových domén jsou cholesterol, sfingolipidy a glykolipidy s převážně nasycenými mastnými kyselinami, které dodávají těmto útvarům (tvořícím tzv. fázi uspořádané tekutiny) velkou rigiditu [50]. Kromě specifického lipidového složení je pro membránové domény příznačná i přítomnost určitých typů proteinů, a to zejména GPI-vázaných (ukotvených pomocí glykosyfosfatidyl-inositolu) proteinů [43,47]. Membránové domény či rafty však v buňkách netvoří uniformní populaci, ale jedná se o různorodé útvary s poněkud proměnlivým obsahem konkrétních lipidů a proteinů [51-54]. Velmi známým a často studovaným podtypem membránových domén jsou kaveoly, které byly původně popsány jako vchlípeniny plazmatické membrány lahvovitého tvaru [55], a které se vyznačují přítomností cholesterol vázícího proteinu kaveolinu [56,57]. Předpokládá se, že kromě zapojení v transportu cholesterolu a v endocytóze mohou membránové domény hrát významnou úlohu také v přenosu signálů [58,59]. V membránových doménách byly identifikovány nejrůznější typy signálních molekul, jako např. různé receptory spřažené s tyrosinkinaseovou aktivitou (receptory pro insulin nebo růstové faktory, imonureceptory leukocytů), Ras, tyrosinové Src kinasy, proteinkinasa C, adenylylcyklasa, fosfolipasa D, endoteliální NO-syntasa a některé iontové kanály [7,60-63]. Byly zde nalezeny také některé GPCRs a trimerní G-proteiny [64-68]. Nahromadění mnoha

různých signálních a dalších pomocných molekul v relativně malém prostoru může usnadnit jejich vzájemné kontakty a interakce, což ve svém důsledku umožňuje efektivnější přenos signálu i jeho regulaci. Membránové domény tedy zřejmě mohou sloužit ke kompartmentalizaci a integraci transmembránové signalizace, a proto se někdy v této souvislosti hovoří o tzv. signalozómu [69,70]. Dosud publikované údaje týkající se lokalizace různých signálních molekul v membránových doménách jsou poměrně heterogenní – asociace některých takovýchto molekul s dalšími komponentami domén může být poměrně volná a zřejmě závisí i na jejich funkčním stavu. Mimo jiné bylo zjištěno, že některé receptory jsou v důsledku aktivace do membránových domén vtahovány (např. muskarinový M_2 , bradykininový B_2 , kininový B_1 a angiotensinový receptor typu II), zatímco jiné jsou naopak vylučovány (např. β_2 -adrenergní a adenosinový A_1 receptor) [71-76]. V našich studiích zabývajících se sledováním změn v G-proteinové signalizaci vyvolaných protražovanou hormonální stimulací jsme se proto zaměřili i na zkoumání vztahu jednotlivých komponent těchto signálních systémů (tj. receptorů a G-proteinů) k membránovým doménám.

ZÁKLADNÍ CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tato disertační práce se zabývá studiem různých aspektů transmembránové signalizace řízené triménními G-proteiny v srdečním svalu, v centrálním nervovém systému a při hormonální stimulaci (experimenty *in vitro*).

Specificky jsme v předložených pracích usilovali o dosažení následujících cílů:

- zjistit vliv změněného thyroidálního stavu na expresi β -adrenergních receptorů, G_s a G_i proteinů a subcelulární distribuci vybraných podjednotek triménních G-proteinů během postnatálního vývoje myokardu potkana
- sledovat důsledky chronické hypoxie na vybrané komponenty a funkci signálního systému adenyllycyklasy v myokardu potkana a prozkoumat reverzibilitu předpokládaných změn
- analyzovat změny v signálním systému adenyllycyklasy v souvislosti s kardiomegalií vyvolanou nadměrnou tlakovou zátěží během časného postnatálního vývoje
- provést podrobnou analýzu exprese některých isoform adenyllycyklasy a vybraných podjednotek triménních G-proteinů v průběhu postnatálního vývoje mozku potkana
- sledovat vývoj aktivity adenyllycyklasy a změny v $GABA_B$ -ergním signálním systému v různých částech potkaního mozku během dospívání
- stanovit vysokoafinitní GTPasovou aktivitu v mozkové kůře mladých a dospělých potkanů a sledovat její ovlivnění prostřednictvím baclofenem stimulovaných $GABA_B$ receptorů a také působením vybraných regulátorů G-proteinové signalizace

- na liniích HEK-293 buněk analyzovat komplexním způsobem (pomocí kombinace mikroskopických a biochemických přístupů) průběh agonistou vyvolané internalizace thyreoliberinového (TRH) receptoru a $G_{q/11\alpha}$ proteinu
- zkoumat úlohu membránových domén v přenosu informace prostřednictvím transmembránových signálních systémů řízených triménními G-proteiny
- určit distribuci vybraných receptorů a G-proteinů v membránových doménách a sledovat vliv hormonální stimulace na jejich proteinové složení

METODICKÉ PŘÍSTUPY

Modely

Pro studium různých aspektů G-proteiny řízené transmembránové signalizace v myokardu a ve vybraných oblastech mozku byly použity tkáně získané z bílých laboratorních potkanů kmene Wistar. Převážná většina *in vitro* experimentů byla provedena s použitím stabilně transfektovaných buněk odvozených z mateřské linie HEK-293, jen v některých případech byly využity také buňky S49.

Přehled nejdůležitějších metodických přístupů a technik:

- práce s laboratorními zvířaty – aplikace farmak potkanům (při navození hypo- nebo hyperthyreózy), chirurgické intervence (podvaz aorty → vyvolání zvýšené tlakové zátěže srdce), adaptace potkanů v hypoxických podmínkách, imunizace králíků a myši (příprava protilátek proti vybraným podjednotkám trimérních G-proteinů)
- zjišťování funkčních parametrů srdce použitím Langendorffovy aparatury
- kultivace buněčných kultur, transfekce buněk, aplikace hormonů a různých inhibitorů
- izolace a homogenizace tkání nebo buněk
- frakcionace tkání nebo buněk, různé typy hustotních sacharózových gradientů & ultracentrifugace, izolace membránových domén
- vazebné studie receptorů s použitím selektivních radioligandů
- světelná a konfokální mikroskopie, imunofluorescence
- standardní polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS a 2-D elektroforéza, detekce a kvantifikace podjednotek trimérních G-proteinů, adenylylcyklasy (AC) a různých dalších proteinů pomocí techniky imunoblotu
- stanovení enzymové aktivity AC (měření tvorby cAMP) a určení funkční aktivity $G_s\alpha$ proteinu pomocí rekonstitutivního zjišťování AC aktivity
- stanovení enzymové aktivity fosfolipasy C, Na,K-ATPasy a alkalické fosfatázy
- měřené vysokoafinitní GTPasové aktivity a vazby $GTP\gamma S$

Všechny použité metody jsou podrobně popsány v původních publikacích, které jsou součástí disertační práce.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE

Trimerní G-proteiny a jejich signální systémy v myokardu (*publikace I-IV*)

Při sledování vlivu změněného thyroidálního stavu na β -adrenergní signální systém potkaního myokardu byla navozena hypo- nebo hypertyreóza během prvních 21 dnů po narození a poté byl obnoven normální euthyroidní stav (*publikace I a II*). Na rozdíl od neonatální hypotyreózy, která vedla k velkému poklesu tělesné hmotnosti i hmotnosti srdce (úbytek přes 50%), byla neonatální hypertyreóza spojena s hypertrofií srdečního svalu. Po obnovení euthyroidního stavu v dospělosti byly váhové parametry těchto dvou skupin potkanů podobné, ale významně nižší než u odpovídajících kontrolních zvířat. V srdci mladých hypothyroidních potkanů došlo k výraznému úbytku β -adrenergních receptorů a ke snížení pozitivní inotropní odpovědi na isoproterenol. Podobné výsledky byly již dříve také popsány u mladých i dospělých zvířat, stejně jako nepodstatný vliv hypertyreózy na β -adrenergní receptory a maximální inotropní odpověď na podobném experimentálním modelu [77,78]. Naše práce však významně rozšiřují předchozí poznatky o detailní analýze exprese podjednotek různých G-proteinů a jejich subcelulární distribuce, a také o zhodnocení reverzibility změn v β -adrenergní signalizaci vyvolaných působením abnormálních hladin thyroidálních hormonů (TH) v rané fázi postnatálního vývoje. Zjistili jsme, že vývoj srdečního svalu potkana je doprovázen zvýšenou expresí dlouhé varianty $G_s\alpha$ proteinu ($G_s\alpha$ -L) a současným poklesem obsahu některých $G_{i/o}\alpha$ a $G_{q/11}\alpha$ proteinů, a že významná část (asi 5-60%) těchto proteinů se vyskytuje v cytosolu. Dříve byly popsány pouze solubilní formy $G_s\alpha$ proteinu v prasečím myokardu a v primárních kulturách potkaních kardiocytů [79,80]. Naše pozorování odhalila, že v průběhu

dospívání měl obsah membránově vázaných $G_{i/o}\alpha$ a $G_{q/11}\alpha$ proteinů klesající tendenci, avšak podíl cytosolárních forem těchto G-proteinů spíše narůstal. Zatímco neonatální hypotyreóza vedla k redukci $G_s\alpha$ a k nárůstu $G_{i/o}\alpha$, neonatální hypertyreóza naopak zvýšila množství $G_s\alpha$ a snížila $G_{i/o}\alpha$ v myokardu mladých potkanů. Změny zjištěné v hladinách $G_s\alpha$ a $G_i\alpha$ proteinů v myokardu mladých hypo- a hyperthyroidních potkanů jsou víceméně v souladu s některými výsledky předchozích studií provedených na dospělých zvířatech [12,81] a také s popsáním účinkem TH na expresi G-proteinů v primárních kulturách kardiocytů [82]. Pokud byly u dospělých zvířat obnoveny fyziologické hladiny TH, změny v expresi G-proteinů dříve vyvolané neonatální hypo- nebo hypertyreózou se během dvou měsíců upravily k normálním hodnotám. Původně narušená citlivost k β -adrenergní stimulaci byla rovněž kompenzována po obnovení euthyroidního stavu v dospělosti. Tyto závěry jsou v podstatě ve shodě se souběžně publikovanou prací, jejíž autoři dospěli k závěru, že důsledky změněného thyroidního stavu pro funkci β -adrenergního signálního systému myokardu jsou přechodné a časově závislé [83].

Naše zkoumání vlivu chronické hypoxie na signální systém adenylcyklasy (AC) v myokardu potkana odhalilo především změny na úrovni stimulatorního G_s proteinu (*publikace III*). Dospělí potkani byli vystaveni intermitentní hypoxii 8 h/den odpovídající nadmořské výšce 7000 m po dobu pěti týdnů. Polovina takto adaptovaných pokusných zvířat byla použita pro analýzu vybraných parametrů hned, kdežto druhá polovina byla ještě předtím chována po dobu následujících pěti týdnů v normoxických podmínkách (\rightarrow „hypoxická rekonvalescence“). Výsledky měření byly vždy porovnávány s odpovídajícími skupinami kontrolních zvířat chovaných ve standardních normoxických podmínkách. Zatímco chronická hypoxie jen mírně ovlivnila sledované vlastnosti levé komory, markantní změny byly nalezeny při zkoumání pravé komory. Hmotnost pravé komory vzrostla téměř o 50%, zvýšila

se hodnota vyvinutého tlaku (asi o 65%), ale současně se snížila (asi o 30%) její odpovídavost na stimulaci isoproterenolem (tj. agonistou β -adrenergních receptorů). Váhové a funkční parametry srdce zjištěné v naší práci v podstatě velmi dobře odpovídaly údajům získaným v některých dřívějších studiích [14,84]. Ani po pěti týdnech hypoxické rekonvalescence nebyly sledované parametry pravé komory, na rozdíl od levé, plně normalizovány. Dosud bylo publikováno mnoho rozporných výsledků týkajících se vlivu hypoxie na β -adrenergní receptory v myokardu. Zatímco v některých studiích byl pozorován úbytek β -adrenergních receptorů [85,86], jiné práce žádný významný vliv hypoxie nezjistily nebo byl pozorován mírný nárůst v množství těchto receptorů [87-90]. Nám se nepodařilo prokázat žádné významné změny v expresi β -adrenergních receptorů v důsledku chronické hypoxie. Největší podíl na získání velmi odlišných údajů může mít zejména použití různých modelů hypoxie a dalších specifických experimentálních podmínek. Nejzajímavější výsledky jsme získali při analýze trimerních G-proteinů a signálního systému AC. Chronická hypoxie neovlivnila distribuci $G_i\alpha$ proteinů, ale vedla ke zřetelnému zvýšení obsahu cytosolární formy $G_s\alpha$ proteinu ($G_s\alpha$ -L) v pravé komoře, a toto zvýšení se ještě zvýraznilo po pětítýdenní normoxické rekonvalescenci. Funkční aktivita $G_s\alpha$ v těchto preparátech byla přitom signifikantně nižší (asi o 20-30%) než v odpovídajících kontrolních vzorcích. Aktivita AC byla v důsledku chronické hypoxie podstatně redukována (až o 50%) v obou srdečních komorách, a toto snížení bylo zřetelně patrné ve vzorcích pravé komory i po rekonvalescenci v normoxických podmínkách (aktivita AC v levé komoře se přitom vrátila k normálním hodnotám). Částečně podobné výsledky týkající se exprese G-proteinů a snížení AC aktivity byly dříve získány při studiu myokardu nebo myocytů připravených z hypoxických potkanů [85,89,91-93]. Novým přínosem naší práce je zejména zjištění, že změněná distribuce $G_s\alpha$ proteinu a jeho funkční aktivita, stejně jako narušená funkce AC signálního systému v pravé

komoře vyvolaná chronickou hypoxií, se po pětítýdenní rekonvalescenci v normoxických podmínkách neupraví do zcela normálního stavu, přestože kontraktilní funkce myokardu je normální. Je možné spekulovat, že zhoršena funkce AC signalizace může být aslepoň částečně kompenzována zapojením přidruženého α -adrenergního signálního systému, neboť zvýšená exprese α_1 -adrenergních receptorů byla popsána jako jeden z důsledků chronické hypoxie [94].

Je známo, že na rozdíl od hypertrofického růstu srdce v dospělosti, je kardiomegalie u novorozených zvířat kombinací hyperplasie a hypertrofie myocytů [95]. Přestože na rozdíl od hypertrofie dochází při kardiomegalii k angiogenezi a pracionálnímu vytváření kolagenové sítě, mohou být její důsledky pro funkci srdce negativní [96,97]. Z dřívějších pozorování vyplývá, že zvýšená tlaková zátěž vyvolaná u novorozených potkanů kromě jiných membránových komponent poměrně výrazně ovlivňuje také vývoj β -adrenergních a angiotenzinových receptorů typu II [98,99]. V naší současné práci jsme se u tohoto modelu zaměřili především na analýzu G-proteinů a signálního systému AC (*publikace IV*). Podvaz aorty u 2-denních potkanů postupně vyvolal různý stupeň kardiomegalie a vybrané myokardiální parametry byly pak hodnoceny u 10-denních a 90-denních zvířat. Hmotnost srdce se vlivem nadměrné tlakové zátěže u mladých i dospělých potkanů zvýšila až dvojnásobně oproti odpovídajícím kontrolám a v dospělosti byly zaznamenány příznaky dysfunkce levé komory (silně zvednuté hodnoty systolického i diastolického tlaku, snížená funkční rezerva). Při biochemickém zkoumání preparátů myokardu jsme u žádné z obou věkových skupin potkanů nezjistili výraznější změny v distribuci $G_i\alpha$ a $G_{q/11}\alpha$ proteinů a v expresi AC V, VII a VII, které by souvisely s kardiomegalii. Vlivem nadměrné tlakové zátěže však došlo k výraznému poklesu $G_s\alpha$ -L (asi o 30%) a k současnému vzestupu $G_o\alpha$ proteinů (asi o 70%) v myokardu dospělých zvířat ve srovnání

s příslušnými kontrolami. Snížená exprese $G_s\alpha$ byla předtím také popsána v některých experimentálních modelech hypertrofie srdce u dospělých zvířat [100-102]. Důležitým nálezem naší práce bylo zjištění výrazně snížené (asi o 50%) aktivity AC v myokardu obou věkových skupin potkanů ovlivněných kardiomegalií. Podobný pokles AC aktivity byl pozorován v hypertrofovaném myokardu dospělých psů nebo potkanů [100,103], a tento poznatek je v souladu se zaznamenanou srdeční dysfunkcí.

Studium G-proteiny řízené signalizace v centrálním nervovém systému (*publikace V-IX*)

Pro sledování vývojových změn v signálním systému $GABA_B$ receptorů, trimérních G-proteinů a AC byly použity preparáty mozkové kůry, thalamu a hippocampu z 1- až 90-denních potkanů. Prakticky hned po narození (první postnatální den – PD1) bylo možné detekovat relativně vysoké hladiny všech G-proteinů, ale jejich další vývoj byl individuálně velmi odlišný (*publikace V a VII*). Zatímco množství $G_s\alpha$ -S, $G_i\alpha1$, $G_i\alpha2$ a $G_o\alpha1$ ve všech testovaných částech mozku stoupalo, exprese $G_s\alpha$ -L, $G_o\alpha^*$ a $G\beta$ se téměř neměnila a hladiny $G_i\alpha3$ a $G_{s/11}\alpha$ se postupně snižovaly. Selektivní zvýšení $G_s\alpha$ -S, které bylo dříve pozorováno také v průběhu vývoje myšího a lidského mozku [25,104], podporuje představu o odlišné regulaci a funkci krátké a dlouhé isoformy $G_s\alpha$ proteinu [105]. Kromě toho se nám podařilo zjistit, že velký podíl (asi polovina celkového množství) $G_s\alpha$ se vyskytuje v cytosolární frakci připravené z různých preparátů potkaního mozku, a že poměr $G_s\alpha$ -L/ $G_s\alpha$ -S zde během dospívání velmi výrazně klesá. Nestejnorodé vývojové změny pozorované v expresi $G_i\alpha1$, $G_i\alpha2$ a $G_i\alpha1$ patrně také odrážejí odlišnou úlohu těchto isoform inibičního G_i proteinu v přenosu nervových signálů. Během postnatálního vývoje došlo také

k vzestupu hladin $G_{\alpha 1}$ (především v hippocampu a částečně i v mozkové kůře) a G_{α^*} (hlavně v mozkové kůře a v thalamu). Nestejná regulace exprese různých isoformů G_{α} proteinů může nasvědčovat pro jejich poněkud odlišný způsob uplatnění v transmembránové signalizaci. Obecně lze shrnout, že změny zjištěné v distribuci jednotlivých typů G-proteinů se v principu příliš neodlišovaly v námi sledovaných oblastech mozku. Odlišná regulace exprese různých G-proteinů svědčí pro jejich specifické role v průběhu maturace mozku potkana.

Detailní analýza distribuce trimérních G-proteinů v průběhu ontogeneze potkaního mozku byla doplněna kvantitativním stanovením vybraných isoformů adenylylcyklasy (AC) a měřením enzymové aktivity (*publikace VI*). Zatímco množství AC I se během postnatálního vývoje téměř neměnilo, exprese AC II, IV a VI se v prvních asi třech týdnech po narození zřetelně zvyšovala a poté již k dalším změnám prakticky nedocházelo. Původně nízká enzymová aktivita AC dosáhla výrazného maxima kolem PD12 a pak se opět postupně snížila k hodnotám zjištěným krátce po narození. Analogický ontogenetický profil byl zjištěn při měření bazální AC aktivity a aktivity stimulované AlF_4^- , forskolinem i Mn^{2+} , což nasvědčuje o přímém ovlivnění na úrovni katalytické podjednotky enzymu. Podobné změny v aktivitě AC v dospívajícím potkaním mozku byly popsány i jinými autory [31,106]. Pozorovaný nárůst v aktivitě AC během prvních dvou týdnů po narození je v souladu se zvýšenou expresí některých isoformů AC a $G_{\alpha s}$ proteinu. Následný výrazný pokles AC aktivity však nelze vysvětlit vývojovými změnami v expresi enzymu (prakticky se nemění) ani ve stimulačních (β -adrenergních) nebo inhibičních (GABA_B) receptorových signálních kaskádách ovlivňujících aktivitu AC. Zdá se tedy, že po PD12 zřejmě začíná aktivitu AC ovlivňovat nějaký negativní regulační faktor/mechanismus. Představu o existenci dosud neznámého inhibičního mechanismu, který se může začít uplatňovat teprve v pozdní fázi dospívání, podporují i výsledky

získané na potkaním myokardu – bylo zde nalezeno výrazné maximum AC aktivity okolo PD15 [107,108].

Při zkoumání GABA_B-ergního signálního systému ve vyvíjejícím se potkaním mozku jsme zjistili zřetelné rozdíly v kůře a thalamu při porovnání s hippocampem (*publikace VIII*). Zatímco v membránových preparátech mozkové kůry a thalamu byly naměřeny (vazebnými studiemi s [³H]-baclofenem) poměrně vysoké hladiny GABA_B receptorů už krátce po narození a jejich maximální exprese bylo dosaženo asi během prvních 2-3 týdnů, v hippocampu nebyla zjištěna žádná vazebná místa pro [³H]-baclofen během prvního týdne a teprve okolo PD12 se podařilo zaznamenat určitou velmi nízkou vazbu [³H]-baclofenu, která se udržela do dospělosti. Již dříve byl pozorován podobný vývoj GABA_B receptorů v mozkové kůře [38]. Poněkud rozporné výsledky různých prací týkajících se distribuce GABA_B receptorů v hippocampu mladých a dospělých potkanů svědčí o existenci farmakologicky odlišných populací těchto receptorů, které zřejmě vykazují různou vazebnou kapacitu vůči různým GABA_B ligandům [109,110]. Zkoumané oblasti mozku se lišily i ve způsobu regulace AC aktivity agonistou GABA_B receptorů baclofenem. Modulační vliv baclofenu se projevil až na vzorcích mozkové tkáně odebrané z 12-denních a starších potkanů. Aktivita AC stimulovaná GTP v mozkové kůře a v thalamu byla působením baclofenu signifikantně snížena, ale v hippocampu naopak převážil stimulační účinek baclofenu. Tyto výsledky jsou v souladu s některými dřívějšími publikovanými údaji, které naznačují, že GABA_B receptory mohou aktivitu AC v některých případech inhibovat prostřednictvím G_{i/o} proteinů [35,111] a za jiných okolností stimulovat prostřednictvím Gβγ podjednotek [36,112].

V následující studii jsme se zaměřili především na porovnání funkční aktivity trimérních G-proteinů při stimulaci GABA_B-ergního signálního systému v membránových preparátech mozkové kůry 12-denních a 90-denních potkanů

(*publikace IX*). V obou typech testovaných vzorků nebyl nalezen žádný významný rozdíl v počtu a afinitě GABA_B receptorů, ale bazální i baclofenem stimulovaná vysokoafinitní GTPasová aktivita byla podstatně vyšší (asi o 50%) u dospělých než u mladých zvířat. Již dříve bylo ukázáno, že vzestup GTPasové aktivity vyvolaný baclofenem přímo odráží funkční aktivaci trimérních G-proteinů spojených s GABA_B receptory [113]. V našem případě byl u obou typů testovaných membrán naměřen zhruba stejně velký přírůstek GTPasové aktivity po stimulaci baclofenem, což naznačuje, že signalizace zprostředkovaná GABA_B receptory v mozkové kůře 12-denních potkanů je již plně funkční. Velmi podobné výsledky jsme získali paralelním stanovením vazby GTP γ S. Údaje zjištěné v některých předchozích studiích také ukázaly, že v mozku potkana mezi 12 a 90 dnem věku prakticky nedochází k výraznějším změnám v množství GABA_B receptorů [38,114]. Existuje několik prací zabývajících se zjišťováním vysokoafinitní GTPasové aktivity stimulované různými agonisty v různých částech mozku, žádná z nich se však nevěnovala zkoumání baclofenem stimulované GTPasové aktivity v mozkové kůře během vývoje [115-117]. Výsledky našich pozorování (zejména výrazný nárůst bazální GTPasové aktivity v dospělosti) mohou být celkem dobře vysvětleny zvýšenou expresí G_{i/o} proteinů, která byla zjištěna v mozkové kůře dospělých potkanů (*publikace V*). Naše doplňující experimenty s použitím vybraných regulátorů G-proteinové signalizace (RGS1 a RGS16) ukázaly, že tyto bílkoviny mohou za určitých okolností zřetelným způsobem ovlivňovat (zvyšovat) vysokoafinitní GTPasovou aktivitu ve zkoumaných preparátech mozkové kůry, přičemž RGS1 se projevil jako výrazně silnější regulátor než RGS16. Toto zjištění je ve shodě s dříve pozorovanou nestejnou kapacitou těchto dvou RGS proteinů při regulaci agonisty stimulované GTPasové aktivity fúzních bílkovin zkonstruovaných spojením α_{2A} -adrenergických receptorů a G_o-proteinů, které byly exprimovány v COS-7 buňkách [118].

Změny v subcelulární distribuci receptorů a G-proteinů vyvolané hormonální stimulací (*publikace X-XV*)

Pro studium internalizace GPCRs a G-proteinů jsme použili stabilně transfektované HEK-293 (human embryonal kidney) buňky, které exprimovaly vysoké hladiny thyreoliberinového (TRH) receptoru a současně také $G_{11\alpha}$ proteinu (\rightarrow buněčná linie E2M11), nebo fúzní konstrukt TRH receptoru s GFP (green fluorescent protein) (\rightarrow buněčná linie VTGP). V obou případech jsme podrobně sledovali časový průběh změn vyvolaných působením hormonu thyreoliberinu (TRH) v subcelulární distribuci TRH receptorů a $G_{q/11\alpha}$ proteinů (*publikace X a XI*). Lokalizaci receptorů a G-proteinů jsme monitorovali pomocí autofluorescence a nepřímé imunofluorescence (s použitím konfokální mikroskopie) přímo v nativních nebo fixovaných buňkách, ale také pomocí vazebných radioligandových studií nebo imunochemické detekce v buněčných frakcích (po jejich separaci na hustotním sacharózovém gradientu). Zjistili jsme, že po přidání hormonu dochází k velmi rychlé internalizaci TRH receptorů – zřetelný úbytek receptorů v plazmatické membráně byl patrný už po několika prvních minutách. Naproti tomu ani během hodiny nedošlo k žádným markantnějším změnám v buněčné distribuci $G_{q/11\alpha}$, mohli jsme však pozorovat určité shlukování imunofluorescenčního signálu těchto G-proteinů do nespojitých struktur v rámci plazmatické membrány. Částečná translokace $G_{q/11\alpha}$ proteinů z plazmatické membrány do nitra buněk (do frakce lehkých vesikul a do cytosolu) byla detekovatelná teprve po 2-4 hodinách působení TRH a po 16 hodinách bylo možné zaznamenat zřetelný úbytek celkového množství $G_{q/11\alpha}$ (tj. down-regulaci). Pomocí aplikace selektivních inhibitorů organizace aktinových mikrofilamentů (cytochalasin D) a mikrotubulů (nocodazol) jsme zjistili, že obě tyto cytoskeletární struktury mají velký význam pro internalizaci $G_{q/11\alpha}$, a že pro normální průběh subcelulární redistribuce TRH

receptorů je důležitá nenarušená síť mikrotubulů. Naše výsledky jsou v souladu s některými pracemi ukazujícími, že při stimulaci dochází k poměrně rychlé internalizaci TRH receptorů, podobně jako je tomu u většiny ostatních GPCRs [119-121]. Určité změny v buněčné distribuci některých trimérních G-proteinů ($G_s\alpha$ a $G_i\alpha$) vyvolané stimulací některých příslušných receptorů byly už dříve pozorovány [122-124]. V poměrně nedávné době byla také objevena důležitost intaktního cytoskeletu pro down-regulaci a recyklaci muskarinových a PTH receptorů [125-127], a jsou popisovány i interakce cytoskeletu s trimérními G-proteiny [128-130]. Naše výzkumy v této oblasti poskytují první přímý popis dynamiky agonistou vyvolané subcelulární redistribuce $G_{q/11}\alpha$ proteinů, která probíhá ve zcela odlišné časové škále než internalizace TRH receptorů.

V následujících studiích jsme se zaměřili především na zkoumání lokalizace vybraných GPCRs a trimérních G-proteinů v membránových doménách, na stanovení účinnosti přenosu signálu v těchto membránových útvarech a na analýzu možných změn vyvolaných hormonální stimulací. Důsledky dlouhodobého působení TRH na lokalizaci $G_{q/11}\alpha$ proteinu jsme pozorovali v membránových doménách E2M11 buněk (*publikace XII*). Kromě toho jsme sledovali vliv iloprostu (IP) na prostacyklinový receptor a $G_s\alpha$ protein v HEK-293 buňkách exprimujících tento receptor (\rightarrow buněčná linie FhIPR), nebo také fúzní konstrukt tohoto receptoru s $G_s\alpha$ proteinem (\rightarrow buněčná linie FhIPR- $G_s\alpha$) (*publikace XIII*). Zjistili jsme, že v detergent (Triton X-100) rezistentních membránových doménách E2M11 buněk v klidovém stavu je obsažena jen asi třetina z celkového buněčného množství $G_{q/11}\alpha$ proteinu. Dvouhodinová aplikace TRH však vyvolala zřetelnou redistribuci $G_{q/11}\alpha$ – asi polovina původního množství tohoto G-proteinu asociovaného s detergent rezistentními membránovými doménami se přesunula do oblasti většinové membránové fáze solubilizovatelné detergentem. Kaveolární lokalizace $G_{q/11}\alpha$

byla nalezena i v jiných typech buněk a tkání [66,131,132] a bylo pozorováno přechodné zvýšení obsahu tohoto G-proteinu v kaveolách vyvolané krátkodobým působením bradykininu [71]. Při následující analýze FhIPR a FhIPR- $G_s\alpha$ buněk jsme určili, že v membránových doménách těchto buněk se vyskytuje pouze minimální podíl prostacyklinových receptorů (< 3% z celkového množství) a asi 40% $G_s\alpha$ proteinu. Podobnou distribuci jsme pozorovali také u TRH receptorů a $G_{q/11}\alpha$ proteinu [133]. Současně jsme zjistili, že dvouhodinové působení IP výrazně neovlivnilo distribuci prostacyklinových receptorů, ale vedlo k dramatickému úbytku $G_s\alpha$ (asi o 70%) v membránových doménách. Údaje předchozích prací zabývajících se rolí membránových domén při přenosu hormonálního signálu jsou velmi nesourodé. V některých případech byl pozorován přírůstek, ale jindy naopak úbytek některých GPCRs nebo trimérních G-proteinů v membránových doménách jakožto důsledek krátkodobějšího působení hormonů [73-75,134,135]. Na základě našich současných výsledků je možno usuzovat, že změny v asociaci zkoumaných G-proteinů s membránovými doménami vyvolané dlouhodobějším působením agonistů mohou hrát významnou roli při desenzitizaci hormonálního působení na úrovni G-proteinů.

Pro analýzu účinnosti přenosu signálu prostřednictvím GPCRs a trimérních G-proteinů v membránových doménách jsme použili stabilně transfektované HEK-293 buňky, které exprimovaly fúzní konstrukt δ -opiátového receptoru s $G_{i1}\alpha$ proteinem (\rightarrow buněčná linie DOR-Gi) (*publikace XIV*). Zjistili jsme, že klasický způsob izolace membránových mikrodomén s použitím Tritonu X-100 není vhodný pro získání materiálu, který by byl použitelný pro naše účely, neboť detergentová extrakce nejen že zabránila provedení vazebných studií receptorů, ale také zcela potlačila adenylylcyklasovou i GTPasovou aktivitu. Rozhodli jsme se proto aplikovat alkalickou metodu založenou na extrakci vzorků v 0.5 M NaHCO_3 (pH 11), která se používá pro

získání tzv. bezdetergentových membránových domén [136]. Kromě toho jsme také zkusili provést intenzivní homogenizaci výchozího buněčného materiálu a takto připravené membránové fragmenty separovat pomocí následné flotace v hustotním sacharózovém gradientu, stejně jako při standardním způsobu izolace membránových domén. Následnou analýzou jsme zjistili, že pomocí alkalické i homogenizační metody se nám podařilo izolovat membránové fragmenty s nízkou vznášivou hustotou, které byly lokalizovány v gradientových frakcích s velkým podílem kaveolinu. Výhodou těchto přístupů bylo získání preparátů membránových domén se zachovanou funkční aktivitou klíčových molekul účastnících se G-proteiny řízeného přenosu signálů. Podařilo se nám zjistit, že agonistou stimulovaná GTPasová aktivita dosahuje mnohem vyšších (asi dvojnásobných) maximálních hodnot v membránových doménách v porovnání s většinovou membránovou fází, a to i přesto, že je zde přítomen pouze asi jen poloviční počet δ -opiátových receptorů. Tento výsledek naznačuje, že je účinnost přenosu signálu mezi δ -opiátovými receptory a $G_i\alpha$ proteiny je mnohem vyšší v membránových doménách než ve většinové fázi plazmatické membrány. Na vysokou účinnost přenosu signálu v membránových doménách poukázaly studie sledující různými receptory ovlivňovanou aktivitu adenylcyklyasy v neonatálních kardiocytech overexprimujících AC VI, která byla přednostně lokalizována v kaveolách [137,138]. V souladu s těmito pozorováními jsou i závěry naší dřívější práce ukazující vyšší funkční aktivitu $G_s\alpha$ proteinu v membránových fragmentech s nízkou vznášivou hustotou (\rightarrow lehké vesikuly), které byly získány frakcionací homogenizovaného materiálu S49 buněk v sedimentačním sacharózovém gradientu [139]. Na základě výsledků těchto výzkumů lze soudit, že dlouho předpokládaná, ale dříve jen obtížně postižitelná kompartmentalizace membránové signalizace, opravdu existuje a má v přenosu informace přes plazmatickou membránu podstatný význam. Potvrzují se tak současně úvahy o tom, že původní model receptorové

signalizace [140] založený na volné distribuci signálních molekul a jejich náhodných srážkách („collision coupling“) v tekuté lipidové dvouvrstvě plazmatické membráně dostatečně nepostihuje ve skutečnosti mnohem komplexnější uspořádání a interakce jednotlivých komponent G-proteiny řízených signálních systémů [141,142].

Vzhledem k možným změnám v souvislosti s dlouhodobou hormonální stimulací buněk bylo pro nás zajímavé sledovat, do jaké míry může být toto působení spojeno se změnami ve složení membránových domén (*publikace XV*). V takto zaměřené studii jsme pomocí 2-D elektroforézy analyzovali zastoupení majoritních bílkovin v membránových doménách odvozených z buněčných linií E2M11 a S49. Kromě klasických detergent rezistentní membránových domén jsme vyizolovali také fragmenty s nízkou vznášivou hustotou pomocí alkalické a homogenizační metody. S použitím imunochemické detekce jsme zjistili, že dlouhodobé působení agonistů TRH (E2M11 buňky) nebo isoproterenolu (S49 buňky) vyvolalo výraznou redistribuci a úbytek celkového množství příslušných G-proteinů ($G_{q/11\alpha}$ nebo $G_s\alpha$), současně však nebyly zaznamenány žádné změny v množství a distribuci $G_i\alpha$ proteinu ani kaveolinu a dalších markerů membránových domén. Vyhodnocení 2-D elektroforetogramů ukázalo, že proteinové složení membránových domén může být částečně odlišné v závislosti na způsobu jejich přípravy. Důležitým závěrem získaným při analýze obou testovaných buněčných linií velmi odlišného typu a původu bylo zjištění, že je zde obsaženo asi 150-170 majoritních proteinů, jejichž množství není ovlivněno dlouhodobou hormonální stimulací. Stejně výsledky (selektivní úbytek příslušných G-proteinů vyvolaný působením agonistů), které byly získány při použití různých metod přípravy membránových domén, podporují názor, že membránové domény jsou reálně existujícími strukturami v plazmatické membráně, a nikoli pouze artefaktem vzniklým při detergentové izolaci.

ZÁVĚRY

Naše práce zabývající se sledováním trimérních G-proteinů v průběhu postnatálního vývoje srdečního svalu potkana odhalily výrazné změny v expresi a buněčné lokalizaci těchto regulačních proteinů. Dochází zejména ke značnému nárůstu dominantní dlouhé varianty $G_s\alpha$ proteinu ($G_s\alpha$ -L), k poklesu hladin některých $G_{i/o}\alpha$ a $G_{i/o}\alpha$ proteinů, a zároveň se mění i poměry mezi obsahem membránově vázaných a cytosolárních forem G-proteinů.

Při zkoumání vlivu thyroideálních hormonů (TH) na β -adrenergní signální systém potkaního myokardu bylo zjištěno, že časný postnatální vývoj tohoto signálního systému je významným způsobem kontrolován TH. Fyziologická hladina TH je nezbytná pro řádnou expresi G-proteinů, β -adrenergních receptorů a pro normální vývoj β -adrenergní odpovědi. Změny v myokardu vyvolané hypo- nebo hypertyreózou v ranných stádiích vývoje mohou být v dospělosti kompenzovány, pokud se hladiny TH navrátí k normální úrovni.

Zjistili jsme, že v důsledku chronické hypoxie dochází u dospělých potkanů k hypertrofii zejména pravé komory srdeční, která je doprovázena výrazně narušenou funkcí adenylylcyklované (AC) signalizace. Tyto účinky chronické hypoxie jsou dlouhodobého charakteru, neboť menší citlivost AC signálního systému k β -adrenergní stimulaci a snížená funkční aktivita $G_s\alpha$ proteinu se neupraví ani po pětítýdenní rekonvalescenci zvířat v normoxických podmínkách.

Nadměrná tlaková zátěž navozená podvazem aorty u novorozených potkanů vede ke kardiomegalii s příznaky dysfunkce myokardu v dospělém věku. Na úrovni transmembránové signalizace řízené G-proteiny je tento patologický vývoj manifestován sníženou expresí myokardiálního $G_s\alpha$ -L, zvýšenou expresí $G_o\alpha$ a zřetelným poklesem AC aktivity.

V průběhu postnatálního vývoje mozku potkana jsme zjistili velké změny v celkovém množství i relativních poměrech různých trimérních G-proteinů. Zatímco dochází k poměrně dramatickému nárůstu $G_s\alpha$ -S, obsah $G_s\alpha$ -L se prakticky nemění. Množství $G_i\alpha$, $G_s\alpha/G_{11}\alpha$ a $G\beta$ se buď nemění nebo klesá. Rozdíly v ontogenetických profilech exprese trimérních G-proteinů naznačují, že tyto regulační bílkoviny plní svou specifickou funkci nejen v závislosti na typu nervové tkáně (mozková kůra, thalamus, hypokampus), ale také na časově proměnných nárocích spojených s vývojem.

Postnatální vývoj potkaního mozku je spojen s výraznými změnami ve fungování AC signalizace. Poměrně nízká enzymová aktivita různým způsobem stimulované AC se zvyšuje ke svému maximu kolem 12. dne po narození a poté opět postupně klesá k normálním hodnotám v dospělosti. V pozdějších fázích dospívání se zejména začíná uplatňovat dosud neznámý inhibiční mechanismus potlačující aktivitu AC, neboť toto výrazné snížení není přímo vysvětlitelné pomocí kvantitativních změn v jednotlivých základních komponentách AC signálního systému.

Naše zkoumání $GABA_B$ -ergní signalizace odhalilo podstatné rozdíly mezi vybranými oblastmi vyvíjejícího se potkaního mozku. Na rozdíl od hippocampu jsou v mozkové kůře a v thalamu už krátce po narození přítomny poměrně vysoké hladiny $GABA_B$ receptorů a stimulace těchto receptorů agonistou baclofenem zde má inhibující účinek na aktivitu AC. V hippocampu se naopak může projevit stimulační vliv tohoto agonisty na aktivitu AC.

Měření vysokoafinity GTPasové aktivity a pomocí vazby $GTP\gamma S$ v membránových preparátech mozkové kůry jsme zjistili, že bazální i agonistou stimulovaná aktivita trimérních G-proteinů je podstatně vyšší u 90-denních než u 12-denních potkanů. Tento vzestup GTPasové aktivity v dospělosti lze považovat za celkem přirozený důsledek zvýšené exprese $G_{i/o}\alpha$ proteinů. Stimulace $GABA_B$ receptorů agonistou baclofenem vyvolala podobný přírůstek GTPasové aktivity v obou věkových skupinách, což nasvědčuje o plné funkčnosti $GABA_B$ -ergní signalizace u mladých zvířat.

Komplexní analýzou subcelulární lokalizace thyreoliberinových (TRH) receptorů a $G_{11\alpha}$ proteinu exprimovaných v HEK-293 buňkách jsme zjistili, že působením agonisty dochází během několika minut k rychlé internalizaci TRH receptorů, která je po 2-4 hodinách následována výrazně pomalejší redistribucí $G_{q/11\alpha}$ proteinů. Současně jsme také ukázali, že internalizace G-proteinů je silně závislá na fungující struktuře cytoskeletonu.

Z našich výzkumů zaměřených na vztahy mezi G-proteiny řízenou signalizací a membránovými doménami vyplynulo, že tyto útvary plazmatické membrány obsahují poměrně velké množství trimérních G-proteinů (asi 30-40%). Při zkoumání transfektovaných HEK-293 buněk exprimujících TRH nebo prostacyklinové receptory jsme zjistili, že pouze nepatrný podíl (< 3%) těchto receptorů (na rozdíl od některých jiných GPCRs) je lokalizován v membránových doménách, a že dlouhodobá stimulace agonisty vede k zřetelnému selektivnímu přesunu příslušných $G_{q/11\alpha}$ nebo $G_s\alpha$ proteinů z membránových domén do většinové fáze plazmatické membrány.

Porovnáním maximálních hodnot agonistou stimulované GTPasové aktivity jsme zjistili, že účinnost přenosu signálu v membránových doménách izolovaných z HEK-293 buněk exprimujících fúzní konstrukt δ -opiátového receptoru s $G_i1\alpha$ proteinem je výrazně vyšší než v ostatní většinové fázi plazmatické membrány. Tento poznatek jednoznačně podporuje představu o důležitosti membránových domén v přenosu signálu.

Pomocí 2-D elektroforetické analýzy se nám podařilo detekovat asi 150-170 majoritních proteinů v membránových doménách odvozených z HEK-293 nebo S49 buněk. Zjistili jsme, že proteinové složení membránových domén se částečně liší v závislosti na způsobu jejich přípravy, ale není ovlivněno dlouhodobým působením hormonů, které vede pouze k selektivní down-regulaci příslušných G-proteinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Post, S. R., Hammond, H. K., and Insel, P. A. (1999) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 343-360
2. Vatner, D. E., Asai, K., Iwase, M., Ishikawa, Y., Shannon, R. P., Homcy, C. J., and Vatner, S. F. (1999) *Am. J. Cardiol.* **83**: 80H-85H
3. Zolk, O., Kouchi, I., Schnabel, P., and Bohm, M. (2000) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**: 187-198
4. Port, J. D., and Bristow, M. R. (2001) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: 887-905
5. Lohse, M. J., Engelhardt, S., and Eschenhagen, T. (2003) *Circ. Res.* **93**: 896-906
6. Artman, M., Kithas, P. A., Wike, J. S., and Strada, S. J. (1988) *Am. J. Physiol.* **255**: H335-342
7. Cros, G. H., Chanez, P. O., Michel, A., Boucard, M., and Serrano, J. J. (1988) *Life Sci.* **43**: 699-706
8. Kojima, M., Ishima, T., Taniguchi, N., Kimura, K., Sada, H., and Sperelakis, N. (1990) *Br. J. Pharmacol.* **99**: 334-339
9. Schiffmann, H., Flesch, M., Hauseler, C., Pfahlberg, A., Bohm, M., and Hellige, G. (2002) *Basic Res. Cardiol.* **97**: 76-87
10. Williams, L. T., Lefkowitz, R. J., Watanabe, A. M., Hathaway, D. R., and Besch, H. R., Jr. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**: 2787-2789
11. Bilezikian, J. P., and Loeb, J. N. (1983) *Endocr. Rev.* **4**: 378-388
12. Levine, M. A., Feldman, A. M., Robishaw, J. D., Ladenson, P. W., Ahn, T. G., Moroney, J. F., and Smallwood, P. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 3553-3560
13. Kolar, F. (1996) *In: Myocardial Preconditioning, edited by C.L. Wainwright and J.R. Parratt. Austin: Landes: 261-275*
14. Kolar, F., and Ostadal, B. (1991) *Pflugers Arch.* **419**: 121-126
15. Maher, J. T., Manchanda, S. C., Cymerman, A., Wolfe, D. L., and Hartley, L. H. (1975) *Am. J. Physiol.* **228**: 477-481
16. Nieto, J. L., Diaz-Laviada, I., Guillen, A., Garcia-Barreno, P., and Haro, A. (1993) *Cell Signal.* **5**: 169-179
17. Flesch, M., Erdmann, E., and Bohm, M. (1996) *J. Card. Fail.* **2**: S35-43
18. Bohm, M., Flesch, M., and Schnabel, P. (1996) *Basic Res. Cardiol.* **91**: 47-51
19. Chase, T. N., Oh, J. D., and Blanchet, P. J. (1998) *Neurology* **51**: S30-35
20. Pandey, S. C. (1998) *Mol. Neurobiol.* **17**: 1-15
21. Tso, P. H., and Wong, Y. H. (2003) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**: 307-316
22. Kelley, A. E., and Schiltz, C. A. (2004) *Neuron* **42**: 181-183
23. Milligan, G., Streaty, R. A., Gierschik, P., Spiegel, A. M., and Klee, W. A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 8626-8630
24. Kitamura, Y., Mochii, M., Kodama, R., Agata, K., Watanabe, K., Eguchi, G., and Nomura, Y. (1989) *J. Neurochem.* **53**: 249-257
25. Young, L. T., Warsh, J. J., Li, P. P., Siu, K. P., Becker, L., Gilbert, J., Hornykiewicz, O., and Kish, S. J. (1991) *Dev. Brain Res.* **61**: 243-248
26. Morishita, R., Shinohara, H., Ueda, H., Kato, K., and Asano, T. (1999) *J. Neurochem.* **73**: 2369-2374

27. Mons, N., and Cooper, D. M. (1995) *Trends Neurosci.* **18**: 536-542
28. Simonds, W. F. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 66-73
29. Chern, Y. (2000) *Cell Signal.* **12**: 195-204
30. Villacres, E. C., Wu, Z., Hua, W., Nielsen, M. D., Watters, J. J., Yan, C., Beavo, J., and Storm, D. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 14352-14357
31. Matsuoka, I., Suzuki, Y., Defer, N., Nakanishi, H., and Hanoune, J. (1997) *J. Neurochem.* **68**: 498-506
32. Kerr, D. I., and Ong, J. (1995) *Pharmacol. Ther.* **67**: 187-246
33. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., and Bettler, B. (1998) *Nature* **396**: 683-687
34. Chebib, M., and Johnston, G. A. (1999) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**: 937-940
35. Nishikawa, M., Hirouchi, M., and Kuriyama, K. (1997) *Neurochem. Int* **31**: 21-25
36. Olanas, M. C., and Onali, P. (1999) *Br. J. Pharmacol.* **126**: 657-664
37. Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., and Hayasaki, H. (2002) *Int. Rev. Cytol.* **213**: 1-47
38. Turgeon, S. M., and Albin, R. L. (1994) *Neuroscience* **62**: 601-613
39. Malitschek, B., Ruegg, D., Heid, J., Kaupmann, K., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., and Kuhn, R. (1998) *Mol. Cell. Neurosci.* **12**: 56-64
40. Lohse, M. J. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1179**: 171-188
41. Freedman, N. J., and Lefkowitz, R. J. (1996) *Recent Prog. Horm. Res.* **51**: 319-351
42. Svoboda, P., and Novotny, J. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 501-512
43. Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**: 533-544
44. Anderson, R. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10909-10913
45. Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Tang, Z., and Sargiacomo, M. (1994) *Trends Cell Biol.* **4**: 231-235
46. Parton, R. G., and Simons, K. (1995) *Science* **269**: 1398-1399
47. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**: 569-572
48. Brown, D. A., and London, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 17221-17224
49. Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 31-39
50. London, E., and Brown, D. A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1508**: 182-195
51. Wang, J., Gunning, W., Kelley, K. M., and Ratnam, M. (2002) *J. Membr. Biol.* **189**: 35-43
52. Kenworthy, A. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**: 435-437
53. Pike, L. J. (2003) *J. Lipid Res.* **44**: 655-667
54. Pike, L. J. (2004) *Biochem. J.* **378**: 281-292
55. Palade, G. E. (1953) *J. Appl. Physiol.* **24**: 1424-1436
56. Anderson, R. G. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 199-225
57. Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001) *Exp. Cell. Res.* **271**: 36-44
58. Stahlhut, M., Sandvig, K., and van Deurs, B. (2000) *Exp. Cell. Res.* **261**: 111-118
59. Hoessli, D. C., Ilangumaran, S., Soltermann, A., Robinson, P. J., Borisch, B., and Nasir Ud, D. (2000) *Glycoconj. J.* **17**: 191-197
60. Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., and Scherer, P. E. (1999) *Methods Mol. Biol.* **116**: 51-60

61. Horejsi, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., and Stockinger, H. (1999) *Immunol. Today* **20**: 356-361
62. Kim, J. H., Han, J. M., Lee, S., Kim, Y., Lee, T. G., Park, J. B., Lee, S. D., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (1999) *Biochemistry* **38**: 3763-3769
63. Feron, O., and Kelly, R. A. (2002) *Circ. Res.* **90**: 369-370
64. Rybin, V. O., Xu, X., and Steinberg, S. F. (1999) *Circ. Res.* **84**: 980-988
65. Moffett, S., Brown, D. A., and Linder, M. E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 2191-2198
66. Oh, P., and Schnitzer, J. E. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**: 685-698
67. Chini, B., and Parenti, M. (2004) *J. Mol. Endocrinol.* **32**: 325-338
68. Steinberg, S. F. (2004) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**: 407-415
69. Werlen, G., and Palmer, E. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 299-305
70. He, H. T., Lellouch, A., and Marguet, D. (2005) *Semin Immunol.* **17**: 23-33
71. de Weerd, W. F., and Leeb-Lundberg, L. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 17858-17866
72. Ishizaka, N., Griendling, K. K., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1998) *Hypertension* **32**: 459-466
73. Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D. R., and Marceau, F. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**: 546-553
74. Feron, O., Smith, T. W., Michel, T., and Kelly, R. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 17744-17748
75. Lasley, R. D., Narayan, P., Uittenbogaard, A., and Smart, E. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 4417-4421
76. Rybin, V. O., Xu, X., Lisanti, M. P., and Steinberg, S. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 41447-41457
77. Dowell, R. T., Atkins, F. L., and Love, S. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**: H2527-2534
78. Wibo, M., Kilar, F., Zheng, L., and Godfraind, T. (1995) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 1731-1743
79. Roth, D. A., Urasawa, K., Leiber, D., Insel, P. A., and Hammond, H. K. (1992) *FEBS Lett.* **296**: 46-50
80. Novotny, J., Gustafson, B., Kvapil, P., and Ransnas, L. A. (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34**: 993-1001
81. Michel-Reher, M. B., Gross, G., Jasper, J. R., Bernstein, D., Olbricht, T., Brodde, O. E., and Michel, M. C. (1993) *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1417-1423
82. Bahouth, S. W. (1995) *Biochem. J.* **307**: 831-841
83. Zwaveling, J., Batink, H. D., Taguchi, K., de Jong, J., Michel, M. C., Pfaffendorf, M., and van Zwieten, A. (1998) *J. Auton. Pharmacol.* **18**: 1-11
84. Pelouch, V., Kolar, F., Ost'adal, B., Milerova, M., Cihak, R., and Widimsky, J. (1997) *Cardiovasc. Drugs Ther.* **11**: 177-185
85. Voelkel, N. F., Hegstrand, L., Reeves, J. T., McMurty, I. F., and Molinoff, P. B. (1981) *J. Appl. Physiol.* **50**: 363-366
86. Mardon, K., Merlet, P., Syrota, A., and Maziere, B. (1998) *J. Appl. Physiol.* **85**: 890-897
87. Marsh, J. D., and Sweeney, K. A. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**: H275-281
88. Rocha-Singh, K. J., Honbo, N. Y., and Karliner, J. S. (1991) *J. Clin. Invest.* **88**: 204-213

89. Kacimi, R., Richalet, J. P., Corsin, A., Abousahl, I., and Crozatier, B. (1992) *J. Appl. Physiol.* **73**: 1377-1382
90. Li, H. T., Honbo, N. Y., and Karliner, J. S. (1996) *Circulation* **94**: 3303-3310
91. Kacimi, R., Moalic, J. M., Aldashev, A., Vatner, D. E., Richalet, J. P., and Crozatier, B. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**: H1865-1873
92. Pei, J. M., Yu, X. C., Fung, M. L., Zhou, J. J., Cheung, C. S., Wong, N. S., Leung, M. P., and Wong, T. M. (2000) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **279**: C1455-1463
93. Hynie, S., Sida, P., Klenerova, V., Asemu, G., and Ost'adal, B. (2003) *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **23**: 53-67
94. Leon-Velarde, F., Bourin, M. C., Germack, R., Mohammadi, K., Crozatier, B., and Richalet, J. P. (2001) *Am. J. Physiol.* **280**: R274-281
95. Rakusan, K., and Korecky, B. (1985) *Can J Cardiol* **1**: 217-222
96. Rakusan, K. a. H., M.I. (1997) *In: The Developing Heart, edited by B. Ostadal. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 63-67*
97. Kolar, F., Papousek, F., Pelouch, V., Ostadal, B., and Rakusan, K. (1998) *Pediatr. Res.* **43**: 521-526
98. Zheng, L., Wibo, M., Kolar, F., and Godfraind, T. (1996) *Mol. Cell. Biochem.* **163-164**: 23-29
99. Oliviero, P., Chassagne, C., Kolar, F., Adamy, C., Marotte, F., Samuel, J. L., Rappaport, L., and Ostadal, B. (2000) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 1631-1645
100. Chen, L. A., Vatner, D. E., Vatner, S. F., Hittinger, L., and Homcy, C. J. (1991) *J. Clin. Invest.* **87**: 293-298
101. Hammond, H. K., Roth, D. A., Insel, P. A., Ford, C. E., White, F. C., Maisel, A. S., Ziegler, M. G., and Bloor, C. M. (1992) *Circulation* **85**: 269-280
102. Di Fusco, F., Hashim, S., and Anand-Srivastava, M. B. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**: C990-998
103. Holmer, S. R., Bruckschlegel, G., Schunkert, H., Rataj, D. B., Kromer, E. P., and Riegger, G. A. (1996) *Cardiovasc. Res.* **31**: 719-728
104. Rius, R. A., Streaty, R. A., Peng Loh, Y., and Klee, W. A. (1991) *FEBS Lett.* **288**: 51-54
105. Novotny, J., and Svoboda, P. (1998) *J. Mol. Endocrinol.* **20**: 163-173
106. Keshles, O., and Levitzki, A. (1984) *Biochem. Pharmacol.* **33**: 3231-3233
107. Kumar, R., Joyner, R. W., Hartzell, H. C., Ellingsen, D., Rishi, F., Eaton, D. C., Lu, C., and Akita, T. (1994) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**: 1537-1550
108. Giannuzzi, C. E., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1995) *Brain Res.* **694**: 271-278
109. Garant, D. S., Xu, S. G., Sperber, E. F., and Moshe, S. L. (1995) *Epilepsia* **36**: 960-965
110. Cunningham, M. D., and Enna, S. J. (1996) *Brain Res.* **720**: 220-224
111. Wojcik, W. J., and Neff, N. H. (1984) *Mol. Pharmacol.* **25**: 24-28
112. Karbon, E. W., and Enna, S. J. (1985) *Mol. Pharmacol.* **27**: 53-59
113. Odagaki, Y., Nishi, N., Ozawa, H., Saito, T., Takahata, N., Riederer, P., and Koyama, T. (1998) *Brain Res.* **789**: 84-91
114. Princivalle, A., Regondi, M. C., Frassoni, C., Bowery, N. G., and Spreafico, R. (2000) *Brain Res. Bull.* **52**: 397-405
115. Sweeney, M. I., and Dolphin, A. C. (1992) *FEBS Lett.* **310**: 66-70

116. Odagaki, Y., and Fuxe, K. (1995) *Brain Res.* **689**: 129-135
117. Odagaki, Y., Dasgupta, S., and Fuxe, K. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* **291**: 245-253
118. Hoffmann, M., Ward, R. J., Cavalli, A., Carr, I. C., and Milligan, G. (2001) *J. Neurochem.* **78**: 797-806
119. Nussenzveig, D. R., Heinflink, M., and Gershengorn, M. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 2389-2392
120. Ashworth, R., Yu, R., Nelson, E. J., Dermer, S., Gershengorn, M. C., and Hinkle, P. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 512-516
121. Petrou, C. P., and Tashjian, A. H., Jr. (1995) *Biochem. J.* **306**: 107-113
122. Levis, M. J., and Bourne, H. R. (1992) *J. Cell Biol.* **119**: 1297-1307
123. Negishi, M., Hashimoto, H., and Ichikawa, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 2364-2369
124. Yajima, Y., Akita, Y., Katada, T., and Saito, T. (1993) *Mol. Cell. Endocrinol.* **92**: 143-152
125. Maloteaux, J. M., and Hermans, E. (1994) *Biochem. Pharmacol.* **47**: 77-88
126. Conway, B. R., Minor, L. K., Xu, J. Z., D'Andrea, M. R., Ghosh, R. N., and Demarest, K. T. (2001) *J. Cell. Physiol.* **189**: 341-355
127. Cheng, G., Iijima, Y., Ishibashi, Y., Kuppuswamy, D., and Cooper, G. 4th (2002) *Am. J. Physiol.* **283**: H2379-2388
128. Ibarrondo, J., Joubert, D., Dufour, M. N., Cohen-Solal, A., Homburger, V., Jard, S., and Guillon, G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8413-8417
129. Popova, J. S., and Rasenick, M. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**: 34299-34308
130. Popova, J. S., and Rasenick, M. M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**: 30410-30418
131. Kifor, O., Diaz, R., Butters, R., Kifor, I., and Brown, E. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 21708-21713
132. Fujita, T., Toya, Y., Iwatsubo, K., Onda, T., Kimura, K., Umemura, S., and Ishikawa, Y. (2001) *Cardiovasc. Res.* **51**: 709-716
133. Rudajev, V., Novotny, J., Hejnova, L., Milligan, G. and Svoboda, P. (2005) *J. Biochem.* **137**: (in press)
134. De Luca, A., Sargiacomo, M., Puca, A., Sgaramella, G., De Paolis, P., Frati, G., Morisco, C., Trimarco, B., Volpe, M., and Condorelli, G. (2000) *J. Cell. Biochem.* **77**: 529-539
135. Murthy, K. S., and Makhlof, G. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 30211-30219
136. Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 9690-9697
137. Ostrom, R. S., Violin, J. D., Coleman, S., and Insel, P. A. (2000) *Mol. Pharmacol.* **57**: 1075-1079
138. Ostrom, R. S., Gregorian, C., Drenan, R. M., Xiang, Y., Regan, J. W., and Insel, P. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 42063-42069
139. Kvapil, P., Novotny, J., Svoboda, P., and Ransnas, L. A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**: 193-199
140. Tolkovsky, A. M., and Levitzki, A. (1978) *Biochemistry* **17**: 3795
141. Neubig, R. R. (1994) *FASEB J.* **8**: 939-946
142. Chidiac, P. (1998) *Biochem. Pharmacol.* **55**: 549-556

PŮVODNÍ PUBLIKACE AUTORA DISKUTOVANÉ V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. Novotny J., Bourova L., Malkova O., Svoboda P. and Kolar F. (1999) G proteins, β -adrenoceptors and β -adrenergic responsiveness in immature and adult rat ventricular myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**:761-772.
- II. Novotny J., Bourova, L., Kolar, F and Svoboda P. (2001) Membrane-bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in young and adult rat myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J. Cell. Biochem.* **82**:215-224.
- III. Hrbasova M., Novotny J., Hejnova L., Kolar F., Neckar J. and Svoboda P. (2003) Altered myocardial G_s protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol.* **94**:2423-2432.
- IV. Novotny J., Hrbasova M., Kolar F. and Svoboda P. (2003) Cardiomegaly induced by pressure overload in newborn rats is accompanied by altered expression of the long isoform of $G_s\alpha$ protein and deranged signaling of adenylyl cyclase. *Mol. Cell. Biochem.* **245**:157-166.
- V. Ihnatovych I., Hejnova L., Kostrova A., Mares P., Svoboda P. and Novotny J. (2001) Maturation of rat brain is accompanied by differential expression of the long and short splice variants of $G_s\alpha$ protein. Identification of cytosolic forms of $G_s\alpha$. *J. Neurochem.* **79**:88-97.
- VI. Ihnatovych I., Novotny J., Haugvicova R., Bourova L., Mares P. and Svoboda P. (2002) Opposing changes of trimeric G proteins levels during ontogenetic development of rat brain. *Dev. Brain Res.* **133**:57-67.
- VII. Ihnatovych I., Novotny J., Haugvicova R., Bourova L., Mares P. and Svoboda P. (2002) Ontogenetic development of the G protein-mediated adenylyl cyclase signalling in rat brain. *Dev. Brain Res.* **133**:69-75.
- VIII. Hejnova L., Ihnatovych I., Novotny J., Kubova H., Mares P. and Svoboda P. (2002) Modulation of adenylyl cyclase activity by baclofen in the developing rat brain: difference between cortex, thalamus and hippocampus. *Neurosci. Lett.* **330**:9-12.

- IX. Stöhr J., Bourova L., Hejnova L., Ihnatovych I., Novotny J. and Svoboda P. (2004) Increased baclofen-stimulated G protein coupling and deactivation in rat brain cortex during development. *Dev. Brain Res.* **151**:67-73.
- X. Drmota T., Novotny J., Kim G.-D., Eidne K.A., Milligan G. and Svoboda P. (1998) Agonist-induced internalization of the G protein $G_{11\alpha}$ and thyrotropin-releasing hormone receptors proceed on different time scales. *J. Biol. Chem.* **273**:21699-21707.
- XI. Drmota T., Novotny J., Gould G.W., Svoboda P. and Milligan G. (1999) Visualization of distinct patterns of subcellular redistribution of the thyrotropin-releasing hormone receptor-1 and $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ induced by agonist stimulation. *Biochem. J.* **340**:529-538
- XII. Pesanova Z., Novotny J., Cerny J., Milligan G. and Svoboda P. (1999) Thyrotropin-releasing hormone-induced depletion of $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ proteins from detergent-insensitive membrane domains. *FEBS Lett.* **464**:35-40.
- XIII. Moravcova Z., Rudajev V., Stöhr J., Novotny J., Cerny J., Patrenti M., Milligan G. and Svoboda P. (2004) Long-term agonist stimulation of IP prostanoid receptor depletes the cognate $G_s\alpha$ protein in membrane domains but does not change the receptor level. *Biochim. Biophys. Acta* **1691**:51-65.
- XIV. Bourova L., Kostrnova A., Hejnova L., Moravcova Z., Moon H.E., Novotny J., Milligan G. and Svoboda P. (2003) δ -Opioid receptors exhibit high efficiency when activating trimeric G proteins in membrane domains. *J. Neurochem.* **85**:34-49.
- XV. Matousek P., Novotny J., Rudajev, V. and Svoboda P. (2005) Prolonged agonist stimulation does not alter the protein composition of membrane domains in spite of dramatic changes induced in a specific signaling cascade. *Cell Biochem. Biophys.* **42**:21-40.

Physiological Regulations of Transmembrane Signaling Systems Mediated by Trimeric G-Proteins

Summary

The present thesis summarizes results of our research focused on various aspects of transmembrane signaling regulated by trimeric G-proteins under different physiological conditions. This work is based on 15 papers, which were subdivided into three groups according to their topics. In the first set of papers we examined the adenylyl cyclase (AC) signaling system in rat myocardium and its changes during maturation, the effect of thyroid hormones, pressure overload or chronic hypoxia. The second set of papers deals with AC and G-proteins in selected regions of rat brain during ontogenetic development. In the third set of papers we monitored changes in G-protein-mediated signaling during long-term hormone stimulation of cells expressing the relevant receptors and G-proteins.

Our detailed analysis of trimeric G-proteins in rat heart muscle revealed that the content of $G_s\alpha$ is rising and $G_{i/o}\alpha$ & $G_{q/11}\alpha$ falling during maturation. Results of our next investigations confirmed the important role of standard physiological levels of thyroid hormones for normal development of myocardial β -adrenergic signaling. We found out that altered expression of the key components (β -adrenergic receptors and G-proteins) of this system as well as the lower sensitivity to β -adrenergic stimulation, which was induced by hypo- or hyperthyroidism during early postnatal period of rat heart development, could be fully normalized after resumption of euthyroid status in adulthood. Our research focused on analyzing the consequences of pressure overload induced in newborn rats demonstrated development of cardiomegaly, which may lead to heart failure in adulthood. We observed that morphological and functional changes of the heart are accompanied by marked alterations at the level of the AC signaling, namely decrease of $G_s\alpha$, increase of $G_o\alpha$ and lower enzyme activity of AC. In our studies of chronic hypoxia in adult rats we detected right ventricle hypertrophy, which was associated with substantial derangement of the myocardial AC signaling. Because the lower sensitivity of the AC signaling system to β -adrenergic stimulation and parallel decrease in the functional activity of $G_s\alpha$ protein was not rectified even after a 5-week recovery in normoxic conditions, it might be assumed that these long-lasting changes of transmembrane signaling should be somehow related to the well-known cardioprotective effect of chronic hypoxia.

Results of our investigations of trimeric G-proteins in selected rat brain regions (cortex, thalamus and hippocampus) indicated significant differences in

the expression of individual G-protein subunits during postnatal development (increase in $G_s\alpha$ and $G_o\alpha$, mild decrease or no changes in the content of $G_i\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ and $G\beta$), which can apparently reflect specific roles of these regulatory proteins in the course of brain maturation. The specific changes observed in the brain AC signaling system – relatively low AC activity detected shortly after birth reached its maximum around postnatal day 12 and then gradually fell down to low adult values – suggest that some yet not known inhibitory mechanism is turning on in the later developmental phases. We also observed substantial differences in GABA_B-ergic signaling in the three tested brain regions. Besides different expression of GABA_B receptors we noticed that stimulation of these receptors in cortex and thalamus results in inhibition of AC activity, but in hippocampus may prevail the stimulatory effect mediated by these receptors. Our determination of high-affinity GTPase activity in rat brain cortex revealed marked increase of this activity in adulthood and results obtained by measurement of baclofen-stimulated GTPase activity indicated that GABA_B-ergic signaling is fully functional already in young animals.

The effects of long-term hormone stimulation on the subcellular receptor and G-protein distribution and the presumed relationship between these signaling systems and membrane domains were studied on stably transfected HEK-293 cell lines. We found out that thyrotropin-releasing hormone (TRH) induces within a few minutes rapid internalization of TRH receptors, which is after 2-4 h followed by much slower redistribution of $G_{q/11}\alpha$ proteins; this process strongly depends on functional cytoskeleton structure. Our next measurements indicated that membrane domains may harbor about 30-40% of total cellular G-proteins, but only negligible amount of TRH and prostanoid receptors (< 3%). Long-term stimulation of these receptors induced selective translocation of the cognate $G_{q/11}\alpha$ or $G_s\alpha$ proteins from membrane domains to the bulk phase of plasma membranes. We also demonstrated that the efficiency of signal transduction mediated by δ -opioid receptors and $G_i\alpha$ in membrane domains is markedly higher as compared to the rest of the bulk membrane phase, despite there is only a relatively small number of the receptors. We also detected partial differences in the protein composition of membrane domains prepared by different procedures. Sustained agonist (TRH or isoproterenol) stimulation of HEK-293 or S49 cells did not alter any of about 150-170 major proteins distinguished by 2-D electrophoretic analysis, except for selective down-regulation of the cognate $G_{q/11}\alpha$ or $G_s\alpha$ proteins. All these data support the notion about a real existence of membrane domains and about important roles of these structures in transmembrane signaling.