



Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



Oddělení biochemie
membránových receptorů

Doktorandská dizertační práce

Úloha membránového cholesterolu v signalizaci δ -opioidního receptoru

Korelace se strukturou plazmatické membrány

Mgr. Jana Brejchová

Vedoucí dizertační práce: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Opioidní receptory (OR)

- receptory spřažené s G proteiny
(**GPCR**)

- typy OR

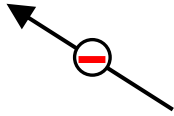
μ -OR

δ -OR

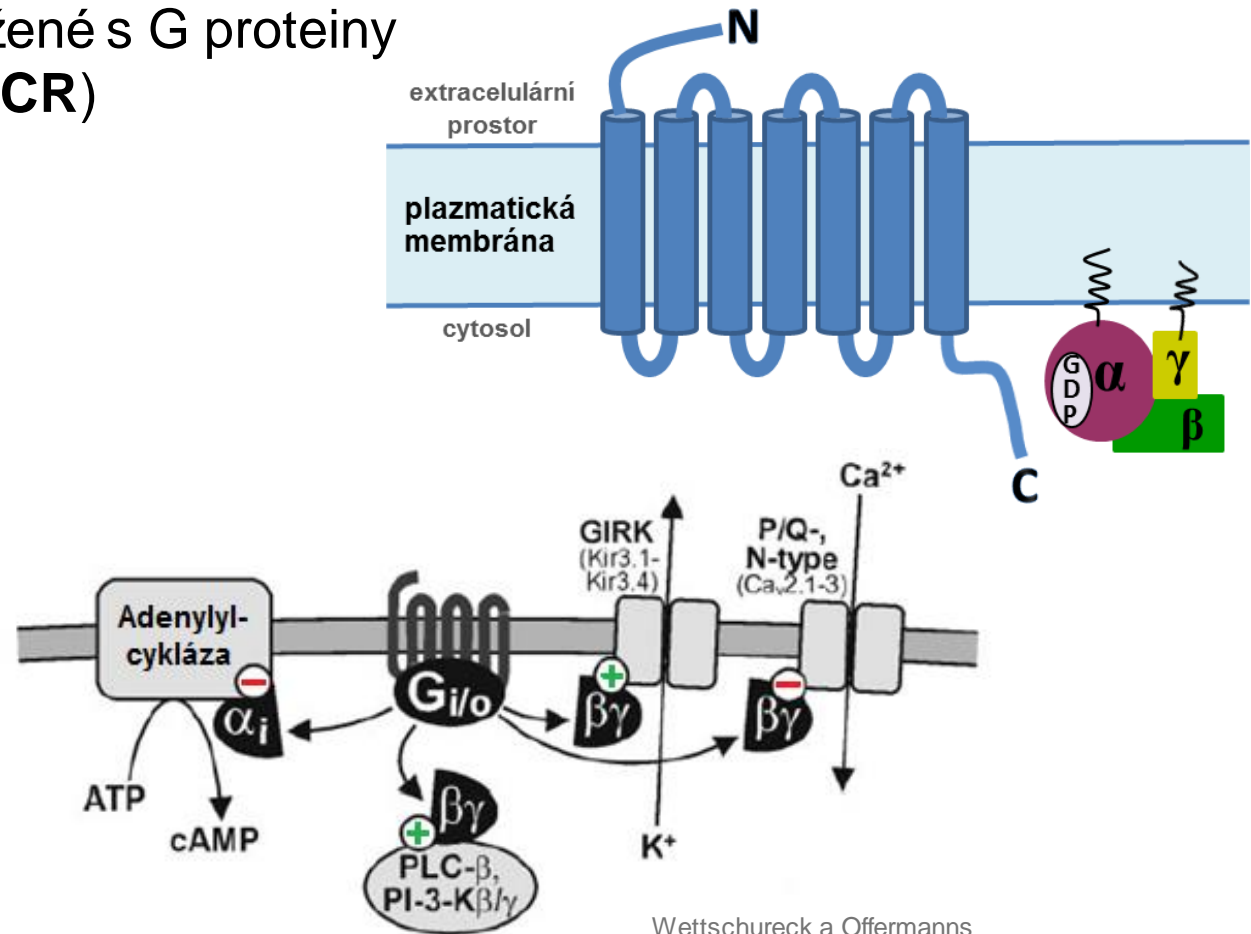
κ -OR

NOP receptor

- G_i/G_o



 pertussis toxin



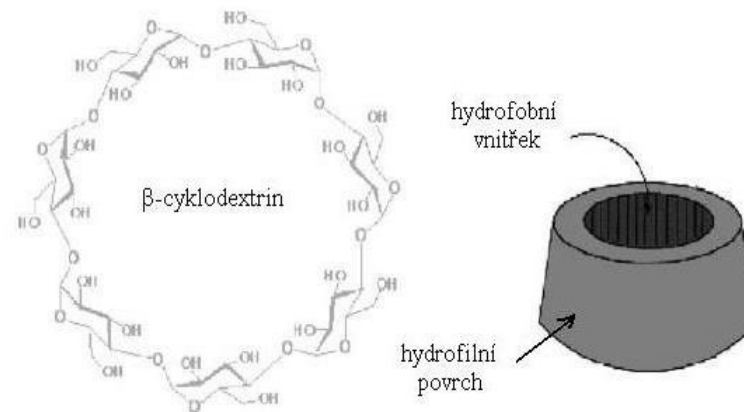
Wettschureck a Offermanns
(2005) Physiol. Rev.

Předchozí výsledky naší laboratoře

- modelová buněčná linie: δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293
Cys³⁵¹-Ile³⁵¹ → necitlivost vůči pertussis toxinu (PTX)
- ***Bouřová et al., (2003) δ -Opioid receptors exhibit high efficiency when activating trimeric G proteins in membrane domains. J.Neurochem. 85, 34-49***

- deplece cholesterolu

β -cyklodextrin
(β -CDX)



Del Valle (2004)
Process Biochem.

Cíle dizertační práce

linie δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

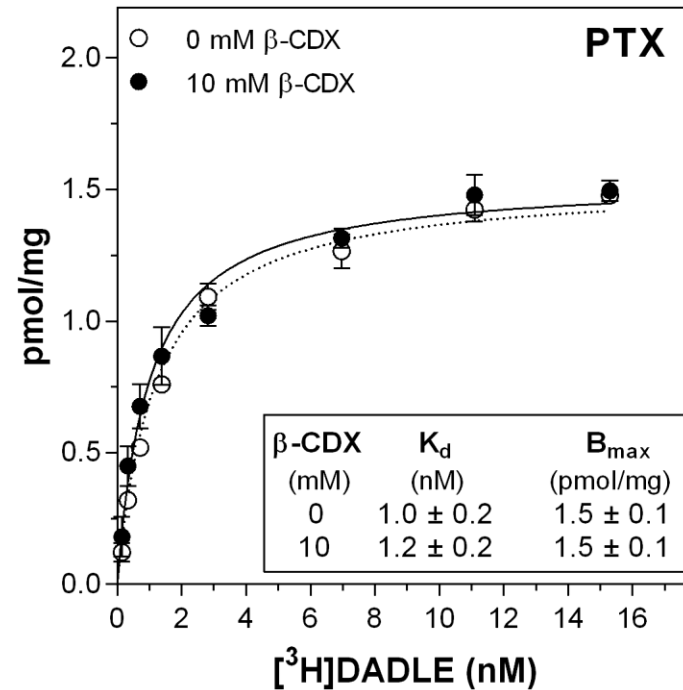
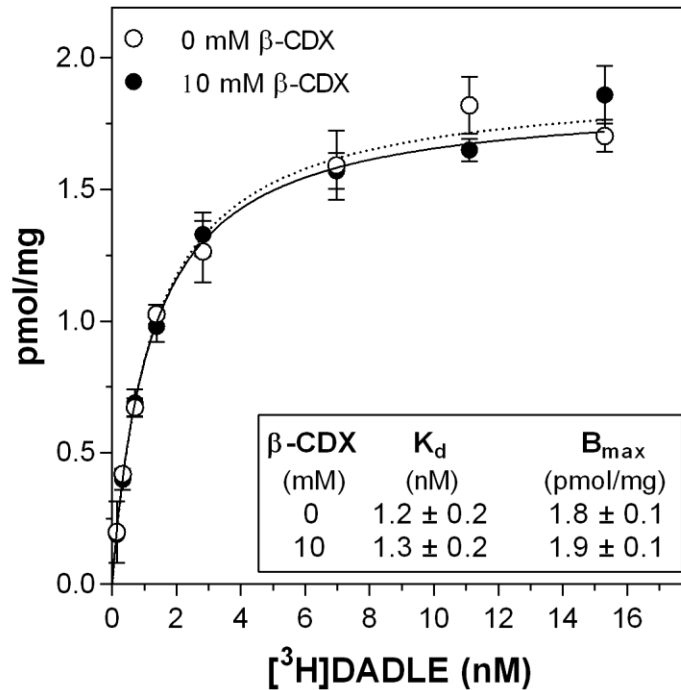
- analyzovat vliv deplece cholesterolu v PM na δ -OR a mechanismus funkčního spřažení mezi tímto receptorem a trimerními G proteiny
- stanovit vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM pomocí metod **fluorescenční spektroskopie** a **fluorescenční mikroskopie**

linie HEK293T přechodně exprimující FLAG- δ -OR

- stanovit vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR

Vliv deplece cholesterolu na vazbu agonisty

saturační vazebné křivky
[³H]DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-enkefalin)

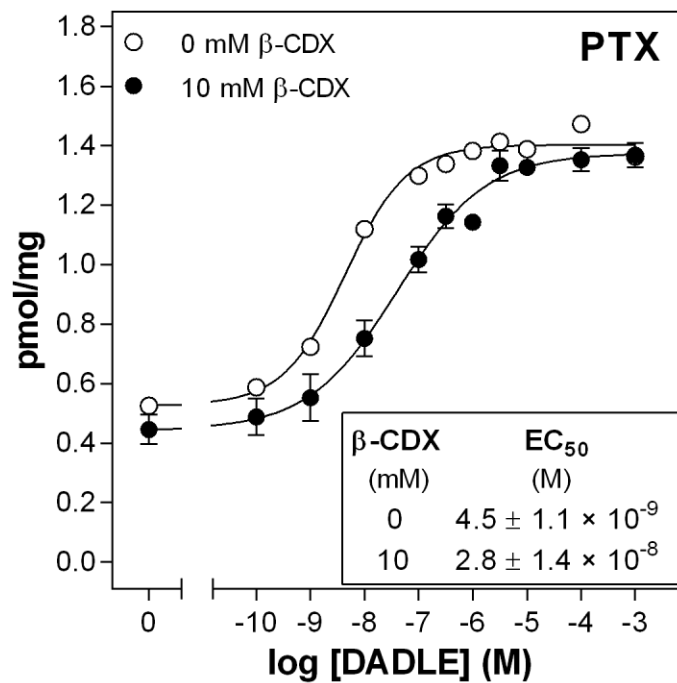
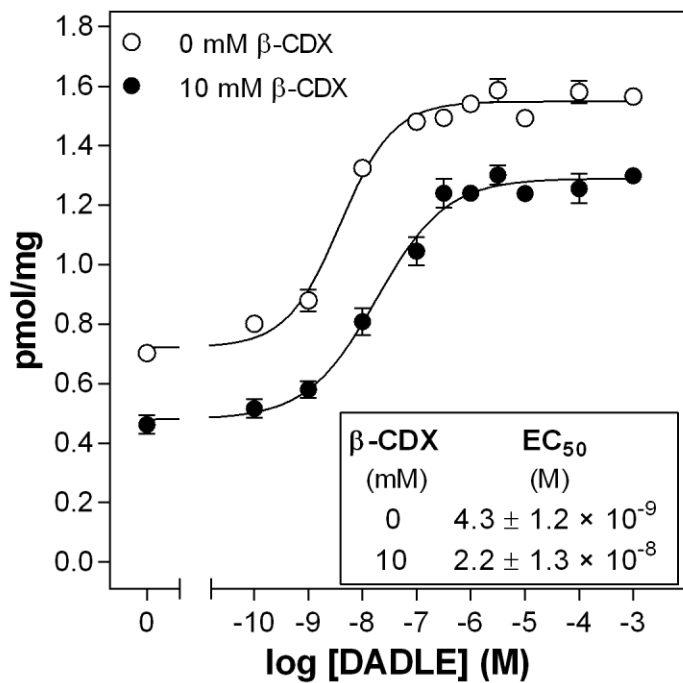


Publikace I

Brejchová et al. (2011) Biochim. Biophys. Acta

Vliv deplece cholesterolu na schopnost δ -OR aktivovat G proteiny

vazba [35 S]GTP γ S
křivky dávka-odpověď



Publikace I

Brejchová et al. (2011) Biochim. Biophys. Acta

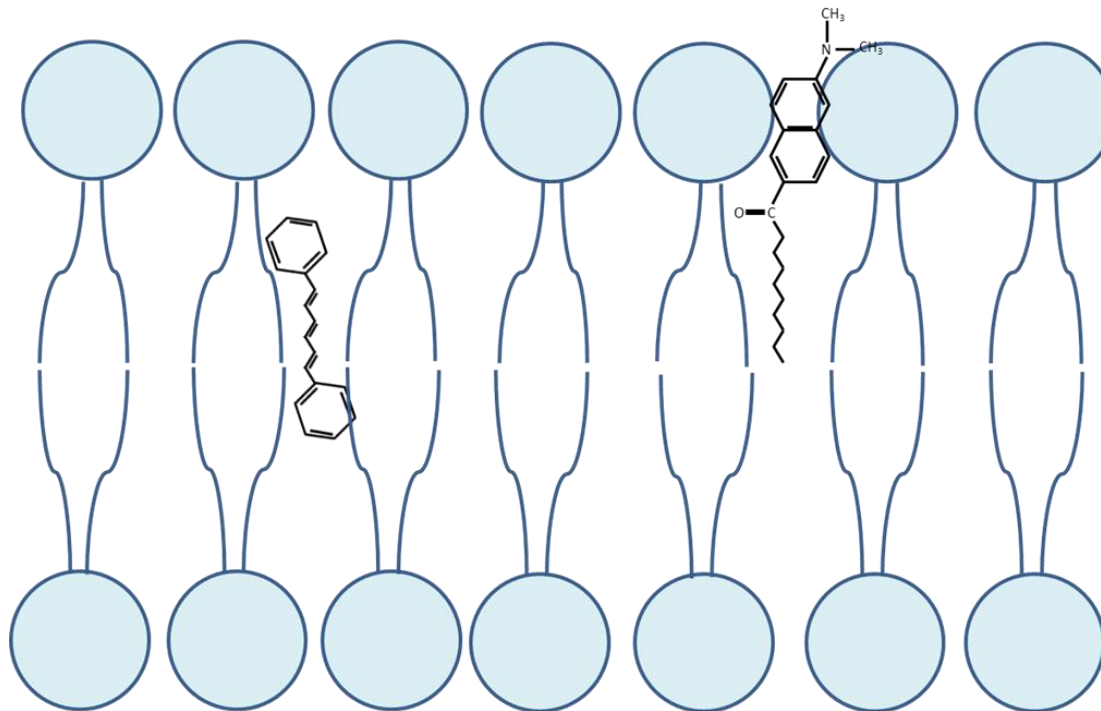
Vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti plazmatické membrány

DPH

1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien

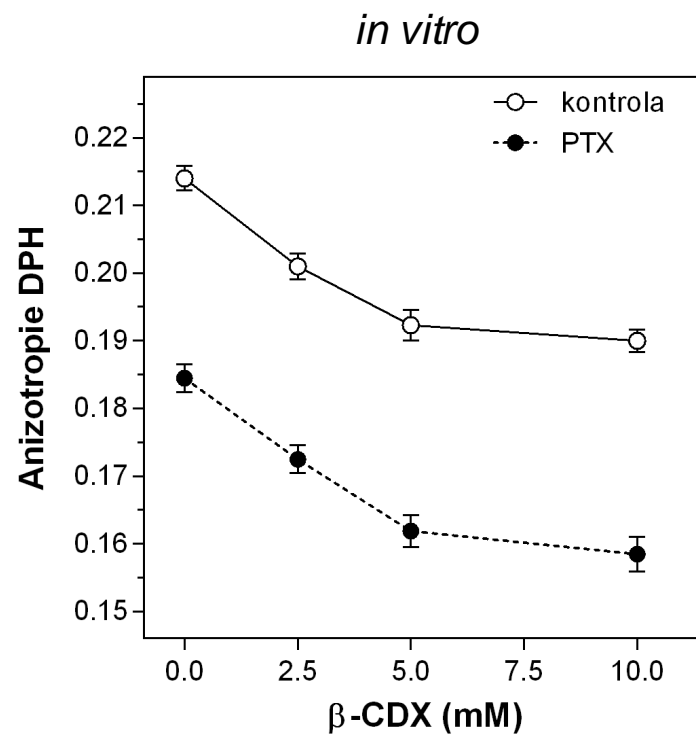
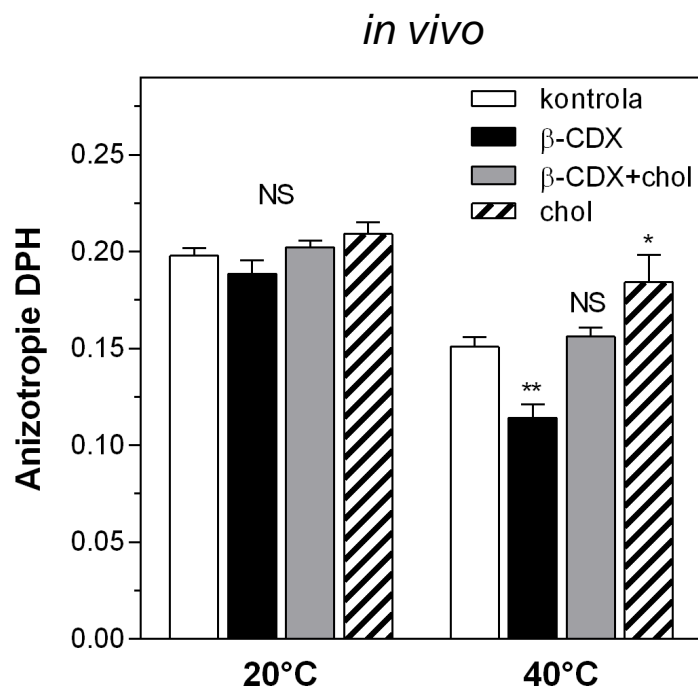
Laurdan

2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen



Rovnovážná anizotropie fluorescence DPH

↑ fluidita \approx ↓ anizotropie



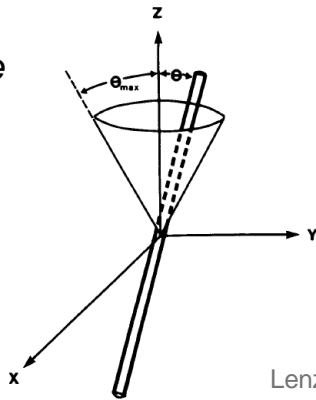
Publikace I

Brejchová et al. (2011) Biochim. Biophys. Acta

Časově rozlišená anizotropie fluorescence DPH

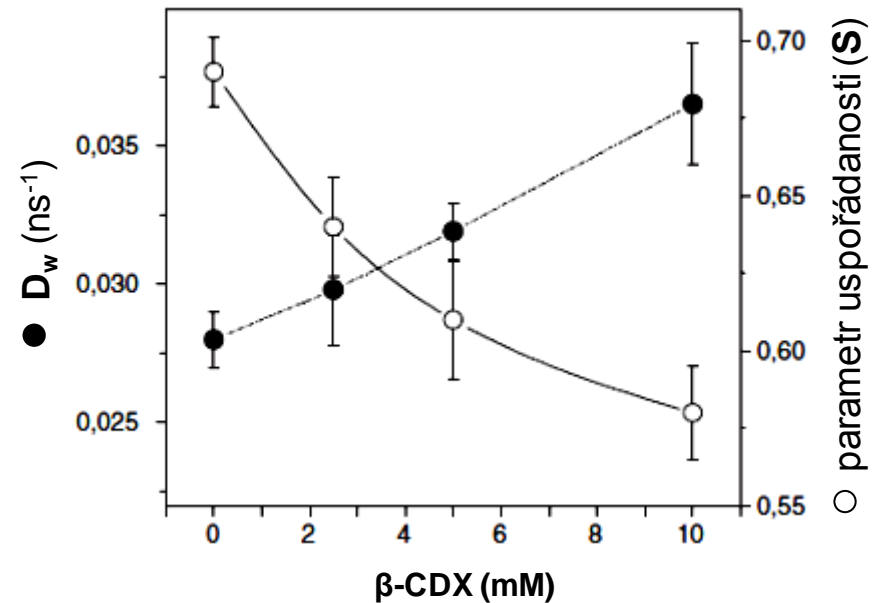
β -CDX (mM)	r_0	r_∞	ϕ (ns)	S	D_w (ns ⁻¹)
0	0,295	0,121	4,4	0,68	0,028
2,5	0,282	0,105	4,7	0,64	0,030
5	0,280	0,096	4,4	0,61	0,032
10	0,279	0,095	4,3	0,58	0,037

wobbling-in-cone model



Lenz (1993)
Chem. Phys. Lipids

D_w – difuzně-rotační konstanta
 S – parametr uspořádanosti



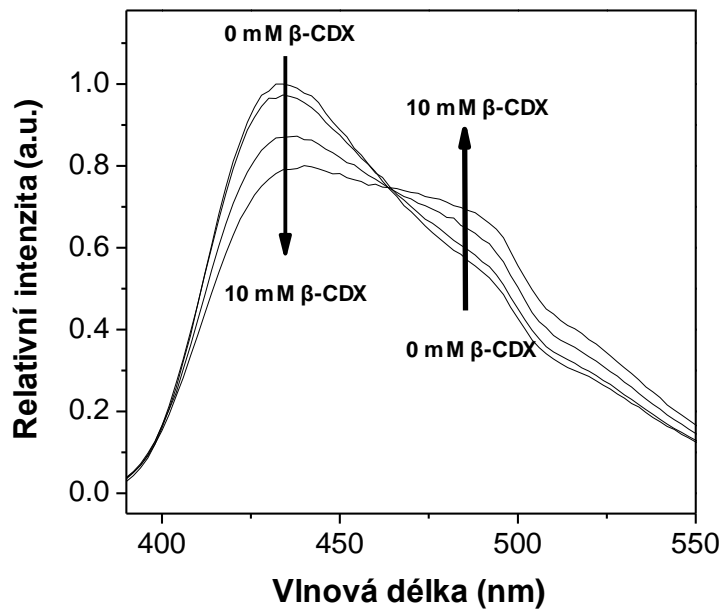
Publikace I

Brejchová et al. (2011) Biochim. Biophys. Acta

Generalizovaná polarizace (GP) sondy Laurdan

emisní λ_{\max} (nm)

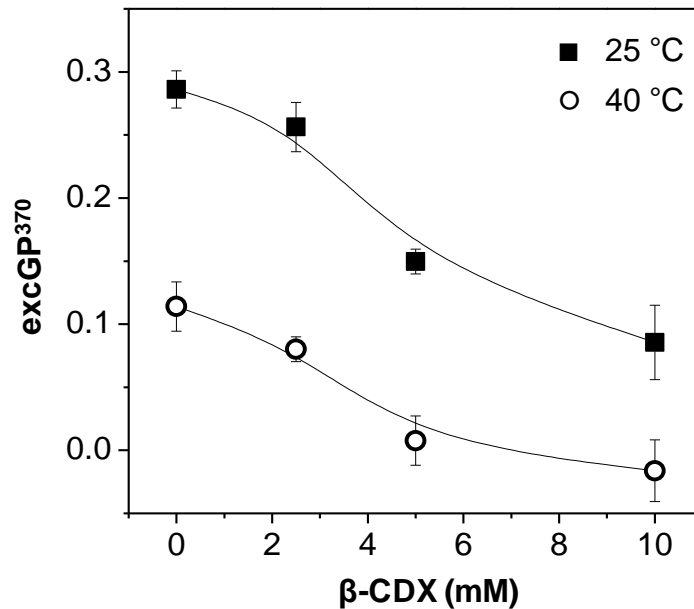
nepolární rozpouštědla



\wedge

emisní λ_{\max} (nm)

polární rozpouštědla

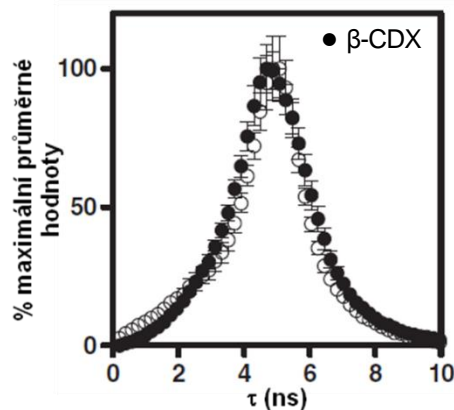
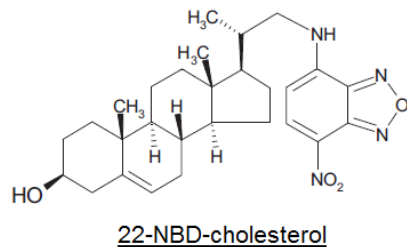


Publikace I

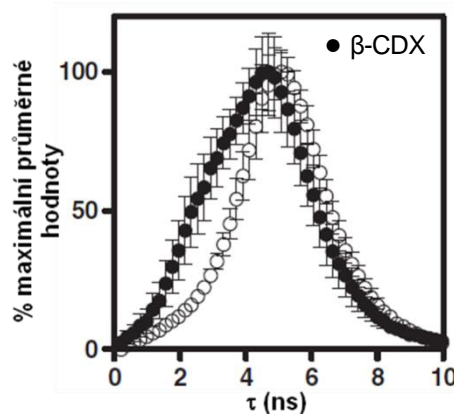
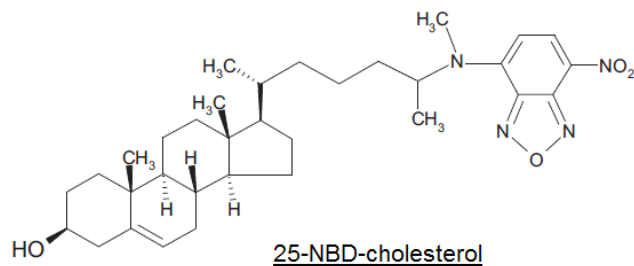
Brejchová et al. (2011) Biochim. Biophys. Acta

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)

τ – doba života excitovaného stavu (*lifetime*)



	kontrola	β-CDX
$\tau_{\text{tot}} \pm \text{SEM}$ (ns)	4,9 ± 0,1	4,8 ± 0,1
$\tau_{\text{in}} \pm \text{SEM}$ (ns)	5,2 ± 0,1	5,1 ± 0,1
$\tau_{\text{pm}} \pm \text{SEM}$ (ns)	5,4 ± 0,1	5,2 ± 0,1



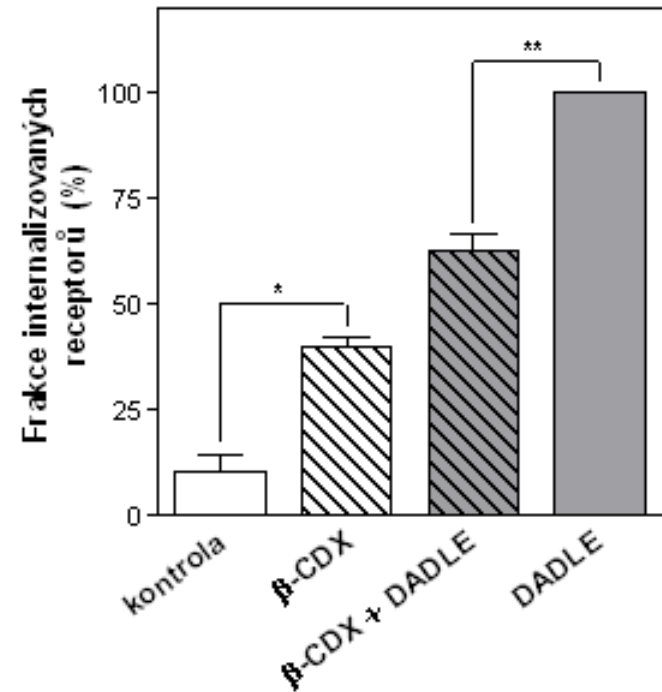
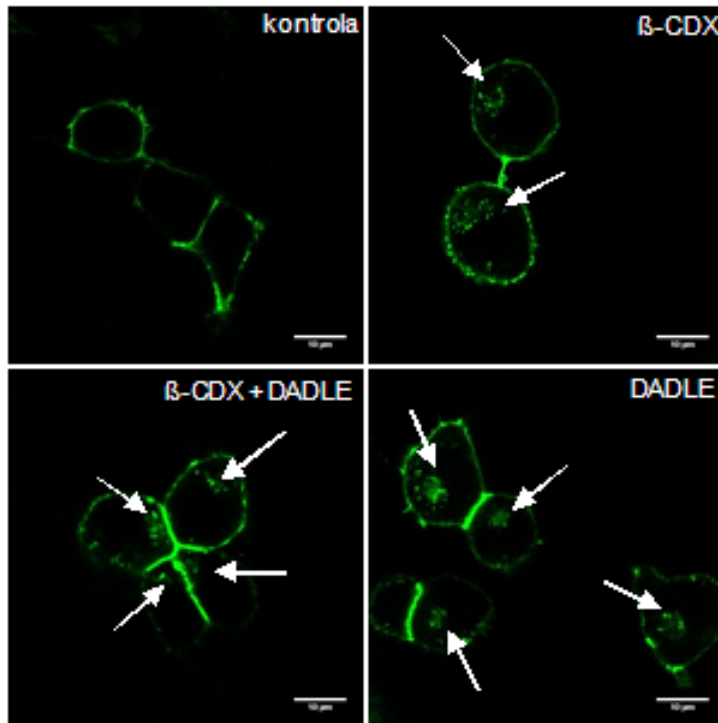
	kontrola	β-CDX
$\tau_{\text{tot}} \pm \text{SEM}$ (ns)	5,1 ± 0,1	4,4 ± 0,1
$\tau_{\text{in}} \pm \text{SEM}$ (ns)	5,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1
$\tau_{\text{pm}} \pm \text{SEM}$ (ns)	5,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1

Publikace II

Ostašov et al. (2013) Chem. Phys. Lipids

Vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR

linie HEK293T přechodně exprimující FLAG- δ -OR
nepřímá imunofluorescence - *Alexa Fluor*[®] 488



Ostatní publikace

Ujčková et al. (2014) *Physiol. Res.*

Kolokalizace internalizovaných δ -OR s Rab proteiny

červeně

FLAG- δ -OR (Alexa Fluor® 568)

zeleně

EGFP-Rab protein

Rab4

časné endozomy

Rab5

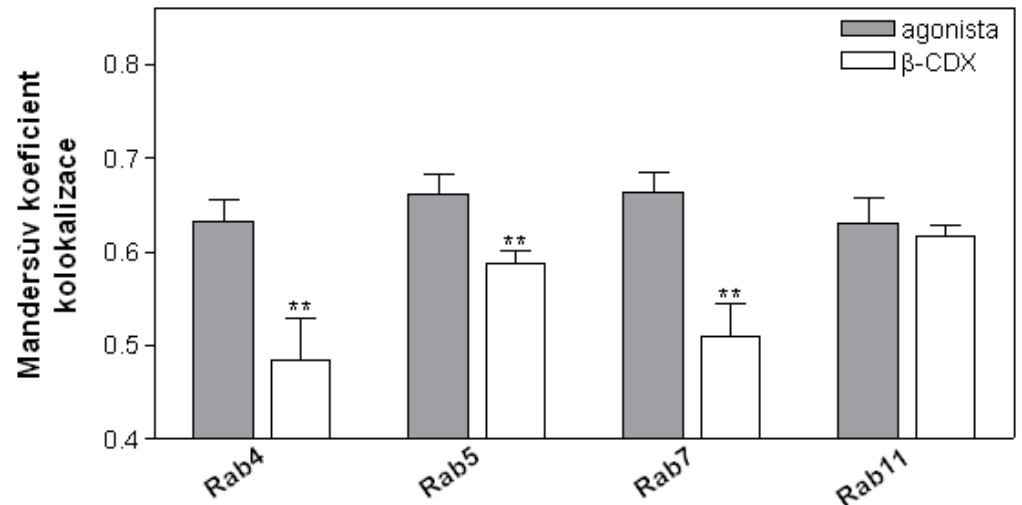
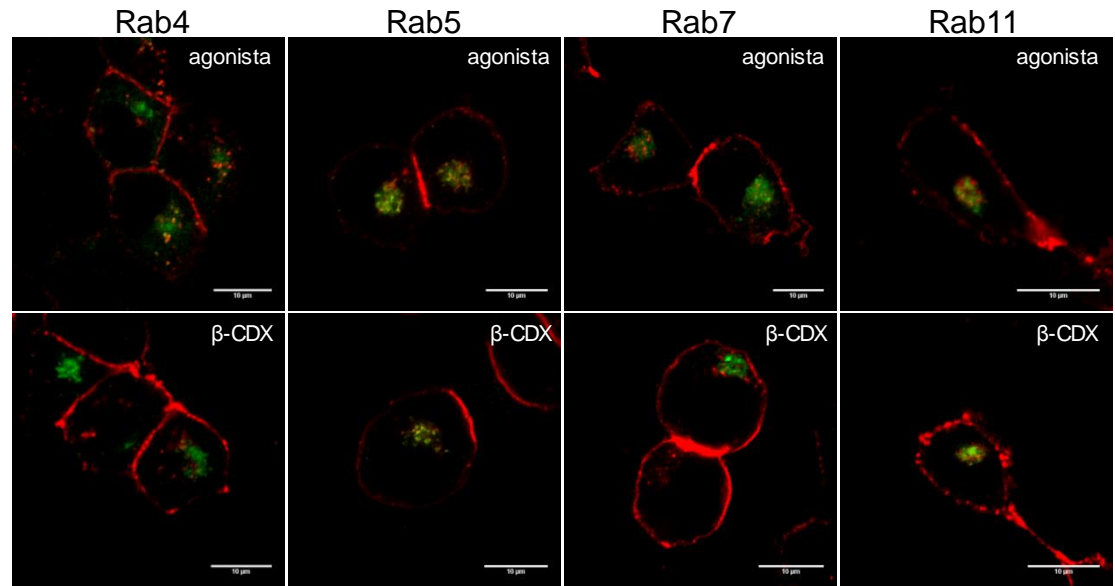
klatrinové váčky,
časné endozomy

Rab7

pozdní endozomy,
lyzozomy

Rab11

trans-GA,
recyklující endozomy



Závěr

Deplece cholesterolu

- nemění vazbu specifického agonisty [³H]DADLE na δ -OR
- snižuje účinnost funkčního spřažení mezi δ -OR a trimerními G proteiny třídy G_i/G_o
- zvyšuje fluiditu plazmatické membrány
- zvyšuje polaritu hydrofilní oblasti plazmatické membrány
- snižuje účinnost internalizace δ -OR, která nastává vlivem stimulace receptoru vazbou agonisty
- způsobuje samovolnou internalizaci δ -OR, tedy internalizaci receptoru bez navázaného agonisty – tato forma internalizace probíhá odlišným způsobem než internalizace vyvolaná vazbou agonisty

Poděkování

Oddělení biochemie

membránových receptorů

Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.

Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

RNDr. Lenka Roubalová, Ph.D.

Ing. Miroslava Vošahlíková, Ph.D.

Mgr. Hana Ujčíková, Ph.D.

Ing. Kateřina Stolařová

Mgr. Dmytro Kagan

Oddělení biofyzikální chemie

Ústav fyzikální chemie

J. Heyrovského AV ČR v.v.i.

Prof. Martin Hof, Dr. rer. nat. DSc.

Mgr. Sýkora Jan, Ph.D.

Department of Experimental Medicine

University of Milano-Bicocca

Prof. Marco Parenti

Francesca Guzzi

Mario Mauri

Seznam publikací

Publikační podklad pro dizertační práci

Publikace I

Brejchová, J., Sýkora, J., Dlouhá, K., Roubalová, L., Ostašov, P., Vošahlíková, M., Hof, M. and Svoboda, P. (2011) Fluorescence spectroscopy studies of HEK293 cells expressing DOR-Gi1 α fusion protein; the effect of cholesterol depletion. Biochim. Biophys. Acta 1808, 2819-2829

Publikace II

Ostašov, P., Sýkora, J., **Brejchová, J.**, Olžyňská, A., Hof, M. and Svoboda, P. (2013) FLIM studies of 22- and 25-NBD-cholesterol in living HEK293 cells: plasma membrane change induced by cholesterol depletion. Chem. Phys. Lipids 167-168, 62-69

Manuskript

Brejchová J., Ostašov P., Sýkora J., Merta L., Roubalová L., Hof M. and Svoboda P. (2014) TRH-receptor mobility and function in control and cholesterol-depleted plasma membrane of HEK293 cells stably expressing TRH-R-eGFP. Biochim. Biophys. Acta, submitted

Ostatní publikace

Ujčíková, H., **Brejchová, J.**, Vošahlíková, M., Kagan, D., Dlouhá, K., Sýkora, J., Merta, L., Drastichová, Z., Novotný, J., Ostašov, P., Roubalová, L., Parenti, M., Hof, M. and Svoboda, P. (2014) Opioid-Receptor (OR) signaling cascades in rat cerebral cortex and model cell lines: the role of plasma membrane structure. Physiol. Res. 63 (Suppl 1), S165-76

Drahota, Z., Páleníčková, E., Endlicher, R., Milerová, M., **Brejchová, J.**, Vošahlíková, M., Svoboda, P., Kazdová, L., Kalous, M., Červinková, Z. and Cahová, M. (2014) Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. Physiol. Res. 63, 1-11