

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Jana Brejchová

Úloha membránového cholesterolu v signalizaci

δ -opioidního receptoru

Korelace se strukturou plazmatické membrány

The role of membrane cholesterol in δ -opioid receptor signaling

Correlation with plasma membrane structure

Doktorandská dizertační práce

Školitel: **Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.**

FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR

Oddělení biochemie membránových receptorů

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla všechny použité informační zdroje. Dále prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Mgr. Jana Brejchová

Poděkování

Děkuji svému školiteli **Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc.**, za odborné vedení, veškerou podporu a zajištění podmínek pro mou práci. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Oddělení biochemie membránových receptorů Fyziologického ústavu AV ČR, především **RNDr. Lence Roubalové, Ph.D.** a **Ing. Miroslavě Vošahlíkové, Ph.D.**, za poskytnutou pomoc při experimentální práci a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Moje díky patří také kolegům z Oddělení biofyzikální chemie Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, jmenovitě **Mgr. Janu Sýkorovi, Ph.D.**. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat **Prof. Marcovi Parentimu** z *University of Milano-Bicocca* za umožnění mého šestiměsíčního pracovního pobytu v jeho laboratoři v rámci *PROGRAM EXTRA^{PLUS}*, který byl financován nadací *Fondazione Cariplo*. Mé díky patří také všem členům této laboratoře, jmenovitě pak **Mariovi Maurimu** a **Francesce Guzzi**, za vřelé přijetí a pomoc při experimentální práci.

ABSTRAKT

Studium buněk linie HEK293 stabilně exprimujících fúzní protein mezi opioidním receptorem typu delta (δ -OR) a mutantou $G_i1\alpha$ proteinu necitlivou vůči působení pertussis toxinu, δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), poskytlo následující výsledky. Snížení obsahu (deplece) cholesterolu v plazmatické membráně s pomocí cyklického oligosacharidu β -cyklodextrinu nezměnila vazbu specifického agonisty δ -OR, [³H]DADLE. Ovlivněn nebyl ani celkový počet vazebných míst, ani afinita vazby [³H]DADLE na receptor. Deplece cholesterolu však narušila schopnost δ -OR aktivovat trimerní G proteiny. Hodnota EC_{50} agonistou stimulované vazby [³⁵S]GTP γ S se zvýšila o jeden řád. Tento účinek byl pozorován jak v případě kontrolních buněk, tak v případě buněk vystavených účinku pertussis toxinu. To znamená, že deplece cholesterolu významně snížila účinnost funkčního spřažení nejen mezi δ -OR a endogenními G proteiny třídy G_i/G_o , které jsou citlivé k působení pertussis toxinu, ale rovněž mezi δ -OR a kovalentně připojeným $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) proteinem. Nezměněný obsah cholesterolu v plazmatické membráně je tedy důležitou podmínkou správné funkce δ -OR.

Stanovení vlivu deplece cholesterolu na funkční aktivitu δ -OR bylo podpořeno analýzou změn biofyzikálních vlastností plazmatické membrány s pomocí fluorescenčních membránových sond, hydrofobní sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a polární sondy Laurdan. Deplece cholesterolu vyvolala zvýšení celkové fluidity plazmatické membrány, které bylo způsobeno zvýšením míry neuspořádanosti a mobility komponent hydrofobní zóny membrány. V hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy způsobila deplece cholesterolu zvýšení polarity, které lze připsat zvýšení počtu molekul vody - hydrataci.

Studie buněk linie HEK293T přechodně exprimujících δ -OR nesoucí na N-konci antigenní epitop FLAG (FLAG- δ -OR) ukázaly, že deplece cholesterolu snižuje účinnost endocytózy δ -OR (internalizace), která nastává vlivem stimulace receptoru vazbou agonisty. Tato forma internalizace receptoru probíhá prostřednictvím klatrinových váčků. Deplece cholesterolu dále způsobila internalizaci FLAG- δ -OR bez navázaného agonisty. Množství tímto způsobem internalizovaných receptorů odpovídalo ~40 % receptorů internalizovaných působením agonisty. Analýza kolokalizace endocytovaných forem receptoru s Rab proteiny (Rab4, Rab5, Rab7 a Rab11), které posloužily jako „markery“ různých typů intracelulárních váčků, ukázala, že internalizace FLAG- δ -OR vlivem deplece cholesterolu probíhá odlišným způsobem než internalizace vyvolaná vazbou agonisty.

ABSTRACT

Study of HEK293 cells stably expressing fusion protein between delta opioid receptor (δ -OR) and pertussis toxin-insensitive mutant of $G_i1\alpha$ protein, δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), provided the following results. Decrease of plasma membrane cholesterol content (cholesterol depletion) induced by cyclic oligosaccharide β -cyclodextrin did not affect binding of specific δ -OR agonist, [³H]DADLE. Neither the maximum number of binding sites nor the affinity of [³H]DADLE binding was changed by cholesterol depletion. However, the ability of δ -OR to activate cognate trimeric G proteins was impaired. EC₅₀ value of agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding was an order of magnitude higher. This effect was observed in case of both control and pertussis toxin-treated cells. It means that cholesterol depletion markedly reduced the efficiency of functional coupling of δ -OR to endogenously expressed pertussis toxin-sensitive G proteins of G_i/G_o family as well as covalently bound $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) protein. Unchanged plasma membrane cholesterol content is therefore important requirement for proper δ -OR function.

Detection of the effect of cholesterol depletion on the functional activity of δ -OR was supported by the analysis of changes in biophysical state of plasma membrane using fluorescent membrane probes, hydrophobic probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and polar probe Laurdan. Cholesterol depletion induced an increase of the overall plasma membrane fluidity that resulted from an increased degree of disorder and mobility of hydrophobic membrane interior constituents. Polarity of the hydrophilic region of membrane bilayer was increased by cholesterol depletion. This can be ascribed to an increase in number of water molecules – hydration.

Studies of HEK293T cells transiently expressing N-terminally epitope-tagged form of δ -OR (FLAG- δ -OR) indicated that cholesterol depletion reduce the efficiency of δ -OR endocytosis (internalization) which occurs in response to binding of an agonist. This form of internalization occurs through the clathrin-coated vesicles. Furthermore, cholesterol depletion induced internalization of agonist-unbound FLAG- δ -OR. The portion of receptors internalized in this way corresponded to ~40 % of agonist-induced internalized receptors. The analysis of colocalization of endocytosed forms of receptor with intracellular vesicle markers (Rab4, Rab5, Rab7 and Rab11 proteins) demonstrated that cholesterol depletion-induced and agonist-induced FLAG- δ -OR internalization proceed in a different manner.

OBSAH

SEZNAM PUBLIKACÍ.....	1
Publikační podklad pro dizertační práci.....	1
Manuskript	1
Ostatní publikace.....	1
Abstrakta z konferencí	2
Pracovně-studijní pobyt	2
SEZNAM ZKRATEK	3
1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1. Receptory spřažené s G proteiny	10
2.2. Heterotrimerní G proteiny	20
2.3. Lipidové modifikace heterotrimerních G proteinů	23
2.4. Mechanismus přenosu signálu G proteiny (G proteinový cyklus)	25
2.5. Desenzitizace a endocytóza	28
2.6. Opioidní receptory	32
2.7. Ligandy opioidních receptorů.....	37
2.8. Receptor pro thyreoliberin, TRH-R.....	40
2.9. Struktura a funkce buněčných membrán	41
2.10. Lipidové složení buněčných membrán	42
2.11. Membránové domény	44
2.12. Kaveoly.....	47
2.13. Planární lipidové rafty	49
2.14. Snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně	51
2.15. Charakterizace membránové dvojvrstvy pomocí fluorescenčních sond.....	53
2.16. Polarizace fluorescence.....	54
2.17. Metoda generalizované polarizace fluorescence (GP) a využití sondy Laurdan.....	61
3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	63
4. MATERIÁLY A METODY	64
4.1. Kultivace buněk	64
4.2. Inkubace buněk s pertussis toxinem	64
4.3. Manipulace obsahu membránového cholesterolu.....	65

4.4.	Izolace frakcí plazmatických membrán	66
4.5.	Stanovení koncentrace proteinů.....	66
4.6.	Vazba agonisty [³ H]DADLE - saturační vazebné křivky.....	67
4.7.	Agonistou stimulovaná vysokoafinní vazba [³⁵ S]GTPγS - křivky dávka odpověď	68
4.8.	Měření rovnovážné anizotropie fluorescence DPH	68
4.9.	Měření časově rozlišené fluorescence a anizotropie fluorescence DPH	69
4.10.	Měření generalizované polarizace (GP) sondy Laurdan.....	71
4.11.	Stanovení obsahu membránového cholesterolu.....	72
4.12.	Inkorporace 22- a 25-NBD-cholesterolu do buněk δ-OR-G _i 1α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293	73
4.13.	Konfokální mikroskopie - pozorování živých buněk	74
4.14.	<i>Fluorescence lifetime imaging microscopy</i> (FLIM) - pozorování živých buněk	74
4.15.	Izolace plazmidové DNA.....	75
4.16.	Přechodná transfekce	75
4.17.	Vliv deplece cholesterolu na internalizaci receptoru – nepřímá imunofluorescence	76
4.18.	Konfokální mikroskopie – pozorování fixovaných preparátů	78
4.19.	Analýza mikroskopických snímků v programu ImageJ	78
4.19.1.	Jednoduchá transfekce - analýza lokalizace receptoru	78
4.19.2.	Kotransfekce - analýza kolokalizace receptoru s Rab proteinem	79
5.	VÝSLEDKY	80
5.1.	Optimalizace metody pro stanovení rovnovážné anizotropie fluorescence DPH	80
5.2.	Vliv deplece cholesterolu na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH (I _{DPH}) v membránách VTGP buněk	81
5.3.	Vliv deplece cholesterolu na časově dynamické parametry fluorescence DPH v plazmatických membránách VTGP buněk	84
5.4.	Vliv deplece cholesterolu na signální kaskádu δ-OR	87
5.4.1.	Vliv deplece cholesterolu na vazbu agonisty δ-OR	87
5.4.2.	Vliv deplece cholesterolu na schopnost δ-OR aktivovat G proteiny	88
5.5.	Vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM buněk δ-OR-G _i 1α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293.....	89

5.5.1. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM izolovaných z buněk δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293 - <i>rovnovážná anizotropie fluorescence DPH</i>	89
5.5.2. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM izolovaných z buněk δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293 - <i>časově rozlišená fluorescence a anizotropie fluorescence DPH</i>	93
5.5.3. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM izolovaných z buněk δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293 - <i>generalizovaná polarizace sondy Laurdan</i>	94
5.5.4. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti plazmatické membrány živých buněk δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293 - <i>detekce intenzity fluorescence a polarizace fluorescenčních sond 22- a 25-NBD-cholesterolu s pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie</i>	96
5.6. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR	105
5.6.1. Srovnání vlivu deplece cholesterolu na internalizaci opioidního receptoru typu delta (FLAG- δ -OR) a receptoru pro oxytocin (Myc-OTR)	105
5.6.2. Kolokalizace internalizovaných δ -OR s Rab proteiny	107
5.6.3. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci prostanoidního receptoru pro tromboxan A ₂ (TP)	109
5.7. Vliv deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R-eGFP v plazmatické membráně živých buněk	112
6. DISKUZE	115
6.1. Vliv deplece cholesterolu na signální kaskádu δ -OR	115
6.2. Vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM buněk δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293.....	117
6.3. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR	120
6.4. Vliv deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R-eGFP v plazmatické membráně živých buněk	121
7. ZÁVĚR	122
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	124
PŘÍLOHY <i>Publikace I-II, Manuskript</i>	

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

IF = 3.990 (rok 2011)

Publikace II

Ostašov, P., Sýkora, J., **Brejchová, J.**, Olžýnska, 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

IF = 2.593 (rok 2013)

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

IF = 1.487 (rok 2013)

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

IF = 1.487 (rok 2013)

Abstrakta z konferencí

Brejchová, J., Bouřová, L., Ostašov, P., Sýkora, J., Svoboda, P. (2010) Interakce δ -opiátového receptoru s proteinem $G_{i1\alpha}$ vyžaduje intaktní strukturu plasmatické membrány. **86. Fyziologické dny** (Organizátor: Fyziologický ústav 1. lékařské fakulty UK), Praha, 9. - 11. února, 2010

Brejchová, J., Bouřová, L., Ostašov, P., Sýkora, J., Svoboda, P. (2010) Cholesterol depletion alters DOR- G_{i1} coupling but not the ligand binding site of δ -opioid receptor; correlation with biophysical state of the plasma membrane. **Key-Stone Meeting: G Protein Coupled Receptors** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7-12, 2010

Ostašov, P., Burdíková, Z., **Brejchová, J.**, Kubínová, L., Svoboda, P. (2010) TRH-receptor mobility in cholesterol depleted cell membrane; studies by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and recovery after photobleaching (FRAP). **Key-Stone Meeting: G Protein Coupled Receptors** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7-12, 2010

Brejchová, J., Sýkora, J., Ostašov, P., Roubalová, L., Vošahlíková, M., Hof, M., Svoboda, P. (2011) FLIM, TCSPC and Laurdan Generalized Polarization studies of the effect of cholesterol depletion on hydrophobic interior and polar-head group region of the cell membrane. **Key-Stone Meeting: Transmembrane Signaling by GPCRs and Channels** (Organizers: Oliver P. Ernst and U. Benjamin Kaupp), Taos, New Mexico, USA, January 23-28, 2011

Pracovně-studijní pobyt

University of Milano-Bicocca, Italy, Faculty of Medicine, Department of Experimental Medicine, Prof. M. Parenti, 3. listopadu 2011 – 27. dubna 2012
PROGRAM EXTRA^{PLUS} – financován nadací Fondazione Cariplo

SEZNAM ZKRATEK

5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
A _{2A} R	Adenosinový receptor typu 2A
AC	Adenylyl cykláza
ADP	Adenosindifosfát
AMK	Aminokyselina
AP	Adaptorový protein
AP2	Adaptorový proteinový komplex 2
AR	Adrenergní receptor
ARK	Kináza adrenergního receptoru
ATP	Adenosintrifosfát
B _{max}	Celkový počet vazebných míst
BPM	<i>Bulk of plasma membranes</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CaSR	Receptor aktivovaný extracelulárními Ca ²⁺ (<i>Calcium-sensing receptor</i>)
CCK	Cholecystokinin
CCR	Chemokinový receptor
cDNA	Komplementární DNA
CDX	Cyklodextrin
CE-DPH	(2-karboxyetyl)-1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CNS	Centrální nervový systém
CRF	Kortikotropin uvolňující faktor (<i>Corticotropin-releasing factor</i>)
CTAP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH ₂ (antagonista μ-OR)
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂ (antagonista μ-OR)
CTP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH ₂ (antagonista μ-OR)
CXCR	Chemokinový receptor
DADLE	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu (agonista δ-OR)
DAG	Diacylglycerol
DAMGO	Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol (agonista μ-OR)

DIG	<i>Detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes</i>
DIM	<i>Detergent-insensitive membrane domains</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMPC	Dimyristoylfosfatidylcholin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPDPE	Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-D-Pen) (agonista δ -OR)
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
DPLPE	Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-Pen) (agonista δ -OR)
DRM	<i>Detergent-resistant membrane domains</i>
DSLET	Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr (agonista δ -OR)
DTLET	Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr (agonista δ -OR)
D_w	Difuzně-rotační konstanta
ECL	Extracelulární smyčka (<i>Extracellular loop</i>)
EDTA	Ethylendiaminotetraoctová kyselina (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ENS	Enterický nervový systém
EOS	Endogenní opioidní systém
ER	Endoplazmatické retikulum
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FLAG	Antigenní epitop (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FSH	Folikuly stimulující hormon
GA	Golgiho aparát
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
GDP	Guanosindifosfát
GHRH	Hormon uvolňující růstový hormon (<i>Growth-hormone-releasing hormone</i>)
GIP	Polypeptid inhibující žaludek (<i>Gastric inhibitory polypeptide</i>)
GIRK	Dovnitř usměřující draslíkový kanál (<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel</i>)
GMP	Guanosinmonofosfát
GnRH	Hormon uvolňující gonadotropin (<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
GNTI	Guanidinonaltrindol (antagonista κ -OR)
GP	Generalizovaná polarizace

GPCR	Receptory spřažené s G proteiny (<i>G protein coupled receptors</i>)
GP _{em}	Emisní GP
GP _{em} S	Směrnice emisního GP spektra
GP _{exc}	Excitační GP
GP _{exc} S	Směrnice excitačního GP spektra
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
GPS	Směrnice GP spektra
GRK	Kinázy GPCR (<i>G protein coupled receptor kinases</i>)
GTP	Guanosintrifosfát
GTP γ S	Guanosin 5'- <i>O</i> -thiotrifosfát, nehydrolyzovatelný analog GTP
HA	Antigenní epitop (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala)
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HRP	Křenová peroxidáza (<i>Horseradish peroxidase</i>)
CHE	Cholesterol esteráza
CHO	Cholesterol oxidáza
ICL	Intracelulární smyčka (<i>Intracellular loop</i>)
iNOS	Inducibilní forma NO syntázy (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
IP ₃	Fosfatidylinositoltrisfosfát
IPR	Prostacyklinový receptor
K _d	Rovnovážná disociační konstanta
LH	Luteinizační hormon
LUV	Velké unilamelární váčky (<i>Large unilamellar vesicles</i>)
MAPK	Mitogeny aktivovaná protein kináza (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MD	Membránové domény
mGluR	Metabotropní glutamátový receptor
MK	Mastná kyselina
mRNA	Informační (<i>messenger</i>) ribonukleotidová kyselina
Myc	Antigenní epitop (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NC-IUPHAR	<i>The nomenclature committee of the International Union of Pharmacology</i>
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NG108-15	Hybridní buněčná linie (<i>mouse neuroblastoma</i> × <i>rat glioma cells</i>)
NHE	Na ⁺ /H ⁺ výměník (<i>Na⁺/H⁺ exchanger</i>)

norBNI	Norbinaltorfimin (antagonista κ -OR)
NS	Nervová soustava
NTS	Neurotenzin
OR	Opioidní receptor
ORL	Opioidnímu receptoru podobný (<i>Opioid receptor-like</i>)
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocinový receptor
P	Polarizace fluorescence
PAR	Proteázou aktivovaný receptor (<i>Protease-activated receptor</i>)
PBS	Fosfátový pufr (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Fosfatidylcholin
PDYN	Prodynorfin
PE	Fosfatidyletanolamin
PENK	Proenkefalin
PI	Fosfatidylinositol
PI-3-K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PIP ₂	Fosfatidylinositolbisfosfát
PKA	Protein kináza A
PKC	Protein kináza C
PLA ₂	Fosfolipáza A ₂
PLC	Fosfolipáza C
PLD	Fosfolipáza D
PM	Plazmatická membrána
PNS	Periferní nervový systém
POMC	Proopiomelanokortin
POPOP	1,4-bis(5-fenyloxazol-2-yl)benzen
PS	Fosfatidylserin
PTX	Pertussis toxin
r	Anizotropie fluorescence
r ₀	Anizotropie fluorescence v čase 0 (limitní anizotropie)
r _∞	Anizotropie fluorescence ve velmi dlouhém čase (reziduální anizotropie)
r _{DPH}	Rovnovážná anizotropie fluorescence DPH
RGS	Regulátor G proteinové signalizace (<i>Regulator of G protein signaling</i>)
Rho-GEF	<i>Rho-guanine nucleotide exchange factor</i>

RICS	<i>Raster Image Correlation Spectroscopy</i>
S	Parametr uspořádanosti (<i>S-order parameter</i>)
S1P	Sfingosin-1 fosfát
Src	Nereceptorová tyrosin kináza
STE2, STE3	Feromonové receptory kvasinek
T4L	Lysozym T4
TAS1, TAS2	Chuťové receptory (<i>Taste receptors</i>)
TCSPC	<i>Time Correlated Single Photon Counting</i>
TCZ	<i>Transient confinement zone</i>
Tic	1,2,3,4-tetrahydroizoquinolin-3-karboxylová kyselina
TIP[ψ]	Tyr-Ticψ[CH ₂ NH]-Phe (antagonista δ-OR)
TIPP	Tyr-Tic-Phe-Phe (antagonista δ-OR)
TIPP[ψ]	Tyr-Ticψ-[CH ₂ NH]-Phe-Phe (antagonista δ-OR)
TIPP-NH ₂	Tyr-Tic-Phe-Phe-NH ₂ (agonista μ-OR a antagonist δ-OR)
TM	Transmembránový úsek
TMA-DPH	1-4-[(trimethylamino)fenyl]-6-fenyl-1,3,5-hexatrien
TP	Prostanoidní receptor pro tromboxan A ₂
TRH	Hormon uvolňující thyreotropin (thyreoliberin)
TRH-R	Receptor pro thyreoliberin
TSH	Thyreotropin (<i>Thyroid-stimulating hormone</i>)
TX-100	Triton X-100
TXA ₂	Tromboxan A ₂
U46619	9,11-Dideoxy-9α,11α-methanoepoxy prostaglandin F _{2a} (agonista TP)
VIP	Vazoaktivní intestinální polypeptid
β-ARK	Kináza β-adrenergního receptoru
δ-OR	δ-opioidní receptor
κ-OR	κ-opioidní receptor
μ-OR	μ-opioidní receptor
τ	Doba života excitovaného stavu (<i>lifetime</i>)
φ	Rotačně-korelační čas

1. ÚVOD

Opioidní receptory jsou členy rozsáhlé rodiny proteinů označovaných jako receptory spřažené s G proteiny (GPCR). GPCR jsou jedním z nejvýznamnějších cílů působení celosvětově předepisovaných léků. Jedná se o integrální proteiny plazmatické membrány, které hrají zásadní roli v rámci mezibuněčné komunikace (Bockaert a Pin, 1999). Funkcí GPCR je přenos informací kódovaných extracelulárními signály do nitra buňky. Takovými extracelulárními signály mohou být například hormony nebo neuropřenašeče. Vazba hormonu na receptor spouští proces přenosu informace do nitra buňky. Způsobuje totiž strukturní změnu molekuly receptoru, prostřednictvím které dochází k aktivaci G proteinu. G proteiny, přesněji řečeno heterotrimerní G proteiny, jsou proteiny vázající guaninové nukleotidy, které ovlivňují funkci řady proteinů signálních kaskád a podílejí se tak na regulaci buněčné signalizace (Wettschureck a Offermanns, 2005). Fyziologický význam přenosu informací prostřednictvím GPCR vyplývá ze skutečnosti, že jsou díky interakci s G proteiny součástí systému regulace buněčné signalizace, která je podstatou fungování organismu jako celku.

V průběhu výzkumu opioidních receptorů (OR) byla postupně zjištěna existence čtyř odlišných typů OR, kterými jsou opioidní receptor typu mí (μ -OR), kappa (κ -OR) a delta (δ -OR) a receptor pro nociceptin/orphanin FQ (NOP receptor). Opioidní receptory jsou spřaženy s G proteiny třídy G_i/G_o , které jsou citlivé k působení pertussis toxinu. Aktivace G proteinů této třídy má za následek inhibici enzymu adenyllyl cyklázy, inhibici napětově závislých vápníkových kanálů nebo aktivaci dovnitř usměrňujících draslíkových kanálů. OR jsou aktivovány jak endogenními opioidními peptidy, tak exogenními opioidy, z nichž některé mají značný význam pro klinickou praxi (Waldhoer et al., 2004). Významným představitelem je opiový alkaloid, morfin. Morfin je velmi účinné a stále používané analgetikum, jehož podávání způsobuje řadu nežádoucích vedlejších účinků. Dlouhodobá aplikace morfinu vede ke vzniku tolerance a závislosti. Mezi další nežádoucí účinky patří snížení střevní motility nebo útlum dýchání (Kieffer, 1999). Morfin primárně interaguje s μ -OR, ale ukázalo se, že účinky morfinu na organismus jsou částečně zprostředkovány i δ -OR. Studie „ δ -OR-deficientních“ myších modelů ukázala, že u těchto jedinců nedochází ke vzniku tolerance k morfinu (Zhu et al., 1999). Dále se zjistilo, že látky selektivní vůči δ -OR jsou účinnými analgetiky, a to především v případě léčby chronické bolesti (Gavériaux-Ruff a Kieffer, 2011). Jejich podání navíc nezpůsobuje takové množství vedlejších účinků jako podání morfinu. Vzhledem k těmto zjištěním má

tedy studium faktorů ovlivňujících funkční aktivitu δ -OR zcela zásadní význam a je zároveň nezbytnou podmínkou pro využití terapeutického potenciálu tohoto typu OR v klinické praxi.

Funkční aktivita GPCR je regulována prostřednictvím interakcí s různými buněčnými proteiny. Pozornost řady vědeckých skupin, které se zabývají výzkumem GPCR, byla dlouhou dobu téměř výhradně zaměřena tímto směrem. Význam vlivu lipidového prostředí plazmatické membrány, ve kterém jsou tyto receptory zanořeny, byl však dlouhou dobu podceňován, ne-li přehlížen.

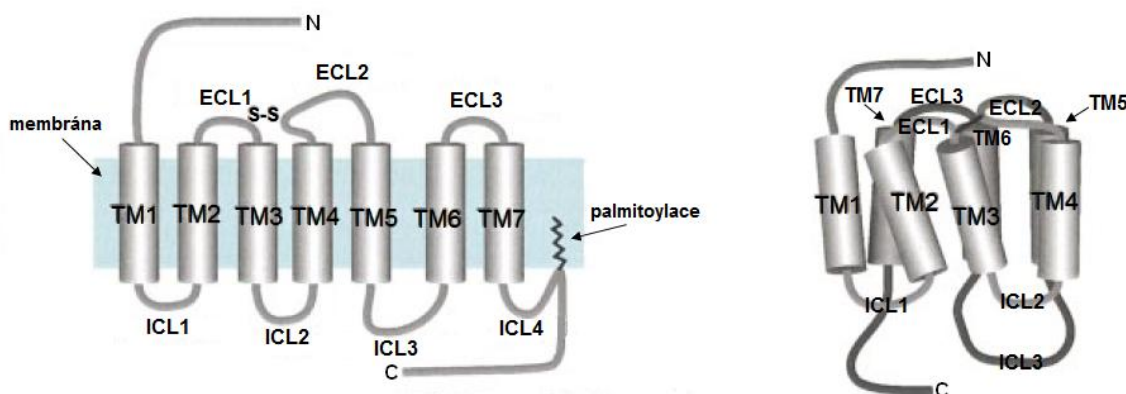
Největší skupinu lipidů plazmatické membrány tvoří glycerofosfolipidy, které jsou základním strukturním prvkem buněčných membrán savců. Mezi další významné lipidy plazmatické membrány patří sfingolipidy a cholesterol, přičemž právě cholesterol je významným regulátorem struktury a funkce plazmatické membrány. Molekuly cholesterolu jsou také důležitou součástí specifických membránových okrsků, které se označují jako membránové domény (Barenholz, 2002). Jedná se o dynamické struktury, které se podílí na regulaci distribuce a funkce řady proteinů plazmatické membrány. Mezi takové proteiny se kromě jiných řadí i GPCR, heterotrimerní G proteiny a některé jejich efekторы (Oh a Schnitzer, 2001; Chini a Parenti, 2004; Ostrom a Insel, 2004). Úloha membránových domén, potažmo samotného cholesterolu, v signalizaci GPCR však stále není dostatečně prozkoumána, přičemž výjimku netvoří ani δ -OR.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Receptory spřažené s G proteiny

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) tvoří největší rodinu proteinů v rámci genomu savců. Jedná se o transmembránové proteiny plazmatické membrány, které zprostředkovávají přenos extracelulárních signálů do nitra buňky. GPCR jsou velmi různorodou rodinou proteinů, což je patrné z rozmanitosti molekul ligandů, které se na tyto receptory vážou. Mezi ligandy GPCR patří biogenní aminy, peptidy, proteiny, aminokyseliny, ionty, lipidy, nukleotidy, fotony nebo odoranty.

Hlavním strukturálním znakem všech GPCR je transmembránová oblast tvořená sedmi úseky (TM1-TM7), které sestávají z 25-30 aminokyselin a prochází membránovou dvojrůstvou v podobě α -helixů stáčejších se v protisměru hodinových ručiček. Transmembránové úseky jsou spojeny třemi extracelulárními (ECL1-ECL3) a třemi intracelulárními (ICL1-ICL3) smyčkami. N-konec se nachází v extracelulárním prostoru, zatímco C-konec je umístěn v cytosolu (**Obr. 1**). Transmembránová oblast GPCR je z hlediska strukturální podobnosti (homologie) obecně velmi konzervovanou částí receptoru, což se však rozhodně nedá říci o koncových doménách. Společným rysem, co se týče mechanismu přenosu signálu, jak napovídá již samotné pojmenování těchto receptorů, je interakce receptorů s G proteiny, přesněji řečeno s heterotrimerními G proteiny (Bockaert a Pin, 1999). GPCR jsou však zapojeny i do signálních drah, které heterotrimerní G proteiny nezahrnují, a proto by možná bylo vhodnější používat pro tyto receptory označení "receptory sedmkrát procházející membránou" (*7TM receptors*). V literatuře lze narazit na použití obou názvů, ale označení GPCR se již vžilo natolik, že je stále používanější.



Obr. 1 Schematické znázornění struktury GPCR (převzato z práce Ji et al., 1998 a upraveno)

Za účelem členění GPCR bylo navrženo několik různých klasifikačních systémů. Zatímco podle některých systémů byly receptory řazeny do jednotlivých skupin či rodin podle umístění vazebného místa pro ligand, jiné systémy třídily receptory na základě kombinace fyziologických účinků a strukturních znaků. Podle jednoho z nejpopulárnějších klasifikačních systémů byly všechny známé GPCR obratlovců i bezobratlých rozděleny do šesti tříd označených A až F (Kolakowski, 1994). Třída A zahrnovala rhodopsinu podobné receptory, třída B receptory pro sekretin, glukagon, kalcitonin nebo parathyroidní hormon, třída C metabotropní glutamátové receptory a metabotropní receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_B receptory), třída D feromonové receptory kvasinek typu STE2, třída E feromonové receptory kvasinek typu STE3, a třída F zahrnovala receptory pro cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) vyskytující se u hlenky *Dictyostelium discoideum*. Z výčtu zástupců jednotlivých tříd je patrné, že některé třídy se nevyskytují u savců a jiné mají jen několik málo členů, které se vyskytují pouze u jednoho druhu organismu (Joseffson, 1999; Perez, 2003).

V roce 2003 publikoval vědecký tým ze Švédska, který provedl analýzu receptorů kódovaných lidským genomem, nový systém klasifikace GPCR. Receptory byly analyzovány podle kompletních aminokyselinových sekvencí. Tento typ analýzy byl dále podpořen fylogenetickou analýzou, která porovnávala aminokyselinové sekvence od první aminokyseliny TM1 po poslední aminokyselinu TM7. Receptory byly na základě získaných výsledků rozděleny do pěti rodin: Glutamátová (G), Rhodopsinová (R), *Adhesion* (A), *Frizzled/Taste2* (F) a Sekretinová (S). Tento systém klasifikace je souhrnně označován zavedeným akronymem GRAFS. Stejný vědecký tým publikoval o dva roky později také výsledky srovnávací analýzy GPCR vyskytujících se u různých druhů organismů. Výsledky této analýzy poskytly důkaz o tom, že systém GRAFS lze použít nejen pro klasifikaci GPCR u lidí, ale i pro klasifikaci GPCR jiných druhů obratlovců (Fredrikson a Schiöth, 2005).

Glutamátová rodina zahrnuje osm metabotropních glutamátových receptorů (mGluR), dva podtypy GABA_B receptoru (GABA_{B1} a GABA_{B2}), receptor aktivovaný extracelulárními vápenatými ionty (CaSR) a chuťové receptory označované jako TAS1. Tato skupina v podstatě odpovídá třídě C klasifikačního systému A-F. Vazebné místo pro ligand je u glutamátových receptorů umístěno na N-konci, jehož přibližná délka je 280-580 aminokyselin. N-konec receptoru tvoří dva „laloky“, které jsou odděleny prohlubní, do které se váže glutamát (tzv. *Venus fly trap*). N-konec GABA_B receptorů je ve srovnání s jinými GPCR velmi dlouhý, obsahuje vazebné místo pro ligand, ale postrádá sekvence

bohaté na cystein (Cys), které se naopak vyskytují v rámci N-konce CaSR a TAS1 receptorů.

Rhodopsinová rodina GPCR je nejobsáhlejší a odpovídá třídě A klasifikačního systému A-F. Charakteristickými znaky této rodiny jsou motiv NSxxNPxxY v TM7 a motiv DRY/D(E)-R-Y(F) na rozhraní mezi TM3 a ICL2. Místo pro vazbu ligandu je tvořeno prohlubní mezi transmembránovými úseky. Existují však i výjimky z tohoto pravidla, jako jsou receptory pro glykoproteiny, které mají vazebné místo pro ligand umístěno na N-konci. Rhodopsinovou rodinu GPCR lze rozdělit do čtyř hlavních skupin, označovaných jako α , β , γ , a δ . Skupina α obsahuje rhodopsin, receptory pro prostaglandiny, melatonin, katecholaminy, dopamin, serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) a acetylcholinové receptory muskarinového typu (M receptory). Do skupiny β se řadí receptory pro peptidové ligandy, jako jsou cholecystokinin (CCK), hormon uvolňující thyreotropin (TRH), hormon uvolňující gonadotropin (GnRH), gastrin uvolňující peptid, ghrelin, arginin-vazopresin, oxytocin (OT), tachykininy, neuropeptid FF, neuropeptid Y, neuromedin B a neurotensin. Skupina γ zahrnuje receptory pro galanin, somatostatin, opioidy a chemokiny. Do skupiny δ byly zařazeny receptory pro hormony glykoproteinové povahy, jako jsou luteinizační hormon (LH), folikuly stimulující hormon (FSH) a thyreotropin (TSH), dále pak receptory pro nukleotidy nebo formyl peptid.

Rodina *Adhesion* je poměrně novou a velmi specifickou rodinou GPCR. Název této rodiny je odvozen od přítomnosti specifických motivů (*adhesion-like motifs*), které existují v rámci relativně dlouhého N-konce (200-2800 aminokyselin) receptoru a hrají důležitou úlohu při adhezi buněk. Některé receptory této rodiny byly dříve označovány jako *sekretin-like* (sekretinu podobné) a byly tudíž řazeny do stejné třídy jako sekretinové receptory (třída B). Fylogenetická analýza ale jasně ukázala, že tento typ receptorů tvoří samostatnou rodinu.

Rodina *Frizzled/Taste2* sdružuje takzvané *frizzled* receptory a chuťové receptory označované jako TAS2. *Frizzled* receptory zprostředkovávají signalizaci sekretovaných glykoproteinů typu Wnt, čímž kontrolují proliferaci a osud jednotlivých buněk v průběhu vývoje organismu. Tyto receptory mají 200 aminokyselin dlouhý N-konec obsahující konzervované cysteiny, které se podílí na vazbě Wnt ligandu. Označení *frizzled* je odvozeno od struktury Wnt ligandu a dalo by se přeložit jako stočený nebo zkroucený. TAS2 receptory nevykazují žádnou jasnou podobnost s TAS1 receptory, které jsou řazeny do glutamátové rodiny. TAS2 receptory mají velmi krátký N-konec. Tato skutečnost podporuje názor, že vazebné místo pro ligand se na jejich N-konci s velkou

pravděpodobností nevyskytuje. TAS2 receptory jsou kromě chuťového epitelu jazyka přítomny ještě v epitelu ústního patra. O jejich funkci se toho zatím příliš mnoho neví, ale má se za to, že se jedná o receptory, které zprostředkují vnímání hořké chuti.

Sekretinová rodina zahrnuje receptory, jejichž ligandy jsou relativně velké peptidy, které většinou fungují v rámci parakrinního typu sekrece. Název této rodiny je odvozen od receptoru pro sekretin, který byl jejím prvním klonovaným členem. Sekretinová rodina odpovídá třídě B klasifikačního systému A-F. N-konec těchto receptorů je dlouhý 60-80 aminokyselin. Postranní řetězce cysteinů v rámci N-konce receptoru jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky, které jsou důležité pro vazbu ligandu. Mezi členy této rodiny patří receptory pro sekretin, kalcitonin, glukagon, kortikotropin uvolňující faktor (CRF), hormon uvolňující růstový hormon (GHRH), polypeptid inhibující žaludek (GIP), vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP) a parathormon (Fredriksson et al., 2003).

Z databáze NC-IUPHAR je zřejmé, že historicky původní systém klasifikace GPCR do tříd A, B a C je stále plně uznávaný a používán. Z klasifikace používané pro účely této databáze dále vyplývá, že nový poznatek vyplývající z fylogenetické analýzy, na základě kterého se *adhesion* a sekretinové receptory dělí do dvou samostatných rodin, byl odborníky nejen zaznamenán, ale i akceptován (www.iuphar-db.org).

Výše uvedený seznam dosud známých receptorů spřažených s G proteiny (GPCR) jasně ukazuje, že ligandy těchto receptorů tvoří velmi rozsáhlou skupinu hormonů a neuropřenašečů (neurotransmiterů). Tyto receptory rovněž zprostředkují přenos světelných, zvukových, chuťových, pachových a tlakových signálů do nitra příslušných specializovaných buněk a následné vnímání těchto fyzikálních dějů celým organismem. Je proto možno říci, že přenos signálu prostřednictvím GPCR má zásadní význam pro řízení a regulaci **všech** fyziologických procesů a funkcí: přenos nervových vzruchů a hormonálních signálů, růst, vývoj a funkční specializaci různých individuálních buněčných typů organismu s následnou koordinací a integrací činnosti těchto buněk v rámci organismu jako celku. Do spektra fyziologických účinků či projevů GPCR dále patří regulace buněčného metabolismu, diferenciaci buněk, vnímání vizuálních, čichových a chuťových podnětů, řízení činnosti srdce i všech dalších orgánů savčího organismu včetně jeho endokrinních a reprodukčních funkcí.

Pro zásadní fyziologický význam GPCR svědčí i skutečnost, že zhruba polovina celosvětově předepisovaných léků uplatňuje svůj terapeutický účinek právě prostřednictvím interakce s tímto typem receptorů. V této souvislosti je rovněž třeba říci, že současný stav léčby využívající ligandy GPCR není v řadě případů optimální. Tato

skutečnost je hnací silou pro farmaceutický průmysl a tudíž i důvodem vynakládání značných finančních prostředků na vývoj a syntézu nových léčebných přípravků, jejichž struktura je navrhována na základě podrobné analýzy struktury vazebného místa GPCR pro ligandy. Zvláštní pozornost je v této souvislosti v poslední době věnována přípravě *alosterických ligandů*, tj. ligandů, které jsou schopny ovlivňovat funkci receptoru nejen přes klasické, tj. *orthosterické* vazebné místo, ale i nepřímo, tj. změnou konformace receptoru primárně vyvolanou interakcí ligandu s jinou částí receptoru než je *orthosterické* vazebné místo.

Interakce ligandu s receptorem závisí především na struktuře receptoru, jejíž znalost má tedy pro syntézu nových ligandů zásadní význam. Znalost struktury receptorů může dále pomoci objasnit význam intracelulárních oblastí receptoru pro interakci s intracelulárními signalizačními a regulačními partnery. Vědci předních světových laboratoří zabývající se výzkumem GPCR z tohoto důvodu věnují zjištění struktury těchto receptorů velké úsilí. Jedná se však o obtížný úkol. Pro zjištění struktury je nejprve nutné mít k dispozici dostatečné množství receptorových proteinů, které je nutno nejprve vyjmout (izolovat) z prostředí lipidové dvojvrstvy membrány v nativním, plně funkčním stavu. Následně je možné receptory krystalizovat a určit jejich trojrozměrnou (3D) strukturu metodou difrakce rentgenových paprsků. Izolace membránových proteinů a jejich krystalizace, je však na rozdíl od solubilních proteinů značně obtížná, neboť stabilita jejich prostorového uspořádání je podmíněna přítomností hydrofobních lipidových molekul membránové dvojvrstvy. Všechna „krystalizační media“ proto obsahují složitou směs detergentů a lipidů.

Nejprozkoumanějšími zástupci GPCR jsou rhodopsin a β_2 -adrenergní receptor (β_2 -AR). Ligandem rhodopsinu jsou fotony světla, tj. kvanta viditelné části spektra slunečního záření. Konformační změna rhodopsinu, ke které dochází po absorpci kvanta světelného záření, proto představuje primární a základní molekulární princip vidění. Příkladně, mutace postihující příslušné genové lokusy kódující informaci pro syntézu rhodopsinu jsou u lidí příčinou některých typů hereditárních chorioretinálních dystrofií. Zájem o studium β -AR (později rozlišených na β_1 -AR, β_2 -AR a β_3 -AR) na počátku sedmdesátých let 20. století byl vyvolán hned několika podněty najednou (Lefkowitz, 2004). Prvním z těchto podnětů bylo zjištění schopnosti katecholaminů aktivovat enzym adenylyl cyklázu (AC) v srdečním svalu. Mechanismus aktivace adenylyl cyklázy byl v tehdejší době zcela neznámý a do formulace úlohy G proteinů jako bílkovin stojících funkčně i strukturně *mezi* receptorem a AC bylo ještě daleko (Rodbell, 1980; Gilman,

1987; Freissmuth et al., 1989; Birnbaumer, 1990; Kaziro et al., 1991). AC byla nově objeveným, intenzivně studovaným, avšak málo prozkoumaným enzymem. První snahou Lefkowitze a spolupracovníků bylo jasně prokázat existenci proteinové molekuly, která by vážala ligandy s povahou β -adrenergních agonistů, tj. noradrenalin, adrenalin a isoprenalin. Jinými slovy, skupina Lefkowitze se snažila jednoznačně prokázat existenci β -AR jako takových, resp. zjistit, na jakých proteinových molekulách se nacházejí vazebná místa pro tyto ligandy (Lefkowitz, 2004). Myšlenka existence nezávislých proteinů funkčně specializovaných *pouze* na vazbu ligandu, které by byly jednoznačně ve strukturním slova smyslu odlišné od molekuly AC, nebyla v této době všeobecně přijímána. Vazebné místo pro ligand (katecholaminy) mohlo být stejně dobře lokalizováno v jiné části proteinové molekuly AC než je její aktivní centrum, tj. katalytická doména.

Druhým podnětem byl možný přínos pro klinickou praxi, který byl způsoben syntézou nových léčiv, *β -blokátorů*, tj. ligandů blokujících účinek katecholaminů na srdeční sval - propranolol, alprenolol, dihydroalprenolol, pindolol, cyanopindolol, practolol, carazolol a řada dalších. Bylo zjištěno, že se jedná o látky s významnou účinností při léčbě kardiovaskulárních chorob, jako jsou srdeční arytmie nebo některé typy hypertenze (propranolol). V neposlední řadě zde byly i důvody praktického rázu, jako nezbytnost zavedení nových metod umožňujících kvantitativní detekci receptorů v dané tkáni. Dostupnost velkého množství ligandů β -adrenergních receptorů, agonistů i antagonistů, současně skýtala solidní základ pro syntézu radioaktivně značených derivátů těchto ligandů (specifických radioligandů), které bylo možno následně použít pro přímé vazebné studie receptorů v izolovaných buňkách nebo membránových frakcích. Neradioaktivní *β -blokátor* alprenolol byl po imobilizaci na matici použit pro izolaci β_2 -AR s pomocí afinitní chromatografie. Příprava vysoce čisté bílkoviny β_2 -AR následně umožnila klonování tohoto receptoru (Lefkowitz, 2004).

Hovězí rhodopsin se stal prvním receptorem, jehož trojrozměrná struktura byla zjištěna (Palczewski et al., 2000; Okada et al., 2000). Výhodou studia rhodopsinu je jeho snadná dostupnost. Rhodopsin se přirozeně vyskytuje ve velkém množství ve vnějším segmentu tyčinek sítnice. Množství rhodopsinu potřebné pro účely krystalizace bylo získáno preparací sítnice získané z oka hovězího dobytka, neboť dostupnost tohoto materiálu nepředstavovala nijak velký problém. Výtěžnost izolace rhodopsinu byla vysoká a purifikace tohoto proteinu nebyla díky vysoké úrovni obsahu receptoru v použité tkáni téměř zapotřebí (Lefkowitz, 2004).

V případě receptorů pro hormony a neuropřenašeče byla však situace o poznání složitější. Tyto receptory se totiž na rozdíl od rhodopsinu nevyskytují v přirozených tkáních v množství dostatečném pro biofyzikální studie, a jsou navíc po izolaci detergenty z membrány mnohem méně stabilní. Tato omezení se samozřejmě vztahují i na β_2 -AR. Zásadním počinem skýtajícím možné řešení nedostatku materiálu bylo klonování β_2 -AR v osmdesátých letech 20. století. V návaznosti na zjištění primární sekvence aminokyselin β_2 -AR byl vytvořen funkční protokol pro expresi a purifikaci dostatečného množství receptorových proteinů pro účely biofyzikálních a biochemických studií, které přispěly k identifikaci strukturních změn receptoru vyvolaných vazbou agonisty. Souhrnným výsledkem provedených experimentů bylo zjištění, že β_2 -AR je velmi dynamickým proteinem, jehož nejvíce flexibilními oblastmi jsou intracelulární část TM5 a TM6, a ICL3, která tyto dva transmembránové úseky spojuje. Dynamická povaha (konformační flexibilita) receptoru se však ukázala být překážkou úspěšné krystalizace proteinu. Tento problém byl následně vyřešen s pomocí dvou různých přístupů zaměřených na snížení flexibility uvedených oblastí receptoru (Kobilka, 2013). Jedním přístupem bylo navázání fragmentu monoklonální protilátky (Fab) na ICL3, druhým pak nahrazení flexibilní oblasti receptoru lysozymem T4 (T4L). T4L je velmi stabilní solubilní protein, který lze snadno krystalizovat, a byl zvolen proto, že se ukázal být vhodným kandidátem k umístění mezi intracelulární konce TM5 a TM6 receptoru. Využití obou těchto přístupů v kombinaci s lipidovými nosiči (např. směs lipidů a detergentu) nakonec v roce 2007 vyústilo v získání prvních krystalů β_2 -AR. Lidský β_2 -AR se tak stal druhým GPCR, jehož trojrozměrná struktura byla odhalena (Rasmussen et al., 2007; Kobilka a Schertler, 2008).

Od té doby byla díky dalšímu neustálému zlepšování postupů purifikace a krystalizace membránových receptorů odhalena struktura řady dalších GPCR, jako jsou β_1 -AR (Warne et al., 2008), A_{2A} adenosinový receptor (Jaakola et al., 2008), D_3 dopaminový receptor (Chien et al., 2010), chemokinový receptor CXCR4 (Wu et al., 2010), H_1 histaminový receptor (Shimamura et al., 2011), receptor pro sfingosin-1 fosfát typu $S1P_1$ (Hanson et al., 2012), M_2 a M_3 receptor (Haga et al., 2012; Kruse et al., 2012), proteázou aktivovaný receptor typu PAR1 (Zhang et al., 2012), chemokinový receptor CXCR1 (Park et al., 2012), μ , δ , κ i N/OFQ opioidní receptor (Manglik et al., 2012; Granier et al., 2012; Wu et al., 2012; Thompson et al., 2012), neurotensinový receptor NTS_1 (White et al., 2012) $5-HT_{1B}$ a $5-HT_{2B}$ receptor (Wang et al., 2013; Wacker et al., 2013). Ve většině případů byly ke krystalizaci použity receptory s navázaným antagonistou nebo inverzním agonistou. V případě NTS_1 receptoru (White et al., 2012), rhodopsinu

(Scheerer et al., 2008; Standfuss et al., 2011; Choe et al., 2011; Deupi et al., 2012), β_2 - a β_1 -AR (Rasmussen et al., 2011a,b; Rosenbaum et al., 2011; Warne et al., 2011; Warne et al., 2012), A_{2A} adenosinového receptoru (Lebon et al., 2011; Xu et al., 2011) a 5-HT_{1B} a 5-HT_{2B} receptorů (Wang et al., 2013; Wacker et al., 2013) jsou již známy i struktury receptoru s navázaným částečným (*partial*) nebo plným (*full*) agonistou. Zlomovým objevem v oblasti krystalizace GPCR bylo ale teprve odhalení struktury komplexu aktivní formy receptoru (s navázaným agonistou) s G proteinem. Jednalo se konkrétně o komplex monomerního β_2 -AR receptoru s heterotrimerním G proteinem třídy G_s bez navázaného nukleotidu (Rasmussen et al., 2011b).

Na rozdíl od výše uvedených GPCR, které náleží do třídy A, byla znalost trojrozměrné struktury GPCR třídy B až do nedávné doby omezena pouze na extracelulární N-koncovou doménu. Průlom nastal až v minulém roce (2013), kdy se dvěma vědeckým týmům podařilo krystalizovat transmembránovou oblast receptorů pro CRF (CRF₁ receptor) a glukagon (Hollenstein et al., 2013; Siu et al., 2013). V obou případech byl zvolen postup, kdy byla nativní N-koncová doména receptoru odstraněna, což významně zvýšilo stabilitu receptorů a usnadnilo tak proces krystalizace.

V případě GPCR třídy C, je zatím známa jen struktura extracelulárních domén několika málo receptorů. Jedná se o struktury extracelulárních domén tří typů metabotropních glutamátových receptorů (Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002; Muto et al., 2007), ke kterým se nově řadí i struktura heterodimerního komplexu extracelulárních domén GABA_{B1} a GABA_{B2} receptorů (Geng et al., 2013).

Znalost trojrozměrné struktury různých typů GPCR odhalila rozdílná uspořádání extracelulární oblasti receptoru. Extracelulární oblasti některých receptorů jsou uspořádány tak, že zakrývají vazebné místo pro ligand. Takové skryté vazebné místo pro ligandy mají například rhodopsin nebo S1P₁ receptor. Jiné receptory, jako adenosinový, β -adrenergní nebo opioidní receptory, mají naopak vazebné místo relativně exponované okolnímu prostředí. Elementem vymezujícím přístupovou cestu ligandu do vazebného místa receptoru je v případě těchto receptorů ECL2, jejíž sekundární struktura může mít jak podobu α -helixu, tak podobu β -listu. Výsledky simulací molekulární dynamiky β_2 -AR nasvědčují tomu, že se ECL2 účastní rozpoznávání ligandů, a je tak jednou z oblastí určujících selektivitu receptoru pro ligand (Dror et al., 2011). Specifickým rysem extracelulární oblasti receptoru je přítomnost disulfidických můstků, které pomáhají udržovat stabilitu receptoru. Disulfidických můstků se v extracelulární oblasti receptoru obvykle vyskytuje několik, ale pouze jeden z nich je společný pro naprostou většinu GPCR

třídy A. Tento disulfidický můstek spojuje Cys^{3.25} v TM3 s ECL2, čímž udržuje extracelulární část TM3 v blízkosti vazebného místa pro ligand a zároveň omezuje rozsah konformačních změn této oblasti vyvolaných aktivací receptoru (Katritch et al., 2013).

Místo pro vazbu ligandu je u většiny GPCR třídy A shodně tvořeno prohlubní mezi transmembránovými úseky receptoru. Struktura ligandů je ovšem velmi různorodá a proto není s podivem, že se některé z ligandů do prohlubně vazebného místa zanořují více, jiné méně. Kontaktní místa pro ligand se u všech receptorů, jejichž struktura je známa, vyskytují v rámci transmembránových úseků (TM). Výjimku tvoří pouze CXCR4 a NTS₁ receptor. Vlastní kontaktní místa pro jednotlivé části ligandu tvoří téměř u všech receptorů postranní řetězce topologicky ekvivalentních aminokyselin, které se nacházejí v TM3, TM6 a TM7. Tato kontaktní místa jsou společná pro všechny ligandy bez rozdílu v jejich struktuře. Konkrétně se jedná o postranní řetězce aminokyselin v pozicích 3.32, 3.33, 3.36, 6.48, 6.51 a 7.39 (Venkatakrishnan et al., 2013). Dvojice čísel charakterizující polohu aminokyselin v transmembránové oblasti molekuly receptoru odpovídá specifickému číslovacímu algoritmu, jehož autory jsou Ballesteros a Weinstein. V literatuře se lze běžně setkat s označením „*Ballesteros-Weinstein numbering*“ (Ballesteros a Weinstein, 1995). Číslo před tečkou uvádí pořadové číslo TM. Číslo za tečkou vymezuje pozici dané aminokyseliny vůči nejvíce konzervované aminokyselině v rámci daného TM, jejíž pozice je (čistě pracovní) označena číslem 50. Aminokyselině nacházející se v rámci daného TM blíže N-konci receptoru než je konzervovaná aminokyselina, je pak přiřazeno číslo < 50. Aminokyselině nacházející se v rámci daného TM blíže C-konci receptoru než je konzervovaná aminokyselina, je naopak přiřazeno číslo > 50.

Velmi důležitým výsledkem studia trojrozměrné struktury GPCR s pomocí krystalů s vysokým rozlišením (1.8-2.4 Å) bylo zjištění, že kromě postranních řetězců aminokyselin se na kontaktu ligandu s receptorem podílejí významným způsobem i molekuly vody. Lze proto říci, že při interakci ligandů s receptorem lze jednoznačně rozlišit dva typy molekul vody: *bulk water*, tedy molekuly ve vodném okolí membrány obsahující GPCR a molekuly vody pevně vázané na bílkovinu receptoru. Kromě těchto „vod“ je třeba se zmínit ještě o molekulách vody, které jsou vázány na polární, povrchovou část lipidové matrice membrány, tvořenou polárními hlavičkami fosfolipidů (Liu et al., 2012; Fenalti et al., 2014).

Systematická analýza známých struktur GPCR odhalila přítomnost soustavy 24 nekovalentních interakcí vzájemně propojujících transmembránové úseky receptoru, která je totožná pro (téměř) všechny GPCR třídy A. Tyto nekovalentní interakce jsou

tvořeny postranními řetězci celkem 36 aminokyselin v topologicky ekvivalentních pozicích v rámci jednotlivých TM receptoru. Strukturní lokalizaci těchto nekovalentních interakcí uvádí následující sestava čísel. Pozice aminokyselin je opět označena algoritmem podle Ballestera a Weinsteina, jehož princip je vysvětlen výše. Dvojtečka odděluje jednotlivé aminokyseliny, jejichž postranní řetězce tvoří zmíněné nekovalentní interakce. Příkladně, postranní řetězec aminokyseliny v TM1 (1.46) interaguje s postranním řetězcem aminokyseliny v TM7 (7.47).

1.46:7.47	1.49:7.50	1.50:2.47	1.50:2.50	1.50:7.46	1.53:2.47
1.57:2.44	2.42:3.46	2.43:7.53	2.50:7.46	3.34:4.53	3.34:4.57
3.36:6.48	3.38:4.50	3.38:4.53	3.40:6.44	3.44:5.54	3.47:5.57
3.51:5.57	3.51:5.60	5.54:6.41	6.47:7.45	6.51:7.38	6.51:7.39

Uvedené nekovalentní interakce tvoří shluky na rozhraní TM1-TM2, TM3-TM4, TM3-TM5 a TM3-TM6-TM7. Oblastí jejich výskytu je převážně centrální oblast a cytoplazmatická strana transmembránových úseků receptoru. Důležitost těchto kontaktů mezi TM pro zachování optimální konformace receptoru byla experimentálně ověřena. Mutace 14 z 36 aminokyselin měla za následek snížení nebo zvýšení aktivity receptoru. Mezi uvedených 36 topologicky ekvivalentních aminokyselin patří i vysoce konzervované aminokyseliny jako Asn^{1.50}, Asp^{2.50}, Trp^{4.50} a Pro^{7.50}.

Intracelulární část receptoru je oblastí, která zprostředkuje interakci s proteiny signálních kaskád (heterotrimerní G proteiny a jejich efekty) a regulačními proteiny (kinázy a arrestiny). Tato oblast také obsahuje několik konzervovaných aminokyselin. Jsou jimi například Arg v ICL2 opioidních a muskarinových receptorů nebo Tyr v ICL2 některých aminergních receptorů, které tvoří solný, respektive vodíkový můstek, s Asp^{3.49} DRY motivu v TM3. Tato interakce pomáhá udržovat stabilní konformaci receptoru. ICL2 a DRY motiv (tentokrát Arg^{3.50}) hrají také významnou roli v rámci aktivní konformace receptoru, jelikož tvoří důležitá kontaktní místa pro interakci s G proteinem (Venkatakrishnan et al., 2013).

Intracelulární oblast receptoru je rovněž cílem posttranslačních modifikací, jmenovitě palmitoylace a fosforylace. Palmitoylace, tedy kovalentní připojení palmitátu, byla poprvé zaznamenána v případě rhodopsinu a to již v roce 1984 (O'Brien a Zatz, 1984). O několik let později byla určena místa, kam se palmitát připojuje (Ovchinnikov et al., 1988). Jedná se o postranní řetězce cysteinů (Cys³²² a Cys³²³) přítomných na C-konci receptoru, přičemž Cys³²² se nachází v pozici vzdálené 14 aminokyselin od rozhraní membrány s cytosolem. Zjištění této relativně dlouhé vzdálenosti míst palmitoylace od

konce posledního transmembránového úseku vedlo autory k domněnce, že zanořením palmitátu do membrány by mohla v rámci intracelulární oblasti receptoru vzniknout čtvrtá intracelulární smyčka (Ganter et al., 1992). Tato domněnka byla později potvrzena prostřednictvím biochemických i biofyzikálních metod. S pomocí struktury krystalu hovězího rhodopsinu se zjistilo, že tato čtvrtá intracelulární smyčka má podobu amfipatického helixu, který je označován jako H8, a který má na svém C-konci místo pro připojení palmitátu (Palczewski et al., 2000). Krystalizace a rozluštění struktury dalších receptorů poskytlo důkazy o tom, že přítomnost H8 je relativně běžným strukturním rysem GPCR třídy A. Výjimku tvoří CXCR4, NTS₁ receptor a PAR1 receptor, u nichž tento úsek C-koncové oblasti nenabývá podoby helixu (Venkatakrisnan et al., 2013). Místem pro fosforylaci receptoru jsou postranní řetězce několika aminokyselin vyskytujících se v rámci C-konce a ICL3. Fosforylace receptoru je součástí systému regulačních mechanismů, ovlivňujících aktivitu receptoru, o kterých bude pojednáno v kapitole 2.5 (Desenzitizace a endocytóza).

2.2. Heterotrimerní G proteiny

Rodina heterotrimerních G proteinů není zdaleka tak početná a různorodá jako rodina GPCR, zato je skupinou evolučně velmi starou a konzervovanou. Heterotrimerní G proteiny jsou tvořeny třemi různými podjednotkami označovanými jako G α , G β a G γ . V současné době je známo 16 genů kódujících G α podjednotku, 5 genů kódujících G β podjednotku a 12 genů kódujících G γ podjednotku (Downes a Gautam, 1999). G α podjednotka je místem vazby guaninových nukleotidů, guanosindifosfátu (GDP) nebo guanosintrifosfátu (GTP). G β podjednotka se za fyziologických podmínek vyskytuje v buňce ve formě stabilního dimeru s G γ podjednotkou, k jehož rozpadu dochází pouze za silně denaturujících podmínek. Výjimku tvoří dimery obsahující G β_5 , k jejichž rozpadu dochází i za fyziologických podmínek, neboť G β_5 podjednotka se na G γ neváže tak pevně jako ostatní G β podjednotky (Wettschureck a Offermanns, 2005). Teoretických variant spojení G β a G γ podjednotek jsou desítky. Většina těchto variant ale nemá funkční význam nebo ani nevzniká. Příkladně G β_3 podjednotka se nikdy nespojuje s G γ_1 ani s G γ_2 podjednotkou (Cabrera-Vera et al., 2003).

G proteiny se dělí podle typu G α podjednotek do čtyř tříd nesoucích označení: G_s, G_i/G_o, G_q/G₁₁ a G₁₂/G₁₃. Součástí každé třídy je několik zástupců, kteří interagují s různými typy efektorů.

Třída G_s

G proteiny náležící do této skupiny obsahují v rámci svého heterotrimerního komplexu podjednotky $G_s\alpha$ nebo $G_{olf}\alpha$. Podjednotky $G_s\alpha$ se vyskytují v různých tkáních a existují ve třech různých variantách, které se liší délkou řetězce aminokyselin. Tyto varianty vznikají alternativním sestřihem transkriptu (mRNA) téhož genu a označují se jako $G_{s(S)}\alpha$, $G_{s(L)}\alpha$ a $G_{s(XL)}\alpha$. Výskyt podjednotky $G_{olf}\alpha$ je naproti tomu tkáňově specifický, neboť tento typ $G\alpha$ podjednotky se nachází pouze v čichovém epitelu.

G_s proteiny aktivují všechny membránově vázané izoformy enzymu adenylyl cyklázy (ACI-IX). AC katalyzuje tvorbu cAMP, který slouží v buňkách jako takzvaný druhý posel. Charakteristickým rysem G proteinů této třídy je jejich citlivost k cholera toxinu, což je exotoxin produkovaný bakterií *Vibrio cholerae*. Tento toxin funguje jako ribosyl-trasferáza, která ireverzibilním připojením adenosindifosfátu (ADP) modifikuje aktivní formu α podjednotky G proteinu v poloze Arg²⁰¹. Takto modifikovaná $G\alpha$ podjednotka nemůže být inaktivována a způsobuje tak permanentní stimulaci aktivity adenylyl cyklázy. Dalšími proteiny, jejichž aktivitu zástupci této třídy G proteinů stimulují, jsou GTPáza tubulinu nebo tyrosin kinázy typu Src (c-Src, Hck).

Třída G_i/G_o

Tato třída zahrnuje nejvíce zástupců. Patří sem proteiny obsahující podjednotky $G_i\alpha$, $G_o\alpha$, $G_t\alpha$, $G_{gust}\alpha$ a $G_z\alpha$. G proteiny, jejichž součástí jsou podjednotky $G_t\alpha$ a $G_{gust}\alpha$, se obvykle označují jako transducin, respektive gustducin.

Podjednotky $G_i\alpha$ existují ve třech variantách označovaných jako $G_{i1}\alpha$, $G_{i2}\alpha$ a $G_{i3}\alpha$, které jsou kódovány třemi nezávislými geny. V případě podjednotky $G_o\alpha$ jsou známy dvě varianty, $G_{o1}\alpha$ a $G_{o2}\alpha$, které, podobně jako varianty $G_s\alpha$, vznikají alternativním sestřihem transkriptu téhož genu. $G_{i2}\alpha$ a $G_{i3}\alpha$ lze nalézt v hojném množství v řadě různých typů tkání, zatímco výskyt $G_{i1}\alpha$ a variant $G_o\alpha$ je specifický pro tkáň neuroendokrinní povahy. $G_t\alpha$ se v organismu rovněž vyskytuje ve dvou variantách, které jsou přítomny v odlišných typech světločivých buněk sítnice oka. $G_{i1}\alpha$ se nachází v tyčinkách, zatímco $G_{i2}\alpha$ v čípcích. Místem výskytu gustducinu jsou chuťové pohárky jazyka a chemoreceptory dýchacích cest. Podjednotka $G_z\alpha$ se nachází v krevních destičkách a neurosekrečních buňkách (Wettschureck a Offermanns, 2005).

G proteiny této třídy inhibují aktivitu AC a napětově závislých vápníkových kanálů, ale působí také aktivačně, například na fosfodiesterázu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), dovnitř usměrňující draslíkový kanál (GIRK) nebo

mitogeny aktivované protein kinázy (MAPK). Typickým znakem proteinů této třídy je citlivost k pertussis toxinu (PTX), což je exotoxin produkovaný bakterií *Bordetella pertussis*. PTX také funguje jako ADP-ribosyl-trasferáza, jako je tomu v případě cholera toxinu, ale v tomto případě je cílem ireverzibilního připojení ADP inaktivní forma $G_i\alpha$ podjednotky. Tato modifikace má tedy za následek inhibici signalizace prostřednictvím G_i/G_o proteinů, neboť blokuje aktivaci $G_i\alpha$ podjednotky. Cílovým místem ADP-ribosylace je Cys v poloze -4 od C-konce $G_i\alpha$ podjednotky. Výjimku v rámci této třídy G proteinů tvoří $G_{z\alpha}$, která je vůči působení PTX necitlivá (Milligan a Kostenis, 2006).

Třída G_q/G_{11}

Zástupci této třídy jsou proteiny obsahující $G\alpha$ podjednotky $G_{q\alpha}$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$, $G_{15\alpha}$ a $G_{16\alpha}$. Podjednotky $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ jsou takřka všudypřítomné, zatímco výskyt ostatních zástupců této třídy je tkáňově specifický. $G_{15\alpha}$ a $G_{16\alpha}$ se kupříkladu vyskytují převážně v hematopoetických buňkách. Zvláštností G proteinu obsahujícího $G_{16\alpha}$, která je lidskou izoformou myši $G_{15\alpha}$, je jeho promiskuitní chování, neboť jeho aktivaci lze docílit prostřednictvím široké škály GPCR.

G_q/G_{11} proteiny aktivují fosfolipázu $C\beta$ (PLC β) a nejsou citlivé k působení cholera toxinu ani pertussis toxinu. $G_{q\alpha}$ podjednotka je však citlivá k působení toxinu produkovaného bakterií *Pasteurella multocida* (Zywietz et al., 2001). Tento toxin způsobuje deamidaci postranního řetězce specifického Gln (Gln²⁰⁹), čímž brání inaktivaci $G_{q\alpha}$ podjednotky. $G_{q\alpha}$ podjednotka tak zůstává permanentně aktivní (Orth et al., 2009).

Třída G_{12}/G_{13}

Tato třída G proteinů zahrnuje pouze 2 zástupce, kterými jsou G proteiny obsahující podjednotku $G_{12\alpha}$ a $G_{13\alpha}$. $G_{12\alpha}$ a $G_{13\alpha}$ jsou všudypřítomné a v řadě případů jsou aktivovány prostřednictvím GPCR, které jsou rovněž spřaženy s proteiny třídy G_q/G_{11} (Wettschureck a Offermanns, 2005). G proteiny G_{12}/G_{13} aktivují například fosfolipázu D (PLD), PLC ϵ , Na⁺/H⁺ výměník (NHE-1) nebo inducibilní formu NO syntázy (iNOS) (Cabrera-Vera et al., 2003). Obecně nejvýznamnější funkcí G_{12}/G_{13} proteinů je regulace buněčné proliferace, pohybu a morfologie, přičemž defekty jejich aktivity způsobují zhoubné bujení (kancerogenesi) a srdeční nedostatečnost (Worzfeld et al., 2008). V rámci těchto aktivit jsou G_{12}/G_{13} proteiny funkčně propojeny s aktivitou tzv. malých, neboli monomerních G proteinů (příkladně *Rho*). Monomerní G proteiny (*Ras superfamily*) s relativní molekulovou hmotností \approx 20-25 kDa, lze rozdělit do 5 základních tříd (Ras,

Ran, Rho, Rab a Arf), které celkově obsahují zhruba 200 různých bílkovin podílejících se na regulaci široké škály nitrobuněčných dějů včetně nitrobuněčného transportu membránových vezikulů (Wennerberg et al., 2005)

2.3. Lipidové modifikace heterotrimerních G proteinů

Heterotrimerní G proteiny jsou periferní membránové proteiny, jejichž přítomnost na intracelulární straně plazmatické membrány (PM) je základním předpokladem pro receptorem zprostředkovaný přenos extracelulárního signálu do nitra buňky (Marrari et al., 2007). Interakci G proteinu s membránou zajišťují molekuly lipidů, mastné kyseliny nebo isoprenoidy, kovalentně připojené na $G\alpha$ a $G\gamma$ podjednotky. Tyto molekuly lipidů slouží jako hydrofobní membránové kotvy, neboť se zanořují přímo mezi lipidy intracelulárního listu PM. K připojení molekul lipidů, lipidové modifikaci, dochází buď ještě v průběhu proteosyntézy $G\alpha$ a $G\gamma$ podjednotek, neboli kotranslačně, nebo těsně po ukončení translace, tedy posttranslačně (Escribá et al., 2007).

$G\alpha$ podjednotky jsou modifikovány připojením kyseliny palmitové (palmitátu) nebo kyseliny myristové (myristátu), případně obou těchto nasycených mastných kyselin. $G\alpha$ podjednotky proteinů třídy G_i/G_o jsou modifikovány prostřednictvím myristoylace, tedy kovalentního připojení myristátu. Tento typ modifikace probíhá kotranslačně a je zprostředkován enzymem N-myristoyl transferázou. N-myristoyl transferáza katalyzuje ireverzibilní připojení myristátu amidovou vazbou na Gly nacházející se ve druhé pozici na N-konci těchto $G\alpha$ podjednotek. V případě podjednotek $G_{t\alpha}$ a $G_{\text{gust}\alpha}$ je myristoylace jediným typem lipidové modifikace. Podjednotky $G_{i\alpha}$, $G_{o\alpha}$ a $G_{z\alpha}$ naproti tomu podléhají dvěma různým typům lipidových modifikací, neboť jsou, kromě připojení myristátu, rovněž modifikovány palmitoylací, tedy kovalentním připojením palmitátu. Pro ostatní typy $G\alpha$ podjednotek, tedy $G_{s\alpha}$, $G_{q\alpha}$, $G_{11\alpha}$, $G_{13\alpha}$, $G_{14\alpha}$, $G_{15\alpha}$ a $G_{16\alpha}$ je palmitoylace jediným typem lipidové modifikace.

Palmitát může být k $G\alpha$ podjednotce připojen dvěma způsoby. Obvyklým způsobem je připojení prostřednictvím thioesterové vazby na jeden nebo více Cys v rámci prvních dvaceti aminokyselin N-konce proteinu. Druhým možným způsobem je připojení palmitátu prostřednictvím amidové vazby na Gly na N-konci $G\alpha$ podjednotky. Nositeli palmitátu připojeného prostřednictvím amidové vazby jsou podjednotky $G_{s\alpha}$, které podléhají dvojnásobné palmitoylaci. První molekula palmitátu je připojena amidovou vazbou na Gly2. Druhá molekula palmitátu je připojena prostřednictvím thioesterové vazby

na Cys3. $G\alpha$ podjednotky třídy G_q/G_{11} jsou modifikovány palmitátem na Cys9 a Cys10. Z funkčního hlediska je důležité, že palmitoylace je modifikací reverzibilní, zatímco myristoylace je modifikací nevratnou (Escribá et al., 2007; Oldham a Hamm, 2008).

$G\gamma$ podjednotky podléhají lipidové modifikaci označované jako isoprenylace, ke které dochází posttranslačně. Tato modifikace spočívá v ireverzibilním připojení geranylgeranylu nebo farnesyly na Cys přítomný v motivu CaaX nacházejícím se v rámci C-konce podjednotky. V sekvenci tohoto motivu se kromě Cys vyskytují dvě alifatické (a) aminokyseliny (Ala/Val a Ile) a aminokyselina X (Leu/Ser), která je specifickým místem rozpoznávaným geranylgeranyl nebo farnesyl transferázou. Všechny $G\gamma$ podjednotky, kromě $G\gamma_1$, $G\gamma_9$ a $G\gamma_{11}$, jsou modifikovány připojením geranylgeranylu. Podjednotky $G\gamma_1$, $G\gamma_9$ a $G\gamma_{11}$ jsou modifikovány připojením farnesyly. Po isoprenylaci $G\gamma$ podjednotky obvykle dochází k proteolytickému odštěpení sekvence aaX, a následně k metylaci isoprenylovaného cysteinu. Metylace je významná v případě $G\gamma$ podjednotek modifikovaných farnesylem, neboť farnesyl je méně hydrofobní než geranylgeranyl. Metylace farnesylovaných $G\gamma$ podjednotek přispívá ke zvýšení hydrofobicity, čímž zvyšuje stabilitu interakce $G\gamma$ podjednotek s PM (Escribá et al., 2007; Oldham a Hamm, 2008).

Lipidové modifikace jsou důležité nejen pro samotnou asociaci heterotrimerních G proteinů s membránou, ale rovněž pro přesun nově syntetizovaných podjednotek na plazmatickou membránu (*plasma membrane targeting*), a tím pádem i pro vznik heterotrimerního komplexu $G\alpha\beta\gamma$. Jednotlivé podjednotky totiž nejsou do PM transportovány samostatně, ale právě v podobě heterotrimeru.

Prvním krokem v rámci formování heterotrimeru je tvorba $G\beta\gamma$ dimeru. Výsledky většiny studií podporují model, kdy ke vzniku $G\beta\gamma$ dimeru dochází v cytoplasmě, tedy ještě před isoprenylací $G\gamma$ podjednotky. Vznik $G\beta\gamma$ dimeru hraje zásadní roli především v případě $G\beta$ podjednotky, která jako jediná nepodléhá lipidové modifikaci a její interakce s membránou je tak zajišťována právě prostřednictvím asociace s isoprenylovanou $G\gamma$ podjednotkou. Po isoprenylaci $G\gamma$ podjednotky dochází k ukotvení $G\beta\gamma$ dimeru na cytoplazmatické straně membrány endoplazmatického retikula (ER). Následně dochází ke spojení $G\beta\gamma$ dimeru s $G\alpha$ podjednotkou, čímž vzniká heterotrimerní komplex. Význam vzniku heterotrimerního komplexu ještě před přesunem G proteinu na PM je v zásadě dvojitý. Interakce $G\alpha$ podjednotky s $G\beta\gamma$ dimerem je potřebná pro uskutečnění lipidové modifikace (palmitoylace) $G\alpha$ podjednotky. Palmitoylovaná $G\alpha$ podjednotka naopak poskytuje heterotrimeru důležitý lokalizační signál, neboť isoprenylace není dostatečným signálem pro translokaci na PM (Marrari et al., 2007; Escrivá et al., 2007).

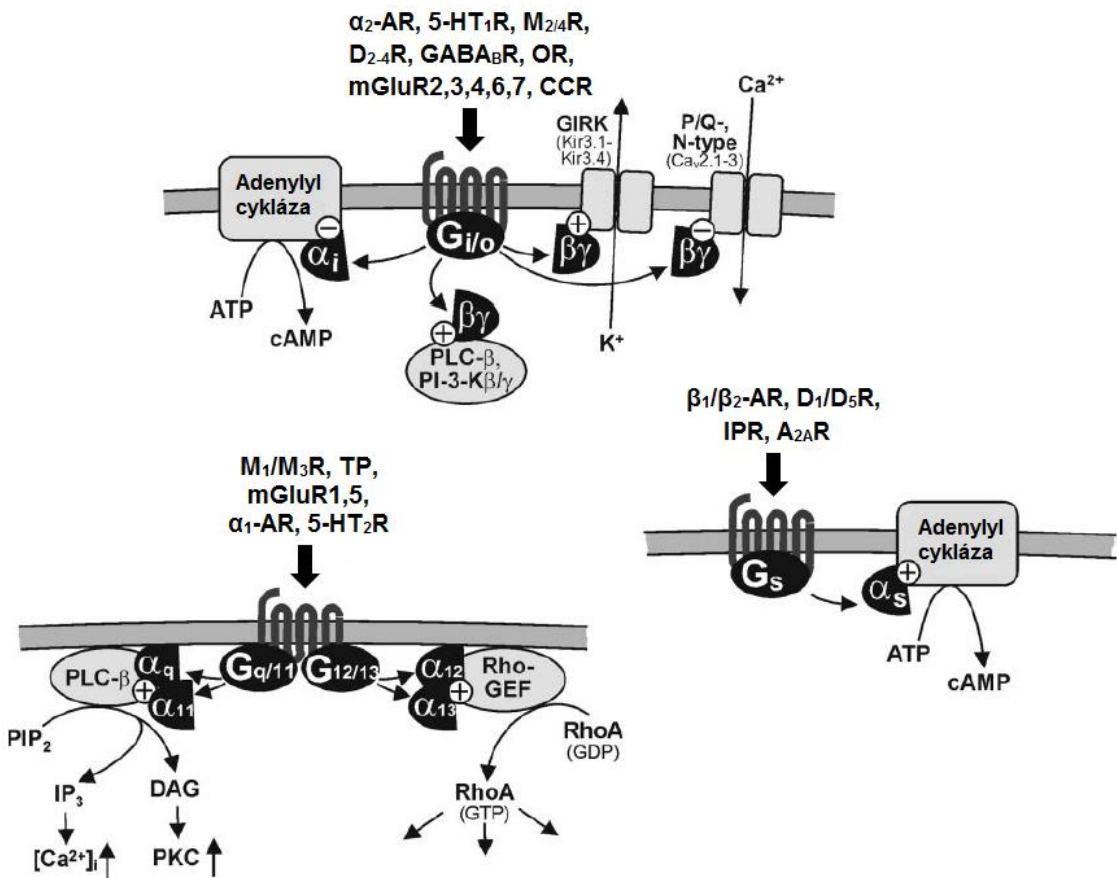
2.4. Mechanismus přenosu signálu G proteiny (G proteinový cyklus)

Trimerní G proteiny plní roli prostředníků a zároveň i regulátorů přenosu informace mezi ligandem aktivovanými GPCR a nitrobuněčnými efektorovými proteiny (efektory). V klidovém (bazálním) stavu je $G\beta\gamma$ dimer asociován s $G\alpha$ podjednotkou obsahující pevně vázané GDP, a tvoří tak heterotrimerní komplex $G\alpha\beta\gamma$. Tento komplex je neaktivní a je vázán na nitrobuněčnou část plazmatické membrány prostřednictvím výše uvedených lipidových modifikací. Zásadním a rychlost určujícím stupněm aktivace neaktivního komplexu $G\alpha\beta\gamma$ je uvolnění pevně vázaného GDP z $G\alpha$ podjednotky. Uvolnění GDP je vyvoláno interakcí G proteinu s receptorem.

Vazba ligandu do vazebního místa receptoru (na vnějším povrchu PM) navozuje konformační změnu, která se přenáší z extracelulární do intracelulární části receptoru a aktivuje G protein. Dochází ke zvýšenému segmentálnímu pohybu nitrobuněčných smyček receptoru a zpřístupnění těchto oblastí pro interakci s G proteinem. Tato interakce spouští rychlou výměnu GDP na $G\alpha$ podjednotce za GTP, čímž dochází k vlastní aktivaci G proteinu. Nezbytnou podmínkou rychlé výměny GDP za GTP je přítomnost hořčičných iontů. Vazba GTP na $G\alpha$ způsobuje rozpad heterotrimerního komplexu na volnou $G\alpha$ -GTP podjednotku a volný $G\beta\gamma$ dimer. Následně a nezávisle na sobě, $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ dimer stimuluji nebo inhibují aktivitu různých efektorů (příkladně adenylyl cyklázy), jejichž prostřednictvím dochází ke změně funkce řady různých signálních kaskád a vyvolání konečné buněčné odpovědi (**viz Obr. 2**) (Wettschureck a Offermanns, 2005).

Výzkum role heterotrimerních G proteinů v rámci buněčné signalizace byl zpočátku zaměřen pouze na interakce efektorů s $G\alpha$ podjednotkou. Předpokládalo se totiž, že regulace signálních drah je zprostředkována pouze interakcí efektorů s volnou $G\alpha$ -GTP, která vzniká po aktivaci G proteinu receptorem. V průběhu let se zjistilo, že interakce $G\alpha$ podjednotek s efektořem je relativně specifická. Povahu této interakce určuje buněčný typ, ve kterém se interakce odehrává, izoforma efektoru specifického pro danou třídu G proteinů nebo funkční vlastnosti konkrétního typu nebo varianty $G\alpha$ podjednotky. Většina $G\alpha$ podjednotek interaguje s více různými efektořy. Výjimku tvoří transducin, který interaguje pouze s jedním efektořem, kterým je fosfodiesteráza cGMP. Nejvíce prozkoumanými a jasně definovanými efektořy $G\alpha$ podjednotek jsou různé izoformy AC a fosfolipáza C (PLC). Aktivitu PLC stimuluji $G\alpha$ podjednotky G proteinů třídy G_q/G_{11} . Aktivita AC je regulována $G\alpha$ podjednotkami G proteinů třídy G_s (stimulace) a G_i/G_o (inhibice). Zatímco $G_s\alpha$ podjednotky stimuluji aktivitu všech izofořem AC,

$G\alpha$ podjednotky G proteinů třídy G_i/G_o ($G_{i\alpha}$, $G_{o\alpha}$, $G_{z\alpha}$) jsou schopné inhibovat aktivitu pouze některých izoform AC (Sadana a Dessauer, 2009).



Obr. 2 Schematické znázornění tří základních typů interakce aktivovaných G proteinů s efekty

$A_{2A}R$, adenosinový receptor, AR, adrenergní receptor, ATP, adenosintrifosfát, cAMP, cyklický adenosinmonofosfát, CCR, chemokinový receptor, $D_{1-5}R$, dopaminové receptory, DAG, diacylglycerol, GIRK, dovnitř usměřující draslíkový kanál, $5-HT_{1,2}R$, serotoninové receptory, IP_3 , fosfatidylinositoltrisfosfát, IPR, prostacyklinový receptor, $M_{1-5}R$, acetylcholinové receptory muskarinového typu, $mGluR_{1-7}R$, metabotropní glutamátové receptory, **OR**, **opioidní receptor**, PI-3-K, fosfatidylinositol-3-kináza, PIP_2 , fosfatidylinositolbisfosfát, PKC, protein kináza C, PLC- β , fosfolipáza C β , Rho-GEF, *Rho-guanine nucleotide exchange factor*, TP, prostanoidní receptor pro tromboxan A_2 . (převzato z práce Wettschureck a Offermanns, 2005 a upraveno)

$G\beta\gamma$ dimeru byla v rámci buněčné signalizace dlouhou dobu přisuzována role pasivního hráče, neboť se předpokládalo, že jeho hlavní úlohou je zamezit spontánní aktivaci $G\alpha$ podjednotky v nepřítomnosti receptorového stimulu. Tato domněnka se však v okamžiku, kdy byla v kardiomyocytech srdeční síně prokázána aktivace selektivního

kanálu pro K^+ (I_{KACH}) prostřednictvím $G\beta\gamma$ dimeru, ukázala jako mylná (Logothetis et al., 1987). V současné době je známo, že $G\beta\gamma$ dimer interaguje s celou řadou efektorů, mezi něž se řadí $PLC\beta_2$, $PLC\beta_3$ (Katz et al., 1992; Sternweis, 1994), různé izofomy AC (Tang a Gilman, 1991), kináza GPCR typu 2 (GRK2; Pitcher et al., 1992), fosfatidylinositol-3-kináza (PI_3 kináza; Stephens et al., 1994; Tang a Downes, 1997), komponenty MAPK kaskády (Inglese et al., 1995) a kanály pro K^+ nebo Ca^{2+} ionty (Reuveny et al., 1994; Ikeda, 1996; Herlitze et al., 1996). Předpokládá se, že volné $G\beta\gamma$ dimery, které regulují aktivitu výše uvedených efektorů, jsou uvolňovány především aktivací G proteinů třídy G_i/G_o . Tato třída G proteinů se v savčím organismu, a to jak v nervové tkáni (mozku), tak i v jiných orgánech, vyskytuje v největším množství (Wettschureck a Offermanns, 2005).

Jedním z fyziologicky významných účinků $G\beta\gamma$ dimerů uvolněných aktivací G proteinů třídy G_i/G_o je regulace výlevu neurotransmiterů. Aktivace G_i/G_o proteinů nervové soustavy (NS) je zprostředkována GPCR, jako jsou α_2 -AR, μ - a δ - opioidní receptory, $GABA_B$ receptory, A_1 adenosinový receptor nebo kanabinoidní receptor typu CB_1 . Podstatou účinku volných $G\beta\gamma$ dimerů je v tomto případě inhibice napět'ově závislých vápníkových kanálů typu N a P/Q. Tyto kanály jsou koncentrovány v nervových zakončeních, kde zajišťují akčním potenciálem navozený vstup extracelulárních Ca^{2+} iontů do presynaptické části nervového zakončení (synapse), který je nezbytnou podmínkou pro následný výlev neuropřenašeče do synaptické štěrbině (Dolphin, 2003).

Z výše uvedeného výčtu efektorů, na které působí volné $G\beta\gamma$ dimery, je zřejmé, že některé efekторы jsou pro $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ podjednotky společné. Interakce $G\alpha$ -GTP podjednotky a $G\beta\gamma$ dimeru s různými efekторы mohou být z funkčního hlediska vzájemně nezávislé, synergistické nebo antagonistické. Volný $G\beta\gamma$ dimer například aktivuje ACII, ale inhibuje aktivitu ACI.

Pro úplnost je třeba zmínit, že účinnost interakce $G\beta\gamma$ dimeru s efektořem může záviset i na zastoupení individuálních podjednotek v tomto dimeru. Z výsledků studií porovnávajících vliv působení $G\beta_1\gamma_2$ a $G\beta_5\gamma_2$ dimerů na aktivitu ACI a ACII je patrné, že oba typy dimerů shodně inhibovaly aktivitu ACI, ale jejich vliv na ACII byl odlišný. Zatímco $G\beta_1\gamma_2$ dimer aktivitu ACII stimuloval, $G\beta_5\gamma_2$ dimer aktivitu tohoto enzymu naopak inhiboval (Bayewitch et al., 1998).

Aktivní stav G proteinu trvá jen do té doby, než je GTP navázané na $G\alpha$ podjednotku hydrolyzováno vnitřní GTPázovou aktivitou této podjednotky na GDP a anorganický fosfát ($G\alpha$ -GTP \rightarrow $G\alpha$ -GDP + P_i). Hydrolýza GTP má za následek ukončení signalizačního procesu a obnovení heterotrimerního $G\alpha\beta\gamma$ komplexu, který může být opět

aktivován. Rychlost určujícím stupněm G proteinového cyklu je GTPázová aktivita $G\alpha$ podjednotky, která je za fyziologických podmínek stimulována řadou buněčných proteinů. GTPázová aktivita $G\alpha$ podjednotky je v řadě případů stimulována efektory, které byly danou podjednotkou aktivovány a působí tak jako negativní zpětnovazebné regulátory dané signalizační kaskády. Jako příklady lze uvést stimulaci GTPázové aktivity transducinu fosfodiesterázou cGMP (Arshavsky a Bownds, 1992) nebo stimulaci GTPázové aktivity $G_q/G_{11}\alpha$ fosfolipázou $C\beta 1$ (Berstein et al., 1992). Kromě efektorů se na regulaci GTPázové aktivity $G\alpha$ podjednotky podílejí také proteiny označované jako regulátory signalizace G proteinů (*regulators of G protein signaling*, RGS proteiny), které tuto aktivitu rovněž stimulují, čímž napomáhají inaktivaci G proteinu. V současné době je známých zhruba 30 RGS proteinů, které selektivně interagují s $G\alpha$ podjednotkami heterotrimerních G proteinů (Ross a Wilkie, 2000; Hollinger a Hepler, 2002). Celková aktivita G proteinu (rychlost G proteinového cyklu) je tedy dána poměrem mezi rychlostí, s jakou aktivovaný receptor uvolňuje GDP z $G\alpha$ podjednotky (rychlostí tvorby $G\alpha$ -GTP), a GTPázovou aktivitou (rychlostí tvorby $G\alpha$ -GDP) $G\alpha$ podjednotky. Neaktivní forma $G\alpha$ podjednotky ($G\alpha$ -GDP) má vysokou afinitu k volnému $G\beta\gamma$ dimeru, takže okamžitě po jejím vytvoření opět vzniká neaktivní komplex $G\alpha\beta\gamma$.

2.5. Desenzitizace a endocytóza

Buněčná signalizace je za fyziologických podmínek regulována složitým systémem zpětnovazebných regulačních mechanismů, obecně označovaných jako desenzitizace. Desenzitizace je definována jako útlum fyziologické odpovědi vyvolané dlouhodobým nebo opakovaným působením extracelulárního stimulu. Z fyziologického hlediska je desenzitizace životně důležitým procesem, protože chrání buňky před nadměrnou stimulací a brání vzniku nežádoucích patologických stavů (Svoboda a Novotný, 2002). Desenzitizace zajišťuje snížení nebo ztrátu schopnosti GPCR vyvolat buněčnou odpověď při opakované nebo nadměrné stimulaci. Narušení mechanismů tohoto typu regulace buněčné signalizace GPCR je nežádoucím stavem nejen na úrovni buňky, ale i na úrovni celého organismu, neboť může vést ke vzniku řady onemocnění. Mezi onemocnění s touto příčinou patří například vysoký krevní tlak, nádorová onemocnění nebo hormonální poruchy.

Zásadním mechanismem desenzitizace GPCR je fosforylace intracelulární oblasti receptoru. Až do poloviny osmdesátých let 20. století se předpokládalo, že fosforylaci

receptorů zajišťují pouze protein kináza A (PKA) a protein kináza C (PKC). K aktivaci těchto protein kináz dochází v důsledku zvýšení intracelulární koncentrace druhých poslů, jako jsou cAMP, Ca^{2+} nebo diacylglycerol (DAG) (Benovic et al., 1985). Platnost tohoto předpokladu však byla zpochybněna pozorováním agonistou navozené fosforylace β_2 -AR v buňkách postrádajících PKA (Strasser et al., 1986). Tento výsledek naznačoval existenci jiných typů kináz schopných fosforylovat agonistou obsazený receptor. Následná identifikace protein kinázy, která není závislá na koncentraci druhých poslů, se proto stala důležitým mezníkem při výzkumu GPCR (Benovic et al., 1986). Identifikovaná kináza byla nejprve pojmenována jako kináza β -AR (β -ARK). Posléze se však zjistilo, že není jedinou svého druhu, ale pouze jedním z členů celé rodiny takových kináz, které byly podle své funkce označeny za kinázy GPCR (GRK). β -ARK získala na základě této terminologie označení GRK2. Dalším zásadním okamžikem v rámci výzkumu GPCR bylo zjištění, že samotná fosforylace není dostačující podmínkou desenzitizace. Podporou tohoto zjištění se stala identifikace další rodiny regulačních proteinů, arrestinů. Arrestiny jsou proteiny, které se s vysokou afinitou vážou na fosforylované, agonistou okupované receptory. Vazba arrestinu na receptor brání interakci receptoru s G proteinem, což má za následek desenzitizaci receptorem vyvolané buněčné odpovědi (Lohse et al., 1990b).

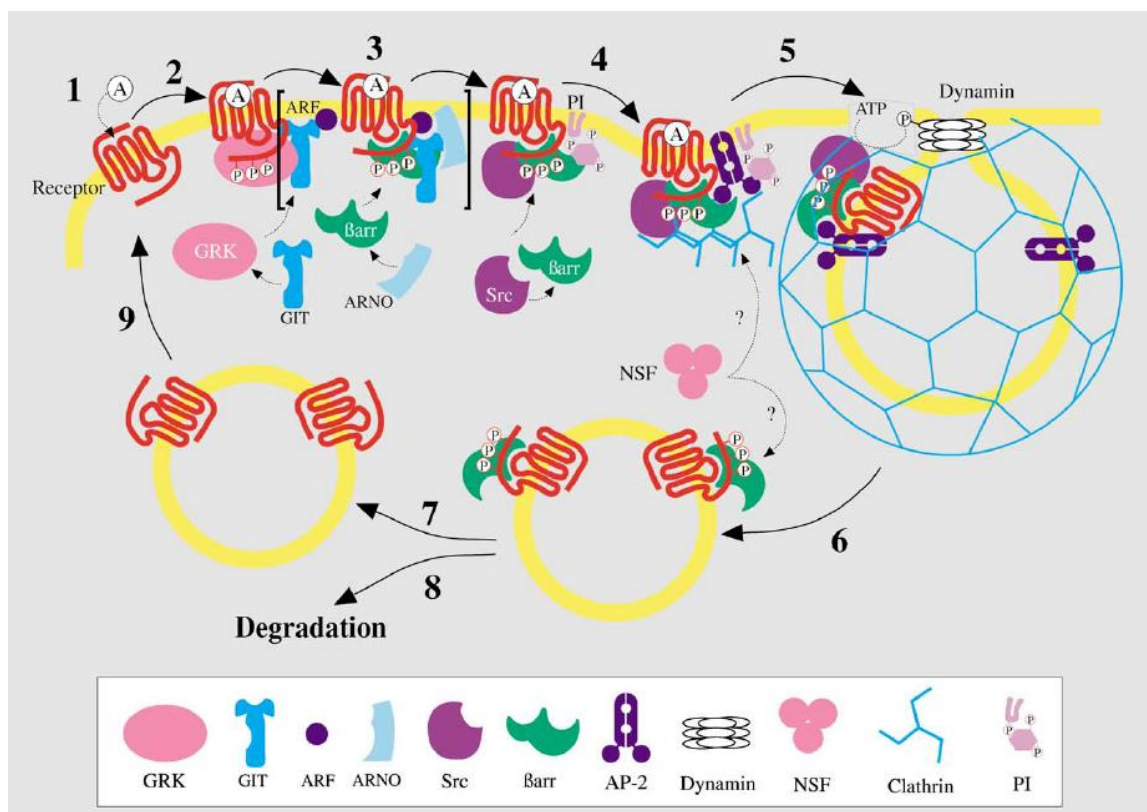
V současné době je známých 7 genů kódujících GRK a 4 geny kódující arrestiny. GRK1, GRK7, arrestin 1 a arrestin 4 jsou exprimovány pouze v sítnici oka. Ostatní GRK a arrestiny jsou exprimovány v řadě dalších tkání. GRK3 se vyskytuje volně v cytosolu. GRK5 a GRK6 jsou naproti tomu membránově vázané. Výskyt GRK4 je specifický pro varlata a mozek. Arrestin 2 a arrestin 3 jsou všudypřítomné (Pitcher et al., 1998; Lefkowitz a Shenoy, 2005)

Na základě objevu těchto regulačních proteinů byl postulován klasický model agonistou navozené desenzitizace GPCR, která je výsledkem fosforylace receptorů prostřednictvím GRK a následné vazby arrestinů. Tento model se považuje za obecně platný pro většinu GPCR. Desenzitizace GPCR s navázaným agonistou, tedy aktivních forem receptorů, navozená fosforylací prostřednictvím GRK a vazby arrestinů, se označuje jako *homologní desenzitizace*, neboť způsobuje snížení citlivosti buňky pouze vůči působení agonisty, který ji (primárně) vyvolal.

PKA a PKC jsou, na rozdíl od GRK, schopné fosforylovat i neaktivní formy receptorů. Desenzitizace neaktivních forem receptorů, která byla navozena fosforylací těmito protein kinázami, jejichž aktivaci vyvolalo zvýšení intracelulární koncentrace druhých poslů způsobené stimulací *jiného* typu receptoru, se označuje jako *heterologní*

desenzitizace. Následkem *heterologní desenzitizace* proto může být snížení buněčné odpovědi na stimulaci agonisty více než jednoho typu receptoru (Kelly et al., 2008; Delom a Fessart, 2011).

Dalším mechanismem přispívajícím k desenzitizaci je endocytóza, tedy přesun receptorů z PM do cytoplazmy, která se v kontextu GPCR označuje jako internalizace (**Obr. 3**). Internalizace slouží nejen k ukončení procesu signalizace, ale představuje také možnost resenzitizace receptorů. K resenzitizaci dochází prostřednictvím defosforylace endocytovaných receptorů a jejich následným transportem zpět na PM. V některých případech však naopak dochází k transportu endocytovaných receptorů do lyzozomů a následné proteolytické degradaci, která má za následek snížení počtu receptorů neboli „down regulaci“. „Down regulaci“ lze tak považovat za další proces přispívající k desenzitizaci buněčné odpovědi iniciované aktivací GPCR.



Obr. 3 Internalizace receptorů spřažených s G proteiny

Krok 1: vazba ligandu na receptor. Krok 2: přesun GRK k plazmatické membráně a fosforylace Ser a Thr aminokyselinových zbytků C-konce receptoru - zahájení desenzitizace a endocytózy receptoru. Krok 3: vazba β -arrestinů na fosforylovaný receptor, interakce s dalšími proteiny (Src). Krok 4: vazba AP2 a klatrinu na komplex receptoru s β -arrestinem. Krok 5: odštěpení klatrinového váčku dynaminem. Krok 6: odpojení molekul klatrinu. Krok 7: odpojení β -arrestinů od receptoru. Kroky 8 a 9: degradace nebo návrat receptoru na membránu. (převzato z práce Claing et al., 2002)

Prvotní informace o internalizaci GPCR poskytly studie endogenních β_2 -AR v žábích erytrocytech a lidských astrocytomových buňkách. Inkubace žábích erytrocytů s isoproterenolem měla za následek zvýšení množství solubilní formy β_2 -AR detekovaných v cytosolární frakci (Chuang a Costa, 1979). V případě lidských astrocytomových buněk měla inkubace s agonistou za následek přesun určitého množství β_2 -AR z frakce těžkých váčků, reprezentujících PM, do frakce lehkých váčků. Tato část populace β_2 -AR představovala desenzitizované receptory, což bylo potvrzeno ztrátou schopnosti vysokoafinní vazby ligandu (Harden et al., 1980). Pozdější studie prokázaly internalizaci prostřednictvím mikroskopie a rovněž potvrdily, že se odehrává přesunem desenzitizovaného receptoru do klatrinem obalených (klatrinových) váčků (von Zastrow a Kobilka, 1992, 1994). Právě endocytóza prostřednictvím klatrinových váčků je v případě GPCR nejprozkoumanějším způsobem internalizace. Obecně se předpokládá, že tímto způsobem dochází především k internalizaci receptorů aktivovaných vazbou agonisty a desenzitizovaných vlivem GRK a arrestinu.

Klatrinovými váčky zprostředkovaná endocytóza je obecným mechanismem internalizace většiny receptorů přítomných na buněčném povrchu, stejně tak jako dalších integrálních membránových proteinů. Klatrinové váčky jsou obaleny jakousi podpůrnou konstrukcí skládající se z různých druhů molekul proteinů. Základním strukturním prvkem této konstrukce je proteinový komplex označovaný jako *triskelion*, složený ze tří těžkých a tří lehkých řetězců klatrinu, který interaguje s řadou regulačních a adaptorových proteinů (adaptorů). Odškrcení klatrinového váčku z PM zprostředkovává protein dynamin. Dynamin je protein s GTPázovou aktivitou, jehož účast je z energetického hlediska nezbytná k oddělení membránové dvojvrstvy endocytického váčku od membránové dvojvrstvy PM (Claing et al., 2002).

Klatrin, adaptory a další regulační proteiny jsou v rámci PM směřovány do oblastí obohacených fosfatidylinositolbisfosfátem (PIP_2), kde se společně podílejí na regulaci procesu formování a invaginace klatrinových váčků. Funkcí adaptorových proteinů je směrování vybraných proteinů určených k endocytóze do vznikajících váčků. Nejhojnějším adaptorovým proteinem vyskytujícím se v klatrinových váčcích je adaptorový proteinový komplex 2 (AP2). AP2 interaguje s proteiny určenými k endocytóze buď přímo, tedy prostřednictvím vazby na specifické sekvence těchto proteinů, nebo nepřímo, tedy prostřednictvím dalšího adaptorového proteinu. Pro internalizaci agonistou aktivovaných GPCR je platný druhý případ interakce, neboť AP2 interaguje s receptorem prostřednictvím navázaného arrestinu. Arrestiny navíc interagují také přímo s klatrinem.

Arrestiny se tak podílejí na regulaci signalizace GPCR nejen tím, že brání interakci receptoru s G proteinem, ale také tím, že zprostředkují internalizaci receptoru (Wolfe a Trejo, 2007).

Agonistou navozená endocytóza byla prokázána i v případě některých podjednotek G proteinů. Příkladem takových podjednotek jsou $G_s\alpha$ a $G_q\alpha/G_{11}\alpha$. V případě $G_s\alpha$ se zjistilo, že agonistou (isoproterenolem) vyvolaný přesun podjednotky do cytoplazmy nastává jiným způsobem než přesun receptoru (β_2 -AR). Specifická inhibice endocytózy zprostředkované klatrinovými váčky totiž zabránila pouze internalizaci receptoru, ale nikoliv internalizaci $G_s\alpha$ (Wedegaertner et al., 1996). V případě $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ byla prokázána internalizace navozená stimulací receptoru pro angiotenzin II a receptoru pro TRH (TRH-R), která opět probíhala jiným způsobem než internalizace receptoru (Drnosta et al., 1998a, 1999; Miserey-Lenkei et al., 2001).

2.6. Opioidní receptory

Opioidní receptory (OR) a jejich endogenní ligandy dohromady tvoří fyziologicky významný neuromodulační systém, který se označuje pojmem *endogenní opioidní systém* (EOS). Tento neuromodulační systém je v rámci organismu zapojen do řízení vzorců chování důležitých pro přežití, jako jsou reakce na bolestivé podněty a stres, motivace nebo aktivace takzvaného systému odměny. EOS se dále podílí na kontrole autonomních funkcí, jako jsou dýchání, termoregulace a gastrointestinální motilita nebo na regulaci imunitních odpovědí. Opioidní receptory jsou také cílem působení exogenních ligandů, široké škály látek vyskytujících se přirozeně jako *sekundární metabolity rostlin*. Neblaze proslulé *opium* (**Obr. 4**), částečně vysušená šťáva získávaná z nezralých tobolek máku setého (*Papaver somniferum*), obsahuje především alkaloidy morfin a kodein, dále pak několik desítek dalších, chemicky příbuzných látek, jejichž koncentrace v opiu jsou relativně nízké, avšak vazebné charakteristiky těchto látek lze jednoznačně interpretovat v termínech interakce s OR. Totéž platí pro jejich biologickou účinnost.



Obr. 4 Sběr opia z nezralých tobolek máku setého – rytina ze 17. století
(převzato z práce Zackon, F. (1988) *Heroin, The Street Narcotic*, a upraveno)

Exogenní ligandy OR lze z funkčního hlediska rozdělit do dvou základních skupin. První skupinu tvoří agonisté, což jsou ligandy vyvolávající aktivaci receptorů. Druhou skupinou jsou antagonisté, které naopak aktivitu OR snižují, resp. udržují receptory v inaktivním stavu. Je zřejmé, že látky s povahou částečných agonistů (*partial agonists*) mohou snižovat účinnost plných agonistů (*full agonists*) za takových okolností, kdy kompetují s receptorem o vazebné místo. Částeční agonisté mají totiž vysokou afinitu k vazebnému místu receptoru. Jejich schopnost vyvolat fyziologickou odpověď je však nízká. Existence exogenních ligandů OR byla prvním skutečně důležitým nástrojem výzkumu opioidních receptorů, jelikož umožnila provádět kompetiční vazebné studie mezi radioaktivně značeným morfinem a endogenními opioidními peptidy, které se přirozeně vyskytují v centrálním nervovém systému (CNS) i periferních tkáních. Řada těchto látek, i jejich uměle připravené deriváty, jako je heroin, našla v rámci lidské populace výrazné uplatnění nejen v klinické praxi (morfin, kodein), ale i jako vysoce účinné návykové drogy s dramatickým euforickým účinkem na organismus. V této souvislosti je možné říci, že opakované podávání těchto drog, ať už v podobě kouření opia nebo při nitrožilní aplikaci

(morfin, heroin), vede k zásadním změnám v objektivním vnímání vnějšího světa. Rovněž dochází ke změnám základních fyziologických funkcí, vytvoření fyzické a psychické závislosti na droze, a následně ke změně (mentální) podstaty daného člověka. Můžeme tedy říci, že drogy na bázi opioidů rychle a nevratně mění osobnost člověka (**Obr. 5**).



Obr. 5 Portrét Thomase de Quincey

Thomas de Quincey je autorem knihy *Confessions of an English Opium-Eater* (1822), ve které se doznává k užívání opia a vypráví o mukách, která zakusil při snaze ukončit svou závislost. (převzato z práce Zackon, F. (1988) *Heroin, The Street Narcotic*, a upraveno)

Existence specifických vazebných míst pro opioidy byla navržena již v polovině šedesátých let 20. století (Portoghese, 1965). K jejich charakterizaci však došlo až po roce 1973, kdy nejprve tři, a později řada dalších nezávislých výzkumných skupin prokázala přítomnost receptorů pro opioidy v mozkové tkáni savců (Simon et al., 1973; Terenius, 1973; Pert a Snyder, 1974; Klee a Nirenberg, 1974; Sharma et al., 1975a,b). Tyto receptory byly o tři roky později, podle toho, že preferenčně vázaly buď morfin nebo ketocyklazocin, rozlišeny na receptory typu μ a κ (μ -OR, κ -OR) (Martin et al., 1976). O rok později byl při experimentech na *vas deferens* myši prokázán farmakologicky odlišný, třetí typ OR, který byl podle místa svého výskytu označen za opioidní receptor typu δ (δ -OR) (Lord et al., 1977). μ -OR, δ -OR a κ -OR lze vzhledem k historii a vývoji poznání souhrnně označit jako

klasické opioidní receptory, které aktivují G proteiny třídy G_i/G_o (viz **Obr. 2**), přičemž míra této aktivace závisí nejen na množství OR, ale i G proteinů (Roth et al., 1981; Koski a Klee, 1981; Maurer, 1982; Pfeiffer et al., 1982; Spain et al., 1985; Mansour et al., 1987; Tempel a Zukin, 1987; Sharif a Hughes, 1989; Remmers et al., 2000).

Dalším nezbytným krokem k získání nových poznatků o opioidních receptorech bylo klonování a izolace genů kódujících tyto receptory. Prvním klonovaným opioidním receptorem byl myší δ -OR, který byl v roce 1992 získán z knihovny komplementární DNA (cDNA) hybridní buněčné linie NG108-15 (*mouse neuroblastoma* \times *rat glioma cells*) (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992). Klonování dalších členů rodiny opioidních receptorů velmi rychle následovalo. V roce 1993 byly klonovány μ -OR a κ -OR (Chen et al., 1993a,b; Minami et al., 1993). Posledním klonovaným zástupcem rodiny opioidních receptorů byl receptor pro nociceptin, NOP receptor (Mollereau et al., 1994; Wang et al., 1994). Farmakologické studie tohoto receptoru odhalily velmi nízkou úroveň vazby všech v tehdejší době známých opioidních ligandů. NOP receptor byl nejprve považován za tzv. sirotčí (*orphan*) receptor a proto byl pojmenován jako receptor pro orphanin FQ nebo také opioidnímu receptoru podobný receptor (*opioid receptor-like 1*, ORL1). Vzápětí se však dvěma vědeckým skupinám podařilo v mozkové tkáni savců identifikovat endogenní peptidový ligand pro tento receptor. Objevený ligand byl pojmenován nociceptin/orphanin FQ (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995).

Identifikace (pouhých) 4 genů kódujících opioidní receptory nekorresponduje s množstvím jednotlivých podtypů opioidních receptorů (μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 , κ_1 , κ_2 , κ_3) stanovených farmakologicky (Pasternak, 1993). Vysvětlením této skutečnosti, která byla již dříve pozorována u řady jiných receptorů, může být odlišné tkáňové zastoupení jednotlivých genů, vznik různých variant receptorů alternativním sestřihem mRNA (Pasternak, 2001), rozdílné posttranslační modifikace v jednotlivých tkáních nebo změny vlastností receptorů vlivem jiných, regulačních proteinů měnících jejich vazebné i funkční parametry. Nejčastěji byla však výše uvedená „farmakologická heterogenita“ OR vysvětlována s pomocí homo- či hetero-oligomerizace OR (Jordan a Devi, 1999; McVey et al., 2001; Ramsay et al., 2002; Javitch et al., 2004). Existence funkčních hetero-oligomerů mezi μ -OR a δ -OR v plazmatické membráně byla přesvědčivým způsobem prokázána při heterologní expresi těchto receptorů v buňkách EcR293 (Law et al., 2005). Důkazy, respektive přímá experimentální podpora pro existenci konkrétního, kauzálního vztahu mezi farmakologickou specifitou různých ligandů OR a určitým typem homo- či hetero-oligomerů OR však přineseny nebyly. Obecně lze říci, že existence oligomerizace

byla jednoznačně prokázána u řady GPCR třídy A (příkladně α_{1b} -adrenergní receptor; Carrillo et al., 2003, 2004). Výraznou podporu pro existenci homo-dimerů a homo-tetramerů OR poskytla podrobná krystalografická analýza jejich 3D-struktury (Filizola a Devi, 2012; Manglik et al., 2012; Granier et al., 2012; Wu et al., 2012). Informace získané s pomocí této metody je však nutné brát s rezervou. Purifikované molekuly receptorů se totiž v umělém lipidovém prostředí krystalizačního média vyskytují ve formě monomerů. Ke vzniku pozorovaných oligomerních komplexů tak dochází až v průběhu krystalizačního procesu. Je tedy nutné si uvědomit, že uspořádání jednotlivých molekul receptorů v takto vzniklých oligomerních komplexech se může zásadně lišit od uspořádání molekul receptorů v oligomerních komplexech, které vznikají v přirozeném prostředí biologických membrán.

Opioidní receptory jsou zastoupeny především v CNS, ale vyskytují se i v periferním nervovém systému (PNS) a rovněž v řadě jiných periferních tkání. Jednotlivé typy opioidních receptorů mají odlišnou distribuci v rámci CNS. μ -OR se nachází v širokém spektru oblastí předního, středního i zadního mozku. μ -OR se v největší hustotě vyskytuje v mozkové kůře, bazálních gangliích (*caudate-putamen*, *nucleus accumbens*), thalamu, hipokampu, amygdale a prodloužené míše (*nucleus tractus solitarius*). Oblastmi s nejvyšší koncentrací κ -OR jsou *caudate-putamen*, *nucleus accumbens*, *hypothalamus*, amygdala a neurohypofýza. δ -OR se kromě *caudate-putamen*, *nucleus accumbens* a amygdaly, vyskytuje ve vysoké míře v mozkové kůře nebo oblastech zapojených ve zprostředkování informace čichových vjemů (Kapitzke et al., 2005).

Přítomnost μ -OR, δ -OR a κ -OR byla rovněž zjištěna v rámci vzestupných a sestupných drah vnímání bolesti (nocicepce), což je v souladu s mechanismem analgetického (antinocicepčního) účinku navozeného aktivací opioidních receptorů. Aktivace opioidních receptorů v *nucleus locus coeruleus* a periakveduktální šedé hmotě způsobuje snížení četnosti výlevu inhibičního neurotransmiteru GABA. Tím dochází k potlačení inhibičního účinku GABA na neurony, které jsou součástí sestupných drah zprostředkujících antinocicepci (Vaughan et al., 1997; Pan et al., 2004). Dále se ukázalo, že μ -OR, κ -OR i δ -OR jsou přítomny v neuronech enterického nervového systému, a to jak v neuronech submukózního plexu, tak v neuronech myenterického plexu (Poole et al., 2011; Sobczak et al., 2014). Opioidní receptory se vyskytují i v jiných tkáních než je tkáň nervová, například v epitelu srdce a cév, v buňkách hladkého svalstva, nebo keratinocytech a fibroblastech kůže. Množství OR v periferních tkáních je mnohem nižší než ve tkáni nervové. Přítomnost opioidních receptorů byla prokázána i v buňkách imunitního systému,

konkrétně v lymfocytech a makrofázích. Aktivace opioidních receptorů přítomných v těchto buňkách ovlivňuje proces oxidativního vzplanutí a produkci cytokinů (Biddlack, 2000).

2.7. Ligandy opioidních receptorů

Endogenní ligandy

Endogenními ligandy opioidních receptorů jsou v savčím mozku přirozeně se vyskytující opioidní peptidy (Hughes et al., 1975), označované rovněž jako endogenní opioidy. Mezi endogenní opioidy se řadí endorfiny, enkefaliny a dynorfiny, které jsou odvozeny od tří prekurzorových molekul, proopiomelanokortinu (POMC), proenkefalínu (PENK) a prodynorfinu (PDYN). Všechny tři prekurzorové molekuly jsou exprimovány v CNS, ale jejich přítomnost byla potvrzena i v periferních tkáních. Všechny peptidy odvozené od těchto prekurzorů mají na svém N-konci společnou tetrapeptidovou sekvenci Tyr-Gly-Gly-Phe. Jednotlivé peptidy se od sebe odlišují afinitou k μ -OR, δ -OR a κ -OR. Všechny však mají zanedbatelnou afinitu k NOP receptoru. β -endorfin má nejvyšší afinitu k μ -OR, ale vykazuje rovněž jistou afinitu k δ -OR i κ -OR. Met- a Leu-enkefaliny mají vysokou afinitu k δ -OR, desetinásobně nižší afinitu k μ -OR a zanedbatelnou afinitu ke κ -OR. Dynorfin A a dynorfin B mají vysokou afinitu ke κ -OR, ale mají také jistou afinitu k μ -OR a δ -OR (Janecka et al., 2004). K typickým endogenním opioidům je řazen také nociceptin/orphanin FQ (nociceptin), jehož prekurzorem je pronociceptin. Nociceptin je endogenním ligandem NOP receptoru (Meunier et al., 1995). Tetrapeptid N-konce nociceptinu ale na rozdíl od ostatních peptidů, obsahuje v první pozici Phe namísto Tyr. Dalšími identifikovanými endogenními opioidy jsou endomorfiny, endomorfin 1 a endomorfin 2 (Zadina et al., 1997). Tyto amidované tetrapeptidy jsou prvními popsány endogenními peptidy, které se selektivně a s vysokou afinitou vážou na μ -OR. Jejich prekurzory však dosud nebyly identifikovány.

Exogenní ligandy

Exogenní ligandy opioidních receptorů neboli exogenní opioidy tvoří rozsáhlou skupinu látek různé chemické povahy, z nichž některé mají značný význam pro klinickou nebo veterinární praxi. Příkladem takových exogenních opioidů jsou morfin, naloxon, naltrexon, etorfin nebo diprenorfin.

Morfin je vůbec nejznámějším a nejpoužívanějším exogenním opioidem. Morfin působí jako agonista opioidních receptorů, který má nejvyšší afinitu k μ -OR. Morfin však není dostatečně selektivní, neboť se s nízkou afinitou váže i na ostatní typy opioidních receptorů. Existuje tedy jistá pravděpodobnost, že účinek morfinu v podmínkách *in vivo* může být do určité míry i výsledkem interakce s δ -OR nebo κ -OR (Kieffer, 1999).

Morfin, jak už bylo řečeno výše, je jednou z látek obsažených v opiu. Analgetické účinky opia jsou známy již po staletí. Aktivní složkou opia jsou alkaloidy. Prvním izolovaným a zároveň nejúčinnějším opiovým alkaloidem byl právě morfin. Morfin pro své uspávací účinky dostal jméno po Morfeovi, řeckém bohovi snů. Morfin byl izolován na začátku 19. století německým chemikem Sertürnerem. Chemická struktura morfinu byla však objasněna až o 120 let později. Kompletní systematický název morfinu je (5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorfinan-3,6-diol (Janecka et al., 2004). Morfin je velmi účinné a stále používané analgetikum, jehož podání s sebou však přináší i řadu komplikací. Dlouhodobá aplikace morfinu vede ke vzniku tolerance a závislosti. Morfin kromě toho ovlivňuje i řadu autonomních funkcí, jako jsou dýchání nebo střevní motilita. Morfin má na organismus kromě analgetických také silně euforizující účinky, pro které je často zneužíván.

Mezi další významné exogenní ligandy opioidních receptorů patří syntetické alkaloidy, naloxon a naltrexon. Jedná se o neselektivní antagonisty, kterých se využívá v klinické praxi. Naloxon je používán k záchraně života při předávkování heroinem. Heroin (diacetylmorfin) je velmi rychle metabolizován na 6-monoacetylmorfin, který je následně přeměněn na morfin. Díky této metabolické přeměně tedy podání heroínu způsobuje aktivaci opioidních receptorů, což má na organismus podobné účinky jako podání morfinu samotného. Příčinou smrti při předávkování heroinem je totální útlum dýchání, způsobený inhibicí neuronů dýchacího centra v prodloužené míše. Tento život ohrožující vedlejší efekt lze zvrátit právě podáním antagonisty naloxonu, který má rychlý nástup účinku (White a Irvine, 1999; Dixon, 2007). Naltrexon se v současnosti používá k léčbě závislosti na alkoholu u lidí. Podávání naltrexonu snižuje potřebu konzumace alkoholu.

Etorfin a diprenorfin našly uplatnění především ve veterinární praxi. Etorfin je neselektivní agonista opioidních receptorů. Podání etorfinu je účinným způsobem rychlého usnutí (anestezie) velkých zvířat, jako jsou koně, sloni nebo nosorožci. K jejich probuzení se používá neselektivní antagonist diprenorfin, přičemž se využívá stejného fenoménu jako při záchraně života předávkovaných osob, kterým je snadná dostupnost vazebného

místa OR pro ligandy přicházející z vodného, extracelulárního prostředí (Manglik et al., 2012; Filizola a Devi, 2012). Diprenorfin může proto rychle a účinně kompetovat s navázaným etorfinem a tím způsobit zvrácení jeho analgetického účinku (Alford et al., 1974).

Mezi exogenní ligandy opioidních receptorů patří také řada syntetických látek, které se využívají především ve výzkumu. Hlavními důvody pro přípravu syntetických ligandů byly nejen nízká selektivita endogenních peptidů pro jednotlivé typy receptorů, ale také nízká odolnost těchto peptidů vůči enzymatické degradaci. Prvotním zvoleným přístupem syntézy nových ligandů byla modifikace enkefalinů. Výsledkem tohoto přístupu byly μ -OR selektivní agonista DAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol) a agonisté s vyšší selektivitou pro δ -OR, jako jsou DADLE (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu), DSLET (Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr) a DTLET (Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr). Další agonisté δ -OR vznikly vložením sekvence penicilaminu (Pen, β,β -dimethylcystein) do struktury enkefalinů. Takovými ligandy jsou DPDPE (Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-D-Pen)) a DPLPE (Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-Pen)).

Analog enkefalinu, ICI 174864 ($(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2)_2$ -Tyr-Aib-Phe-Leu), byl prvním antagonistou se značnou selektivitou a afinitou vůči δ -OR. Dalšími syntetickými antagonisty δ -OR jsou tetrapeptidy, které obsahují v druhé pozici peptidové sekvence kyselinu 1,2,3,4-tetrahydroizoquinolin-3-karboxylovou (Tic). Typickými zástupci této skupiny jsou tetrapeptidy TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe) a TIPP-NH₂ (Tyr-Tic-Phe-Phe-NH₂). TIPP má vysokou afinitu a mimořádnou selektivitu pro δ -OR, kdežto TIPP-NH₂ byl v době svého objevu prvním známým ligandem, který byl agonistou μ -OR a zároveň antagonistou δ -OR. Antagonisty s ještě vyšší afinitou a selektivitou pro δ -OR jsou pseudopeptidové analogy TIPP[ψ] (Tyr-Tic ψ -[CH₂NH]-Phe-Phe) a TIP[ψ] (Tyr-Tic ψ [CH₂NH]-Phe) (Janecka et al., 2004).

Peptidičtí antagonisté s vysokou selektivitou pro μ -OR byly získány modifikací somatostatinu, který v rámci CNS vykazuje jistou afinitu k opioidním receptorům. Na základě tohoto objevu se Hruby a jeho kolektiv zaměřili na možnost vytvoření analogů somatostatinu, které by preferenčně asociovaly s opioidními receptory. Prvním takto syntetizovaným selektivním antagonistou μ -OR byl oktapeptid CTP (Pelton et al., 1985), který byl velmi odolný vůči enzymatické degradaci a nebyl schopen projít přes hematoencefalickou bariéru. Modifikacemi CTP bylo dosaženo syntézy dalších antagonistů μ -OR, kterými jsou CTAP a CTOP.

Snaha o přípravu analogů Dyn A, které by fungovaly jako selektivní antagonisté κ -OR, se bohužel setkala jen s nepatrným úspěchem. Podařilo se však připravit několik nepeptidických antagonistů κ -OR, z nichž nejvíce selektivní jsou norbinaltorfimin (norBNI) a GNTI (Janecka et al., 2004).

2.8. Receptor pro thyreoliberin, TRH-R

Receptor pro thyreoliberin (TRH-R) (Gershengorn, 1986; Gershengorn a Osman, 1996) je řazen do podskupiny β rhodopsinové rodiny GPCR (třída A), která kromě tohoto receptoru obsahuje receptory pro další peptidové ligandy, jako jsou CCK, GnRH, gastrin uvolňující peptid, ghrelin, arginin-vazopresin, oxytocin, tachykininy, neuropeptid FF, neuropeptid Y, neuromedin B a neurotenzin. V naší laboratoři byl TRH-R v minulosti intenzivně studován nejprve z hlediska různých mechanismů desenzitizace hormonální akce, později z hlediska úlohy membránových domén v těchto dějích. Při tomto studiu byly používány stabilní linie buněk HEK293, které exprimovaly TRH-R (klon E2), TRH-R spolu s velkým množstvím $G_{11}\alpha$ proteinu (klon E2M11) nebo fluorescenční verzi TRH-R, fúzní bílkovinu TRH-R-eGFP (klon VTGP) (Svoboda et al., 1996; Drmota et al., 1998b, 1999; Novotný et al., 1999; Rudajev et al., 2005; Ostašov et al., 2007, 2008).

Dlouhodobá stimulace TRH-R (4-16 hodin) způsobila specifickou internalizaci, solubilizaci a „down-regulaci“ heterotrimerních G proteinů třídy G_q/G_{11} (Svoboda et al., 1996). První internalizace G proteinů byla prokázána až po 60 minutách stimulace TRH, zatímco internalizace receptorů probíhala velmi rychle s poločasem několika minut (Drmota et al., 1998a). Tento výsledek byl následně ověřen v podmínkách *in vivo* při studiu HEK293 buněk exprimujících fluoreskující verzi TRH-R, fúzní bílkovinu TRH-R-eGFP (klon VTGP) (Drmota et al., 1999). VTGP buňky byly rovněž použity pro prokázání významu integrity buněčné membrány a membránových domén pro optimální funkci signální kaskády stimulované TRH-R (Ostašov et al., 2007). Překvapivě, množství TRH-R v membránových doménách bylo velmi malé ve srovnání s množstvím G proteinů (Rudajev et al., 2005). Buňky VTGP byly následně použity pro stanovení mobility TRH-R v živých buňkách s pomocí moderních metod fluorescenční konfokální mikroskopie CLSM, FRAP, FLIM a RICS (kapitola 5.7; příloha 3 – manuskript Brejchová et al., 2014).

2.9. Struktura a funkce buněčných membrán

Buněčné membrány jsou hydrofobní struktury, které vymezují buňku jako celek vzhledem k jejímu vnějšímu okolí (plazmatická membrána), dále pak vymezují jednotlivé nitrobuněčné orgány vzájemně mezi sebou a vůči cytosolu. Samotná existence a neporušenost („intaktnost“) povrchové, plazmatické membrány je základní podmínkou životaschopnosti každé buňky. Plazmatická membrána (PM) se rozhodujícím způsobem podílí na udržování stálosti vnitřního prostředí buňky (homeostáze), na komunikaci buňky s okolním prostředím a rovněž vytváří primární obrannou bariéru při napadení buňky patogenními organizmy, jako jsou viry a bakterie, nebo při kontaktu s toxickými látkami. Nitrobuněčné membrány plní zásadní úlohu při tvorbě ATP a regulaci energetického metabolismu (mitochondrie), transportu GPCR do nitra buňky a jejich hydrolytické degradaci v lyzozomech, transportu nově syntetizovaných bílkovin z ER do Golgiho aparátu (GA) a jejich posttranslační modifikaci v rámci GA, a konečně, při transportu z GA do PM nebo výstupu „exportních“ bílkovin mimo buňku.

Názory na strukturní organizaci (uspořádání) plazmatické membrány se měnily tak, jak se postupně vyvíjely znalosti o této struktuře: „musí tam být lipidy“ (Overton, 1899), „musí tam být proteiny“ (Danieli, 1935), přímý důkaz přítomnosti lipidů i proteinů (1945-1960), „lipidy a proteiny jsou ve vrstvách“ (Robertson, 1959), „membrána je mozaikou proteinů a lipidů a tato mozaika je tekutá“ (Singer a Nicholson, 1972). Historický přehled vývoje poznání struktury a funkce plazmatické membrány, a biologických membrán obecně, lze získat četbou řady monografií, které byly na toto téma sepsány (Rothfield (1971) *Structure and Function of Biological Membranes*; Wallach a Schmidt-Ullrich (1975) *Membrane Molecular Biology of Neoplastic Cells*; Poste a Nicholson (1977) *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization*; Kates a Kuksis (1980) *Membrane Fluidity, Biophysical Techniques and Cellular Regulation*; Shinitzky (1984) *Physiology of Membrane Fluidity, Vol I and II*; Benga et al. (1984) *Membrane Processes, Molecular Biology and Medical Applications*; Nicolau a Chapman (1990) *Horizons in Membrane Biotechnology*) i původních článků Singera a Nicholsona (1972), Bretschera a Raffa (1975) a Chapmana (1983). Čtenáře se zájmem o podrobnější informace, příkladně membránově závislou regulaci prototypického enzymu plazmatické membrány, Na⁺-K⁺-ATPázy, a mitochondriálních enzymů, odkazují na souborný článek Kimelberga (1977).

2.10. Lipidové složení buněčných membrán

Buněčné membrány jsou ze strukturního hlediska dvojvrstvy tvořené molekulami amfipatických lipidů, které jsou k sobě přiloženy svými hydrofobními částmi a jejich hydrofilní části jsou orientovány do okolního, vodného prostředí. Celkový charakter lipidové dvojvrstvy je tedy rovněž amfipatický. Hlavními strukturními lipidy buněčných membrán savců jsou glycerofosfolipidy, jejichž hydrofilní část je tvořena polárními hlavičkami obsahujícími cholin, serin, etanolamin nebo inositol připojený k fosfátové skupině přítomné v sn-3 pozici glycerolu. Hydrofobní část glycerofosfolipidů sestává z řetězců mastných kyselin (MK) připojených esterovou vazbou v pozicích sn-1 a sn-2 glycerolu. Připojené MK jsou buď nasycené, nebo nenasycené, přičemž nenasycené MK se obvykle nacházejí v pozici sn-2. Molekuly glycerofosfolipidů jsou pojmenovány podle svých polárních hlaviček jako fosfatidylcholin (PC), fosfatidylserin (PS), fosfatidyletanolamin (PE) a fosfatidylinositol (PI). Mezi další významné lipidy buněčných membrán savců patří sfingolipidy a cholesterol (Ohvo-Rekilä et al., 2002). Jelikož se cholesterol v organismu vyskytuje ve dvou formách, volné a esterifikované, je třeba zdůraznit, že v membránové dvojvrstvě je přítomen cholesterol volný, který bude v následujícím textu označován jako membránový cholesterol nebo jen cholesterol. Kromě lipidů, jak již bylo řečeno výše v historickém přehledu, jsou součástí buněčných membrán také proteiny. Membránové proteiny sice představují pouze malé procento všech membránových komponent, ale jejich přítomnost je podstatou všech zásadních funkcí buněčných membrán, jakými jsou transport látek přes membránu nebo přenos informací kódovaných extracelulárními signály (Barenholz, 2002).

Membránové proteiny lze rozdělit do dvou základních skupin: integrální a periferní. Typickým příkladem integrálních membránových proteinů jsou GPCR, jejichž solubilizace lze docílit pouze za podmínek úplné degradace plazmatické membrány detergenty. Molekula GPCR, jak již bylo řečeno na samém začátku literárního přehledu (kapitola 2.1), obsahuje 7 transmembránových úseků (segmentů), podle kterých se GPCR někdy označují také jako *7TM receptors*. Heterotrimerní G proteiny jsou naopak příkladem periferních membránových proteinů, které neobsahují žádný transmembránový segment a jejichž vazba do membrány se uskutečňuje nepřímou, pomocí hydrofobních alifatických řetězců mastných kyselin, nebo pomocí isoprenoidů (Barenholz, 2002). O lipidových modifikacích heterotrimerních G proteinů je podrobně pojednáno v kapitole 2.3.

Životaschopnost buněk je podmíněna jejich schopností přizpůsobit se měnícím se podmínkám okolního prostředí. V tomto ohledu je důležitou vlastností buňky schopnost regulovat skladbu lipidových molekul membránové dvojvrstvy. Zásadní význam má především regulace lipidového složení plazmatické membrány, která plní nejen funkci ochranné bariéry, ale uplatňuje se také v rámci mezibuněčné komunikace. Hlavním způsobem, jakým tento úkol savčí buňky plní, je změna obsahu membránového cholesterolu. Právě cholesterol je totiž klíčovým lipidem ovlivňujícím fyzikálně-chemické vlastnosti membránové dvojvrstvy. Molekula cholesterolu sestává ze tří strukturně odlišných částí. Základ tvoří sterolové jádro, ke kterému je připojen flexibilní uhlovodíkový řetězec isooktylu a hydroxylová skupina v pozici 3 β . Významná je právě přítomnost hydroxylové skupiny, která propůjčuje jinak převážně hydrofobní molekule cholesterolu amfipatický charakter, čímž podmiňuje její správnou orientaci vzhledem k základní rovině membrány (na interfázi mezi vnějším listem membrány a vodným prostředím extracelulárního prostoru). Molekula cholesterolu je orientována kolmo na tuto rovinu, přičemž hydroxylová skupina se nachází v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů a sterolové jádro s řetězcem isooktylu jsou umístěny mezi alifatickými řetězci MK fosfolipidů. Cholesterol zde uplatňuje především svůj organizační účinek, neboť přítomnost sterolového jádra mezi řetězci MK snižuje jejich pohyblivost, a prostředí membránové dvojvrstvy se tak stává více uspořádané. Přítomnost cholesterolu má dále za následek zvýšení tloušťky membránové dvojvrstvy, zvýšení její mechanické odolnosti a snížení její propustnosti. Snížení propustnosti membrány je dáno tím, že molekuly cholesterolu svou přítomností vyplňují mezery vznikající díky strukturním defektům, jejichž původci jsou převážně řetězce nenasycených MK fosfolipidů. Co se týče řetězců MK fosfolipidů, cholesterol upřednostňuje interakci s řetězci nasycených MK. Nejpravděpodobnějším důvodem je možnost vzniku těsnější interakce mezi planárním sterolovým jádrem a lineárním řetězcem nasycené MK. Na základě této skutečnosti lze vysvětlit preferenci interakce cholesterolu se sfingolipidy, jejichž hydrofobní část je téměř výlučně tvořena řetězci nasycených MK (Barenholz, 2002). Vzhledem k výše uvedeným, výjimečným (!) vlastnostem, má molekula cholesterolu zásadní vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti plazmatické membrány jako celku (Yeagle, 1985, 1992) a je tedy vysoce pravděpodobné, že se jejich změna projeví i na úrovni funkce membránových proteinů (Burger et al., 2000; Pucadyil a Chattopadhyay, 2006).

Přítomnost cholesterolu je sice nezbytně nutnou podmínkou životaschopnosti savčích buněk, ale jeho obsah musí být velmi striktně regulován, neboť v nadbytku působí

naopak toxicky a přispívá tak ke vzniku patologických stavů, z nichž stojí za zmínku především ateroskleróza (Soccio a Breslow, 2004). Regulace obsahu buněčného cholesterolu je uskutečňována řadou velmi komplexních a složitých mechanismů, které se odehrávají jak na úrovni buněk, tak na úrovni celého organismu. Již samotné řízení distribuce cholesterolu v rámci buňky je aktivním, dynamickým procesem, jehož účelem je udržení optimální struktury jednotlivých buněčných membrán. Některé buněčné membrány pro svou funkci vyžadují značné, zatímco jiné naopak velmi malé množství membránového cholesterolu (Maxfield a van Meer, 2010). Příkladem buněčné membrány, která pro svou optimální funkci vyžaduje velké množství cholesterolu, je plazmatická membrána, ve které může být podle dosavadních poznatků soustředěno 65-90% celkového buněčného cholesterolu. Nejméně cholesterolu je naopak obsaženo v membránách endoplazmatického retikula (Maxfield a Wüstner, 2002).

2.11. Membránové domény

V průběhu studia uspořádání buněčných membrán se postupně zjistilo, že uspořádání membránových lipidů napříč dvojrivrstvou je asymetrické. To znamená, že jednotlivé druhy molekul lipidů se vyskytují převážně ve vnějším nebo vnitřním listu membránové dvojrivrstvy. V případě PM se v extracelulárním listu dvojrivrstvy nachází PC a sfingomyelin, jehož polární hlavička také obsahuje cholin. V intracelulárním listu dvojrivrstvy PM jsou pak soustředěny PS, PE a PI. Cholesterol je přítomen v obou listech PM. Dále se zjistilo, že ani rozmístění lipidů v rovině membrány, tedy v laterálním směru, není rovnoměrné. Podstatou heterogenní laterální organizace membránových lipidů PM je pravděpodobně výše zmíněná preferenční interakce cholesterolu se sfingolipidy, jejímž výsledkem jsou membránové domény (Simons a Ikonen, 1997; Xu a London, 2000).

Membránové domény (MD) obohacené o cholesterol a sfingolipidy se také označují jako lipidové nebo membránové rafty. Správnější je spíše použití přídavného jména membránové, neboť neobsahují pouze lipidy ale také proteiny. V literatuře se lze rovněž setkat s označením „detergent rezistentní“ membránové domény (*detergent-resistant membrane domains*, DRM). Prvotní, fyzikálně-chemický přístup studia membránových domén byl totiž založen na zjištění, že některé lipidy jsou při nízké teplotě (0-4 °C) nerozpustné v neiontových detergencích. Triton X-100 (TX-100) byl prvním detergentem používaným k tomuto účelu (Skibbens et al., 1989; Brown a Rose, 1992). Na základě tohoto přístupu byly jako membránové domény označeny ty části buněčných membrán,

kteře byly při 0-4 °C odolné vůči rozpuštění v neiontových detergentech a kteře bylo možné následně izolovat flotací v hustotním sacharózovém gradientu jako frakci s nízkou hustotou (Harder a Simons, 1997; Brown a London, 1997; Ahmed et al., 1997; London a Brown, 2000).

Koncept membránových raftů, ve smyslu obecně platné představy o organizaci plazmatické membrány (v prostoru a čase), byl poprvé navržen Simonsem a van Meerem (Simons a van Meer, 1988). Rafty jsou velmi dynamické, tedy v čase se rychle měnící, membránové okrsky, které jsou zapojeny do mnoha důležitých buněčných dějů, jakými jsou polarizované třídění apikálních membránových proteinů epitelových buněk nebo signalizace (Burger et al., 2000). Modernější definice formulovaná na základě společné dohody řady odborníků je následující: „*Membránové rafty jsou malé (10-200 nm), heterogenní a velmi dynamické domény obohacené cholesterolem a sfingolipidy, které se podílí na regulaci buněčných dějů. Malé rafty se mohou za určitých podmínek sdružovat do větších domén, které jsou stabilizovány vzájemnou interakcí proteinů nebo interakcí proteinů s lipidy*“ (Pike, 2006).

Podle současného stavu poznání se membránové domény rozdělují do dvou skupin. Zásadní je v tomto kontextu přítomnost membránového proteinu kaveolinu. Domény, které tento protein obsahují, se označují jako kaveoly. Membránové domény, ve kterých se kaveolin nevyskytuje, se označují jako planární lipidové rafty. Společným rysem obou skupin je jejich specifické lipidové složení. Jak kaveoly, tak rafty jsou obohaceny cholesterolem, sfingolipidy a fosfolipidy obsahujícími nasycené MK. Typickým znakem membránových domén je rovněž přítomnost proteinů připojených prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy.

Zájem o studium membránových domén vzrostl především na základě zjištění, že tyto specifické membránové okrsky se podílí na regulaci mnoha důležitých buněčných dějů. Postupem času byla v biochemických preparátech membránových domén prokázána existence řady signálních molekul. Mezi tyto se kromě jiných zařadily také GPCR, heterotrimerní G proteiny a některé z jejich efektorových proteinů. Paralelně s kvalitativní charakterizací proteinového složení MD byly popsány změny v obsahu celé řady GPCR a G proteinů vlivem hormonální stimulace GPCR (Feron et al., 1997; de Weerd a Leeb-Lundberg, 1997; De Lucca et al., 2000; Dessy et al., 2000; Lasley et al., 2000; Lasley a Smart, 2001; Moffett et al., 2000; Ostrom et al., 2000, 2001; Ostrom a Insel, 2004; Galbiati et al., 2001; Oh a Schnitzer, 2001; Becher et al., 2001, 2004; Guzzi et al.,

2002; Sabourin et al., 2002; Donati a Rasenick, 2003, 2005; Quinton et al., 2005; Pike, 2004, 2006; Chini a Parenti, 2004, 2009; Monastyrskaya et al., 2005; Allen et al., 2007).

Výsledky získané při studiu biochemických preparátů membránových domén označovaných jako DRM (*detergent-resistant membrane domains*), DIM (*detergent-insensitive membrane domains*) nebo DIG (*detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes*) byly ale v řadě případů nejednotné, a to především z hlediska obsahu GPCR, poměru mezi GPCR a G proteiny a vlivu hormonální stimulace na zastoupení GPCR v membránových doménách. Rozdílné názory na přítomnost či nepřítomnost GPCR v MD, byly vyjádřeny v přímé diskuzi mezi Muntzem a Lisantim, jejímž předmětem byly tak významné receptory, jako jsou β -AR, a která se v širším slova smyslu dotýkala také významu „kaveolinové cesty“ při internalizaci GPCR obecně a speciálně β -AR (Muntz, 1994; Lisanti, 1994; Raposo a Benedetti, 1994; Lamaze a Schmid, 1995; Schwencke et al., 1999). Argumenty prezentované v této diskuzi mají význam až do dnešní doby, protože ani dnes není známo, jaký je kvantitativní poměr mezi internalizací β -AR zprostředkovanou „klatrinovou“ versus „kaveolinovou“ cestou. Totéž platí pro význam lokalizace GPCR v MD co se vlastního mechanismu aktivace G proteinů týče, tedy pro objasnění, *jak* závisí agonistou indukovaná konformační změna GPCR (která způsobuje aktivaci G proteinu) na bezprostředním lipidovém okolí receptoru.

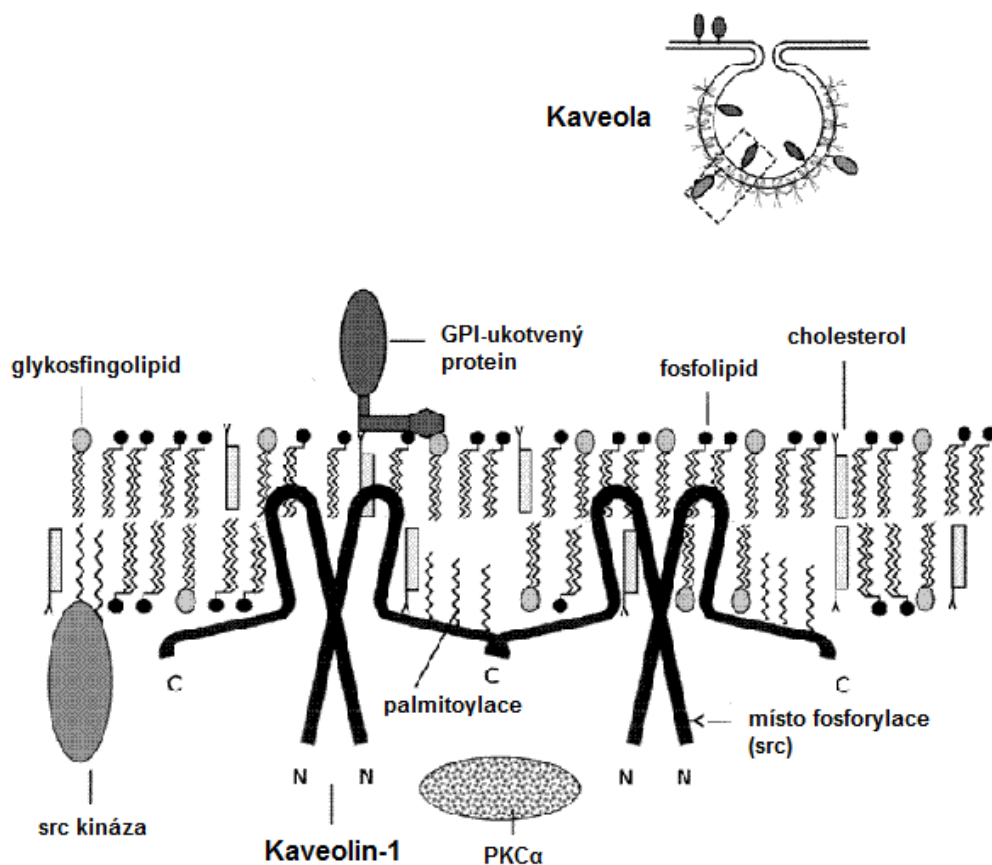
Ke vzniku zásadně odlišných názorů na zastoupení GPCR v MD přispěla i skutečnost, že různí autoři používali pro izolaci, a následnou analýzu MD, odlišné metodické přístupy. V souvislosti se studiem vlivu hormonální stimulace na zastoupení GPCR a G proteinů v MD je třeba rovněž zvážit skutečnost, že vysoké koncentrace detergentů (0,5-1 % TX-100), které se po desetiletí používaly pro jejich izolaci, působí degradaci funkčního spřažení mezi receptorem a G proteinem (Bourova et al., 2003). Totéž platí při aplikaci izolačního postupu používajícího alkalický uhličitán sodný (pH 9) a sonikaci (Song et al., 1996a,b; Rybin et al., 2000, 2003). Za plně uspokojivou metodu pro izolaci membránových domén lze považovat metodu popsanou Smartem (Smart et al., 1995), která není založena na použití detergentu. Kromě metodického přístupu použitého pro izolaci MD záleží rovněž na buněčném typu a podtypu studovaného proteinu (Chini a Parenti, 2004; Allen et al., 2007), přičemž význam MD při signalizaci β_2 -AR v srdečním svalu lze považovat za prokázaný (Rybin et al., 2000, 2003; Steinberg a Brunton, 2001).

Membránové domény se na regulaci buněčných procesů mohou podílet v principu dvěma různými způsoby, pozitivně či negativně. Přítomnost daných signálních molekul v rámci určitého typu membránových domén může zvýšit jejich místní koncentraci a tudíž

i pravděpodobnost jejich vzájemné interakce, což v konečném důsledku způsobí zrychlení přenosu signálu z extracelulárního prostředí do nitra buňky. Na druhé straně mohou membránové domény sloužit také jako platforma pro regulaci v negativním slova smyslu, tedy ve smyslu snížení účinnosti přenosu signálu (Epanand et al., 2005, 2006). V tomto ohledu byla jednoznačně prokázána především úloha kaveol. Řada signálních molekul fyzicky interaguje s kaveolinem a tato interakce zabraňuje jejich aktivaci. Příkladem takových proteinů jsou zástupci některých tříd heterotrimerních G proteinů, které jsou vazbou na kaveolin inaktivovány (Li et al., 1995; Oh a Schnitzer, 2001).

2.12. Kaveoly

Kaveoly jsou morfologicky jasně definované útvary, které lze pozorovat elektronovým mikroskopem. Jedná se o vchlípeniny plazmatické membrány, jejichž tvar připomíná řecké písmeno omega (*Ω-shaped invaginations of plasma membrane*) (Anderson, 1998; Smart et al., 1999).



Obr. 6 Struktura kaveol a lipidové dvojvrstvy obsahující kaveolin (převzato z práce Bender et al., 2002 a upraveno)

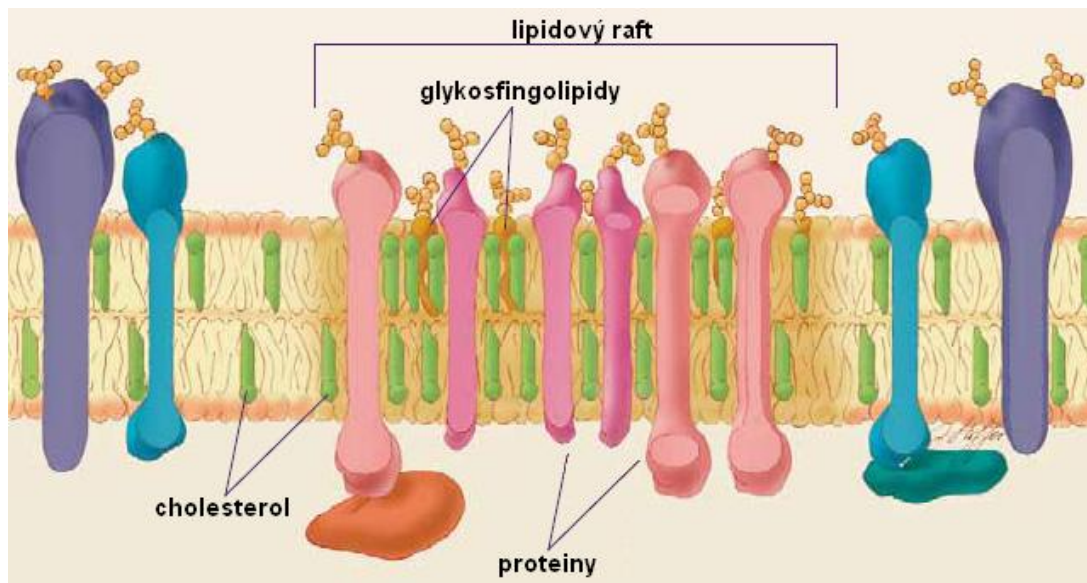
Hlavní nelipidovou složkou kaveol je cholesterol vázající protein kaveolin. V současné době jsou známy tři izoformy kaveolinu, které se označují jako kaveolin-1, kaveolin-2 a kaveolin-3. Kaveolin-1 a kaveolin-2 jsou exprimovány v buňkách nejrůznějších tkání, ne však v neuronech. Kaveolin-3 se naopak specificky nachází pouze ve svalové tkáni (Okamoto et al., 1998). Kaveoliny jsou integrální membránové proteiny nacházející se v rámci intracelulární části membránové dvojvrstvy PM. Kaveoliny se do membrány zanořují prostřednictvím 33 AMK dlouhé hydrofobní domény. Obě koncové domény kaveolinů jsou umístěny v cytoplazmě. Místem syntézy kaveolinů je drsné ER. Kaveoliny jsou již v průběhu syntézy zabudovávány do membrány ER, odkud jsou poté transportovány do GA. V membráně GA dochází k oligomerizaci kaveolinů a rovněž k vazbě cholesterolu. Preformované kaveoly jsou do plazmatické membrány dopravovány prostřednictvím sítě vysoce pohyblivých váčků trans-GA (Parton et al., 2006). Dříve se myslelo, že přítomnost kaveolinu-1 je podmínkou postačující pro tvorbu kaveol. V nedávné době se však zjistilo, že pro formování kaveol je nezbytná přítomnost kavinů. Kaviny jsou rodinou čtyř příbuzných proteinů, které se označují jako kavin-1, kavin-2, kavin-3 a kavin-4. Kaviny jsou periferní membránové proteiny, které se vážou na PS přítomný v kaveolách. Kaviny a kaveoliny se v rámci kaveol vyskytují ve stechiometrickém poměru 1:1. Má se za to, že právě přítomnost kavinů propůjčuje kaveolám jejich specifický tvar (Hansen a Nichols, 2010; Head et al., 2014).

Kaveoly se ve značné míře vyskytují v terminálně diferencovaných periferních buňkách, jako jsou adipocyty, endotelové buňky, fibroblasty a buňky příčně pruhované svaloviny. Tkáněmi s největším obsahem kaveol jsou střevo, tuková tkáň a plíce. V organismu se však nacházejí i buňky, které kaveoly postrádají. Patří mezi ně lymfocyty a neurony (Fielding a Fielding, 2004). Kaveoly jsou zapojeny do řady důležitých buněčných procesů, jako jsou signalizace, transport proteinů nebo transport buněčného cholesterolu. Ukázalo se, že kaveoly slouží jako místa vstupu virů a bakterií do buněk (Pelkmans a Helenius, 2002; Williams a Lisanti, 2004).

2.13. Planární lipidové rafty

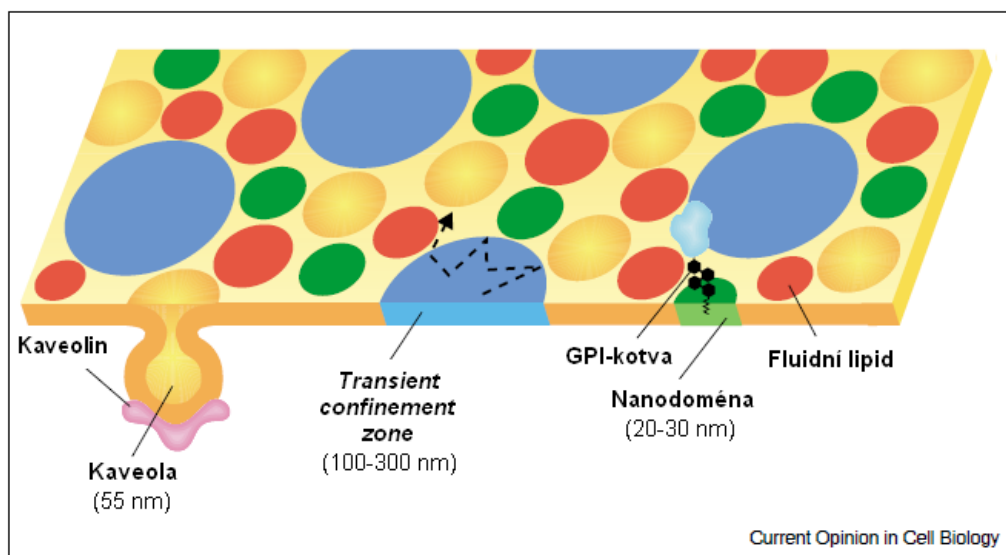
Planární lipidové rafty (rafty) jako takové nelze pozorovat s pomocí elektronové mikroskopie, neboť nevytvářejí v rámci PM žádnou morfoloicky specifickou strukturu. Jedná se o dynamické okrsky PM bohaté na sfingolipidy a cholesterol, jejichž přesná velikost dosud není známa. Předpokládá se spíše, že velikost jednotlivých raftů může být značně proměnlivá. Podle teorie totiž existují spíše jako menší membránové okrsky, které se za určitých podmínek spojují do větších komplexů. Existence těchto větších raftových komplexů ale pravděpodobně není příliš dlouhá. V poslední době se množí důkazy podporující domněnku, že pohyb raftů v PM je řízen prostřednictvím interakce s cytoskeletem (Head et al., 2014).

Rafty vznikají už v membránách GA. Prostředí lumen GA totiž usnadňuje interakce mezi molekulami sfingolipidů, které tak mohou vytvářet separátní membránové domény (Simons a van Meer, 1988). Preformované rafty jsou následně transportovány do PM. Tím ale jejich pohyb v rámci buňky nekončí. Rafty jsou kromě asociace v rámci PM přesouvány endocytózou zpět do nitra buňky, odkud jsou pak znovu navraceny zpět na membránu (Fielding a Fielding, 2003). Jejich distribuce v PM nezávisí pouze na příchozích signálech, ale také na buněčném typu. V případě raftů se předpokládá, že se vyskytují ve všech typech buněk. Rafty totiž existují i v neuronech a lymfocytech, které neobsahují kaveoly. V rámci PM neuronů se rafty nalézají spíše v membránách somatu a axonu. Nalezeny byly také v postsynaptických oblastech neuronů. Rafty se účastní procesů, jako jsou buněčná signalizace, adheze nebo "molekulární třídění" (*molecular sorting*) a slouží v membráně také jako místo pro kontakt s extracelulárními ligandy (Chauhan, 2003). Vizuální představy o transverzálním nebo planárním prostorovém uspořádání membránových raftů jsou znázorněny na **Obr. 7 a 8**.



Obr. 7 Struktura lipidového raftu - vertikální řez membránou

Molekuly cholesterolu (zelená barva) jsou koncentrovány v lipidovém raftu, kde přicházejí do blízkého kontaktu s molekulami bílkovin (růžová barva), které jsou v této membránové struktuře přítomny ve vyšší koncentraci než v jiných částech membrány (modrá a fialová barva). (převzato z práce Davis, 2005 a upraveno)



Obr. 8 Lipidové rafty mají různou velikost – uspořádání v rovině membrány

Podle tohoto modelu je plazmatická membrána mozaikou více typů současně se vyskytujících mikrodomén: kaveoly, nanodomény obohacené glykosfingolipidy a proteiny připojenými GPI-kotvou, oblasti obohacené fluidními lipidy nebo oblasti označované jako *transient confinement zones* (TCZ). Laterální difuze proteinů a lipidů v membráně může být přechodnou (*transient*) dobu omezena (*confined*) pouze na určitý okrsek PM (*zone*), jehož velikost se odhaduje na 100-300 nm. (převzato z práce Maxfield, 2002 a upraveno)

2.14. Snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně

Z výše uvedeného textu je zřejmé, že nutnou podmínkou optimální funkce signálních kaskád GPCR je přesně nastavená a mnoha regulačními mechanismy kontrolovaná, *optimální* struktura (stav) plazmatické membrány. Lze tudíž předpokládat, že narušení této optimální struktury vyvolá změny vlastností plazmatické membrány jako celku i funkčních vlastností proteinů signálních kaskád, které v ní existují. Předchozí části literárního úvodu (kapitoly 2.10 a 2.11) jasně dokládají, že cholesterol je jednou ze základních lipidových molekul tvořících hydrofobní zónu plazmatické membrány a současně i základní, konstitutivní složkou specifických okrsků plazmatické membrány, které se nazývají *membránové domény*. Z obsahu uvedených kapitol dále jasně vyplývá, že membránové domény hrají velmi důležitou a v současné době nedostatečně prozkoumanou úlohu v receptorové signalizaci.

Experimentálně navozené snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně proto můžeme považovat za výhodný *nástroj* jak (*specificky*) testovat úlohu této molekuly a membránových domén v receptorové signalizaci. V naší laboratoři se k tomuto účelu používá metoda extrakce pomocí cyklického oligosacharidu, β -cyklodextrinu (β -CDX), která umožňuje snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně živých buněk za podmínek, kdy nedochází k narušení základních buněčných funkcí (Ostašov et al., 2007). V naší laboratoři byly nejprve používány buňky HEK293, které stabilně exprimovaly receptor pro thyreoliberin (TRH-R, klon E2) a TRH-R společně s vysokým množstvím $G_{11\alpha}$ proteinu (TRH-R a $G_{11\alpha}$, klon E2M11) (Svoboda et al., 1996). Tyto buněčné linie byly studovány z hlediska změn v subcelulární lokalizaci G proteinů po aktivaci TRH-R (Svoboda et al., 1996; Drmota et al., 1998a), desenzitizace hormonální akce (Novotný et al., 1999; Ostašov et al., 2008) i zastoupení $G_q/G_{11\alpha}$ proteinů v membránových doménách (Pešanová et al., 1999). Deplece cholesterolu způsobila snížení citlivosti buněčné odpovědi na stimulaci TRH o dva řády (Ostašov et al., 2007).

Metodu deplece cholesterolu pomocí β -CDX jsme aplikovali i při analýze změny hydrofobní zóny PM a mobility TRH-R v živých buňkách (kapitola 5.7; příloha 3 – manuskript Brejchová et al., 2014). Pro tento účel byly použity buňky HEK293, které stabilně exprimují fluoreskující formu TRH-R, fúzní protein TRH-R-eGFP (klon VTGP; Drmota et al., 1998b).

Následně jsme vypracovali metodu pro zpětnou inkorporaci cholesterolu do buněk, tj. replaci cholesterolu, a obě metody aplikovali při studiu významu hydrofobní zóny

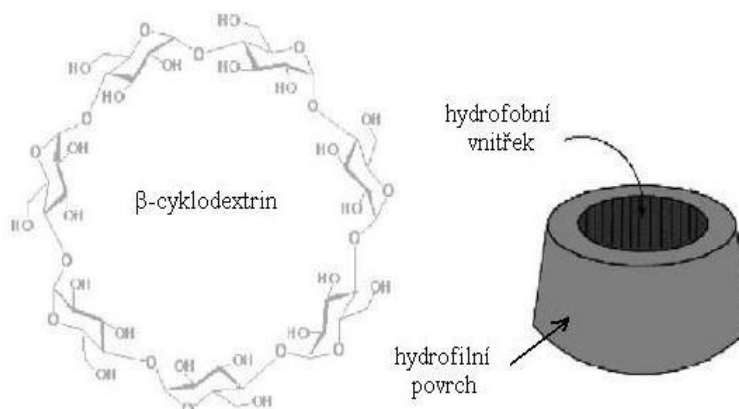
membrány v regulaci funkčního spřažení mezi δ -OR a G proteiny (Brejchová et al., 2011). Pro tento účel jsme použili stabilně transfekovanou buněčnou linii HEK293, která stabilně exprimuje fúzní protein mezi δ -OR a $G_i1\alpha$ proteinem, δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹). δ -OR je v tomto hybridním proteinu spojen kovalentní vazbou s definovaným typem G proteinu ($G_i1\alpha$), což zajišťuje přesnou a současně známou stechiometrii 1:1 mezi receptorem a G proteinem. Další výhodou těchto buněk je, že mutanta $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) není citlivá k pertussis toxinu (PTX), protože tento inhibitor působí selektivně na cystein v poloze 351. Záměna Cys³⁵¹ za Ile³⁵¹ vyvolává necitlivost $G_i1\alpha$ vůči PTX a současně i vysokou aktivitu G proteinu po stimulaci agonistou OR. Vysoká aktivita G proteinu je způsobena přítomností vysoce hydrofobní^{1,2} aminokyseliny (Ile) v této poloze. Z této skutečnosti vyplývá, že preinkubace buněk δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 s PTX blokuje aktivitu všech endogenních G proteinů třídy G_i/G_o , které jsou přítomny v buněčné linii HEK293 a jediným G proteinem, který bude aktivován, zůstává $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹).

Buněčná linie δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 byla rovněž použita pro studii detailního upořádání fluorescenčních analogů cholesterolu, 22- a 25-NBD-cholesterolu v plazmatické membráně (Ostašov et al., 2013).

¹, kvantitativní mírou hydrofobnosti chemických sloučenin je rozdělovací koeficient voda - n-oktanol, Q . Isoleucin vykazuje nejvyšší hodnotu Q při srovnání s ostatními aminokyselinami.

², účinnost spřažení mezi GPCR a G proteinem je přímo úměrná hydrofobnosti aminokyseliny v poloze 351 (Bahia et al., 1988; Moon et al., 2001a,b).

Pro vysvětlení způsobu, jakým β -CDX odstraňuje cholesterol z buněčné membrány, je na následujícím obrázku (**Obr. 9**) uvedena struktura této látky.



Obr. 9 Struktura β -cyklodextrinu

β -CDX je tvořen šesti jednotkami α -D-glukopyranosy spojenými prostřednictvím α -(1,4) glykosidické vazby. Prostorová struktura β -CDX připomíná tvarem dutý kornout, jehož povrch je velmi hydrofilní, zatímco jeho vnitřek je hydrofobní (převzato z práce Del Valle, 2004 a upraveno)

Cyklodextriny se obecně vyznačují schopností tvorby stabilních komplexů s hydrofobními látkami, které se zanořují do hydrofobní dutiny molekuly cyklodextrinu (Del Valle, 2004). Příkladem takové látky je právě cholesterol. β -CDX při interakci s povrchem buňky „nasává“ molekuly cholesterolu z PM do svého hydrofobního nitra, čímž dochází k jejich fyzickému odstranění (depleci) z PM. β -CDX lze použít i za opačným účelem, tedy k dopravení cholesterolu zpět do PM s cílem obnovit původní hladinu cholesterolu i funkci PM. K tomuto účelu je používán strukturně analogický methyl- β -CDX v komplexu s cholesterolem. Tato látka je komerčně dostupná pod názvem „rozpuštěný cholesterol“ (Cholesterol-methyl- β -CDX, Sigma-Aldrich, C4951).

2.15. Charakterizace membránové dvojvrstvy pomocí fluorescenčních sond

Molekuly schopné absorpce fotonu a jeho následné emise se obecně označují jako fluorofory. Existují dvě skupiny fluoroforů, fluorofory přirozené a fluorofory umělé (uměle syntetizované). Mezi přirozené, tedy v přírodě se běžně vyskytující, patří polyaromatické uhlovodíky, heterocykly, porfyriny nebo zelený fluorescenční protein (GFP). Mezi umělé fluorofory se řadí modifikované přirozené fluorofory a fluorofory plně syntetické. Umělé fluorofory mohou být navrženy tak, aby reagovaly na určité druhy podnětů (např. pH nebo koncentrace Ca^{2+}) nebo byly schopny v rámci biologických preparátů specificky označit pouze určité struktury, například buněčné membrány.

Uměle syntetizované membránově specifické fluorofory se označují jako membránové fluorescenční sondy (dále jen membránové sondy nebo sondy). Membránové sondy jsou navrhovány tak, aby se zanořovaly pouze do určité oblasti membránové dvojvrstvy a jejich emisní parametry byly citlivé na dynamické a strukturní změny membránového prostředí.

Membránové sondy lze podle tvaru a rozměrů obecně rozdělit na lineární a nelineární. Tvar a velikost lineárních sond zhruba odpovídá prostorové struktuře řetězců nasycených MK připojených k molekulám fosfolipidů. Mezi zástupce této skupiny patří 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a jeho deriváty 1-4-[(trimethylamino)fenyl]-6-fenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH) a (2-karboxyetyl)-1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (CE-DPH), nebo cis- a trans-parinarová kyselina (*parinaric acid*). Do skupiny nelineárních membránových sond se řadí například pyren nebo antracen.

Lineární membránové sondy se díky své struktuře a orientaci v rámci membránové dvojvrstvy výborně hodí pro sledování membránové dynamiky (fluidity), potažmo struktury. K tomuto účelu se běžně používá metody stanovení polarizace fluorescence sondy v membránových suspenzích (Lentz, 1993).

2.16. Polarizace fluorescence

Pro účel vysvětlení podstaty jevu zvaného polarizace, je nutné chápat světlo jako elektromagnetické vlnění, které je charakterizováno kmitáním vektorů intenzity elektrického pole a magnetické indukce. Tyto vektory kmitají v navzájem kolmých směrech a navzájem budí jeden druhý. Elektromagnetické vlnění se prostředím šíří ve směru kolmém ke směru kmitání obou těchto vektorů. Podstatou polarizace světla je izolace určitého směru kmitání vektoru intenzity elektrického pole. Směr kmitání tohoto vektoru v rámci přirozeného světla totiž není neměnný, nýbrž náhodný. Přirozené světlo je tedy světlem nepolarizovaným. Určitý směr kmitání elektrického vektoru lze izolovat pomocí opticky aktivního zařízení, které se označuje jako polarizátor nebo polarizační filtr.

V rámci metod fluorescenční spektroskopie se polarizátorů využívá ke stanovení míry polarizace fluorescence daného fluoroforu, která poskytuje informaci o uspořádání studovaného systému. Měření polarizace fluorescence se provádí na spektrofluorometru, jehož konstrukce umožňuje buď stanovení hodnot rovnovážné (*steady-state*) nebo časově rozlišené (*time-resolved*) polarizace fluorescence.

V případě měření rovnovážné polarizace fluorescence je vzorek v kyvetě obsahující molekuly fluoroforu ozařován konstantním zdrojem světla určité vlnové délky, které se po průchodu polarizátorem stává vertikálně polarizované. Tímto způsobem dochází k excitaci pouze těch molekul, jejichž orientace, respektive orientace jejich excitačního dipólového momentu, je rovnoběžná s orientací vektoru elektrického pole polarizovaného excitačního světla. Emitované záření je detekováno ve směru kolmém ke směru excitačního záření. V dráze mezi vzorkem v kyvetě a detektorem je umístěn druhý polarizátor, jehož orientace je nejprve vertikální (**V**), a pak horizontální (**H**). Detekovány jsou tedy dvě hodnoty polarizované intenzity fluorescence, I_{VV} a I_{VH} . Polarizace fluorescence je funkcí těchto dvou intenzit. Hodnotu rovnovážné polarizace fluorescence (**P**) lze vypočítat podle následujícího vztahu:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

Z naměřených hodnot polarizované intenzity fluorescence, I_{VV} a I_{VH} , lze vypočítat rovněž hodnotu rovnovážné anizotropie fluorescence (r):

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

Vztah mezi polarizací a anizotropií fluorescence je následující:

$$r = \frac{2P}{3 - P}$$

Míra polarizace fluorescence závisí na pohyblivosti molekul fluoroforu v daném systému. Nejsou-li pohyblivost ani uspořádání molekul fluoroforu v měřeném systému ničím omezené, dá se předpokládat, že míra polarizace fluorescence fluoroforu bude v takovém případě nízká. Je-li pohyb molekul fluoroforu něčím omezen, ať už uspořádaností prostředí, ve kterém se fluorofor nachází (sonda v membráně) nebo připojením k nějaké makromolekule, míra polarizace emitovaného záření takového fluoroforu bude obecně vyšší.

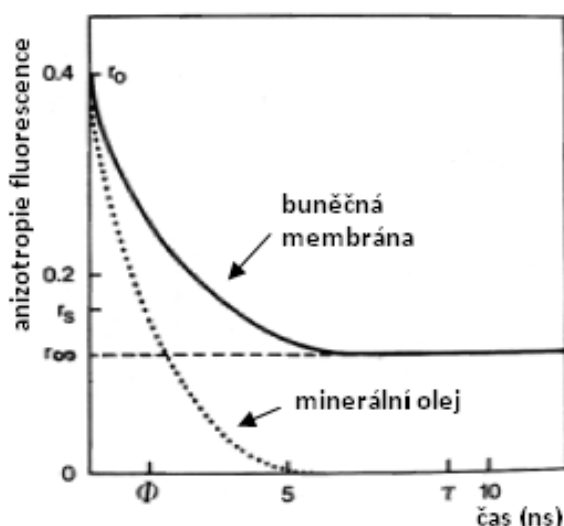
Informace, kterou poskytuje hodnota polarizace (P) nebo hodnota anizotropie (r) je v zásadě stejná. Použití hodnot P nebo r pro charakterizaci daného systému je dáno především zvyklostmi daného experimentátora nebo oblastí výzkumu. V klinické chemii se k charakterizaci daného systému používá téměř výhradně hodnot P , kdežto v biofyzice a biochemii se používají spíše hodnoty r (Jameson a Ross, 2010).

Anizotropie fluorescence je bezrozměrná veličina, jejíž maximální hodnota pro jednofotonovou excitaci je 0,4. V případě membránových sond vypovídají hodnoty rovnovážné anizotropie fluorescence převážně o fluiditě membránové dvojvrstvy, která je určována uspořádáním, respektive pohyblivostí jednotlivých komponent membrány. Podrobnější informace o míře pohyblivosti a uspořádání membránových komponent lze získat prostřednictvím hodnot časově rozlišené anizotropie fluorescence, která slouží k detailnějšímu popisu dynamiky membránových sond.

Obecné schéma měření časově rozlišené anizotropie fluorescence je v zásadě shodné s výše popsaným schématem měření rovnovážné anizotropie fluorescence. Hlavním rozdílem je zdroj světla používaný k excitaci molekul fluoroforu. V případě

měření časově rozlišené anizotropie fluorescence se totiž, na rozdíl od měření rovnovážné anizotropie fluorescence, k excitaci molekul fluoroforu používá pulzního (*time-domain method*, TD) nebo fázově modulovaného zdroje záření (*frequency-domain method*, FD). V následující části této kapitoly bude pojednáno pouze o přístupu měření časově rozlišené anizotropie fluorescence využívajícím pulzního zdroje záření, neboť tento byl použit k získání výsledků uvedených v této dizertační práci.

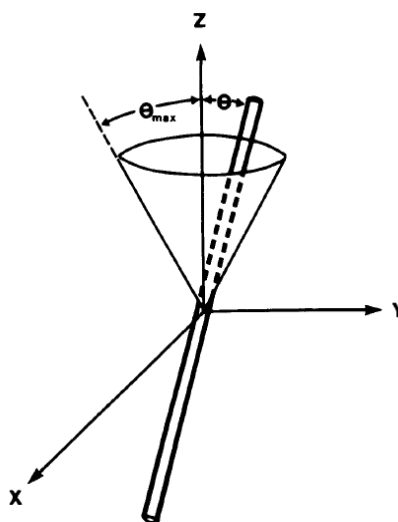
Z naměřených složek polarizované intenzity fluorescence, I_{VV} a I_{VH} , se počítají hned dvě hodnoty anizotropie, limitní a reziduální anizotropie. Limitní anizotropie (r_0) odpovídá hodnotě anizotropie fluorescence na počátku měření, tj. v čase blízkém nule. Reziduální anizotropie (r_∞) odpovídá „zbytkové“ hodnotě anizotropie fluorescence ve velmi dlouhém čase (Van Blitterswijk et al., 1981; Kinosita a Ikegami, 1988). Hodnoty rovnovážné anizotropie (r_s , *steady-state anisotropy*) v biologických membránách leží mezi hodnotami r_0 a r_∞ (**Obr. 10**).



Obr. 10 Pokles anizotropie fluorescence DPH v čase

Srovnání poklesu anizotropie fluorescence DPH v čase ve dvou různých prostředích, tedy v buněčné membráně a izotropním referenčním mediu (minerální olej). r_s , hodnota rovnovážné anizotropie fluorescence, r_0 , hodnota limitní anizotropie, která odpovídá hodnotě anizotropie na počátku měření, tj. v čase blízkém nule, r_∞ , reziduální anizotropie, která odpovídá „zbytkové“ hodnotě anizotropie ve velmi dlouhém čase. (převzato z práce Van Blitterswijk et al., 1981 a upraveno)

V případě měření časově rozlišené anizotropie fluorescence lineárních membránových sond lze prostřednictvím analýzy vypočítaných hodnot r_0 a r_∞ získat parametry, které poskytují informace o pohyblivosti těchto sond v rámci membránové dvojvrstvy. Hodnoty r_0 a r_∞ se v tomto případě analyzují s pomocí modelu *wobbling-in-cone*, který slouží k popisu rotačního pohybu lineárních membránových sond (Kawato et al., 1977; Kinosita et al., 1982). Tento model chápe lineární sondu jako tyčkovitý objekt (*rod-like object*), jehož rotace v rámci membrány probíhá pouze s takovou rychlostí (*rate*) a rozsahem (*range*), jaké mu umožňuje okolní lipidové prostředí (**Obr. 11**). Zmíněnými parametry, které charakterizují rotační pohyb sondy v membráně, jsou difuzně-rotací konstanta (D_w) a parametr uspořádanosti S (*S-order parameter*). D_w popisuje rychlost rotace sondy, zatímco S vypovídá o rozsahu tohoto pohybu. Matematické vztahy pro výpočet parametrů časově rozlišené anizotropie fluorescence jsou uvedeny v kapitole 4.9.



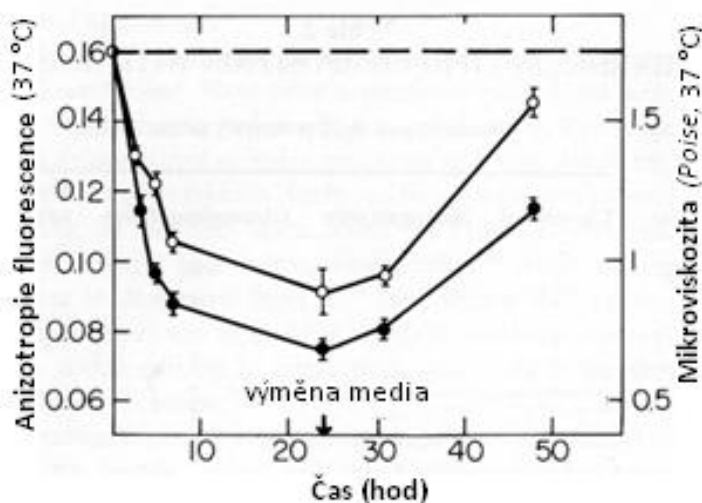
Obr. 11 Schematické znázornění rotace lineární membránové sondy dle modelu *wobbling-in-cone*

θ_{\max} , úhel maximálního výkyvu od osy (z) při rotačním pohybu lineární sondy v membráně. (převzato z práce Lentz, 1993)

Lineární membránovou sondou, která je v naší laboratoři mnoho let používána pro charakterizaci vlastností hydrofobní zóny různých biologických membrán, je DPH. Tato sonda patří mezi hojně využívanou především proto, že její použití má řadu výhod. První výhodnou vlastností této hydrofobní fluorescenční sondy je skutečnost, že tato ve vodném roztoku tvoří agregáty, které téměř nefluoreskují. Další výhodnou vlastností je snadná inkorporace sondy do hydrofobního prostředí membránové dvojvrstvy. Po přidání roztoku

DPH v organickém rozpouštědle, jako je aceton nebo tetrahydrofuran, k míchané suspenzi membrán ve vodném roztoku lze rychle detekovat velmi silný fluorescenční signál, jehož intenzita je $\approx 1000x$ větší než fluorescence DPH ve vodě. Fluorescence DPH, které je inkorporováno v membráně, není ovlivněna fluorescencí DPH, které je přítomno ve vodě. Metoda využívající DPH pro charakterizaci strukturních a dynamických parametrů membrány je proto velmi spolehlivá a reprodukovatelná. Hodnoty anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) navíc představují velmi citlivý parametr, který je měněn širokou škálou fyziologických dějů (Shinitzky (1984) *Physiology of Membrane Fluidity, Vol. I and II*).

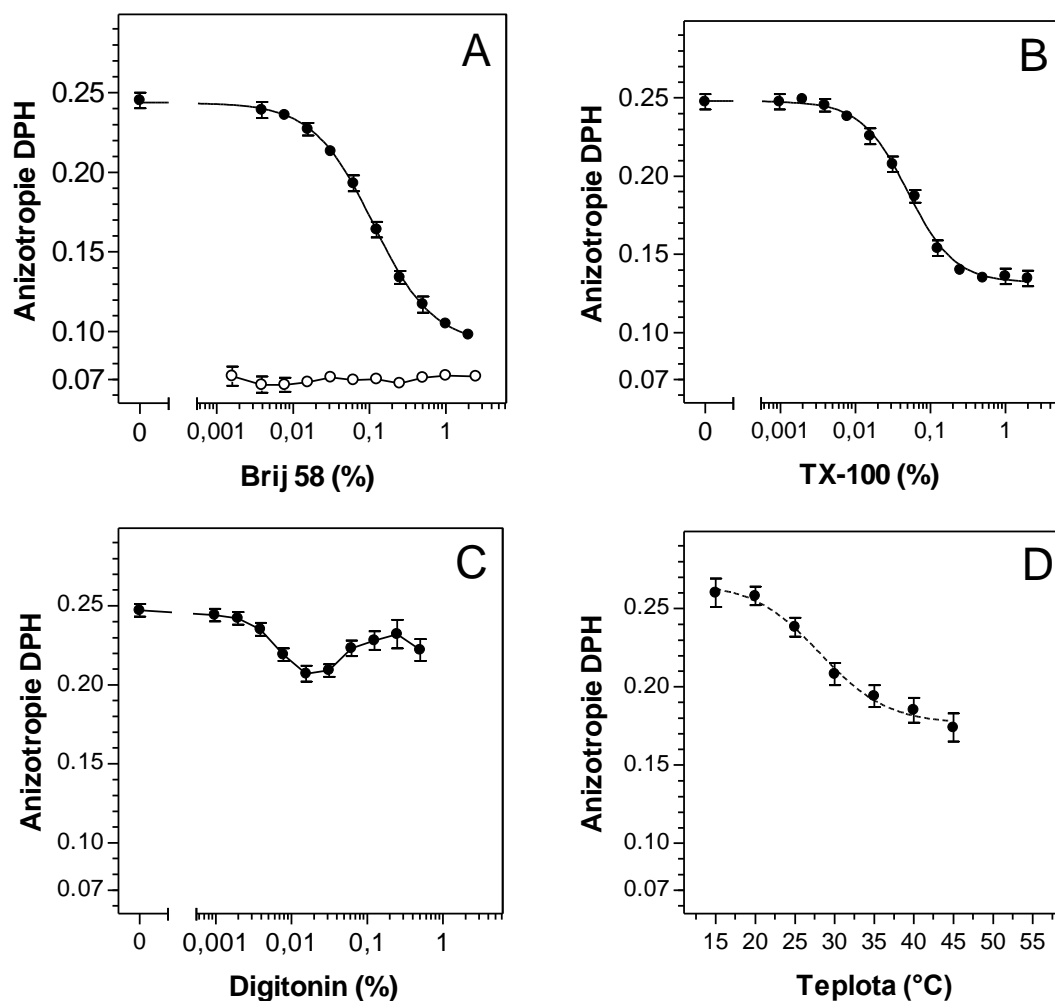
Z chemického hlediska je DPH vysoce hydrofobní molekula, která se zabudovává hluboko do hydrofobní zóny membránové dvojvrstvy, která je tvořena řetězci mastných kyselin molekul fosfolipidů. Anizotropie fluorescence DPH tedy odráží stav této oblasti membránové dvojvrstvy, a poskytuje tak informaci o její struktuře (uspořádanosti) a pohyblivosti (tekutosti, *fluiditě*). Vztah mezi hodnotami anizotropie fluorescence DPH a fluiditou membrány je následující. Zvyšuje-li se fluidita membrány, hodnota r_{DPH} klesá. Snižuje-li se fluidita membrány, hodnota r_{DPH} roste. Příkladem citlivosti, s jakou anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) monitoruje zvýšení fluidity buněčných membrán je vliv kyseliny olejové na membrány neuroblastomových buněk (**Obr. 12**). Inkorporace kyseliny olejové do membrán způsobuje výrazné snížení hodnoty r_{DPH} .



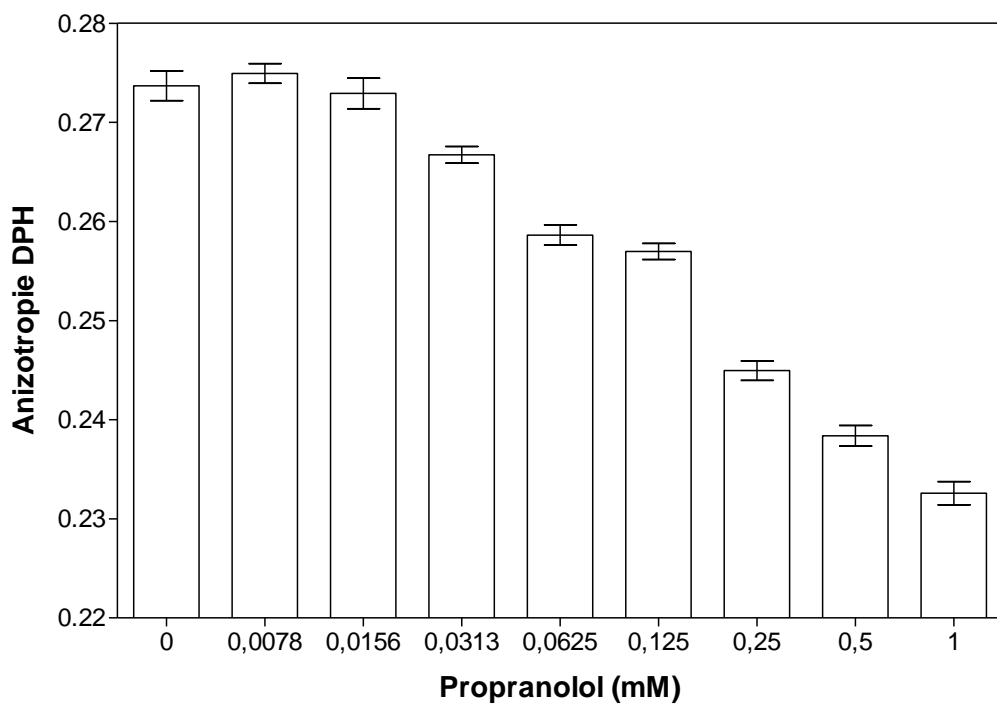
Obr. 12 Stanovení vlivu kyseliny olejové na fluiditu membrány neuroblastomových buněk s pomocí rovnovážné anizotropie fluorescence DPH

Buňky (klon Neuro-2A[®]) byly po dobu 24 hodin kultivovány v mediu bez séra (○) nebo v mediu se sérem (●) obsahujícím kyselinu olejovou (40 $\mu\text{g/ml}$). Médium bylo poté nahrazeno mediem, které již kyselinu olejovou neobsahovalo. Přerušovaná čára znázorňuje počáteční hodnotu anizotropie, tedy hodnotu před přidáním kyseliny olejové. (převzato z práce Shinitzky, 1984 a upraveno)

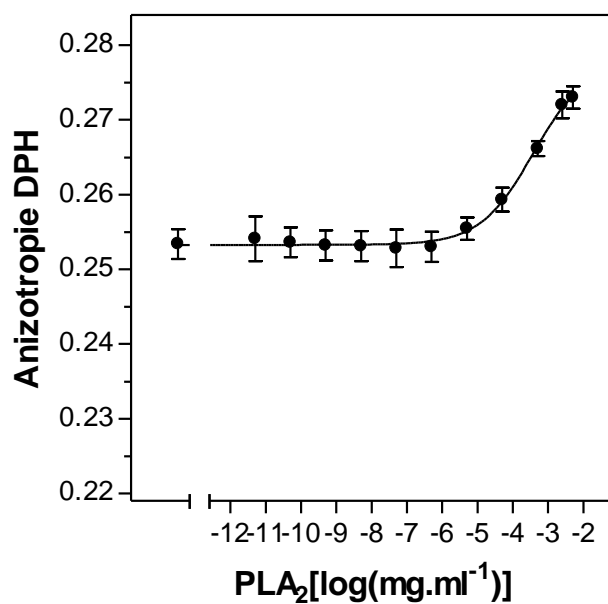
Podobný efekt na membrány mají i neiontové detergenty a vzestup teploty (Obr. 13) nebo vysoké koncentrace hydrofobního antagonisty β -AR, propranololu (Obr. 14). Opačný efekt, tj. snížení fluidity neboli zvýšení mikroviskozity membrán způsobuje fosfolipáza A₂ (PLA₂, Obr. 15) nebo chlorpromazin (Obr. 16).



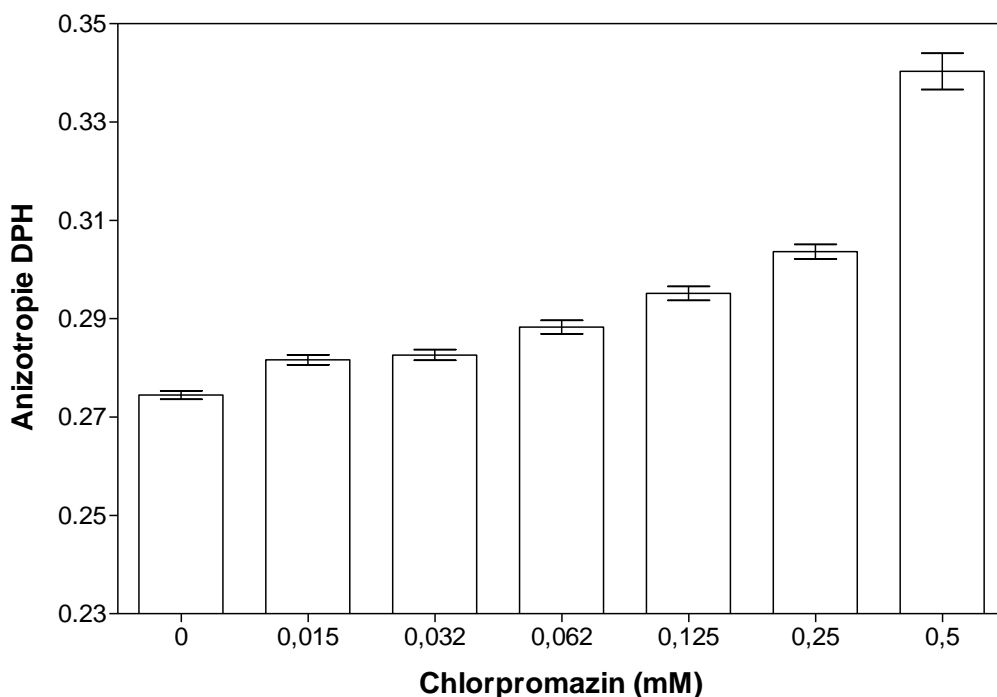
Obr. 13 Vliv neiontových detergentů Brij58 (A), Triton X-100 (B), Digitonin (C) a teploty (D) na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH: izolované plazmatické membrány z mozku potkana (převzato z práce Sýkora et al., 2009 a upraveno)



Obr. 14 Vliv propranololu na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH: *izolované plazmatické membrány předního mozku potkana* (Vošahlíková, nepublikováno)



Obr. 15 Vliv PLA₂ na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH: *izolované plazmatické membrány předního mozku potkana* (Roubalová, nepublikováno)



Obr. 16 Vliv chlorpromazinu na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH: izolované plazmatické membrány předního mozku potkana (Vošahlíková, nepublikováno)

2.17. Metoda generalizované polarizace fluorescence (GP) a využití sondy Laurdan

Jak již bylo uvedeno výše, membránové sondy lze navrhnout tak, aby se zanořovaly pouze do určité oblasti membránové dvojvrstvy. Příkladem takové sondy je Laurdan (6-lauroyl-2-dimethylaminonaftalen), který se v rámci membránové dvojvrstvy zabudovává do hydrofilní oblasti tvořené polárními hlavičkami molekul fosfolipidů. Fluorescenční parametry této sondy tedy odráží stav této oblasti membránové dvojvrstvy.

Specifickou vlastností této sondy je citlivost jejích spektrálních parametrů vůči polaritě prostředí (rozpouštědla), ve kterém se sonda nachází. Emisní maximum sondy Laurdan v polárních rozpouštědlech je oproti emisnímu maximu v nepolárních rozpouštědlech posunuto směrem k červené oblasti spektra viditelného záření (*red shift*), tedy k delším vlnovým délkám. Pro kvantifikaci příspěvků intenzity fluorescence jednotlivých emisních maxim byl zaveden parametr označovaný jako generalizovaná polarizace, který je analogií definice klasické polarizace fluorescence (viz výše).

Generalizovaná polarizace (GP) je obecně definována následujícím vztahem:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

kde I_B je intenzita fluorescence emisního maxima modré oblasti (*blue*, B) spektra viditelného záření a I_R je intenzita fluorescence emisního maxima posunutého směrem k červené oblasti (*red*, R) spektra viditelného záření.

Důvod pro definici a použití parametru GP pro analýzu spektrálních vlastností sondy Laurdan (po jeho inkorporaci do membrán) vyplývá z vlastností klasické polarizace fluorescence, která je kvantitou poskytující informace o dynamice interkonverze mezi různými stavy fluoroforu. V rámci klasické definice polarizace fluorescence jsou tyto dva stavy reprezentovány vertikální a horizontální orientací emisního polarizátoru a odpovídají rozdílné orientaci emisního dipólového momentu studované sondy vzhledem k laboratorní ose. V případě sondy Laurdan odpovídají tyto dva stavy dvěma rozdílným maximům emisního spektra této sondy (Parasassi et al., 1990).

Měření fluorescence sondy Laurdan v umělých membránových systémech potvrdila, že spektrální vlastnosti této sondy jsou schopny informovat o fázovém stavu lipidového prostředí. Emisní maximum sondy Laurdan, je-li inkorporován v membránové dvojvrstvě, jejíž lipidy se nacházejí v tekuté krystalické fázi, je vzhledem k emisnímu maximu v membránové dvojvrstvě, jejíž lipidy se nacházejí v gelové fázi, posunuto směrem k červené oblasti spektra viditelného záření. Emisní maxima sondy Laurdan v jednotlivých lipidových fázích jsou od sebe vzdálena přibližně 50 nm. Tento rozdíl je způsoben „reorientací“ (relaxací) molekul rozpouštědla v okolí molekuly fluoroforu nacházející se v excitovaném stavu, která se odehrává v tekuté krystalické fázi, zatímco v gelové fázi nenastává (Velázquez a Fernández, 2006).

3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

1) Prvním cílem této dizertační práce byla analýza vlivu snížení obsahu (deplece) cholesterolu v plazmatické membráně na opioidní receptor typu delta (δ -OR) a mechanismus funkčního spřažení mezi tímto receptorem a trimerními G proteiny. K tomuto účelu posloužily modelové buňky HEK293, které stabilně exprimují hybridní molekulu δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), která je necitlivá k pertussis toxinu a vykazuje vysokou aktivitu G proteinu po stimulaci agonistou δ -OR (linie δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293).

2) Druhým cílem bylo stanovit vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti plazmatických membrán těchto buněk s pomocí fluorescenčních membránových sond 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a Laurdan. Fluorescenční parametry těchto membránových sond odrážejí stav hydrofobní zóny (DPH), respektive hydrofilní oblasti (Laurdan) membránové dvojvrstvy.

3) Třetím cílem bylo získat bezprostřední informace o změnách v uspořádání molekul cholesterolu v plazmatické membráně *živých buněk* δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, které způsobí deplece cholesterolu. Pro tento účel byly zvoleny fluorescenční analogy cholesterolu, 22- a 25-NBD-cholesterol.

4) Výzkum úlohy membránového cholesterolu v mechanismu účinku δ -OR pokračoval v rámci spolupráce se zahraničním pracovištěm (Prof. M. Parenti, *University of Milano-Bicocca, Italy*), kde byla provedena studie vlivu deplece cholesterolu, resp. degradace membránových domén, na internalizaci tohoto receptoru. Pro tento účel byly použity buňky HEK293T přechodně transfekované FLAG- δ -OR a průběh internalizace δ -OR byl porovnán s internalizací receptoru pro oxytocin (OTR).

5) Paralelně s programem orientovaným na výzkum δ -OR, jsem se podílela na zavedení metody FRAP a RICS pro analýzu mobility receptoru pro thyreoliberin (TRH-R). Pro tento účel byly použity buňky linie HEK293 stabilně exprimující fluoreskující verzi TRH-R, TRH-R-eGFP (linie VTGP). První částí tohoto programu byla standardizace metody kultivace těchto buněk a následný sběr velkého množství buněk, které sloužilo pro přípravu plazmatických membrán na hustotním gradientu Percollu. Tento biochemický preparát PM byl následně použit pro stanovení funkčních parametrů aktivity TRH-R-eGFP.

4. MATERIÁLY A METODY

4.1. Kultivace buněk

Buňky linie HEK293 stabilně exprimující fúzní protein mezi δ -OR a mutantou $G_i1\alpha$ proteinu necitlivé vůči působení pertussis toxinu (δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), Moon et al., 2001) i buňky HEK293 stabilně exprimující fluoreskující verzi TRH-R, fúzní bílkovinu TRH-R-eGFP (VTGP; Drmota et al., 1998b) byly kultivovány v *Dulbecco's modified Eagle's* médiu (DMEM, Sigma-Aldrich, D6429) obsahujícím 9% tepelně inaktivované *Newborn Calf Serum* (NCS, GIBCO, 26010-074). Pro udržení stabilní exprese jak proteinu δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), tak proteinu TRH-R-eGFP bylo do média pravidelně přidáváno antibiotikum geneticin (Gibco, 11811-031) tak, aby jeho výsledná koncentrace v médiu byla 0,8 mg/ml. Kultivace probíhala při teplotě 37°C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂. Ke kultivaci byly použity lahve s kultivační plochou 80 cm² (NUNC, 153732). Při dosažení 70-90% pokrytí kultivační plochy lahví byly buňky trypsinizovány, resuspendovány v čerstvém médiu a rozsazeny do nových kultivačních lahví.

Buňky linie HEK293T použité pro přechodnou transfekci byly kultivovány v DMEM (Sigma-Aldrich, D5671) obsahujícím 10% tepelně inaktivované *Fetal Bovine Serum* (FBS, Sigma-Aldrich, 26010-074), 2 mM glutamin, penicilin o koncentraci 100 I.U./ml a streptomycin o koncentraci 100 µg/ml. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂. Ke kultivaci byly použity Petriho misky o průměru 10 cm. Buňky byly trypsinizovány při dosažení 70-90% pokrytí kultivační plochy Petriho misky, resuspendovány v čerstvém médiu a nasazeny do nové Petriho misky a pro účely transfekce rovněž na krycí sklíčka.

4.2. Inkubace buněk s pertussis toxinem

Inkubace buněk δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 s pertussis toxinem (PTX, Sigma-Aldrich, P2980) byla provedena za účelem inaktivace endogenně exprimovaných G proteinů třídy G_i/G_o . Buňky byly inkubovány s PTX po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂ a následně buď rovnou sklizeny, nebo ještě před sklizením podrobeny depleci cholesterolu. PTX byl přidán do kultivačního média tak, aby jeho finální koncentrace byla 25 ng/ml.

4.3. Manipulace obsahu membránového cholesterolu

Deplece membránového cholesterolu buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 byla navozena inkubací s roztokem 10 mM β -cyklodextrinu (β -CDX, Sigma-Aldrich, C4805) v DMEM bez séra (DMEM). Buňky byly po odsátí kultivačního média opláchnuty 5 ml DMEM, které bylo následně nahrazeno 5 ml roztoku 10 mM β -CDX nebo 5 ml DMEM (kontroly). Inkubace trvala 1 hodinu a probíhala při teplotě 37 °C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂.

V případě replece cholesterolu byly buňky po inkubaci s 10 mM β -CDX dále inkubovány s „rozpuštěným cholesterolem“ (Cholesterol-methyl- β -CDX, Sigma-Aldrich, C4951) v DMEM. Finální koncentrace cholesterolu v médiu byla 0,25 mM. Buňky byly po odsátí inkubačního média (10 mM β -CDX nebo DMEM) opláchnuty 5 ml čistého DMEM, které bylo následně nahrazeno 5 ml DMEM obsahujícím cholesterol-methyl- β -CDX nebo 5 ml DMEM (kontroly). Inkubace trvala 2 hodiny a probíhala při teplotě 37 °C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂.

Posledním případem manipulace obsahu membránového cholesterolu bylo obohacení plazmatických membrán cholesterolem, které bylo provedeno inkubací buněk s „rozpuštěným cholesterolem“. Buňky byly po odsátí kultivačního média opláchnuty 5 ml DMEM, které bylo následně nahrazeno 5 ml DMEM obsahujícím cholesterol-methyl- β -CDX. Finální koncentrace cholesterolu v médiu byla opět 0,25 mM jako při repleci. Kontrolní buňky byly inkubovány v samotném DMEM. Inkubace trvala 2 hodiny a probíhala při teplotě 37 °C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂.

Buňky byly po ukončení všech typů inkubace mechanicky sklizeny v roztoku ledově vychlazeného PBS pufru (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, P4417), jehož složení bylo následující: 10 mM fosfátový pufr (KH₂PO₄/ K₂HPO₄), 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4. Kultivační lahve byly po odsátí inkubačního média umístěny na led, opláchnuty vychlazeným PBS, a mechanicky sklizeny v PBS při 0 °C. Suspenze buněk v PBS byla následně centrifugována po dobu 10 minut při 300 × g a teplotě 4 °C (Hettich Universal 320 R). Po odlití supernatantu byl buněčný sediment zmrazen v tekutém dusíku a následně uskladněn při teplotě -80 °C do té doby, než byl použit k izolaci frakcí plazmatických membrán (PM).

4.4. Izolace frakcí plazmatických membrán

Buněčný sediment byl po rozmrazení homogenizován v ledově vychlazeném STEM pufru (250 mM sacharóza, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, pH 7,6) obsahujícím 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF, SERVA, 32395) a 1×koncentrovaný roztok inhibitorů proteáz (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, 11 697 498 001). Homogenizace byla provedena ve sklo-teflonovém homogenizátoru po dobu 7 minut při 1800 rpm a teplotě 4 °C. Homogenát byl následně centrifugován po dobu 7 minut při 1160 × g a teplotě 4 °C (Hettich Universal 320 R). Centrifugace homogenátu byla provedena za účelem sedimentace buněčných jader. Poté byl odebrán postnukleární supernatant, který byl dále použit pro izolaci frakcí plazmatických membrán (PM).

Izolace frakcí PM probíhala na gradientu Percollu (GE Healthcare, 17-0891-01), jehož 30% roztok v STEM pufru byl připraven těsně před použitím. Připravený roztok 30% Percollu byl převeden do silnostěnných polykarbonátových centrifugačních kyvet typu Beckman (objem 26,3 ml) a opatrně převrstven 3 ml postnukleárního supernatantu tak, aby nedošlo k promíchání s roztokem Percollu. Kyvety byly po vyvážení umístěny do ledově vychlazeného úhlového rotoru Beckman Ti 70.1. a centrifugovány po dobu 30 minut při 61 000 × g a teplotě 4 °C na ultracentrifuze Beckman Optima XL-100K. Tato centrifugace měla za následek oddělení frakce PM (horní) od frakce mitochondrií (dolní). Frakce PM byly opatrně odebrány, naředěny STEM pufrem v poměru 1:3 a znovu centrifugovány na ultracentrifuze Beckman Optima XL-100K, tentokrát po dobu 2 hodin při 170 000 × g a teplotě 4 °C. Účelem této centrifugace bylo přečištění PM od zbytků roztoku Percollu. Pelet frakce PM byl po centrifugaci ručně zhomogenizován v malém objemu TEM pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, pH 7,6). Výsledná suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek, které byly poté zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy do -80 °C.

4.5. Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita modifikovaná metoda podle Lowryho (Lowry et al., 1951). Koncentrace proteinů ve frakcích PM byla stanovena v triplicátu o výsledném objemu 500 µl, připraveném přidáním 5 µl suspenze PM do 495 µl destilované vody. Kalibrační řada byla připravena přidáním roztoku hovězího sérového albuminu (BSA, Sigma-Aldrich, A-2153) o koncentraci 1 mg/ml do destilované vody tak, aby jednotlivé zkumavky obsahovaly 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 a 200 µg

proteinu a jejich výsledný objem byl 500 μ l. Ke všem vzorkům bylo následně přidáno 1,5 ml roztoku A+B+C, vzniklého smícháním 50 ml roztoku A (2% Na₂CO₃ a 0,1 M NaOH), 1 ml roztoku B (2% vlnan sodno-draselný) a 1 ml roztoku C (1% CuSO₄ x 5 H₂O). Vzorky byly ihned po přidání roztoku promíchány a inkubovány po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. V mezičase byl připraven čerstvý roztok Folinova reagens (Sigma-Aldrich, F-9252). Zásobní roztok byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:1. Po ukončení inkubace vzorků s roztokem A+B+C bylo s časovým rozestupem 30 sekund ke vzorkům postupně přidáno 150 μ l zředěného Folinova reagens, vzorky byly ihned promíchány a opět inkubovány při laboratorní teplotě, tentokrát po dobu 30 minut. Absorbance jednotlivých vzorků byla přesně po 30 minutách od přidání Folinova reagens změřena při vlnové délce 595 nm na spektrofotometru BioPhotometer plus značky Eppendorf. Naměřená data byla vyhodnocena programem GraphPad Prism4 pomocí rovnice polynomu druhého řádu ($y = ax^2 + bx + c$).

4.6. Vazba agonisty [³H]DADLE - saturační vazebné křivky

Frakce plazmatických membrán (10 μ g proteinu) byly inkubovány v přítomnosti zvyšující se koncentrace (0,15–20 nM) radioligandu [³H]DADLE ve výsledném objemu 100 μ l reakční směsi obsahující 75 mM Tris-HCl (pH 7,4), 12,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA po dobu 1 hodiny při 30 °C. Vazebná reakce byla ukončena přidáním 3 ml ledově vychlazeného 10 \times zředěného inkubačního pufru následovaným filtrací přes filtry ze skelných vláken (Whatman GF/B) a promytím (2 \times 3 ml) na Brandel cell harvestoru. Filtry byly následně umístěny do scintilačních lahvíček obsahujících 4 ml scintilačního roztoku (Cytoscint, ICN) a ponechány 16 hodin při laboratorní teplotě. Radioaktivita zachycená na filtrech byla změřena přístrojem pro kapalnou scintigrafii. Nеспецифická vazba byla stanovena v přítomnosti 10 μ M neradioaktivního DADLE. Hodnoty rovnovážné disociační konstanty (K_d) a maximálního počtu vazebných míst (B_{max}) byly získány nelineární regresí v programu GraphPad Prism4 za použití rovnice rektangulární hyperboly (saturační vazebná křivka).

4.7. Agonistou stimulovaná vysokoafinní vazba [³⁵S]GTPγS - křivky dávka odpověď

Frakce plazmatických membrán byly inkubovány v přítomnosti (celková vazba) nebo nepřítomnosti (bazální vazba) zvyšující se koncentrace agonisty DADLE (0,1-20 nM) ve výsledném objemu 100 μl reakční směsi obsahující 20 mM HEPES (pH 7,4), 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2 μM GDP, 0,2 mM askorbát a [³⁵S]GTPγS (100-200 000 dpm) po dobu 30 minut při 30 °C. Vazebná reakce byla ukončena přidáním 3 ml ledově vychlazeného pufru (20 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, pH 7,4) následovaným filtrací přes filtry ze skelných vláken (Whatman GF/C) a promytím (2 × 3 ml) na Brandel cell harvesteru. Filtry byly následně umístěny do scintilačních lahvíček obsahujících 4 ml scintilačního roztoku (CytoScint, ICN) a ponechány 16 hodin při laboratorní teplotě. Radioaktivita zachycená na filtrech byla změřena přístrojem pro kapalnou scintigrafii. Nespecifická vazba byla stanovena v přítomnosti 10 μM neradioaktivního GTPγS. Hodnoty koncentrace agonisty, při které je obsazena polovina vazebných míst (EC₅₀), a maximálního počtu vazebných míst (B_{max}) byly získány nelineární regresí v programu GraphPad Prism4.

4.8. Měření rovnovážné anizotropie fluorescence DPH

Zásobní suspenze frakcí PM byly naředěny v TE pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) na výslednou koncentraci proteinu 0,1 mg/ml a za stálého míchání označeny přidáním 1 mM zásobního roztoku DPH v acetonu (Invitrogen, D-202) tak, aby výsledná koncentrace sondy v membránové suspenzi byla 1 μM. Značení probíhalo v temnu po dobu 30 minut při 25 °C. Anizotropie byla následně změřena v kyvetách z křemenného skla (1 × 1 cm) s pomocí spektrofluorimetru PC1 od firmy ISS. Vlnová délka excitace a emise byla nastavena na 365 nm, respektive 425 nm.

Měření suspenzí frakcí PM izolovaných z buněk podrobených manipulaci obsahu membránového cholesterolu v podmínkách *in vivo*, které nebyly vystaveny působení PTX, probíhalo při 20 °C, respektive 40 °C. V případě stanovení vlivu deplece cholesterolu v podmínkách *in vitro* byly použity frakce PM izolované z kontrolních buněk a buněk, které byly před sklizením inkubovány s PTX. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Zásobní suspenze frakcí PM izolovaných z těchto buněk byly naředěny v roztocích 0, 2,5, 5 a 10 mM β-CDX v TE pufru, inkubovány za stálého míchání po dobu 1 hodiny při

laboratorní teplotě a teprve poté označeny fluorescenční sondou podle výše uvedeného postupu.

Rovnovážnou anizotropii DPH (r_{DPH}) lze vypočítat podle rovnice:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

I_{VV} - intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního i emisního polarizátoru; I_{VH} - intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního a horizontální orientaci emisního polarizátoru.

4.9. Měření časově rozlišené fluorescence a anizotropie fluorescence DPH

Měření probíhalo na přístroji TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) IBH 5000 U, který je vybaven pulzním diodovým laserem s frekvencí 1 MHz. Vlnová délka excitace a emise byla nastavena na 375 nm, respektive 450 nm. Časově rozlišené parametry fluorescence a anizotropie fluorescence byly vypočítány podle následujících rovnic.

Časová závislost intenzity fluorescence je definována vztahem:

$$I(t) = I_{VV}(t) + 2G \times I_{VH}(t)$$

I_{VV} - intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního i emisního polarizátoru

I_{VH} - intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního a horizontální orientaci emisního polarizátoru

t - čas

G - G faktor, který byl stanoven s pomocí standardu POPOP.

$$G = \frac{\langle I_{HV}(t) \rangle_t}{\langle I_{HH}(t) \rangle_t}$$

I_{HV} - intenzita fluorescence měřená při horizontální orientaci excitačního a vertikální orientaci emisního polarizátoru

I_{HH} - intenzita fluorescence měřená při horizontální orientaci excitačního i emisního polarizátoru.

Doba života excitovaného stavu (*lifetime*) byla získána fitováním naměřených hodnot intenzity podle funkce:

$$I(t) = B_1 \times \exp(-t/\tau_1) + B_2 \times \exp(-t/\tau_2)$$

B – amplituda

t - čas

τ – doba života excitovaného stavu (*lifetime*)

Časově rozlišená anizotropie fluorescence DPH je definována následujícím vztahem:

$$r(t) = (I_{VV}(t) - I_{VH}(t)) / (I_{VV}(t) + 2I_{VH}(t))$$

Jednotlivé parametry časově rozlišené anizotropie fluorescence byly získány fitováním vypočítaných hodnot anizotropie podle uvedené funkce:

$$r(t) = (r(0) - r(\infty)) \times \exp(-t/\phi) + r(\infty)$$

$r(0)$ – limitní anizotropie

$r(\infty)$ – reziduální anizotropie

ϕ - rotačně-korelační čas

Analýzou hodnot limitní a reziduální anizotropie fluorescence podle modelu *wobbling-in-cone* (Kawato et al., 1977) byly získány následující dva parametry, které popisují rotační pohyb DPH v membráně. Parametr uspořádanosti S (*S-order parameter*) vypovídá o rozsahu rotačního pohybu sondy a je definován následujícím vztahem:

$$S = \left(\frac{r(\infty)}{r(0)} \right)^{1/2}$$

Difuzně-rotací konstanta (D_w) popisuje rychlost rotace sondy a je definována vztahem:

$$D_w = \frac{\sigma_s}{\phi}$$

ϕ - rotačně-korelační čas; σ_s - relaxační čas, jehož hodnota byla určena výpočtem podle práce Kinosita et al., 1982.

4.10. Měření generalizované polarizace (GP) sondy Laurdan

Zásobní suspenze frakcí PM izolovaných z kontrolních buněk byly naředěny v roztocích 0, 2,5, 5 a 10 mM β -CDX v TE pufru na výslednou koncentraci proteinu 0,1 mg/ml, inkubovány za stálého míchání po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě a poté označeny přidáním roztoku 0,4 mM Laurdan v metanolu (Invitrogen, D-250) tak, aby výsledná koncentrace sondy v membránové suspenzi byla 10 μ M. Značení probíhalo za stálého míchání, v temnu po dobu 30 minut při 40 °C. Měření probíhalo na spektrofluorimetru PC1 od firmy ISS při teplotách 25 °C a 40 °C. Emisní spektra byla měřena při fixních vlnových délkách excitace 340 nm, 370 nm a 410 nm. Excitační spektra byla měřena při fixních vlnových délkách emise. Generalizovaná polarizace (GP) byla vypočítána z naměřených hodnot intenzity fluorescence podle práce Parasassi et al., 1991. GP excitačních a emisních spekter byla vypočítána podle následujících vztahů.

Excitační GP spektra byla vypočítána podle rovnice:

$$GP_{exc}^{\lambda} = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

I_{440} – intenzita fluorescence při excitační vlnové délce λ (320-420 nm) naměřená při fixní emisní vlnové délce 440 nm

I_{490} – intenzita fluorescence při excitační vlnové délce λ (320-420 nm) naměřená při fixní emisní vlnové délce 490 nm

Emisní GP spektra byla vypočítána podle rovnice:

$$GP_{em}^{\lambda} = \frac{I_{410} - I_{340}}{I_{410} + I_{340}}$$

I_{410} – intenzita fluorescence při emisní vlnové délce λ (425-550 nm) naměřená při fixní excitační vlnové délce 410 nm

I_{340} – intenzita fluorescence při emisní vlnové délce λ (425-550 nm) naměřená při fixní excitační vlnové délce 340 nm

Zjištěním směrnice jednotlivých GP spekter (GPS) lze získat další informace o chování sondy v měřeném systému (Velázquez a Fernández, 2006). Směrnice excitačních GP spekter ($GP_{exc}S$) byla vypočítána podle rovnice:

$$GP_{exc}S = \frac{GP_{exc}^{410} - GP_{exc}^{340}}{410 - 340}$$

GP_{exc}^{410} – hodnota excitační GP při excitační vlnové délce 410 nm

GP_{exc}^{340} – hodnota excitační GP při excitační vlnové délce 340 nm

Směrnice emisních GP spekter ($GP_{em}S$) byla vypočítána podle rovnice:

$$GP_{em}S = \frac{GP_{em}^{490} - GP_{em}^{440}}{490 - 440}$$

GP_{em}^{490} – hodnota emisní GP při emisní vlnové délce 490 nm

GP_{em}^{440} – hodnota emisní GP při emisní vlnové délce 440 nm

4.11. Stanovení obsahu membránového cholesterolu

Stanovení množství cholesterolu v homogenátu a frakcích PM, které byly připraveny z kontrolních buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 a z buněk podrobených depleci cholesterolu, bylo provedeno s pomocí kitu - *Amplex® Red Cholesterol Assay Kit* (Invitrogen, A12216). Stanovení množství cholesterolu prostřednictvím tohoto kitu je založeno na detekci molekul H₂O₂ produkovaných oxidací molekul volného cholesterolu

enzymem cholesterol oxidázou (CHO) prostřednictvím 10-acetyl-3,7-dihydroxazinu (*Amplex Red reagents*). Interakcí *Amplex Red reagents* s H_2O_2 (stechiometrie 1:1) v přítomnosti křenové peroxidázy (HRP) dochází ke vzniku vysoce fluorescenční látky zvané resorufin, který slouží ke kvantifikaci obsahu cholesterolu v analyzovaném vzorku. Prostřednictvím tohoto kitu lze detekovat také esterifikovanou formu molekul cholesterolu, neboť kit obsahuje také enzym cholesterol esterázu (CHE), jejímž působením dochází k hydrolytickému štěpení esterů cholesterolu na volný cholesterol a MK.

Obsah cholesterolu byl stanoven v tetraplikátu. Analyzované vzorky byly naředěny $1 \times$ koncentrovaným reakčním pufrům tak, aby výsledná koncentrace proteinu byla 0,25 mg/ml. Kalibrační řada obsahující 0-8 μ g cholesterolu/ml byla připravena naředěním referenčního standardu cholesterolu ve stejném pufru. Takto připravené roztoky analyzovaných preparátů i vzorků kalibrační řady byly následně po 50 μ l rozděleny do jednotlivých jamek černé 96-jamkové destičky (NUNC, 137101). Reakce byla spuštěna přidáním 50 μ l reakční směsi ke všem vzorkům. Reakční směs vznikla smícháním HRP, CHO, CHE a *Amplex Red reagents* v $1 \times$ koncentrovaném reakčním pufru. Inkubace vzorků s reakční směsí probíhala v temnu po dobu 30 minut a při 37 °C. Fluorescence resorufinu byla poté detekována s pomocí čtečky destiček Victor Wallac. Vlnová délka excitace a emise byla nastavena na 544 nm, respektive 590 nm. Naměřená data byla následně analyzována lineární regresí v programu GraphPad Prism4.

4.12. Inkorporace 22- a 25-NBD-cholesterolu do buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Buňky byly pro tento účel kultivovány v komůrkách, jejichž kultivační povrch tvoří krycí sklíčko (*LAB-TEK Chambered coverglass*, NUNC 155411), který byl pro zvýšení adheze buněk potažen poly-D-lysinem. Potažení bylo provedeno inkubací s roztokem poly-D-lysinu o koncentraci 0,1 mg/ml a probíhalo v temnu po dobu 60 min při 37 °C. Po odsátí roztoku poly-D-lysinu a před aplikací kultivačního média byla sklíčka dvakrát promyta deionizovanou H_2O . Před značením bylo buňkám odsáto kultivační médium a nahrazeno barvicím roztokem obsahujícím 100 nM 22-NBD-cholesterol (Invitrogen, N-1148) nebo 25-NBD-cholesterol (Avanti Polar Lipids, 810250P), který byl připraven přidáním zásobního roztoku sondy v etanolu do DMEM (Ostašov et al., 2013). Inkubace probíhala po dobu 30 minut při 37 °C v humidifikované atmosféře s obsahem 5% CO_2 . Po odsátí barvicího roztoku byly buňky třikrát opláchnuty DMEM a poté podrobeny depleci

cholesterolu (viz podkapitolu Manipulace obsahu membránového cholesterolu). Kontrolní buňky byly inkubovány s DMEM. Buňky byly poté opláchnuty bezbarvým DMEM. V bezbarvém DMEM byly rovněž uchovávány v průběhu mikroskopie.

4.13. Konfokální mikroskopie - pozorování živých buněk

Zhotovení mikroskopických snímků buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 značených 22- nebo 25-NBD-cholesterolem za účelem stanovení distribuce fluorescenčního signálu bylo provedeno s pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu Leica TCS SP2 AOBS. Pro pozorování byl použit objektiv pro vodní imerzi s numerickou aperturou 1,2 a 63-násobným zvětšením (HCX PL APO 63x/1.20 Imm Corr). Pro excitaci byl použit Ar-Kr laser o vlnové délce 488 nm a emise byla snímána v rozsahu vlnových délek 500-600 nm. Rozlišení snímků bylo nastaveno na 512×512 pixelů a hloubka odstínu šedi na 8 bitů. Měření probíhalo při 37 °C a v atmosféře s 5% CO₂. Zhotovené snímky byly analyzovány s pomocí programu ImageJ.

4.14. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) - pozorování živých buněk

Zhotovení mikroskopických snímků buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 značených 22- nebo 25-NBD-cholesterolem za účelem stanovení distribuce hodnot doby života excitovaného stavu (*lifetime*) bylo provedeno s pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu MicroTime 200 (PicoQuant, Germany). Měření probíhalo při 37 °C a v atmosféře s 5% CO₂. Pro pozorování byl použit objektiv pro vodní imerzi s numerickou aperturou 1,2 a 60-násobným zvětšením. Pro excitaci byl použit pulzní diodový laser (LDH-P-C-470, 470 nm) s frekvencí 20 MHz a výkonem nižším než 5 μ W. Excitační a emisní záření bylo odděleno dichroickým zrcátkem 505DRLP (Omega Optical, USA) a fluorescence byla poté směřována do detekčního kanálu vybaveného *band-pass* filtrem HQ 515/50 (Omega Optical, USA) a SPCM-AQR-14 detektorem (Perkin Elmer, Canada) spojeným se *single photon counting system PicoHarp 300* (PicoQuant, Germany). Poté byly pro každý pixel zrekonstruovány křivky dohasínání fluorescence, na jejichž základě byla pro každý pixel snímku podle následujícího vztahu vypočítána průměrná hodnota času dohasínání τ_{av} . Ta byla určena jako intenzitně vážený průměr podle následujícího vztahu:

$$\tau_{av} = \frac{\sum I_i t_i}{\sum I_i} - t_{offset}$$

τ_{av} - průměrná hodnota *lifetime* v daném pixelu

I_i – intenzita fluorescence v čase t_i

t_{offset} - čas odpovídající náběžné hraně dohasínání

4.15. Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla namnožena v bakteriích DH5 α , což je jeden z kmenů bakterie *Escherichia coli*. Transformace bakterií plazmidovou DNA byla provedena metodou tepelného šoku (*heat shock*). Izolace namnožené DNA byla provedena s pomocí kitu *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, 12143). Kvalita izolované DNA byla ověřena prostřednictvím horizontální agarózové elektroforézy, které předcházelo štěpení plazmidové DNA s pomocí specifických restrikčních enzymů. Koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky.

4.16. Přejídná transfekce

Pro přejídnou transfekci buněk linie HEK293T byly použity následující plazmidy, které byly připraveny a poskytnuty laboratoří Prof. M. Parentiho (*University of Milano-Bicocca, Italy*).

pcDNA3

pcDNA3 vektor kódující FLAG- δ -OR cDNA

pcB6 vektor kódující Myc-OTR cDNA

pGW1 vektor kódující HA-TP β cDNA

pGW1 vektor kódující Myc-TP β cDNA

pGW1 vektor kódující Myc-TP α cDNA

pEGFP vektor kódující Rab4/Rab5/Rab7/Rab11 cDNA

Buňky linie HEK293T byly pro účely přejídné transfekce nasazeny na krycí sklíčka o průměru 19 mm umístěná ve 12-jamkové destičce, jejichž povrch byl za účelem zvýšení adheze buněk potažen poly-D-lysinem. Potažení bylo provedeno inkubací s roztokem poly-D-lysinu o koncentraci 0,1 mg/ml po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Po odsátí roztoku poly-D-lysinu a před aplikací kultivačního média byla sklíčka dvakrát

promyta deionizovanou H₂O. Nasazení buněk probíhalo 24 hodin před provedením transfekce za použití takového množství buněk, aby bylo v den transfekce dosaženo 50-60% pokrytí kultivačního povrchu krycích sklíček. Transfekce buněk byla provedena za pomoci transfekčního reagens od firmy Roche (*FuGENE 6 Transfection Reagent*, 11 814 443 001) podle následujícího postupu. Vytvoření komplexů transfekčního reagens s DNA bylo dosaženo smícháním transfekčního reagens s DNA v optimalizovaném poměru 3:1 (1,5 µl:0,5 µg DNA, **Tab. 1**) v DMEM a následnou inkubací po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Vzniklé komplexy byly poté bez výměny média přidány k buňkám narostlým na krycích sklíčkách. Kultivace transfekovaných buněk probíhala po dobu 48 hodin za standardních podmínek a bez výměny média. Buňky byly použity k pozorování vlivu deplece cholesterolu na internalizaci receptoru.

Tab. 1 Množství reagensů použitých pro transfekci 1 ks 19 mm sklíčka

jednoduchá transfekce	DMEM	<i>FuGENE</i>	DNA		
			receptor	Rab protein	pcDNA3
FLAG-δ-OR	100 µl	1,5 µl	100 ng	-	400 ng
Myc-OTR	100 µl	1,5 µl	100 ng	-	400 ng
kotransfekce					
FLAG-δ-OR	100 µl	1,5 µl	200 ng	100 ng	200 ng
Myc-TPβ	100 µl	1,5 µl	200 ng	100 ng	200 ng
Myc-TPα + HA-TPβ	100 µl	1,5 µl	200 ng + 200 ng	100 ng	-

4.17. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci receptoru – nepřímá imunofluorescence

Transfekované buňky byly na počátku každého experimentu po dobu 1 hodiny inkubovány s médiem obsahujícím primární protilátky (myší monoklonální protilátky, ředění 200krát) proti epitopu FLAG (Sigma, F3165) nebo Myc (Santa Cruz, sc-40). Inkubace probíhala při teplotě 37 °C v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂. Médium obsahující protilátky bylo k buňkám přidáno ihned po odsátí kultivačního média. Takto byly označeny pouze ty receptory, které byly v daném okamžiku přítomny v PM.

Následovala inkubace buněk s β -CDX a agonistou (DADLE pro δ -OR, oxytocin pro OTR, U46619 pro TP). Médium obsahující primární protilátky bylo po uplynutí inkubace nahrazeno roztokem 10 mM β -CDX v DMEM, nebo roztokem agonisty (100 nM DADLE, 100 nM oxytocin, 1 μ M U46619) v DMEM, nebo DMEM obsahujícím 10 mM β -CDX spolu s agonistou, nebo samotným DMEM (kontroly). Buňky byly s těmito roztoky inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C v humidifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂. Po ukončení inkubace byly buňky zafixovány.

Fixace byla provedena roztokem obsahujícím 4% paraformaldehyd a 4% sacharózu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Vzniklé preparáty byly po odsátí fixačního roztoku promyty roztokem PBS pufru, 2 \times 10 min při pokojové teplotě a 1 \times přes noc při teplotě 4 °C.

Následující den bylo provedeno barvení s fluorescenčně značenými sekundárními protilátkami. V případě jednoduché transfekce byly použity protilátky konjugované s fluoroforem *Alexa Fluor*® 488 (*donkey anti-mouse*, Invitrogen, A21202). V případě kotransfekce byly k vizualizaci receptorů použity protilátky konjugované s fluoroforem *Alexa Fluor*® 568 (*goat anti-mouse*, Invitrogen, A11004). Fixované preparáty byly před inkubací se sekundárními protilátkami nejprve promyty roztokem pufru o vysoké koncentraci soli (HS (*high-salt*) pufr, 500 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2), 3 \times 5 min při pokojové teplotě. Preparáty byly následně inkubovány s roztokem 100 \times naředěných sekundárních protilátek v pufru obsahujícím 450 mM NaCl, 0,2% (w/v) hovězí gelatinu, 0,3% (v/v) Triton X-100, 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.2 v prostředí vlhké komůrky po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Preparáty byly poté postupně promyty roztokem HS pufru, 3 \times 5 min při pokojové teplotě, a roztokem pufru o nízké koncentraci soli (LS (*low-salt*) pufr, 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2), 1 \times 5 min. Preparáty byly dále inkubovány s roztokem 1 μ M DAPI (barvení DNA) v PBS (10 min, v temnu), promyty roztokem LS pufru (1 \times 5 min), opláchnuty rychlým ponořením do destilované vody a na závěr jednotlivě umístěny na kapku 90% glycerolu v PBS na podložním skle. Na závěr byla pozice krycích sklíček na podložních sklech zafixována bezbarvým lakem na nehty.

4.18. Konfokální mikroskopie – pozorování fixovaných preparátů

Fixované preparáty byly pozorovány na skenovacím konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 710. Pro pozorování byl použit objektiv pro olejovou imerzi s numerickou aperturou 1,4 a 63-násobným zvětšením (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27). Pro excitaci EGFP a Alexa Fluor 488 byl použit Ar laser o vlnové délce 488 nm, zatímco pro excitaci Alexa Fluor 568 byl použit DPSS laser o vlnové délce 561 nm. Světelným zdrojem použitým pro excitaci DAPI byl diodový laser o vlnové délce 405 nm. Rozlišení pořizovaných snímků bylo vždy 512×512 pixelů, přičemž hloubka odstínu šedi byla nastavena na 8 bitů. V případě preparátů zhotovených z kotransfekovaných buněk byly pořizovány pouze snímky buněk exprimujících oba studované proteiny (receptor a Rab protein). V rámci každé transfekce bylo pro každou skupinu ovlivněných buněk pořízeno v průměru 10 snímků, které zobrazovaly optické řezy odpovídající prostřednímu průřezu buňkou. Zhotovené snímky byly analyzovány s pomocí programu ImageJ.

4.19. Analýza mikroskopických snímků v programu ImageJ

4.19.1. Jednoduchá transfekce - analýza lokalizace receptoru

Za účelem odstranění nespecifického signálu bylo před kvantifikací vybraných buněk manuálně nastaveno rozmezí intenzity stupňů šedi 10-255, které měl program použít pro stanovení požadovaných parametrů. Poté následoval výběr oblasti analyzovaného snímku určený ke kvantifikaci. Pro analýzu každé buňky byly vybrány vždy dvě oblasti, oblast celé buňky a oblast cytoplazmy. Výběr byl proveden manuálním obkreslením dané oblasti s použitím *Polygon Selection Tool*. Kvantifikace signálu zvolené oblasti byla provedena stanovením parametru *integrated density*. Populace internalizovaných receptorů, tedy receptorů, které se vlivem inkubace buněk s β -CDX nebo agonistou přesunuly z PM do cytoplazmy, byla vypočítána jako podíl hodnot *integrated density* oblasti cytoplazmy a oblasti celé buňky. Vypočítané hodnoty byly normalizovány podle hodnoty stanovené v případě receptorů, jejichž internalizaci vyvolala inkubace s agonistou. Tímto způsobem bylo v každé skupině preparátů zhotovených v rámci jednoho experimentu (β -CDX, agonista, β -CDX + agonista, kontroly) hodnoceno vždy 8 buněk.

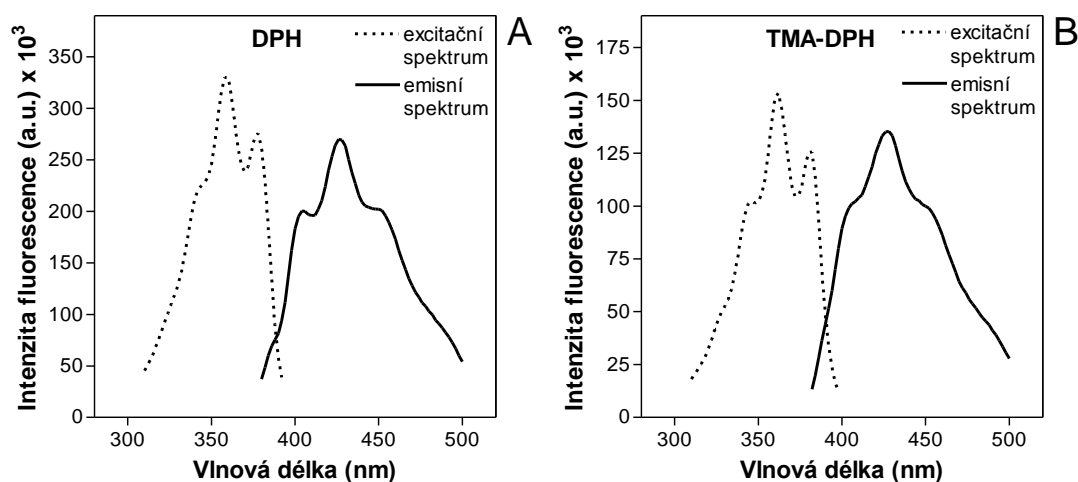
4.19.2. Kótransfekce - analýza kolokalizace receptoru s Rab proteinem

V tomto případě byla v rámci každé buňky pro analýzu zvolena pouze oblast cytoplazmy, kde se nacházely internalizované receptory. Výběr této oblasti byl proveden s pomocí *Rectangular Selection Tool*. Poté bylo nastaveno rozmezí intenzity stupňů šedi s pomocí funkce *autothreshold*. Míra překryvu signálu odpovídajícího internalizovanému receptoru (červený kanál) se signálem odpovídajícím Rab proteinu (zelený kanál) byla zjištěna stanovením hodnoty Mandersova koeficientu kolokalizace (*Manders' coefficient*) s pomocí JACoP (*Just Another Co-localization Plugin*) podle práce Bolte a Cordelières, 2006. Tímto způsobem bylo v každé skupině preparátů zhotovených v rámci jednoho experimentu (β -CDX, agonista) hodnoceno vždy 10 buněk.

5. VÝSLEDKY

5.1. Optimalizace metody pro stanovení rovnovážné anizotropie fluorescence DPH

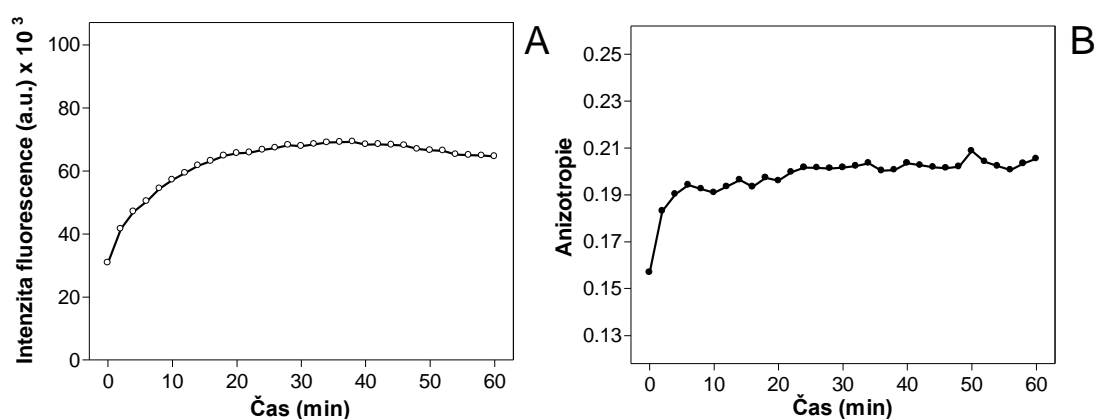
Standardizace metody pro stanovení rovnovážné anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) byla provedena na plazmatických membránách (PM) izolovaných z buněk VTGP. Na začátku každého měření s fluorescenční sondou je nutné ověřit intenzitu fluorescence, což se v praxi provádí změřením excitačního a emisního spektra (**Obr. 17A**). Emisní spektrum DPH bylo měřeno při excitační vlnové délce 365 nm. Excitační spektrum DPH bylo měřeno při emisní vlnové délce 425 nm. Pro porovnání, byla rovněž změřena spektra polárnějšího derivátu TMA-DPH (**Obr. 17B**). Spektra obou uvedených membránových sond byla měřena při shodných excitačních a emisních vlnových délkách a stejném nastavení přístroje. Průběh spekter byl téměř totožný, intenzita fluorescence však byla odlišná. Příčinou rozdílu intenzit fluorescence byl zřejmě rozdíl v použitých rozpouštědlech, aceton (DPH) a dimetylformamid (TMA-DPH). V dalších pokusech byl proto používán základní roztok 1 mM DPH v čerstvě destilovaném acetonu.



Obr. 17 Spektra DPH (A) a TMA-DPH (B) v plazmatických membránách izolovaných z kontrolních VTGP buněk

Inkubace membránové suspenze se sondou (DPH nebo TMA-DPH) probíhala za stálého míchání po dobu 1 hodiny, v temnu a při teplotě 25 °C. Finální koncentrace sondy (DPH nebo TMA-DPH) v membránové suspenzi byla 1 μ M. Emisní spektra byla měřena při excitační vlnové délce 365 nm. Excitační spektra byla měřena při emisní vlnové délce 425 nm. Měření probíhalo při teplotě 25 °C.

Následně byla změřena časová závislost intenzity fluorescence DPH po přidání této sondy k míchané suspenzi membrán (**Obr. 18A**). Po uplynutí 30 minut bylo dosaženo maximální hodnoty intenzity, která se s postupujícím časem již dále nezvyšovala. V paralelním pokuse byla ve stejné membránové suspenzi stanovena časová závislost anizotropie fluorescence (r_{DPH}). Zvýšení hodnot r_{DPH} bylo rychlejší než v případě intenzity fluorescence, nicméně, ustálení hodnot r_{DPH} na konstantní úrovni vyžadovalo podobný časový interval jako dosažení maximálních hodnot intenzity fluorescence - 30 minut (**Obr. 18B**).



Obr. 18 Závislost intenzity fluorescence (A) a anizotropie fluorescence (B) DPH na době inkubace s preparátem PM izolovaných z kontrolních VTGP buněk

Stanovení jednotlivých hodnot intenzity a anizotropie fluorescence DPH probíhalo v časových rozestupech 2 minuty od okamžiku přidání zásobního roztoku DPH k membránové suspenzi. Finální koncentrace DPH v membránové suspenzi byla 1 μM . Měření probíhalo při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$.

5.2. Vliv deplece cholesterolu na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH (r_{DPH}) v membránách VTGP buněk

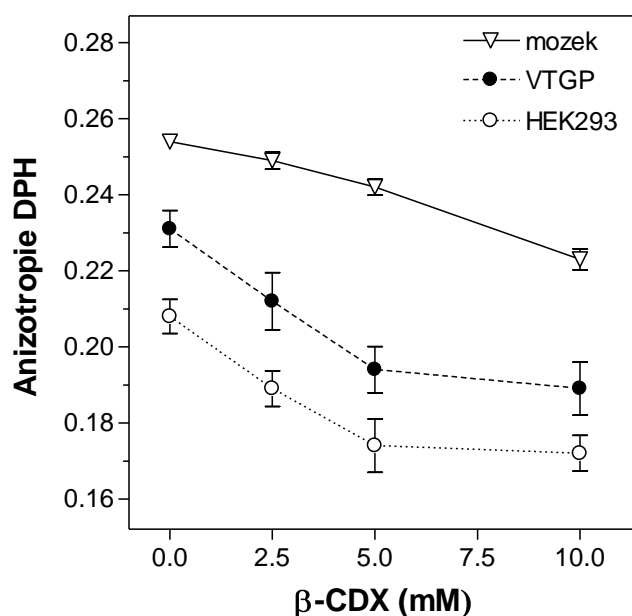
Snížení (deplece) membránového cholesterolu bylo nejprve provedeno inkubací membrán, které byly izolovány z kontrolních buněk, s rostoucí koncentrací $\beta\text{-CDX}$, tedy v podmínkách *in vitro*. Z výsledků znázorněných v **Tab. 2** a na **Obr. 19** je zřejmé, že hodnoty anizotropie DPH citlivě odpovídaly na snížení obsahu cholesterolu v membránách, což se projevilo výrazným poklesem hodnot r_{DPH} . Pro srovnání jsou uvedeny hodnoty r_{DPH} pro membrány připravené z mozku potkana (frontální kortex) a mateřské linie HEK293 buněk.

Tab. 2 Vliv deplece cholesterolu na anizotropii fluorescence DPH v různých typech biologických membrán

Mozek, kůra předního mozku potkana; VTGP, buněčná linie HEK293 stabilně exprimující fúzní protein VSV-TRH-R-eGFP; HEK293, mateřská buněčná linie VTGP buněk.

Uvedené hodnoty r_{DPH} představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze tří nezávislých měření.

	mozek	VTGP	HEK293
β-CDX (mM)	$r_{DPH} \pm SEM$	$r_{DPH} \pm SEM$	$r_{DPH} \pm SEM$
0	0,254 \pm 0,002	0,231 \pm 0,005	0,208 \pm 0,005
2,5	0,249 \pm 0,002	0,212 \pm 0,008	0,189 \pm 0,005
5	0,242 \pm 0,002	0,194 \pm 0,006	0,174 \pm 0,005
10	0,223 \pm 0,003	0,189 \pm 0,007	0,172 \pm 0,005
15	0,218 \pm 0,002	0,201 \pm 0,006	0,188 \pm 0,004



Obr. 19 Vliv deplece cholesterolu na rovnovážnou anizotropii fluorescence DPH v různých typech biologických membrán

Jednotlivé typy membránových preparátů byly nejprve inkubovány s β -CDX (30 minut) nebo se samotným pufrém (0 mM β -CDX) a následně označeny DPH (30 minut). Finální koncentrace DPH v membránové suspenzi byla 1 μ M. Inkubace s β -CDX a DPH, stejně jako samotné měření, probíhala při teplotě 25 $^{\circ}$ C. Hodnoty uvedené v grafu představují průměrnou hodnotu $r_{DPH} \pm SEM$ ze tří nezávislých měření.

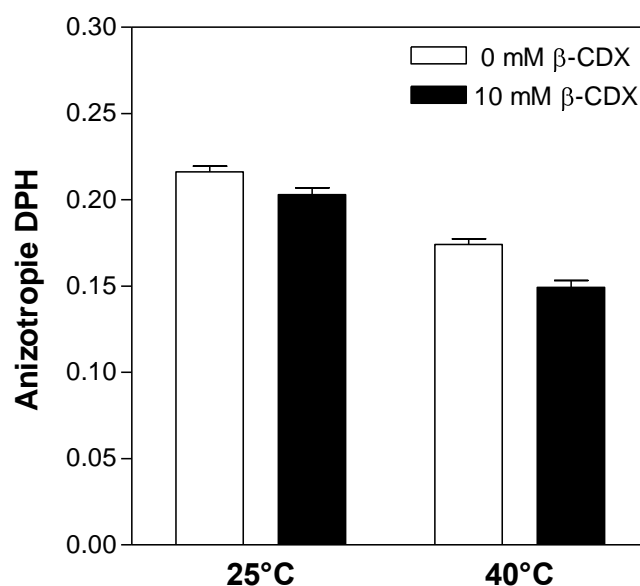
Mozek, kůra předního mozku potkana; VTGP, buněčná linie HEK293 stabilně exprimující fúzní protein VSV-TRH-R-eGFP; HEK293, mateřská buněčná linie VTGP buněk.

Výsledky získané v podmínkách *in vitro*, byly ověřeny v podmínkách *in vivo*: v plazmatických membránách (PM) izolovaných z VTGP buněk, které byly vystaveny účinku 10 mM β -CDX přímo během kultivace v živném médiu (70-80% konfluence). Z výsledků znázorněných v **Tab. 3** a na **Obr. 20** je zřejmé, že hodnoty r_{DPH} v PM, které byly připraveny z buněk vystavených účinku 10 mM β -CDX, byly signifikantně nižší než v PM izolovaných z kontrolních buněk. Rozdíl mezi oběma typy PM byl patrný při teplotě měření 25 °C i 40 °C.

Tab. 3 Hodnoty rovnovážné anizotropie fluorescence DPH v PM izolovaných z *in vivo* ovlivněných VTGP buněk - *stanovení při různých teplotách*

Uvedené hodnoty r_{DPH} představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze tří nezávislých měření.

	25 °C	40 °C
β -CDX (mM)	$r_{DPH} \pm SEM$	$r_{DPH} \pm SEM$
0	0,216 \pm 0,002	0,174 \pm 0,002
10	0,203 \pm 0,003	0,149 \pm 0,003

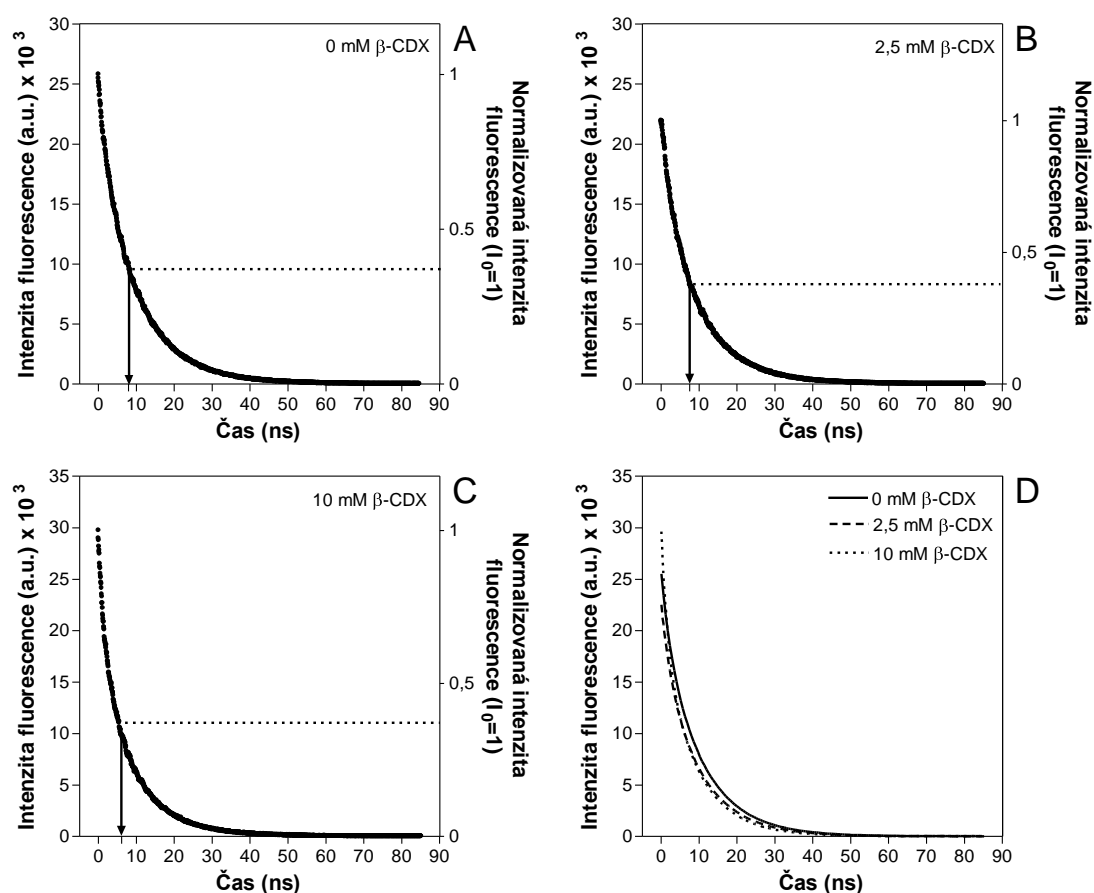


Obr. 20 Hodnoty rovnovážné anizotropie fluorescence DPH v PM izolovaných z *in vivo* ovlivněných VTGP buněk: *stanovení při různých teplotách*

Inkubace buněk s DMEM obsahujícím 10 mM β -CDX nebo se samotným DMEM (30 minut) probíhala při teplotě 37 °C a v humifikované atmosféře s obsahem 5% CO₂. Značení izolovaných PM s DPH (30 minut) probíhalo při teplotě 25 °C. Finální koncentrace DPH v membránové suspenzi byla 1 μ M. Uvedené hodnoty r_{DPH} představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze tří nezávislých měření.

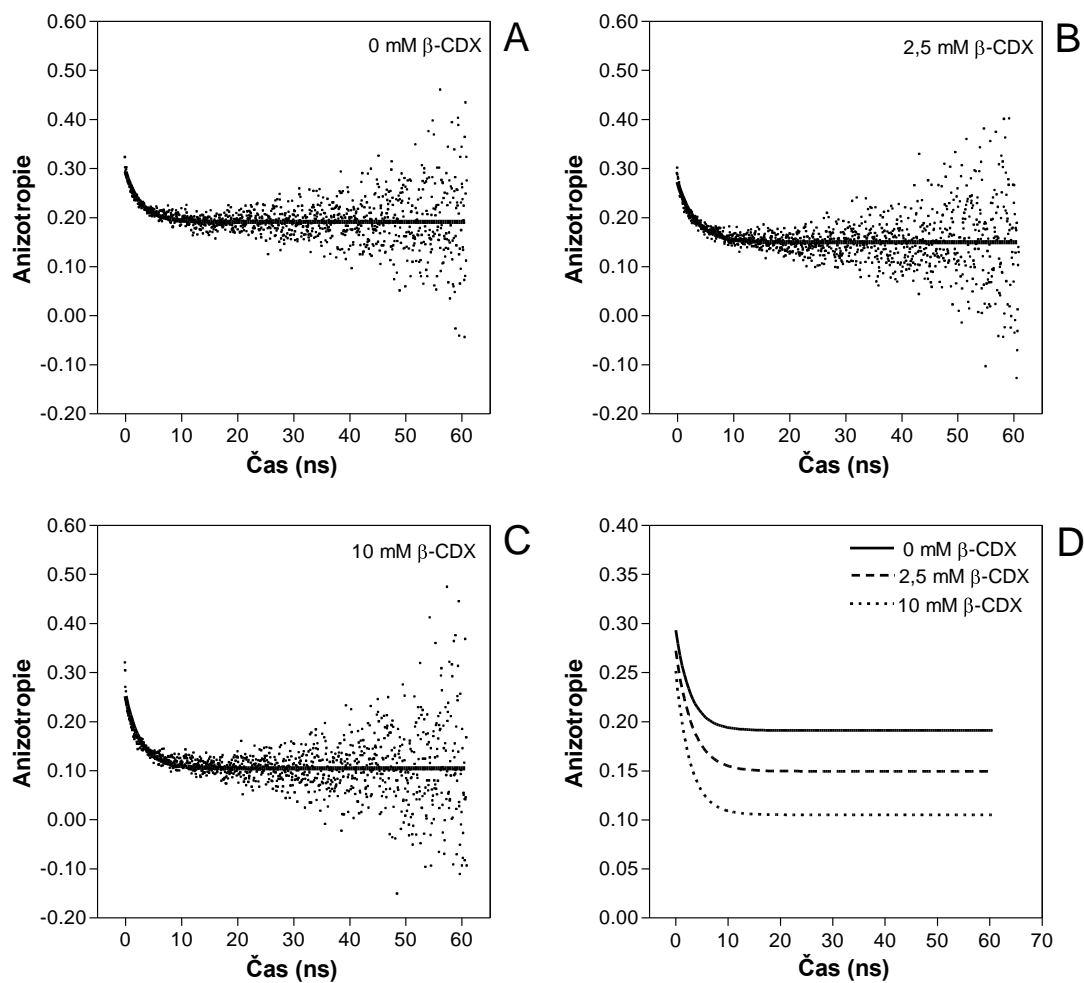
5.3. Vliv deplece cholesterolu na časově dynamické parametry fluorescence DPH v plazmatických membránách VTGP buněk

Výchozí veličinou pro výpočet časově dynamických parametrů DPH je intenzita fluorescence. Pokles intenzity fluorescence v čase pro různé koncentrace β -CDX znázorňují grafy na **Obr. 21A-C**. Jejich srovnání dokumentuje **Obr. 21D**. Pokles anizotropie fluorescence v čase pro různé koncentrace β -CDX znázorňují **Obr. 22A-C**. Jejich srovnání ilustruje **Obr. 22D**. Souborné hodnocení všech těchto výsledků uvádí **Tab. 4**.



Obr. 21 Časová závislost intenzity fluorescence DPH – vliv koncentrace β -CDX

A) 0 mM β -CDX (kontrola), **B)** 2,5 mM β -CDX, **C)** 10 mM β -CDX, **D)** srovnání časové závislosti intenzity fluorescence DPH pro všechny použité koncentrace β -CDX. PM izolované z kontrolních VTGP buněk byly nejprve po dobu 30 minut inkubovány s β -CDX (2,5 mM, 10 mM) nebo se samotným puforem (0 mM β -CDX) a následně označeny DPH (30 minut). Finální koncentrace DPH v membránové suspenzi byla 1 μ M. Inkubace s β -CDX a DPH, stejně jako samotné měření, probíhala při teplotě 25 °C. Šipka vyznačuje průměrnou dobu života excitovaného stavu (*lifetime*): $\tau = 0,37 \times I_0$.



Obr. 22 Časová závislost anizotropie fluorescence DPH – vliv koncentrace β -CDX

A) 0 mM β -CDX (kontrola), **B)** 2,5 mM β -CDX, **C)** 10 mM β -CDX, **D)** srovnání časové závislosti anizotropie fluorescence DPH pro všechny použité koncentrace β -CDX. PM izolované z kontrolních VTGP buněk byly nejprve po dobu 30 minut inkubovány s β -CDX (2,5 mM, 10 mM) nebo se samotným pufrům (0 mM β -CDX) a následně označeny DPH (30 minut). Finální koncentrace DPH v membránové suspenzi byla 1 μ M. Inkubace s β -CDX a DPH, stejně jako samotné měření, probíhala při teplotě 25 $^{\circ}$ C.

Tab. 4 Časově dynamické parametry DPH v plazmatických membránách VTGP buněk

τ , doba života excitovaného stavu (*lifetime*); r_0 , anizotropie fluorescence v čase 0 (limitní anizotropie); r_∞ , anizotropie fluorescence ve velmi dlouhém čase (reziduální anizotropie); ϕ , rotačně-korelační čas; S , parametr uspořádanosti (*S-order parameter*); D_w , difuzně-rotační konstanta

β -CDX (mM)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	r_0	r_∞	ϕ (ns)	S	D_w (ns ⁻¹)
0	2,87	10,41	0,324	0,186	4,6	0,73	0,022
2,5	2,49	10,08	0,306	0,145	4,6	0,64	0,029
10	1,96	9,42	0,312	0,099	4,9	0,53	0,035

Výsledky znázorněné na **Obr. 18A** (časová závislost intenzity fluorescence DPH) a **Obr. 18B** (časová závislost anizotropie fluorescence DPH) umožnily provést rozklad hodnoty průměrné doby života excitovaného stavu (τ) DPH na dvě komponenty, které vykazovaly kratší (τ_1) a delší (τ_2) dobu života. Matematická analýza provedená v rámci spolupráce s Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, umožnila rovněž stanovit anizotropii fluorescence v čase 0 (r_0), anizotropii fluorescence ve velmi dlouhém čase (r_∞), rotačně-korelační čas (ϕ), parametr uspořádanosti S (*S-order parameter*) a difuzně-rotační konstantu D_w .

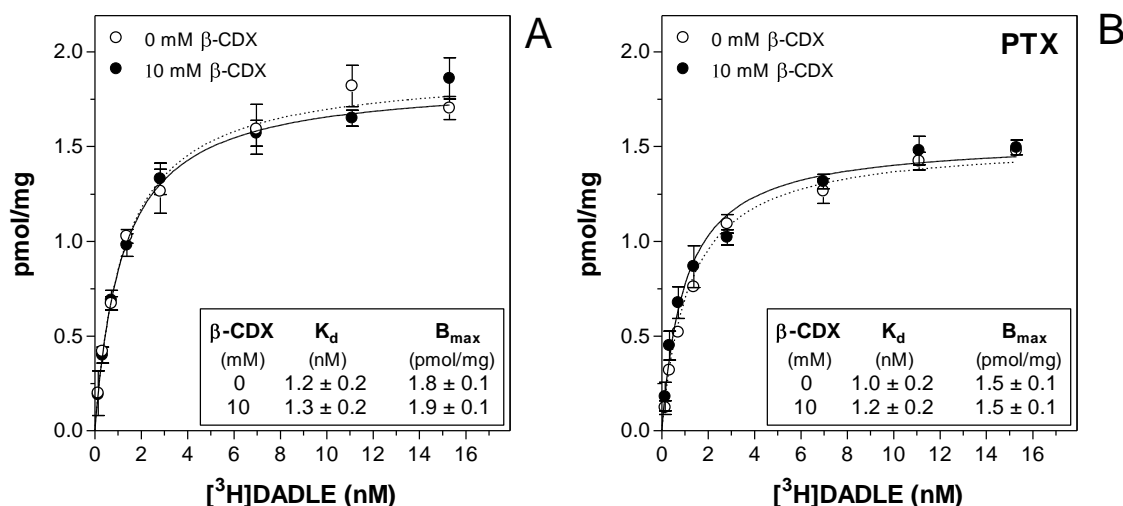
Výsledky znázorněné v **Tab. 4** ukazují, že *fluidizace* membrány způsobená deplecí cholesterolu se projevila jako změna mikrookolí DPH, kterou lze detekovat jako pokles krátké (τ_1) i dlouhé (τ_2) komponenty doby života excitovaného stavu DPH. Pokles obsahu cholesterolu v membráně se dále projevil jako pokles hodnoty anizotropie v čase 0 (r_0) i hodnoty anizotropie ve velmi dlouhém čase (r_∞). Rotačně-korelační čas (ϕ) se významně nezměnil. Snížení hodnoty parametru uspořádanosti S spojené se zvýšením hodnoty konstanty D_w lze považovat za důsledek obecné chaotizace hydrofobní části membrány a zvýšení mobility jejích komponent. Analýza parametrů dynamické depolarizace byla v souladu s výsledky získanými měření rovnovážné anizotropie fluorescence DPH, r_{DPH} .

5.4. Vliv deplece cholesterolu na signální kaskádu δ -OR

Ke stanovení vlivu β -cyklodextrinem (β -CDX) navozené deplece cholesterolu na funkční spřažení mezi δ -OR a G proteiny třídy G_i/G_o byly použity buňky linie HEK293, které stabilně exprimují fúzní protein mezi δ -OR a mutantou $G_i1\alpha$ proteinu rezistentní vůči působení pertussis toxinu, δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) (Moon et al., 2001).

5.4.1. Vliv deplece cholesterolu na vazbu agonisty δ -OR

Vliv deplece cholesterolu na vazebné parametry δ -OR byl hodnocen s pomocí saturační vazebné křivky radioaktivně značeného agonisty [³H]DADLE. Vazebné parametry byly stanoveny ve frakcích plazmatických membrán (PM) izolovaných z buněk δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 podrobených depleci cholesterolu v podmínkách *in vivo*, které předtím nebyly (**Obr. 23A**) nebo byly (**Obr. 23B**) vystaveny působení PTX. Jak je patrné z křivek a hodnot vazebných parametrů B_{max} a K_d uvedených na **Obr. 23**, deplece cholesterolu významně neovlivnila ani celkový počet vazebných míst pro [³H]DADLE (B_{max}), ani afinitu vazby [³H]DADLE na receptor, která je nepřímo úměrná hodnotám disociační konstanty (K_d). K_d je rovna koncentraci radioligandu, při níž je obsazena polovina celkového množství vazebných míst (B_{max}). Tento výsledek byl obdržen jak pro kontrolní buňky (**Obr. 23A**), tak pro buňky vystavené působení PTX (**Obr. 23B**).



Obr. 23 Vazba agonisty [³H]DADLE - saturační vazebné křivky

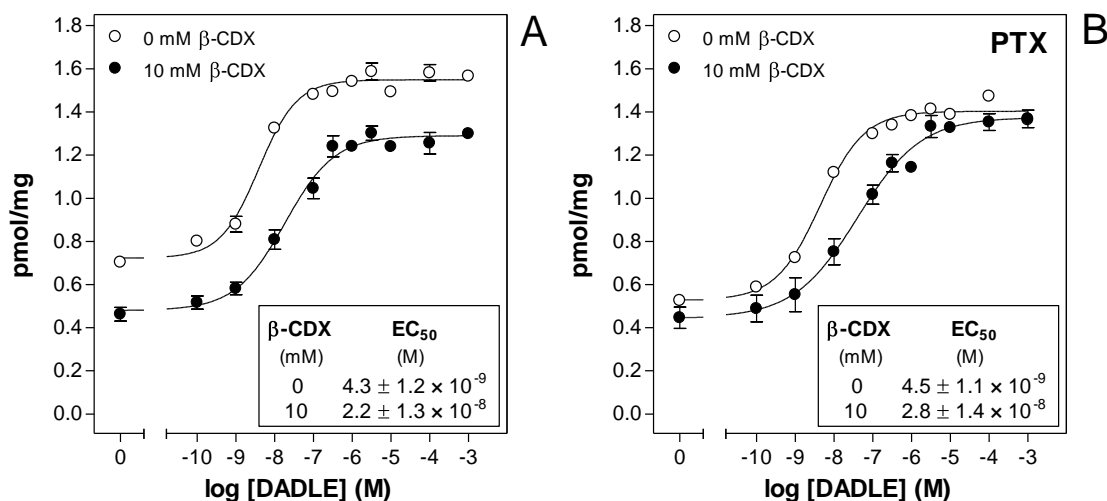
Vliv deplece cholesterolu na vazbu [³H]DADLE byl stanoven v PM izolovaných z buněk linie δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, které nebyly (**A**) nebo byly (**B**) vystaveny působení PTX. Deplece cholesterolu byla provedena inkubací živých buněk s 10 mM β -CDX po dobu 1 hodiny. Grafy představují průměr vazebných křivek ze tří nezávislých měření. Uvedené hodnoty celkového počtu vazebných míst ($B_{max} \pm SEM$) a rovnovážné disociační konstanty ($K_d \pm SEM$) byly vypočítány s pomocí programu GraphPad Prism4.

5.4.2. Vliv deplece cholesterolu na schopnost δ -OR aktivovat G proteiny

Vliv deplece cholesterolu na schopnost δ -OR aktivovat G proteiny byl studován s pomocí vazby radioaktivně značeného nehydrolyzovatelného analoga GTP, [35 S]GTP γ S. Podstatou této metody je stanovení vysokoafinní vazby [35 S]GTP γ S na $G\alpha$ podjednotku G proteinu, která je stimulována vazbou agonisty na receptor. Bazální a agonistou (DADLE) stimulovaná vazba [35 S]GTP γ S byla stanovena, podobně jako v případě přímé vazebné studie receptoru, v PM izolovaných z δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys 351 -Ile 351)-HEK293 buněk, které nebyly (**Obr. 24A**) nebo byly (**Obr. 24B**) vystaveny působení PTX. Deplece cholesterolu byla provedena inkubací obou typů buněk s 10 mM β -CDX po dobu 1 hodiny. Inkubace s PTX byla provedena za účelem inaktivace endogenních G proteinů třídy G_i/G_o .

V případě PM izolovaných z kontrolních buněk, tedy buněk, které nebyly vystaveny účinku PTX (**Obr. 24A**), měla deplece cholesterolu za následek snížení bazální hodnoty vazby [35 S]GTP γ S. Maximální přírůstek agonistou stimulované vazby [35 S]GTP γ S však významně ovlivněn nebyl. Snížení bazální hodnoty vazby [35 S]GTP γ S nebylo pozorováno v PM izolovaných z buněk, které byly vystaveny působení PTX (**Obr. 24B**). V tomto typu buněk rovněž nedošlo ke snížení maximálního přírůstku agonistou stimulované vazby [35 S]GTP γ S.

Matematická analýza křivek „dávka-odpověď“ (*dose-response curves*), ukázala, že deplece cholesterolu způsobila zvýšení hodnot 50% efektivní koncentrace agonisty (EC_{50}) o řád. Ke zvýšení hodnoty EC_{50} došlo jak v případě PM izolovaných z kontrolních buněk (**Obr. 24A**), tak v případě buněk vystavených působení PTX (**Obr. 24B**). Deplece cholesterolu tedy výrazně snížila schopnost δ -OR aktivovat nejen endogenní G proteiny třídy G_i/G_o , ale také kovalentně připojený $G_i1\alpha$ (Cys 351 -Ile 351) protein. Z uvedených výsledků je zřejmé, že optimální spřažení δ -OR s G proteinem nezávisí pouze na fyzické interakci jednotlivých proteinů, ale rovněž na vlastnostech prostředí, ve kterém se tato interakce uskutečňuje, v tomto případě tedy na struktuře membránové dvojvrstvy. Na základě těchto výsledků byly vazebné studie δ -OR a $G_i1\alpha$ (Cys 351 -Ile 351) v membránách izolovaných z buněk δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys 351 -Ile 351)-HEK293 doplněny analýzou vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM, která byla provedena s využitím metod fluorescenční spektroskopie (**kapitola 5.5**).



Obr. 24 Vazba [35 S]GTP γ S - křivky dávka-odpověď

Vliv deplece cholesterolu na schopnost δ -OR aktivovat G proteiny byl stanoven ve frakcích PM izolovaných z buněk linie δ -OR-G $_i$ 1 α (Cys 351 -Ile 351)-HEK293, které nebyly (**A**) nebo byly (**B**) vystaveny působení PTX. Deplece cholesterolu byla navozena inkubací živých buněk s 10 mM β -CDX po dobu 1 hodiny. Grafy představují průměr křivek dávka-odpověď ze tří nezávislých měření. Uvedené hodnoty 50% efektivní koncentrace agonisty ($EC_{50} \pm SEM$) byly vypočítány s pomocí programu GraphPad Prism4.

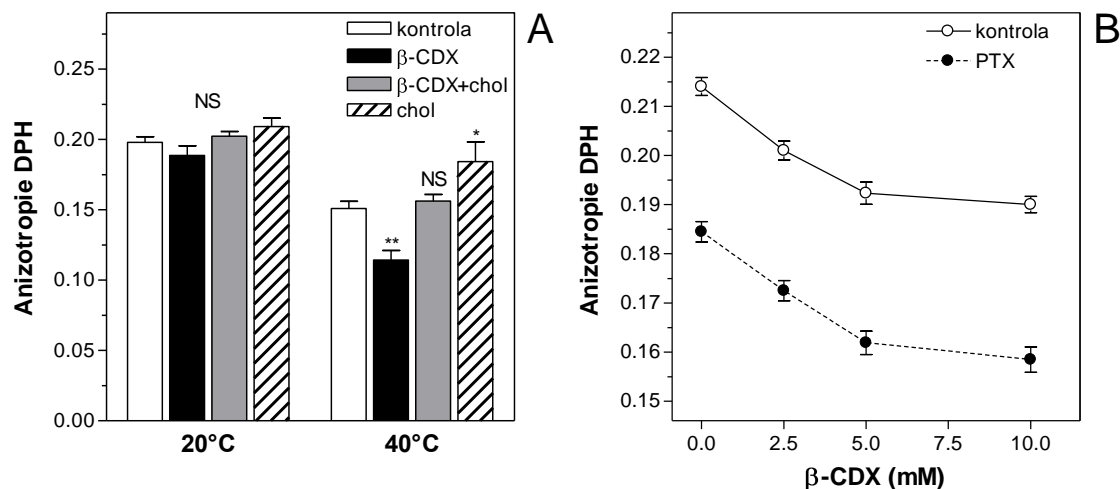
5.5. Vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM buněk δ -OR-G $_i$ 1 α (Cys 351 -Ile 351)-HEK293

Analýza vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti izolovaných PM byla provedena s pomocí fluorescenčních membránových sond 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a Laurdan, jejichž fluorescenční parametry vypovídají o stavu hydrofobní, respektive hydrofilní oblasti PM (podrobně viz kapitoly 2.16 a 2.17). Stanovení vlivu deplece cholesterolu provedené v izolovaných plazmatických membránách pomocí sond DPH a Laurdan bylo dále rozšířeno o mikroskopickou analýzu plazmatické membrány v živých buňkách s pomocí fluorescenčních analogů cholesterolu, 22- a 25-NBD-cholesterolu.

5.5.1. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM izolovaných z buněk δ -OR-G $_i$ 1 α (Cys 351 -Ile 351)-HEK293 - rovnovážná anizotropie fluorescence DPH

Stanovení hodnot rovnovážné anizotropie fluorescence DPH (anizotropie, r_{DPH}) bylo nejprve provedeno ve frakcích PM izolovaných z buněk podrobených depleci

cholesterolu v podmínkách *in vivo* a PM izolovaných z kontrolních buněk, které nebyly vystaveny působení PTX. Deplece cholesterolu byla v tomto případě navozena inkubací buněk s 10 mM β -CDX. Měření probíhalo při dvou různých teplotách, 20 °C a 40 °C (**Obr. 25A**). Zatímco hodnoty anizotropie naměřené při 20 °C se vzájemně téměř nelišily, hodnoty naměřené v jednotlivých typech PM při 40 °C odlišné byly. Hodnota anizotropie naměřená v PM z buněk podrobených depleci cholesterolu ($r_{DPH} = 0,114 \pm 0,007$) byla výrazně nižší než hodnota anizotropie v PM kontrolních buněk ($r_{DPH} = 0,151 \pm 0,005$). Jelikož je anizotropie fluorescence DPH nepřímo úměrná fluiditě membrány, z naměřených hodnot r_{DPH} tedy vyplývá, že deplece cholesterolu způsobila výrazné zvýšení membránové fluidity. Vliv deplece cholesterolu na fluiditu membrány byl plně reverzibilní, neboť hodnoty anizotropie DPH naměřené ve frakcích PM izolovaných z buněk podrobených replaci cholesterolu ($r_{DPH} = 0,156 \pm 0,005$) se shodovaly s hodnotami anizotropie ve frakcích PM izolovaných z kontrolních buněk. Obohacení buněk cholesterolem naopak způsobilo významné zvýšení hodnoty anizotropie DPH ($r_{DPH} = 0,184 \pm 0,014$), což pro změnu vypovídá o snížení membránové fluidity.



Obr. 25 Rovnovážná anizotropie fluorescence DPH – vliv deplece cholesterolu

(A) Stanovení rovnovážné anizotropie DPH bylo provedeno ve frakcích PM izolovaných z buněk δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 podrobených manipulaci obsahu membránového cholesterolu: β -CDX (deplece), β -CDX+chol (replece), chol (obohacení cholesterolem). Hodnoty uvedené v grafu představují průměrnou $r_{DPH} \pm SEM$ ze tří nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena s pomocí nepárového Studentova t-testu (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). (B) Závislost r_{DPH} na depleci cholesterolu v podmínkách *in vitro* byla stanovena ve frakcích PM izolovaných z kontrolních buněk a buněk vystavených působení PTX. Měření probíhalo při 25 °C. Hodnoty uvedené v grafu představují průměrnou $r_{DPH} \pm SEM$ ze tří nezávislých měření.

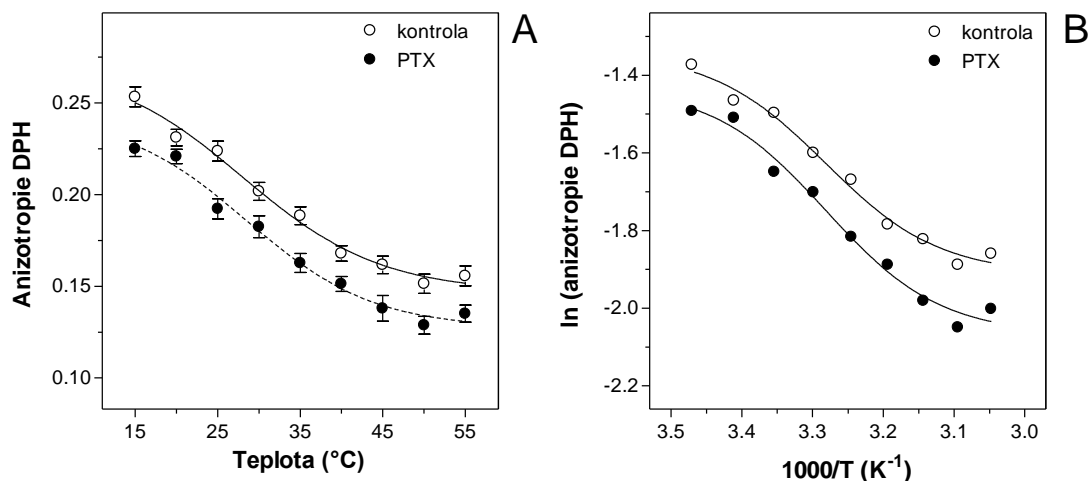
Vysvětlením absence rozdílu mezi hodnotami anizotropie DPH naměřenými při 20 °C by mohla být skutečnost, že tato teplota je značně vzdálená kultivační teplotě buněk (37 °C), při které byly v tomto případě rovněž provedeny změny v obsahu membránového cholesterolu. Teplota měření 40 °C je naproti tomu kultivační teplotě velmi blízká. Hodnoty anizotropie naměřené při této teplotě tedy lépe vypovídají o fluiditě PM živých buněk. Obsah membránového cholesterolu je na druhou stranu pouze jedním z několika faktorů ovlivňujících fluiditu membrány. Fluiditu membrány významně ovlivňuje i teplota prostředí, jejíž vliv je z naměřených hodnot anizotropie také patrný. Hodnoty anizotropie naměřené při 20 °C byly totiž obecně vyšší než hodnoty anizotropie naměřené při 40 °C. Ačkoliv je fluidita membrány výslednicí kombinace působení více faktorů, za určitých podmínek může mít některý z nich větší vliv než ostatní. Absenci rozdílu mezi hodnotami anizotropie DPH naměřenými při 20 °C by za tohoto předpokladu bylo možné vysvětlit tak, že vliv teploty prostředí na membránovou fluiditu v tomto případě převažuje nad vlivem obsahu membránového cholesterolu. Výsledky biochemického stanovení cholesterolu v izolovaných PM totiž prokázaly, že deplece cholesterolu (10 mM β -CDX, 1 hodina) způsobila pokles obsahu membránového cholesterolu o 30 %.

Stanovení hodnot rovnovážné anizotropie DPH bylo následně provedeno ve frakcích PM izolovaných z buněk, které před sklizením nebyly (kontroly) nebo byly inkubovány s PTX. V těchto preparátech bylo provedeno stanovení závislosti r_{DPH} na depleci cholesterolu v podmínkách *in vitro* (**Obr. 25B**). Deplece cholesterolu byla navozena inkubací frakcí PM se zvyšující se koncentrací β -CDX (0, 2,5, 5 a 10 mM) při teplotě 25 °C. Měření anizotropie probíhalo rovněž při teplotě 25 °C (**Obr. 25B**). Naměřené hodnoty r_{DPH} potvrdily fluidizační účinek snížení obsahu membránového cholesterolu stanovený ve frakcích PM izolovaných z buněk, které byly depleci cholesterolu podrobeny v podmínkách *in vivo*. Deplece cholesterolu navozená inkubací PM s 10 mM β -CDX způsobila v obou typech membrán srovnatelný pokles hodnot r_{DPH} . Ve frakcích PM izolovaných z kontrolních buněk klesla hodnota r_{DPH} z $0,214 \pm 0,001$ (0 mM β -CDX) na $0,190 \pm 0,002$ (10 mM β -CDX). Hodnota r_{DPH} ve frakcích PM izolovaných z buněk, které byly inkubovány s PTX klesla z $0,184 \pm 0,002$ (0 mM β -CDX) na $0,158 \pm 0,003$ (10 mM β -CDX).

Celkově nižší hodnoty r_{DPH} naměřené ve frakcích PM izolovaných z buněk, které byly vystaveny působení PTX naznačují, že tento toxin má kromě svého specifického vlivu (ADP-ribosylací navozená inaktivace G proteinů třídy G_i/G_o proteinů) ještě efekt

nespecifický - působí nepříznivě na celkový buněčný metabolismus. Dokladem toho byla o 30 % nižší koncentrace proteinů v buňkách vystavených působení PTX stanovená v množství buněk shodném s kontrolními buňkami. Vzhledem k této skutečnosti byly pro následující experimenty použity již pouze frakce PM izolované z kontrolních buněk.

Pro podrobnou dokumentaci rozdílu mezi PM izolovanými z kontrolních buněk a buněk vystavených účinku PTX je uvedena závislost r_{DPH} na rostoucí teplotě měření (**Obr. 26**). Zvýšení teploty snižuje hodnoty rovnovážné anizotropie fluorescence DPH. Rozdíl mezi oběma typy preparátů však zůstává zachován v celé teplotní škále mezi 15 °C a 55 °C.



Obr. 26 Zvýšení teploty snižuje hodnotu rovnovážné anizotropie DPH - rozdíl \pm PTX

Vliv teploty měření na r_{DPH} byl stanoven ve frakcích PM izolovaných z kontrolních δ -OR- $G_{i1\alpha}$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buněk a z buněk vystavených působení PTX. Grafy znázorňují závislost hodnoty r_{DPH} na teplotě měření (**A**) a závislost přirozeného logaritmu r_{DPH} na převrácené hodnotě absolutní teploty, tzv. Arrheniovo vynesení (**B**). Uvedené hodnoty představují průměrnou $r_{DPH} \pm$ SEM ze tří nezávislých měření.

5.5.2. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM izolovaných z buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 - časově rozlišená fluorescence a anizotropie fluorescence DPH

Měření rovnovážné anizotropie fluorescence DPH bylo rozšířeno o stanovení časově rozlišených parametrů fluorescence a anizotropie fluorescence DPH, které poskytlo mnohem detailnější informace o vlivu deplece cholesterolu na membránovou fluiditu a strukturní uspořádání hydrofobní oblasti PM. Deplece cholesterolu byla v tomto případě navozena v podmínkách *in vitro*, tedy inkubací PM izolovaných z kontrolních buněk se zvyšující se koncentrací β -CDX (0, 2,5, 5 a 10 mM). Měření anizotropie probíhalo při teplotě 25 °C. Časově rozlišené parametry byly získány analýzou naměřených dat s pomocí matematických výpočtů uvedených v metodách (**kapitola 4.9**).

Vlivem deplece cholesterolu došlo ke zkrácení průměrné doby života excitovaného stavu DPH (τ , *lifetime*). Hodnota τ DPH závisí na polaritě prostředí, přičemž se zvyšující se polaritou prostředí dochází k jejímu zkrácení. Jelikož deplece cholesterolu měla na τ DPH přesně tento účinek, lze předpokládat, že hydrofobní oblast membrány se tím pádem stala přístupnější pro polární molekuly vody. Toto zjištění je v naprostém souladu se skutečností, že přítomnost cholesterolu v membráně snižuje propustnost membrány pro polární molekuly a zvyšuje tak hydrofobnost membránové dvojvrstvy. Deplece cholesterolu dále způsobila pokles hodnot anizotropie v čase 0 (r_0 , limitní anizotropie) a anizotropie ve velmi dlouhém čase (r_∞ , reziduální anizotropie), a rovněž pokles hodnoty parametru uspořádanosti **S** (*S-order parameter*). Hodnota difuzně-rotací konstanty (**D_w**) naopak vzrostla. Poslední dva zmíněné parametry slouží k popisu rotačního pohybu DPH v membráně, přičemž **D_w** popisuje rychlost rotace sondy a **S** vypovídá o rozsahu tohoto pohybu. Hodnoty jednotlivých parametrů jsou uvedeny v **Tab. 5**.

Tab. 5 Parametry časově rozlišené fluorescence a anizotropie fluorescence DPH v buňkách δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

τ , průměrná doba života excitovaného stavu (*lifetime*); r_0 , limitní anizotropie; r_∞ , reziduální anizotropie; ϕ , rotačně korelační čas; **S**, *S-order parameter*; **D_w**, difuzně-rotací konstanta

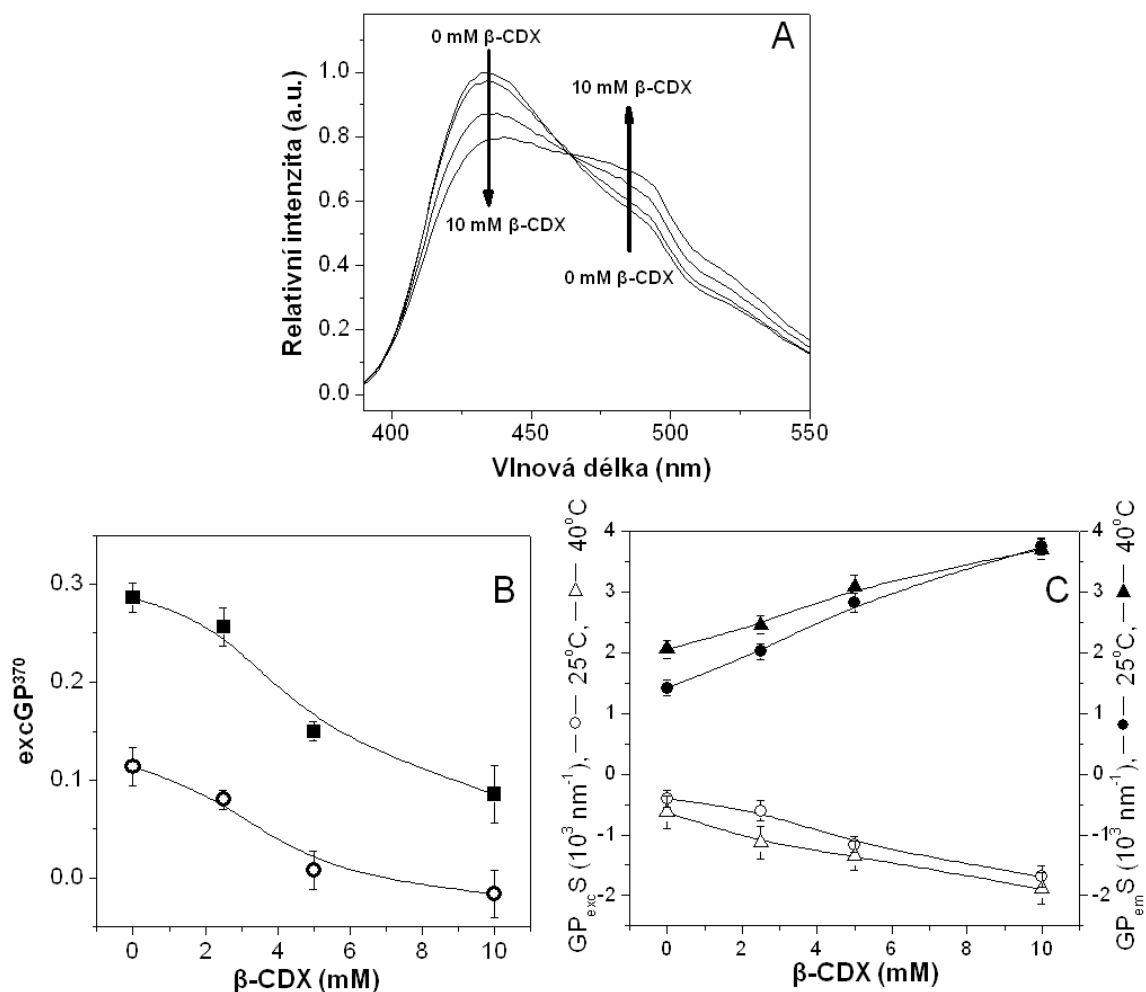
β -CDX (mM)	τ (ns)	r_0	r_∞	ϕ (ns)	S	D_w (ns ⁻¹)
0	9,61	0,295	0,121	4,4	0,68	0,028
2,5	9,37	0,282	0,105	4,7	0,64	0,030
5	8,99	0,280	0,096	4,4	0,61	0,032
10	8,41	0,279	0,095	4,3	0,58	0,037

5.5.3. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM izolovaných z buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 - generalizovaná polarizace sondy Laurdan

Vliv deplece cholesterolu navozené inkubací izolovaných PM se zvyšující se koncentrací β -CDX (0, 2,5, 5 a 10 mM) na hydrofilní oblast membránové dvojvrstvy tvořené polárními hlavičkami molekul fosfolipidů byl analyzován s pomocí generalizované polarizace (GP) sondy Laurdan. Inkubace membrán s β -CDX probíhala při teplotě 25 °C. Měření probíhalo při dvou různých teplotách, 25 °C a 40 °C.

Deplece cholesterolu způsobila změnu tvaru emisního spektra sondy Laurdan měřeného při excitační vlnové délce 370 nm, která se projevila jako pokles intenzity fluorescence při vlnové délce 440 nm a nárůst intenzity fluorescence při vlnové délce 490 nm (**Obr. 27A**). Hodnota excitační GP, která byla vypočítána z intenzit fluorescence při 440 a 490 nm pro excitační vlnovou délku 370 nm (**excGP³⁷⁰**) klesla vlivem deplece cholesterolu z 0,29 na 0,09 (měřeno při 25 °C) a z 0,12 na -0,02 (měřeno při 40 °C). Vliv deplece cholesterolu na **excGP³⁷⁰** znázorňuje **Obr. 27B**.

Další informace byly získány pomocí výpočtu směrnice jednotlivých excitačních (**GP_{excS}**) i emisních GP spekter (**GP_{emS}**), jejichž závislost na koncentraci β -CDX znázorňuje **Obr. 27C**. Výsledek tohoto typu analýzy ukazuje, že deplece cholesterolu nezpůsobila žádný jasně detekovatelný fázový přechod. **GP_{emS}** se zvyšujícími se koncentracemi β -CDX pozvolna stoupala a **GP_{excS}** paralelně klesala. Tento typ symetrických, recipročních závislostí **GP_{emS}** a **GP_{excS}** na koncentraci β -CDX, které byly stanoveny při obou teplotách měření, naznačuje, že *deplece cholesterolu měla za následek zvýšení polarity hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy doprovázené zvýšenou pohyblivostí lipidových molekul membrány*. Změnu polarity lze v tomto případě přisuzovat navýšení počtu molekul vody v hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy, které mohou díky snížení obsahu membránového cholesterolu snáze pronikat do membrány. Z tohoto důvodu se úroveň polarity hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy zjištěná prostřednictvím GP sondy Laurdan popisuje v termínech hydratace.



Obr. 27 Generalizovaná polarizace sondy Laurdan – vliv rostoucí koncentrace β -CDX

Stanovení generalizované polarizace (GP) sondy Laurdan bylo provedeno ve frakcích PM izolovaných z kontrolních buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293. Deplece cholesterolu byla provedena v podmínkách *in vitro*, tedy inkubací izolovaných PM s β -CDX (0, 2,5, 5 a 10 mM), která probíhala po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C.

A) Závislost tvaru emisního spektra sondy Laurdan na koncentraci β -CDX. Emisní spektra byla měřena při fixní excitační vlnové délce 370 nm a teplotě 25 °C.

B) Závislost excitační GP pro vlnovou délku excitace 370 nm (excGP³⁷⁰) na koncentraci β -CDX. Měření probíhalo při 25 °C (■) a 40 °C (○).

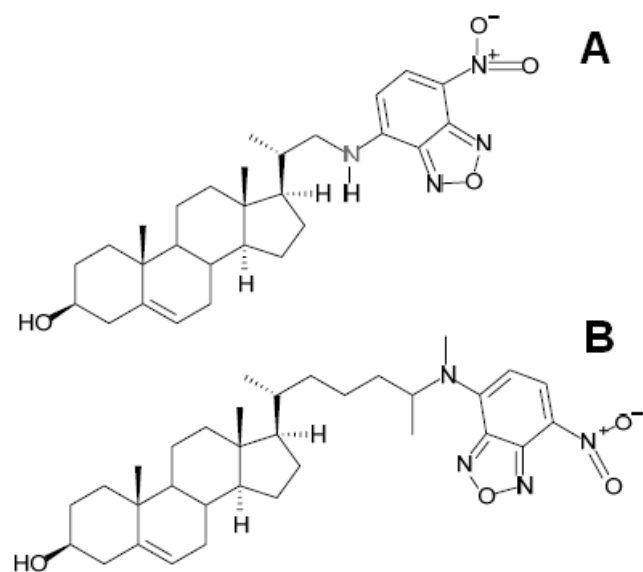
C) Závislost směrnice excitačních (GP_{exc}S, levá osa y) a emisních GP (GP_{em}S, pravá osa y) spekter sondy Laurdan na koncentraci β -CDX. Uvedené hodnoty excGP³⁷⁰ (**B**), GP_{exc}S a GP_{em}S (**C**) představují průměrné hodnoty \pm SEM ze tří nezávislých měření.

5.5.4. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM živých buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 - detekce intenzity fluorescence a polarizace fluorescenčních sond 22- a 25-NBD-cholesterolu s pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie

Analýza vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti izolovaných plazmatických membrán buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 s pomocí rovnovážné a dynamické depolarizace fluorescence DPH (kapitoly 5.5.1 a 5.5.2) a metody generalizované polarizace sondy Laurdan (kapitola 5.5.3) prokázala, že deplece cholesterolu zásadním způsobem ovlivnila organizaci membránové dvojvrstvy PM. Tato analýza však byla provedena na izolovaných preparátech plazmatických membrán, tedy v podbuněčném systému po homogenizaci, zániku intaktní struktury buněk.

Dalším cílem naší práce proto bylo charakterizovat deplecí cholesterolu navozené změny v distribuci a organizaci molekul cholesterolu v membránách živých buněk. K tomuto účelu byly použity fluorescenční analogy cholesterolu, fluorescenční sondy 22- a 25-NBD-cholesterol. Distribuce a fluorescenční parametry těchto sond v rámci membránových struktur živých δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buněk byly stanoveny prostřednictvím konfokální laserové skenovací mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM), detekce doby života excitovaného stavu (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, FLIM) a dynamické depolarizace těchto sond.

Fluorescenčních analogů cholesterolu existuje celá řada (Gimpl a Gehrig-Burger, 2011; Wüstner, 2007). Místem připojení fluoroforu je buď hydroxylová skupina v pozici 3 β , nebo postranní alkylový řetězec nacházející se na opačném konci sterolového jádra molekuly cholesterolu. Hydroxylová skupina má naprosto zásadní význam pro správnou funkci cholesterolu (viz kapitolu 2.10). Z tohoto důvodu byly ke studiu membránových struktur živých δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buněk zvoleny analogy 22- a 25-NBD-cholesterol, které mají fluorofor (NBD) připojený k postrannímu alkylovému řetězci. Struktura molekul 22- a 25-NBD-cholesterolu je uvedena na následujícím obrázku (**Obr. 28**).



Obr. 28 Struktura fluorescenčních analogů cholesterolu

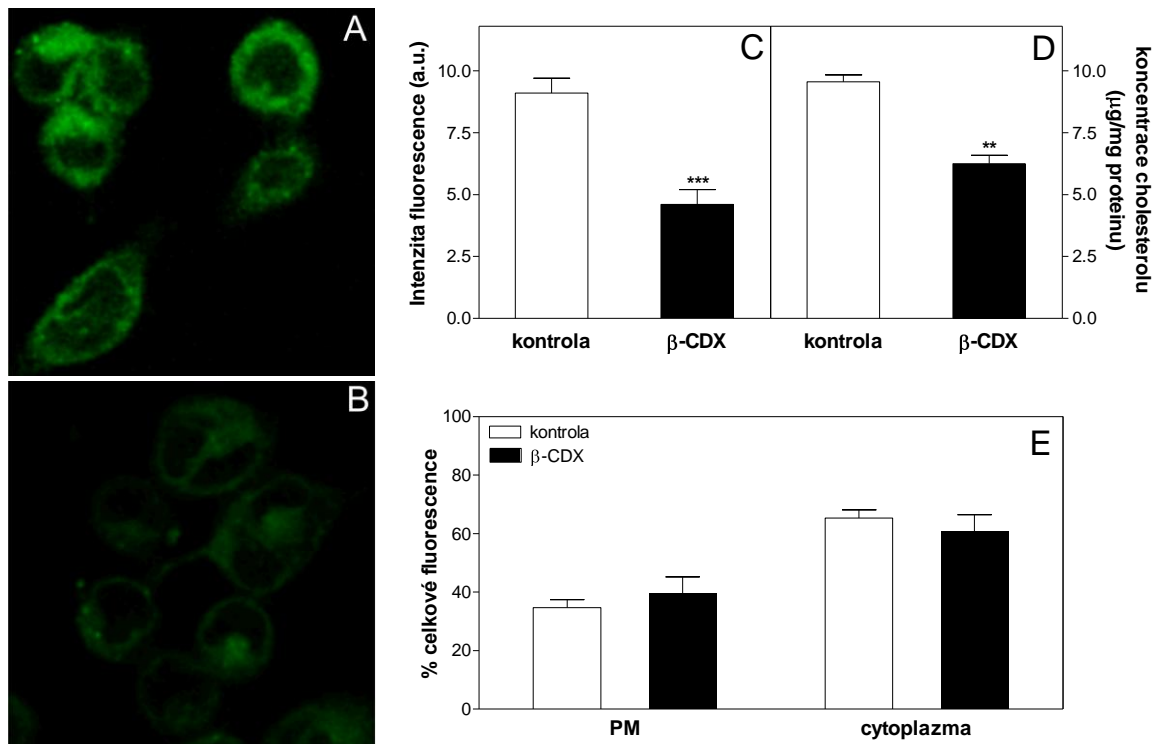
A) 22-NBD-cholesterol, B) 25-NBD-cholesterol

(převzato z práce Loura a Ramalho, 2011 a upraveno)

Buňky δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 byly za účelem stanovení vlivu deplece cholesterolu na distribuci a organizaci molekul cholesterolu nejprve označeny fluorescenčním analogem, tj. 22- nebo 25-NBD-cholesterolem, a teprve poté inkubovány s 10 mM β -CDX. Distribuce intenzity fluorescenčního signálu v živých buňkách byla pozorována s pomocí CLSM.

Fluorescenční signál 22-NBD-cholesterolu byl přítomen v plazmatické membráně i v nitrobuněčných membránových strukturách, a to jak v případě kontrolních buněk, tak v případě buněk podrobených depleci cholesterolu. Jak je patrné z mikroskopických snímků (**Obr. 29A,B**) i z výsledků kvantifikace celkové intenzity fluorescence (**Obr. 29C**), deplece cholesterolu způsobila výrazný pokles intenzity fluorescence 22-NBD-cholesterolu. Srovnatelný pokles celkového fluorescenčního signálu po depleci cholesterolu byl zaznamenán i v případě buněk značených 25-NBD-cholesterolem. To znamená, že molekuly 22- i 25-NBD-cholesterolu byly účinně odstraněny β -cyklodextrinem. Míra poklesu intenzity fluorescence byla srovnatelná s mírou poklesu obsahu cholesterolu v buněčném homogenátu, který byl stanoven biochemicky (**Obr. 29D**). Kvantifikace fluorescenčního signálu 22-NBD-cholesterolu přítomného v plazmatické membráně a cytoplazmě ukázala, že většina celkového buněčného signálu

($65 \pm 3 \%$) pocházela z nitrobuněčných membránových struktur a že deplece cholesterolu tento poměr rozložení signálu neovlivnila (**Obr. 29E**).

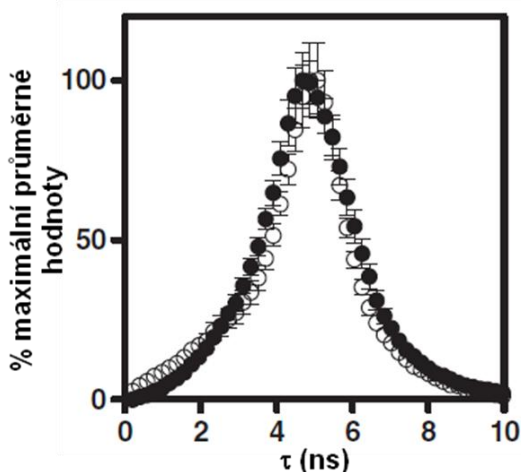


Obr. 29 Konfokální mikroskopie živých buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 značených 22-NBD-cholesterolem – vliv deplece cholesterolu

Uvedené snímky představují typické mikroskopické snímky kontrolních buněk (A) a buněk inkubovaných s 10 mM β -CDX (B). Grafy znázorňují výsledky kvantitativní analýzy celkového signálu 22-NBD-cholesterolu (C) a jeho zastoupení v PM a cytoplazmě (E). Hodnoceno bylo 20 kontrolních a 16 ovlivněných buněk. Biochemické stanovení obsahu buněčného cholesterolu bylo provedeno v homogenátu z kontrolních a ovlivněných buněk (D). Hodnoty představují průměr \pm SEM ze tří nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena s pomocí nepárového Studentova t-testu (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

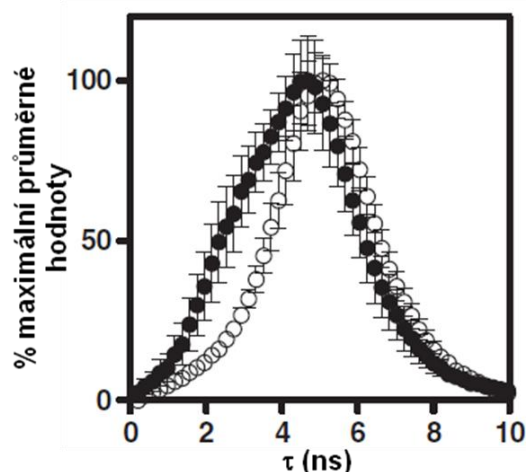
Vliv deplece cholesterolu na fluorescenční parametry 22- a 25-NBD-cholesterolu inkorporovaných v živých buňkách δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 byl dále studován metodou FLIM, která umožňuje určení hodnoty doby života excitovaného stavu (τ) fluoroforu v každém bodě (pixelu) mikroskopického snímku. Doba života excitovaného stavu fluoroforu je obecně citlivá ke změnám prostředí, ve kterém se fluorofor nachází. Snížení doby života nastává v podmínkách zvýšení polarity okolního prostředí a naopak.

Průměrné hodnoty τ v rámci celé buňky (τ_{tot}), plazmatické membrány (τ_{pm}) a cytoplazmy (τ_{in}) byly stanoveny matematickou analýzou mikroskopických snímků pořízených metodou FLIM, prostřednictvím které byly pro každý pixel hodnoceného snímku zrekonstruovány křivky dohasínání fluorescence, ze kterých byly následně vypočítány hodnoty τ . Z hodnot uvedených v **Tab. 6**, je zřejmé že ani jedna ze stanovených hodnot τ 22-NBD-cholesterolu nebyla deplecí cholesterolu významně ovlivněna (**Obr. 30**). Naproti tomu, změna hodnot τ 25-NBD-cholesterolu byla vysoce signifikantní (**Obr. 31**). Snížení obsahu cholesterolu v buňkách δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 způsobilo vysoce signifikantní pokles průměrné doby života excitovaného stavu v celém buněčném objemu (τ_{tot}) z $5,1 \pm 0,1$ ns (kontroly) na $4,4 \pm 0,1$ ns, **, $p < 0.01$ (**Tab. 6**). K podobně významnému poklesu došlo také v případě hodnot τ příslušejících plazmatické membráně (τ_{pm}) a nitrobuněčnému prostoru (τ_{in}).



Obr. 30 Vliv deplece cholesterolu na distribuci jednotlivých hodnot doby života excitovaného stavu (τ) 22-NBD-cholesterolu v živých δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buňkách – studie FLIM

Grafické znázornění distribuce četností hodnot τ 22-NBD-cholesterolu v oblasti celé buňky. Z četností jednotlivých hodnot τ shromážděných ze 17 kontrolních (\circ) a 17 ovlivněných buněk (\bullet) byly nejprve vypočítány průměrné hodnoty, které byly následně normalizovány a jsou v grafu vyneseny jako % maximální průměrné hodnoty.



Obr. 31 Vliv deplece cholesterolu na distribuci jednotlivých hodnot doby života excitovaného stavu (τ) 25-NBD-cholesterolu v živých δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buňkách - studie FLIM

Grafické znázornění distribuce četností hodnot τ 25-NBD-cholesterolu v oblasti celé buňky. Z četností jednotlivých hodnot τ shromážděných ze 17 kontrolních (○) a 17 ovlivněných buněk (●) byly nejprve vypočítány průměrné hodnoty, které byly následně normalizovány a jsou v grafu vyneseny jako % maximální průměrné hodnoty.

Tab. 6 Doba života excitovaného stavu (τ) fluorescenčních analogů cholesterolu

Z četností jednotlivých hodnot τ 22- a 25-NBD-cholesterolu pro oblast celé buňky, které byly shromážděny ze 17 kontrolních a 17 ovlivněných buněk (+ β -CDX), byly nejprve vypočítány průměrné hodnoty. Tímto způsobem byly stanoveny průměrné hodnoty τ 22- a 25-NBD-cholesterolu, jejichž četnost byla nejvyšší v rámci oblasti celé buňky (τ_{tot}). Stejným způsobem byly následně stanoveny průměrné hodnoty τ pro oblast plazmatické membrány (τ_{pm}) a pro oblast cytoplazmy (τ_{in}).

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

Překvapivě, pokles hodnot doby života 25-NBD-cholesterolu byl provázen vzestupem anizotropie fluorescence této sondy, zatím co anizotropie 22-NBD-cholesterolu se nezměnila (**Tab. 7**).

Tab. 7 Anizotropie fluorescence 22- a 25-NBD-cholesterolu v živých buňkách δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Hodnota anizotropie fluorescence 22- a 25-NBD-cholesterolu byla nejprve stanovena pro každý pixel snímku dané buňky. Následně byla z hodnot anizotropie shromážděných pro jednotlivé soubory analyzovaných buněk (kontrola, + β -CDX) vypočítána průměrná hodnota anizotropie (r_{tot}). Hodnoty reziduální anizotropie (r_{inf}) a rotačně korelačního času (ϕ_{tot}) byly stanoveny fitováním a následným průměrováním hodnot těchto parametrů získaných při dekonvoluční analýze křivek vyjadřujících pokles anizotropie v čase (dynamická depolarizace).

	$r_{tot} \pm SEM$	$r_{inf} \pm SEM$	$\phi_{tot} \pm SEM$ (ns)
22-NBD-cholesterol			
kontrola	0,099 \pm 0,002	0,083 \pm 0,012	1,31 \pm 0,31
+ β -CDX	0,100 \pm 0,002	0,093 \pm 0,011	1,14 \pm 0,39
25-NBD-cholesterol			
kontrola	0,076 \pm 0,002	0,061 \pm 0,010	1,52 \pm 0,29
+ β -CDX	0,085 \pm 0,003	0,073 \pm 0,009	1,65 \pm 0,24

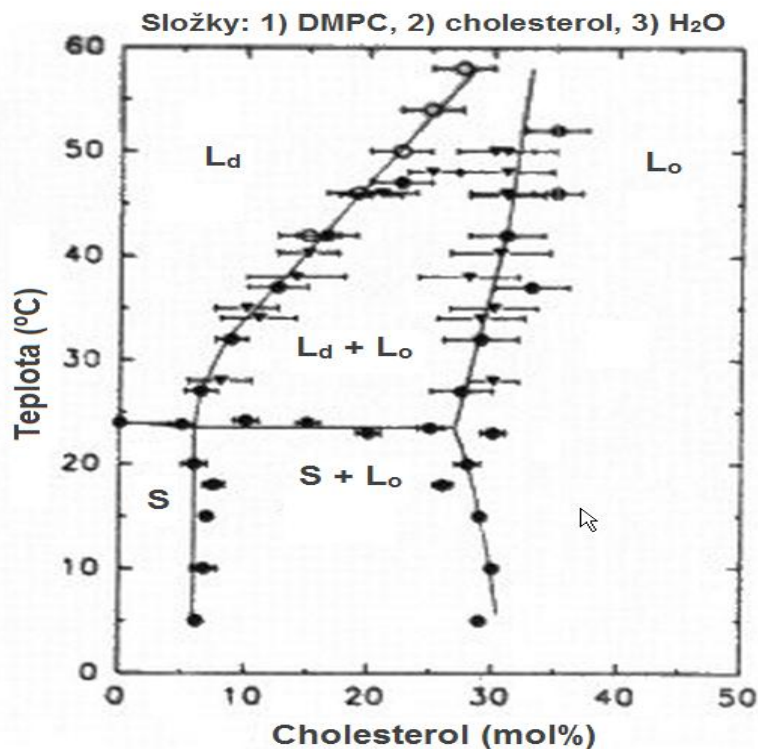
Vysvětlení tohoto překvapivého nálezu jsme získali na základě následující úvahy. Vzestup anizotropie fluorescence 25-NBD-cholesterolu (vlivem deplece cholesterolu) je způsoben snížením hodnoty τ_{tot} , neboť anizotropie je závislá na poměru mezi dobou života excitovaného stavu (τ) a rotačně korelačním časem (ϕ) dané sondy. Tuto závislost vyjadřuje vztah:

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\phi}$$

Jelikož se vlivem deplece cholesterolu hodnota ϕ pro 25-NBD-cholesterol významně nezměnila (**Tab. 7**), pokles průměrné hodnoty doby života excitovaného stavu 25-NBD-cholesterolu v celé buňce (τ_{tot}) způsobil vzestup hodnoty anizotropie r_{tot} .

Schopnost 25-NBD-cholesterolu odrážet deplecí cholesterolu navozené změny v organizaci komponent buněčných membrán je dána jeho strukturou. Fluorofor (NBD skupina) molekuly 25-NBD-cholesterolu je totiž ke sterolovému jádru připojen delším uhlovodíkovým řetězcem než v případě 22-NBD-cholesterolu (**Obr. 28**). NBD skupina molekuly 25-NBD-cholesterolu je zřejmě zanořena hlouběji v hydrofobní zóně membránové dvojvrstvy, tedy v méně polárním prostředí, než NBD skupina molekuly 22-NBD-cholesterolu. Hodnoty τ_{tot} stanovené v kontrolních buňkách, tedy $5,1 \pm 0,1$ ns (25-NBD-cholesterol) a $4,9 \pm 0,1$ ns (22-NBD-cholesterol), tuto teorii potvrdily. Jak již bylo řečeno výše, doba života excitovaného stavu (τ) fluoroforu je citlivá k podmínkám prostředí, ve kterém se fluorofor nachází. Pro změnu polaritativy bezprostředního okolí fluoroforu platí, že se zvyšující se polaritou prostředí hodnota τ fluoroforu klesá. Pokles hodnot τ_{tot} , τ_{pm} i τ_{in} způsobený deplecí cholesterolu z buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 značených 25-NBD-cholesterolem (**Tab. 6**) lze tedy interpretovat jako *zvýšení polaritativy hydrofobní zóny membránové dvojvrstvy*. *Toto zjištění je v souladu s výsledky získanými analýzou izolovaných plazmatických membrán s pomocí hydrofobní membránové sondy DPH. Hodnota doby života excitovaného stavu DPH byla deplecí cholesterolu rovněž snížena.*

Vliv strukturální organizace membránové dvojvrstvy na fluorescenční parametry 22- a 25-NBD-cholesterolu byl v poslední části naší práce stanoven v modelových membránových systémech. Zvoleným typem modelových membrán byly velké unilamelární váčky (*Large unilamellar vesicles*, LUV) tvořené buď samotným dimyristoylfosfatidylcholinem (DMPC), nebo směsí DMPC (65 mol%) s cholesterolem (35 mol%). LUV o tomto lipidovém složení byly zvoleny záměrně, aby bylo možné provést měření modelových membrán při stejné teplotě, jako měření živých buněk, tedy při 37 °C (**Obr. 32**). Lipidy v umělých membránových váčkách o uvedeném složení totiž při této teplotě mohou existovat ve dvou různých fázích. LUV obsahující samotný DMPC existují ve fázi L_d (*liquid disordered*), zatímco LUV obsahující směs DMPC a cholesterolu existují ve fázi L_o (*liquid ordered*). Označení těchto fází odráží organizační vliv (*ordering effect*) molekul cholesterolu na molekuly fosfolipidů.



Obr. 32 Fázový diagram směsi DMPC/cholesterol
(převzato z práce Almeida et al., 1992 a upraveno)

Výsledky analýzy LUV značených 22- nebo 25-NBD-cholesterolem s pomocí rovnovážné a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie jsou uvedeny v **Tab. 8 a 9**. Excitační i emisní maximum, stejně jako hodnota průměrné doby života excitovaného stavu (τ_{fl}), 22-NBD-cholesterolu byly k fázovému stavu lipidů LUV necitlivé. V případě 25-NBD-cholesterolu byly však tyto parametry fázovým stavem lipidů LUV ovlivněny významně. Vlnová délka emisního i excitačního maxima 25-NBD-cholesterolu přítomného v lipidových váčcích ve fázi L_d byla výrazně delší než v lipidových váčcích ve fázi L_o . Hodnota průměrné doby života excitovaného stavu (τ_{fl}) 25-NBD-cholesterolu přítomného v LUV ve fázi L_d byla mnohem nižší než hodnota v LUV ve fázi L_o . Fázový stav LUV měl vliv i na hodnoty anizotropie fluorescence 25-NBD-cholesterolu (**Tab. 8 a 9**). Hodnoty rovnovážné (r_{st}) i časově rozlišené anizotropie fluorescence (r_0 a r_∞) 25-NBD-cholesterolu v LUV ve fázi L_d byly vyšší než hodnoty naměřené v LUV ve fázi L_o . Rotačně korelační čas (ϕ) fázovým stavem LUV ovlivněn nebyl. Výsledky měření na modelových membránových systémech proto byly v souladu s chováním 22- a 25-NBD-cholesterolu v membránách živých δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buněk (**Tab. 6 a 7**).

Tab. 8 Rovnovážné parametry fluorescence a anizotropie fluorescence 22- a 25-NBD-cholesterolu v umělých lipidových váčcích (LUV)

Stanovení rovnovážných parametrů fluorescence a anizotropie fluorescence sond 22- a 25-NBD-cholesterolu v LUV, které byly připraveny buď ze samotného DMPC (L_d fáze), nebo ze směsi DMPC/cholesterol v poměru 65:35 mol% (L_o fáze), bylo provedeno při 37 °C. λ_{ex} , excitační maximum; λ_{em} , emisní maximum; relativní intenzita, intenzita fluorescence normalizovaná podle celkové intenzity 22-NBD-cholesterolu stanovené v LUV ve fázi L_d ; r_{st} , rovnovážná anizotropie

	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	relativní intenzita	r_{st}
22-NBD-cholesterol				
L_d fáze	472	540	1,00	0,138
L_o fáze	473	539	0,04	0,206
25-NBD-cholesterol				
L_d fáze	475	530	0,59	0,174
L_o fáze	460	520	0,43	0,112

Tab. 9 Časově rozlišené parametry fluorescence a anizotropie fluorescence 22- a 25-NBD-cholesterolu v umělých lipidových váčcích (LUV)

Měření časově dynamických parametrů fluorescence a anizotropie fluorescence sond 22- a 25-NBD-cholesterolu v LUV, které byly připraveny buď ze samotného DMPC (L_d fáze), nebo ze směsi DMPC/cholesterol v poměru 65:35 mol% (L_o fáze), bylo provedeno při 37 °C. τ_{fl} , průměrná doba života excitovaného stavu (*lifetime*); r_0 , limitní anizotropie; r_∞ , reziduální anizotropie; ϕ_{corr} , průměrný rotačně korelační čas

	τ_{fl} (ns)	r_0	r_∞	ϕ_{corr} (ns)
22-NBD-cholesterol				
L_d fáze	6,19	0,281	0,065	7,61
L_o fáze	6,66	0,264	0,119	8,10
25-NBD-cholesterol				
L_d fáze	2,02	0,273	0,080	6,02
L_o fáze	4,47	0,262	0,062	6,11

5.6. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR

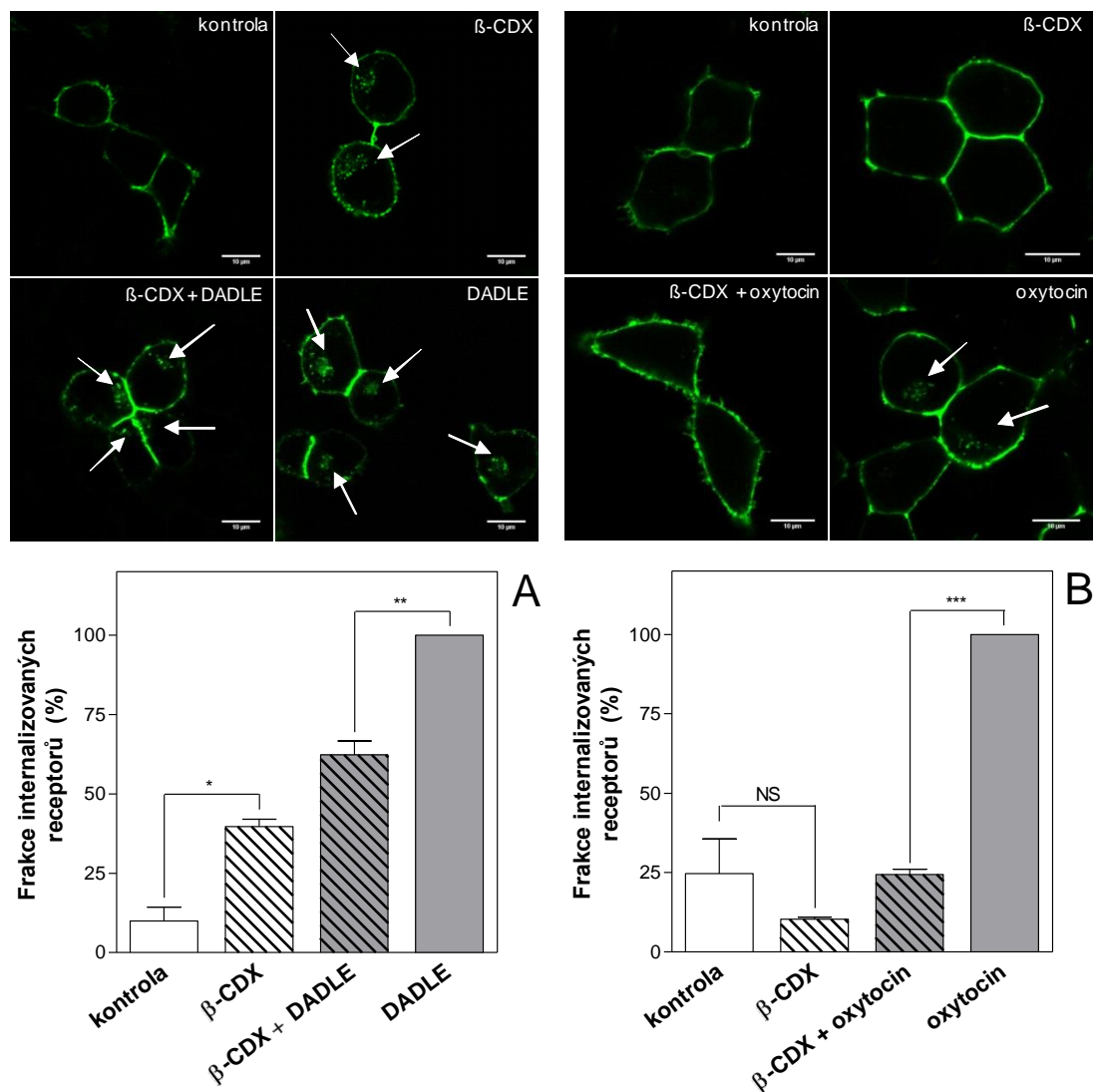
Tato část experimentálního programu byla uskutečněna v rámci zahraniční stáže v laboratoři Prof. M. Parentiho (*University of Milano-Bicocca, Italy*). Stanovení vlivu β -cyklodextrinem navozené deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR bylo provedeno ve fixovaných preparátech buněk linie HEK293T přechodně exprimujících variantu δ -OR nesoucí na svém extracelulárně umístěném N-konci antigenní epitop FLAG (FLAG- δ -OR). Pro srovnání byl stanoven vliv deplece cholesterolu na internalizaci oxytocinového receptoru (OTR). K tomuto účelu byly použity buňky linie HEK293T přechodně exprimující variantu OTR nesoucí na N-konci antigenní epitop Myc (Myc-OTR).

5.6.1. Srovnání vlivu deplece cholesterolu na internalizaci opioidního receptoru typu delta (FLAG- δ -OR) a receptoru pro oxytocin (Myc-OTR)

Inkubace buněk se samotným β -CDX vyvolala internalizaci FLAG- δ -OR (**Obr. 33A**). Množství receptoru internalizovaného tímto způsobem odpovídalo přibližně 40 % receptorů internalizovaných působením samotného agonisty (DADLE). V případě buněk inkubovaných s roztokem obsahujícím DADLE i β -CDX bylo množství internalizovaných receptorů významně nižší než množství receptorů internalizovaných působením samotného DADLE. Deplece cholesterolu tedy negativně ovlivnila agonistou navozenou internalizaci FLAG- δ -OR. Vysvětlení by mohlo být následující. Internalizace agonistou okupovaných δ -OR se odehrává prostřednictvím klatrinových váčků, jejichž formování a odštěpování od PM se ukázalo být narušeno deplecí cholesterolu z plazmatické membrány (Subtil et al., 1999; Rodal et al., 1999). Způsob, jakým došlo k internalizaci FLAG- δ -OR vyvolané působením samotného β -CDX, je tak s největší pravděpodobností odlišný a podporuje představu, že samotné narušení integrity buněčné membrány navozuje samovolnou internalizaci δ -OR.

V případě Myc-OTR byla situace odlišná. Deplece cholesterolu nevyvolala internalizaci Myc-OTR a navíc zcela potlačila oxytocinem (OT) navozenou internalizaci receptoru (**Obr. 33B**). Tento výsledek je v souladu se skutečností, že funkce OTR závisí na obsahu membránového cholesterolu. Přítomnost určitého množství cholesterolu v PM je nezbytnou podmínkou pro vysokoafinní vazbu ligandu na OTR (Klein a Fahrenholz, 1994; Klein et al., 1995; Gimpl et al., 1997). Cholesterol navíc chrání receptor před tepelnou denaturací (Gimpl et al., 2000). Deplece cholesterolu má tedy na funkci OTR jednoznačně

negativní vliv a proto není s podivem, že zapříčinila neschopnost oxytocinu vyvolat internalizaci Myc-OTR.



Obr. 33 Vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR a OTR

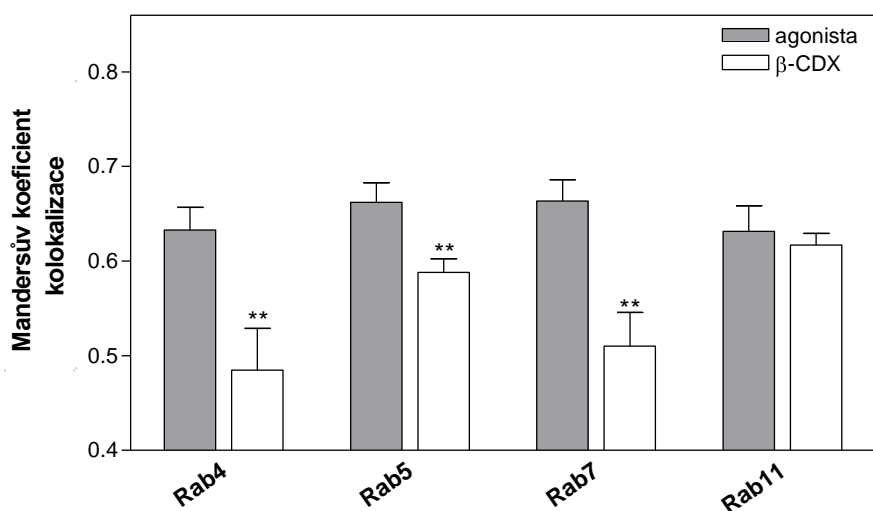
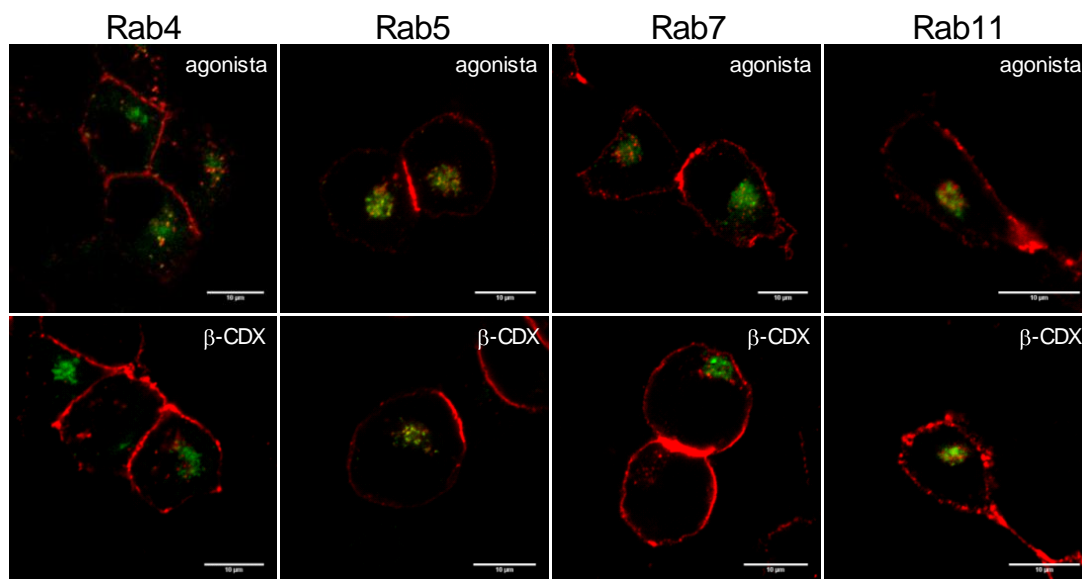
Buňky přechodně exprimující FLAG- δ -OR (A) nebo Myc-OTR (B) byly nejprve inkubovány s primárními protilátkami proti epitopu (1 hod). Následovala inkubace s DMEM obsahujícím 10 mM β -CDX, nebo agonistu (100 nM DADLE/oxytocin), nebo β -CDX v kombinaci s agonistou, nebo se samotným DMEM (kontrola), která probíhala po dobu 30 minut. Buňky byly poté zafixovány a obarveny *Alexa Fluor*® 488 značenými sekundárními protilátkami. Preparáty byly pozorovány s pomocí konfokální mikroskopie a kvantifikovány programem ImageJ. Data uvedená v grafech představují průměr hodnot stanovených v 8 buňkách v rámci tří nezávislých transfekcí \pm SEM. Statistická analýza byla provedena s pomocí jednocestné ANOVY s Bonferroni *post hoc* testem (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

5.6.2. Kolokalizace internalizovaných δ -OR s Rab proteiny

Lokalizaci internalizovaných receptorů v nitrobuněčném prostoru lze zjistit prostřednictvím stanovení kolokalizace s Rab proteiny. Rab proteiny jsou členy rodiny monomerních G proteinů, které se podílejí na regulaci transportu endocytických váčků. Výskyt jednotlivých Rab proteinů je víceméně specifický pro membránu určitého typu intracelulárních váčků (Somsel Rodman a Wandinger-Ness, 2000; Stenmark a Olkkonen, 2001). Pro účely stanovení lokalizace internalizovaných FLAG- δ -OR byly zvoleny proteiny Rab4, Rab5, Rab7 a Rab11. Rab4 se vyskytuje v časných endozomech. Rab5 je přítomen v kltrinových váčcích a časných endozomech. Rab7 se naopak vyskytuje v pozdních endozomech, případně v lyzozomech. Rab11 je přítomen v membráně trans-GA a v recyklujících endozomech, prostřednictvím kterých dochází k návratu endocytovaných proteinů zpět na PM.

Zjištění míry kolokalizace FLAG- δ -OR s Rab proteiny posloužilo k porovnání lokalizace receptorů internalizovaných působením samotného β -CDX a samotného agonisty (DADLE). Stanovení kolokalizace internalizovaných FLAG- δ -OR s Rab proteiny bylo provedeno v buňkách linie HEK293T přechodně koexprimujících FLAG- δ -OR a fluorescenčně značený Rab protein (EGFP-Rab).

Míra kolokalizace internalizovaného FLAG- δ -OR s Rab proteinem byla hodnocena prostřednictvím Mandersova koeficientu kolokalizace (Bolte a Cordelières, 2006). Mandersův koeficient v tomto případě vyjadřuje podíl z celkového signálu v červeném kanálu (receptor) přítomném v analyzované oblasti mikroskopického snímku, který kolokalizuje se signálem v zeleném kanálu (EGFP-Rab). Hodnoty Mandersova koeficientu kolokalizace znázorňuje graf uvedený na **Obr. 34**. Srovnání hodnot Mandersova koeficientu pro jednotlivé Rab proteiny ukázalo, že míra kolokalizace receptorů, které se internalizovaly vlivem inkubace buněk s β -CDX, s proteiny Rab4, Rab5 a Rab7 byla výrazně nižší než v případě receptorů internalizovaných působením agonisty.



Obr. 34 Kolokalizace internalizovaných δ -OR s Rab proteiny

Buňky přechodně koexprimující FLAG- δ -OR a EGFP-Rab4/5/7/11 protein byly nejprve po dobu 1 hodiny inkubovány s primárními protilátkami proti epitopu FLAG. Následně byly po dobu 30 minut vystaveny působení agonisty (100 nM DADLE) nebo 10 mM β -CDX a zafixovány. Fixované buňky byly obarveny *Alexa Fluor*® 568 značenými sekundárními protilátkami. Preparáty byly pozorovány s pomocí konfokální mikroskopie. Červená barva na mikroskopických snímcích odpovídá receptoru, zelená Rab proteinu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty Mandersova koeficientu \pm SEM stanoveného v 10 různých buňkách v rámci jedné transfekce. Statistická analýza byla provedena s pomocí nepárového Studentova t-testu (**, $p < 0,01$).

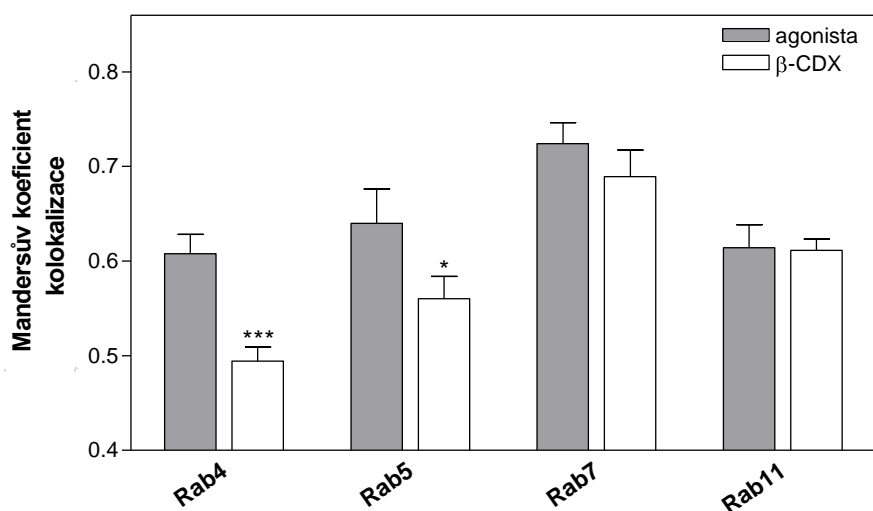
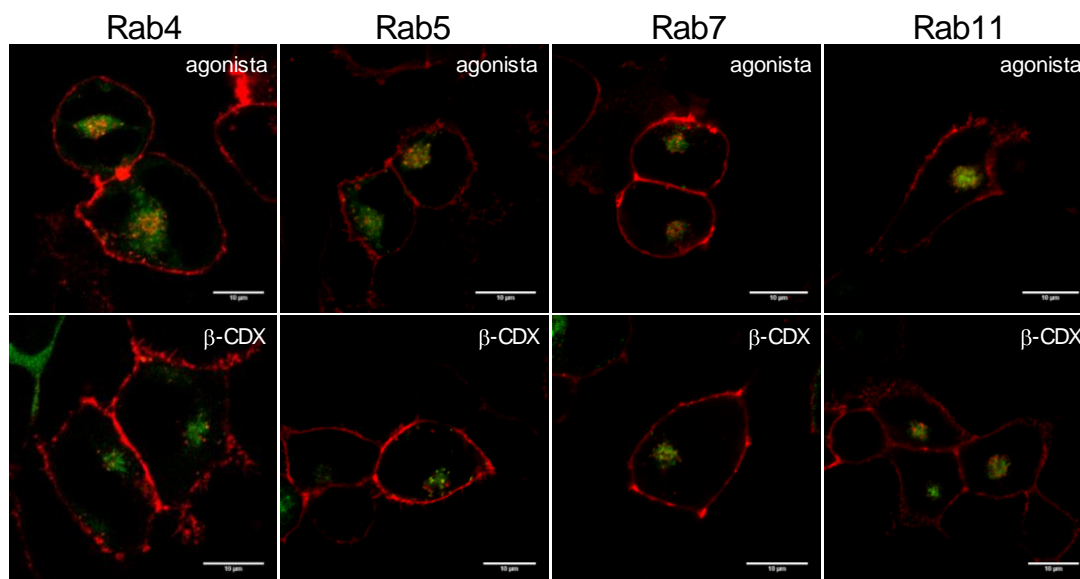
5.6.3. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci prostanoidního receptoru pro tromboxan A₂ (TP)

Výše uvedený experimentální postup byl rovněž aplikován při studii internalizace prostanoidního receptoru pro tromboxan A₂ (TP). Důvodem pro studii tohoto typu receptoru, která byla rovněž uskutečněna v rámci mé zahraniční stáže v Itálii, byla spolupráce Prof. Parentiho a Prof. Rovattiho založená na výzkumu tohoto receptoru.

TP existuje ve dvou variantách, TP α a TP β , které vznikají alternativním sestřihem téhož genu. TP α je kratší (343 AMK) než TP β (407 AMK). Obě varianty se shodují v prvních 328 AMK. TP β , ale ne TP α , podstupuje agonistou navozenou internalizaci, která se odehrává prostřednictvím klatrinových váčků (Parent et al., 1999). TP α podstupuje internalizaci pouze tehdy, je-li koexprimován s TP β . Z toho je zřejmé, že TP α a TP β tvoří hetero-oligomery, díky kterým může být internalizován i TP α , který sám o sobě internalizaci nepodstupuje (Laroche et al., 2005).

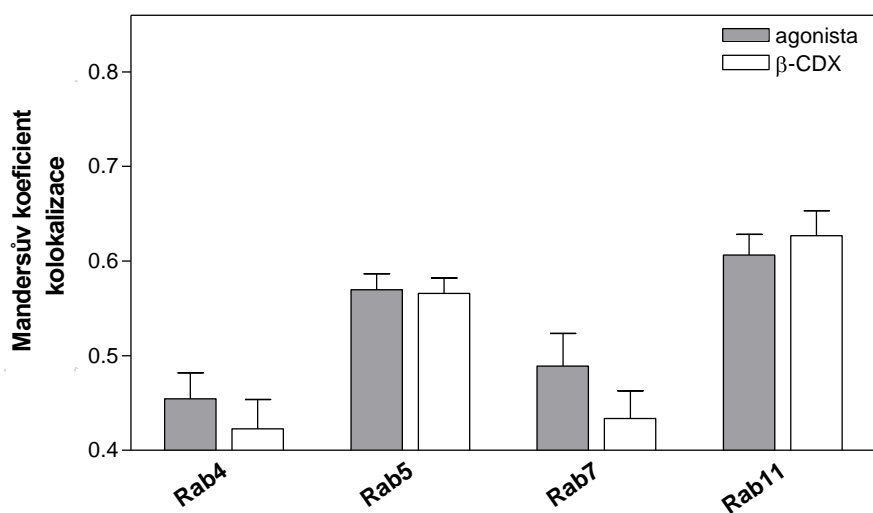
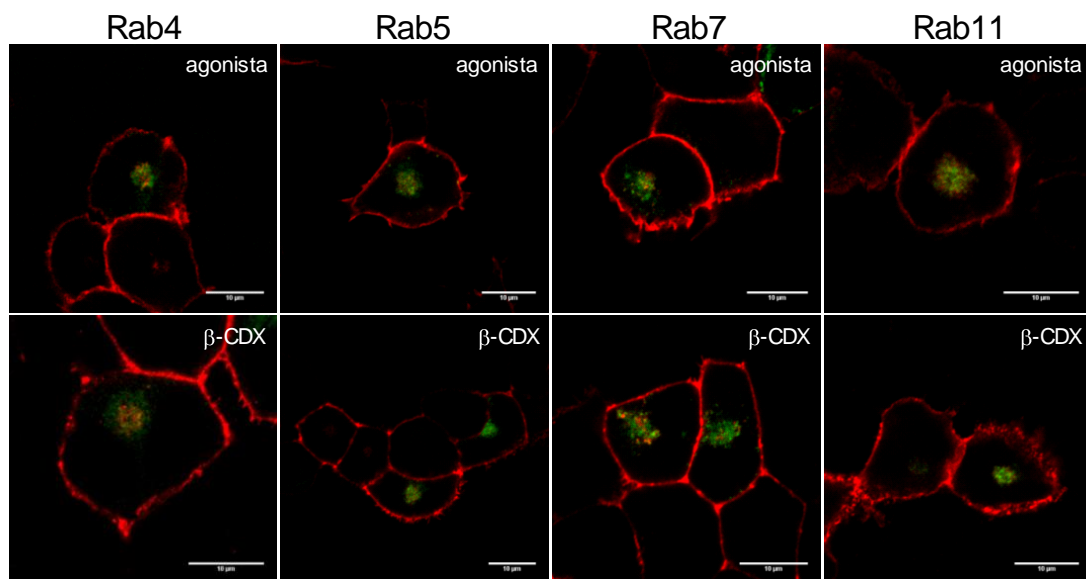
Stanovení kolokalizace internalizovaných TP β s Rab proteiny bylo provedeno v buňkách linie HEK293T přechodně koexprimujících variantu TP β nesoucí na N-konci antigenní epitop Myc (Myc-TP β) a EGFP-Rab protein. Stanovení kolokalizace internalizovaných TP α s Rab proteiny bylo provedeno v buňkách linie HEK293T přechodně koexprimujících variantu TP α nesoucí na N-konci antigenní epitop Myc (Myc-TP α), variantu TP β nesoucí na N-konci antigenní epitop HA (HA-TP β) a EGFP-Rab protein. V případě těchto buněk byl vizualizován pouze TP α .

Internalizace Myc-TP β i Myc-TP α nastala jak vlivem působení samotného agonisty (1 μ M U46619), tak vlivem inkubace buněk se samotným β -CDX. Kolokalizace internalizovaných receptorů s jednotlivými Rab proteiny byla opět hodnocena s pomocí Mandersova koeficientu, jehož hodnoty jsou uvedeny v grafech na **Obr. 35 a 36**. V případě Myc-TP β byla míra kolokalizace receptorů internalizovaných vlivem inkubace buněk s β -CDX s proteiny Rab4, Rab5 výrazně nižší než v případě receptorů internalizovaných působením agonisty (**Obr. 35**). Míra kolokalizace internalizovaných Myc-TP α s Rab proteiny v buňkách inkubovaných se samotným β -CDX se nelišila od míry kolokalizace stanovené v buňkách inkubovaných se samotným agonistou (**Obr. 36**).



Obr. 35 Kolokalizace internalizovaných TPβ s Rab proteiny

Buňky přechodně koexprimující Myc-TPβ a EGFP-Rab4/5/7/11 protein byly nejprve po dobu 1 hodiny inkubovány s primárními protilátkami proti epitopu Myc. Následně byly po dobu 30 minut vystaveny působení agonisty (1 μM U46619) nebo 10 mM β-CDX a zafixovány. Fixované buňky byly obarveny *Alexa Fluor® 568* značenými sekundárními protilátkami. Preparáty byly pozorovány s pomocí konfokální mikroskopie. Červená barva na mikroskopických snímcích odpovídá receptoru, zelená Rab proteinu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty Mandersova koeficientu ± SEM stanoveného v 10 různých buňkách v rámci jedné transfekce. Statistická analýza byla provedena s pomocí nepárového Studentova t-testu (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).



Obr. 36 Kolokalizace internalizovaných TPα s Rab proteiny

Buňky přechodně koexprimující Myc-TPα, HA-TPβ a EGFP-Rab4/5/7/11 protein byly nejprve po dobu 1 hodiny inkubovány s primárními protilátkami proti epitopu Myc. Následně byly po dobu 30 minut vystaveny působení agonisty (1 μM U46619) nebo 10 mM β-CDX a zafixovány. Fixované buňky byly obarveny *Alexa Fluor® 568* značenými sekundárními protilátkami. Preparáty byly pozorovány s pomocí konfokální mikroskopie. Červená barva na mikroskopických snímcích odpovídá receptoru, zelená Rab proteinu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty Mandersova koeficientu ± SEM stanoveného v 10 různých buňkách v rámci jedné transfekce.

5.7. Vliv deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R-eGFP v plazmatické membráně živých buněk

V poslední části dizertační práce uvádím ve stručné podobě výsledky, které tvoří základ manuskriptu, který byl navržen do časopisu *BBA Biomembranes* a v současné době připravujeme jeho revidovanou verzi (**Příloha 3**). Cílem této práce bylo studium mobility GPCR v živých buňkách za kontrolních podmínek a po depleci cholesterolu. Jako vhodný modelový systém jsme zvolili již dříve zmíněné buňky VTGP (**Obr. 17-22, Tab. 2-4**), které stabilně exprimují *plně funkční* fluoreskující verzi receptoru pro thyreoliberin, TRH-R-eGFP (Ostašov et al., 2007, 2008). Pro studium mobility TRH-R-eGFP jsme použili moderní a experimentálně i technicky obtížné metody konfokální fluorescenční mikroskopie FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) a RICS (*Raster image correlation spectroscopy*). Rovněž jsme použili techniku FLIM s cílem charakterizovat případné změny v mikrookolí eGFP na vnitřní straně plazmatické membrány těchto buněk vzhledem k tomu, že eGFP je v těchto buňkách připojeno na C-konci TRH-R.

Metoda FRAP je založena na vybělení malého místa („spotu“) plazmatické membrány intenzivním pulzem laserového paprsku a následným měřením *recovery*, znovuoobjevení fluorescenčního signálu v tomto místě. Molekuly TRH-R-eGFP migrují v rámci svého přirozeného laterálního pohybu v plazmatické membráně do vyběleného místa, přičemž rychlost této migrace by měla být identická s rychlostí jejich pohybu v nevybělené části membrány. Výsledky znázorněné v **příloze 3** na **Fig. 1** a **Fig. 2** ukázaly, že deplece cholesterolu (**Fig. 1**) ani expozice intenzivnímu laserovému paprsku (**Fig. 2**) nezpůsobily změnu morfologie VTGP buněk nebo struktury jejich plazmatické membrány (konfokální mikroskop Leica TCS SP2 AOBS).

Pro získání co nejobjektivnější informace o rychlosti pohybu receptoru v membráně byl sběr primárních dat i jejich normalizace proveden ve třech různě velikých „spotech“ tvaru kruhu, jejichž průměr činil 2, 3 a 6 μm . Analýza rychlosti vzestupu fluorescenčního signálu molekuly TRH-R-eGFP ve „spotech“ všech těchto velikostí ukázala, že deplece cholesterolu neměla statisticky významný vliv na mobilitu receptoru (**Fig. 3** a **Fig. 4**). Mobilita receptoru v plazmatické membráně, kterou jsme kvantitativně vyjádřili jako „zdánlivý difuzní koeficient“ (D_{app}), proto nebyla rozdílná v buňkách kontrolních ($0.24\text{-}0.26 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a buňkách vystavených účinku $\beta\text{-CDX}$ ($0.26\text{-}0.28 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $p > 0.05$, NS) (**Table 1**). Arteficiálně vysoké hodnoty D_{app} ve spotu velikosti 6 μm lze vysvětlit jako migraci receptorů z roviny nad a pod konfokální rovinou do vybělené oblasti

plazmatické membrány, která je v daném okamžiku snímána (ROI, *region of interest*). Stejný výsledek byl získán i analýzou mobility TRH-R-eGFP s pomocí metody RICS, která charakterizuje mobilitu receptoru ve vybraném objemovém elementu buňky (**Fig. 5** a **Table 2**). Překvapivě, numerická hodnota $Dapp$ stanovená metodou RICS byla velmi blízká hodnotě $Dapp$ stanovené metodou FRAP ($0.28 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Srovnání námi stanovených hodnot $Dapp$ s literárními údaji ukázalo dobrou shodu s výsledky získanými při studiu jiných buněčných linií (**Table 5**).

¹, Při výpočtu numerických hodnot $Dapp$ byl použit matematický model dvojrozměrné, plošné difuze formulovaný Soumpasisem (Soumpasis, 1983).

Zánik membránových domén v živých buňkách nemění mobilitu TRH-R-eGFP zřejmě proto, že jen velmi malá část molekul tohoto proteinu je v živých buňkách lokalizována v membránových doménách. Uvolnění malého množství receptorů vázaných v membránových doménách do většinové frakce receptorů se tak v rámci celkového množství receptorů v plazmatické membráně neprojeví jako statisticky významná změna. Tento závěr je v souladu s naší dřívější studií „detergent rezistentních“ membránových domén (DRM), která ukázala, že DRM obsahují méně než 5 % z celkového množství TRH-R-eGFP přítomných v plazmatické membráně (Rudajev et al., 2005). Detergent rezistentní domény však obsahují velké množství G proteinů, které jsou po degradaci domén uvolněny do většinové fáze plazmatických membrán (*bulk of plasma membranes*, BPM). Uvolnění G proteinů třídy G_q/G_{11} do BPM způsobuje snížení schopnosti TRH-R aktivovat tyto proteiny (Ostašov et al., 2007). Podobný výsledek jsme získali při studiu buněk VTGP. Deplece cholesterolu způsobila narušení funkční aktivity TRH-R-eGFP. Toto narušení bylo prokázáno s pomocí metody agonistou stimulované vazby [^{35}S]GTP γ S. Thyreoliberinem (TRH) stimulovaná vazba [^{35}S]GTP γ S na G proteiny třídy G_q/G_{11} , která byla vyjádřena jako % bazální hodnoty vazby [^{35}S]GTP γ S v nepřítomnosti agonisty, byla deplecí cholesterolu snížena z 360 % (kontrolní buňky) na 185 % (**Fig. 7**). Pro získání tohoto výsledku musely být G_a podjednotky G proteinů třídy G_q/G_{11} , které jsou specificky aktivovány TRH-R, odděleny od ostatních G proteinů imunoprecipitací se specifickými protilátkami. Výsledky této části naší práce je možné uzavřít tak, že *narušení integrity buněčné membrány vlivem deplece cholesterolu způsobuje narušení funkce signální kaskády iniciované TRH-R*.

Pohyb TRH-R-eGFP se uskutečňuje v rámci lipidové matrice (dvojvrstvy) membrány, jejíž převážnou část zaujímá hydrofobní zóna tvořená řetězcí mastných kyselin molekul fosfolipidů a sfingolipidů. Z tohoto důvodu jsme rovněž zkoumali, jakým

způsobem je tato hydrofobní zóna ovlivněna snížením obsahu membránového cholesterolu. Pro charakterizaci změn hydrofobní zóny jsme nejprve použili stanovení hodnot rovnovážné anizotropie fluorescence sondy DPH, r_{DPH} . Zvýšení koncentrace β -CDX výrazným způsobem snížilo mikroviskozitu plazmatických membrán (**Table 3A**). Naše výsledky dále ukázaly (**Table 3B**), že fragmenty PM, které byly připraveny z buněk se sníženým obsahem cholesterolu (10 mM β -CDX), mají nižší „mikroviskozitu“ než membrány připravené z kontrolních buněk. Stanovení dynamické depolarizace DPH ukázalo, že *deplece cholesterolu způsobuje změnu mikrookolí sondy, kterou lze interpretovat jako snížení úrovně strukturní organizace membrány* (**Table 4**). Pokles obsahu cholesterolu v membráně se projevil jako pokles doby života excitovaného stavu DPH (τ_1 a τ_2) a hodnot anizotropie v čase 0 (r_0 , limitní anizotropie) i anizotropie ve velmi dlouhém čase (r_∞ , reziduální anizotropie). Rotačně korelační čas (ϕ) se nezměnil. Snížení parametru uspořádanosti (**S**) spojené se zvýšením difuzně-rotační konstanty (D_w) lze považovat za důsledek obecné chaotizace hydrofobní zóny membrány.

V celkovém pohledu na výsledky získané při práci s buňkami VTGP a na dřívější výsledky naší skupiny (Rudajev et al., 2005; Ostašov et al., 2007) lze říci, že výrazné snížení mikroviskozity, neboli zvýšení fluidity plazmatické membrány negativním způsobem ovlivňuje funkci signální kaskády TRH-R. Novým a originálním zjištěním je, že mobilita molekul TRH-R v plazmatické membráně živých buněk, kterou jsme detekovali metodami FRAP a RICS, nebyla ovlivněna degradací membránových domén. Tento závěr je těžko zpochybnitelný vzhledem k tomu, že nejen FRAP, ale i RICS poskytly stejný výsledek.

Pro podrobnou diskuzi vhodnosti a výpovědní hodnoty použitých biofyzikálních metod pro analýzu membránových domén v živých buňkách, odkazují čtenáře na práci Lagerholma (Lagerholm et al., 2005). Makroskopický pohyb TRH-R, který v rovině plazmatické membrány probíhá v časovém horizontu minut, je zřejmě výslednicí mnoha rychlých přenosů mezi různými membránovými doménami (Maxfield, 2002), které se liší nejen velikostí, ale i dobou své existence. Mírné narušení integrity plazmatické membrány vlivem 10 mM β -CDX, které se neprojevalo jako detekovatelná změna morfologie VTGP buněk (**Fig. 1**), nezpůsobuje dostatečně významnou změnu ve výsledné sumě / integrálu všech těchto pohybů.

6. DISKUZE

Rozhodující vliv na strukturní a dynamické parametry plazmatické membrány má cholesterol, který podle dosavadních poznatků tvoří 30-40 % všech lipidových molekul této buněčné membrány (Maxfield a Wüstner, 2002). Hlavní rolí cholesterolu je regulace stavu hydrofobní zóny PM, která se odehrává prostřednictvím interakce s alifatickými řetězci mastných kyselin fosfolipidů a sfingolipidů. Integrita hydrofobní zóny PM je nezbytnou podmínkou pro udržení optimální funkce PM, která je základním předpokladem životaschopnosti každé savčí buňky (Barenholz, 2002). Další význam cholesterolu pro funkci plazmatické membrány vyplývá z jeho nerovnoměrné laterální distribuce. Značné množství cholesterolu je totiž spolu se sfingolipidy soustředěno ve specifických membránových okrscích souhrnně označovaných jako membránové domény. Membránové domény (MD) jsou dynamické struktury, které ovlivňují distribuci a funkci řady membránových proteinů, mezi něž se kromě jiných řadí také receptory spřažené s G proteiny (GPCR), heterotrimerní G proteiny i některé jejich efekторы (Oh a Schnitzer, 2001; Chini a Parenti, 2004; Ostrom a Insel, 2004). Úloha MD v signalizaci GPCR však stále není dostatečně prozkoumána, přičemž výjimku netvoří ani opioidní receptor typu delta (δ -OR).

6.1. Vliv deplece cholesterolu na signální kaskádu δ -OR

Podnětem pro stanovení vlivu deplece cholesterolu na signalizaci δ -OR byly předchozí výsledky získané v naší laboratoři při studiu tohoto receptoru. Tato studie byla provedena v membránových frakcích izolovaných s pomocí hustotního sacharóзовého gradientu z buněk linie HEK293, které stabilně exprimují fúzní protein mezi δ -OR a mutantou $G_i1\alpha$ proteinu, δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹). Záměna Cys³⁵¹ za Ile³⁵¹ propůjčuje $G_i1\alpha$ proteinu necitlivost vůči pertussis toxinu a současně zajišťuje vysokou úroveň aktivity G proteinu po stimulaci agonistou δ -OR (viz kapitolu 2.14).

V živočišných tkáních daný receptor aktivuje více G proteinů s neznámou stechiometrií, přičemž výsledná změna aktivity závisí nejen na množství receptorů, G proteinů a rychlosti G proteinového cyklu každé z aktivovaných $G\alpha$ podjednotek, ale i na aktivitě široké škály RGS proteinů, které urychlují G proteinový cyklus. Za těchto podmínek je proto velmi obtížné postavit primární experimentální otázky tak, aby bylo možné předpokládat jednoznačnou odpověď. Z těchto důvodů byly pro studium signální kaskády iniciované δ -OR použity právě buňky δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293.

Schopnost δ -OR aktivovat kovalentně připojený $G_{i1\alpha}$ protein i endogenní G proteiny třídy G_i/G_o byla mnohem vyšší v membránových frakcích o nízké hustotě, které představovaly membránové domény, než ve většinové fázi plazmatických membrán (*bulk of plasma membranes*) ve frakcích o vysoké hustotě (Bourova et al., 2003). Dalším krokem ve studiu signalizace δ -OR v rámci uvedené modelové buněčné linie, δ -OR- $G_{i1\alpha}$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, byl tedy logicky vliv destabilizace či degradace MD na signalizaci tohoto receptoru.

Jelikož jsou membránové domény obohaceny cholesterolem, deplece cholesterolu tak představuje výhodný experimentální přístup, jak studovat roli těchto domén i samotného cholesterolu v receptorové signalizaci. V naší laboratoři se pro depleci cholesterolu používá metoda extrakce pomocí cyklického oligosacharidu, β -cyklodextrinu (β -CDX). Molekuly β -CDX při kontaktu s povrchem buňky specificky odstraňují cholesterol z plazmatické membrány (**Obr. 9**). Nejen výsledky získané v naší laboratoři (Ostašov et al., 2007), ale i výsledky několika dalších výzkumných skupin (Kabouridis et al., 2000; Dreja et al., 2002; Prendergast et al., 2010) ukázaly, že deplece cholesterolu pomocí β -CDX má skutečně za následek degradaci MD.

Analýza vlivu deplece cholesterolu na vazebné parametry a funkční aktivitu δ -OR ve frakcích PM, které byly izolovány z buněk linie δ -OR- $G_{i1\alpha}$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, poskytla následující výsledky. Zatímco celkový počet vazebných míst pro agonistu [³H]DADLE ani afinita vazby tohoto agonisty na receptor nebyly deplecí cholesterolu ovlivněny (**Obr. 23**), míra schopnosti δ -OR aktivovat G proteiny byla významně snížena (**Obr. 24**). Deplece cholesterolu narušila jak funkční spřažení mezi receptorem a endogenními G proteiny třídy G_i/G_o , tak spřažení receptoru s kovalentně připojeným $G_{i1\alpha}$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) proteinem (Brejchová et al., 2011). Z toho vyplývá, že správná funkce δ -OR nezávisí pouze na fyzické interakci receptoru s G proteinem, ale i na podmínkách prostředí, kde se tato interakce odehrává, tedy na složení a struktuře lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány.

Naše výsledky jsou v souladu s výsledky studia signalizace δ -OR v membránách izolovaných z *caudate-putamen* mozku potkana a hybridní buněčné linie NG108-15 (*mouse neuroblastoma* \times *rat glioma cells*), která endogenně exprimuje δ -OR. Deplece cholesterolu měla totiž v obou typech preparátů na signalizaci δ -OR negativní vliv (Huang et al., 2007). Negativní účinek deplece cholesterolu na signální kaskádu iniciovanou δ -OR byl zaznamenán také v případě myocytů izolovaných ze srdce potkana, které jsou za kontrolních podmínek prostřednictvím stimulace agonistou δ -OR chráněny před buněčnou

smrtí vlivem ischemie (Patel et al., 2006). Autoři obou uvedených prací připisují negativní účinek deplece cholesterolu na funkční aktivitu δ -OR narušení optimální organizace PM vlivem degradace membránových domén.

Zajímavý výsledek ve smyslu významu struktury membrány pro funkční aktivitu GPCR poskytly studie δ -OR v prostředí uměle připravené planární lipidové dvojvrstvy (*solid-supported lipid bilayer*), které byly provedeny s pomocí metody *plasmon-waveguide resonance spectroscopy* (Alves et al., 2005). Pro účely této studie byla umělá lipidová dvojvrstva připravena ze směsi obsahující palmitoylloeoylefosfatidylcholin (POPC) a sfingomyelin (SM). Autoři zjistili, že agonistou okupovaný δ -OR, tedy aktivní forma receptoru, byl koncentrován v oblasti lipidové dvojvrstvy tvořené SM, pro kterou je charakteristická větší tloušťka než pro oblast tvořenou POPC. Neaktivní forma δ -OR, tedy receptor bez navázaného agonisty, naopak preferovala oblast tvořenou POPC. Preferenční lokalizaci aktivní formy receptoru v oblasti membrány vyznačující se větší tloušťkou lipidové dvojvrstvy lze vysvětlit změnou konformace transmembránové oblasti receptoru po vazbě agonisty, která se projevuje „prodloužením“ molekuly receptoru ve vertikálním směru, tj. ve směru kolmém na rovinu membrány (Salamon et al., 2000). Začlenění „prodloužené“ formy receptoru do tlustší oblasti membrány je tedy pro molekulu receptoru energeticky výhodným stavem, při kterém zůstanou hydrofobní AMK transmembránových úseků zanořeny v prostředí lipidové dvojvrstvy. Vezmeme-li v úvahu výsledky této studie v kontextu mechanismu stimulace G proteinu receptorem, jehož podstatou je právě konformační změna receptoru vyvolaná vazbou agonisty, představuje výše uvedené zjištění zřetelnou podporu pro význam membránových domén v receptorové signalizaci. Právě membránové domény, které jsou obohaceny sfingolipidy a cholesterolem, se totiž vyznačují větší tloušťkou lipidové dvojvrstvy než ostatní oblasti PM.

6.2. Vliv deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM buněk δ -OR-G₁ α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Stanovení vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti *izolovaných PM* bylo provedeno s pomocí fluorescenčních membránových sond 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a Laurdan (viz kapitoly **2.16** a **2.17**). Fluorescenční parametry DPH vypovídají o stavu hydrofobní zóny, zatímco fluorescenční parametry sondy Laurdan slouží k charakterizaci hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy (Sýkora et al., 2009; Brejchová et al., 2011). Hydrofobní zóna je tvořena řetězcí mastných kyselin molekul fosfolipidů.

Hydrofilní oblastí se rozumí oblast polárních hlaviček fosfolipidů, která představuje rozhraní mezi membránou a okolním vodným prostředím.

Analýza hydrofobní zóny izolovaných PM s pomocí rovnovážné anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) poskytla následující informace. Deplece cholesterolu navozená jak v podmínkách *in vivo* (**Obr. 25A**), tak v podmínkách *in vitro* (**Obr. 25B**) měla za následek výrazné snížení hodnoty r_{DPH} , což lze interpretovat jako zvýšení celkové fluidity membrány. Podrobnější informace o stavu hydrofobní zóny PM byly získány stanovením časově rozlišených parametrů fluorescence a anizotropie fluorescence DPH. Hodnoty stanovených parametrů, které jsou uvedeny v **Tab. 5**, ukazují, že deplece cholesterolu se projevila jako změna mikrookolí DPH. Deplece cholesterolu způsobila pokles hodnoty doby života excitovaného stavu (τ) DPH. Doba života excitovaného stavu DPH je citlivá k polaritě okolního prostředí, přičemž v případě zvýšení polaritě prostředí dochází k jejímu zkrácení (Fiorini et al., 1987, 1989). Vliv deplece cholesterolu na hodnotu τ je tedy možné přisuzovat zvýšení polaritě hydrofobní zóny PM, které lze vysvětlit zvýšením propustnosti membránové dvojvrstvy pro molekuly vody. Deplece cholesterolu dále způsobila pokles hodnot limitní (r_0) i reziduální anizotropie (r_∞) DPH a rovněž snížení hodnoty parametru uspořádanosti **S** (*S-order parameter*). Hodnota difuzně-rotací konstanty (D_w) naopak vzrostla. Změny posledních dvou uvedených parametrů, tedy pokles hodnoty **S** doprovázený zvýšením hodnoty D_w , lze považovat za důsledek obecné chaotizace hydrofobní oblasti membrány, které se projevilo zvýšením mobility jejích komponent.

Vliv deplece cholesterolu na hydrofilní oblast PM izolovaných z buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 byl studován s pomocí generalizované polarizace (GP) sondy Laurdan (Parasassi et al., 1990, 1991). Deplece cholesterolu způsobila změnu tvaru emisního spektra této sondy (**Obr. 27A**) a snížení hodnot excitační GP (**Obr. 27B**). Pokles byl zaznamenán i v případě hodnoty směrnice excitačního GP spektra ($GP_{exc}S$). Hodnota směrnice emisního GP spektra ($GP_{em}S$) naopak vzrostla (**Obr. 27C**). Výsledky získané s pomocí sondy Laurdan lze shrnout následovně. Vlivem deplece cholesterolu došlo ke zvýšení polaritě hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy, které bylo doprovázeno zvýšenou pohyblivostí lipidových molekul membrány. Změnu polaritě lze v tomto případě přisuzovat nárůstu počtu molekul vody v hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy.

Studium vlivu deplece cholesterolu provedené v izolovaných PM bylo dále rozšířeno o mikroskopickou analýzu **PM živých buněk** δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293. Pro tento účel byly použity fluorescenční analogy cholesterolu, 22- a 25-NBD-cholesterol, které mají fluorofor (NBD) připojený k postrannímu alkylovému řetězci

(Ostašov et al., 2013). Deplece cholesterolu způsobila výrazný pokles intenzity fluorescence obou fluorescenčních analogů cholesterolu (**Obr. 29A-C**), který byl srovnatelný se snížením obsahu cholesterolu stanoveným biochemicky (**Obr. 29D**). To znamená, že v průběhu inkubace buněk s β -CDX došlo nejen ke snížení obsahu molekul přirozeného cholesterolu, ale i k účinnému odstranění molekul fluorescenčních analogů, 22- a 25-NBD-cholesterolu. Stanovení vlivu deplece cholesterolu na dobu života excitovaného stavu (τ) 22- a 25-NBD-cholesterolu, které bylo provedeno metodou FLIM, poskytlo následující výsledky (**Tab. 6**). Hodnota τ 22-NBD-cholesterolu nebyla deplecí cholesterolu významně ovlivněna (**Obr. 30**). V případě 25-NBD-cholesterolu naopak došlo vlivem snížení obsahu membránového cholesterolu k vysoce signifikantnímu poklesu hodnoty τ (**Obr. 31**). Pokles hodnoty τ 25-NBD-cholesterolu lze i v tomto případě vysvětlit zvýšením polarizace hydrofobní zóny membránové dvojvrstvy, neboť deplece cholesterolu činí tuto oblast membrány přístupnější pro polární molekuly vody.

Výsledky naší práce ukázaly, že 25-NBD-cholesterol je na rozdíl od 22-NBD-cholesterolu schopen zaznamenat deplecí cholesterolu navozené změny ve struktuře membrány živých buněk. Podstatou této schopnosti 25-NBD-cholesterolu je jeho molekulární struktura. Fluorofor 25-NBD-cholesterolu, NBD skupina, je totiž ke sterolovému jádru připojen delším uhlovodíkovým řetězcem, než je tomu v případě 22-NBD-cholesterolu (**Obr. 28**). NBD skupina molekuly 25-NBD-cholesterolu je díky tomu zanořena hluboko v hydrofobní zóně membrány (Chattopadhyay a London, 1987, 1988) a může tak snáze odrážet změny, ke kterým v této oblasti vlivem deplece cholesterolu prokazatelně dochází. Námí zjištěná necitlivost 22-NBD-cholesterolu ke změnám ve struktuře PM živých buněk je v souladu s předchozími výsledky, které byly získány při studiu chování 22-NBD-cholesterolu v prostředí modelové membránové dvojvrstvy (Loura et al., 2001). Autoři této práce zjistili, že 22-NBD-cholesterol se přednostně vyskytuje v oblastech, které nejsou obohaceny cholesterolem, což je patrně vysvětlením jeho necitlivosti vůči změnám způsobeným deplecí cholesterolu.

6.3. Vliv deplece cholesterolu na internalizaci δ -OR

Jelikož je internalizace důležitým regulačním mechanismem přenosu extracelulárních signálů prostřednictvím GPCR, rozhodli jsme se v rámci studia úlohy membránového cholesterolu na signalizaci δ -OR stanovit i vliv deplece cholesterolu na internalizaci tohoto receptoru. Stanovení bylo provedeno ve fixovaných preparátech buněk HEK293T přechodně exprimujících variantu δ -OR nesoucí na extracelulárně situovaném N-konci antigenní epitop FLAG (FLAG- δ -OR). Varianta receptoru nesoucí epitop právě na N-konci byla zvolena záměrně. Přítomnost epitopu v extracelulární oblasti receptoru totiž představuje elegantní možnost, jak s pomocí protilátek proti danému epitopu specificky označit pouze ty receptory, které byly na počátku experimentu lokalizovány v PM. Je-li pak ve zhotovených preparátech po obarvení pozorován nitrobuněčný signál, je jisté, že se jedná o internalizované receptory.

Analýza vlivu deplece cholesterolu na internalizaci FLAG- δ -OR poskytla následující výsledky. Deplece cholesterolu narušila průběh agonistou (DADLE) navozené internalizace FLAG- δ -OR (**Obr. 33A**). Úroveň internalizace pozorovaná v buňkách, které byly současně vystaveny působení agonisty a β -CDX, byla významně nižší než v případě buněk inkubovaných se samotným agonistou. Překvapivě, inkubace buněk se samotným β -CDX vyvolala internalizaci FLAG- δ -OR. Množství receptorů internalizovaných tímto způsobem odpovídalo ~40 % receptorů internalizovaných působením samotného agonisty. Způsob internalizace FLAG- δ -OR vyvolané působením samotného β -CDX je pravděpodobně odlišný od způsobu, kterým dochází k internalizaci agonistou okupovaného receptoru. Agonistou navozená internalizace δ -OR se totiž odehrává prostřednictvím klatrinových váčků (Trapaidze et al., 1996; Keith et al., 1996; Ko et al., 1999), ale formování a odštěpování těchto váčků od PM se ukázalo být deplecí cholesterolu narušeno (Subtil et al., 1999; Rodal et al., 1999).

Za účelem prozkoumání této hypotézy bylo provedeno stanovení kolokalizace internalizovaných FLAG- δ -OR s Rab proteiny, konkrétně Rab4, Rab5, Rab7 a Rab11. Tyto proteiny se podílí na regulaci transportu endocytických váčků a jejich výskyt je do značné míry specifický pro membránu určitého typu intracelulárních váčků (Somsel Rodman a Wandinger-Ness, 2000; Stenmark a Olkkonen, 2001). Rab4 se vyskytuje v časných endozomech. Rab5 je přítomen v klatrinových váčcích a časných endozomech. Rab7 se naopak vyskytuje v pozdních endozomech, případně v lyzozomech. Rab11 je

přítomen v trans-GA a v tzv. recyklujících endozomech, jejichž prostřednictvím se endocytované receptory navracejí zpět na PM.

Výsledky analýzy míry kolokalizace FLAG- δ -OR se zvolenými typy Rab proteinů znázorňuje **Obr. 33**. Z grafů uvedených na tomto obrázku vyplývá, že míra kolokalizace receptorů internalizovaných vlivem samotného β -CDX s proteiny Rab4, Rab5 a Rab7 byla výrazně nižší než v případě receptorů internalizovaných působením agonisty. Toto zjištění lze tak považovat za podporu výše uvedené hypotézy, podle které probíhá internalizace FLAG- δ -OR vlivem β -CDX odlišným způsobem než internalizace navozená agonistou. Přesný mechanismus tohoto procesu ovšem na základě získaných výsledků definovat nelze.

6.4. Vliv deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R-eGFP v plazmatické membráně živých buněk

Pro studium vlivu deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R v plazmatické membráně živých buněk byly použity buňky linie HEK293, které stabilně exprimují plně funkční fluoreskující verzi TRH-R, fúzní bílkovinu TRH-R-eGFP (linie VTGP). Mobilita TRH-R byla stanovena s pomocí dvou nezávislých metod konfokální fluorescenční mikroskopie, FRAP a RICS. Analýza mobility TRH-R-eGFP metodou FRAP ukázala, že deplece cholesterolu nezpůsobila statisticky významnou změnu mobility TRH-R-eGFP v plazmatické membráně. Stejný výsledek byl získán i s pomocí metody RICS. Vzhledem k tomu, že deplece cholesterolu zvyšuje fluiditu plazmatické membrány, je tento výsledek poněkud překvapivý. Snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně má rovněž za následek degradaci membránových domén (Kabouridis et al., 2000; Dreja et al., 2002; Ostašov et al., 2007; Prendergast et al., 2010). Zánik membránových domén v živých buňkách nemění mobilitu TRH-R-eGFP zřejmě proto, že jen velmi malá část (< 5 %) z celkového množství receptorů přítomných v plazmatické membráně je soustředěna v membránových doménách (Rudajev et al., 2005). Uvolnění malého množství receptorů vázaných v membránových doménách do většinové frakce receptorů se tak v rámci celkové mobility všech receptorů přítomných v plazmatické membráně neprojeví jako statisticky významná změna. Funkční aktivita TRH-R-eGFP je však, podobně jako v případě δ -OR, deplecí cholesterolu narušena.

7. ZÁVĚR

1) Výsledky získané při studiu buněk modelové linie δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 ukázaly, že snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně (PM) nemění vazbu specifického agonisty [³H]DADLE na opioidní receptor typu delta (δ -OR). Deplece cholesterolu významně neovlivnila ani celkový počet vazebných míst pro [³H]DADLE (B_{\max}), ani afinitu vazby agonisty na receptor.

2) Deplece cholesterolu však snižuje účinnost funkčního spřažení mezi δ -OR a trimerními G proteiny. Velikost maximální odpovědi na stimulaci DADLE se nemění, dochází však k výraznému snížení afinity této odpovědi. Hodnoty EC₅₀ se zvyšují o jeden řád.

3) Výše uvedené výsledky byly získány při studiu kontrolních buněk i buněk vystavených účinku pertussis toxinu. Platí proto jak pro stimulaci endogenních G proteinů třídy G_i/G_o, tak pro stimulaci G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) proteinu obsaženého v hybridní molekule δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹).

4) Analýza vlivu deplece cholesterolu na biofyzikální vlastnosti PM s využitím hydrofobní fluorescenční sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a polární sondy Laurdan ukázala, že snížení obsahu cholesterolu zvyšuje celkovou fluiditu plazmatické membrány. Příčinou je zvýšení míry neuspořádanosti a zvýšení mobility komponent hydrofobní zóny membránové dvojvrstvy. V hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy dochází ke zvýšení polaritu, které lze připsat zvýšení počtu molekul vody - hydrataci.

5) Výsledky stanovení doby života excitovaného stavu fluorescenčních sond 22- a 25-NBD-cholesterolu inkorporovaných v membráně *živých buněk* linie δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, které byly získány metodou FLIM lze shrnout následovně. 25-NBD-cholesterol, na rozdíl od 22-NBD-cholesterolu, představuje vhodný fluorescenční analog cholesterolu, jehož vlastnosti *jsou* schopny zaznamenat kvalitativní změny ve struktuře membrán *živých buněk* způsobené deplecí cholesterolu. 25-NBD-cholesterol proto představuje membránovou sondu, kterou je možno použít nejen pro stanovení obecných kvalitativních změn hydrofobní zóny buněčné membrány, podobně jako DPH, ale i jako fluorescenční sondu, jejíž vlastnosti jsou blízké vlastnostem samotného cholesterolu.

6) Studie buněk HEK293T přechodně exprimujících δ -OR nesoucí na N-konci antigenní epitop FLAG (FLAG- δ -OR) ukázala, že deplece cholesterolu snižuje účinnost endocytózy δ -OR (internalizace), která nastává jako přímý důsledek stimulace receptoru agonistou. Tato forma internalizace probíhá prostřednictvím klatrinových váčků.

Deplece cholesterolu dále způsobuje samovolnou internalizaci δ -OR, tedy internalizaci receptoru bez navázaného agonisty. Na základě podrobné analýzy kolokalizace nitrobuněčných forem δ -OR s Rab proteiny (Rab4, Rab5, Rab7 a Rab11), které byly použity jako „markery“ různých typů intracelulárních váčků, lze říci, že tato forma internalizace δ -OR je odlišná od internalizace vyvolané agonistou. Narušení integrity membrány či degradace membránových domén tedy labilizuje vazbu δ -OR v plazmatické membráně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmed, S.N., Brown, D.A., and London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36, 10944-10953

Alford, B.T., Burkhart, R.L. and Johnson, W.P. (1974) Etorphine and diprenorphine as immobilizing and reversing agents in captive and free-ranging mammals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 164, 702-705

Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A. and Rasenick, M.M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 128-140

Almeida, P.F., Vaz, W.L. and Thompson, T.E. (1992) Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry* 31, 6739-6747

Alves, I.D., Salamon, Z., Hruby, V.J. and Tollin, G. (2005) Ligand modulation of lateral segregation of a G-protein-coupled receptor into lipid microdomains in sphingomyelin/phosphatidylcholine solid-supported bilayers. *Biochemistry* 44, 9168-9178

Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199-225

Arshavsky, V.Y. and Bownds, M.D. (1992) Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 357, 416-417

Bahia, D.S., Wise, A., Fanelli, F., Lee, M., Rees, S. and Milligan, G. (1998) Hydrophobicity of residue 351 of the G protein Gi1 alpha determines the extent of activation by the alpha 2A-adrenoceptor. *Biochemistry* 37, 11555-11562

Ballesteros, J.A. and Weinstein, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* 25, 366-428

Barenholz, Y. (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog. Lipid Res.* 41, 1-5

Bayewitch, M.L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simonds, W.F. and Vogel, Z. (1998) Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G beta subunits. *J. Biol. Chem.* 273, 2273-2276

Becher, A., Green, A., Ige, A.O., Wise, A., White, J.H. and McIlhinney, R.A. (2004) Ectopically expressed gamma-aminobutyric acid receptor B is functionally down-regulated in isolated lipid raft-enriched membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 981-987

Becher, A., White, J.H. and McIlhinney, R.A. (2001) The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* 79, 787-795

Bender, F., Montoya, M., Monardes, V., Leyton, L. and Quest, A.F. (2002) Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. *Biol. Res.* 35, 151-167

Benga, G., Baum, H. and Kummerov, F.A. (1984) *Membrane Processes. Molecular Biology and Medical Applications*, Benga, G., Baum, H. and Kummerov, F.A. (eds.) Springer-Verlag New York Inc.

Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of

receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 260, 7094-7101

Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2797-2801

Berstein, G., Blank, J.L., Jhon, D.Y., Exton, J.H., Rhee, S.G. and Ross, E.M. (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* 70, 411-418

Bidlack, J.M. (2000) Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 719-723

Birnbaumer, L. (1990) Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so. *FASEB J.* 4, 3178-3188

Bockaert, J. and Pin, J.P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729

Bolte, S. and Cordelières, F.P. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213-232

Bourova, L., Kostrova, A., Hejnova, L., Moravcova, Z., Moon, H.E., Novotny, J., Milligan, G. and Svoboda, P. (2003) delta-Opioid receptors exhibit high efficiency when activating trimeric G proteins in membrane domains. *J. Neurochem.* 85, 34-49

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-G_i1 α fusion protein; the effect of cholesterol depletion. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2819-2829

Bretscher, M.S. and Raff, M.C. (1975) Mammalian plasma membranes. *Nature* 258, 43-49

Brown, D.A. and London, E. (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 1-7

Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544

Burger, K., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1577-1592

Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R. and Hamm, H.E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 24, 765-781

Carrillo, J.J., López-Giménez, J.F. and Milligan, G. (2004) Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric α 1b-adrenoceptor. *Mol. Pharmacol.* 66, 1123-1137

Carrillo, J.J., Pediani, J. and Milligan, G. (2003) Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 42578-42587

Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* 66, 61-79

Davis, A. (2005) Cells 101: Business Basics. In: *Inside the Cell*, Zapp Machalek, A. (ed), U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, NIH Publication No. 05-1051, pp. 20-31

- De Luca, A., Sargiacomo, M., Puca, A., Sgaramella, G., De Paolis, P., Frati, G., Morisco, C., Trimarco, B., Volpe, M. and Condorelli, G. (2000) Characterization of caveolae from rat heart: localization of postreceptor signal transduction molecules and their rearrangement after norepinephrine stimulation. *J. Cell. Biochem.* 77, 529-539
- de Weerd, W.F.C. and Leeb-Lundberg, L.M.F. (1997) Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 17858-17866
- Del Valle, E.M.M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39, 1033-1046
- Delom, F. and Fessart, D. (2011) Role of Phosphorylation in the Control of Clathrin-Mediated Internalization of GPCR. *Int. J. Cell Biol.* 246954
- Dessy, C., Kelly, R.A., Balligand, J.L. and Feron, O. (2000) Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alternation in NO signaling. *EMBO J.* 19, 4272-4280
- Deupi, X., Edwards, P., Singhal, A., Nickle, B., Oprian, D., Schertler, G. and Standfuss, J. (2012) Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 119-124
- Dolphin, A.C. (2003) G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55, 607-627
- Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (2003) G protein signaling and the molecular basis of antidepressant action. *Life Sci.* 73, 1-17
- Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (2005) Chronic antidepressant treatment prevents accumulation of galpha in cholesterol-rich, cytoskeletal-associated, plasma membrane domains (lipid rafts). *Neuropsychopharmacology* 30, 1238-1245
- Downes, G.B. and Gautam, N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* 62, 544-552
- Dreja, K., Voldstedlund, M., Vinten, J., Trantum-Jensen, J., Hellstrand, P. and Swärd, K. (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1267-1272
- Drmota, T., Gould, G.W. and Milligan, G. (1998b) Real time visualization of agonist-mediated redistribution and internalization of a green fluorescent protein-tagged form of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 24000-24008
- Drmota, T., Novotný, 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 Gqalpha/G11alpha induced by agonist stimulation. *Biochem. J.* 340, 529-538
- Drmota, T., Novotný, J., Kim, G.D., Eidne, K.A., Milligan, G. and Svoboda, P. (1998a) Agonist-induced internalization of the G protein G11alpha and thyrotropin-releasing hormone receptors proceed on different time scales. *J. Biol. Chem.* 273, 21699-21707
- Dror, R.O., Pan, A.C., Arlow, D.H., Borhani, D.W., Maragakis, P., Shan, Y., Xu, H. and Shaw, D.E. (2011) Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 13118-13123
- Eband, R.F., Thomas, A., Brasseur, R., Vishwanathan, S.A., Hunter, E. and Eband, R.M. (2006) Juxtamembrane protein segments that contribute to recruitment of cholesterol into domains. *Biochemistry* 45, 6105-6114
- Eband, R.M., Sayer, B.G. and Eband, R.F. (2005) Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *J. Mol. Biol.* 345, 339-350
- Escribá, P.V., Wedegaertner, P.B., Goñi, F.M. and Vögler, O. (2007) Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 836-852

- Evans, C.J., Keith, D.E. Jr, Morrison, H., Magendzo, K. and Edwards, R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955
- Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L. and Stevens, R.C. (2014) Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature* 506, 191-196
- Feron, O., Smith, T.W., Michel, T. and Kelly, R.A. (1997) Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 17744-17748
- Fielding, C.J. and Fielding, P.E. (2003) Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 219-228
- Fielding, C.J. and Fielding, P.E. (2004) Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 65-69 Feb
- Fillizola, M. and Devi, L.A. (2012) Structural biology: How opioid drugs bind to receptors. *Nature* 485, 314-317
- Fiorini, R., Gratton, E., and Curatola, G. (1989) Effect of cholesterol on membrane microheterogeneity: a study using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime distributions. *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 198-202
- Fiorini, R., Valentino, M., Wang, S., Glaser, M. and Gratton, E. (1987) Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 26, 3864-3870
- Fredriksson, R. and Schiöth, H.B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* 67, 1414-1425
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.G. and Schiöth, H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272
- Freissmuth, M., Casey, P.J. and Gilman, A.G. (1989) G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J.* 3, 2125-2131
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M.P. (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403-411
- Ganter, U.M., Charitopoulos, T., Virmaux, N. and Siebert, F. (1992) Conformational changes of cytosolic loops of bovine rhodopsin during the transition to metarhodopsin-II: an investigation by Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 56, 57-62
- Gavériaux-Ruff, C. and Kieffer, B.L. (2011) Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav. Pharmacol.* 22, 405-414
- Geng, Y., Bush, M., Mosyak, L., Wang, F. and Fan, Q.R. (2013) Structural mechanism of ligand activation in human GABA(B) receptor. *Nature* 504, 254-259
- Gershengorn, M.C. (1986) Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 515-526
- Gershengorn, M.C. and Osman, R. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol. Rev.* 76, 175-191
- Ghahremani, M.H., Cheng, P., Lembo, P.M. and Albert, P.R. (1999) Distinct roles for Galphai2, Galphai3, and Gbeta gamma in modulation of forskolin- or Gs-mediated cAMP accumulation and calcium mobilization by dopamine D2S receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 9238-9245
- Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649
- Gimpl, G. and Gehrig-Burger, K. (2011) Probes for studying cholesterol binding and cell biology. *Steroids* 76, 216-231

- Gimpl, G., Burger, K. and Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36, 10959-10974
- Gimpl, G., Burger, K., Politowska, E., Ciarkowski, J. and Fahrenholz, F. (2000) Oxytocin receptors and cholesterol: interaction and regulation. *Exp. Physiol.* 85 Spec No, 41S-49S
- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Weis, W.I. and Kobilka, B.K. (2012) Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485, 400-404
- Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M. and Chini, B. (2002) Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene* 21, 1658-1667
- Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., Kobilka, B.K., Haga, T. and Kobayashi, T. (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482, 547-551
- Hansen, C.G. and Nichols, B.J. (2010) Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 20, 177-186
- Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., Sanna, M.G., Han, G.W., Kuhn, P., Rosen, H. and Stevens, R.C. (2012) Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 335, 851-855
- Harden, T.K., Cotton, C.U., Waldo, G.L., Lutton, J.K. and Perkins, J.P. (1980) Catecholamine-induced alteration in sedimentation behavior of membrane bound beta-adrenergic receptors. *Science* 210, 441-443
- Harder, T. and Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542
- Head, B.P., Patel, H.H. and Insel, P.A. (2014) Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838, 532-545
- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 258-262
- Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R.K., Doré, A.S., Jazayeri, A., Cooke, R.M., Weir, M. and Marshall, F.H. (2013) Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* 499, 438-443
- Hollinger, S. and Hepler, J.R. (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* 54, 527-559
- Huang, P., Xu, W., Yoon, S.I., Chen, C., Chong, P.L. and Liu-Chen, L.Y. (2007) Cholesterol reduction by methyl- β -cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.* 73, 534-549
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. and Moriss, H.R., (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577-580
- Chapman, D. (1983) Biomembrane fluidity: The concept and its development. In: *Membrane Fluidity in Biology*, Vol. 2), Academic Press Inc., New York, pp. 5-42.
- Chattopadhyay, A. and London, E. (1987) Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry* 26, 39-45

- Chattopadhyay, A. and London, E. (1988) Spectroscopic and ionization properties of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-Yl)-labeled lipids in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 938, 24-34
- Chauhan, N.B. (2003) Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 44, 2019-2029
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J. and Yu, L. (1993b) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem. J.* 295, 625-628
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A. and Yu, L. (1993a) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8-12
- Chien, E.Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G.W., Hanson, M.A., Shi, L., Newman, A.H., Javitch, J.A., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 330, 1091-1095
- Chini, B. and Parenti, M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J. Mol. Endocrinol.* 32, 325-338
- Chini, B. and Parenti, M. (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 371-379
- Choe, H.W., Kim, Y.J., Park, J.H., Morizumi, T., Pai, E.F., Krauss, N., Hofmann, K.P., Scheerer, P. and Ernst, O.P. (2011) Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471, 651-655
- Chuang, D.M. and Costa, E. (1979) Evidence for internalization of the recognition site of beta-adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (-)-isoproterenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76, 3024-3028
- Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 255-258
- Inglese, J., Koch, W.J., Touhara, K. and Lefkowitz, R.J. (1995) G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 20, 151-156
- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P. and Stevens, R.C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211-1217
- Jameson, D.M. and Ross, J.A. (2010) Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chem. Rev.* 110, 2685-2708
- Janecka, A., Fichna, J. and Janecki, T. (2004) Opioid receptors and their ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1-17
- Javitch, J.A. (2004) The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 66, 1077-1082
- Ji, T.H., Grossmann, M. and Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 17299-17302
- Jordan, B.A. and Devi, L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700
- Josefsson, L.G. (1999) Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* 239, 333-340
- Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L. and Ley, S.C. (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30, 954-963
- Kapitzke, D., Vetter, I. and Cabot, P.J. (2005) Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 1, 279-297

- Kates, M. and Kuksis, A. (1980) Membrane Fluidity, Biophysical Techniques and Cellular Regulation, Kates, M. and Kuksis, A. (eds.), The Humana Press Inc.
- Katritch, V., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 531-556
- Katz, A., Wu, D. and Simon, M.I. (1992) Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686-689
- Kawato, S., Kinosita, K. Jr. and Ikegami, A. (1977) Dynamic structure of lipid bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques. *Biochemistry* 16, 2319-2324
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. and Satoh, T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 349-400
- Keith, D.E., Murray, S.R., Zaki, P.A., Chu, P.C., Lissin, D.V., Kang, L., Evans, C.J. and von Zastrow, M. (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J. Biol. Chem.* 271, 19021-19024
- Kelly, E., Bailey, C.P. and Henderson, G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* 153, S379-S388
- Kieffer, B.L. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 19-26
- Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. and Hirth, C.G. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89, 12048-12052
- Kimelberg, H.K. (1977) The influence of membrane fluidity on activity of membrane-bound enzymes. In: *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization*, Poste, G. and Nicholson, G.L. (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press
- Kinosita, K. Jr. and Ikegami, A. (1988) Dynamic structure of membranes and subcellular components revealed by optical anisotropy decay methods. *Subcell. Biochem.* 13, 55-88
- Kinosita, K. Jr., Ikegami, A. and Kawato, S. (1982) On the wobbling-in-cone analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biophys. J.* 37, 461-464
- Klee, W.A. and Nirenberg, M. (1974) A neuroblastoma × glioma hybrid cell line with morphine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 71, 3474-3477
- Klein, U. and Fahrenholz, F. (1994) Reconstitution of the myometrial oxytocin receptor into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol. *Eur. J. Biochem.* 220, 559-567
- Klein, U., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34, 13784-13793
- Ko, J.L., Arvidsson, U., Williams, F.G., Law, P.Y., Elde, R., and Loh, H.H. (1999) Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 69, 171-185
- Kobilka, B. (2013) The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 6380-6388
- Kobilka, B. and Schertler, G.F. (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 79-83
- Kolakowski, L.F. Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1-7
- Koski, G. and Klee, W.A. (1981) Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78, 4185-4189
- Kruse, A.C., Hu, J., Pan, A.C., Arlow, D.H., Rosenbaum, D.M., Rosemond, E., Green, H.F., Liu, T., Chae, P.S., Dror, R.O., Shaw, D.E., Weis, W.I., Wess, J. and Kobilka,

B.K. (2012) Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482, 552-556

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H. and Morikawa, K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977

Lagerholm, B.C., Weinreb, G.E., Jacobson, K. and Thompson, N.L. (2005) Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56, 309-336

Lamaze, C. and Schmid, S.L. (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 573-580

Laroche, G., Lépine, M.C., Thériault, C., Giguère, P., Giguère, V., Gallant, M.A., de Brum-Fernandes, A. and Parent, J.L. (2005) Oligomerization of the alpha and beta isoforms of the thromboxane A2 receptor: relevance to receptor signaling and endocytosis. *Cell. Signal.* 17, 1373-1383

Lasley, R.D. and Smart, E.J. (2001) Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. *Trends Cardiovasc. Med.* 11, 259-263

Lasley, R.D., Narayan, P., Uittenbogaard, A. and Smart, E.J. (2000) Activated cardiac adenosine A1 receptors translocate out of caveolae. *J. Biol. Chem.* 275, 4417-4421

Law, P.Y., Erickson-Herbrandson, L.J., Zha, Q., Q., Solberg, J., Chu, J., Sarre, A. and Loh, H.H. (2005) Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J. Biol. Chem.* 280, 11152-11164

Lebon, G., Warne, T., Edwards, P.C., Bennett, K., Langmead, C.J., Leslie, A.G. and Tate, C.G. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 474, 521-525

Lefkowitz, R.J. (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 413-422

Lefkowitz, R.J. and Shenoy, S.K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517

Lentz, B.R. (1993) Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 64, 99-116

Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J.E., Hansen, S.H., Nishimoto, I. and Lisanti, M.P. (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270, 15693-15701

Lisanti, M.P. (1994) Reply. *Trends Cell Biol.* 4, 354

Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, .F, Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., IJzerman, A.P., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* 337, 232-236

Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J. and Clapham, D.E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321-326

Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1990b) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550

London, E. and Brown, D.A. (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 182-195

Lord, J.A., Waterfield, A.A., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499

Loura, L.M.S. and Ramalho, J.P.P. (2011) Recent developments in molecular dynamics simulations of fluorescent membrane probes. *Molecules* 16, 5437-5452

- Loura, L.M.S., Fedorov, A and Prieto, M. (2001) Exclusion of a cholesterol analog from the cholesterol-rich phase in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1511, 236-243
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Manglik, A., Kruse1, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K. and Granier, S. (2012) Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485, 321-326
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H. and Watson, S.J. (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7, 2445-2464
- Marrari, Y., Crouthamel, M., Irannejad, R. and Wedegaertner, P.B. (2007) Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* 46,7665-7677
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E. and Gilbert, P.E. (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517-532
- Maurer, R. (1982) Multiplicity of opiate receptors in different species. *Neurosci. Lett.* 30, 303-307
- Maxfield, F.R. (2002) Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 483-487
- Maxfield, F.R. and van Meer, G. (2010) Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 422-429
- Maxfield, F.R. and Wüstner, D. (2002) Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* 110, 891-898
- McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A.J. and Milligan, G. (2001) Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta-opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J. Biol. Chem.* 276, 14092-14099
- Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M. and Costentin, J. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532-535
- Milligan, G., Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* 147, S46-55
- Minami, M., Toya, T., Katao, Y., Maekawa, K., Nakamura, S., Onogi, T., Kaneko, S. and Satoh, M. (1993) Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett.* 329, 291-295
- Miserey-Lenkei, S., Lenkei, Z., Parnot, C., Corvol, P. and Clauser, E. (2001) A functional enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged angiotensin II at(1a) receptor recruits the endogenous Galphaq/11 protein to the membrane and induces its specific internalization independently of receptor-g protein coupling in HEK-293 cells. *Mol. Endocrinol.* 15, 294-307
- Moffett, S., Brown, D.A. and Linder, M.E. (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 2191-2198
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G. and Meunier, J.C. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341, 33-38

- Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Buergi, S. and Draeger, A. (2005) The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J. Biol. Chem.* 280, 7135-7146
- Moon, H.E., Bahia, D.S., Cavalli, A., Hoffmann, M. and Milligan, G. (2001a) Control of the efficiency of agonist-induced information transfer and stability of the ternary complex containing the delta opioid receptor and the alpha subunit of G(i1) by mutation of a receptor/G protein contact interface. *Neuropharmacology* 41, 321-330
- Moon, H.E., Cavalli, A., Bahia, D.S., Hoffmann, M., Massotte, D. and Milligan, G. (2001b) The human delta opioid receptor activates G(i1)alpha more efficiently than G(o1)alpha. *J. Neurochem.* 76, 1805-1813
- Muntz, K.H. (1994) Beta-ARs in caveolae? *Trends Cell Biol.* 4, 354
- Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K. and Jingami, H. (2007) Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104, 3759-3764
- Nicolau, C. and Chapman, D. (1990) *Horizons in Membrane Biotechnology*, Nicolau, C. and Chapman, D. (eds.), Wiley-Liss Inc.
- Novotný, J., Krůšek, J., Drmota, T. and Svoboda, P. (1999) Overexpression of the G protein G11alpha prevents desensitization of Ca²⁺ response to thyrotropin-releasing hormone. *Life Sci.* 65, 889-900
- O'Brien, P.J. and Zatz, M. (1984) Acylation of bovine rhodopsin by [3H]palmitic acid. *J. Biol. Chem.* 259, 5054-5057
- Oh, P. and Schnitzer, J.E. (2001) Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains: G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default, *Mol. Biol. Cell* 12, 685-698
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäk, P. and Slotte, J.P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41, 66-97
- Okada, T., Le Trong, I., Fox, B.A., Behnke, C.A., Stenkamp, R.E. and Palczewski, K. (2000) X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J. Struct. Biol.* 130, 73-80
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 5419-5422
- Oldham, W.M. and Hamm, H.E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 60-71
- Orth, J.H., Preuss, I., Fester, I., Schlosser, A., Wilson, B.A. and Aktories, K. (2009) Pasteurella multocida toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 7179-7184
- Ostašov, P., Bouřová, L., Hejnová, L., Novotný, J. and Svoboda, P. (2007) Disruption of the plasma membrane integrity by cholesterol depletion impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G(q)/G(11)alpha proteins. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 27, 335-352
- Ostašov, P., Krůšek, J., Durchánková, D., Svoboda, P. and Novotný, J. (2008) Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G11alpha protein overexpression on homologous and heterologous desensitization. *Cell Biochem. Funct.* 26, 264-274
- Ostašov, P., Sýkora, J., Brejchová, J., Olzysná, 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

- Ostrom, R.S. and Insel, P.A. (2004) The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 143, 235-245
- Ostrom, R.S., Gregorian, C., Drenan, R.M., Xiang, Y., Regan, J.W. and Insel, P.A. (2001) Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 276, 42063-42069
- Ostrom, R.S., Post, S.R. and Insel, P.A. (2000) Stoichiometry and compartmentation in G protein-coupled receptor signaling: implications for therapeutic interventions involving G(s). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 407-412
- Ovchinnikov, Yu.A., Abdulaev, N.G. and Bogachuk, A.S. (1988) Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett.* 230, 1-5
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745
- Pan, Y.Z., Li, D.P., Chen, S.R. and Pan, H.L. (2004) Activation of mu-opioid receptors excites a population of locus coeruleus-spinal neurons through presynaptic disinhibition. *Brain Res.* 997,67-78
- Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A. and Gratton, E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 57, 1179-1186
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M. and Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 60, 179-189
- Parent, J.L., Labrecque, P., Orsini, M.J. and Benovic, J.L. (1999) Internalization of the TXA₂ receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 274, 8941-8948
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M. and Opella, S.J. (2012) Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* 491, 779-783
- Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M. and Hancock, J.F. (2006) Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* 119, 787-796
- Pasternak, G.W. (1993) Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin. Neuropharmacol.* 16, 1-18
- Pasternak, G.W. (2001) Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci.* 68, 2213-2219
- Patel, H.H., Head, B.P., Petersen, H.N., Niesman, I.R., Huang, D., Gross, G.J., Insel, P.A. and Roth, D.M. (2006) Protection of adult rat cardiac myocytes from ischemic cell death: role of caveolar microdomains and delta-opioid receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H344-350
- Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3, 311-320
- Perez, D.M. (2003) The evolutionarily triumphant G-protein-coupled receptor. *Mol. Pharmacol.* 63, 1202-1205
- Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014
- Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1974) Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Mol. Pharmacol.* 10, 868-879
- Pešánová, Z., Novotný, J., Černý, 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

- Pfeiffer, A., Pasi, A., Mehraein, P. and Herz, A. (1982) Opiate receptor binding sites in human brain. *Brain Res.* 248, 87-96
- Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 378, 281-292
- Pike, L.J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47, 1597-1598
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J. and Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653-692
- Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257, 1264-1267
- Poole, D.P., Pelayo, J.C., Scherrer, G., Evans, C.J., Kieffer, B.L. and Bunnett, N.W. (2011) Localization and regulation of fluorescently labeled delta opioid receptor, expressed in enteric neurons of mice. *Gastroenterology* 141, 982-991
- Portoghese, P.S. (1965) A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J. Med. Chem.* 8, 609-616
- Poste, G. and Nicholson, G.L. (1977) *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization*, Poste, G. and Nicholson, G.L. (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press
- Prendergast, C., Quayle, J., Burdyga, T. and Wray, S. (2010) Cholesterol depletion alters coronary artery myocyte Ca(2+) signaling in a stimulus-specific manner. *Cell Calcium* 47, 84-91
- Pucadyil, T.J. and Chattopadhyay, A. (2006) Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog. Lipid Res.* 45, 295-333
- Quinton, T.M., Kim, S., Jin, J. and Kunapuli, S.P. (2005) Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y12 receptor during ADP-mediated platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1036-1041
- Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S. and Milligan, G. (2002) Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem. J.* 365, 429-440
- Raposo, G. and Benedetti, E.L. (1994) Are beta-ARs internalized via caveolae or coated pits? *Trends Cell Biol.* 4, 418
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K. and Kobilka, B.K. (2011b) Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., DeVree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R.K., Gellman, S.H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W.I. and Kobilka, B.K. (2011a) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β (2) adrenoceptor. *Nature* 469, 175-180
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I. and Kobilka, B.K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387

- Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J. and Civelli, O. (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270, 792-794
- Remmers, A.E., Clark, M.J., Alt, A., Medzihradsky, F., Woods, J.H. and Traynor, J.R. (2000) Activation of G protein by opioid receptors: role of receptor number and G-protein concentration. *Eur. J. Pharmacol.* 396, 67-75
- Reuveny, E., Slesinger, P.A., Inglese, J., Morales, J.M., Iniguez-Lluhi, J.A., Lefkowitz, R.J., Bourne, H.R., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1994) Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* 370, 143-146
- Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B. and Sandvig, K. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10, 961-974
- Rodbell, M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17-22
- Rosenbaum, D.M., Zhang, C., Lyons, J.A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Devree, B.T., Sunahara, R.K., Chae, P.S., Gellman, S.H., Dror, R.O., Shaw, D.E., Weis, W.I., Caffrey, M., Gmeiner, P. and Kobilka, B.K. (2011) Structure and function of an irreversible agonist-beta2adrenoceptor complex. *Nature* 469, 236-240
- Ross, E.M. and Wilkie, T.M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 795-827
- Roth, B.L., Laskowski, M.B. and Coscia, C.J. (1981) Evidence for distinct subcellular sites of opiate receptors. Demonstration of opiate receptors in smooth microsomal fractions isolated from rat brain. *J. Biol. Chem.* 256, 10117-10123
- Rothfield, L. (1971) *Structure and Function of Biological Membranes*, Rothfield, L. (ed), Academic Press Inc.
- Rudajev, V., Novotný, J., Hejnová, L., Milligan, G. and Svoboda, P. (2005) Dominant portion of thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and Gqalpha/G11alpha protein. *J. Biochem.* 138, 111-125
- Rybin, V.O., Pak, E., Alcott, S. and Steinberg, S.F. (2003) Developmental changes in beta2-adrenergic receptor signaling in ventricular myocytes: the role of Gi proteins and caveolae microdomains. *Mol. Pharmacol.* 63, 1338-1348
- Rybin, V.O., Xu, X., Lisanti, M.P. and Steinberg, S.F. (2000) Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 41447-41457
- Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D.R. and Marceau, F. (2002) Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol. Pharmacol.* 61, 546-553
- Sadana, R. and Dessauer, C.W. (2009) Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals* 17,5-22
- Salamon, Z., Cowell, S., Varga, E., Yamamura, H.I., Hruby, V.J. and Tollin, G. (2000) Plasmon resonance studies of agonist/antagonist binding to the human delta-opioid receptor: new structural insights into receptor-ligand interactions. *Biophys. J.* 79 2463-2474

- Sharif, N.A. and Hughes, J. (1989) Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides* 10, 499-522
- Sharma, S.K., Klee, W.A. and Nirenberg, M. (1975b) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 72, 3092-3096
- Sharma, S.K., Nirenberg, M. and Klee, W.A. (1975a) Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 72, 590-594
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., Kobayashi, T., Stevens, R.C. and Iwata, S. (2011) Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 475, 65-70
- Shinitzky, M. (1984) Membrane fluidity and cellular functions. In: *Physiology of Membrane Fluidity, Volume I*, Shinitzky, M. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp.1-51
- Shinitzky, M. (1984) *Physiology of Membrane Fluidity, Volumes I and II*, Shinitzky, M. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P. and Ernst, O.P. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497-502
- Schwencke, C., Okumura, S., Yamamoto, M., Geng, Y.J. and Ishikawa, Y. (1999) Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J. Cell. Biochem.* 75, 64-72
- Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, I. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [3H] etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 70, 1947-1949
- Simons, K and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572
- Singer, S.J. and Nicholson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731
- Siu, F.Y., He, M., de Graaf, C., Han, G.W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J.S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M.W. and Stevens, R.C. (2013) Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*. 499, 444-449
- Skibbens, J.E., Roth, M.G. and Matlin, K.S. (1989) Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J. Cell Biol.* 108, 821-832
- Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T. and Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7289-7304
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C. and Anderson, R.G.W. (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10104-10108
- Sobczak, M., Sałaga, M., Storr, M.A. and Fichna, J. (2014) Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *J. Gastroenterol.* 49, 24-45
- Soccio, R.E. and Breslow, J.L. (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1150-1160

- Somsel Rodman, J. and Wandinger-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* 113, 183-192
- Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M. and Lisanti, M.P. (1996a) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 271, 9690-9697
- Song, K.S., Scherer, P.E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D.S. and Lisanti, M.P. (1996b) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 15160-15165
- Soumpasis, D. M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* 41, 95-97
- Spain, J.W., Roth, B.L. and Coscia, J. (1985) Differential ontogeny of multiple opioid receptor sites (μ , δ and κ). *J. Neurosci.* 5, 584-588
- Standfuss, J. Edwards, P.C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D.D. and Schertler, G.F. (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* 471, 656-660
- Steinberg, S.F. and Brunton, L.L. (2001) Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 751-773
- Stenmark, H. and Olkkonen, V.M. (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2, REVIEWS3007
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F.T., Jackson, T.R., Sternweis, P.C. and Hawkins, P.T. (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* 77, 83-93
- Sternweis, P.C. (1994) The active role of beta gamma in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 198-203
- Strasser, R.H., Sibley, D.R. and Lefkowitz, R.J. (1986) A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry* 25, 1371-1377
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H. and McGraw, T.E. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 96, 6775-6780
- Svoboda P., Amler E. and Teisinger J. (1988) Different sensitivity of ATP+Mg+Na (I) and Pi+Mg (II) dependent types of ouabain binding to phospholipase A2. *J. Membrane Biol.* 104, 211-221
- Svoboda, P. and Novotny, J. (2002) Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 501-512
- Svoboda, P., Kim, G.D., Grassie, M.A., Eidne K.A. and Milligan G. (1996) Thyrotropin-releasing hormone-induced subcellular redistribution and down-regulation of G11alpha: analysis of agonist regulation of coexpressed G11alpha species variants. *Mol. Pharmacol.* 49, 646-55
- Sýkora, J., Bouřová, L., Hof, M. and Svoboda, P. (2009) The effect of detergents on trimeric G-protein activity in isolated plasma membranes from rat brain cortex: correlation with studies of DPH and Laurdan fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 324-332
- Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 254, 1500-1503

Tang, X. and Downes, C.P. (1997) Purification and characterization of Gbetagamma-responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol. *J. Biol. Chem.* 272, 14193-14199

Tempel, A. and Zukin, R.S. (1987) Neuroanatomical patterns of the μ , δ and κ opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 4308-4312

Terenius, L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32, 317-319

Thompson, A.A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., Huang, X.P., Trapella, C., Guerrini, R., Calo, G., Roth, B.L., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2012) Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 485, 395-399

Trapaidze, N., Keith, D.E., Cvejic, S., Evans, C.J. and Devi, L.A. (1996) Sequestration of the δ opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* 271, 29279-29285

Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H. and Morikawa, K. (2002) Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd³⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 2660-2665

Van Blitterswijk, W.J., Van Hoeven., R.P. and Van der Meer, B.W. (1981) Lipid structural order parameter (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 644, 323-332

Vaughan, C.W., Ingram, S.L., Connor, M.A. and Christie, M.J. (1997) How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 390, 611-614

Velázquez, J.B. and Fernández, M.S. (2006) GPS, the slope of Laurdan generalized polarization spectra, in the study of phospholipid lateral organization and Escherichia coli lipid phases. *Arch. Biochem. Biophys.* 455, 163-174

Venkatakrishnan A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F. and Babu, M.M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194

von Zastrow, M. and Kobilka, B.K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* 267, 3530-3538

von Zastrow, M. and Kobilka, B.K. (1994) Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 269, 18448-18452

Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.P., Vardy, E., McCorvy, J.D., Jiang, Y., Chu, M., Siu, F.Y., Liu, W., Xu, H.E., Cherezov, V., Roth, B.L. and Stevens, R.C. (2013) Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* 340, 615-619

Waldhoer, M., Bartlett, S.E. and Whistler, J.L. (2004) Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953-990

Wallach, D.F.H. and Schmidt-Ullrich, R. (1975) Membrane Molecular Biology of Neoplastic Cells, Wallach, D.F.H. (ed.), Elsevier Scientific Pub. Co.

Wang, C., Jiang, Y., Ma, J., Wu, H., Wacker, D., Katritch, V., Han, G.W., Liu, W., Huang, X.P., Vardy, E., McCorvy, J.D., Gao, X., Zhou, X.E., Melcher, K., Zhang, C., Bai, F., Yang, H., Yang, L., Jiang, H., Roth, B.L., Cherezov, V., Stevens, R.C. and Xu, H.E. (2013) Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* 340, 610-614

- Wang, J.B., Johnson, P.S., Imai, Y., Persico, A.M., Ozenberger, B.A., Eppler, C.M. and Uhl, G.R. (1994) cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* 348, 75-79
- Warne, T., Edwards, P.C., Leslie, A.G. and Tate, C.G. (2012) Crystal structures of a stabilized β_1 -adrenoceptor bound to the biased agonists bucindolol and carvedilol. *Structure* 20, 841-849
- Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J.G., Nehmé, R., Edwards, P.C., Leslie, A.G., Schertler, G.F. and Tate, C.G. (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a β_1 -adrenergic receptor. *Nature* 469, 241-244
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G. and Schertler, G.F. (2008) Structure of a β_1 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491
- Wedegaertner, P.B., Bourne, H.R. and von Zastrow, M. (1996) Activation-induced subcellular redistribution of Gs α . *Mol. Biol. Cell.* 7, 1225-1233
- Wennerberg, K., Rossmann, K.L. and Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 843-846
- Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* 85, 1159-1204
- White, J.F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C.G. and Grisshammer, R. (2012) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490, 508-513
- Williams, T.M. and Lisanti, M.P. (2004) The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann. Med.* 36,584-595
- Wolfe, B.L. and Trejo, J. (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8, 462-470
- Worzfeld, T., Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2008) G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 582-589
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 330, 1066-1071
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G.W., Vardy, E., Liu, W., Thompson, A.A., Huang, X.P., Carroll, F.I., Mascarella, W.S., Westkaemper, R.B., Mosier, P.D., Roth, B.L., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2012) Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485, 327-332
- Wüstner, D. (2007) Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids* 146, 1-25
- Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Jacobson, K.A., Gao, Z.G., Cherezov, V. and Stevens, R.C. (2011) Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* 332, 322-327
- Xu, X. and London, E. (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* 39, 843-849
- Yeagle, P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267-287
- Yeagle, P.L. (1992) The Dynamics of Membrane Lipids. In: *The Structure of Biological Membranes*, Yeagle, P.L. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 157-174

Zackon, F. (1988) Heroin, the Street Narcotic. In: The Encyclopedia of Psychoactive Drugs, Snyder, S.H. and Lader, M.H. (eds.), Burke Publishing Company Limited, pp. 6, 23.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J. and Kastin, A.J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502

Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D.H., Fung, J.J., Palmer, D., Zheng, Y., Green, H.F., Pandey, A., Dror, R.O., Shaw, D.E., Weis, W.I., Coughlin, S.R. and Kobilka, B.K. (2012) High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 492, 387-392

Zhu, Y., King, M.A., Schuller, A.G., Nitsche, J.F., Reidl, M., Elde, R.P., Unterwald, E., Pasternak, G.W. and Pintar, J.E. (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* 24, 243-252

Zywietz, A., Gohla, A., Schmelz, M., Schultz, G. and Offermanns, S. (2001) Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. involvement of Gq but not G11. *J. Biol. Chem.* 276, 3840-3845

PŘÍLOHY

Příloha 1 - *Publikace I*

Příloha 2 - *Publikace II*

Příloha 3 - Manuskript