

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Ladislav Merta**

**Organizace a mobilita receptorů spřažených s G proteiny v plasmatické  
membráně**

**Organization and mobility of G protein-coupled receptors in plasma  
membrane**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:  
doc. RNDr. Petr Svoboda DrSc.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2.5.2014

Podpis .....

Ladislav Merta

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení, cenné rady, pracovní prostor a ochotnou pomoc při práci na Oddělení biochemie membránových receptorů Fyziologického ústavu AV ČR.

Dále děkuji Mgr. Janě Brejchové, RNDr. Lence Roubalové, Ph.D., Mgr. Janu Sýkorovi, Ph.D. a prof. Martinu Hofovi, DSc. za ochotnou pomoc při realizaci praktické části této diplomové práce. Rovněž děkuji celému kolektivu Oddělení biochemie membránových receptorů FgÚ AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za materiální i duševní podporu během mého studia na Přírodovědecké fakultě UK.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá analýzou membránové organizace receptoru pro tyreoliberin (TRH-R) a  $\delta$ -opioidního receptoru (DOR) ve vztahu k membránovým doménám, neboli membránovým raftům. Pro tyto účely jsou využity moderní techniky fluorescenční mikroskopie FLIM, FRAP a RICS. Jedná se o studii na živých buňkách odvozených od buněčné linie HEK293. K výzkumu membránových domén je využívána deplece cholesterolu z plasmatické membrány pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu. Práce ukazuje, že naprostá většina TRH-R je v plasmatické membráně lokalizována mimo membránové rafty. Práce rovněž porovnává různé módy měření metodou FRAP a srovnává výsledky získané metodou FRAP s výsledky získanými metodou RICS, protože oba přístupy jsou do jisté míry analogické. Jedná se o jednu z prvních prací, která charakterizuje mobilitu receptorů spřažených s G proteiny v plasmatické membráně s použitím metody RICS. Ve druhé části práce byl vypracován postup pro transientní transfekci buněk HEK293 konstrukty DOR-ECFP a DOR-EYFP a současně byla ověřována funkčnost těchto fúzních bílkovin, tedy jejich schopnost aktivovat příslušný G protein.

**Klíčová slova:** receptor pro tyreoliberin,  $\delta$ -opioidní receptor, GFP, YFP, CFP, FRAP, RICS, FLIM, membránové domény, transfekce

## **Abstract**

This diploma thesis deals with the analysis of structural and dynamic organization of thyrotropin-releasing hormone receptor (TRH-R) and  $\delta$ -opioid receptor (DOR) within plasma membrane (PM) in relation to the specific sub-compartments of PM denominated as domains or membrane rafts. Modern fluorescence microscopy techniques FLIM, FRAP and RICS were used for this purpose. The experiments were performed on the live cells derived from HEK293 cell line. To reach the main goal of this work, the integrity of PM structure was altered by depletion of cholesterol which was performed by incubation of cells with  $\beta$ -cyclodextrin. Results clearly support our previously suggested idea that the vast majority of TRH-R is localized in non-raft regions of plasma membrane. This work also compared different modes of performance of FRAP and results obtained by FRAP and RICS because these methods are to some extent analogous. This is one of the first works that used the RICS approach to characterize the G protein-coupled receptors. In the second part of this work, the setup of transient transfection of the HEK293 cells with DOR-ECFP and DOR-EYFP constructs was established. Simultaneously, the functionality of these constructs, i.e. the ability of DOR to activate the cognate G protein was determined.

**Key words:** thyrotropin-releasing hormone receptor,  $\delta$ -opioid receptor, GFP, CFP, YFP, FRAP, RICS, FLIM, membrane domains, transfection

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Úvod</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>15</b>
3.1. Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) .....	15
3.1.1. Úvod.....	15
3.1.2. Struktura.....	15
3.1.3. Rodiny GPCR .....	16
3.1.4. Ligandy.....	17
3.1.5. Model signalizace GPCR prostřednictvím trimerních G proteinů .....	18
3.1.6. Negativní regulace signalizace GPCR .....	19
3.1.7. Alternativní signalační dráhy receptorů spřažených s G proteiny .....	20
3.1.8. Oligomerizace GPCR.....	21
3.2. Receptory pro tyreoliberin (TRH-R) .....	23
3.2.1. Úvod.....	23
3.2.2. Struktura a signalizace TRH-R.....	23
3.2.3. Distribuce TRH receptorů v organismu .....	25
3.2.4. Fyziologické akce TRH.....	25
3.3. $\delta$ -opioidní receptor .....	27
3.3.1. Opioidy a opioidní receptory .....	27
3.3.2. Struktura a signalizace opioidních receptorů .....	27
3.3.3. Distribuce DOR v organismu .....	29
3.3.4. Fyziologické účinky DOR.....	29
3.4. Plasmatická membrána .....	31
3.4.1. Úvod.....	31
3.4.2. Základní složky membrán .....	32
3.4.3. Membránové domény.....	34
3.4.4. Modulace obsahu membránového cholesterolu pomocí cyklodextrinové deplece.....	42
3.5. Úloha membránových raftů v signalizaci GPCR .....	43
3.5.1. Úvod.....	43
3.5.2. Kompartmentalizace jednotlivých proteinů signalační kaskády GPCR .....	43
3.5.3. Dynamické změny raftové / neraftové lokalizace GPCR.....	44
3.5.4. Význam membránových raftů v signalizaci GPCR.....	44

3.6. Vybrané fluorescenční techniky zkoumající dynamiku proteinů.....	46
3.6.1. Fluorescence .....	46
3.6.2. Zelený fluorescenční protein (GFP).....	47
3.6.3. FRAP ( <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> ; „Obnovení fluorescence po foto-vybělení“) .....	49
3.6.4. RICS ( <i>Raster Image Correlation Spectroscopy</i> ; „Korelační spektroskopie rastrových obrázků“).....	51
<b>4. Cíle diplomové práce.....</b>	<b>55</b>
<b>5. Materiál a metody .....</b>	<b>56</b>
5.1. Chemikálie a speciální vybavení.....	56
5.2. Kultivace buněčných linií .....	57
5.2.1. Buněčné linie .....	57
5.2.2. Podmínky kultivace.....	58
5.2.3. Pasážování .....	58
5.2.4. Sklizení buněk .....	58
5.2.5. Příprava buněčných preparátů pro experimenty .....	59
5.2.6. Fixace buněk.....	60
5.3. Deplece cholesterolu.....	61
5.4. FLIM.....	61
5.5. FRAP .....	62
5.5.1. Snímání obrázků .....	62
5.5.2. Analýza dat.....	63
5.6. RICS .....	65
5.7. Pozorování fixovaných buněk na konfokálním mikroskopu .....	66
5.8. Transfekce buněčných linií .....	67
5.8.1. Plasmidy .....	67
5.8.2. Pomnožení a izolace plasmidů.....	67
5.8.3. Transfekce .....	68
5.9. Vazba [ <sup>35</sup> S]GTPγS a imunoprecipitace .....	70
5.9.1. Použité pufrы.....	70
5.9.2. Homogenizace sklizených buněk.....	70
5.9.3. Stanovení koncentrace proteinů.....	70
5.9.4. Vazba [ <sup>35</sup> S]GTPγS a imunoprecipitace.....	70
<b>6. Výsledky .....</b>	<b>72</b>
6.1. VTGP buňky .....	72

6.1.1.	VTGP buňky v konfokálním mikroskopu.....	72
6.1.2.	Vliv deplece cholesterolu na dobu života ( <i>lifetime</i> ) EGFP fúzně připojeného k TRH-R.....	72
6.1.3.	Vliv deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R-EGFP v plasmatické membráně.....	74
6.1.4.	Metodické aspekty měření mobility konstruktu TRH-R-EGFP metodami FRAP a RICS.....	80
6.2.	Transientně transfekované buňky HEK293 .....	83
6.2.1.	Stanovení vhodné délky kultivace po transientní transfekci.....	83
6.2.2.	Transientní kotransfekce buněk HEK293 konstruktů DOR-ECFP a DOR-EYFP.....	84
6.2.3.	Ověření funkčnosti konstruktů DOR-ECFP a DOR-EYFP .....	85
6.2.4.	Doba života excitovaného stavu ECFP a EYFP ve fúzních bílkovinách DOR-ECFP a DOR-EYFP .....	88
6.2.5.	Stanovení mobility DOR-EYFP v plasmatické membráně pomocí metody RICS.....	89
<b>7.</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>90</b>
7.1.	Výsledky získané na VTGP buňkách .....	90
7.2.	Metodické aspekty měření metodami FRAP a RICS .....	94
7.3.	Experimenty na transientně transfekovaných buňkách HEK293.....	97
<b>8.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>100</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>101</b>
<b>10.</b>	<b>Elektronické zdroje .....</b>	<b>114</b>



## 1. Seznam použitých zkratek

<b>[<sup>35</sup>S]GTP<math>\gamma</math>S</b>	Guanosin 5'-( $\gamma$ -thio)trifosfát značený radioaktivní sírou [ <sup>35</sup> S]
<b>5-HT<sub>1A</sub>R</b>	5-Hydroxytryptamine 1A Receptor (serotoninový receptor typu 1A)
<b>7TM</b>	Seven-TransMembrane (sedmkrát procházející membránou)
<b>Å</b>	Ångström (jednotka délky; 10 <sup>-10</sup> metru)
<b>A<sub>1</sub>R</b>	Adenosinový receptor typu 1
<b>A<sub>2A</sub>R</b>	Adenosinový receptor typu 2A
<b>Arg</b>	Arginin
<b>AT<sub>1A</sub>R</b>	Angiotensinový receptor typu 1A
<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate (adenosin trifosfát)
<b>B<sub>2</sub>R</b>	Bradykinin B <sub>2</sub> Receptor (bradykininový receptor typu 2)
<b>BFP</b>	Blue Fluorescent Protein (modrý fluorescenční protein)
<b>BRET</b>	Bioluminescence Resonance Energy Transfer (bioluminiscenční rezonanční energetický přenos)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin (hovězí sérový albumin)
<b>cAMP</b>	Cyklický 3',5'-adenosin monofosfát
<b>CAV1</b>	Kaveolin 1
<b>CAV2</b>	Kaveolin 2
<b>CAV3</b>	Kaveolin 3
<b>CB</b>	Celá buňka
<b>CDX</b>	Buňky inkubované před pokusy s 10 mM $\beta$ -CDX
<b>CFP</b>	Cyan Fluorescent Protein (modro-zelený fluorescenční protein)
<b>CLSM</b>	Confocal Laser Scanning Microscopy (konfokální laserová skenovací mikroskopie)
<b>COS-7</b>	Buněčná linie odvozená od ledvinové tkáně opic
<b>c-Src</b>	Varianta Src obsahující v kinázové doméně tyrosin
<b>D</b>	Difuzní koeficient
<b>DADLE</b>	Syntetický agonista DOR (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu)
<b>DAG</b>	1,2-diacylglycerol
<b>DHSM</b>	Dihydrosfingomyelin
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>DOR</b>	$\delta$ -Opioid Receptor ( $\delta$ -opioidní receptor)
<b>DOR-G<sub>i</sub></b>	Buněčná linie HEK293 stabilně exprimující DOR s fúzně připojenou G $\alpha_i$ podjednotkou

<b>dpm</b>	Disintegration per minute (počet radioaktivních rozpadů za minutu)
<b>DRM</b>	Detergent-rezistentní membránové domény
<b>D<sub>zd</sub></b>	Zdánlivý difuzní koeficient
<b>ECFP</b>	Enhanced CFP (vylepšený CFP)
<b>ECL</b>	Extracellular Loop (extracelulární smyčka)
<b>EDTA</b>	Kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>EGFP</b>	Enhanced GFP (vylepšený GFP)
<b>ER</b>	Endoplasmatické retikulum
<b>ERK1/2</b>	Extracellular-signal-Regulated Kinase 1/2 (kinázy aktivované extracelulárními signály typu 1 a 2)
<b>ET<sub>A</sub>R</b>	Endotelinový receptor typu A
<b>EYFP</b>	Enhanced YFP (vylepšený YFP)
<b>F<sub>0</sub></b>	Intenzita fluorescence těsně po foto-vybělení
<b>F<sub>1</sub></b>	Intenzita fluorescence před foto-vybělením
<b>F<sub>∞</sub></b>	Intenzita fluorescence po ustanovení rovnováhy obnovení fluorescence
<b>FCS</b>	Fluorescence Correlation Spectroscopy (Fluorescenční korelační spektroskopie)
<b>FLIM</b>	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (mikroskopie zobrazující dobu života excitovaného stavu)
<b>FRAP</b>	Fluorescence Recovery After Photobleaching (obnovení fluorescence po foto-vybělení)
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer (fluorescenční rezonanční energetický přenos)
<b>G protein(y)</b>	Trimerní protein(y) vázající guaninové nukleotidy
<b>GABA<sub>B</sub>R</b>	Receptor pro kyselinu $\gamma$ -aminomáselnou typu B
<b>GDP</b>	Guanosine Diphosphate (guanosin difosfát)
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide Exchange Factor (faktor měnicí guaninové nukleotidy)
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein (zelený fluorescenční protein)
<b>Gly</b>	Glycin
<b>GnRHR</b>	Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (receptor pro gonadotropin-uvolňující hormon)
<b>GPCR</b>	G Protein-Coupled Receptor (receptor spřažený s G proteiny)
<b>GPI</b>	Glykosylfosfatidylinositol
<b>GRK</b>	G protein-coupled Receptor Kinase (kinázy receptorů spřažených s G proteiny)

<b>GTP</b>	Guanosine Triphosphate (guanosin trifosfát)
<b>G<math>\alpha</math></b>	$\alpha$ podjednotka trimerních G proteinů
<b>G<math>\beta</math></b>	$\beta$ podjednotka trimerních G proteinů
<b>G<math>\gamma</math></b>	$\gamma$ podjednotka trimerních G proteinů
<b>HEK</b>	Human Embryonic Kidney cells (buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinných buněk)
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary cells (buněčná linie odvozená z vaječnickových buněk čínského křečka)
<b>Chol</b>	Cholesterol
<b>ICL</b>	Intracellular Loop (intracelulární smyčka)
<b>ICS</b>	Image Correlation Spectroscopy (obrazová korelační spektroskopie)
<b>InsP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-trifosfát
<b>k</b>	Boltzmannova konstanta ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ )
<b>KDELR</b>	Lys-Asp-Glu-Leu Receptor (receptor pro rozpoznávání signální sekvence Lys-Asp-Glu-Leu)
<b>Kont.</b>	Kontrolní buňky
<b>KOR</b>	$\kappa$ -Opioid receptor ( $\kappa$ -opioidní receptor)
<b>LB médium</b>	Médium Luria-Bertani (standardní médium pro kultivaci E. Coli)
<b>L<sub>d</sub></b>	Liquid-Disordered (neuspořádaná tekutá) fáze
<b>Leu</b>	Leucin
<b>LHR</b>	Luteinizing Hormone Receptor (receptor pro luteinizační hormon)
<b>L<sub>o</sub></b>	Liquid-Ordered (uspořádaná tekutá) fáze
<b>M</b>	Molární ( $\text{mol.dm}^{-3}$ )
<b>m2AChR</b>	Muskarinový cholinergní m2 receptor
<b>MAP kináza</b>	Mitogen-Activated Protein kinase (mitogenem aktivovaná protein kináza)
<b>Met</b>	Methionin
<b>M<sub>f</sub></b>	Mobilní frakce
<b>MHC I</b>	Major Histocompatibility Complex I (MHC glykoprotein třídy I)
<b>MOR</b>	$\mu$ -Opioid receptor ( $\mu$ -opioidní receptor)
<b>mRFP1</b>	Monomerní červený fluorescenční protein
<b>mRNA</b>	Mediátorová ribonukleová kyselina
<b>N</b>	Počet prvků v dané datové skupině
<b>NA</b>	Numerical Aperture (numerická apertura) – účinná světelnost objektivu
<b>NBD</b>	N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)

<b>NCS</b>	Newborn Calf Serum (novorozenecké telecí sérum)
<b>OFQ/N</b>	Orphanin FQ/nociceptin
<b>OR</b>	Opioid Receptor (opioidní receptor)
<b>P</b>	P-hodnota (statistická veličina)
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufř)
<b>PC</b>	Fosfatidylcholin
<b>PDZ</b>	Konkrétní strukturně konzervovaná proteinová doména
<b>PE</b>	Fosfatidylethanolamin
<b>pH</b>	Vodíkový exponent (záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů)
<b>Phe</b>	Fenylalanin
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
<b>PI-PE</b>	Plasmalogen PE
<b>PM</b>	Plasmatická membrána
<b>POZ</b>	Pozadí
<b>PS</b>	Fosfatidylserin
<b>R</b>	Hydrodynamický poloměr
<b>RGS</b>	Regulator of G protein Signalling (regulátor G proteinové signalizace)
<b>RICS</b>	Raster Image Correlation Spectroscopy (korelační spektroskopie rastrových obrázků)
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>ROI</b>	Region of Interest (oblast zájmu)
<b>RP</b>	Rovina průřezu buňkou
<b>RS</b>	Rovina sklíčka
<b>RV</b>	Rovina vrcholu buňky
<b>SD</b>	Standard Deviation (směrodatná odchylka)
<b>SDS</b>	Dodecylsírán sodný
<b>SEM</b>	Standard Error of Mean (směrodatná chyba průměru)
<b>Ser</b>	Serin
<b>SH2</b>	Src Homology 2 domain (strukturně konzervovaná proteinová doména)
<b>SH3</b>	Src Homology 3 domain (strukturně konzervovaná proteinová doména)
<b>SM</b>	Sfingomyelin
<b>Src</b>	Nereceptorová tyrosinkináza
<b>T</b>	Termodynamická (nebo též absolutní) teplota
<b>T3</b>	Trijodtyronin

<b>T4</b>	Tyroxin
<b>TBE</b>	Tris-borátový-EDTA pufr
<b>TICS</b>	Temporal Image Correlation Spectroscopy (časová obrazová korelační spektroskopie)
<b>T<sub>m</sub></b>	Teplota tání
<b>TM</b>	Transmembránový
<b>TRH</b>	Thyrotropin Releasing Hormone (tyreotropin uvolňující hormon, tyreoliberin)
<b>TRH-R</b>	Thyrotropin Releasing Hormone Receptor (receptor pro TRH)
<b>TSH</b>	Thyroid Stimulating Hormone (hormon stimulující štítnou žlázu, tyreotropin)
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>VTGP</b>	Buňky HEK293 stabilně exprimující konstrukt TRH-R-EGFP
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein (žlutý fluorescenční protein)
<b>β<sub>1</sub>-AR</b>	Beta 1-adrenergní receptor
<b>β<sub>2</sub>-AR</b>	Beta 2-adrenergní receptor
<b>β<sub>3</sub>-AR</b>	Beta 3-adrenergní receptor
<b>β-CDX</b>	β-cyklodextrin
<b>η</b>	Hustota prostředí
<b>τ<sub>dz</sub></b>	Doba života excitovaného stavu ( <i>lifetime</i> ) fluorescenční sondy

## 2. Úvod

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) tvoří největší rodinu membránových receptorů v savčích tělech. Díky nim vnímáme světlo, pachy a chutě okolního světa. Uvnitř těla se účastní neurotransmise, řízení činnosti žláz s vnitřní sekrecí zajišťujících fyziologickou homeostázu, řízení reprodukce, regulují metabolismus, ovlivňují růst, diferenciaci i smrt některých buněk a mají i mnoho dalších úloh. Není tedy překvapením, že jsou cílem více než poloviny současně používaných léčiv. Proto je zásadní těmto signalizačním bílkovinám co nejvíce porozumět, abychom dosáhli v klinické praxi co nejlepších výsledků.

GPCR jsou membránové proteiny, a proto je aktuální a žádoucí zajímat se o vliv tzv. membránových domén (nebo též membránových raftů) na jejich funkci. O samotné existenci membránových raftů se dlouhou dobu vedly vášnivé diskuze. V současné době je již tento koncept přijímán širokou vědeckou veřejností. Jedná se o oblasti plasmatické membrány obohacené o cholesterol a sfingomyelin, které vykazují vlastnosti odlišné od „neraftové“ (někdy též „většinové“) části membrány. Bylo dokázáno, že tyto oblasti soustřeďují preferenčně některé proteiny, zatímco jiné jsou přednostně lokalizovány v neraftových oblastech. Tato nesouměrná distribuce proteinů přináší mnoho signalizačních možností oproti původnímu konceptu membrány jakožto tekuté mozaiky, kde se proteiny volně pohybují v „moři“ lipidů.

Membránové domény byly definovány na základě nerozpustnosti v roztocích neiontových detergentů jako je Triton X-100 při 0 °C. A byly to právě biochemické metody, které velice dlouho hrály prim ve výzkumu membránových raftů. V současné době se však stále více dostávají do popředí přístupy, které jsou více šetrné a umožňují citlivější analýzu nejen na buněčných preparátech, ale rovněž na živých buňkách.

S objevem zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), který je v současné době k dispozici v celé řadě funkčních a barevných variant, získal biologický a medicínský výzkum mocný nástroj. Velkou výhodou GFP je možnost jeho „přivěšení“ ke zkoumanému proteinu na úrovni nukleové kyseliny. Vzniklý fúzní protein je pak možné produkovat v modelových systémech, aniž by bylo pro vizualizaci zkoumaného proteinu nutné buňky zabíjet fixací či homogenizací. Fluorescenční metody, které mohou využívat GFP jako fluorescenční sondu, se nyní poměrně bouřlivě rozvíjejí díky rychlému technologickému pokroku v zobrazovacích metodikách. Velice důležité je znát silné a slabé stránky nových i starých přístupů a neustále data získaná moderními technikami porovnávat s již zavedenými metodami, abychom tyto přístupy mohli verifikovat a případně objektivně zahrnout ty staré.

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Receptory spřažené s G proteiny (GPCR)

##### 3.1.1. Úvod

Receptory spřažené s G proteiny (G protein-coupled receptors; GPCR) tvoří největší receptorovou rodinu savčích druhů. U člověka je tato rodina zastoupena více než 800 geny. Započítáme-li alternativní sestřih, může být na základě těchto genů produkováno až 2000 odlišných receptorových bílkovin. GPCR registrují informace z vnějšího prostředí rozpoznáváním různých stimulů počínaje neuropřenašeči, přes peptidové hormony či odoranty a konče fotony světla. Podílejí se na vnitrobuněčné signalizaci, endokrinních funkcích, udržování fyziologické homeostázy (dynamické stálosti vnitřního prostředí), regulaci metabolismu, růstu a diferenciaci a mnoha dalších funkcích (Luttrell, 2008).

V současné době jsou již dokázány signalizační dráhy receptorů spřažených s G proteiny, které nevyužívají heterotrimerní G proteiny. Z tohoto důvodu by bylo správnější označovat tuto velkou skupinu receptorů jako „7TM receptory“ (dle jejich typické struktury – viz dále), avšak označení GPCR je již používáno tradičně (Pierce a kol., 2002).

##### 3.1.2. Struktura

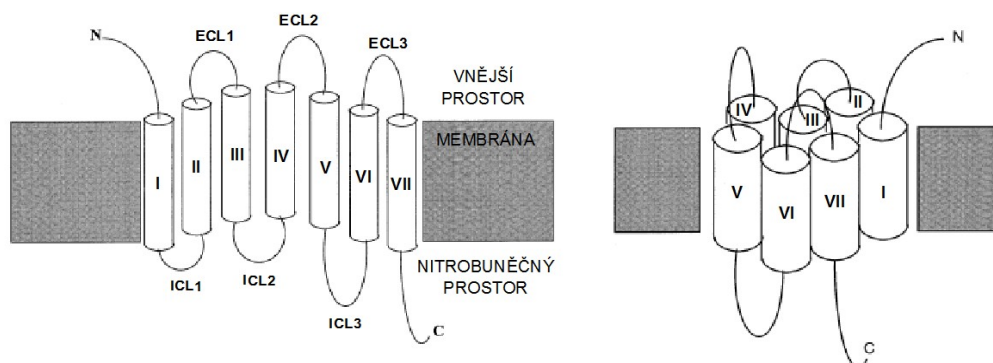
Pro receptory spřažené s G proteiny je naprosto zásadním jednotícím principem jejich struktura. Všechny obsahují 7  $\alpha$  šroubovic, které procházejí membránou (transmembránové helixy). Tato charakteristická struktura byla popsána v 80. letech 20. století na receptoru rhodopsinu, který se na dlouhá léta stal modelovým GPCR (Pierce a kol., 2002).

N-konec receptoru je orientován vně buňky (extracelulárně) a C-konec je orientován dovnitř buňky (intracelulárně). Pro označení transmembránových šroubovic se používá označení „TM“ společně s příslušnou římskou číslicí (TMI-VII; číslováno od N-konce). Dále na GPCR rozpoznáváme 3 intracelulární smyčky (ICL) a 3 extracelulární smyčky (ECL) (Hanson a Stevens, 2009). Zjednodušené schéma struktury modelového receptoru spřaženého s G proteiny je uvedeno na obrázku 1 na následující straně.

Vazebné místo pro receptorový stimul je obecně formováno z N-koncové části bílkoviny a extracelulárních smyček a částí TM šroubovic. Místo interakce s vnitrobuněčnými bílkovinami (např. G proteiny) je pak formováno C-koncem a intracelulárními smyčkami a částmi receptoru (Nygaard a kol., 2009).

Krystalizace receptorů spřažených s G proteiny byla od počátku velice obtížnou záležitostí. Velice dlouho byl jediným úspěšně krystalograficky analyzovaným receptorem rhodopsin. Ovšem s pokrokem v oblasti přípravy preparátů pro tyto studie se v dnešní době

objevují další a další detailní struktury GPCR, které mohou objasnit funkci konkrétních receptorů na molekulární úrovni (Kobilka a Schertler, 2008).



**Obrázek 1 | Schematické znázornění struktury receptoru spřaženého s G proteiny**

Membrána je zobrazena šedě. V levé části obrázku je zachycena topologie receptoru v membráně. V pravé části je schematicky znázorněn receptor ve výsledné „sbalené“ konformaci. Transmembránové oblasti jsou pro přehlednost označeny pouze římskou číslicí. Upraveno podle Flower, 1999

### 3.1.3. Rodiny GPCR

Jelikož existuje mnoho zástupců této velké rodiny receptorů, je praktické je nějakým způsobem pro větší přehlednost rozřadit. Stále nejpoužívanějším systémem je třídění do rodin A-F. Největší rodinou je skupina A obsahující až 80 % lidských GPCR. Zástupci rodin A, B, C a F jsou nacházeni v těle savců, zatímco receptory rodiny D jsou zastoupeny výlučně v houbách a receptory rodiny E se nacházejí pouze v organismu *Dictyostelium* (Davies a kol., 2008). Jednotlivé rodiny společně s typickými zástupci jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1 | Přehled rodin GPCR s typickými zástupci**

Podle Davies a kol., 2008; Kolakowski, 1994

Rodina	Příklad zástupců
A	rhodopsin; dopaminové, serotoninové, adrenergní, opioidní receptory; receptor pro tyreoliberin; acetylcholinové receptory muskarinového typu
B	receptory pro sekretin, kalcitonin, glukagon, vazoaktivní intestinální peptid
C	metabotropní glutamátové receptory; receptory pro kyselinu $\gamma$ -aminomáselnou, odoranty
D	receptory pro feromony
E	receptory pro cAMP
F	receptory „Frizzled/Smoothened“



Poměrně známým alternativním způsobem klasifikace je systém GRAFS, který třídí pouze GPCR nalezené v lidském těle. Je založen na genové analýze a rozdělování receptorů do skupin podle genetické příbuznosti (Fredriksson a kol., 2003).

#### 3.1.4. Ligandy

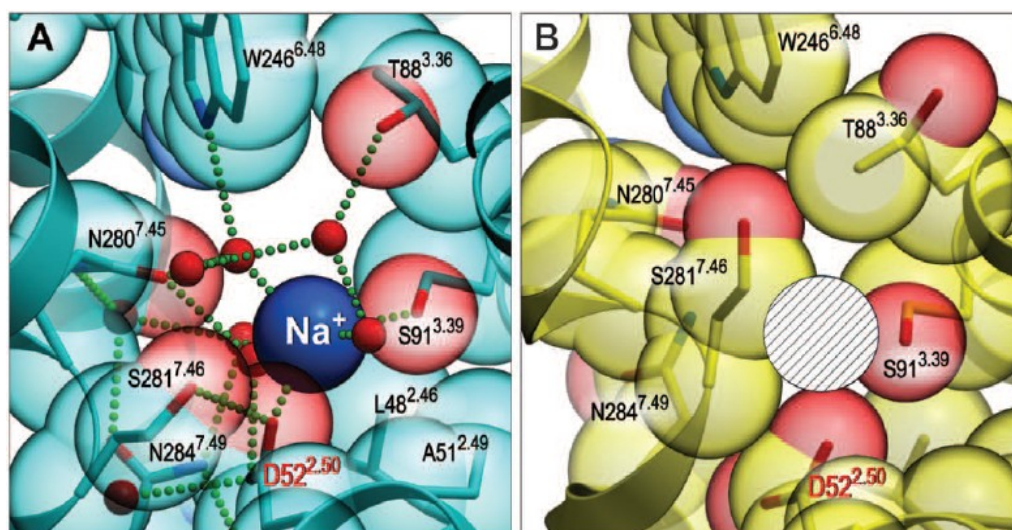
Termínem ligand se rozumí molekula, která je schopna vazby na receptor a ovlivnění jeho funkce. Prvotní studie chápaly receptory spřažené s G proteiny jako jakési spínače, které se vyskytují právě v polohách „zapnutý“, nebo „vypnutý“. Nyní je praktičtější nahlížet na tyto struktury spíše jako na „reostaty“ (zachováme-li slovník elektronických součástek), které vykazují mezi krajními „spínačovými“ stavy ještě celou řadu mezistavů. Tomu odpovídají i látky, které takové spektrum efektů vyvolávají. Rozpoznáváme tzv. plné agonisty, částečné agonisty, antagonisty a inverzní agonisty (Kobilka a Deupi, 2007).

Při popisu funkce ligandů na signalizaci pomocí GPCR je zásadní zmínit pojem konstitutivní aktivita receptoru. Jedná se o schopnost receptoru aktivovat příslušný G protein i přes absenci vazby ligandu. Je to děj způsobený schopností receptoru přecházet s určitou pravděpodobností samovolně mezi všemi možnými konformačními mezistavy. Ligandy pak v tomto náhledu vystupují spíše jako jakési „katalyzátory“, které vychylují rovnováhu mezi aktivovaným a deaktivovaným receptorem. Receptory zaujímají konformace na oné škále „zapnutý“ až „vypnutý“ a příslušné ligandy je stabilizují v příslušné konformaci. Tento fenomén se navenek projevuje bazální aktivitou většiny receptorů spřažených s G proteiny (Seifert a Wenzel-Seifert, 2002).

Efekt plného agonisty je charakterizován maximální biologickou odpovědí receptoru. Částečný agonista pak receptor aktivuje jen zčásti, přestože obsadí všechna vazebná místa (receptory jsou jím saturovány). Antagonista nemá na biologickou funkci receptoru žádný vliv, ale kompetuje (soutěží) o vazebné místo na receptoru s dalšími ligandy. Inverzní agonista stabilizuje neaktivní konformaci receptoru, a tak signalizaci „vypíná“ (Kobilka a Deupi, 2007).

V této části textu je nutné zmínit ještě jeden zajímavý fakt. Pod pojmem ligand (a tedy agonista, antagonist a atd.) rozumíme hormon, neurotransmitter nebo jejich syntetické analogy, které se k buňkám dostávají po svém fyziologickém vyloučení nebo vnějším dodání. Podobné účinky však mohou mít i nízkomolekulární látky, které interagují s místem odlišným od vlastního orthosterického vazebného místa receptoru pro ligand. Takové látky označujeme jako allosterické modulátory. Např. sodné ionty za fyziologických podmínek fungují jako inverzní agonisté, tzn. látky, které stabilizují neaktivní konformaci receptoru, a převádí tak celkovou populaci receptorů v dané buňce do méně aktivního stavu. Pokud je

zkoumána signalizace GPCR v médiu bez  $\text{Na}^+$ , je signalizační aktivita receptorů velmi vysoká. Při vysoké fyziologické koncentrací sodných iontů v extracelulárním prostoru (145 mM) proto receptor existuje v neaktivní či málo aktivní formě (Vosahlikova a kol., 2014). Nedávno bylo v rámci podrobné krystalografické studie charakterizováno vazebné místo pro  $\text{Na}^+$  ionty u adenosinového  $\text{A}_{2\text{A}}$  receptoru ( $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ ). Ukázalo se, že vazba agonisty na receptor dokonce vytěsňuje sodné ionty z vazebného místa receptoru (viz obrázek 2) (Liu a kol., 2012).



**Obrázek 2 | Detail struktury vazebného místa pro  $\text{Na}^+$**

Jedná se o vazebné místo adenosinového  $\text{A}_{2\text{A}}$  receptoru, které je značně konzervované v rámci rodiny A receptorů spřažených s G proteiny. V části A je toto místo zobrazeno ve stavu neaktivní konformace receptoru s navázaným  $\text{Na}^+$ . V části B je pak aktivní konformace receptoru. Je patrné, že sodný iont byl z pozice ve vazebném místě vytěsňován (zobrazeno bílým šrafovaným kolečkem). Značky pro aminokyseliny jsou pro přehlednost v jednopísmenkovém tvaru.

Upraveno podle Liu a kol., 2012

### 3.1.5. Model signalizace GPCR prostřednictvím trimerních G proteinů

Klasická cesta signalizace receptorů spřažených s G proteiny je historicky první popsanou a zároveň nejprozkoumanější drahou těchto receptorů. V principu se jedná o systém složený ze 3 členů – receptoru, trimerního G proteinu a efektorové bílkoviny (enzymu či iontového kanálu) (Luttrell, 2008).

Heterotrimerní proteiny se skládají ze 3 podjednotek –  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Alfa podjednotka je místem vazby guaninového nukleotidu. Podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$  vytvářejí pevný  $\beta/\gamma$  komplex. V lidském genomu bylo identifikováno 16 genů pro  $\alpha$ , 5 genů pro  $\beta$  a 14 genů pro  $\gamma$  podjednotky (Milligan a Kostenis, 2006). Rodinu  $\alpha$  podjednotek dělíme na 4 základní

podskupiny ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  a  $G\alpha_{12}$ ). Dle obsažených  $\alpha$  podjednotek jsou pak klasifikovány celé trimerní G proteiny. Rodina  $G\alpha_s$  je spojena s aktivací adenylyl cyklázy, ale obsahuje též  $G\alpha_{olf}$  spojenou s čichovými drahami. Rodina  $G\alpha_i$  obsahuje 4 podjednotky, které adenylyl cyklázu inhibují, dále retinální  $\alpha$  podjednotku transducin,  $\alpha$  podjednotku gustducin hrající roli při vnímání chuťových stimulů a ještě 2 podjednotky, jejichž funkce zatím není příliš dobře popsána. Skupina  $G\alpha_q$  obsahuje podjednotky ovlivňující aktivitu fosfolipázy C. Poslední skupina –  $G\alpha_{12}$  obsahuje podjednotky  $G\alpha_{12}$  a  $G\alpha_{13}$ , jejichž efektem jsou malé G proteiny rodiny *Rho* – díky tomu se tato rodina podílí na regulaci celé řady buněčných dějů jako např. apoptózy, regulace funkce cytoskeletu nebo MAP kinázové dráhy (Kurose, 2003; Luttrell, 2008).

Ovšem i  $\beta/\gamma$  dimery mají své efekty (ač byla jejich role v minulosti podceňována). Jedná se např. o některé izoformy adenylyl cykláz, některé fosfolipázy C či A2 nebo kinázy spřažené s G proteiny.

V prvním kroku signalizace dochází k vazbě ligandu (agonisty) na receptor na vnější straně buňky (*extracelulárně*), což vyvolá konformační změnu v receptorové bílkovině. Díky této změně získá receptor afinitu k příslušnému G proteinu na vnitřní straně plasmatické membrány (*intracelulárně*), kterému slouží jako tzv. GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*; faktor měnicí guaninové nukleotidy) – tzn. katalyzuje výměnu GDP na alfa podjednotce trimerního G proteinu za GTP, což způsobí disociaci komplexu na volnou  $\alpha$  podjednotku a  $\beta/\gamma$  dimer. Tyto signální jednotky jsou do membrány vázány pomocí lipidické kotvy, takže se pak pohybují ve dvojrozměrném prostoru membrány a ovlivňují další bílkoviny signální kaskády (viz výše), které obvykle regulují množství tzv. druhých posílů, kteří dále interagují s dalšími členy signální kaskády. Signalizace pokračuje do chvíle, kdy dojde k hydrolýze GTP na GDP a volný fosfát na  $\alpha$  podjednotce (díky její vnitřní GTPázové aktivitě), která tak opět získá afinitu k  $\beta/\gamma$  dimeru, a tak se obnoví heterotrimerní uspořádání G proteinu (Luttrell, 2008). Doba obnovení neaktivní formy G proteinu může být urychlena pomocí tzv. regulátorů G proteinové signalizace (RGS), které stimuluje GTPázovou aktivitu  $\alpha$  podjednotek (Pierce a kol., 2002).

### 3.1.6. Negativní regulace signalizace GPCR

Signalizaci pomocí receptorů spřažených s G proteiny je třeba efektivně regulovat. Pokud by vazba ligandu s následnou plnou aktivací signalizace trvala příliš dlouho, muselo by nutně dojít k zásadnímu narušení celkového buněčného metabolismu a následně k buněčné smrti. Například permanentní zvýšení hladin cAMP vede k poruše regulace buněčných cyklů a zhoubnému bujení. Proto je kvantitativní míra a časová délka signalizace

přísně regulována snad na všech možných úrovních příslušné signální dráhy a fyziologická odpověď je s trvajícím vazbou ligandu zeslabována (např. mohou být specificky degradovány molekuly druhých posílů, G proteiny jsou regulovány RGS atd.). V následujícím textu bude pozornost věnována hlavně samotným receptorovým molekulám.

Prvním krokem v odpovědi buňky na déletrvajícím stimulus (vazbu agonisty) je tzv. desenzitizace, která nastává v řádu desítek sekund (Ostasov a kol., 2008). Jde o fyzické odpražení receptoru od G proteinu. Jednou z možností je klasická zpětnovazebná smyčka, kdy produkované molekuly druhých posílů stimulují proteinkinázy A či C, které následně fosforylují receptory, které tak ztratí schopnost vázat G proteiny. Tento mechanismus je však relativně nespecifický, takže může dojít k desenzitizaci i jiných než právě signalizujících receptorů (tzv. heterologní desenzitizace). Druhým mechanismem je tzv. homologní desenzitizace, kdy je signalizující receptor rozpoznán speciálními kinázami GRK (kinázy receptorů spřažených s G proteiny; *G protein-coupled Receptor Kinase*), které receptor fosforylují, a vytvářejí tak vazebné místo pro proteiny arrestiny, které vytvářejí fyzickou zábranu kontaktu s G proteiny (Luttrell, 2008). Rozlišují se 2 skupiny arrestinů – arrestiny spojené s funkcí pouze rhodopsinu a  $\beta$ -arrestiny, které regulují prakticky všechny ostatní GPCR (Ferguson, 2001).

Dalším krokem je proces tzv. internalizace, ke kterému dochází v řádu jednotek až desítek minut. Receptory jsou touto cestou endocytovány z plasmatické membrány do nitrobuněčných váčků. Internalizace probíhá buď klatrinovou cestou (tj. endocytózou zprostředkovanou klatrinovými váčky) nebo mechanismem kaveolární endocytózy (tj. nezávisle na klatrinu) (Pierce a kol., 2002). První typ internalizace je primárně umožněn díky navázanému  $\beta$ -arrestinu, který obsahuje sekvence mj. pro interakci s klatrinem, což je stavební prvek endocytických váčků buněk v obecném slova smyslu (Goodman a kol., 1996). Následně je receptor buď znovu dopraven na membránu, nebo degradován v lysosomech (Luttrell, 2008). Dlouhodobá aktivace GPCR vyvolává rovněž snížení genové exprese daného receptoru, čímž se dráždivost buňky k tomuto podnětu dlouhodobě sníží (Pierce a kol., 2002).

### **3.1.7. Alternativní signalizační dráhy receptorů spřažených s G proteiny**

Současný výzkum odhaluje fakt, že vyjma relativně dobře popsaného klasického modelu signalizace GPCR, podle kterého tato skupina receptorů vlastně dostala své jméno, mohou být tyto proteiny zapojeny i do dalších signalizačních drah. Ve svých nitrobuněčných doménách obsahují často sekvence, které mohou být využity pro vazbu (buď přímo nebo

prostřednictvím adaptorových proteinů) např. GEF bílkovin pro malé G proteiny, nereceptorových tyrosin kináz a členů některých MAP kinázových drah (Luttrell, 2008).

První možností je přímá interakce receptoru s dalšími proteiny pomocí jejich vazebných domén. Takto byla popsána např. přímá interakce  $\beta_2$ -AR s regulátorem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  výměníku pomocí adaptorové PDZ domény (Hall a kol., 1998). Dalším příkladem je možnost fosforylace  $\beta_2$ -adrenergního receptoru receptorem insulinovým, což vytvoří vazebné místo pro vazbu dalších proteinů pomocí jejich SH2 domén (Malbon a Karoor, 1998). Třetím příkladem je interakce  $\beta_3$ -AR s nereceptorovou tyrosin kinázou c-*Src* pomocí její SH3 domény (Cao a kol., 2000).

Druhým mechanismem je napojení GPCR na jiné signální dráhy prostřednictvím adaptorových proteinů. Ústřední roli v tomto procesu hrají již dříve zmíněné  $\beta$ -arrestiny, což významně posiluje jejich roli v signalizaci receptorů spřažených s G proteiny. Touto cestou dochází k zapojení do celé řady MAP kinázových kaskád (Miller a Lefkowitz, 2001). V tomto ohledu bylo provedeno mnoho zajímavých experimentů. V tomto textu se omezím pouze na krátký příklad. V buněčných liniích COS-7 způsobila nadměrná exprese (*overexpress*)  $\beta$ -arrestinu 2 očekávané snížení odpovědi angiotensinového receptoru ( $\text{AT}_{1\text{A}}\text{R}$ ) prostřednictvím G proteinů (hydrolyza fosfatidylinositolu), ale zároveň byla posílena aktivace kinázy ERK1/2 (dráha nezávislá na G proteinech) (Tohgo a kol., 2002). Zároveň deplece  $\beta$ -arrestinu 2 pomocí RNA interference v buňkách HEK293 inhibovala aktivaci ERK1/2 prostřednictvím  $\text{AT}_{1\text{A}}\text{R}$  (Ahn a kol., 2004).

### 3.1.8. Oligomerizace GPCR

Receptory spřažené s G proteiny byly dlouho považovány za monomerní signální jednotky. V posledních dvou desetiletích se ovšem začalo ukazovat, že podobně jako celá řada jiných receptorových rodin (např. receptorové tyrosin kinázy) mohou oligomerizovat. Oligomerizace může nastávat mezi stejnými receptory (homooligomerizace) nebo mezi receptory různými (heterooligomerizace). Možnost oligomerizace otevřela cestu nejen k lepšímu pochopení buněčné signalizace, ale rovněž k hledání nových účinnějších farmak (Cottet a kol., 2012).

S objevem oligomerizace GPCR se rovněž otevřelo nemálo otázek ohledně jejich funkcí. Jednalo se o otázky specifity rozpoznávání ligandů, mechanismu aktivace a desenzitizace receptorů i formování a dopravy oligomerních forem do membrány nebo ovlivnění mobility receptorů v plasmatické membráně (Lohse, 2010).

Při výzkumu tohoto fenoménu byly použity nejrůznější metody. Zpočátku se jednalo hlavně o přístupy biochemické a farmakologické. Často byla využívána imunoprecipitace

v kombinaci s imunoblody. Takto byla demonstrována možnost dimerizace  $\delta$ -opioidních (Cvejic a Devi, 1997) nebo  $\beta_2$ -adrenergních receptorů (Hebert a kol., 1996). Vzhledem k nejrůznějším nedostatkům těchto technik a řadě závěrů, které přinesly a následně se ukázaly být mylnými, byly pro tento výzkum upřednostněny jiné techniky – hlavně pak techniky založené na rezonančním přesunu energie (FRET, BRET atd.) (Cottet a kol., 2012).

Ukazuje se, že ne všechny poznatky o oligomerizaci se dají zobecnit pro všechny GPCR. Už jen samotná velikost těchto struktur je různá pro různé receptory a použité metody. Zdá se, že metabotropní glutamátové receptory se vyskytují nejvýše ve formě dimerů (Doumazane a kol., 2011), zatímco receptory GABA<sub>B</sub> formují dimery, ale rovněž tetramery (Maurel a kol., 2008). Tetramerní komplexy byly demonstrovány také v případě dopaminových receptorů (Guo a kol., 2008). A takto by mohl výčet pokračovat pro jednotlivé členy rodiny GPCR.

První jasné rozpoznání a důkaz funkčního významu oligomerizace pro činnost GPCR přinesl výzkum metabotropního receptoru pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA<sub>B</sub>R). Tento receptor se vyskytuje ve dvou základních podtypech – GABA<sub>B</sub>R1 a GABA<sub>B</sub>R2. Současná existence těchto podjednotek v dimeru je nutnou podmínkou pro lokalizaci GABA<sub>B</sub>R (jako celku) v buněčné membráně i pro jeho funkci. Zároveň se podařilo rozlišit i jednotlivé funkce obou „partnerů“ – GABA<sub>B</sub>R1 je zodpovědný za vazbu ligandu a GABA<sub>B</sub>R2 za interakci s příslušným G proteinem (Kaupmann a kol., 1998). Důležitost dimerizace pro opuštění endoplasmatického retikula a pokračování směrem k plasmatické membráně byla později pozorována např. i u  $\beta_2$ -adrenergních receptorů (Salahpour a kol., 2004).

Při výzkumu heterooligomerizace  $\delta$ - a  $\mu$ -opioidních receptorů nebyla tato interakce pouze detekována, ale s pomocí vazebných studií s radioligandy bylo demonstrováno, že heterooligomer má jiné vazebné a signalizační charakteristiky než monomerní forma, což zásadním způsobem rozšiřuje signalizační možnosti GPCR oproti klasickému modelu signalizace těchto receptorů (George a kol., 2000). Bylo rovněž prokázáno, že k snadnější heterooligomerizaci dochází u strukturně příbuzných receptorů (Ramsay a kol., 2002).

V současné době existuje velké množství prací, kde je popsáno mnoho možných kvartérních struktur GPCR. Je však potřeba zjistit, zda všechny tyto struktury plní nějakou konkrétní fyziologicky významnou funkci. Dále je třeba zkoumat, jaký je efekt daného typu oligomerizace na signalizační vlastnosti zúčastněných partnerů (Lohse, 2010).

## 3.2. Receptory pro tyreoliberin (TRH-R)

### 3.2.1. Úvod

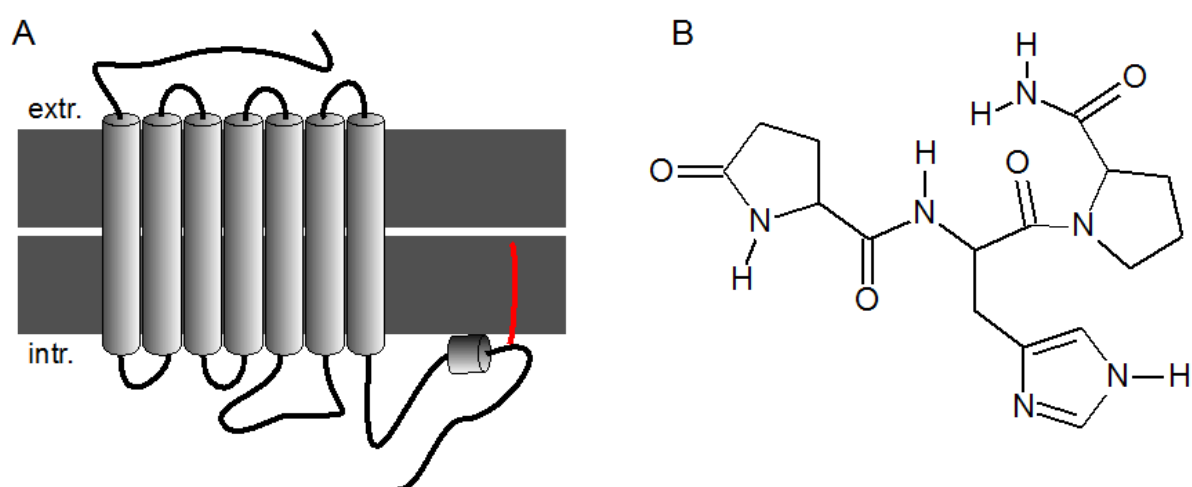
Receptory pro tyreoliberin (TRH; *Thyrotropin-Releasing Hormone*; tyreotropin uvolňující hormon) patří v klasifikaci receptorů spřažených s G proteiny do rodiny A. Velice dlouho se zdálo, že do skupiny receptorů pro TRH (TRH-R) bude patřit pouze jediný zástupce. Pomocí analýzy mRNA byl u hlodavců objeven jediný gen pro tento receptor, který však vykazoval 2 sestřihové varianty. Tyto varianty produkovaly delší a kratší formu TRH-R, které však byly od sebe elektrofyziologicky nerozlišitelné (de la Peña a kol., 1992). Postupně byla takto zjišťována sekvence myších, potkaních, lidských a dalších receptorů pro TRH, které mezi sebou vykazovaly až 95% homologii v aminokyselinovém složení. Pouze v lidském genomu nebyl popsán alternativní sestřih genu pro TRH-R, a tedy výskyt 2 izoform tohoto receptoru (Sun a kol., 2003). V roce 1998 však byl u potkanů izolován druhý člen rodiny TRH receptorů, který s původně jediným TRH-R sdílí pouze 50% homologii. Tento nový typ byl označen TRH-R2, zatímco pro původní typ se vžilo označení TRH-R1 (Cao a kol., 1998). TRH-R2 zatím nebyl identifikován u lidí (Sun a kol., 2003). Vzhledem k absenci TRH-R2 v lidském organismu je daleko větší zájem věnován receptoru pro TRH typu 1.

### 3.2.2. Struktura a signalizace TRH-R

Receptory pro TRH obsahují 7 transmembránových průniků jako všechny GPCR. Stejně jako řada z nich obsahují zřejmě na svém cytoplasmatickém konci osmý helix, který není zanořen do membrány, ale díky svému amfipatickému charakteru je s membránou asociovaný a je k ní orientován paralelně. Navíc se v této oblasti nachází několik míst, kde může docházet k palmitoylaci. Přítomnost těchto 2 strukturních prvků je, zdá se, důležitá pro činnost receptorů. Zároveň je tak zformována 4. intracelulární smyčka (viz obrázek 3 na následující straně) (Du a kol., 2005).

Přirozeným agonistou TRH-R je tyreoliberin (TRH). Jedná se o tripeptid, který v organismu funguje jako hormon, parakrinní regulátor a jako neuromodulátor. Tripeptid je složen z kyseliny pyroglutamové, histidinu a prolinamidu (viz obrázek 3) (Gershengorn a Osman, 1996). Je zajímavé, že vyjma jediného syntetického analogu se nedaří najít žádné další látky podobné TRH, které by se na receptor vázaly s vyšší afinitou (Sun a kol., 2003). Rovněž hledání antagonistů těchto receptorů bylo dlouhou dobu bez úspěchu. V nedávné době se však přece jen podařilo některé takové látky identifikovat (Engel a kol., 2008). Jako příklad inverzního agonisty těchto receptorů je uváděn midazolam (Wang a Gershengorn, 1999).

Primární signalizační kaskáda TRH-R spočívá v aktivaci receptoru pomocí TRH. Aktivovaný receptor interaguje s G proteiny třídy  $G_{q/11}$ , které aktivují fosfolipázu C $\beta$ . Tento enzym katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP $_2$ ) na 1,2-diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (InsP $_3$ ). Tito druzí poslové stimulují zvýšení intracelulární koncentrace Ca $^{2+}$  a aktivaci proteinkinázy C (Hsieh a Martin, 1992). Aktivace TRH-R rovněž stimuluje Ca $^{2+}$ /kalmodulin-závislou protein kinázu a MAP kinázové dráhy. Pomocí proteinkinázy C nebo Ca $^{2+}$ /kalmodulin-závislé protein kinázy mohou být aktivovány různé transkripční faktory. Při absenci ligandu se ukázalo, že TRH-R2 aktivuje tyto dráhy daleko významněji než TRH-R1, ačkoli jejich bazální aktivita v klasické odpovědi vyvolávající změny v koncentraci Ca $^{2+}$  nebo aktivita v přítomnosti TRH je prakticky nerozlišitelná (Sun a kol., 2003).



**Obrázek 3 | Zjednodušené schéma struktury TRH-R a strukturní vzorec TRH**

V části A je zjednodušené topologické schéma TRH-R, které má demonstrovat přítomnost helixu 8 a přilehlé palmitoylace, které vytvářejí čtvrtou intracelulární smyčku. Červeně je znázorněna palmitoylace C-konce receptoru. Extr. a intr. značí extracelulární a intracelulární stranu membrány. V části B je zobrazena chemická struktura TRH.

Vytvořeno podle Gershengorn a Osman, 1996

Po navázání agonisty jsou TRH receptory rychle fosforylovány (poločas děje je asi 15 sekund) (Jones a Hinkle, 2009). Jelikož za fosforylaci aktivovaných receptorů je zodpovědná hlavně GRK2 (Jones a Hinkle, 2005), hovoříme o desenzitizaci homologní. Na fosforylované receptory se váží molekuly  $\beta$ -arrestinů a komplexy jsou internalizovány z membrány pomocí klatrinových váčků. Po odmytí agonisty je množství TRH receptorů na membráně obnoveno s poločasem asi 30 minut. Poločas defosforylace receptorů po odmytí agonisty je poměrně krátký (pod 5 minut). Je zajímavé, že internalizované receptory jsou recyklovány na plasmatickou membránu až po asi 3 hodinách, takže membrána musí



být do 30 minut „osazena“ TRH-R z intracelulárních buněčných zásob těchto receptorů (Jones a Hinkle, 2009).

Velkému zájmu o oligomerizaci GPCR neušly ani receptory pro TRH. Bylo demonstrováno, že tyto receptory mohou vytvářet jak homooligomery, tak heterooligomery složené z TRH-R1 i TRH-R2 podtypů (Hanyaloglu a kol., 2002). Zdá se, že oligomerizace (v tomto případě se zřejmě jedná o dimerizaci) těchto receptorů může urychlovat a zesilovat fosforylaci receptorů po aktivaci ligandem, a ovlivňovat tak proces desenzitizace, internalizace a dopravy TRH-R (Song a kol., 2007).

### **3.2.3. Distribuce TRH receptorů v organismu**

Distribuce receptorů pro tyreoliberin byla zkoumána pomocí histochemie, *in situ* hybridizace a imunoblotů. Všechny metody poskytly do značné míry stejné výsledky (samozřejmě s některými výjimkami, které mohou být dány limitacemi jednotlivých přístupů) (Sun a kol., 2003).

Primárním místem, kde byly receptory pro TRH objeveny, je přední lalok hypofýzy, kam je tento tripeptid uvolňován z hypotalamu (viz oddíl 3.2.4 Fyziologické akce TRH). Již na tomto místě je patrný rozdíl ve funkci obou receptorů. Zatímco v hypofýze se nachází TRH-R1, později objevený TRH-R2 v této tkáni popsán nebyl, a je tudíž zřejmě zapojen do jiných akcí (Cao a kol., 1998).

Distribuce těchto 2 receptorů se v některých místech překrývá a v některých výrazně liší. Obecně je TRH-R1 výrazně exprimován v předním laloku hypofýzy, neuroendokrinních oblastech mozku, autonomním nervovém systému a útrobních oblastech mozkového kmene. TRH-R2 je pak vysoce exprimován v oblastech mozku důležitých pro přenos somatosenzorických signálů a vyšších funkcí centrálního nervového systému. Rovněž se tyto receptory vyskytují v periferních oblastech těla. Přítomnost TRH-R1 byla demonstrována např. v srdci, plicích, varlatech a žaludku. Naproti tomu výskyt TRH-R2 je na periférii značně omezen – byl popsán v sítnici, varlatech a gastrointestinálním traktu (Sun a kol., 2003).

### **3.2.4. Fyziologické akce TRH**

Tyreoliberin je zapojen do mnoha fyziologických dějů. Je syntetizován jako tzv. preprohormon TRH, který čítá 255 aminokyselin a je následně štěpen za vzniku 5 tripeptidických molekul TRH (údaje pro potkaní model) (Nillni a Sevarino, 1999).

Původně byl TRH popsán ve fungování osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza. Hypotalamus v parvocelulárních neuronech paraventriculárního jádra produkuje mj. TRH.

Axony z této oblasti projikují do cirkumventrikulárních orgánů savčího mozku, které leží vně hematoencefalické bariéry, díky čemuž může být TRH uvolňován do portálního oběhu, kterým se dostává až k přednímu laloku hypofýzy. Zde stimuluje uvolnění hormonu TSH (tyreotropin), který následně stimuluje štítnou žlázu k sekreci a syntéze tyroidních hormonů tyroxinu (T4) a trijodtyroninu (T3). Tyroidní hormony zpětně regulují výlev TRH na začátku kaskády, takže se jedná o klasickou zpětnovazebnou smyčku. Tyroidní hormony mají zásadní vliv na energetický metabolismus – na bazální energetickou produkci a na adaptivní termogenezi (Lechan a Fekete, 2006). Pokud je štítná žláza aktivována nadměrně, dochází k hubnutí, třesu, nervozitě, tachykardii a nadměrné produkci tepla. Nedostatečná činnost se projevuje mentálními a fyzickými poruchami, špatnou odolností vůči chladu a u dětí i mentální retardací a omezením růstu (Ganong, 2005).

Až dvě třetiny TRH v mozku se nachází mimo tradiční „tyreotropickou zónu“ hypotalamu. Toto TRH se může chovat jako neuromodulátor, nebo dokonce neurotransmiter. TRH může ovlivňovat uvolňování dalších hormonů než TSH – např. prolaktinu, vazopresinu a inzulinu. Taktéž může ovlivňovat výlev noradrenalinu a adrenalinu (Nillni a Sevarino, 1999). Výčet těchto „nehypofyziotropických“ efektů je uveden v tabulce 2.

## **Tabulka 2 | Přehled dalších efektů TRH mimo uvolňování TSH z předního laloku hypofýzy**

Podle Lechan a Fekete, 2006

<b>„Nehypofyziotropické“ efekty TRH</b>	
analgezie	zvyšování vyprazdňování žaludku
antikonvulzivní účinky	zvyšování gastrointestinální motility
bdělost	zvyšování jaterního prokrvení
mozková vazodilatace	zvyšování vylučování inzulinu
pocení	zvyšování pohybové aktivity
usnadnění tvorby paměťových stop	zrychlené dýchání
usnadnění vzrušivosti motoneuronů	inhibice příjmu potravy
vysoký krevní tlak	neurotrofické efekty na míšní motoneurony
zlepšování paměti	periferní vazokonstrikce
zvyšování krevního tlaku	tachykardie
zvyšování tělesné teploty	třes
zvyšování sekrece žaludečních kyselin	

### **3.3. $\delta$ -opioidní receptor**

#### **3.3.1. Opioidy a opioidní receptory**

Skupina opioidních receptorů náleží do rodiny A v klasifikaci GPCR. Jedná se o fyziologicky a terapeuticky vysoce významnou skupinu receptorů, která je aktivována celou řadou endogenních i exogenních látek. Jako příklad takové známé exogenní látky jmenujme morfin, který je hlavní součástí opia a který je v medicíně využíván již po staletí. První zprávy o jeho použití k mírnění bolesti a ulevování lidem trpícím např. astmatem pocházejí již od řeckého „fyziologa“ Galéna ze druhého století našeho letopočtu (Waldhoer a kol., 2004). Syntetický analog morfinu – heroin je zneužíván jako droga. Obě tyto látky se však vyznačují rychlým vznikem tolerance a závislosti na pravidelném podávání látky s potřebou dávku zvyšovat. I přesto je morfin jakožto jedna z nejsilnějších látek pro tlumení bolesti v některých případech stále využíván v současném lékařství (Lutz a Kieffer, 2012).

Opioidní receptory nehrají úlohu pouze při tlumení bolesti, ale rovněž např. v ovlivňování afektivity, regulaci reakce na stres a regulaci dýchání, gastrointestinálních, endokrinních a imunitních procesů (Chu Sin Chung a Kieffer, 2013).

Mezi klasické opioidní receptory řadíme  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ - opioidní receptory (MOR, DOR, KOR), které interagují s rodinou endogenních opioidních peptidů ( $\beta$ -endorfin, enkefaliny, dynorfiny). Jak receptory, tak zmíněné opioidní látky jsou produkovány jak centrálním, tak periferním nervovým systémem (Lutz a Kieffer, 2012). Všechny 3 zmíněné receptory jsou vysoce homologní (nejvíce pak v transmembránových segmentech) (Waldhoer a kol., 2004). Do skupiny opioidních receptorů patří navíc orphanin FQ/nociceptinový receptor (OFQ/N receptor), který je s ostatními třemi receptory sekvenčně homologický z 60 % (Lutz a Kieffer, 2012), ale vykazuje malou nebo zanedbatelnou afinitu pro většinu opioidních alkaloidů (Granier a kol., 2012).

V experimentální části této diplomové práce jsme se zabývali  $\delta$ -opioidním receptorem. Proto je dále konkrétněji charakterizován především tento člen rodiny opioidních receptorů.

#### **3.3.2. Struktura a signalizace opioidních receptorů**

Stejně jako všechny receptory spřažené s G proteiny i opioidní receptory obsahují 7 transmembránových šroubovic. Všechny tyto receptory obsahují vysoce konzervované cysteiny v 1. a 2. extracelulární smyčce, které zřejmě vytvářejí disulfidický můstek (Waldhoer a kol., 2004). Rovněž je přítomna 4. intracelulární smyčka, která je formována díky palmitoylovanému C-konci – podobně jako u TRH-R (Law a kol., 2000).

Významným krokem kupředu ve výzkumu opioidních receptorů jsou aktuální krystalografické studie, které umožňují popis vlastností těchto signalizačních bílkovin na molekulární úrovni (viz obrázek 4 na str. 30). Po KOR a MOR se podařilo úspěšně krystalizovat i DOR. Zdá se, že vazebné místo („kapsu“) pro ligandy všech opioidních receptorů je možné rozdělit na 2 odlišné části. Aminokyselinové složení spodní části vazebného místa je v rámci této skupiny vysoce konzervované, zatímco svrchní část obsahuje rozdílné aminokyseliny, což zřejmě určuje vazebnou selektivitu jednotlivých receptorů (Granier a kol., 2012).

Endogenní opioidní peptidy jsou většinou odvozeny od 4 prekurzorů – proopiomelanokortinu, proenkefalinu, prodynorfinu a proorphanin FQ/nociceptinu. Společným rysem opioidů vázajících se na MOR, DOR a KOR je pentapeptidová sekvence TyrGlyGlyPheMet/Leu. Klíčovou aminokyselinou v této sekvenci je tyrosin, který je zásadní pro vysokoafinní vazbu těchto ligandů k receptorům (Waldhoer a kol., 2004). Odlišné vazebné vlastnosti OFQ/N receptoru mohou být dány přizpůsobením vazebného místa orphanin FQ/nociceptinu, ve kterém je tento charakteristický tyrosin nahrazen fenylalaninem (Lapalu a kol., 1997).

Endogenními agonisty DOR jsou látky ze skupiny enkefalinů, jejichž strukturním základem je pentapeptid enkefalin. Konkrétně byly popsány 4 takové peptidy (Leu<sup>5</sup>-enkefalin, Met<sup>5</sup>-enkefalin, Met<sup>5</sup>-enkefalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> a Met<sup>5</sup>-enkefalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>) (Noda a kol., 1982). Z peptidových syntetických agonistů jmenujme např. DADLE (D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>-enkefalin) a jako příklad využívaného antagonisty naltrindol. Obsáhlejší seznam ligandů je možné nalézt v příslušné literatuře (Janecka a kol., 2004; Waldhoer a kol., 2004).

Všechny opioidní receptory jsou obecně spřažené s heterotrimerními proteiny třídy G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>. Po aktivaci receptoru  $\alpha$  podjednotka  $i$   $\beta/\gamma$  dimer interagují s několika efektorovými systémy. Výsledkem je inhibice adenylyl cyklázy a napětově závislých Ca<sup>2+</sup> kanálů a stimulace G proteiny aktivovaných dovnitř usměřňujících K<sup>+</sup> kanálů a fosfolipázy C $\beta$  (Waldhoer a kol., 2004).

Při delším vystavení  $\delta$ -opioidních receptorů působení agonisty, jsou receptory rychle desenzitizovány fosforylací pomocí GRK a navázáním  $\beta$ -arrestinu. Následuje rychlá internalizace. Oproti MOR jsou tyto procesy výrazně rychlejší (Lowe a kol., 2002). Zdá se, že v této rychlé negativní regulaci DOR hraje významnou roli kináza rodiny Src. Rovněž bylo demonstrováno, že zatímco internalizované  $\mu$ -opioidní receptory jsou obvykle vraceny zpět na membránu, internalizované DOR jsou přednostně směřovány do lysosomů k degradaci (Archer-Lahlou a kol., 2009).

Opioidní receptory byly jedněmi z prvních, na kterých byla zkoumána možnost oligomerizace GPCR. Zpočátku byly využívány hlavně biochemické metody, jejich limitace však přinášely řadu sporných závěrů (Cvejic a Devi, 1997; McVey a kol., 2001). Za použití moderní metody BRET byla demonstrována homooligomerizace  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR a následně také jejich vzájemná heterooligomerizace (McVey a kol., 2001; Ramsay a kol., 2002). Pomocí metody kvantitativní BRET bylo později dokázáno, že opioidní receptory mohou vytvářet kvartérní struktury všech kombinací (DOR-DOR, MOR-MOR, KOR-KOR, DOR-MOR, DOR-KOR, MOR-KOR). Taktéž byl vyvozen závěr, že základním asociačním stupněm je dimer. Díky limitům této metody není jasné, zda se vyšší oligomerní struktury v buňkách nevyskytují, nebo zda se formují z dimerních struktur (Wang a kol., 2005).

### 3.3.3. Distribuce DOR v organismu

DOR je v rámci lidského centrálního nervového systému produkován v míše, korových oblastech a limbických strukturách jako je hipokampus a amygdala a dále rovněž v bazálních gangliích a hypotalamu (Chu Sin Chung a Kieffer, 2013).

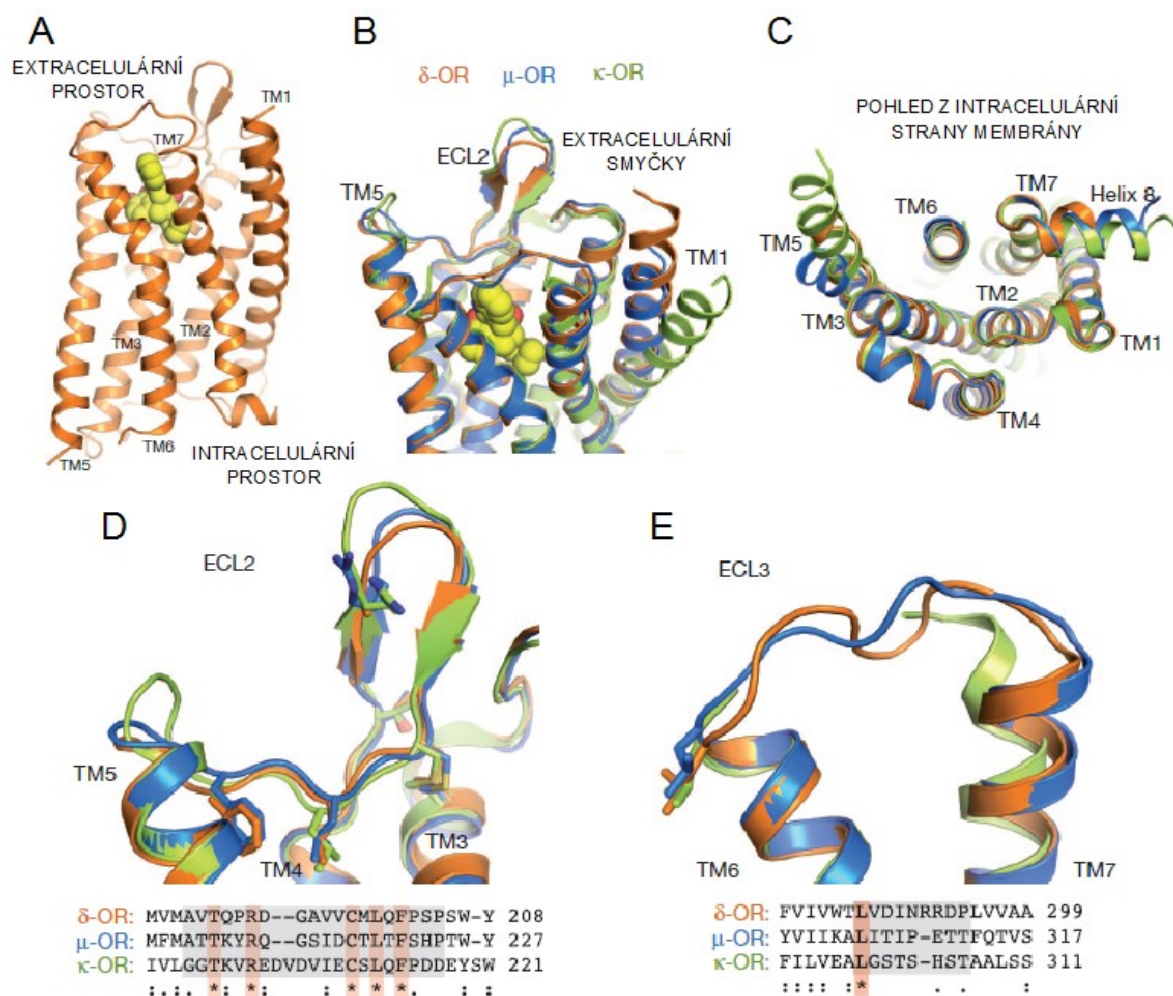
Mimo mozek byl výskyt DOR popsán v plicích, ledvinách, srdci, kosterním svalu, brzlíku, tenkém střevě, slinivce břišní a nadledvinách (Peng a kol., 2012).

### 3.3.4. Fyziologické účinky DOR

Opioidní receptory byly velice dlouho zkoumány s důrazem na jejich úlohu ve zmírňování bolesti. Výzkum agonistů  $\delta$ -opioidních receptorů přinesl mnoho slibných látek, které by snad jednou mohly nahradit morfin, na kterém vzniká silná závislost (Gavériaux-Ruff a Kieffer, 2011). S přibývajícimi znalostmi byla ovšem objevena spousta dalších oblastí, ve kterých je DOR důležitým hráčem.

Farmakologické a genetické experimenty odhalily, že aktivace DOR mírní úzkost, a má tedy vliv na citové odpovědi organismu (Chu Sin Chung a Kieffer, 2013). Myši bez genu pro DOR vykazovaly vyšší úzkost a chování podobné depresi (Filliol a kol., 2000). Rovněž byla zkoumána role DOR v procesech odměny a závislosti, kde byla díky mnoha studiím zachycena úloha v příjmu, vyhledávání a závislosti na drogách (morfin, alkohol, psychostimulancia) (Chu Sin Chung a Kieffer, 2013). Byly taktéž demonstrovány pro-epileptické účinky některých agonistů DOR, ovšem tyto projevy nebyly vyvolány zdaleka všemi použitými látkami. Zdá se tedy, že mohou být specifické pro konkrétní použitý ligand (Pradhan a kol., 2011). DOR je rovněž zapojen do procesů motorické aktivity – u myši s *knock-outovaným* genem pro DOR byla pozorována hyperaktivita (Filliol a kol., 2000). Následující farmakologické studie zachytily tento fenomén opět při použití pouze

některých látek (Chu Sin Chung a Kieffer, 2013). Velice zajímavé je rovněž zapojení DOR v hypoxickém/ischemickém stresu. DOR hraje významnou roli v neuroprotektivních procesech navozených *hypoxickým preconditioningem* (Gao a kol., 2012).



#### Obrázek 4 | Struktura $\delta$ -opioidního receptoru

V části A je zobrazen DOR (oranžově) s navázaným naltrindolem. Receptor obsahuje 7 transmembránových helixů (TM1-7) jako všechny GPCR. Sekvence helixů je v rámci opioidních receptorů vysoce konzervována, jak je vidět v částech B a C při srovnání s MOR (modře) a KOR (zeleně). V části D je zobrazen konzervovaný motiv  $\beta$ -listu vyskytující se ve druhé extracelulární smyčce (ECL2). Navzdory strukturální podobnosti je v této oblasti plně konzervováno pouze 5 aminokyselin. Hvězdičky znamenají pozici s plně konzervovanými aminokyselinami, dvojtečky s aminokyselinami s podobnými vlastnostmi a tečky pozice s aminokyselinami s málo podobnými vlastnostmi. V části E je zobrazen detail třetí extracelulární smyčky (ECL3). V případě KOR tato oblast nebyla dobře rozlišena z důvodu slabé elektronové hustoty vzorku.

Upraveno podle Granier a kol., 2012

### 3.4. Plasmatická membrána

#### 3.4.1. Úvod

Membrány jsou jedním ze stavebních kamenů většiny živých systémů (ponechme nyní stranou viry). Ohraničují živé buňky, a definují je tak v jejich životním prostředí. Nelze je však chápat pouze jako bariérovou strukturu – jsou zásadní také v otázkách signalizace, transportu, energetického metabolismu, biosyntézy, pohybu atd. Eukaryotická buňka neobsahuje pouze membránu plasmatickou, ale rovněž celou řadu nitrobuněčných membránových organel (endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, lisosomy atd.).

Základní strukturou buněčných membrán je dvojvrstva lipidů tvořená dvěma protilehlými listy, která vytváří dvojrozměrnou kapalnou strukturu s nejrůznějšími funkcemi, které buňky vyžadují pro svou existenci a správnou funkci (Simons a Sampaio, 2011).

Cesta k současnému poznání buněčných membrán započala již ve 30. letech 20. století, kdy bylo zjištěno, že membrány jsou tvořeny dvojvrstvou lipidů (Gorter a Grendel, 1925). Nejsou však tvořeny výhradně lipidickou složkou, ale také velkým počtem nejrůznějších proteinů. V roce 1972 byl uveřejněn model membrány jakožto tekuté mozaiky, který se stal odrazovým můstkem pro všechny následné práce a představy. Chápal membránu jako dvojvrstvu lipidů, která obsahuje periferní a integrální proteiny. Tyto proteiny se v matici tvořené lipidy vyskytují náhodně – tj. bez vyššího uspořádání (Singer a Nicolson, 1972). Následně však byly publikovány články, které poukazyvaly na fakt, že představa náhodné distribuce proteinů a lipidů nebude úplně správná. Hned za 2 roky spatřila světlo světa práce, která na základě ovlivnění vlastností membrán různými teplotami, předpokládala přítomnost „lipidických klastrů“ (Lee a kol., 1974). V dalších letech byl tento termín znovu definován jako „rigidní tekuté krystalické klastry“ (Wunderlich a kol., 1975) a následně jako „lipidy ve více uspořádaném stavu“ (Wunderlich a kol., 1978). Brzy již bylo známo, že oproti klasickému modelu Singera a Nicolsona se proteiny v matici lipidů nepohybují volnou difuzí (např. díky vazbě na cytoskelet). Nově byl zaveden pojem membránové domény, který měl vysvětlit, proč se ani lipidy nepohybují v membráně pomocí volné difuze (Karnovsky a kol., 1982). Koncept lipidických domén (nebo též „raftů“) byl ve fyziologii poprvé použit k objasnění tvorby apikální membrány epitelů bohaté na glykolipidy (Simons a van Meer, 1988) a později byl obohacen a zobecněn jako princip membránové subkompartmentalizace, která funguje nejen v membránovém transportu, ale rovněž při endocytóze, signalizaci a dalších procesech závislých na membránách (Simons a Sampaio, 2011).

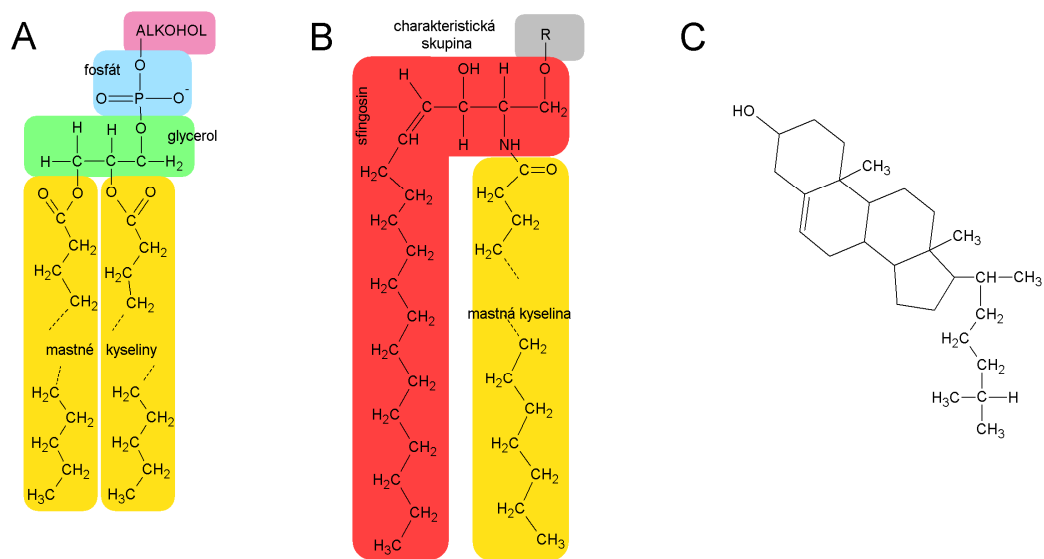
Následující text bude nejprve zaměřen na stručný popis složek buněčných membrán a následně podrobněji na velmi dynamickou oblast současné membránové biologie, tedy membránové domény (neboli rafty).

### 3.4.2. Základní složky membrán

#### 3.4.2.1. Lipidy

Lipidy jsou amfipatické molekuly, což znamená, že mají jak hydrofobní, tak hydrofilní část molekuly. Hydrofilní částí molekuly je obvykle polární hlavička, zatímco hydrofobní část tvoří dlouhé řetězce mastných kyselin.

V eukaryotických buňkách jsou nejdůležitějšími membránovými lipidy glycerofosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Steroly jsou v savčích buňkách obvykle zastoupeny pouze cholesterolem, zatímco první dvě skupiny lipidů mohou čítat až několik stovek různých molekul. Ačkoli jsou vymezeny určitým obecným vzorcem (viz obrázek 5), celá plejáda možných mastných kyselin a polárních hlaviček otevírá kombinatorické možnosti tvorby ohromného množství různých molekul.



**Obrázek 5 | Vzorce lipidů**

V části A je zobrazen obecný vzorec glycerofosfolipidů. Základem molekul je glycerol, který je esterifikován dvěma mastnými kyselinami a fosfátem, na který se může vázat alkoholová skupina (cholin, ethanolamin atd.). V části B je obecný vzorec sfingolipidů. Základním prvkem je sfingosin, na který je navázána jedna mastná kyselina. Pokud je jako charakteristická skupina použit nějaký sacharid, hovoříme o glykosfingolipidech, pokud je to alkohol zapojený přes fosfát, jedná se o sfingomyeliny. Přerušení mastných kyselin symbolizuje možnost zapojení velkého spektra různých řetězců. V části C je uvedena struktura cholesterolu jakožto prakticky jediného sterolu v savčích membránách.

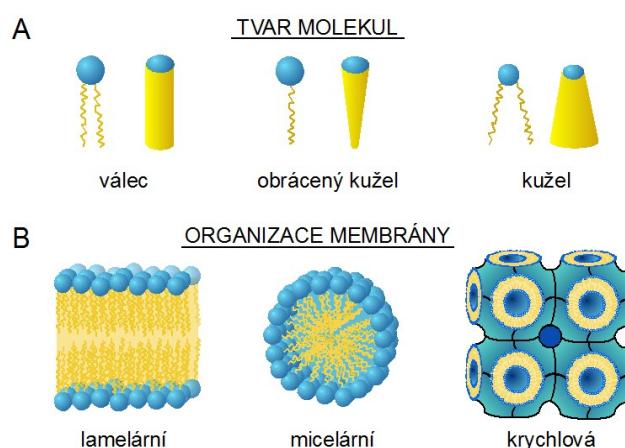
Upraveno podle Pollard a kol., 2008



Membránová dvojvrstva musí být vytvořena tak, aby zůstala relativně nepropustná i ve chvílích, kdy jsou složení, osmolarita nebo pH lokálně pozměněny (ať již z fyziologických nebo patologických důvodů). Proto nejsou membrány tvořeny pouze několika druhy lipidů, ale celým tzv. lipidomem, který čítá řádově tisíčky různých molekul.

Každý membránový lipid vykazuje na základě obsažených mastných kyselin a použité hlavičky jiný geometrický tvar. Tento fakt umožňuje „samouspořádávání“ lipidických molekul ve vodném (a tedy polárním) prostředí do různých struktur (micelární, lamelární či krychlové uspořádání) – tento fenomén je nazýván lipidickým polymorfismem (viz obrázek 6). Každý jednotlivý lipid má tendenci zaujímat preferenčně jistou výslednou membránovou konformaci. Ovšem biologické membrány jsou obvykle lamelární. To je umožněno použitím nejen široké palety různých lipidů, ale rovněž interakcí s membránovými proteiny (Simons a Sampaio, 2011).

Lipidová dvojvrstva plasmatické membrány je výrazně asymetrická. Vnější list obsahuje hlavně fosfatidylcholin a sfingolipidy, zatímco cytosolický list membrány je tvořen hlavně fosfatidylethanolaminem, fosfatidylserinem a fosfoinositidy. Cholesterol se nachází v obou listech rovnoměrně. Tato asymetrie není náhodná a je aktivně udržována pomocí ATPáz P-typu, které pro svou funkci vyžadují poměrně velké množství energie ve formě ATP (Shevchenko a Simons, 2010).



### Obrázek 6 | Lipidický polymorfismus

Každý lipid zaujímá výsledný tvar molekuly na základě poměru objemu polární hlavičky a nepolárních řetězců mastných kyselin (viz část A). Lipidy z tohoto hlediska můžeme rozdělit na válcové (např. fosfatidylcholin), kuželové (např. fosfatidylethanolamin) a tvaru obráceného kuželu (např. lysofosfatidylcholin). Každý lipid pak na základě tohoto tvaru zaujímá přednostně určitou konformaci membrány (lamelární neboli dvojvrstevnou, micelární či krychlovou) – viz část B.

Vytvořeno na základě Thomas, 2001 a Simons a Sampaio, 2011

### 3.4.2.2. Membránové proteiny

Membránové proteiny zajišťují široké spektrum funkcí zásadních pro fungování buněk. Podílejí se na signalizaci, buněčné adhezi, metabolismu, udržování iontových poměrů v buňce, endocytóze atd. (Santoni a kol., 2000). Jestliže lipidy působí jako izolační součást membrány, která ji udržuje nepropustnou, jsou to právě membránové proteiny, které z velké části umožňují selektivní procesy a komunikaci buňky s prostředím.

Již v původním modelu membrány jako tekuté mozaiky byly rozlišeny dvě třídy proteinů asociovaných s membránami – proteiny integrální a periferní (Singer a Nicolson, 1972).

Integrální membránové proteiny jsou nějakou svou částí přímo zanořeny do fosfolipidové dvojvrstvy nebo jí přímo procházejí z jedné strany na druhou (často i několikrát). Z tohoto důvodu musejí obsahovat specifické sekvence aminokyselin, které se vyznačují silnou hydrofobicitou, aby bylo jejich obklopení hydrofobními lipidy energeticky výhodné. Obvykle se jedná o sekundární strukturu  $\alpha$ -šroubovice (obvykle tvořené 15-25 aminokyselinami) nebo  $\beta$ -listu (Santoni a kol., 2000). Integrální membránové proteiny se izolují pomocí detergentů, žlučových kyselin, látek denaturujících proteiny nebo organických rozpouštědel. Velmi často zůstávají i po izolaci asociované s lipidy. Pokud jsou kompletně zbaveny lipidů, obvykle jsou vysoce nerozpustné nebo se srážejí v neutrálních vodných pufrách (Singer a Nicolson, 1972).

Periferní membránové proteiny jsou posttranslačně upravovány připojením mastné kyseliny, složitých glykolipidových kotev nebo polyizoprenylací jejich polypeptidického řetězce. Rovněž mohou být tyto proteiny s membránou asociovány pouze na základě např. elektrostatické interakce s jiným proteinem nebo lipidovou molekulou (Santoni a kol., 2000). Izolace periferních membránových proteinů vyžaduje oproti integrálním proteinům daleko mírnější postupy jako například zvýšení iontové síly média nebo použití chelatačního činidla. Takto izolované proteiny obvykle nejsou asociovány s lipidy a jsou relativně dobře rozpustné v neutrálních vodných pufrách (Singer a Nicolson, 1972).

### 3.4.3. Membránové domény

#### 3.4.3.1. Definice

Od samého počátku byla otázka podoby a způsobu existence membránových domén (raftů) v živé buňce náročnou problematikou, kolem které se rozhořela silná diskuze. Přesné a současně obecně uznávané vyjádření tohoto pojmu neexistuje ani v dnešní době. Různí autoři tento pojem chápou různým způsobem, přičemž jejich názor je dán charakterem metody, která je použita pro charakterizaci těchto proměnlivých struktur (*elusive structures*).

Proč proměnlivých? Proměnlivost a nestabilita membránových domén/raftů je tak velká, že jejich konkrétní podoba a funkční a chemické vlastnosti závisí na metodě jejich izolace (pro biochemickou či farmakologickou charakterizaci) či metodě, která je použita pro jejich vizualizaci – detekci v živých buňkách či podbuněčných preparátech.

Během prvních patnácti let výzkumu (1985-2000) byla stanovena norma, že membránové domény jsou části plasmatické membrány, které jsou nerozpustné v neiontových detergentech při 0 °C (obvykle v Tritonu X-100) a obsahují velké množství cholesterolu, sfingolipidů, trimerních G proteinů a kaveolinu (v buňkách, které kaveolin exprimují). V souladu s tímto pravidlem byla používána deplece cholesterolu pomocí methyl- $\beta$ -cyklodextrinu (či  $\beta$ -cyklodextrinu) pro jejich narušení a degradaci. Nerozpustnost daného proteinu po extrakci plasmatických membrán detergentem při 0 °C byla ukazatelem jeho lokalizace v membránových doménách. Pokud byl nějaký biologický proces narušen pomocí cyklodextrinového působení, byl považován za spřažený s doménami. K tomuto souboru pravidel se ovšem v průběhu času objevilo nemálo výhrad. Hlavní připomínky vyvstaly k definování součástí raftů pomocí rezistence k detergentům, protože se ukázalo, že samotné podmínky jejich přípravy (typ použitého detergentu, jeho koncentrace, poměr detergentu k množství membránových bílkovin, doba izolace a především teplota) výrazně ovlivňují výsledek izolace detergent-rezistentních membránových domén (DRM), případně že dokonce indukují tvorbu raftových struktur. Zároveň plasmatická membrána obsahuje až 40 % cholesterolu, a proto není překvapivé, že jeho odstranění vede ke změně procesů, které v ní probíhají, ať už rafty existují nebo ne. Pokrok v oblasti převážně mikroskopických a spektroskopických metod, které dnes vynikají velkým rozlišením, umožnil významný pokrok ve výzkumu membránových raftů s vyhnutím se zmíněným kontroverzním otázkám (Simons a Gerl, 2010). To však neznamená, že tyto kontroverzní otázky přestaly existovat.

Aby se v oblasti definice membránových raftů udělal pořádek a terminologie byla sjednocena, bylo jedním z cílů symposia Keystone o lipidických raftech a buněčných funkcích roku 2006 vytvořit funkční definici membránových raftů, která zní:

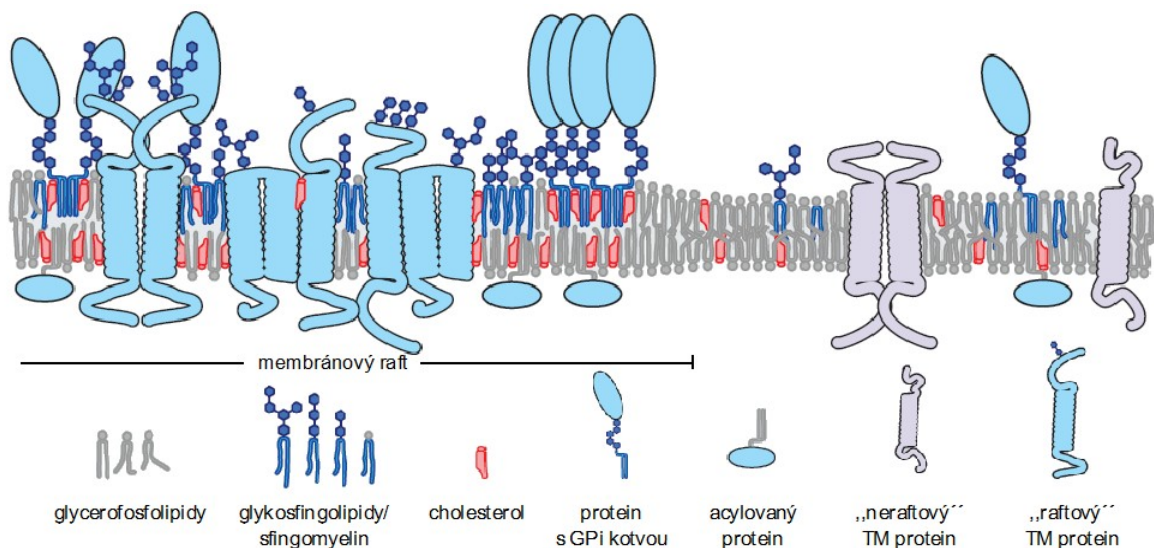
*„Membránové rafty jsou malé (10-200 nm) heterogenní vysoce dynamické domény obohacené o steroly a sfingolipidy, které kompartmentalizují buněčné procesy. Malé rafty mohou být stabilizovány protein-proteinovými a protein-lipidovými interakcemi, aby mohly vytvořit větší uskupení.“* Kaveoly byly v rámci této definice přijaty jako specializovaná vyšší struktura membránových raftů (Pike, 2006).

Následující oddíly budou věnovány membránovým raftům a následně kaveolám jakožto jejich speciálnímu typu.

### 3.4.3.2. Podstata a složení membránových raftů

Membránové rafty jsou chápány jako struktury, které jsou v rámci plasmatické membrány rigidnější, tlustší a obohacené o cholesterol a sfingolipidy (v savčích buňkách hlavně sfingomyelin). V molekulách membránových lipidů se vyskytují převážně nasycené mastné kyseliny a všechny volné prostory jsou vyplněny molekulami cholesterolu (Simons a Sampaio, 2011). Pravidlo o plné nasycenosti mastných kyselin lipidů přítomných v raftech však bude muset být zřejmě podrobena další analýze, protože se zdá, že nemalá část lipidů obsahuje alespoň jednu jedenkrát nenasycenou mastnou kyselinu (Pike, 2009).

S membránovými rafty je neoddiskutovatelně spjat i výskyt některých proteinů. Zdá se, že se přednostně jedná o proteiny ukotvené do membrány pomocí GPI kotvy, dvojitě acylované tyrosinkinázy rodiny Src,  $G\alpha$  podjednotky heterotrimerních G proteinů, proteiny ukotvené palmitátem či cholesterolem (např. Hedgehog protein) a některé transmembránové proteiny (Simons a Ehehalt, 2002). Modelový obrázek membránového raftu je na obrázku 7.



**Obrázek 7 | Membránový raft**

Na obrázku je zobrazen modelový membránový raft. Je patrné, že je obohacen o sfingolipidy a cholesterol a celkově tlustší než „neraftová“ oblast membrány. Rovněž jsou zobrazeny typy proteinů, které s rafty asociují.

Upraveno podle Lingwood a Simons, 2010

Existence membránových raftů je snadno patrná v modelových membránách. Při nízkých teplotách fosfolipidové dvojvrstvy existují ve „zmrzlé“ nebo lépe uspořádané gelové fázi. Při překročení teploty tání ( $T_m$ ), která je charakteristická pro každý lipid, přejde dvojvrstva do „neuspořádané kapalně“ fáze ( $L_d$  – *liquid disordered*). Pokud je použita směs dvou různých lipidů, leží pak hodnota výsledné teploty tání takové modelové membrány mezi hodnotami  $T_m$  jednotlivých lipidů. Membrány eukaryotických buněk jsou směsí

glycerolipidů (obecně velmi nízká  $T_m$ ), sfingolipidů (obecně daleko vyšší  $T_m$  než u glycerolipidů) a cholesterolu. Rozdíl v teplotách tání pak naznačuje, že může dojít k fázovému oddělení glycerolipidy- a sfingolipidy-obohacených domén. V modelových membránách byla dobře popsána fázová separace gelové a  $L_d$  fáze. Ovšem v biologických membránách se gelová fáze, až na vzácné výjimky, nevyskytuje. Nicméně byla pozorována fázová separace při použití dvousložkových směsí cholesterolu a lipidů obsahujících nasycené mastné kyseliny (s vysokými  $T_m$ ). V tomto případě došlo k rozdělení na  $L_d$  fázi a „tekutou uspořádanou“ fázi ( $L_o$  – *liquid ordered*). Tento fenomén se objevil rovněž při použití trojsložkových směsí cholesterolu a lipidů s nízkou a vysokou teplotou tání.  $L_o$  fáze je svými vlastnostmi na pomezí rigidní gelové fáze a fáze  $L_d$ . Je tlustší a rigidnější (jako fáze gelová), ale má vysokou laterální mobilitu (jako fáze  $L_d$ ). Pozorované fázové rozdělení bylo závislé na teplotě a obsahu cholesterolu v membráně. Dále bylo pozorováno, že přítomnost  $L_o$  fáze je zřejmě zodpovědná za nerozpustnost v detergentech, která je stále (s výhradami) považována za znak raftů (Brown a London, 1998).

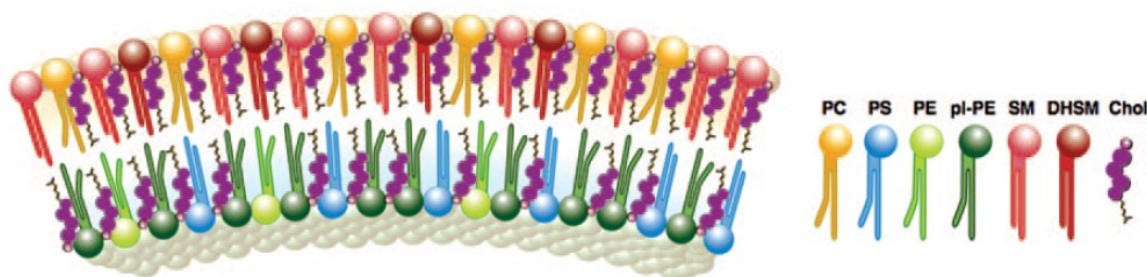
Zkoumat fázové rozdělení v komplexních membránách živých buněk se zpočátku zdálo prakticky nemožné, ovšem s nástupem pokročilých metod přípravy váček přímo z živých buněk se tyto možnosti otevřely. Různými technikami je možné připravit nebuněčné váčky, které se složením velice podobají živým buňkám. Překvapivě i na těchto preparátech bylo naměřeno podobné chování jako v případě jednoduchých modelových lipidických směsí. Byla tedy prokázána současná přítomnost  $L_d$  a  $L_o$  fáze v živých buňkách (Baumgart a kol., 2007; Levental a kol., 2009).

Podívejme se nyní ještě podrobněji na složení membránových raftů. Koncentrace cholesterolu je v raftech asi dvojnásobná oproti plasmatickým membránám, ze kterých byly izolovány. Stejně tak je zvýšena koncentrace sfingomyelinu asi o 50 % (protože obsahuje ve své molekule cholin, je v raftech sníženo množství fosfatidylcholinu, takže celkové množství lipidů obsahujících cholin je v raftech i ve zbytku membrány stejné). Koncentrace fosfatidylserinu je oproti původní membráně zvýšena 2-3krát. Rafty jsou rovněž obohaceny o plasmalogeny (etherové fosfolipidy) ethanolaminu často obsahující kyselinu arachidonovou (Pike, 2009). Za předpokladu, že většina sfingomyelinu přítomného v plasmatické membráně je součástí membránových raftů, mohou pak rafty tvořit až polovinu buněčného povrchu (Simons a Ehehalt, 2002).

Rafty i se svým specifickým složením stále podléhají základnímu pravidlu asymetrie membrán. Vnější list obsahuje většinu sfingolipidů, a je tudíž velice uspořádaný. Ovšem rafty jsou struktury zahrnující oba listy membrány. Právě interakce vnějšího listu s vnitřním je stále poměrně neprobádanou oblastí. Jedna z teorií říká, že dlouhé řetězce mastných

kyselin, které se velice často vyskytují ve sfingolipidech, se mohou vmezeřit mezi mastné kyseliny lipidů ve vnitřním listu membrány, a „vnutit“ jim tak vyšší uspořádanost, kterou se rafty vyznačují (Simons a Sampaio, 2011). Zmíněná asymetrie listů membrány v rámci membránových raftů je zachycena na obrázku 8.

Pádným argumentem pro existenci membránových raftů byl experiment, při kterém byl stanovován lipidom membránového obalu viru HIV. Tento virus je znám tím, že z hostitelské buňky pučí ven i s membránou této buňky. Byla provedena identifikace a kvantifikace lipidů v tomto membránovém obalu a data byla porovnána s údaji z hostitelské buňky. Složení virové membrány bylo velice podobné složení předpokládaných raftů přítomných v membráně hostitelské buňky. Tento experiment nevyužívající k přípravě preparátů detergenty, nedokazoval pouze teorii, že virus HIV opouští buňku díky interakci s membránovými doménami, ale rovněž se stal jedním z důkazů samotné existence raftů v živých buňkách (Brügger a kol., 2006).



### Obrázek 8 | Lipidické složení membránového raftu

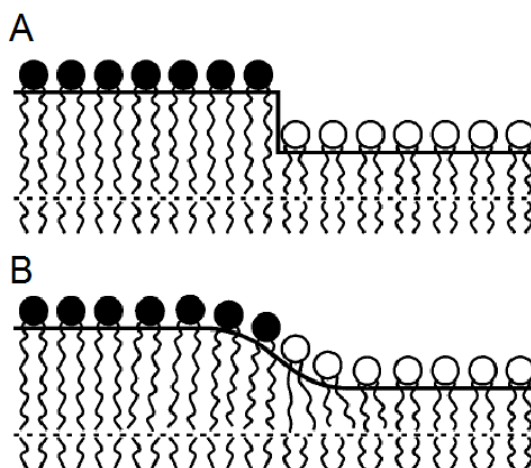
Obrázek zachycuje asymetrii lipidického složení membránového raftu. Jedná se o složení membrány kolem HIV partikule, která vykazuje stejné složení lipidů jako rafty hostitelské buňky. PC – fosfatidylcholin; PS ... fosfatidylserin; PE ... fosfatidylethanolamin; PI-PE ... plasmalogen PE; SM ... sfingomyelin; DHSM ... dihydro-sfingomyelin; Chol ... cholesterol.

Podle Brügger a kol., 2006

#### 3.4.3.3. Dynamika membránových raftů

Membránové rafty dostaly své jméno díky představě, že se jedná o předpřipravené struktury v membránách, do kterých jsou posléze zapojeny specifické proteiny (Pike, 2009). Z dnešního pohledu jsou to ovšem struktury velikosti v řádu nanometrů, které vynikají velkou heterogenitou (převážně v zastoupení různých lipidů) (Lingwood a Simons, 2010). Zdá se, že tyto struktury neustále vznikají a zanikají a že jejich stanovená doba života závisí na použité metodě měření – obvykle se pohybuje v rozmezí milisekund až sekund (Simons a Sampaio, 2011).

Síla, která formuje ony heterogenní nanometrové struktury, se nazývá „liniové napětí“. Jedná se o energii, která je zapotřebí ke zformování hranice raftu v okolní membráně. V praxi se jedná o rozdíl v tloušťce raftu a okolní membrány, což způsobuje „hydrofobní nesoulad“, který odpovídá energii, kterou je třeba dodat, aby byl překonán a raft mohl existovat jako samostatná membránová fáze (Pike, 2009). Rozhraní membránového raftu je schematicky znázorněno na obrázku 9. Bylo demonstrováno, že čím je větší rozdíl v tloušťce obou fází, tím je vyšší liniové napětí (García-Sáez a kol., 2007). Toto napětí může být snižováno několika způsoby. Zprv, lipidy na okraji raftu se mohou ohýbat a deformovat (Kuzmin a kol., 2005). To by mohlo vysvětlovat přítomnost široké palety lipidů v membránách – jejich různě dlouhé řetězce s různým stupněm nasycení mohou být vhodné pro stabilizaci rozhraní (Pike, 2009). Dalším způsobem je přítomnost již dříve zmíněných lipidů s jednou nenasycenou kyselinou. Pokud se takový lipid nachází na okraji raftu, působí jako tzv. hybridní lipid (nebo obecněji linaktant), který je svou nasycenou mastnou kyselinou zanořen do raftu a nenasycenou mastnou kyselinou do okolní membrány. Jako linaktanty v membránových raftech rovněž mohou působit i některé proteiny (Simons a Sampaio, 2011). Další možností, jak snížit liniové napětí, je zakřivení membrány (Baumgart a kol., 2003). Posledním, ovšem vysoce významným způsobem, je fúze malých raftů do větších uskupení (Pike, 2009).



**Obrázek 9 | Schematické znázornění okraje membránového raftu**

Na obrázku je patrný rozdíl v tloušťce raftu a okolní membrány. Pokud by byl přechod ostrý (jako v případě části A), byla by poměrně velká část hydrofobních částí lipidů vystavena hydrofilnímu vodnému prostředí, což je energeticky extrémně nevýhodné. Aby byl přechod plynulý (část B), musejí být lipidy deformovány, případně musí být využit jiný způsob minimalizace energie (viz text).

Podle Kuzmin a kol., 2005



Fúze nanometrových raftů do větších uskupení může být stabilizována pomocí lipid-lipidových, protein-lipidových nebo protein-proteinových interakcí. Jednou z těchto interakcí by mohla být také oligomerizace některých proteinů následující po příslušném stimulu. Tyto mechanismy by mohly buňkám umožňovat sestavovat právě potřebné sety jednotlivých druhů „základních“ raftů do vyšších uskupení na základě aktuální potřeby za spotřeby minimálního množství energie (Lingwood a Simons, 2010).

Membránové rafty se začínají formovat již v průběhu vezikulárního transportu proteinů a lipidů směrem od endoplasmatického retikula k plasmatické membráně. Proteiny adresované do plasmatické membrány mají delší transmembránové úseky než proteiny, které zůstávají např. v endoplasmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu. Stejně tak se pomalu ztlušťuje i membrána. To je zřejmě dáno zvyšujícím se zastoupením cholesterolu – zatímco v endoplasmatickém retikulu se jedná o asi 5 %, v plasmatické membráně je to něco kolem 40 %. Transmembránové proteiny se tedy zřejmě postupně „usazují“ v těch organelách, které mají odpovídající tloušťku membrán. Zároveň se ukazuje, že zpětně transportované váčky v rámci vezikulárního transportu jsou poměrně chudé na cholesterol a sfingomyelin, což by poukazovalo na zvyšování obsahu těchto molekul ve vznikajících raftech. Formování raftů pomocí nejrůznějších interakcí tedy nemá vliv pouze na třídění a transport proteinů, ale zároveň na třídění lipidických molekul (Simons a Sampaio, 2011).

#### **3.4.3.4. Kaveoly**

Přestože byly kaveoly objeveny už v 50. letech minulého století, stále v tomto odvětví membránové biologie existuje velké množství nezodpovězených otázek.

Kaveoly jsou definovány jako 60-80 nm široké jamky (invaginace; viz obrázek 10 na str. 41) v plasmatické membráně, které obsahují oligomerní protein kaveolin. Každá kaveola obsahuje asi 140-150 molekul kaveolinu 1 (viz dále). Tyto struktury jsou odlišitelné od klatrinových endocytických váček hned v několika ohledech (např. nevykazují různá stadia uzavírání krčku během endocytózy, hustota jejich výskytu je různá mezi různými buněčnými typy, ale i v rámci jedné buňky atd.) (Parton a del Pozo, 2013).

Kaveoly se ve velkém množství vyskytují v adipocytech, endoteliálních buňkách a svalech (Simons a Ehehalt, 2002).

Při vzniku kaveol jsou zásadní dvě skupiny proteinů – membránové kaveoliny a cytoplasmatické kaviny. Kaveoliny byly už od svého objevu považovány za *markery* kaveol. Rozlišujeme tři savčí kaveoliny – kaveolin 1 (CAV1), kaveolin 2 (CAV2) a kaveolin 3 (CAV3). CAV1 a CAV2 jsou obecně společně exprimovány ve všech buňkách s výjimkou kosterních svalů, zatímco CAV3 je převážně exprimován v příčně pruhovaném

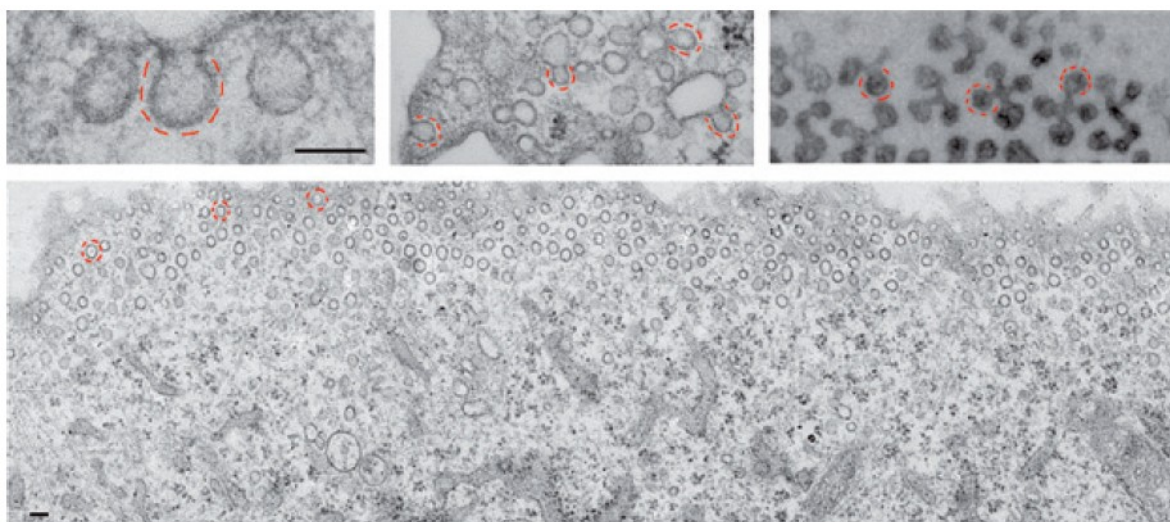


svalstvu. Kaveoliny 1 a 3 jsou zásadní pro zformování kaveol prostřednictvím oligomerizace.

Nejlépe prostudovaný je kaveolin 1. Jedná se o protein, jehož C- i N-konec je orientován směrem do buňky a který obsahuje membránovou doménu, která je zanořena do fosfolipidové dvojvrstvy. Rovněž je palmitoylován a obsahuje místa pro vazbu cholesterolu a mastných kyselin (Parton a del Pozo, 2013). Zablokování exprese kaveolinu 1 vede ke ztrátě kaveol (Drab a kol., 2001). Naopak zavedení genu pro expresi tohoto proteinu do buněk, které přirozeně nevytvářejí kaveoly, vede k jejich formaci *de novo* (Fra a kol., 1995).

Kaviny jsou relativně nedávno objevené proteiny. Rozlišujeme kaviny 1-4. Kavin 1 je společně s kaveolinem 1 zásadní pro formování kaveol. Funkce ostatních členů této rodiny zatím není plně známa. Zdá se, že kavin 2 je zapojen do zakřívování kaveolární membrány a kavin 3 se podílí na formování kaveolárních endocytických nosičů.

Kaveoly se zásadním způsobem podílejí na udržování struktury plasmatické membrány, na organizaci nejrůznějších molekul a rovněž vystupují jako buněčné senzory zapojené do mnoha signalizačních drah. Jejich fyziologický význam podtrhuje jejich spojení s nejrůznějšími onemocněními zahrnujícími mj. svalové dystrofie a rakovinu (Parton a del Pozo, 2013).



#### **Obrázek 10 | Obrázky kaveol z elektronového mikroskopu**

Na velkém obrázku dole a na horním vlevo jsou zachyceny kaveoly ve fibroblastech. Na horním obrázku uprostřed jsou kaveoly v kultuře adipocytů a vpravo nahoře v kultuře kosterních svalů.

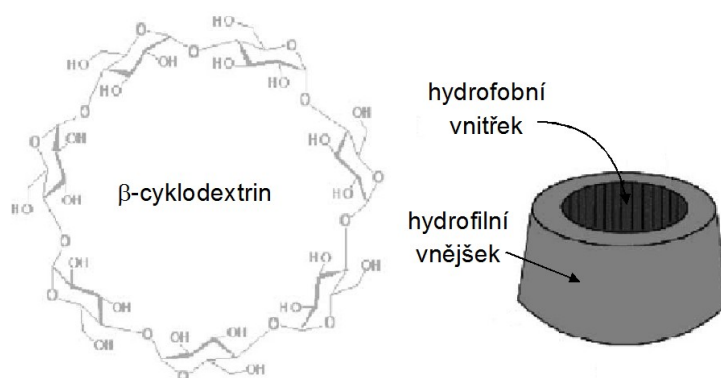
Podle Parton a del Pozo, 2013

### 3.4.4. Modulace obsahu membránového cholesterolu pomocí cyklodextrinové deplece

Deplece (snížení) a replece (obnovení) obsahu cholesterolu v plasmatické membráně pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu ( $\beta$ -CDX) zůstává stále hojně využívanou metodou studia membránových raftů.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy obsahující 6 ( $\alpha$ -cyklodextrin), 7 ( $\beta$ -cyklodextrin), 8 ( $\gamma$ -cyklodextrin) nebo více glukopyranózových jednotek (glukóz) spojených  $\alpha(1-4)$  glykosidickými vazbami. Přirozeně vznikají jako důsledek intramolekulární transglykosylace při degradaci škrobu enzymem cyklodextrin glukotransferázou. Svým výsledným tvarem připomínají dutý komolý kužel (viz obrázek 11). Vnější část tohoto útvaru je hydrofilní, což umožňuje rozpustnost ve vodě, vnitřek tvoří hydrofobní kapsu. Tento fakt umožňuje cyklodextrinům vytvářet rozmanité komplexy s různými hydrofobními molekulami, a rozpouštět je tak ve vodných prostředích. Proto jsou hojně využívány ve farmacii, potravinářství, kosmetickém průmyslu a mnoha dalších odvětvích (Del Valle, 2004).

$\beta$ -cyklodextrin a methyl- $\beta$ -cyklodextrin vykazují vyšší specifitu pro cholesterol (a jiné steroly) než pro fosfolipidy. Jsou schopné cholesterol „vytáhnout“ z membrány, uzavřít ho uvnitř hydrofobní části molekuly, a rozpustit ho tak ve vodném prostředí (Kilsdonk a kol., 1995). Stechiometrie cholesterol:cyklodextrin byla stanovena na 1:2 (Tsamaloukas a kol., 2005). Jelikož jsou cyklodextriny navenek polární, nevstupují do membrány. Díky tomu mohou být od vzorků odstraněny jednoduchou centrifugací. Díky své malé velikosti (oproti např. liposomům) se mohou dostat do těsné blízkosti membrány, a tak je proces zbavování ji cholesterolu efektivnější (Pucadyil a Chattopadhyay, 2006). Tento proces je však možné také obrátit a využívat cyklodextriny k dopravě cholesterolu (případně jeho analogů) do buněčných membrán (Gimpl a kol., 1997).



**Obrázek 11 | Struktura  $\beta$ -cyklodextrinu**

Vlevo je znázorněna chemická struktura  $\beta$ -CDX. Vpravo je schematicky naznačen tvar molekuly s vnější hydrofilní částí a vnitřní, která je hydrofobní.

Upraveno podle Del Valle, 2004

### **3.5. Úloha membránových raftů v signalizaci GPCR**

#### **3.5.1. Úvod**

Stále více se ukazuje, že membránové domény hrají velice důležitou roli v buněčné signalizaci. Jsou důležité nejenom v dopravě receptorů a dalších členů signalizační kaskády na buněčnou membránu (viz výše), ale rovněž k jejich koncentraci ve specifických subkompartmentech. V případě receptorů spřažených s G proteiny byla rovněž popsána možnost receptorů opouštět rafty nebo do nich vstupovat po obdržení specifického stimulu. Jelikož je však vztah různých proteinů k membránovým doménám různý, nedá se tato problematika příliš zobecňovat a je třeba zkoumat každý receptorový systém individuálně.

Už samotný signál, který určuje asociaci proteinu s membránovými doménami, je v rámci GPCR různorodý. Může se jednat o interakci receptoru s lipidy nebo proteinovými komponentami raftu (mezi které samozřejmě patří také kaveoly). V některých případech byla jako takováto interakce popsána vazba cholesterolu. Další okolností podmiňující asociaci s rafty by mohla být posttranslační modifikace receptoru přidáním mastných kyselin (hlavně pak palmitoylace). V případě GPCR zřejmě hraje roli rovněž délka transmembránových helixů (Chini a Parenti, 2004; Chini a Parenti, 2009).

#### **3.5.2. Kompartmentalizace jednotlivých proteinů signalizační kaskády GPCR**

Díky nejrůznějším metodám bylo identifikováno mnoho proteinů, které se preferenčně vyskytují v membránových raftech. Zároveň bylo demonstrováno, že rafty nejsou stejné. Vyskytují se v řadě populací obsahujících různé proteiny, což přináší rozšíření signalizačních možností buňky (Pike, 2003).

Mezi proteiny asociované s rafty jmenujme některé GPCR, heterotrimerní G proteiny, kinázy rodiny Src, MAP kinázy, protein kinázu C či různé formy adenylyl cyklázy (Ostrom a kol., 2002; Pike, 2003).

V membránových doménách jsou přednostně lokalizovány např.  $\beta_2$ -adrenergní (Rybin a kol., 2000) a  $\mu$ -opioidní receptory (Zheng a kol., 2008), zatímco např. receptory pro tyreoliberin (Rudajev a kol., 2005) či  $\delta$ -opioidní receptory (Alves a kol., 2005) se zdají být přednostně lokalizovány v membránových oblastech mimo rafty.

Mezi výše jmenovanými proteiny, které byly v membránových doménách objeveny, jsou i podjednotky G proteinů (Foster a kol., 2003). Americká skupina se touto problematikou zabývala podrobněji a došla k velice zajímavým výsledkům. Bylo ukázáno, že  $G_q$  proteiny se preferenčně koncentrují v kaveolách, zatímco  $G_s$  a  $G_i$  spíše v jiných membránových raftech. Dále se ukázalo, že  $G\alpha_q$  podjednotka v kaveolách interaguje s kaveolinem, a je proto oddělena od  $\beta/\gamma$  podjednotek, zatímco  $G\alpha_s$  a  $G\alpha_i$  podjednotky jsou

přednostně asociovány s  $\beta/\gamma$  dimerem (a tudíž připraveny signalizovat). Pokud byly pro experimenty použity buňky, které kaveoly nevytvářejí, byla lokalizace  $G\alpha_q$  podjednotky stejná jako v případě ostatních skupin G proteinů (Oh a Schnitzer, 2001).

### 3.5.3. Dynamické změny raftové / neraftové lokalizace GPCR

Výše zmíněná lokalizace GPCR uvnitř membránových raftů či mimo ně se zdá být dynamickým procesem. Tento fenomén můžeme demonstrovat na příkladu lidského  $\delta$ -opioidního receptoru. Bez navázaného ligandu se DOR vyskytoval převážně mimo raftové oblasti, zatímco po navázání agonisty či antagonisty se přesunul do frakce simulující domény (bohatá na sfingomyelin). V případě agonisty byl tento jev dvakrát silnější než v případě antagonisty. Z předchozích závěrů výzkumné skupiny plynulo, že receptor se po navázání agonisty „narovná“ v oblasti transmembránových helixů (což je v souladu s klasickou představou o relativní změně pozice helixů v aktivovaném stavu receptoru). Jelikož by tak byly v tenčí neraftové části membrány vystaveny hydrofobní aminokyselinové zbytky vodnému prostředí, je energeticky výhodnější, aby se receptor začlenil do tlustší raftové části, kde tyto zbytky „schová“ v hydrofobní zóně membrány (Alves a kol., 2005).

Různé receptory se v tomto ohledu chovají rozdílně. Zatímco např. TRH-R nebo muskarinové cholinergní  $m2$  receptory ( $m2AChR$ ) se po přidání agonisty pohybují směrem do raftů,  $\beta_2$ -adrenergní receptory, MOR nebo adenosinové  $A_1$  receptory ( $A_1R$ ) po přidání agonisty rafty opouštějí (Pike, 2003; Chini a Parenti, 2004).

Další zajímavou okolností je, že různí agonisté mohou mít na stejný receptor různé účinky, což se translokace z/do domén týče. To bylo prezentováno na modelu  $\mu$ -opioidního receptoru, který je přednostně lokalizován v membránových raftech. Po přidání etorfinu došlo k translokaci receptoru mimo domény, zatímco v případě morfinu nikoliv (Zheng a kol., 2008).

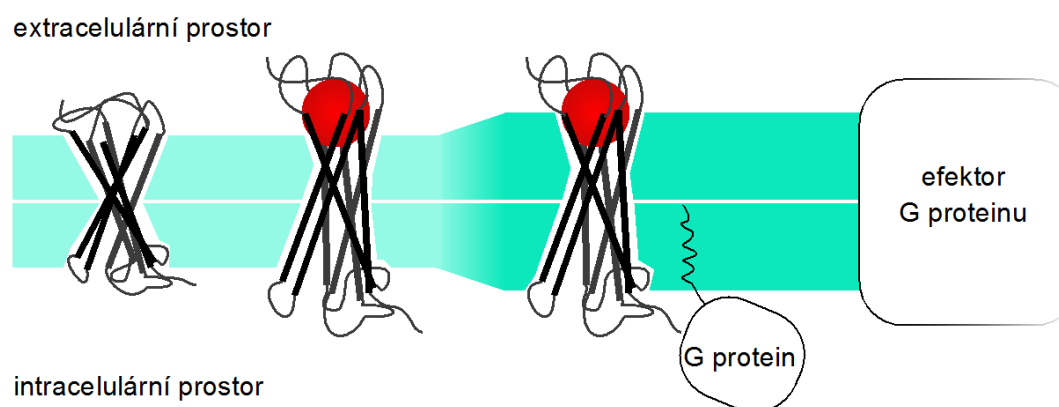
### 3.5.4. Význam membránových raftů v signalizaci GPCR

Membránové rafty hrají rozhodně významnou roli v signalizaci receptorů spřažených s G proteiny. O jejich roli existuje několik hypotéz. Opět je třeba zdůraznit, že různé receptory (a jejich signalizační dráhy) se v tomto ohledu mohou chovat různě.

V nejjednodušší představě vystupují membránové rafty jako signalizační platformy, které koncentrují všechny složky signalizační kaskády (tj. receptory, G proteiny a efektorové bílkoviny), což by umožňovalo rychlou odpověď na stimul bez nutnosti „hledání“ signalizačního partnera. Tento způsob by zároveň snižoval nespecifickou signalizaci.

V o něco složitějším modelu raft obsahuje téměř kompletní signalizační kaskádu, ale nějaká klíčová součást chybí. V tomto případě by se jednalo např. o receptor, který by po navázání agonisty změnil svou lokalizaci do specifického raftu a započal efektivní signalizaci (schematicky znázorněno na obrázku 12). Tímto způsobem by mohla být regulována signalizace díky kompartmentalizaci jednotlivých složek kaskády, čímž by se zamezilo interakci proteinů, které spolu interagují i bez přítomnosti stimulu (Pike, 2003).

V neposlední řadě nesmíme zapomínat také na úlohu membránových raftů v endocytóze, a tedy internalizaci receptorů (Le a kol., 2002). U této problematiky existuje rovněž několik modelových situací. Receptor se může po aktivaci agonistou dostat do domén, kde je endocytován na klatrinu nezávislým mechanismem (prostřednictvím kaveol). Rovněž může po aktivaci vstoupit do raftu, zaktivovat své efekty a následně vystoupit opět ven a být endocytován klatrinovým mechanismem. Další možností je internalizace aktivovaného receptoru běžně přítomného v raftech prostřednictvím kaveol. Posledním zvažovaným scénářem je situace, kdy normálně v raftu přítomný receptor opouští po aktivaci agonistou membránovou doménu a je internalizován za pomoci klatrinu (Chini a Parenti, 2004).



**Obrázek 12 | Model funkce membránových raftů v signalizaci GPCR**

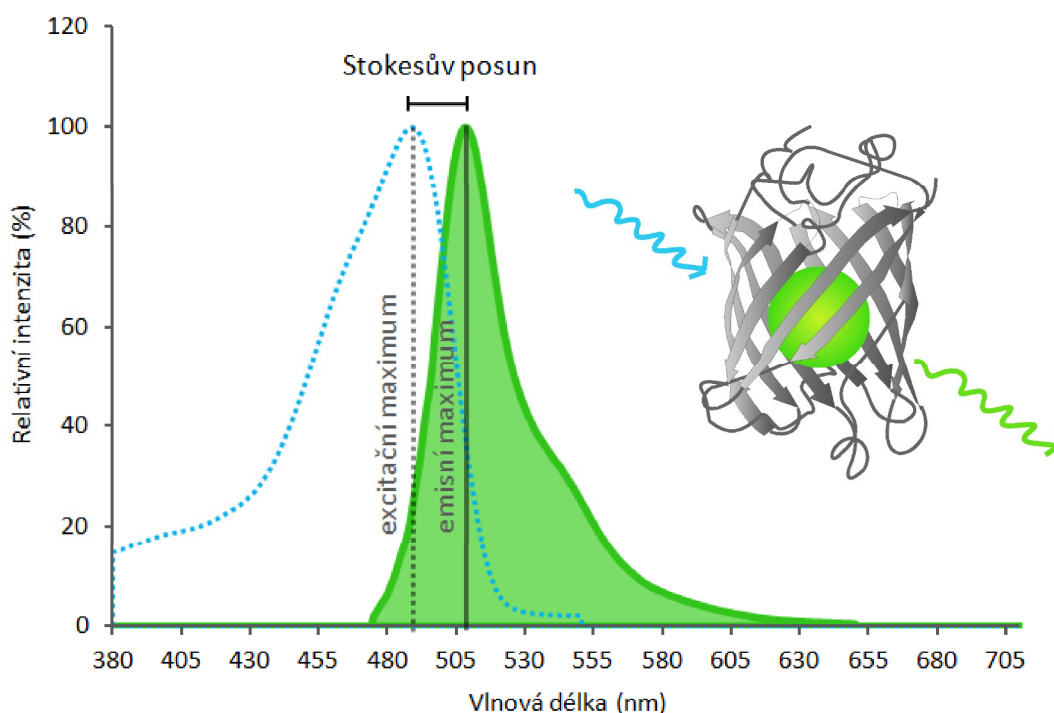
Na obrázku je schematicky znázorněn jeden z modelů významu membránových raftů v signalizaci GPCR. Po vazbě agonisty (červené kolečko) se receptor díky změně konformace transmembránových helixů „narovná“, čímž vystaví část hydrofobních aminokyselin vodnému prostředí buňky a extracelulárního prostoru. Energeticky je výhodnější, aby v tomto stavu asocioval s tlustší membránovou oblastí, kterou tvoří rafty a která tyto aminokyseliny „schová“. Zároveň je zde předpřipraven zbytek signalizační kaskády daného receptoru.

### 3.6. Vybrané fluorescenční techniky zkoumající dynamiku proteinů

#### 3.6.1. Fluorescence

Fluorescence patří do širšího okruhu luminiscenčních jevů. Jedná se v podstatě o tříkrokový proces zahrnující vybuzení (excitaci) elektronu, dobu, po kterou zůstává v excitovaném stavu (*lifetime*) a vyzáření (emisi) fotonu při návratu do základního energetického stavu (Daly a McGrath, 2003).

Fluorescenční sondy nejsou obvykle excitovány zářením (fotony) o jediné vlnové délce, ale spíše jejich určitým rozmezím. Z tohoto důvodu jsou fluorochromy (části molekul zodpovědné za fluorescenci) charakterizovány nikoli diskrétními hodnotami, ale tzv. excitačními a emisními spektry. Na těchto spektrech rozpoznáváme excitační a emisní maxima (takové hodnoty vlnových délek, při kterých maximum fluorochromů absorbuje nebo emituje foton) (Lakowicz, 2006). Protože jsou obvykle při excitaci i emisi využity stejné mechanismy energetických přechodů, většina fluorochromů vykazuje emisní spektrum, které je téměř zrcadlovým obrazem spektra excitačního (viz obrázek 13).



**Obrázek 13 | Excitační a emisní spektrum YFP (žlutého fluorescenčního proteinu)**

Na obrázku je zobrazeno excitační (tečkovaně) a emisní (plnou čarou) spektrum žlutého fluorescenčního proteinu. Rovněž je schematicky zakresleno excitační a emisní maximum a Stokesův posun.

Data získána z <http://www.lifetechnologies.com>

Typickým znakem fluorescence je tzv. Stokesův posun, který se projevuje emisí fotonu o vyšší vlnové délce (a tedy nižší energii), než je energie excitačního záření (viz obrázek 13 na předchozí straně). Tento fenomén je dán vyzářením části energie excitovaného stavu ve formě tepla při poklesu do nejnižšího vibračního stavu této energetické hladiny. Další zásadní charakteristikou každé fluorescenční sondy v daném prostředí je doba života excitovaného stavu (*lifetime*), který se obvykle pohybuje v řádech nanosekund (Ishikawa-Ankerhold a kol., 2012).

Velmi důležitým fenoménem, který je třeba zmínit, je tzv. foto-vybělení (*photobleaching*; dále jen „vybělení“). Při vybělení dochází k nevratnému zničení fluorochromu obvykle při delším ozáření silným zdrojem světla nebo při dlouhodobém vystavení sondy světlu. Obvykle je tento jev nežádoucí, ale některé aplikace (např. FRAP – viz dále) ho naopak s výhodou využívají (Daly a McGrath, 2003).

### 3.6.2. Zelený fluorescenční protein (GFP)

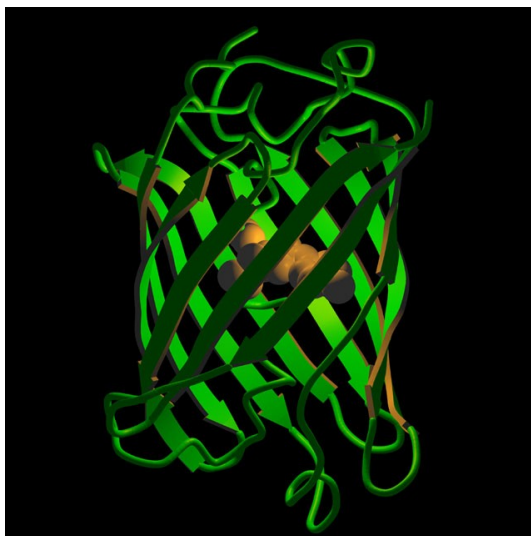
Objev zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) se datuje do roku 1961, kdy ho doktor Osamu Shimomura identifikoval jakožto vedlejší produkt při izolaci fluoreskujícího aequorinu z organismu *Aequorea victoria* (Shimomura, 2005). V následujících letech byly podobné proteiny objeveny i u dalších láčkovců – například *Obelia*, *Phialidium* a *Renilla* (Tsien, 1998).

GFP je protein obsahující 238 aminokyselin a vykazující relativní molekulovou hmotnost 26 888 (Prasher a kol., 1992). Jedná se o 42 Å vysoký  $\beta$ -barel tvořený 11 antiparalelními listy (viz obrázek 14 na str. 48), kterým uprostřed prochází  $\alpha$ -šroubovice, která obsahuje fluorochrom tvořený trojicí aminokyselin Ser-Tyr-Gly v pozici 65-67 (Ormö a kol., 1996). Tento protein vykazuje dvě absorpční maxima (ve vlnových délkách 396 nm a 476 nm) a rovněž dvě emisní maxima (508 nm pro excitaci 396 nm a 503 nm pro excitaci 476 nm), která odpovídají zelené části spektra (Heim a kol., 1994).

Hlavní předností GFP je schopnost zaujetí funkčního prostorového uspořádání bez potřeby jakýchkoli dalších proteinových kofaktorů, což bylo dokázáno expresí v organismech jako *Escherichia coli* nebo *Caenorhabditis elegans* s nerozlišitelnými spektrálními vlastnostmi fluorescenčního produktu (Chalfie a kol., 1994). Formování fluorochromu je tedy tzv. autokatalytické. Výjimku tvoří potřeba molekulárního kyslíku, který je nezbytný pro dokončení celého procesu. Za anaerobních podmínek je možné detekovat produkt odpovídající GFP, který však nevykazuje fluorescenci. Tu je možné indukovat zavedením kyslíku (Heim a kol., 1994). Nevýhodou je v tomto ohledu potřeba téměř celé aminokyselinové sekvence zeleného fluorescenčního proteinu pro zformování



fluoreskujícího produktu. Tato minimální sekvence byla stanovena na aminokyseliny 7-229 (Li a kol., 1997).



**Obrázek 14 | Terciární struktura GFP**

Podle <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>

Aby mohl být zelený fluorescenční protein použit jako vhodná fluorescenční značka mnohých proteinů, bylo třeba některé jeho vlastnosti vylepšit. Proto vznikla celá řada jeho mutant.

První skupinou jsou mutanty řešící jeho maturační nedostatky. *Wild-type* („divoký“) GFP totiž nejlépe zaujímá nativní konformaci při teplotách okolo 22 °C, což je však nevhodné pro expresi např. v savčích systémech. Variantou řešící tento problém byl např. tzv. *cycle3* GFP, který byl optimalizován pro expresi při 37 °C (Cramer a kol., 1996).

Dále bylo třeba vypořádat se se dvěma excitačními a emisními maximy. Toho bylo dosaženo záměnou threoninu za serin v pozici 65. Mutace S65T vykazovala jediné excitační (490 nm) a emisní (510 nm) maximum. Navíc byla touto mutací až šestkrát zesílena fluorescence a čtyřikrát zrychlena doba tvorby fluorochromu (Heim a kol., 1995). Zavedením další mutace (záměna fenylalaninu za leucin v pozici 64; F64L) byla fluorescence zesílena dokonce třicetkrát oproti *wild-type* GFP (Cormack a kol., 1996). Tak vznikla varianta označovaná někdy jako tzv. „vylepšený“ zelený fluorescenční protein (EGFP; *enhanced*).

V průběhu let byly mutagenézí připraveny varianty původního GFP, které mají posunuté spektrální charakteristiky do jiných vlnových délek, a tudíž emitují v jiných částech spektra než je pouze zelená (Tsien, 1998). Zásadní skupiny těchto proteinů (které jsou dále následnými úpravami optimalizovány pro nejrůznější účely) jsou shrnuty v tabulce 3 na následující straně.



### Tabulka 3 | Krátký přehled skupin barevných variant zeleného fluorescenčního proteinu včetně jejich základních spektrálních charakteristik

Mutace jsou pro přehlednost uváděny jednopísmenovými zkratkami pro aminokyseliny.

Upraveno podle Tsien, 1998

Protein	Klíčová mutace	Excitační maximum (nm)	Emisní maximum (nm)	Emitovaná barva
BFP	Y66H	384	448	modrá
CFP	Y66W	436	485	modro-zelená
GFP	-	395-397 470-475	504	zelená
EGFP	S65T, F64L	488	507-509	zelená
YFP	T203Y	512	522	žlutá

Pro posun do červené oblasti spektra bylo třeba využít fluorescenční protein jiného živočišného druhu – jmenovitě mořského korálu rodu *Discosoma* (Matz a kol., 1999). U této bílkoviny s názvem DsRed bylo třeba odstranit řadu nedostatků (mj. se jednalo o obligátní tetramer). To se podařilo zavedením 33 mutací, čímž vznikl monomerní červený fluorescenční protein mRFP1 (Campbell a kol., 2002).

Jakoukoli variantu GFP je možné pomocí vhodných technik genového inženýrství připojit na různá místa zkoumaného proteinu. Je však třeba dbát i na jiné faktory než je správný čtecí rámec vzniklé fúzní bílkoviny. V úvahu je třeba brát i funkčnost takového proteinu, a proto musí být místo vložení vybráno pečlivě a musí být provedeny kontrolní experimenty, zda fluorescenční protein zásadně neovlivňuje vlastnosti zkoumané bílkoviny (Daly a McGrath, 2003).

#### 3.6.3. FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*; „Obnovení fluorescence po foto-vybělení“)

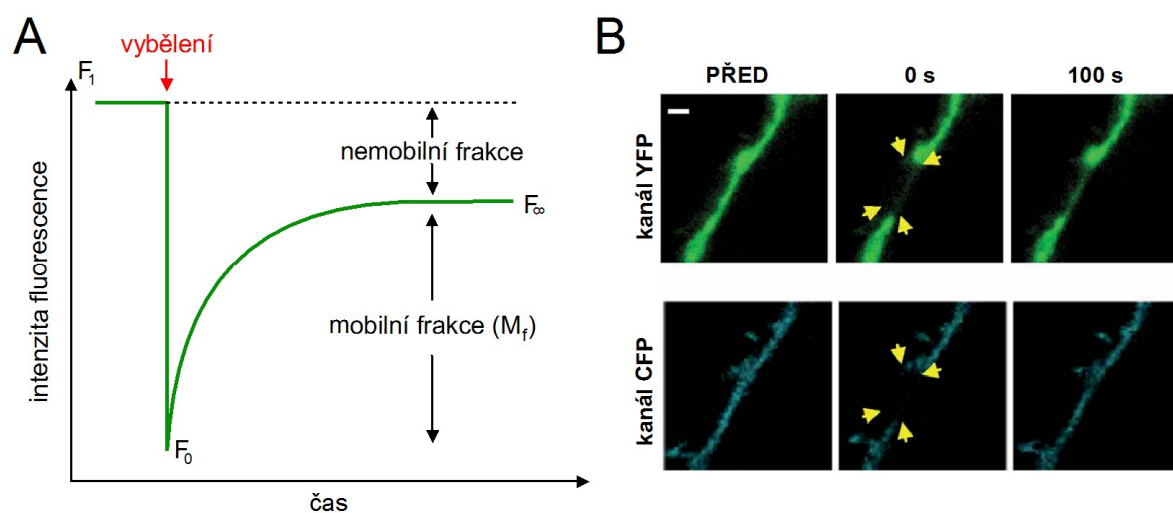
Základem metody FRAP je ozáření fluorescenčních molekul v malé definované oblasti vzorku silným laserovým paprskem, které způsobí nevratné poškození fluorochromu. Následuje sledování difuze okolních nevybělených molekul do této oblasti, což je prováděno sledováním vzorku při nízké intenzitě laseru. Zelený fluorescenční protein je pro tuto techniku obzvláště vhodný, protože vybělení fluorochromů je obecně často doprovázeno tvorbou nestabilních částic (např. radikálů kyslíku), avšak GFP „udrží“ tyto reaktivní částice uvnitř své dosti kompaktní barelové struktury.

Pomocí této metody je možné získat 2 kinetické parametry proteinů – difuzní koeficient ( $D$ ) a mobilní frakci molekul ( $M_f$ ). Mobilní frakce je množina fluorescenčně

značených molekul, které jsou schopny difundovat do vybělené oblasti. Pokud je její hodnota nižší než 100 %, část zkoumaných molekul je nějakým způsobem znehybněna (např. vázána na cytoskelet nebo membránové proteiny). Difuzní koeficient udává pohyblivost značené molekuly v daném prostředí. Zahrnuje jak vlastnosti objektu samotného, tak vlastnosti okolního prostředí. Difuzní koeficient volné částice v určitém objemu je definován na základě Stokes-Einsteionovy rovnice

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (3.1)$$

kde  $D$  je difuzní koeficient,  $T$  je absolutní teplota,  $\eta$  je hustota prostředí,  $k$  je Boltzmannova konstanta a  $R$  je hydrodynamický poloměr částice (Lippincott-Schwartz a kol., 2001).



**Obrázek 15 | Příklad měření metodou FRAP**

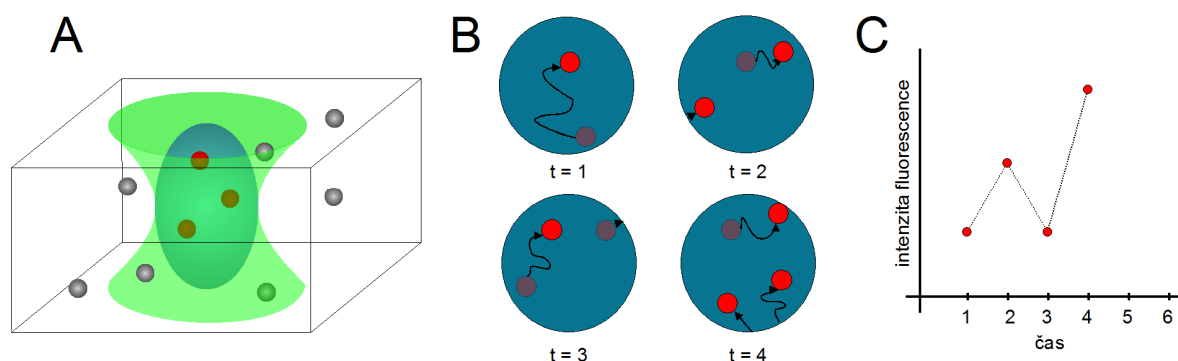
V části A je schematický graf měření metodou FRAP, který zachycuje intenzitu fluorescence jako funkci času ( $F_1$  – intenzita před vybělením;  $F_0$  – intenzita těsně po vybělení;  $F_\infty$  – intenzita po ustanovení rovnováhy obnovení fluorescence). V části B je ukázka konkrétního měření. V jedné buňce jsou přítomny  $\beta_1$ -adrenergní receptory ( $\beta_1$ -AR) značené na C-konci pomocí CFP a  $\beta_1$ -AR značené na N-konci pomocí YFP. Zároveň jsou přidány protilátky, které specificky znehybnují konstrukt YFP- $\beta_1$ -AR. Situace je zachycena ve 3 časových bodech – před vybělovacím pulzem (PŘED), těsně po něm (0 s) a 100 sekund po něm (100 s). V kanálu YFP je patrné, že díky znehybnění receptorů nedošlo k plnému obnovení fluorescence ve vyběleném místě. Naproti tomu v kanálu CFP je vidět téměř úplné obnovení fluorescence.

Upraveno podle Dorsch a kol., 2009

### 3.6.4. RICS (*Raster Image Correlation Spectroscopy*; „Korelační spektroskopie rastrových obrázků“)

Metoda RICS se v současnosti stává mocným nástrojem ve výzkumu dynamiky, koncentrace či agregace nejruznějších molekul. Nebyla však vystavěna „na zelené louce“, a proto je třeba se pro její lepší pochopení krátce ohlédnout do minulosti.

Základy korelačních technik byly položeny v 70. letech 20. století, kdy se zrodil model flukтуаčních spektroskopických technik – v tomto ohledu je důležitá tzv. fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Tato metoda byla zavedena pro měření koncentrace a stanovení difuzních koeficientů (Elson a Magde, 1974). V principu využívá měření kolísání (fluktuace) fluorescenční intenzity v malém definovaném objemu, který je určen objemem laserového paprsku procházejícího vzorkem (přesněji kombinací zaostřeného laserového paprsku a konfokální štěrbinu, která je umístěna v detekční části mikroskopu – pozn. autora). Tyto výkyvy mohou být způsobeny pohybem fluorescenčně značených částic přes sledovaný objem, konformačními změnami nebo obecně změnami v excitačně-emisních vlastnostech během pozorování. Následně jsou data získaná v jednotlivých časových intervalech vzájemně korelována. Zjednodušené schéma měření pomocí této metody je zachyceno na obrázku 16.



**Obrázek 16 | Schematické znázornění principu metody FCS**

V části A je schematicky zakresleno snímání difuze fluorescenční sondy v roztoku. Zeleně je znázorněn laserový paprsek, modře měřený objem, šedivé jsou sondy, které v aktuální čas nejsou měřeny, a červeně sondy, které jsou právě detekovány metodou FCS. V části B je zachycen pohled shora ve 4 časových intervalech (tmavě červeně je znázorněna pozice konkrétní sondy na konci předchozího časového intervalu), které jsou následně „vyneseny“ v grafu v části C.

Tato metoda může být aplikována na živé buňky, ale měření probíhá pouze v předem zvoleném místě, a tudíž může být zatížena velkou chybou už při samotném výběru místa měření. Dalším problémem je poměrně rychlé vybělení fluorochromů při nepřerušovaném

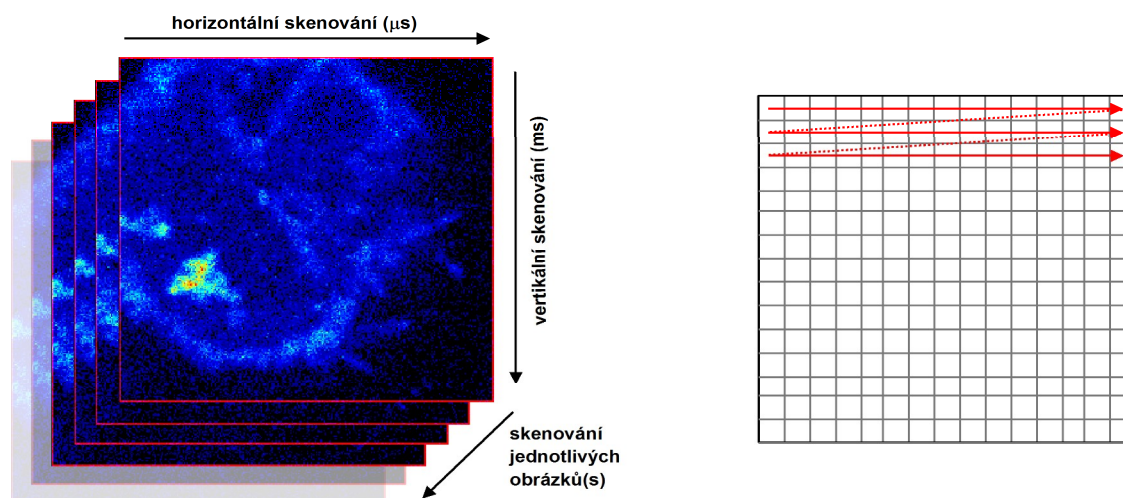
osvětlení vzorku. Celkově je metoda FCS vhodná spíše pro malé molekuly a nízké koncentrace fluorescenčních látek (typicky přibližně nanomolární). V neposlední řadě je pro tuto techniku potřeba poměrně drahé a specializované vybavení, což výrazně omezuje spektrum uživatelů (Digman a kol., 2013).

V roce 1993 byl publikován článek, který výrazně rozšířil možnosti korelační spektroskopie. Autoři se rozhodli použít principu FCS, ale místo závislosti fluorescenční intenzity na čase využili závislost prostorovou. Tato technika byla pojmenována obrazová korelační spektroskopie (*Image Correlation Spectroscopy*, ICS). Využívá data získaná pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy*; CLSM) – tj. obrázky celých objektů (buněk), případně několika objektů (buněk) najednou. To umožňuje celistvou analýzu celého systému, oproti předem definovanému malému prostoru, který využívá FCS. Navíc dostupnost ICS je daleko příznivější, jelikož vyžaduje pouze skenovací konfokální mikroskop, který je na většině pracovišť již běžně k dispozici (Petersen a kol., 1993).

Teorie ICS byla vyvinuta za předpokladu, že se v době pořizování obrázků nic nehýbe a byla aplikována hlavně na fixované preparáty nebo na velmi pomalu se pohybující transmembránové proteiny nebo na proteiny asociované s cytoskeletem. V následujících letech však byla nejrůznějším způsobem rozšiřována (Rossow a kol., 2010). Jedním z rozšíření byl například přístup časové obrazové korelační spektroskopie (*Temporal Image Correlation Spectroscopy*; TICS), při které je autokorelační funkce počítána ze série obrázků pořízených v různých časech (Brown a kol., 2008).

Metoda RICS byla uveřejněna roku 2005 a na ICS přímo navazuje (Digman a kol., 2005). Jejím zásadním rozdílem je pořizování obrázků vzorku, které je označováno jako rastrování, za pomoci rychlé skenovací jednotky (tzv. Galvano skener – pozn. autora). První je sejmut pixel vlevo nahoře obrázku, následně laser a skener projíždějí vzorek až na konec 1. řádky pixelů, kde se laser vypíná a skenování se vrací na první pixel 2. řádku, kde se celá situace opakuje až do dosažení pixelu úplně vpravo dole (viz obrázek 17 na str. 53). Pro následné kalkulace je naprosto zásadní kontrolovat nastavení velikosti pixelů, času, po který je daný pixel snímán, a času, který je potřeba pro sejmutí celé jedné řádky. Na obrázku pak rozlišujeme tzv. rychlou vodorovnou osu, která snímá jeden pixel za druhým, a pomalou svislou osu, která poskytuje informace o změnách intenzity fluorescence mezi jednotlivými řadami pixelů. Použití tohoto uspořádání měření umožňuje na jediném obrázku prostorově a časově rozlišovat fluktuace v intenzitě fluorescence, a to ještě v různých časových škálách – ve vodorovné ose v řádu mikrosekund, v horizontální ose v řádu milisekund (Rossow a kol., 2010). Při kombinaci s technikou TICS je při korelaci jednotlivých obrázků

pořízených v časové sérii získáno také časové rozlišení v řádu sekund (či delších časových intervalech) (Brown a kol., 2008).



**Obrázek 17 | Jednotlivé osy časového rozlišení RICS a způsob rastrového snímání**

Vlevo je schematicky znázorněno, v jakých směrech se snímají konkrétní časové škály rozlišení. Vpravo je zobrazen princip rastrového skenování (plná čára – laser je zapnutý; přerušovaná čára – laser je vypnutý).

Informace o difuzních koeficientech a koncentracích látek jsou analýzou obrázků metodou RICS získávány ve dvou krocích – odstranění pozadí a obrazová korelace. Při odstraňování pozadí jsou potlačeny všechny nepohyblivé nebo pomalu se pohybující objekty (typicky např. membránové výběžky buněk, adheze, ...) metodou klouzavého průměru. Klouzavý průměr je zvolen proto, že živé buňky obvykle nejsou zcela stacionární a v průběhu měření se pohybují. Při tomto postupu je od konkrétního obrázku série odečtena průměrná hodnota několika obrázků před ním a za ním – např. když je pro výpočet klouzavého průměru využito 10 obrázků, pak je průměrná hodnota z obrázků 1-10 odečtena od obrázku 5. Z tohoto důvodu (a z důvodu dosažení lepšího poměru signál / šum) je při měření pořizováno obvykle 50-100 obrázků, i když informace v časových škálách mikrosekund a milisekund jsou plnohodnotně obsaženy v každém jednotlivém obrázku sekvence.

Obrazová autokorelace je prováděna na základě rovnice rovnice 3.2.

$$G(\xi, \psi) = \frac{\langle \delta I(x, y) \delta I(x + \xi, y + \psi) \rangle}{\langle I(x, y) \rangle^2} \quad (3.2)$$

kde  $G(\xi, \psi)$  je autokorelační funkce,  $I(x, y)$  je intenzita fluorescence v jednotlivých bodech (pixelech) obrázku,  $\xi$  a  $\psi$  jsou prostorové posuny (viz dále) a  $\delta I(x, y) = I(x, y) - \langle I(x, y) \rangle$ . Lomené závorky znamenají průměr ze všech  $x$  a  $y$  pozic

(Norris a kol., 2011). Důležitá je závislost pozice jednotlivého pixelu v obrázku na čase, ve kterém je snímán (viz rovnice 3.3 až 3.5).

$$\text{čas v pixelu } n = y \times \tau_l + x \times \tau_p \quad (3.3)$$

$$\xi = x \times \tau_p \quad (3.4)$$

$$\psi = y \times \tau_l \quad (3.5)$$

kde  $\tau_p$  je doba snímání jednoho pixelu a  $\tau_l$  je doba snímání jedné řádky pixelů na obrázku (Digman a kol., 2013).

Pro přehlednost ještě jednou uceleně uvedme, jaké jsou výhody RICS oproti klasické FCS. RICS analyzuje celé obrázky, nikoli pouze předem vybranou malou definovanou oblast vzorku. Navíc analýza probíhá až po skončení měření, což umožňuje lepší výběr oblastí zájmu. Pomocí metody RICS je možné korelovat pouze část obrázku, a získat tak distribuci difuzních koeficientů. Navíc měří hned v několika časových škálách (od mikrosekund až po minuty či hodiny). Při FCS je často velký problém s vybělováním vzorku. V neposlední řadě k provedení měření postačuje skenovací konfokální mikroskop, zatímco pro FCS jsou třeba drahé specializované přístroje.

V tabulce 4 jsou závěrem přehledně shrnuty základní možnosti měření dynamiky proteinů a jiných částic za pomoci výše zmíněných metod.

**Tabulka 4 | Srovnání metod zkoumajících dynamiku proteinů**

Upraveno podle Rossow a kol., 2010

Technika	Měření difuzních koeficientů ?	Měření vazby na další částice ?	Měření vazby na scaffold?	Přímé měření vazby?	Měření v živých systémech ?	Aplikace v živých systémech
<b>RICS</b>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	malé molekuly, cytosolické proteiny, transmembránové proteiny
<b>FRAP</b>	ANO	NE	NE	NE	ANO	proteinové agregáty, membránové proteiny
<b>FCS</b>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	malé molekuly
<b>TICS</b>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	velké proteinové agregáty, membránové proteiny

## 4. Cíle diplomové práce

Prvním cílem práce je stanovení vlivu deplece cholesterolu z plasmatické membrány pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu na mobilitu a membránové okolí TRH receptoru. Pro tuto problematiku budou zvoleny moderní metody fluorescenční mikroskopie CLSM, FLIM, FRAP a RICS.

Dalším cílem je porovnat výsledky získané metodami FRAP a RICS, protože zatímco metoda FRAP je již široce zavedenou metodou, RICS je metodou v biologii zcela novou.

Třetím, především metodickým, cílem je vyzkoušet různá uspořádání měření metodou FRAP a zhodnotit jejich případný vliv na výsledky pokusů.

Čtvrtým cílem je zavedení protokolu pro transfekce buněčné linie HEK293 pomocí látky Lipofectamine<sup>®</sup> Reagent v naší laboratoři a stanovení funkčnosti konstruktů DOR-ECFP a DOR-EYFP ve smyslu jejich schopnosti aktivovat příslušný G protein.

Jako příprava pro zavedení a použití metody FRET při analýze oligomerizace a konformačních změn DOR bude stanovena doba života excitovaného stavu fluorescenčních sond obsažených v transfekovaných konstruktech.

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Chemikálie a speciální vybavení

Pro přehlednost jsou všechny použité chemikálie a speciální vybavení uvedeny ve formě souhrnné tabulky 5.

#### Tabulka 5 | Chemikálie a speciální vybavení použité v této diplomové práci

Názvy jsou uvedeny často v anglickém jazyce, aby korespondovaly s položkami katalogů jednotlivých firem.

<b>Chemikálie / vybavení</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Katalogové číslo</b>
[ <sup>35</sup> S]GTPγS (spec. radioaktiv. 1250 Ci/mmol)	Perkin Elmer	NEG030H
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich	A3059
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche	11697498
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Lach-Ner	30182-AP0
DADLE	Sigma Aldrich	E7131
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich	D6429
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (bez fenolové červeně)	Sigma Aldrich	D1145
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	Sigma Aldrich	F9252
Gelatin (Type A: From porcine skin)	Sigma Aldrich	G2625
Geneticin Selective Antibiotic (G418)	Life Technologies	11811-031
HEPES	Sigma Aldrich	H3375
Kanamycin sulfate	Sigma Aldrich	60615-5G
L-Ascorbic acid	Sigma Aldrich	A5960
LB agar powder	Sigma Aldrich	L2897-250G
LB medium	Carl Roth	X268.1
Lipofectamine <sup>®</sup> Reagent	Life Technologies	18324-012
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich	M2393
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Penta	28010-31000
NaCl	Sigma Aldrich	S3014
NaOH	BDH	102524X
Newborn Calf Serum (NCS)	Life Technologies	26010-074
Nonidet <sup>™</sup> P 40 Substitute solution	Sigma Aldrich	98379



Nunc™ Cell Culture/Petri Dishes	NUNC	150350
Nunc™ Cell Culture Treated Flasks with Vent/Close Caps; Culture Area 80 cm <sup>2</sup>	NUNC	153732
Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass	NUNC	155411
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Life Technologies	31985-047
Pansorbin	Sigma Aldrich	507858
Paraformaldehyde	Sigma Aldrich	158127
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich	P4417-100TAB
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma Aldrich	P6407-5MG
Potassium sodium tartrate tetrahydrate (vinan sodno-draselný)	Sigma Aldrich	217255
Protein G Sepharose®, Fast Flow	Sigma Aldrich	P3296
Protilátky Gα <sub>i1</sub>	Mitchell a kol., 1989	
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen	12143
Rotiszint® eco plus	Carl Roth	0016.3
Sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	S2002
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma Aldrich	L3771
Trypsin-EDTA Solution	Sigma Aldrich	T4174
β-Cyclodextrin	Sigma Aldrich	C4805
Ethylenediamine tetraacetic acid·Na <sub>2</sub> -salt (EDTA)	SERVA	11280
Kyselina boritá (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Lach-Ner	10017-CP0
Trizma® base (Tris)	Sigma Aldrich	T6066-1KG

## 5.2. Kultivace buněčných linií

### 5.2.1. Buněčné linie

Pro pokusy byly využity buněčné linie HEK293 a VTGP.

Buněčná linie HEK293 byla připravena již v 70. letech 20. století transformací primární kultury lidských embryonálních ledvinných buněk fragmenty DNA adenoviru (Ad)5 (Graham a kol., 1977).

Buňky VTGP stabilně exprimují konstrukt TRH-R-EGFP a jsou původně odvozeny od buněk HEK293. Jedná se konkrétně o dlouhou izoformu potkaního TRH-R1. Tento klon stabilně exprimuje konstrukt přibližně ve 120 000 kopiích na buňku (Drmot a kol., 1998).

### 5.2.2. Podmínky kultivace

Buňky byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; D6429) obsahujícím 9% NCS (dále jen „kultivační médium“). Kultivace probíhala v inkubátoru ve vlhké atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub> a při teplotě 37 °C v kultivačních lahvích s plochou dna 80 cm<sup>2</sup>.

Pro zlepšení adhezivních vlastností buněk VTGP byla dna kultivačních lahví potažena 2% roztokem želatiny. Pro udržení stabilní exprese konstruktů TRH-R-EGFP v buňkách VTGP bylo do kultivačního média přidáváno antibiotikum geneticin ve finální koncentraci 800 µg/ml (koncentrace zásobního roztoku 80 mg/ml).

#### 5.2.2.1. Potažení dna kultivačních lahví želatinou

K potažení dna 20 kultivačních lahví bylo vysterilizováno 100 ml 2% roztoku želatiny a 200 ml deionizované vody. Do kultivačních lahví bylo napipetováno 5 ml roztoku želatiny, lahve byly uzavřeny a roztok byl rovnoměrně rozprostřen po dně lahve. Inkubace s želatinou probíhala jednu hodinu při laboratorní teplotě. Následně byl roztok želatiny odpipetován a každá lahev byla promyta 10 ml deionizované vody. Maximum vody bylo odsáto, lahve byly uzavřeny a vráceny do obalů až do použití.

### 5.2.3. Pasážování

Po dosažení konfluency 70-80 % byly buňky pasážovány. Z lahví bylo odsáto kultivační médium a buňky byly opláchnuty 1 ml roztoku 0,1% trypsinu a 0,5 mM EDTA v PBS (fosfátový pufr). Tento objem byl odpipetován a následně byly buňky inkubovány 1-2 minuty s čerstvým 1 ml roztoku 0,1% trypsinu a 0,5 mM EDTA v PBS, aby se buňky oddělily vzájemně a ode dna kultivační lahve. K buněčné suspenzi bylo přidáno vhodné množství kultivačního média a buňky byly mechanicky resuspendovány opakovaným pipetováním. Suspenze byla následně využita k počítání buněk, jejich nasazení na sklíčka či Petriho misky nebo byla rozdělena do nových kultivačních lahví pro další kultivaci.

### 5.2.4. Sklizení buněk

Pro biochemické analýzy buněčných preparátů je třeba poměrně velké množství buněčného materiálu. Proto byly buňky pro tyto experimenty pěstovány ve velkém množství (*large scale*) a po dosažení konfluency 70-90 % mechanicky sklizeny. Obvykle byla polovina lahví či Petriho misek (v případě transfekovaných buněk) inkubována s 10mM roztokem β-CDX a polovina ponechána jako buňky kontrolní (viz oddíl 5.3. Deplece cholesterolu).

Nádoby s buňkami byly umístěny do ledové lázně a po přidání 5 ml ledově vychlazeného PBS do něj byly mechanicky seškrábnuty škrabkou. Suspenze byly přeneseny do 50ml kónických zkumavek a centrifugovány 10 minut při 4 °C a 270 x g. Supernatant byl následně odlit, vzniklý pelet byl převeden do 1,5ml mikrozkušavky, zamražen v tekutém dusíku a následně uskladněn v -80 °C až do dalšího použití.

#### **5.2.5. Příprava buněčných preparátů pro experimenty**

Pro fluorescenční měření FRAP, FLIM a RICS byly buňky VTGP napěstovány na krycích sklíčkách dělených na 8 jednotlivých oddílů („komůrek“) potažených roztokem poly-D-lysinu ve vodě o koncentraci 0,1 mg/ml. Do jednotlivých oddílů na těchto sklíčkách bylo napipetováno 350 µl kultivačního média. Do tohoto objemu byl přidán takový objem buněčné suspenze, aby obsahoval 70 000 buněk (stanoveno počítáním buněk v Bürkerově počítací komůrce). Buňky byly následně kultivovány 2 dny a pak použity pro experimenty.

Pro transfekční pokusy byly buňky HEK293 nasazeny na kulatá krycí sklíčka o průměru 12 mm. Tato sklíčka byla předem odmaštěna 30ti-minutovou inkubací v ethanolu pro UV spektroskopii a následně vysterilizována. Až do fixace byla umístěna po jednom v jamkách 24-jamkové destičky. Do každé jamky se sklíčkem bylo přidáno 500 µl kultivačního média a takové množství buněčné suspenze, aby obsahovalo 70 000 buněk (rovněž stanoveno počítáním buněk v Bürkerově počítací komůrce). Buňky byly v destičce kultivovány v inkubátoru do druhého dne.

Při přípravě transfekovaných buněk pro experimenty stanovující vazbu [<sup>35</sup>S]GTPγS byly buňky nasazeny na 10cm Petriho misky. Do každé misky bylo přidáno 15 ml kultivačního média. V tomto případě bylo třeba nasadit 1 800 000 buněk na jednu misku (číslo bylo stanoveno přepočtem počtu buněk v jamce 24-jamkové destičky na kultivační povrch 10cm Petriho misky).

##### **5.2.5.1. Potažení dělených krycích sklíček poly-D-lysinem**

Do každého oddílu děleného krycího sklíčka bylo pipetováno 250 µl roztoku poly-D-lysinu ve vodě o koncentraci 0,1 mg/ml. Sklíčka byla zabalena do alobalu a inkubována na kývačce při laboratorní teplotě 1 hodinu. Po skončení inkubace byl roztok poly-D-lysinu odsát a oddíly byly dvakrát propláchnuty 500 µl deionizované vody. Nakonec bylo z oddílů odsáto maximum vody. Sklíčka byla ihned použita k nasazení buněk nebo byla zabalena do alobalu a skladována v lednici až do dalšího použití.

#### **5.2.5.2. Potažení kulatých 12mm krycích sklíčků poly-D-lysinem**

Do jamek 24-jamkové destičky byla sterilní pinzetou umístěna sterilní a odmaštěná krycí sklíčka (odmaštění 30 minut v 98% ethanolu pro UV spektroskopii před sterilizací). Do každé jamky se sklíčkem bylo pipetováno 500  $\mu$ l roztoku poly-D-lysinu ve vodě o koncentraci 0,1 mg/ml. Destička byla zabalena do alobalu a inkubována na kývačce při laboratorní teplotě 1 hodinu. Po skončení inkubace byl roztok poly-D-lysinu odsát a jamky byly dvakrát propláchnuty 1 ml deionizované vody. Nakonec bylo z jamek odsáto maximum vody. Destička byla ihned využita k nasazení buněk nebo byla zabalena do alobalu a skladována v lednici až do dalšího použití.

#### **5.2.5.3. Počítání buněk v Bürkerově počítací komůrce**

Pro potřebu nasazení srovnatelného počtu buněk pro experimenty mezi jednotlivými měřeními byly buňky ze suspenze připravené pasážováním počítány pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Komůrka byla očištěna a sestavena. Ke straně krycího sklíčka byla kápnuta kapka suspenze tak, aby se rovnoměrně roztáhla pod sklíčko. Byly počítány buňky ve 4 velkých čtvercích mřížky (tj. 4 mm<sup>3</sup>) a následně byl proveden přepočít na 1 ml buněčné suspenze.

#### **5.2.6. Fixace buněk**

V některých experimentech bylo třeba buněčné preparáty narostlé na 12mm krycích sklíčkách zafixovat. Ze všech jamek se sklíčky bylo odsáto kultivační médium a bylo nahrazeno 800  $\mu$ l 4% paraformaldehydu. Inkubace se 4% paraformaldehydem probíhala v digestoři 20 minut. Následně byla sklíčka ještě třikrát omyta 800  $\mu$ l PBS (inkubace vždy 10 minut). V případě barvení látkou Hoechst 33255 bylo toto fluorescenční barvivo přidáváno při druhém promytí do PBS (výsledná koncentrace 1  $\mu$ g/ml). Po uplynutí času třetí inkubace s PBS nebyl pufr odsát. Sklíčko bylo z jamky vytaženo pomocí pinzety, bylo opláchnuto v kádince s destilovanou vodou, osušeno položením hrany sklíčka na buničitou vatu a nakonec bylo položeno porostlou stranou do kapky montovacího média (90% glycerol v PBS) na odmaštěném a čistém podložním sklíčku. Přebytek montovacího média byl odstraněn pomocí filtračního papíru a krycí sklíčko bylo na podložním zafixováno pomocí bezbarvého laku na nehty, kterým bylo krycí sklíčko „obtaženo“. Získané trvalé preparáty buněk byly až do pozorování uskladněny v lednici.

### 5.3. Deplece cholesterolu

Pro depleci cholesterolu z plasmatických membrán buněk byl použit 10mM roztok  $\beta$ -cyclodextrinu v DMEM bez přidaného séra. Kultivační médium bylo odsáto a buňky byly opláchnuty malým množstvím média DMEM bez séra. Následně byly buňky inkubovány s roztokem  $\beta$ -CDX při 37 °C ve vlhčené atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> 30 minut. Ihned po uplynutí doby inkubace byly buňky přímo použity na mikroskopická pozorování (médium bylo v takovém případě vyměněno za DMEM bez séra a indikátoru) nebo byly mechanicky sklizeny.

### 5.4. FLIM

Měření probíhalo na konfokálním mikroskopu MicroTime 200 (PicoQuant, Německo). Měřenou veličinou byla doba života excitovaného stavu (*lifetime*) EGFP, ECFP či EYFP. Paralelně s obrázky distribuce dob života excitovaného stavu byly pořizovány obrázky intenzity fluorescence. Paprsek příslušného laseru byl zaměřen na vzorek zobrazený příslušným objektivem. Emisní a excitační světlo bylo odděleno dichroickým zrcátkem a fluorescenční signál byl veden do detekčního kanálu vybaveného příslušným filtrem a SPCM-AQR-14 detektorem (Perkin Elmer, Kanada) připojeným na jednofotonový počítačový systém PicoHarp 300 (PicoQuant, Německo). Obrázky byly pořizovány v rozlišení 200x200 pixelů (40x40  $\mu$ m). Konkrétní specifikace laserů, objektivů apod. použitých pro měření jednotlivých fluorescenčních sond jsou uvedeny v tabulce 6 na následující straně.

Průměrný *lifetime* ( $\tau_{dz}$ ) každého pixelu bylo možné určit z jednotlivých zhášecích křivek. Průměrná hodnota doby života excitovaného stavu byla vypočítána jako rozdíl těžiště fluorescenčního zhášení v jedné pozici skeneru a kompenzace (*offset*), který byl určen jako nejstrmější nárůst zhášení dle rovnice 5.1.

$$\tau_{dz} = \frac{\sum I_i t_i}{\sum I_i} - t_{offset} \quad (5.1)$$

kde  $\tau_{dz}$  znamená průměrný *lifetime* pro jednotlivý pixel,  $I_i$  intenzitu naměřenou v čase  $t_i$  a  $t_{offset}$  čas odpovídající náběžné hraně dohasínání.

Analýza obrazu byla provedena v programu FiJi (ImageJ). Na intenzitním obrázku dané buňky byla vybrána pouze plasmatická membrána a tento výběr byl uložen do ROI manageru. Následně byl tento výběr aplikován na „*lifetimový*“ obrázek té samé buňky. Z tohoto výběru byl vytvořen graf distribuce četností doby života excitovaného stavu (1 pixel = 1 hodnota  $\tau_{dz}$ ). Následně byla data přenesena z tabulkového editoru MS Excel do

programu GraphPad Prism 4.0 a graficky a statisticky zpracována na základě fitování na model Gaussova rozdělení. Výsledky v distribučních grafech byly normalizovány jako procenta nejvyšších hodnot daného výběru z důvodu vyšší grafické názornosti distribuce hodnot  $\tau_{dz}$  v jednotlivých měřeních.

### **Tabulka 6 | Konkrétní součástky mikroskopu použité pro měření hodnot $\tau_{dz}$ jednotlivých fluorescenčních sond**

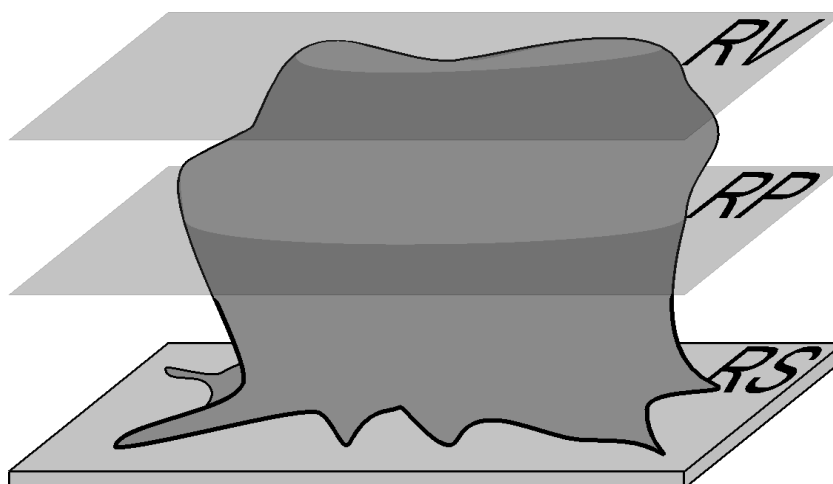
V tabulce jsou uvedeny konkrétní typy a specifikace laserů, objektivů a filtrů použitých pro detekci jednotlivých sond při měření metodou FLIM. NA znamená numerickou aperturu objektivu (tj. jeho světelnou účinnost).

	<b>EGFP</b>	<b>ECFP</b>	<b>EYFP</b>
<b>Laser</b>	LDH-P-C-470, 470 nm	LDH-P-C-440, 440 nm	Picota, 535 nm
<b>Objektiv</b>	1,2 NA, 60x; vodní imerze	1,35 NA, 60x, olejová imerze	1,35 NA, 60x, olejová imerze
<b>Filtr v detekčním kanálu</b>	515 ± 25 nm	480 ± 20 nm	585 ± 40 nm

## **5.5. FRAP**

### **5.5.1. Snímání obrázků**

Preparáty buněk VTGP byly měřeny na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 (Leica Microsystems). Obrázky byly snímány objektivem PL APO 100x/1.40-0.70 Oil s olejovou imerzí vyhřívaným na 37 °C rychlostí 800 Hz v rozlišení 512x512 pixelů při elektronickém zoomu 3,00 (tedy 49,99 x 49,99  $\mu\text{m}$ ) a barevné hloubce 12-bit. Při snímání buněk byl použit laser 488 nm nastavený na 12 % maximálního výkonu. Během fotovybělovacích (dále jen „vybělovacích“) pulzů byly nastaveny lasery 458, 476 a 488 nm na maximální výkon. Velikost štěrbin byla nastavena na 1,6 Airy pro dosažení lepšího poměru signál/pozadí. Emise EGFP byla snímána v rozmezí 500-600 nm. Při všech měřeních bylo pořízeno 15 obrázků před vybělením. Na samotné vybělování bylo použito 5 opakování laserových pulzů v režimu „zoom-in“ (tj. přístroj pracuje pouze v oblasti zájmu, čímž se výrazně zrychlí a zintenzivní celý proces). Po těchto pulzech bylo snímáno 120 obrázků. Čas potřebný pro sejmutí jednoho obrázku byl 0,823 sekund. Oblastí zájmu (ROI) byl kruh o průměru 3  $\mu\text{m}$  nebo 5  $\mu\text{m}$ . Snímání probíhalo v rovině průřezu buňkou (RP) nebo v rovině sklíčka (RS). Tyto roviny jsou schematicky znázorněny na obrázku 18 na str. 63. Buňky byly měřeny v komůrce vyhřívané na 37 °C a obsahující 5% CO<sub>2</sub> atmosféru.



**Obrázek 18 | Schematické znázornění řezů buňkou**

Jednotlivé roviny řezů jsou znázorněny kolmou plochou. RV je rovina vrcholu buňky (byla využita u pokusů měření metodou RICS – viz dále), RP je rovina průřezu buňkou a RS je rovina přichycení buněk ke sklíčku.

### 5.5.2. Analýza dat

Pomocí programu Leica LCS Lite byly z naměřených obrázků získány hodnoty intenzity fluorescence ve třech oblastech zájmu – v oblasti, kde bylo vybělováno (ROI), v oblasti obsahující celou buňku (CB) a v oblasti zachycující signál pozadí (POZ). Průměrné intenzity v těchto oblastech pro každý časový interval byly převedeny do MS Excel a dále zpracovávány. Při snímání v RP byla provedena ještě modifikovaná analýza, kdy byl v rámci kruhového ROI vytvořen ROI tvaru obdélníku pokrývající pouze oblast se signálem (tj. plasmatickou membránu). Rovněž oblast zájmu CB byla v tomto případě zúžena pouze na fluorescenční periferii buňky (tj. pouze plasmatickou membránu). Pro názorné schéma všech variant oblastí zájmu viz obrázek 22 na str. 76.

Až po výpočet mobilní frakce byla data zpracována dle Day a kol., 2012.

Dle dohodnuté konvence byl jako čas „0“ označen 1. obrázek po vybělování. Nejprve bylo třeba data korigovat na signál pozadí, vybělování během snímání obrázků a na ztrátu fluorescenčního signálu způsobenou vybělovacími pulzy. Tyto korekce byly provedeny na základě rovnice 5.2.

$$F(t)_{kor} = \frac{F(t)_{ROI(post)} - F(t)_{POZ}}{F(t)_{CB(post)} - F(t)_{POZ}} \quad (5.2)$$

kde  $F(t)_{ROI(post)}$  je intenzita fluorescence ve vybělované oblasti v čase  $t$  po vybělovacích pulzech,  $F(t)_{CB(post)}$  je intenzita fluorescence v rámci celé buňky v čase  $t$  po vybělovacích pulzech a  $F(t)_{POZ}$  je intenzita fluorescenčního signálu pozadí v čase  $t$ .

Pro výpočet mobilní frakce bylo třeba data znormalizovat na hodnotu fluorescence před vybělením dle vztahu 5.3.

$$F(t)_{norm} = F(t)_{kor} \times \frac{F_{CB(pre)}}{F_{ROI(pre)}} \quad (5.3)$$

$$F_{CB(pre)} = \frac{\sum_{t_{0-15}} (F(t)_{CB} - F(t)_{POZ})}{15} \quad (5.4)$$

$$F_{ROI(pre)} = \frac{\sum_{t_{0-15}} (F(t)_{ROI} - F(t)_{POZ})}{15} \quad (5.5)$$

kde  $F_{CB(pre)}$  je průměrná hodnota intenzity fluorescence před vybělovacími pulzy v rámci celé buňky (viz rovnice 5.4) a  $F_{ROI(pre)}$  je průměrná hodnota intenzity fluorescence před vybělovacími pulzy uvnitř ROI (viz rovnice 5.5),  $t_{0-1}$  označuje poslední obrázek před vybělovacími pulzy a  $t_{0-15}$  15. obrázek před vybělovacími pulzy (tedy první obrázek celkové série).

Samotná mobilní frakce byla vypočítána dle rovnice 5.6.

$$M_f = \frac{(F_\infty - F_0)}{(F_i - F_0)} \times 100 \quad (5.6)$$

kde  $F_\infty$ ,  $F_0$  a  $F_i$  jsou normalizované intenzity fluorescence uvnitř ROI po dosažení rovnováhy (viz rovnici 5.7), ihned po vybělovacích pulzech (tj. v čase  $t = 0$ ) a před samotným vybělováním (viz rovnici 5.8).

$$F_\infty = \frac{\sum_{t_{0+99}}^{t_{0+119}} F(t)_{norm}}{20} \quad (5.7)$$

$$F_i = \frac{\sum_{t_{0-15}} F(t)_{norm}}{15} \quad (5.8)$$

$t_{0+99}$  a  $t_{0+119}$  označují 100. a 120. obrázek po vybělení.

Pro výpočet relaxačního času a následně difuzního koeficientu bylo třeba normalizovaná data ještě jednou znormalizovat dle vztahu 5.9 (tentokrát na maximální intenzitu fluorescence dosaženou po obnovení fluorescence).

$$F(t)_{2 \times norm} = \frac{F(t)_{norm} - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (5.9)$$



Takto dvojitě normalizovaná data byla fitována pomocí programu MATLAB 7.10 na model uvažující dvojrozměrnou difuzi (viz rovnici 5.10) (Soumpasis, 1983).

$$I_{2 \times \text{norm}} = e^{\frac{-2\tau}{t}} \left[ I_0\left(\frac{2\tau}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau}{t}\right) \right] \quad (5.10)$$

kde  $\tau$  je relaxační čas a  $I_0$  a  $I_1$  jsou modifikované Besselovy funkce nultého a prvního řádu. Získané hodnoty  $\tau$  byly následně dosazeny do rovnice 5.11.

$$D_{zd} = \frac{\omega^2}{4\tau} \quad (5.11)$$

kde  $\omega$  je průměr vybělovaného kruhu a  $D_{zd}$  je zdánlivý difuzní koeficient.

Získané hodnoty mobilních frakcí ( $M_f$ ) a zdánlivých difuzních koeficientů ( $D_{zd}$ ) byly nakonec statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 4.0 pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %.

Aby mohlo být učiněno rozhodnutí, zda zvolit modifikovanou (obdélníkové ROI) nebo nemodifikovanou (kruhové ROI) analýzu buněk snímaných v rovině průřezu buňkou, byl při těchto měřeních stanovován poměr signál/pozadí. Ten byl vypočítán jako poměr intenzit fluorescenčního signálu uvnitř ROI (kruhové nebo obdélníkové) a uvnitř oblasti zachycující signál pozadí pro posledních 20 snímků každé série (z kterých byl vypočítán průměr). Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 4.0 pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %.

## 5.6. RICS

Připravené preparáty živých buněk (transfekovaných HEK293 nebo VTGP) byly pozorovány na konfokálním mikroskopu Olympus Fluoview 1000 (Olympus, Japonsko) vybaveným objektivem s vodní imerzí (1,2 NA, 60x). Stolek mikroskopu byl umístěn v komůrce vyhřívané na 37 °C. K excitaci EGFP byl využit diodový laser 470 nm LDH-P-C-470 (PicoQuant, Německo) v kontinuálním vlnovém módu a před detektorem byl umístěn „*long-pass*“ filtr Q500LP propouštějící světlo o vlnové délce delší než 500 nm. Pro excitaci EYFP byl použit Helium-neonový laser 543 nm a v detekčním kanálu byl umístěn filtr BP filter 585/50. Během RICS měření bylo při každém snímání pořízeno 100 obrázků v rozlišení 256x256 pixelů. Rychlost skeneru podél rychlé a pomalé osy byla 10  $\mu\text{s}/\text{pixel}$  a 3,68 ms/řádek. Vzdálenost mezi kroky skeneru byla 50 nm. Buňky byly v předpokusu snímány v RS, RP i RV. V „ostrých pokusech“ pak již pouze v rovině sklička (RS). Před každým experimentem byla ověřena funkčnost měření stanovením difuzního koeficientu vodného roztoku sondy Alexa 488.

Naměřená data byla zpracována pomocí programu SimFCS 2.0. Vybělení a pomalé pohyby vzorku byly vyloučeny odečtením klouzavého průměru 4 obrázků. Autokorelační funkce je definována dle rovnice 5.12.

$$G(\xi, \psi) = \frac{\langle \delta I(x, y) \delta I(x + \xi, y + \psi) \rangle}{\langle I(x, y) \rangle^2} \quad (5.12)$$

kde  $G(\xi, \psi)$  je autokorelační funkce,  $I(x, y)$  je intenzita fluorescence v jednotlivých bodech (pixelech) obrázku,  $\xi$  a  $\psi$  jsou prostorové posuny (viz str. 54) a  $\delta I(x, y) = I(x, y) - \langle I(x, y) \rangle$ . Lomené závorky znamenají průměr ze všech  $x$  a  $y$  pozic.

Získaná autokorelační funkce  $\psi$  byla následně fitována na model odvozený od difuze v dvojrozměrných systémech (viz rovnice 5.13).

$$G(\xi, \psi) = \frac{\gamma}{N} \left( 1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{\omega_0^2} \right)^{-1} \quad (5.13)$$

kde  $\gamma$  představuje nerovnoměrné osvětlení excitovaného objemu a je rovno 0,5 pro Gaussovu funkci distribuce bodů,  $N$  je průměrné množství molekul v ohniskovém objemu,  $D$  je difuzní koeficient,  $\tau_p$  je doba snímání 1 pixelu a  $\tau_l$  je doba snímání jedné řádky pixelů obrázku a  $\omega_0$  průměr laserového paprsku v místě zaostření.

Jako další parametr je k hodnotám difuzního koeficientu udáván poměr  $G_0V/G_0H$ . Tento poměr udává, zda se v mobilitě zkoumané molekuly odráží rovněž přechodná vazba. Blíží-li se tato hodnota jedné, molekuly volně difundují.

Naměřená data byla statisticky zpracována v programu GraphPad Prism 4.0 a hodnoty mezi experimentálními skupinami byly porovnány pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %.

## 5.7. Pozorování fixovaných buněk na konfokálním mikroskopu

Fixované buněčné preparáty byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu Leica SPE. Při těchto pokusech byly pozorovány  $\delta$ -opioidní receptory fúzně značené na C-konci pomocí EYFP či ECFP, případně konstrukt TRH-R-EGFP. Mikroskop bylo možné nastavit na libovolné množství kanálů. Společně s kanály pro fluorescenční sondy byl využit rovněž kanál snímání v procházejícím světle pro lepší orientaci při hledání vhodných buněk. Velikost štěrbin byla nastavena na 1 Airy. Obrázky byly snímány objektivem ACS APO 40,0 x 1,15 OIL s olejovou imerzí rychlostí 600 Hz při rozlišení 1024x1024 pixelů (183,33 x 183,33  $\mu\text{m}$ ). Výsledné obrázky byly výsledkem průměrování 4-6 jednotlivých

obrázků (kvůli eliminaci signálu pozadí). Excitační a emisní podmínky pro jednotlivé sondy jsou uvedeny v tabulce 7.

Získané obrázky byly zpracovány pomocí programu Leica LAS AF Lite 2.6.3. Hodnocení úspěšnosti transfekce bylo provedeno v programu FiJi za využití pluginu „Cell Counter“ jako poměr transfekovaných buněk z celkového počtu buněk na obrázku a statisticky zpracováno v programu GraphPad Prism 4.0 s využitím jednocestné ANOVA metody s intervalem spolehlivosti 95 %.

**Tabulka 7 | Nastavení mikroskopu použitá pro snímání jednotlivých fluorescenčních sond**

Sonda	Excitační laser	Výkonu laseru (%)	Snímaná emise
ECFP	405 nm	12 %	460-505 nm
Hoechst 33255	405 nm	10-15 %	410-435 nm
EGFP	488 nm	25 %	495-555 nm
EYFP	488 nm	20 %	540-590 nm

## 5.8. Transfekce buněčných linií

### 5.8.1. Plasmidy

Vektory použité pro transfekce byly připraveny a laskavě poskytnuty laboratoří prof. Marca Parentiho (Univerzita Miláno-Bicocca, Itálie) v rámci spolupráce s naší laboratoří. Inzertem je sekvence pro dlouhou verzi potkaního DOR. Tento inzert byl vložen do plasmidů pECFP-N1 a pEYFP-N1 pomocí restriktáz EcoR I a BamH I. Díky této manipulaci plasmidy produkují  $\delta$ -opioidní receptor, který je na C-konci označen pomocí ECFP či EYFP (výsledné konstrukty jsou dále zjednodušeně označovány jako „DOR-ECFP“ a „DOR-EYFP“).

### 5.8.2. Pomnožení a izolace plasmidů

#### 5.8.2.1. Transformace bakterií

Pro pomnožení plasmidů byly použity kompetentní bakterie Top10. Ke 100  $\mu$ l bakteriální suspenze byl přidán 1  $\mu$ l plasmidu (koncentrace 500  $\mu$ g/ml) a získaná suspenze byla lehce promíchána pipetou. Mikrozkuřavky byly inkubovány na ledu 30 minut. Následně byl aplikován tepelný šok (37  $^{\circ}$ C; 45 sekund). Mikrozkuřavky byly ihned po tepelném šoku umístěny na led a následně bylo přidáno 400  $\mu$ l LB média vytemperovaného na 37  $^{\circ}$ C. Mikrozkuřavky byly umístěny na 1 hodinu do třepací lázně

vyhříváné na 37 °C. Pro každý plasmid byly vytvořeny 2 kultivační misky s pevným LB médiem obsahujícím kanamycin (koncentrace 50 µl/ml). Misky byly kultivovány při 37 °C přes noc. Pomocí sterilní žluté pipetovací špičky bylo do připravených zkumavek s 5 ml sterilního tekutého LB média a kanamycinem (koncentrace 50 µl/ml) pro každý plasmid přeneseno malé množství biomasy bakterií a zkumavky byly kultivovány přes noc ve třepací lázni při 37 °C.

Z těchto zkumavek byl připraven „*glycerol-stock*“ bakterií obsahujících daný plasmid přidáním 880 µl narostlé bakteriální suspenze ke 120 µl sterilního glycerolu. Obsah mikrozkušavek byl promíchán a mikrozkušavky byly umístěny do -80°C mrazáku.

#### **5.8.2.2. Kultivace bakterií, izolace plasmidů, ověření jejich čistoty a stanovení koncentrace**

Z připravených „*glycerol-stocků*“ pro jednotlivé plasmidy bylo pomocí seškrábnutí přeneseno malé množství biomasy do příslušných zkumavek s tekutým LB médiem a kanamycinem. Zkušavky byly uzavřeny (ale tak, aby propouštěly vzduch) a inkubovány ve vodní třepací lázni 11 hodin při 37 °C. Následně bylo přidáno 150 µl z narostlých bakteriálních kultur do příslušných 500ml Erlenmayerových baněk se 100 ml sterilního LB média, do kterého byl těsně před přidáním buněk přidán kanamycin (výsledná koncentrace 50 µl/ml). Baňky byly kultivovány ve třepací lázni 16 hodin při 37 °C.

Narostlé kultury byly rozděleny po 25 ml do 50ml kónických zkumavek. Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kitu.

Ověření čistoty izolovaných plasmidů bylo provedeno pomocí horizontální agarózové elektroforézy (1% agarózový gel v TBE pufru – 100 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, pH = 8,0; napětí 7V/cm gelu; trvání 1 hodina; barvení pomocí ethydiumbromidu) a přístroje NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer ND-1000, kdy byly stanovovány standardizované poměry absorbancí A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> a A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>. Pomocí zmiňovaného přístroje byla rovněž určena koncentrace izolovaných plasmidů.

#### **5.8.3. Transfekce**

K transfekci buněk HEK293 byla zvolena lipofekční metoda využívající Lipofectamine<sup>®</sup> Reagent (dále jen „lipofectamin“) jakožto transfekční látku.

Transfekce byla prováděna ve dvou uspořádáních – pro účely konfokální mikroskopie v jamkách 24-jamkové destičky obsahujících 12mm sklíčko a pro biochemické analýzy konstruktů v 10cm Petriho miskách. Množství chemikálií bylo analogické v obou případech, pouze bylo dle instrukcí výrobce přepočítáváno na větší kultivační plochu Petriho

misek. Nasazení buněk pro experimenty je popsáno v samostatném oddílu (5.2.5 Příprava buněčných preparátů pro experimenty). Následující postup je popsán obecně, konkrétní objemy jednotlivých látek jsou shrnuty v tabulce 8.

Pro všechny reakce byl poměr DNA : lipofectamin 1:3. DNA a lipofectamin byly naředěny v samostatných zkumavkách v médiu OPTI-MEM. Roztok DNA v OPTI-MEM byl přenesen do zkumavky s naředěným lipofectaminem. Vzniklý komplexační roztok byl lehce promíchán nasátím a vypuštěním z pipety a byl inkubován při laboratorní teplotě 30 minut. Následně byl komplexační roztok naředěn médiem OPTI-MEM. Z jednotlivých nádob s narostlými buňkami bylo odsáto kultivační médium a bylo nahrazeno kultivačním médiem bez séra. Do jednotlivých nádob byl pipetován roztok „naředěných komplexů“. Nádoby byly lehce promíchány pohybem dopředu/dozadu a doleva/doprava a byly inkubovány při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře 5 hodin. Po skončení inkubace bylo k buňkám přidáno kultivační médium s dvojnásobným množstvím séra než obvykle. Petriho misky byly následně kultivovány v inkubátoru 48 hodin a pak sklizeny. Destičky se sklíčky byly kultivovány v inkubátoru 24, 48 či 72 hodin a pak byly buňky na sklíčkách zafixovány.

**Tabulka 8 | Konkrétní množství látek v lipofekčním postupu**

Údaje pro 1 jednotku	24-jamková destička	10cm Petriho miska
<b>Objem kultivačního média</b>	500 µl	15 ml
<b>Počet nasazených buněk</b>	70 000	1 800 000
<b>Poměr DNA:lipofectamin</b>	1:3	
<b>Množství DNA</b>	0,2 µg	10 µg
<b>Množství lipofectaminu</b>	0,6 µl	30 µl
<b>Objem roztoku DNA v OPTI-MEM</b>	25 µl	0,8 ml
<b>Objem roztoku lipofectaminu v OPTI-MEM</b>	25 µl	0,8 ml
<b>Výsledný objem komplexačního roztoku</b>	25 + 25 = 50 µl	0,8 + 0,8 = 1,6 ml
<b>Objem OPTI-MEM k naředění komplexů</b>	150 µl	1,6 ml
<b>Výsledný objem naředěných komplexů</b>	50 + 150 = 200 µl	1,6 + 1,6 = 3,2 ml
<b>Objem kultivačního média bez séra</b>	200 µl	3,2 ml
<b>Výsledný objem „transfekčního média“</b>	200 + 200 = 400 µl	3,2 + 3,2 = 6,4 ml
<b>Objem kultivačního média s 2xNCS</b>	400 µl	6,4 ml

## 5.9. Vazba [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S a imunoprecipitace

### 5.9.1. Použité pufrы

<u>Solubilizační pufr</u>	<u>Inkubační pufr (10x)</u>	<u>Adsorpční pufr</u>
100 mM Tris	200 mM HEPES	2% BSA
200 mM NaCl	30 mM MgCl <sub>2</sub>	0,1% NaN <sub>3</sub>
1 mM EDTA	1 M NaCl	směs inhibitorů proteáz
1,25% NP 40	pH = 7,4	(cOmplete)
pH = 7,4		H <sub>2</sub> O
		pH = 7,4

### 5.9.2. Homogenizace sklizených buněk

Sklizené buňky byly ručně homogenizovány v 0,5 – 1,0 ml ledového solubilizačního pufru s přidanými nespecifickými inhibitory proteáz pomocí sklo-teflonového homogenizátoru asi 3 minuty.

### 5.9.3. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v preparátech homogenizovaných buněk byla stanovována modifikovanou metodou dle Lowryho (Lowry a kol., 1951). Jako standard pro stanovení kalibrační křivky (pro odečtení koncentrace ve vzorcích) byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Do zkumavek bylo pipetováno 3 – 10  $\mu$ l vzorků a objem byl v každé zkumavce doplněn vodou na 500  $\mu$ l. Byly smíchány roztoky A (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,1 M NaOH), B (2% vinan sodno-draselný) a C (1% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) v poměru 50:1:1 a 1,5 ml tohoto roztoku bylo přidáno do každé zkumavky. Zkumavky byly inkubovány při laboratorní teplotě 15 minut. Po skončení inkubace bylo do každé zkumavky přidáno 150  $\mu$ l Folinova činidla čerstvě naředěného vodou (v poměru 1:1), obsah zkumavek byl promíchán a inkubován přesně 30 minut při laboratorní teplotě. Absorbance vzorků byla měřena (v triplicátech) pomocí přístroje Eppendorf BioPhotometer plus při vlnové délce 595 nm. Získaná data byla hodnocena programem GraphPad Prism 4.0. Kalibrační křivka byla stanovena pomocí polynomické regrese dle rovnice  $y = ax^2 + bx + c$ .

### 5.9.4. Vazba [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S a imunoprecipitace

Schopnost receptoru stimulovat proteiny vázající GTP byla měřena pomocí agonistou stimulované vazby [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, což je G proteiny nehydrolyzovatelný analog GTP. 30  $\mu$ l vzorků homogenizovaných buněk (tj. asi 200  $\mu$ g bílkoviny) bylo inkubováno v 1,5ml mikrozkuvkách s [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (4.10<sup>5</sup> dpm/vzorek) ve finálním objemu 100  $\mu$ l

reakční směsi (20 mM HEPES, pH = 7,4; 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 2 μM GDP, 0,2 mM kyselina askorbová) s agonistou δ-opioidního receptoru DADLE (koncentrace 10<sup>-5</sup> M), nebo bez něj (stanovení bazální aktivity) po dobu 15 minut při 30 °C (veškerá příprava až do umístění zkumavek do vyhřívané lázně probíhala v lázni ledové). Reakce byla zastavena přidáním 500 μl ledově vychlazeného inkubačního pufru. Zkumavky byly centrifugovány 15 minut při 20 000 x g a 4 °C. Supernatant byl odpipetován a k peletu bylo přidáno 50 μl ledového solubilizačního pufru s přidaným 0,2% SDS a inhibitory proteáz. Zkumavky byly intenzivně promíchány a vzorky byly přečištěny inkubací s adsorpčním pufrem s pansorbinem (40 μl adsorpčního pufru + 20 μl pansorbinu) 1 hodinu při 4 °C na pomalu se otáčejícím kotouči. Mikrozukumavky byly centrifugovány (20 000 x g, 4 °C, 2 minuty) a supernatanty byly přeneseny do nových 1,5ml mikrozukumavek obsahujících 40 μl protein G sefarózy (naředěné v poměru 1:5 v adsorpčního pufru) a 3 μl protilátek proti Gα<sub>i1</sub>. Mikrozukumavky byly inkubovány na rotujícím kotouči při 4 °C přes noc. Mikrozukumavky byly následně centrifugovány (20 000 x g, 4 °C, 2 minuty) a pelety byly dvakrát promyty solubilizačním pufrem. Po promytí byly supernatanty odstraněny a do mikrozukumavek byl přidán 1 ml scintilačního pufru. Obsah mikrozukumavek byl promíchán, každá mikrozukumavka byla umístěna do scintilační lahvičky a byla změřena radioaktivita [<sup>35</sup>S] ve vzorcích metodou kapalné scintigrafie. Každý vzorek byl připravován a měřen v triplikátu. Výsledné hodnoty byly vztaženy na hmotnostní jednotku proteinu stanovenou Lowryho metodou.

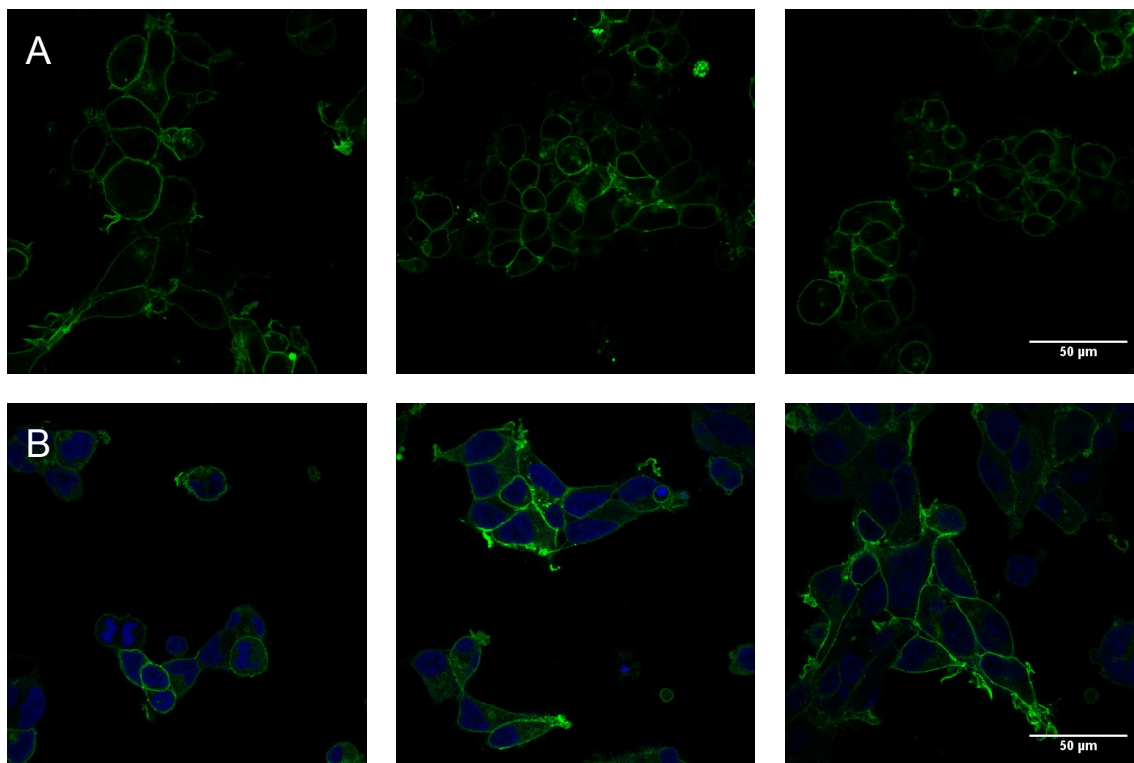
Naměřená data byla statisticky zpracována v programu GraphPad Prism 4.0 a hodnoty mezi experimentálními skupinami byly porovnány pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %.

## 6. Výsledky

### 6.1. VTGP buňky

#### 6.1.1. VTGP buňky v konfokálním mikroskopu

Buňky VTGP byly zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu a z obrázku 19 je patrné, že fluorescenční signál konstruktů TRH-R-EGFP je soustředěn na plasmatické membráně. Důkazem stability linie VTGP je fakt, že se v části B nevyskytují žádná buněčná jádra, která by nebyla obklopena signálem EGFP na plasmatické membráně.



**Obrázek 19 | Buňky VTGP**

Na obrázku jsou zobrazeny fixované preparáty buněk VTGP. V části A jsou buňky s nebarvenými buněčnými jádry, v části B jsou pak buněčná jádra obarvena látkou Hoechst 33255. Zeleně je znázorněn signál EGFP, modře signál fluorescenčního barviva Hoechst 33255.

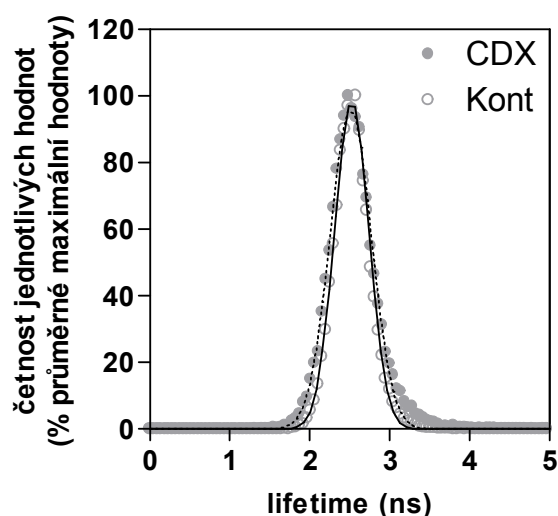
#### 6.1.2. Vliv deplece cholesterolu na dobu života (*lifetime*) EGFP fúzně připojeného k TRH-R

Stanovení doby života excitovaného stavu (*lifetime*,  $\tau_{dz}$ ) bylo využito jako test vlivu inkubace buněk s  $\beta$ -CDX na fluorescenční vlastnosti EGFP a zároveň jako nepřímý test vlivu této inkubace na flexibilitu C-konce TRH-R, která by se mohla projevit v hodnotě  $\tau_{dz}$ . Měření bylo provedeno na živých VTGP buňkách.



Na obrázku 20 jsou uvedeny distribuce četností naměřených hodnot dob života excitovaného stavu pro buňky kontrolní (Kont) a buňky inkubované s  $\beta$ -CDX (CDX). Výsledek stanovení byl naprosto jednoznačný – nebyla pozorována žádná statisticky významná změna ve stanovené hodnotě  $\tau_{dz}$  mezi zkoumanými skupinami buněk. Výsledné hodnoty průměrné doby života jsou uvedeny v tabulce 9.

Naměřená data byla statisticky zpracována na základě fitování na model Gaussova rozdělení. V obou skupinách bylo hodnoceno 12 buněk. Stanovené průměrné hodnoty  $\tau_{dz}$  byly porovnány pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %.



**Obrázek 20 | Distribuce četností jednotlivých hodnot  $\tau_{dz}$  EGFP na plasmatické membráně jako procento nejvyšší hodnoty v daném výběru.**

Na obrázku jsou znázorněny stanovené četnosti dob života excitovaného stavu EGFP na plasmatické membráně pro buňky kontrolní (Kont) a buňky inkubované s  $\beta$ -CDX (CDX). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento nejvyšší hodnoty v daném výběru. Body jsou proloženy křivkou Gaussova rozdělení (Kont – plná čára; CDX – přerušovaná čára). Průměrné  $\tau_{dz}$  kontrolních buněk a buněk ovlivněných  $\beta$ -CDX se statisticky významně neliší. Chybové úsečky nejsou pro přehlednost uvedeny.

**Tabulka 9 | Průměrné hodnoty  $\tau_{dz}$  pro kontrolní buňky (Kont) a buňky inkubované s  $\beta$ -CDX (CDX)**

N je počet buněk analyzovaných v daném datovém souboru.

Vzorek	$\tau_{dz}$ (ns) $\pm$ SEM	N
Kont	2,5 $\pm$ 0,1	12
CDX	2,5 $\pm$ 0,1	12

### 6.1.3. Vliv deplece cholesterolu na mobilitu TRH-R-EGFP v plasmatické membráně

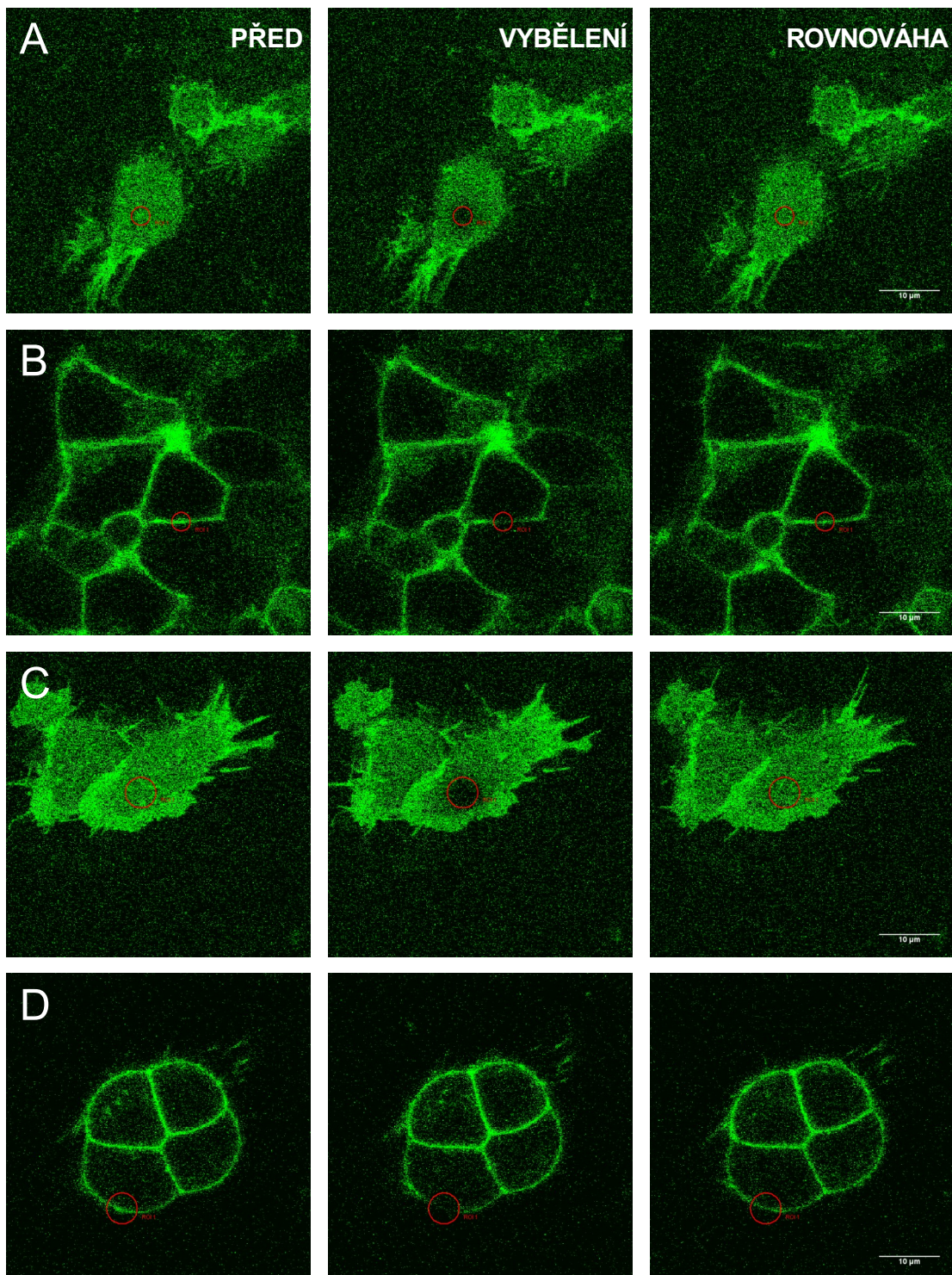
Pro stanovení vlivu deplece cholesterolu z plasmatické membrány na mobilitu TRH-R-EGFP byly využity 2 různé metody – FRAP a RICS. Měření bylo provedeno na živých VTGP buňkách.

Měření metodou FRAP bylo provedeno v několika uspořádáních – v rovině sklíčka (RS) a rovině průřezu buňkou (RP), a to ještě při současném použití různých průměrů foto-vybělovaného (dále jen „vybělovaného“) kruhu – 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ . Pro názornost jsou tyto způsoby měření znázorněny na obrázku 21 (str. 75). Při samotné analýze snímání RP byla prováděna dvojitá kvantifikace naměřených dat – v původně vybělovaném kruhu nebo v obdélníku v rámci tohoto kruhu, který byl zaměřen pouze na plasmatickou membránu vykazující fluorescenční signál. Pro výběr nejvhodnějšího způsobu měření / sběru dat byl stanoven poměr signál/pozadí, který byl ve všech měřeních statisticky významně vyšší v případě analýzy dat z „obdélníku“ (viz obrázek 22 na str. 76). Proto byl tento způsob zvolen při zpracování všech dat naměřených v RP.

Z dat získaných metodou FRAP byly vypočítány hodnoty mobilních frakcí ( $M_f$ ) a zdánlivých difuzních koeficientů ( $D_{zd}$ ). V žádném uspořádání měření nebyl prokázán signifikantní rozdíl v  $M_f$  či  $D_{zd}$  mezi kontrolními buňkami (Kont) a buňkami inkubovanými před měřením s  $\beta$ -CDX (CDX), jak je znázorněno na obrázcích 23 a 24 (str. 77 a 78).

Zdánlivé difuzní koeficienty pro stejné experimentální skupiny byly stanovovány rovněž metodou RICS. Opět nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v mobilitě TRH-R-EGFP mezi zkoumanými skupinami (viz obrázek 26 na str. 79). Stejně tak nebyl deplecí cholesterolu z plasmatické membrány ovlivněn ani poměr  $G_0V/G_0H$ . Jako předpoklad k měření RICS bylo proměřeno 6 různých buněk ve třech konfokálních rovinách, což je zachyceno na obrázku 25 (str. 79). V grafu v části B jsou zásadní velikosti chybových úseček, které by např. v případě RV byly ve formátu průměr  $\pm$  SD prakticky stejně velké jako sloupeček samotný. Na základě tohoto předpokusu (a definice metody jako takové) byla jako nejvhodnější rovina pro měření metodou RICS zvolena rovina sklíčka (RS).

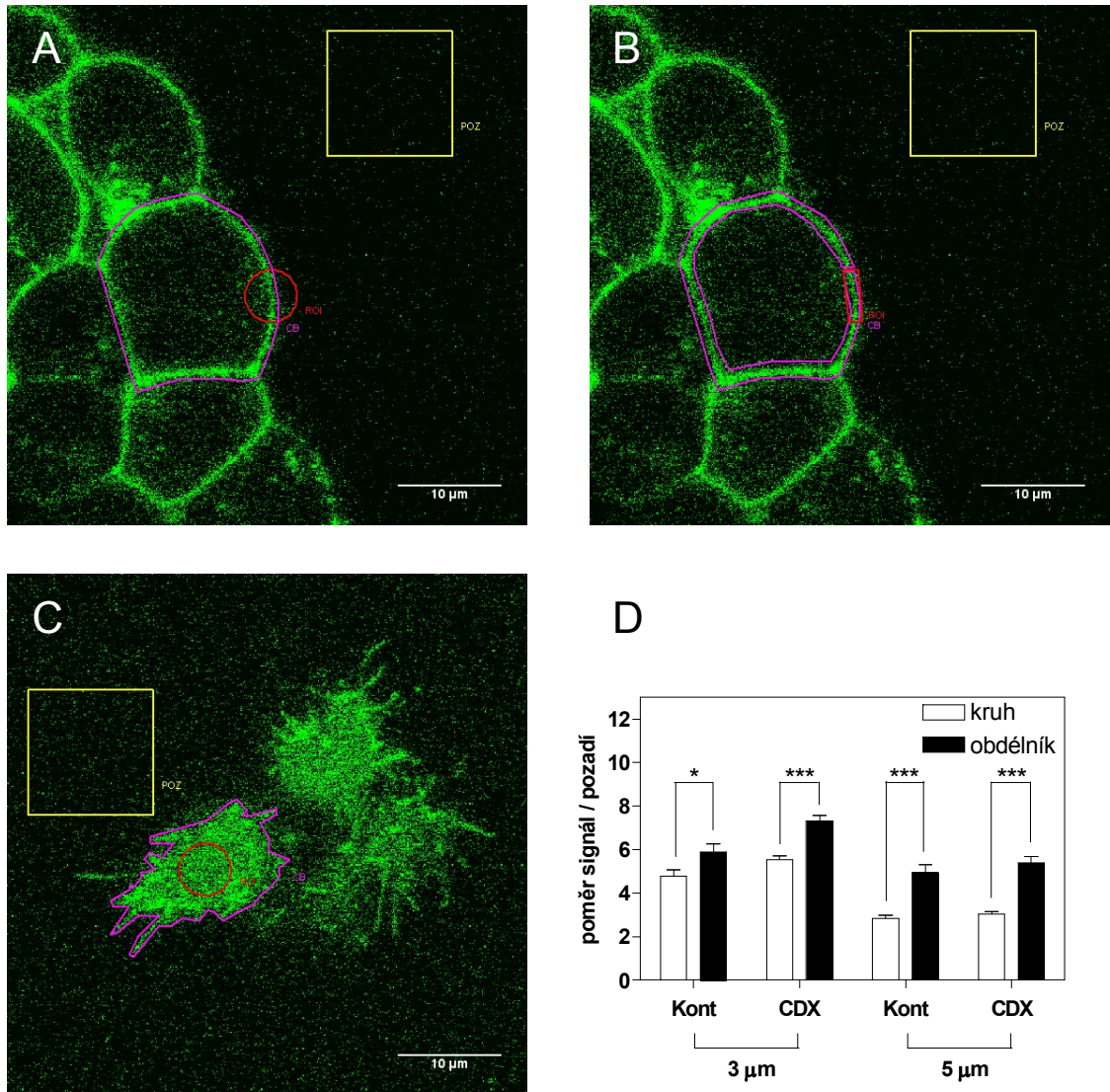
Získané hodnoty byly statisticky hodnoceny pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %. Hodnoty naměřené metodou FRAP i RICS jsou přehledně shrnuty v tabulce 10 na straně 80, která rovněž uvádí počet buněk, které byly analyzovány v dané experimentální skupině. Pouze data zobrazená v části B na obrázku 25 byla hodnocena pomocí metody jednocestná ANOVA s intervalem spolehlivosti 95 %. Hodnoty ve všech grafech jsou uvedeny ve formátu průměr daného měření  $\pm$  SEM.



**Obrázek 21 | Uspořádání měření fluorescenčně značených buněk metodou FRAP**

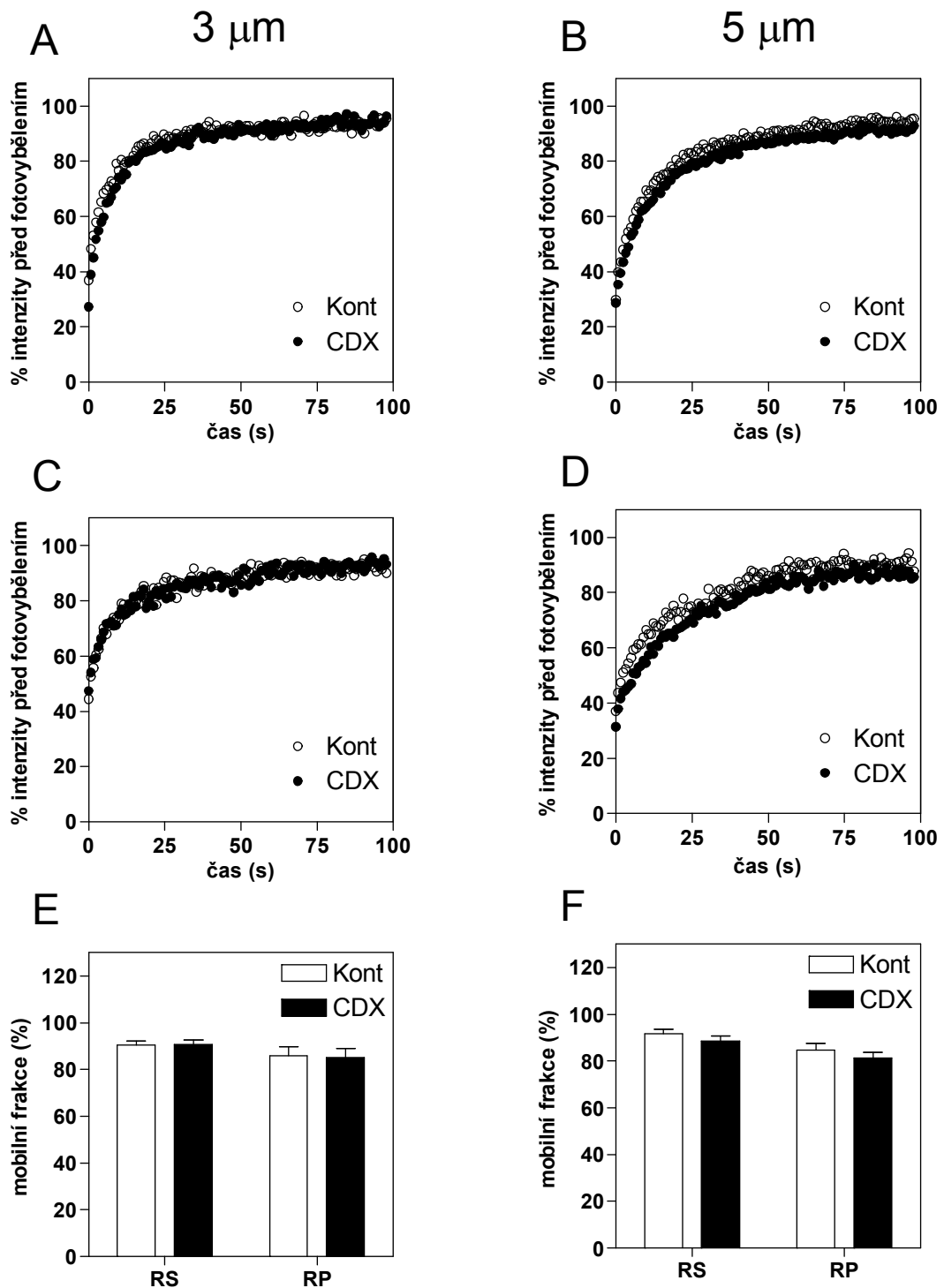
Na obrázku jsou ukázkové záznamy měření buněk VTGP pomocí metody FRAP. V části A jsou buňky měřené v rovině sklíčka za použití vybělovaného kruhu o průměru 3 μm, v části B pak v rovině průřezu buňkou při použití vybělovaného kruhu rovněž o průměru 3 μm. V částech C a D jsou zachycena stejná uspořádání jako v částech A a B (tedy RS a RP), ovšem při použití kruhu o průměru 5 μm. Ve všech částech je vždy v sérii první obrázek před vybělením, druhý ihned po vybělování a poslední po dosažení rovnovážného stavu.





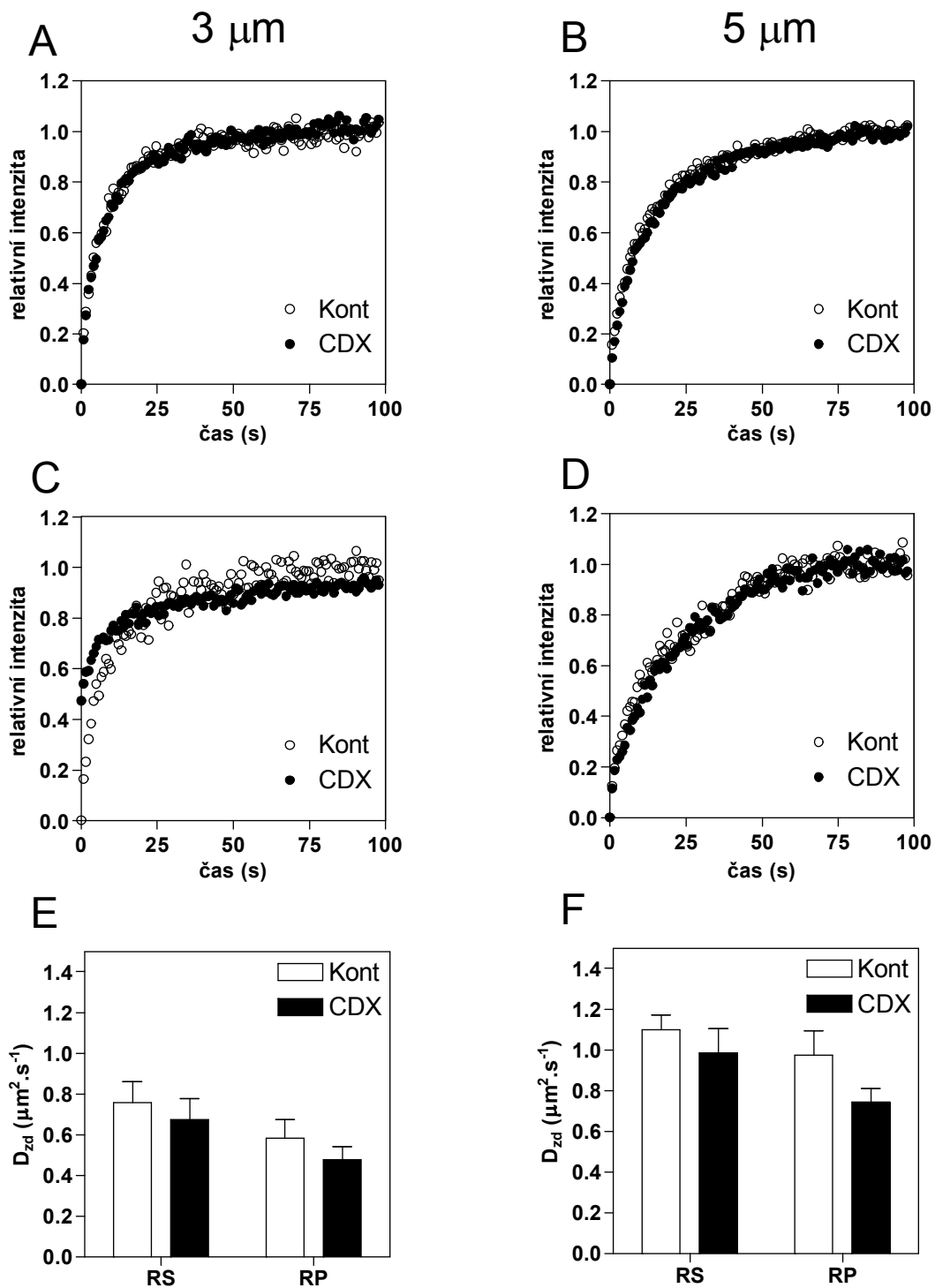
## Obrázek 22 | Analýza VTGP buněk metodou FRAP

Na obrázcích A až C je schematicky naznačena analýza obrázků získaných metodou FRAP. Červená oblast odpovídá ROI, fialová oblasti CB a žlutá oblasti POZ (viz metody). Část A znázorňuje analýzu buněk v průřezu buňkou (RP), v části B jsou oblasti zájmu oproti situaci A modifikovány (zaměřeny pouze na oblast plasmatické membrány, která vykazuje fluorescenční signál), aby bylo dosaženo lepšího poměru signál/pozadí. O vhodnosti modifikované analýzy vypovídá graf v části D, kde jsou jednotlivé postupy porovnány a je patrný signifikantní rozdíl v poměru signál/pozadí (\* ...  $P < 0,05$ ; \*\*\* ...  $P < 0,001$ ). V části C je pak naznačen způsob analýzy obrázků získaných v rovině sklička (RS).



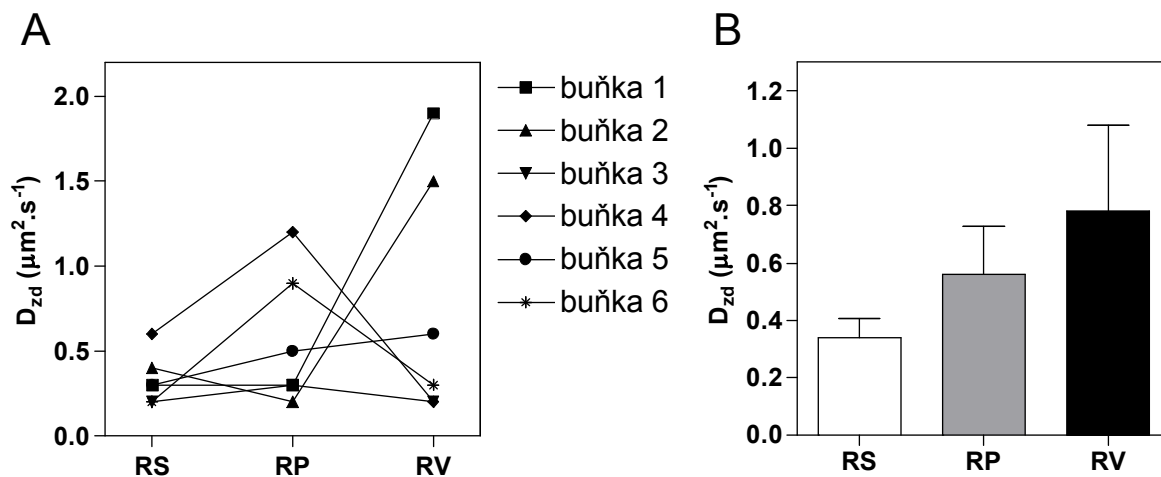
**Obrázek 23 | Mobilní frakce TRH-R-EGFP stanovené metodou FRAP**

V částech A a B jsou grafy zachycující průměrnou křivku, ze které byly stanovovány mobilní frakce TRH-R-EGFP na buňkách měřených v RS (tedy data normalizovaná na hodnotu intenzity fluorescence před vybělováním  $F_0$  v ROI). V částech C a D jsou křivky pro stanovení mobilní frakce TRH-R-EGFP ovšem pro buňky měřené v RP. V grafech E a F jsou vyneseny vypočítané hodnoty mobilních frakcí pro příslušná měření. Části A, C a E zachycují měření při použití vybělovaného kruhu o průměru 3  $\mu\text{m}$ , části B, D a F pak měření při použití kruhu o průměru 5  $\mu\text{m}$ . Chybové úsečky nejsou v částech A-D pro přehlednost uvedeny.



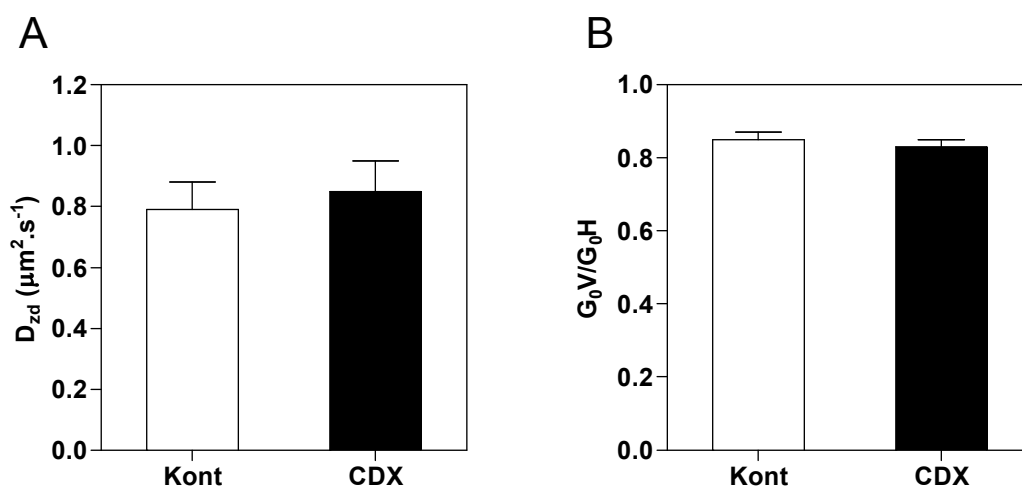
**Obrázek 24 | Zdánlivé difuzní koeficienty TRH-R-EGFP stanovené metodou FRAP**

V částech A a B jsou grafy zachycující průměrnou křivku, ze které byly stanovovány zdánlivé difuzní koeficienty TRH-R-EGFP na buňkách měřených v RS (tedy data normalizovaná na hodnotu rovnovážné intenzity fluorescence  $F_{\infty}$  v ROI). V částech C a D jsou křivky pro stanovení zdánlivých difuzních koeficientů TRH-R-EGFP ovšem pro buňky měřené v RP. V grafech E a F jsou pak graficky vyneseny vypočítané zdánlivé difuzní koeficienty pro příslušná měření. Části A, C a E zachycují měření při použití vybělovaného kruhu o průměru 3  $\mu\text{m}$ , části B, D a F pak měření při použití kruhu o průměru 5  $\mu\text{m}$ . Chybové úsečky nejsou v částech A-D pro přehlednost uvedeny.



**Obrázek 25 | Zdánlivé difuzní koeficienty TRH-R-EGFP stanovené metodou RICS v různých konfokálních rovinách měřených buněk**

V části A jsou zobrazeny hodnoty naměřené pro 6 buněk v daných rovinách. V části B jsou pak vyneseny hodnoty průměrných zdánlivých difuzních koeficientů konstruktu TRH-R-EGFP stanovené metodou RICS v různých rovinách. RS je rovina sklíčka, RP je rovina průřezu buňkou a RV je rovina vrcholu buňky (pro schéma viz obr. 18 na straně 63)



**Obrázek 26 | Zdánlivé difuzní koeficienty TRH-R-EGFP stanovené metodou RICS v kontrolních buňkách a buňkách ovlivněných  $\beta$ -CDX**

V části A jsou vyneseny průměrné hodnoty zdánlivých difuzních koeficientů kontrolních buněk a buněk ovlivněných  $\beta$ -CDX. V části B jsou pak zobrazeny průměrné hodnoty poměru funkcí  $G_0V/G_0H$  pro tato měření.

**Tabulka 10 | Souhrnný přehled důležitých hodnot získaných metodami FRAP a RICS při měření mobility konstruktů TRH-R-EGFP v živých buňkách VTGP**

$D_{zd}$  je zdánlivý difuzní koeficient,  $M_f$  je mobilní frakce molekul a N je počet buněk analyzovaných v konkrétních datových souborech.

Metoda	Rovina	Průměr kruhu	Vzorek	$D_{zd}$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) ± SEM	$M_f$ (%) ± SEM	N
FRAP	RS	3 $\mu\text{m}$	Kont	0,76 ± 0,10	90,5 ± 1,66	15
			CDX	0,68 ± 0,10	90,9 ± 1,95	15
		5 $\mu\text{m}$	Kont	1,10 ± 0,07	91,8 ± 1,85	13
			CDX	0,98 ± 0,12	88,5 ± 2,27	13
	RP	3 $\mu\text{m}$	Kont	0,58 ± 0,09	85,9 ± 3,88	11
			CDX	0,48 ± 0,06	85,2 ± 4,00	11
		5 $\mu\text{m}$	Kont	0,97 ± 0,12	84,6 ± 2,92	13
			CDX	0,74 ± 0,07	81,2 ± 2,64	13
RICS	RS	-	Kont	0,79 ± 0,09	-	32
			CDX	0,85 ± 0,10	-	21

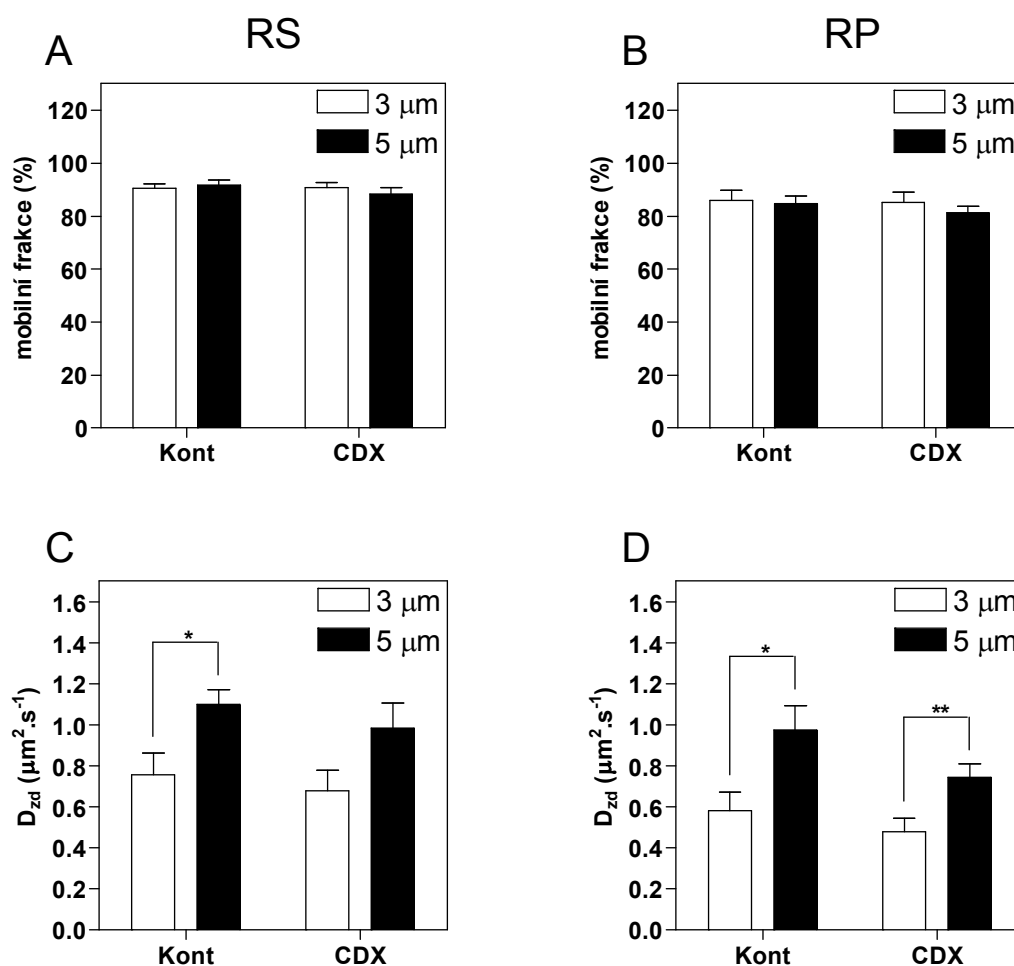
**6.1.4. Metodické aspekty měření mobility konstruktů TRH-R-EGFP metodami FRAP a RICS**

Z metodického hlediska byla data naměřená metodou FRAP z předchozí sekce porovnávána z pohledu závislosti naměřených hodnot na velikosti vybělovaného kruhu. Tato analýza je znázorněna na obrázku 27 (str. 81). Zatímco hodnoty mobilní frakce se při různých průměrech vybělovaného kruhu statisticky významně nelišily, zdánlivé difuzní koeficienty vykazovaly s rostoucím průměrem kruhu statisticky významný rostoucí trend (s výjimkou buněk ovlivněných  $\beta$ -CDX při měření v RS, kdy byl rozdíl patrný, ale nesignifikantní). Hodnoty zdánlivého difuzního koeficientu byly podrobeny další analýze, kdy byly porovnávány v závislosti na rovině snímání buňky (tedy RS nebo RP). Ačkoli je z obrázku 28 (str. 82) patrný jistý trend (nižší hodnoty  $D_{zd}$  v rovině RP než RS), u žádné dvojice porovnávaných hodnot nebylo dosaženo statistické signifikance.

Následně byly porovnány hodnoty zdánlivých difuzních koeficientů získaných měřením metodou RICS a FRAP v RS (aby byla uspořádání srovnatelná). Nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách zdánlivých difuzních koeficientů naměřených těmito dvěma metodami (viz obrázek 29 na str. 82).

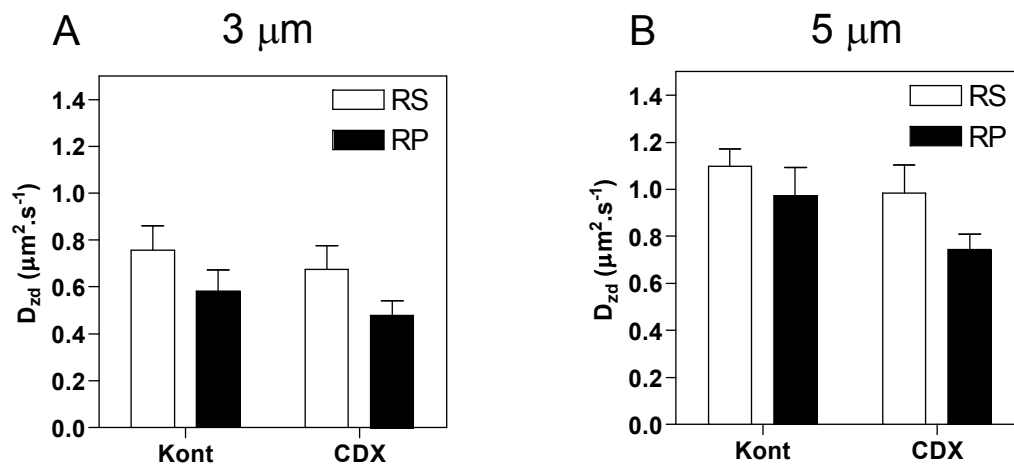


Zkoumané veličiny byly statisticky hodnoceny pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %. Pouze data zobrazená na obrázku 29 byla hodnocena pomocí metody jednocestná ANOVA s intervalem spolehlivosti 95 %. Velikost experimentálních skupin odpovídá údajům v tabulce 10 na straně 80. Hodnoty jsou ve všech grafech uvedeny ve formátu průměr daného měření  $\pm$  SEM.



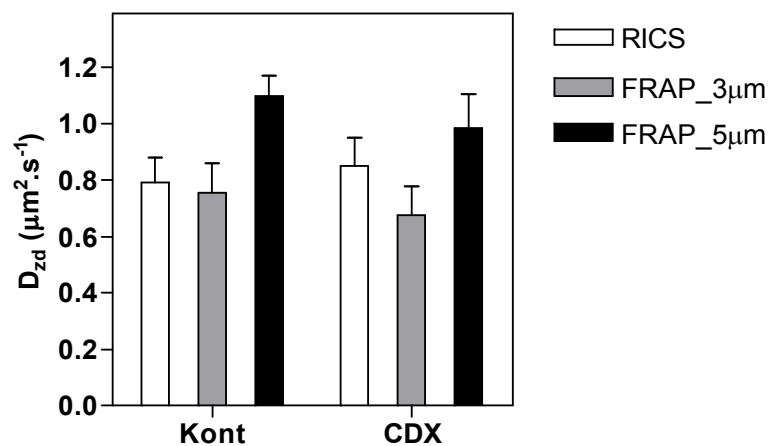
**Obrázek 27 | Porovnání hodnot mobilních frakcí ( $M_f$ ) a zdánlivých difuzních koeficientů ( $D_{zd}$ ) získaných metodou FRAP v závislosti na průměru vybělovaného kruhu**

V částech A a B jsou grafy zachycující průměrné mobilní frakce TRH-R-EGFP. V částech C a D jsou pak grafy zachycující průměrné zdánlivé difuzní koeficienty tohoto konstruktu. Skupiny kontrolních buněk (Kont) a buněk ovlivněných  $\beta$ -CDX (CDX) jsou v tomto vynesení odděleny a proměnnou hodnotou je velikost vybělovaného kruhu (3  $\mu\text{m}$  nebo 5  $\mu\text{m}$ ). Části A a C znázorňují hodnoty pro měření v RS, části B a D pak pro měření v RP.  
\* ...  $P < 0,05$ ; \*\* ...  $P < 0,01$ .



**Obrázek 28 | Zdánlivé difuzní koeficienty ( $D_{zd}$ ) získané metodou FRAP v závislosti na zvolené rovině snímání buněk**

V grafech jsou porovnány hodnoty zdánlivých difuzních koeficientů v závislosti na rovině, ve které bylo provedeno měření v rámci stejných skupin buněk (tj. kontrolních – Kont a inkubovaných před pokusem s  $\beta$ -CDX – CDX). V části A jsou tato vynesení pro vybělovaný kruh o průměru 3  $\mu\text{m}$ , v části B pak pro vybělovaný kruh o průměru 5  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 29 | Zdánlivé difuzní koeficienty ( $D_{zd}$ ) získané metodou FRAP a RICS měřením živých VTGP buněk v RS**

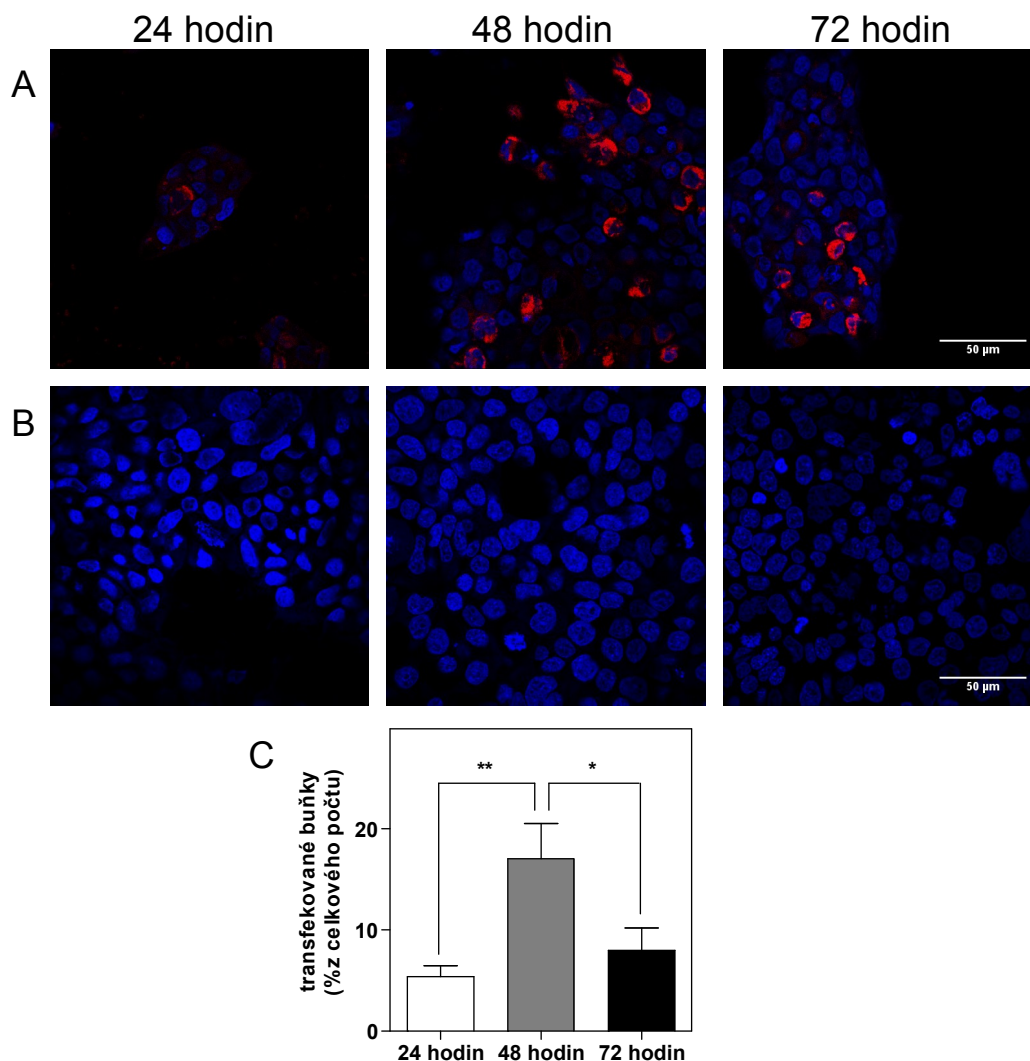
V grafu jsou vyneseny zdánlivé difuzní koeficienty naměřené metodami RICS a FRAP v rovině sklíčka.

## 6.2. Transientně transfekované buňky HEK293

### 6.2.1. Stanovení vhodné délky kultivace po transientní transfekci

Každý transfekovaný konstrukt se chová trochu odlišně. Buňky potřebují dostatečný čas k expresi zkoumaných proteinů v dostatečném (tedy detekovatelném) množství.

Pro stanovení ideální doby kultivace transfekovaných buněk po transfekci před pokusy byly buňky fixovány 24, 48 a 72 hodin po transfekci. Následně byl stanoven poměr transfekovaných buněk ke všem buňkám v záběru. Jak je patrné z obrázku 30, jako nejlepší se ukázala kultivace 48 hodin po transfekci.



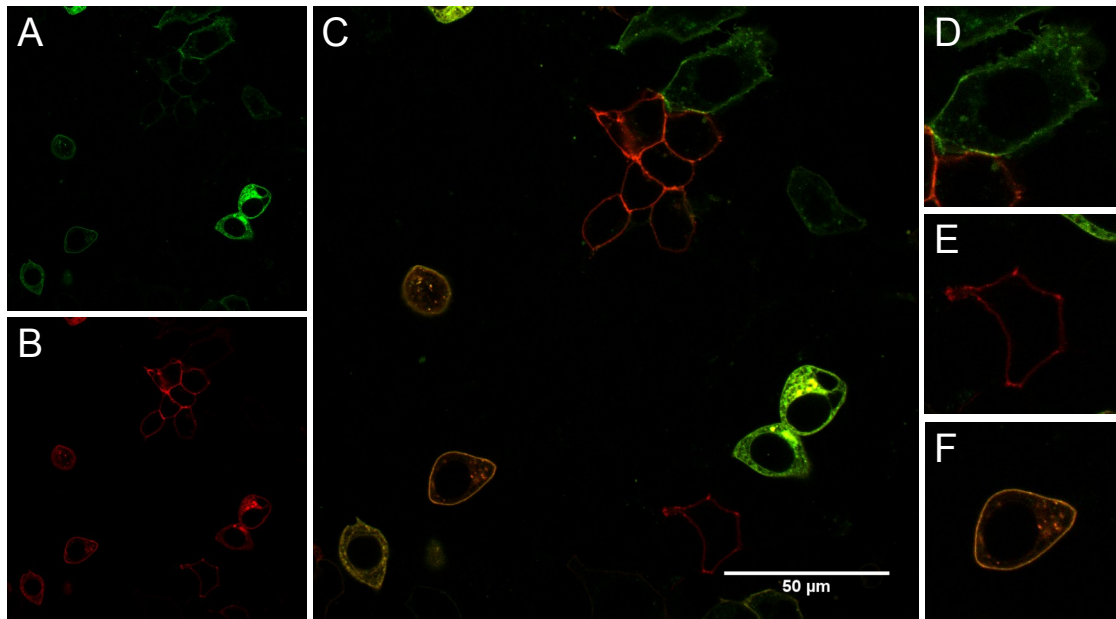
**Obrázek 30 | Stanovení vhodné doby kultivace buněk po transientní transfekci**

V části A jsou buňky transientně transfekované konstruktem DOR-EYFP zafixované 24, 48 a 72 hodin po transfekci. V části B jsou buňky kontrolní (tj. netransfekované). Modře je zobrazeno fluorescenční barvivo Hoechst 33255, červeně pak EYFP. V části C je výsledný graf vyjadřující procento transfekovaných buněk z celkového počtu buněk na obrázku po 24, 48 či 72 hodinách od transfekce. Data byla hodnocena pomocí metody jednocestná ANOVA s intervalem spolehlivosti 95 %. V každé skupině bylo hodnoceno 15 obrázků. Hodnoty jsou ve formátu průměr měření  $\pm$  SEM. \* ...  $P < 0,05$ ; \*\* ...  $P < 0,01$ .

### 6.2.2. Transientní kotransfekce buněk HEK293 konstrukty DOR-ECFP a DOR-EYFP

Z důvodu plánovaných pokusů na živých buňkách kotransfekovaných současně konstrukty DOR-ECFP a DOR-EYFP byl tento postup pro začátek vyzkoušen na buňkách, které byly zafixovány 48 hodin po transfekci.

Reprezentativní výsledek je zobrazen na obrázku 31. Z tohoto obrázku je patrné, že v získaných vzorcích se vyskytují jak buňky transfekované pouze 1 konstruktem, tak buňky kotransfekované oběma současně.



**Obrázek 31 | Transientní kotransfekce buněk HEK293 konstrukty DOR-ECFP a DOR-EYFP**

Zeleně je znázorněna fluorescence ECFP, červeně fluorescence EYFP. Žlutá barva je dána současnou přítomností červené i zelené a vyjadřuje úspěšnou kotransfekci buňky oběma konstrukty. V části A je znázorněn detekční kanál ECFP a v části B je detekční kanál pro EYFP. V části C je pak obrázek vzniklý kombinací obou kanálů. V částech D-F jsou výřezy z obrázku C, které zobrazují buňku úspěšně transfekovanou pouze konstruktem DOR-ECFP (D), pouze konstruktem DOR-EYFP (E) a buňku kotransfekovanou oběma konstrukty (F).

### 6.2.3. Ověření funkčnosti konstruktů DOR-ECFP a DOR-EYFP

Pro stanovení funkčnosti transfekovaných konstruktů (tedy schopnosti řízních bílkovin DOR-ECFP a DOR-EYFP aktivovat příslušný  $G_i$  protein byla využita metoda měření vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S v kombinaci s imunoprecipitací. Imunoprecipitace byla zvolena proto, že  $G\alpha_i$  podjednotky se v buňkách HEK293 vyskytují v relativně malém množství. Z celkové populace G proteinů je nutno zachytit specificky stimulaci přes  $G\alpha_i$  podjednotku, kterou by jinak nebylo možné rozlišit od souhrnné vazby všech přítomných G proteinů. Data byla měřena na vzorcích homogenátů připravených z transfekovaných buněk.

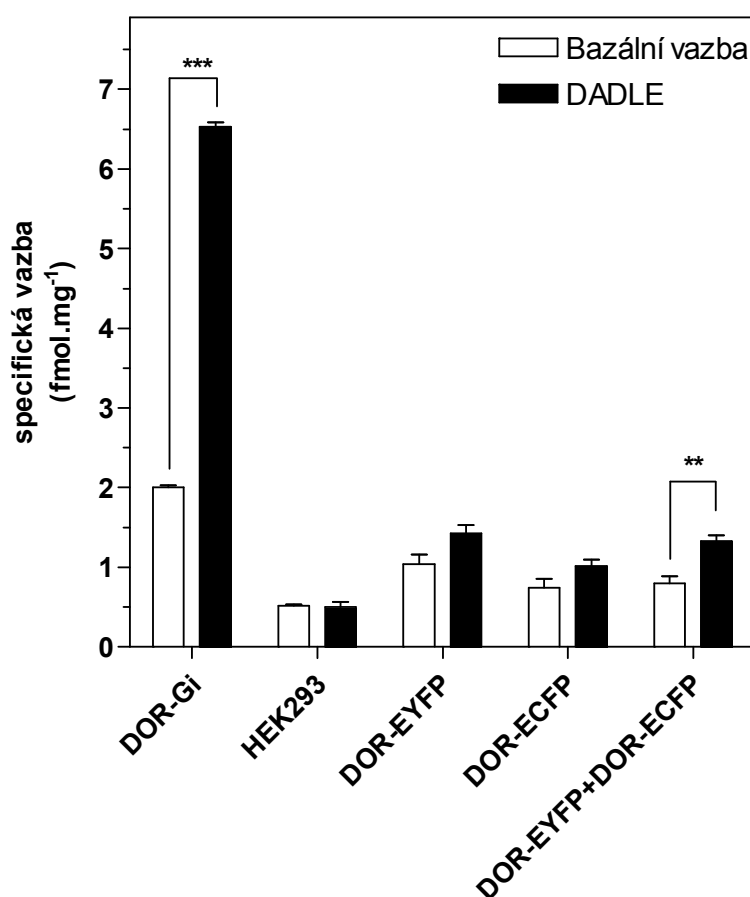
V prvotním experimentu, jehož výsledky jsou zachyceny na obrázku 32 (str. 86), bylo sice patrné zvýšení vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S při stimulaci DOR agonistou DADLE, ovšem kromě kotransfekovaných buněk byl tento vzestup statisticky nevýznamný. V tomto pokusu byla oproti postupu uvedenému v metodách použita celková radioaktivita pouze  $2 \cdot 10^5$  dpm/vzorek a 90  $\mu$ g bílkoviny/vzorek. Získané hodnoty specifické vazby byly tak malé, že jejich výpovědní hodnota byla přinejmenším pochybná (oproti jasným a přesvědčivým hodnotám naměřeným na vzorku pozitivní kontroly, což byly preparáty plasmatických membrán buněk DOR- $G_i$ ). Ze zmíněného důvodu byl následně postup této metody upraven do stavu, který je popsán v metodické části předkládané diplomové práce.

Protože pro tyto vazebné pokusy bylo potřeba poměrně velké množství biologického materiálu, byla dále zkoumána pouze vazba ve vzorcích s konstruktem DOR-EYFP. V těchto experimentech byl rovněž zkoumán vliv deplece cholesterolu pomocí  $\beta$ -CDX (skupina DOR-EYFP+CDX) na schopnost receptoru aktivovat příslušný G protein. V tomto ohledu je kontrolní skupinou k buňkám „DOR-EYFP+CDX“ skupina „DOR-EYFP“. Z obrázku 33 na str. 87 je jasně patrná až více než 2,5-krát zvýšená specifická vazba [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S v transfekovaných buňkách po stimulaci receptoru agonistou DADLE. Oproti tomu buňky, které transfekované nebyly (HEK293), nevykazovaly žádné zvýšení specifické vazby po přidání agonisty. Relativně nápadný rozdíl ve velikosti stimulace vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S po přidání DADLE v buňkách, které byly před sklizením inkubovány s  $\beta$ -CDX, oproti buňkám, které s  $\beta$ -CDX inkubovány nebyly, byl rovněž podroben statistickému hodnocení a ukázal se být statisticky nesignifikantní.

Na základě získaných dat je možné jednoznačně říci, že transfekovaný konstrukt DOR-EYFP je funkční. To znamená, že přítomnost objemných fluoreskujících molekul ECFP a EYFP na C-konci receptoru neodstranila schopnost DOR aktivovat příslušný  $G_i$  protein.

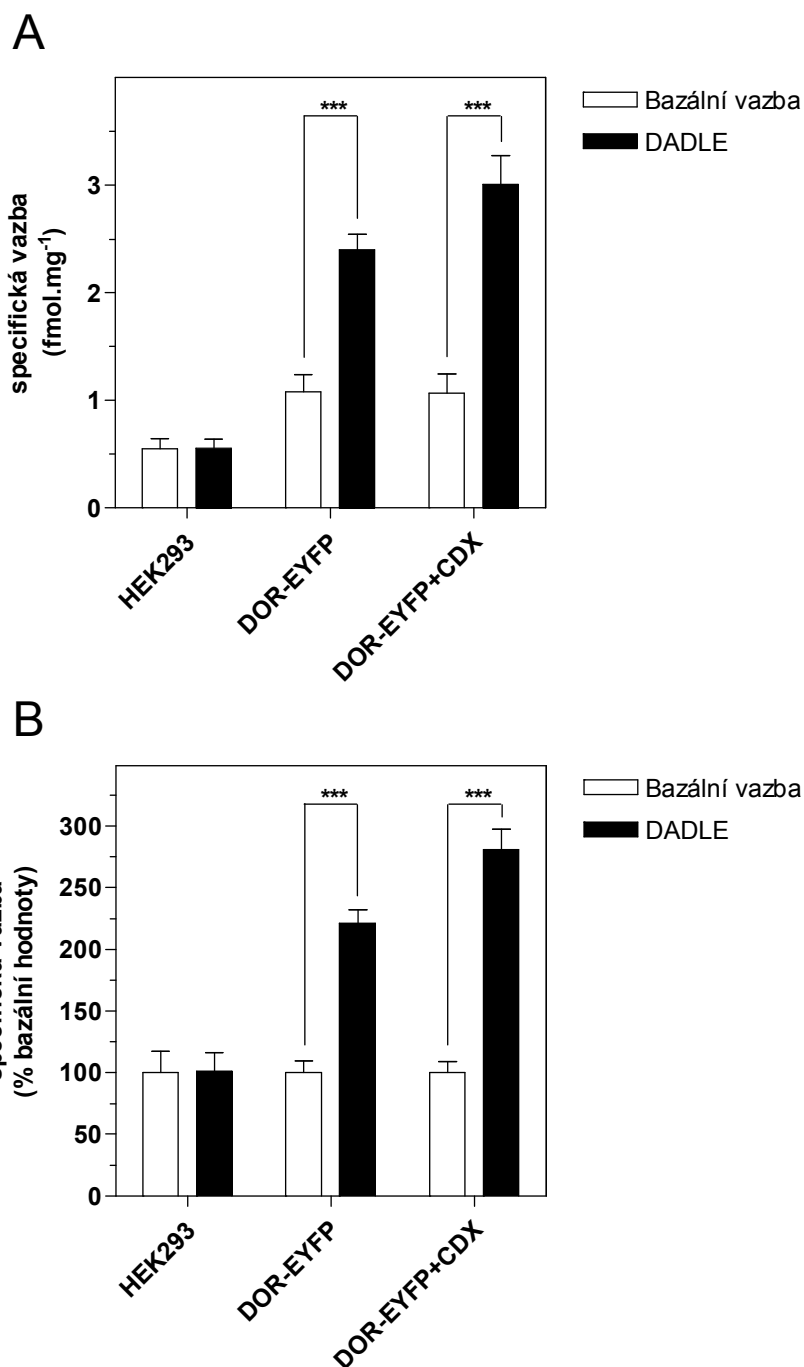
Hodnoty mezi experimentálními skupinami byly porovnány pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %. Výsledky uvedené na obrázku 32 jsou

průměrem ze tří hodnot. Výsledky uvedené na obrázku 33 jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů (v každém experimentu byly navíc vzorky měřeny v triplicátech) provedených na vzorcích homogenátů z transfekovaných buněk získaných 2 nezávislými transientními transfekcemi. Všechny hodnoty jsou ve formátu průměr daného měření  $\pm$  SEM.



**Obrázek 32 | Stanovení vazby [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S v homogenátech připravených z buněk transientně transfekovaných konstrukty DOR-EYFP a DOR-ECFP**

V grafu je znázorněna vazba [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S bez přidání agonisty  $\delta$ -opioidního receptoru (Bazální aktivita) a v přítomnosti agonisty DADLE v koncentraci  $10^{-5}$  M (DADLE). Jako pozitivní kontrola byl stanoven vzorek plasmatických membrán získaných z buněk DOR-G<sub>i</sub>, které stabilně exprimují  $\delta$ -opioidní receptor s fúzně připojenou G $\alpha_i$  podjednotkou. Jako negativní kontrola posloužily netransfekované buňky HEK293. Naměřené hodnoty radioaktivity jsou vztaženy na mg proteinu ve vzorku. \*\* ... P < 0,01; \*\*\* ... P < 0,001.



**Obrázek 33 | Stanovení vazby [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S v homogenátech připravených z buněk transientně transfekovaných konstruktem DOR-EYFP a vliv deplece cholesterolu pomocí  $\beta$ -CDX na tuto vazbu**

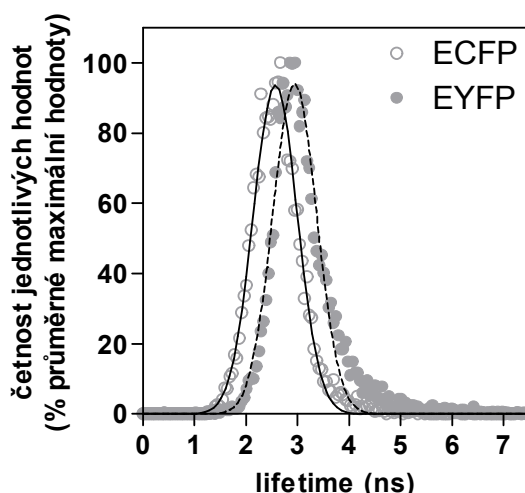
V grafu je zachycena vazba [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S vždy bez přidání agonisty  $\delta$ -opioidního receptoru DADLE (Bazální aktivita) a v jeho přítomnosti v koncentraci 10<sup>-5</sup> M (DADLE). V části A jsou hodnoty vyneseny v absolutních hodnotách (vztažených na mg proteinu ve vzorku), v části B pak jako procento bazální aktivity. \*\*\* ... P < 0,001.

#### 6.2.4. Doba života excitovaného stavu ECFP a EYFP ve fúzních bílkovinách DOR-ECFP a DOR-EYFP

Z důvodu možného budoucího využití metody FLIM-FRET při analýze funkce  $\delta$ -opioidního receptoru byly orientačně stanoveny hodnoty doby života excitovaného stavu sond ECFP a EYFP připojených k C-konci DOR. Průměrné hodnoty  $\tau_{dz}$  se vzájemně lišily, ovšem díky malému počtu vzorků v datovém souboru byla chyba relativně velká, a proto nebylo dosaženo statistické signifikance. Měření bylo provedeno na fixovaných preparátech transientně transfekovaných buněk.

Na obrázku 34 jsou uvedeny distribuce naměřených hodnot dob života excitovaného stavu ECFP a EYFP. Vypočítané průměrné hodnoty  $\tau_{dz}$  jsou uvedeny v tabulce 11.

Naměřená data byla statisticky zpracována na základě fitování na model Gaussova rozdělení. V obou skupinách bylo hodnoceno 5 buněk. Stanovené průměrné hodnoty  $\tau_{zd}$  byly porovnány pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %.



**Obrázek 34 | Distribuce četností jednotlivých  $\tau_{dz}$  ECFP a EYFP na plasmatické membráně jako procento nejvyšší hodnoty v daném výběru.**

Na obrázku jsou znázorněny naměřené četnosti výskytu hodnot doby života excitovaného stavu na plasmatické membráně pro buňky transfekované konstruktem DOR-ECFP a DOR-EYFP. Body jsou proloženy křivkou Gaussova rozdělení (ECFP – plná čára; EYFP – přerušovaná čára). Chybové úsečky nejsou pro přehlednost uvedeny.

**Tabulka 11 | Průměrné hodnoty  $\tau_{dz}$  ECFP a EYFP**

N je počet buněk analyzovaných v daném datovém souboru.

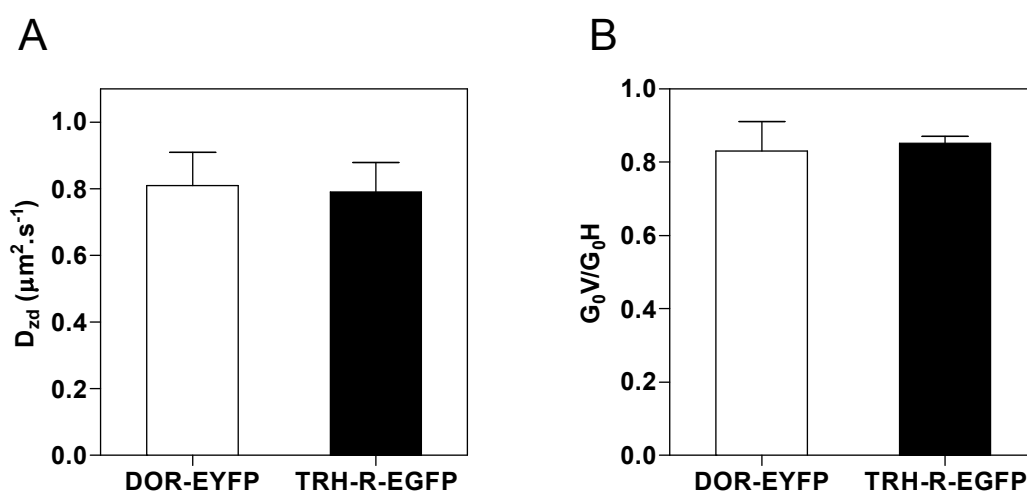
Vzorek	$\tau_{dz}$ (ns) $\pm$ SEM	N
ECFP	2,57 $\pm$ 0,19	5
EYFP	2,95 $\pm$ 0,19	5



### 6.2.5. Stanovení mobility DOR-EYFP v plasmatické membráně pomocí metody RICS

Metoda RICS byla aplikována rovněž na živé buňky HEK293 transientně transfekované konstruktom DOR-EYFP. Vypočítaný průměrný difuzní koeficient byl porovnán se zdánlivým difuzním koeficientem TRH-R-EGFP (kontrolních buněk) stanoveným v předchozích oddílech práce. Jak je patrné z obrázku 35, hodnoty  $D_{zd}$  ani  $G_0V/G_0H$  se při porovnání těchto dvou fúzních bílkovin statisticky významně nelišily. Konkrétní hodnoty  $D_{zd}$  jsou uvedeny v tabulce 12.

Hodnoty mezi experimentálními skupinami byly porovnány pomocí Studentova oboustranného t-testu s intervalem spolehlivosti 95 %. Velikost datových souborů je zachycena v tabulce 12. Hodnoty jsou ve formátu průměr daného měření  $\pm$  SEM.



**Obrázek 35 | Zdánlivé difuzní koeficienty konstruktů DOR-EYFP a TRH-R-EGFP stanovené metodou RICS**

V grafu v části A jsou vyneseny průměrné hodnoty zdánlivých difuzních koeficientů DOR-EYFP exprimovaného v transientně transfekovaných buňkách HEK293 a TRH-R-EGFP exprimovaného ve stabilní buněčné linii VTGP. V části B jsou pak zobrazeny průměrné hodnoty poměru funkcí  $G_0V/G_0H$  pro tato měření.

**Tabulka 12 | Průměrné hodnoty zdánlivého difuzního koeficientu konstruktů DOR-EYFP a TRH-R-EGFP**

N je počet buněk analyzovaných v daném datovém souboru.

Vzorek	$D_{zd}$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) $\pm$ SEM	N
DOR-EYFP	0,81 $\pm$ 0,10	12
TRH-R-EGFP	0,79 $\pm$ 0,09	32

## 7. Diskuze

Receptory spřažené s G proteiny hrají klíčovou úlohu v signalizaci savčích buněk. O tom svědčí i fakt, že zhruba polovina nově zaváděných léčiv byla vyvinuta na základě studia struktury a funkce nejrůznějších GPCR (Luttrell, 2008). GPCR jsou membránové receptory, jejichž funkce závisí na vlastnostech plasmatické membrány. Proto v jejich funkci hrají významnou úlohu tzv. membránové domény (neboli rafty), jejichž samotná existence byla dlouhou dobu silně diskutovanou otázkou. Nyní je však tento koncept již obecně přijímán a objevují se stále nové a nové poznatky o jejich významné úloze při regulaci buněčných funkcí (Simons a Sampaio, 2011).

### 7.1. Výsledky získané na VTGP buňkách

Je známo, že deplece cholesterolu narušuje strukturu membránových raftů a vede k jejich degradaci (Brown a London, 2000). V naší laboratoři bylo již dříve ukázáno, že inkubace preparátů s 10 mM roztokem  $\beta$ -CDX po dobu 30 minut má za následek pokles obsahu cholesterolu v membránách na 50 % původní hodnoty. Současně bylo prokázáno, že tento způsob expozice buněk  $\beta$ -CDX nevede k narušení buněčné integrity v základním slova smyslu (Ostasov a kol., 2007). Předkládaná diplomová práce se v první části zabývá vlivem deplece cholesterolu z plasmatické membrány pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu na mobilitu TRH-R-EGFP. Tato problematika byla doposud zkoumána pouze metodami biochemickými, které ukázaly, že naprostá většina TRH-R je v nepřítomnosti agonisty lokalizována mimo membránové rafty – v membránových raftech se nacházela pouze 1-3 % těchto receptorů (Rudajev a kol., 2005). Výsledky získané biochemickými přístupy, tj. izolací detergent-rezistentních membránových domén (DRM), které charakterizovaly vlastnosti membránových raftů až po degradaci intaktní buněčné struktury, byly terčem kritiky (Simons a Gerl, 2010). Rozhodli jsme se proto ověřit naše výsledky rovněž metodami fluorescenční mikroskopie, které umožňují zkoumat živé buňky. Naším předpokladem bylo, že pokud by byl TRH-R součástí membránových raftů, deplece cholesterolu pomocí  $\beta$ -CDX by měla ovlivnit jeho mobilitu v plasmatické membráně, jelikož membránové domény jsou rigidnější než neraftové oblasti. Pro účely výzkumu této problematiky byly zvoleny metody FRAP a RICS.

Jako modelový systém byla vybrána buněčná linie VTGP, která stabilně produkuje konstrukt TRH-R-EGFP (Drmotá a kol., 1998). Pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie bylo ověřeno, že produkováný konstrukt je lokalizován v plasmatické membráně a že každá buňka tento konstrukt obsahuje. V dalším pokusu bylo za pomoci metody FLIM zjištěno, že inkubace buněk s  $\beta$ -CDX nemá vliv na fluorescenční vlastnosti

sondy EGFP. Fluorescenční vlastnosti této sondy byly charakterizovány stanovením doby života EGFP v buňkách kontrolních a v buňkách vystavených účinku  $\beta$ -CDX. Tento výsledek je rovněž možné interpretovat tak, že palmitoylace C-koncové části receptoru (Du a kol., 2005), ke které je EGFP připojen, nebyla narušena inkubací buněk s  $\beta$ -CDX. Doba života excitovaného stavu totiž může odrážet změnu v rotačních pohybech EGFP, protože anisotropie pohybu sondy má vliv na časově rozlišené dohasínání. Této problematice jsme si všimli proto, že jsme již dříve zjistili, že deplece cholesterolu narušuje signalizační dráhu TRH-R (Ostasov a kol., 2008).

Při měření FRAP byla použita různá experimentální uspořádání. V každém souboru dat byly použity buňky kontrolní a buňky opůsobené 10 mM roztokem  $\beta$ -CDX. Navíc byly pro foto-vybělování (dále jen „vybělování“) použity dvě velikosti vybělovaných kruhů (3  $\mu$ m a 5  $\mu$ m) a dvě roviny snímání (RS – rovina sklíčka a RP – rovina průřezu buňkou). V žádném experimentálním uspořádání nebyl pozorován rozdíl v hodnotě mobilní frakce ( $M_f$ ) nebo zdánlivého difuzního koeficientu ( $D_{zd}$ ) konstruktu TRH-R-EGFP po inkubaci buněk s  $\beta$ -CDX, což naznačuje, že většina populace receptoru není přítomna v membránových doménách. To je v dobré shodě s biochemickými výsledky naší laboratoře (Rudajev a kol., 2005). Jestliže se více jak 97 % TRH-R nachází mimo rafty, po jejich rozrušení pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu se uvolněná 1-3 % neprojeví na mobilitě celé populace značených receptorů pro tyreoliberin. Prezentované zdánlivé difuzní koeficienty byly ve finále stanovovány výpočtem podle Soumpasise (1983). Souběžně byl výpočet proveden pomocí původního matematického modelu metody FRAP (Axelrod a kol., 1976), který rovněž neodhalil žádné signifikantní změny v mobilních frakcích nebo zdánlivých difuzních koeficientech zkoumaných molekul. Indičtí vědci zkoumali podobným způsobem serotoninový<sub>1A</sub> receptor (5-HT<sub>1A</sub>R) a po depleci cholesterolu z membrány uvádějí vzestup  $D_{zd}$  a zároveň pokles  $M_f$  (Pucadyil a Chattopadhyay, 2007). Rozdíl oproti našim výsledkům se dá jednoduše vysvětlit tak, že oproti 1-3 % TRH-R přítomného v raftech (Rudajev a kol., 2005) je dle údajů biochemických analýz v raftech přítomno bez přidání ligandu asi 33 % 5-HT<sub>1A</sub>R (Renner a kol., 2007). Díky tomu se již deplece cholesterolu z plasmatické membrány má šanci projevit v mobilitě celé populace zkoumaného receptoru.

Měření preparátů VTGP buněk pomocí metody RICS rovněž neprokázalo žádnou změnu v celkové mobilitě populace TRH-R-EGFP po snížení obsahu cholesterolu v plasmatické membráně. Poměr  $G_0V/G_0H$  udává, zda se v mobilitě zkoumané molekuly odráží rovněž přechodná vazba. Blíží-li se tato hodnota jedné, molekuly volně difundují. Ani na tento parametr nemá inkubace buněk s  $\beta$ -CDX vliv. Oproti „FRAPovým“ experimentům byly buňky při analýze metodou RICS měřeny pouze v rovině sklíčka.

Tomuto rozhodnutí předcházela pokus, kdy bylo 6 jednotlivých buněk měřeno v RS, RP i RV (rovina vrcholu buňky). Nejmenší chyba měření byla zaznamenána u hodnot stanovených v RS, stanovení v RP rovněž nevykazovalo nápadně vysokou chybu, což se však nedá říci o RV, kdy byla chyba měření prakticky stejně velká jako stanovená průměrná hodnota. Důvodem je vysoká flexibilita buňky v této části, protože se jedná o oblast nejvíce vzdálenou přichycení adhezivních buněk ke sklíčku. Proto je velice těžké udržet buňku v RV po dobu sejmutí 100 snímků ve stejné konfokální rovině. Matematický model pro analýzu RICS je navíc navržen pro pohyb značených molekul v planárním systému. Tomu tedy z definice metody nejlépe odpovídá RS (pro RP by bylo nutné odvodit modifikovaný matematický model).

V tomto bodě je důležité poznamenat, že se v našem případě jedná o druhou práci zaměřenou na studium GPCR, která používá tuto relativně novou metodu. Prvenství drží práce z roku 2013 (De La Torre a kol., 2013). Autoři prezentují výsledky naměřené na endotelinovém receptoru  $ET_A$  ( $ET_{AR}$ ) značeném pomocí EGFP. Pochybují však o správné, tedy membránové, lokalizaci této fluoreskující verze receptoru. Spíše se přiklánějí k názoru, že receptor byl za daných podmínek transfekce arteficiálně exprimován pouze v cytoplasmě a nedošlo k jeho správné inzerci do plasmatické membrány. Vysoká hodnota stanoveného difuzního koeficientu ( $D = 11 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) podporuje toto sebekritické hodnocení.

V budoucnu by bylo zajímavé provést ještě další sérii měření metodou FRAP a RICS na buňkách VTGP ( $\pm \beta\text{-CDX}$ ) s tím, že by byly srovnávány buňky kontrolní s buňkami stimulovanými TRH. Pokud by, při optimálním uspořádání sběru dat metodou FRAP a RICS, došlo k poklesu mobility TRH-R-EGFP, bylo by možné takový výsledek interpretovat jako vstup receptoru do membránových domén/raftů, jejichž velikost leží pod detekčním limitem fluorescenčního mikroskopu. Tento model je teoreticky popsán v kapitole 3.5 Úloha membránových raftů v signalizaci GPCR. O proveditelnosti takového experimentu svědčí již před lety publikovaná práce zkoumající receptor pro luteinizační hormon (LHR), která s pomocí metody FRAP ukazuje snížení difuzního koeficientu i mobilní frakce sledovaného receptoru po přidání agonisty LHR (Horvat a kol., 1999).

Mobilita receptorů je v této práci vyjadřována pomocí tzv. zdánlivého difuzního koeficientu ( $D_{zd}$ ) namísto difuzního koeficientu ( $D$ ). Veličina  $D_{zd}$  je použita proto, že se jedná o měření v živých systémech a absolutní hodnota  $D_{zd}$  může být ovlivněna řadou faktorů. Pro stanovení  $D$  by bylo nutné konstrukt vystavit kontrolovaným biofyzikálním experimentům, kde by bylo přesně definované složení prostředí zkoumané molekuly. Proto jsou pro nás daleko důležitější relativní změny  $D_{zd}$  než jeho absolutní hodnoty. V tabulce 13 na následující straně jsou uvedeny příklady proteinů lokalizovaných v různých prostředích

a částech buňky a jejich difuzních koeficientů stanovených metodou FRAP při teplotě 37 °C.  $D_{zd}$  naměřené v této práci se pohybují v rozmezí 0,5-1,1  $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , což jsou hodnoty o něco vyšší, než jaké by byly u GPCR na základě literárních údajů očekávány. Ovšem řádově hodnoty odpovídají transmembránovým proteinům. Cytoplasmatické proteiny dosahují hodnot v řádu až desítek  $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ . Pro představu uveďme ještě difuzní koeficient membránového lipidu fosfatidylethanolaminu, přesněji jeho značeného analogu NBD-PE. Tento lipid dosahuje difuzního koeficientu asi 6-8  $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  v různých lipidických prostředích při teplotě 35-40 °C (Vaz a kol., 1985).

### **Tabulka 13 | Příklady difuzních koeficientů fúzních proteinů o různé buněčné lokalizaci stanovené metodou FRAP**

V tabulce jsou uvedeny difuzní koeficienty v buňce různě lokalizovaných proteinů. Všechny bílkoviny byly zkoumány za pomoci fúzního značení GFP nebo jeho variantou. D znamená difuzní koeficient, ER endoplasmatické retikulum, Ku70 je podjednotka Ku proteinu, který se účastní oprav DNA, MHC I je glykoprotein zapojený v imunitních procesech, KDEL<sub>R</sub> je receptor rozpoznávající signální sekvenci Lys-Asp-Glu-Leu, která je důležitá pro zadržení proteinů v ER. Všechny uvedené proteiny lokalizované v plasmatické membráně jsou GPCR. LHR je receptor pro luteinizační hormon, GnRHR je receptor pro gonadotropin-uvolňující hormon, B<sub>2</sub>R je bradykininový receptor typu 2 a 5-HT<sub>1A</sub>R je serotoninový receptor typu 1A.

<b>Protein</b>	<b>Prostředí</b>	<b>D (<math>\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>Publikace</b>
<b>EGFP</b>	vodný roztok	87	Swaminathan a kol., 1997
<b>EGFP</b>	cytoplasma	25	Swaminathan a kol., 1997
<b>EGFP</b>	lumen ER	5-10	Dayel a kol., 1999
<b>Ku70-EGFP</b>	jádro	0,35	Rodgers a kol., 2002
<b>MHC I-EGFP</b>	membrána ER	0,46	Marguet a kol., 1999
<b>KDEL<sub>R</sub>-GFP</b>	membrána Golgi	0,46	Cole a kol., 1996
<b>LHR-EGFP</b>	plasmatická membrána	0,16	Horvat a kol., 1999
<b>GnRHR-EGFP</b>	plasmatická membrána	0,12-0,16	Nelson a kol., 1999
<b>B<sub>2</sub>R-EYFP</b>	plasmatická membrána	0,25-0,35	Philip a kol., 2007
<b>5-HT<sub>1A</sub>R-EYFP</b>	plasmatická membrána	0,18	Pucadyil a Chattopadhyay, 2007

Jedním z faktorů, který může hrát roli ve zkreslení skutečné hodnoty D v našich experimentech, je i zvolená buněčná linie. Při snímání v rovině sklíčka (RS) totiž hraje roli rovněž „plochost“ membrány, kterou dané buňky tvoří ve styku se sklíčkem. Buňky

HEK293 jsou často přichyceny pomocí membránových výběžků, a proto je v této rovině poměrně složité najít buňku vhodnou k měření. Navíc může být membrána různě zprohýbaná, což pak může vytvářet odchylku v chování molekul, pokud předpokládáme, že je membrána rovná. Z tohoto úhlu pohledu jsou pro experimenty vhodnější např. buňky COS-7, o kterých je známo, že vytvářejí na rozhraní buňka-skličko pěkné rovné membrány (Day a kol., 2012). Možná i z tohoto důvodu některé skupiny raději volí měření v rovině průřezu buňkou (RP) (Pucadyil a Chattopadhyay, 2007; Dorsch a kol., 2009), kdy mohou analyzovat i buňky, které nejsou pro měření metodou FRAP z tohoto pohledu ideální. Za předpokladu, že jde pouze o zájem o relativní změnu mobility zkoumaných molekul po nějakém experimentálním zásahu, je toto uspořádání korektní, ovšem naměřené difuzní koeficienty je pak třeba brát pouze jako orientační (není-li zvolen jiný matematický model pro hodnocení získaných dat – základní model totiž počítá s dvojrozměrným pohybem zkoumaných molekul).

## 7.2. Metodické aspekty měření metodami FRAP a RICS

Důležitou a časově náročnou část výsledků této diplomové práce tvoří podrobná analýza metody FRAP, kritické hodnocení sběru dat a hodnocení výsledků za různých experimentálních uspořádání. Následně bylo rovněž provedeno srovnání výsledků získaných metodou FRAP s výsledky získanými pomocí metody RICS

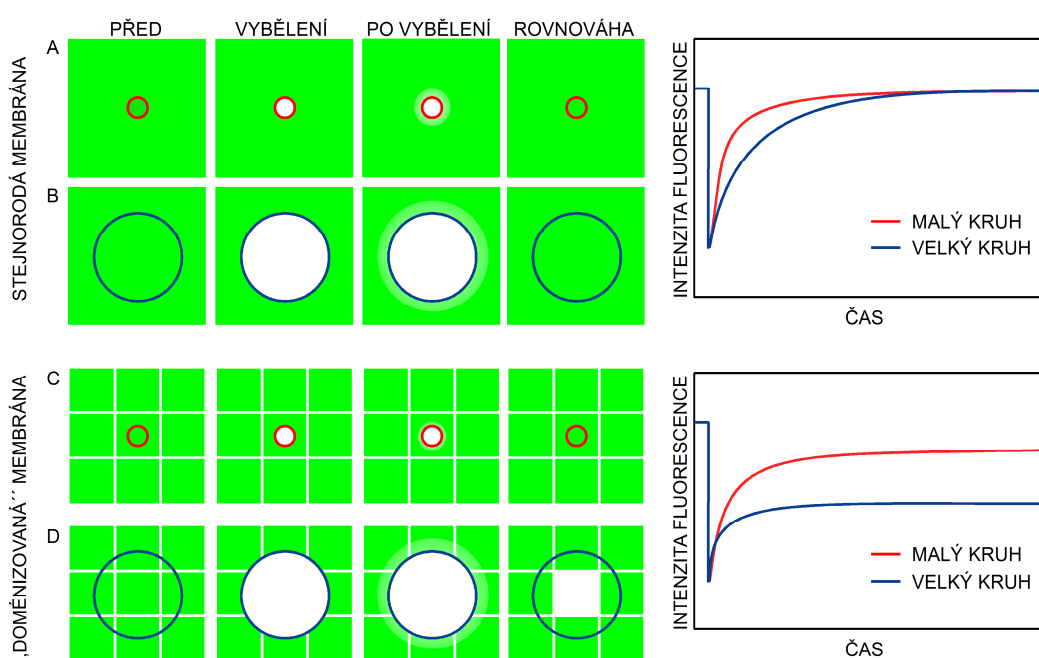
Hned zpočátku byla řešena otázka, jakým nejvhodnějším způsobem analyzovat data naměřená v rovině průřezu buňkou (RP). Pokud by v tomto uspořádání byl jako oblast zájmu (ROI) uvažován celý vybělovaný kruh, tvořil by zhruba 2/3 této hodnoty signál z intracelulární a extracelulární strany membrány, který se blíží nule. Používaný program totiž udává pro každé ROI v daném časovém intervalu konkrétní série obrázků průměrnou hodnotu intenzit v konkrétní oblasti. Proto byla, vzhledem k výsledkům Pucadyila a Chattopadhyaye (2007), prověřována vhodnost „modifikované“ analýzy, kdy byla v rámci vybělovaného kruhu při následném hodnocení dat uvažována pouze plasmatická membrána („obdélník“), která vykazovala fluorescenční signál. Abychom vhodnost této modifikace potvrdili rovněž statisticky, byl stanoven poměr signál/pozadí pro jednotlivá měření, který ukázal výrazné zlepšení kvality analyzovaného fluorescenčního signálu. Analogicky byla upravena i oblast zájmu „celá buňka“ (CB), která byla použita pro korekci naměřených dat.

Dalším parametrem našeho zájmu byl průměr vybělovaného kruhu. V tomto ohledu byla pozorována zajímavá závislost – s vyšším průměrem ROI byl rovněž vyšší i námi stanovený zdánlivý difuzní koeficient, a to jak v buňkách kontrolních, tak v buňkách inkubovaných s  $\beta$ -CDX. Hodnoty mobilních frakcí však na průměru vybělované oblasti

závislé nebyly. Podobná měření FRAP byla prováděna indickou skupinou (Pucadyil a Chattopadhyay, 2007) při analýze mobility 5-HT<sub>1A</sub>R, které však byly exprimovány v buněčné linii CHO. Deplece cholesterolu z plasmatické membrány byla provedena obdobným způsobem – inkubací buněk s methyl- $\beta$ -cyklodextrinem. Zatímco v případě kontrolních buněk nedošlo ke změně ani jednoho parametru ( $M_f$  ani  $D_{zd}$ ), v případě buněk inkubovaných před pokusy s methyl- $\beta$ -cyklodextrinem byla situace jiná. Se zvyšujícím se průměrem vybělovaného kruhu se snižovala hodnota mobilní frakce a zvyšovala se hodnota zdánlivého difuzního koeficientu. Je však třeba poznamenat, že autoři využívali vybělované oblasti o průměru v rozmezí 1,5-3,0  $\mu\text{m}$ , zatímco v této práci jsou použity oblasti o průměru 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Autoři zmíněného článku získané výsledky vysvětlují s pomocí modelu „membránových okrsků“, které definují odlišným způsobem ve srovnání s obecnou představou membránových raftů bohatých na cholesterol a sfingomyelin, které tímto modelem pomocí metody FRAP rozlišit nelze. Tyto okrsky jsou často označovány jako jakési „ohrádky“. Jejich velikost se odhaduje na zhruba 0,4-0,7  $\mu\text{m}$  v průměru. Pravděpodobně se jedná o oddíly tvořené proteiny buněčného cytoskeletu, které mohou být přímo zanořeny v plasmatické membráně nebo se mohou vázat na jiné membránové bílkoviny. Pohyb proteinů v rámci těchto oblastí se neliší od volné difuze v membráně, ovšem přeskok do „vedlejší ohrádky“ je proces nepoměrně pomalejší a je zřejmě dán termodynamickými fluktuacemi membránových a cytoskeletálních součástí (Salomé a kol., 1998). Pokud se tedy při vybělování „trefíme“ dovnitř takové „ohrádky“, nejsou naměřené parametry nijak ovlivněné. Pokud je však vybělovaná oblast natolik velká, že pokrývá více takových struktur, sníží se významně mobilní frakce zkoumaných molekul, protože centrální „ohrádky“ budou vybělené zcela a difuze značených proteinů do těchto oblastí bude omezena. Tím je urychleno dosažení plató intenzity fluorescence v oblasti zájmu, a proto je zkrácen rovněž relaxační čas, a tudíž zvýšen difuzní koeficient dané látky (viz rovnici 5.11 na str. 65). Na obrázku 36 (str. 96) je schematicky zachycen tento model a porovnání očekávaných výsledků za předpokladu, že membrána je stejnorodá, nebo „doménizovaná“. Autoři studie předpokládají, že deplece cholesterolu z plasmatické membrány může indukovat tvorbu jakýchsi uspořádanějších oblastí v rámci membrány, a tudíž je následně snížena mobilní frakce zkoumaných receptorů (Pucadyil a Chattopadhyay, 2007). Při absenci poklesu mobilní frakce nemůžeme jednoduše vysvětlit naše výsledky pomocí tohoto modelu.

Pro rovinu průřezu buňkou se nabízí ještě jedno vysvětlení. I když měříme určitou rovinu buňky, fluorescenční signál se nachází rovněž nad a pod rovinou našeho zájmu. Značené proteiny z těchto rovin rovněž difundují do ROI. V případě většího vybělovaného kruhu je pak tento příspěvek větší díky relativně větší ploše měřené oblasti membrány.

Avšak tímto způsobem není možné vysvětlit chování molekul v rovině sklička, protože nad a pod touto rovinou se nachází intracelulární a extracelulární prostor, které nevykazují fluorescenční signál. Popsaná závislost by si jistě zasloužila hlubší prozkoumání. Bylo by vhodné využít různé velikosti průměru vybělované oblasti (počínaje např. 1,5  $\mu\text{m}$  a konče např. 8,0  $\mu\text{m}$ ). Aby bylo možné zjistit, zda je tato závislost doménou pouze živých systémů, bylo by vhodné provést pro srovnání rovněž měření ve volných modelových membránách.



**Obrázek 36 | Schematické znázornění očekávaných výsledků měření FRAP pro stejnorodou a „doménizovanou“ membránu při použití různých velikostí vybělovaných oblastí**

Pokud by se membrána chovala jako stejnorodá (části A a B), neměla by mít velikost vybělovaného kruhu vliv na výsledný difuzní koeficient. Relaxační čas ( $\tau$ ) by sice byl u většího kruhu vyšší, ovšem při výpočtu difuzního koeficientu je druhá mocnina průměru vybělovaného kruhu dělena čtyřnásobkem této hodnoty (viz rovnici 5.11 na str. 65). Za předpokladu, že je membrána doménizovaná (v tomto případě jsou uvažovány „ohrádky“ tvořené proteiny cytosleketu), jsou výsledky odlišné (část C a D). Při použití malého vybělovaného kruhu je šance „trefit se“ dovnitř „ohrádky“, v rámci níž se zkoumané molekuly chovají jako ve stejnorodé membráně. Při použití většího kruhu je pravděpodobné, že některá doména bude vybělena zcela, což za předpokladu pomalých „přeskoků“ mezi „ohrádkami“ významně sníží mobilní frakci molekul, a tím se logicky zvýší difuzní koeficient.

Upraveno podle Pucadyil a Chattopadhyay, 2007



Při porovnání výsledků získaných měření v různých rovinách buňky se hodnoty  $D_{zd}$  statisticky významně nelišily. Byl ovšem patrný jistý trend, kdy průměrné hodnoty zdánlivých difuzních koeficientů naměřených v RS měly o něco (i když nesignifikantně) vyšší hodnotu. Tento jev může být dán výpočtem  $D_{zd}$ , ve kterém bylo pro zjednodušení i při analýze RP uvažováno snímání z celého vybělovaného kruhu (výpočet byl tedy proveden pro kruhové ROI), i když signál zahrnoval pouze obdélníkové ROI obsahující signál plasmatické membrány uvnitř tohoto kruhu. I přes toto zjednodušení však nebyly získané hodnoty  $D_{zd}$  v různých rovinách signifikantně rozdílné. Z tohoto úhlu pohledu tedy můžeme konstatovat, že obě roviny jsou vhodné pro analýzu metodou FRAP, i když RS lépe vyhovuje klasickému matematickému modelu FRAP metody (Soumpasis, 1983).

Dále byly porovnány výsledné hodnoty  $D_{zd}$  naměřené metodou FRAP a RICS v rovině sklíčka. Opět nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v získaných hodnotách. Studie skupiny prof. Hofa z roku 2011 se detailně zabývala srovnáním těchto dvou přístupů při studiu interakce makromolekul s „lešeními“ (*scaffolds*) tvořenými nanovláknky. V závěru autoři konstatují, že FRAP nemá takovou rozlišovací schopnost jako RICS (nanomolární koncentrace látek, odlišení difuze od přechodné vazby na lešení atd.). RICS však naproti tomu vyžaduje dobrou znalost zkoumaného systému, aby bylo možné vytvořit komplexní modely vhodné pro analýzu obrazu. Závěrem této studie tedy je, že nejlepším způsobem je kombinace obou přístupů (Norris a kol., 2011). K tomuto závěru se přikláníme rovněž i my, protože obě metody jsou z hlediska získaných výsledků analogické, ovšem jejich princip je rozdílný. Je-li pak nějaký fenomén (např. absence relativní změny mobility zkoumaného konstruktu TRH-R-EGFP) detekován oběma metodami současně, je výpovědní hodnota takového závěru o to větší.

### 7.3. Experimenty na transientně transfekovaných buňkách HEK293

Druhá velká část této diplomové práce byla zaměřena na zavedení postupu transienční (přechodné) transfekce buněčné linie HEK293 konstrukty DOR-ECFP a DOR-EYFP, jejichž funkčnost bylo rovněž nutné ověřit. Buňky HEK293 jsou v biologickém výzkumu široce využívanou linií, protože jejich kultivace je relativně levná a nenáročná. Dále se k jejich transfekci dají využít téměř všechny běžné metody s relativně vysokou účinností. Rovněž disponují biochemickými dráhami, které jsou schopné produkovat (přepis a překlad mRNA) a finálně upravovat (posttranslační modifikace a „sbalování“ proteinu) většinu savčích a velké množství „nesavčích“ bílkovin (Thomas a Smart, 2005). Pro lepší pochopení nejen této modelové buněčné linie byl skupinou amerických vědců proveden plošný průzkum endogenní exprese GPCR a s nimi spojených proteinů pomocí analýzy izolované mRNA.

Ukázalo se, že buňky HEK293 endogenně produkují mj.  $G_i$  trimerní G proteiny a další podřízené členy dráhy opioidních receptorů. Z opioidních receptorů produkují endogenně pouze DOR, ovšem v relativně nízkém množství (Atwood a kol., 2011).

Jelikož jsou oba plasmidy použité k přípravě konstruktů komerčně dostupné a prakticky totožné (vyjma použité varianty GFP) a k jejich přípravě byl využit stejný inzert a restriční enzymy, byl hlouběji analyzován pouze reprezentativní konstrukt DOR-EYFP. S tímto konstruktem bylo možné snadněji pracovat i díky fluorescenčním charakteristikám žlutého fluorescenčního proteinu (při použití DOR-ECFP nebylo možné oddělit fluorescenci ECFP od fluorescence barviva Hoechst 33255 použité k barvení buněčných jader).

Pro transfekci byla využita lipofekční metoda za použití látky Lipofectamine<sup>®</sup> Reagent. V experimentech se ukázalo, že nejvhodnější je transfekované buňky před pokusy kultivovat 48 hodin. V případě 24 hodin ještě není exprese konstruktů dostatečně vysoká a v případě 72 hodin je sice počet transfekovaných buněk v absolutní hodnotě víceméně podobný jako při 48 hodinách, ovšem v poměru ke všem buňkám v daném záběru je tento počet významně nižší. Proto předpokládáme, že k další expresi už nedochází. Dochází pouze k dělení buněk, a tedy k postupnému „vyředování“ signálu. Podařilo se nám dosáhnout účinnosti transfekce kolem 20 %. V literatuře se objevují články uvádějící účinnost transfekce pomocí Lipofectamine 2000 nebo Lipofectamine Plus až 82-98 % při současné nízké toxicitě těchto látek (viabilita buněk 67-80 %) (Maurisse a kol., 2010). Jedná se však o novější verze lipofekční látky, které jsme neměli k dispozici.

Z obrázků buněk transfekovaných oběma konstrukty najednou (tedy buněk kotransfekovaných) je patrné, že některé buňky neobsahují žádný fluorescenční signál, některé pouze signál jedné sondy a některé jsou úspěšně kotransfekované oběma konstrukty najednou. V budoucnu chceme měřit FRAP či RICS na buňkách s fluorescenčně značeným DOR a rovněž analyzovat oligomerizaci DOR v živých buňkách. Pro takové pokusy je potřeba aby byly buňky kotransfekované. Proto by bylo nejlepším řešením vytvořit stabilní buněčnou linii. Tato linie by obsahovala pouze jeden z konstruktů a druhý by mohl být v případě potřeby do buněk transienně transfekován. Oba konstrukty totiž obsahují stejnou rezistenci k antibiotikům (geneticinovou), takže není možné je v této formě stabilně selektovat oba ve stejné buňce. Zároveň samotné buňky HEK293 nejsou odolné vůči geneticinu, takže by neměl být problém ony základní stabilní buněčné linie vytvořit.

Pro ověření funkčnosti konstruktů, tedy schopnosti DOR aktivovat  $G_i$  proteiny, byla využita metoda vazby [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S v kombinaci s imunoprecipitací. Principem je „uvěznění“ radioaktivně značeného analogu GTP v aktivovaném G proteinu (díky vysokoafinní vazbě), protože tento protein není schopen GTP $\gamma$ S štěpit. Tato metoda je v oblasti GPCR často

využívána k výzkumu látek, které by mohly funkční vlastnosti daného receptoru nějakým způsobem ovlivňovat (Brejchova a kol., 2011). V prvotním experimentu byly všechny naměřené hodnoty velice malé, a tudíž zatížené velkou chybou. To bylo jasně patrné i z výsledků získaných v tom samém pokusu, ovšem na vzorku plasmatických membrán buněčné linie DOR-G<sub>i</sub>, který posloužil jako pozitivní kontrola. Tyto buňky exprimují DOR s fúzně připojenou G<sub>α</sub>i podjednotkou (Moon a kol., 2001). Na základě tohoto pokusu byl protokol upraven a bylo použito více buněčného materiálu transientně transfekovaných buněk. Po úpravě experimentálního protokolu již bylo pozorováno zhruba 2,5-násobné zvýšení vazby [<sup>35</sup>S]GTPγS po přidání TRH oproti bazální hodnotě (odpovídající konstitutivní aktivitě receptoru – tedy bez TRH). Z důvodu potřeby většího množství materiálu se opět přikláníme k tvorbě stabilní buněčné linie, protože transientní transfekce v takovém rozsahu je finančně velmi náročná. Podpora výsledků naměřených mikroskopickými technikami metodami biochemickými je však vysoce žádoucí.

Na transfekovaných buňkách byly rovněž stanovovány doby života excitovaného stavu DOR-ECFP a DOR-EYFP. Výsledky sice nejsou statisticky významně rozdílné z důvodu nízkého počtu pozorování v datových souborech, ovšem z grafu distribucí četností hodnot doby života excitovaného stavu je patrný rozdíl v průměrných hodnotách. Získané údaje jsou pro nás důležité, protože se v budoucnu chceme zabývat oligomerizací DOR, jak již bylo zmíněno výše. Všechny možné varianty homooligomerizace a heterooligomerizace opioidních receptorů byly popsány před více jak 10 lety (Wang a kol., 2005). Ovšem s výzkumem vlivu deplece cholesterolu z plasmatické membrány na stabilitu a funkci těchto komplexů se zatím v literatuře nesetkáme. K tomuto účelu plánujeme využít metodu FRET v kombinaci s měřením FLIM. Toto uspořádání minimalizuje komplikace použití klasického „intenzitního“ provedení (Piston a Kremers, 2007).

V závěru práce byla porovnána mobilita konstruktů DOR-EYFP a TRH-R-EGFP stanovená metodou RICS. Srovnání neodhalilo žádný statisticky významný rozdíl v mobilitě těchto dvou značených konstruktů v buňkách HEK293 ani v poměru G<sub>0V</sub>/G<sub>0H</sub>, jehož význam je popsán výše.

## 8. Závěr

Deplece cholesterolu z plasmatické membrány pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu neměla vliv na *lifetime* EGFP fúzně připojeného k TRH-R.

Deplece cholesterolu z plasmatické membrány neměla vliv na mobilitu TRH R-EGFP v živých buňkách odvozených od buněčné linie HEK293. Tento výsledek byl podložen měřením dvěma nezávislými metodami FRAP a RICS.

Výsledky FRAP a RICS, které byly získány při analýze živých buněk, jsou v souladu s výsledky získanými při studiu biochemických preparátů (detergent-rezistentních membránových domén) – převážná většina TRH-R je i v nativní plasmatické membráně lokalizována mimo membránové domény / rafty.

Při měření metodou FRAP byly získané hodnoty zdánlivého difuzního koeficientu závislé na velikosti (průměru) vyběhované oblasti, zatímco hodnoty mobilní frakce tímto parametrem ovlivněny nebyly. Snímání buněk v rovině sklíčka a v průřezu buňkou poskytovalo srovnatelné hodnoty zdánlivých difuzních koeficientů.

Numerické hodnoty zdánlivého difuzního koeficientu stanovené metodou FRAP byly blízké hodnotám stanoveným metodou RICS.

V závěrečné části diplomové práce, která byla věnována vypracování metody pro transfekci buněčné linie HEK293 konstrukty DOR-ECFP a DOR-EYFP lipofekční metodou, bylo zjištěno, že optimálním postupem je kultivovat transfekované buňky (před fluorescenčními pokusy) 48 hodin. Úspěšnost transfekce dosáhla za těchto podmínek přibližně 20 %.

Stanovením agonistou-stimulované vysokoafinní vazby nehydrolyzovatelného analogu GTP, [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S, byla prokázána funkčnost konstruktů DOR-ECFP a DOR-EYFP po jejich expresi v buňkách HEK293. Fúzní bílkoviny aktivovaly příslušný G protein.

## 9. Seznam použité literatury

- Ahn, S., Wei H., Garrison T. R., Lefkowitz R. J. (2004) Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by  $\beta$ -arrestins 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:7807-7811
- Alves, I. D., Salamon Z., Hruby V. J., 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
- Archer-Lahlou, E., Audet N., Amraei M. G., Huard K., Paquin-Gobeil M., Pineyro G. (2009) Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13:147-163
- Atwood, B. K., Lopez J., Wager-Miller J., Mackie K., Straiker A. (2011) Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics*. 12:14
- Axelrod, D., Koppel D. E., Schlessinger J., Elson E., Webb W. W. (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*. 16:1055-1069
- Baumgart, T., Hess S. T., Webb W. W. (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. 425:821-824
- Baumgart, T., Hammond A. T., Sengupta P., Hess S. T., Holowka D. A., Baird B. A., Webb W. W. (2007) Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:3165-3170
- Brejchova, J., Sykora J., Dlouha K., Roubalova L., Ostasov P., Vosahlikova M., Hof M., Svoboda P. (2011) Fluorescence spectroscopy studies of HEK293 cells expressing DOR-G<sub>i</sub>1 $\alpha$  fusion protein; the effect of cholesterol depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1808:2819-2829
- Brown, C. M., Dalal R. B., Hebert B., Digman M. A., Horwitz A. R., Gratton E. (2008) Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope. *Journal of Microscopy*. 229:78-91
- Brown, D. A., London E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *The Journal of Membrane Biology*. 164:103-114
- Brown, D. A., London E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:17221-17224

- Brügger, B., Glass B., Haberkant P., Leibrecht I., Wieland F. T., Kräusslich H. G. (2006) The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:2641-2646
- Campbell, R. E., Tour O., Palmer A. E., Steinbach P. A., Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:7877-7882
- Cao, J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lembo P., Ahmad S., Walker P. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:32281-32287
- Cao, W., Luttrell L. M., Medvedev A. V., Pierce K. L., Daniel K. W., Dixon T. M., Lefkowitz R. J., Collins S. (2000) Direct binding of activated c-Src to the  $\beta_3$ -adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:38131-38134
- Cole, N. B., Smith C. L., Sciaky N., Terasaki M., Edidin M., Lippincott-Schwartz J. (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*. 273:797-801
- Cormack, B. P., Valdivia R. H., Falkow S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 173:33-38
- Cottet, M., Faklaris O., Maurel D., Scholler P., Doumazane E., Trinquet E., Pin J. P., Durroux T. (2012) BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Frontiers in Endocrinology*. 3:92
- Cramer, A., Whitehorn E. A., Tate E., Stemmer W. P. (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology*. 14:315-319
- Cvejic, S., Devi L. A. (1997) Dimerization of the  $\delta$  opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:26959-26964
- Daly, C. J., McGrath J. C. (2003) Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 100:101-118
- Davies, M. N., Secker A., Halling-Brown M., Moss D. S., Freitas A. A., Timmis J., Clark E., Flower D. R. (2008) GPCRTree: online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Research Notes*. 1:67

- Day, C. A., Kraft L. J., Kang M., Kenworthy A. K. (2012) Analysis of protein and lipid dynamics using confocal fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Current Protocols in Cytometry*. Chapter 2:Unit2.19
- Dayel, M. J., Hom E. F., Verkman A. S. (1999) Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophysical Journal*. 76:2843-2851
- de la Peña, P., Delgado L. M., del Camino D., Barros F. (1992) Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 267:25703-25708
- De La Torre, D., Gordon E. A., Digman M. A., Stakic M., Häberlein H., Gratton E., Caballero-George C. (2013) Raster Image Correlation Spectroscopy in Live cells Expressing Endothelin ET<sub>A</sub> Receptor. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 7:499-504
- Del Valle, E. M. M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 39:1033-1046
- Digman, M. A., Stakic M., Gratton E. (2013) Raster image correlation spectroscopy and number and brightness analysis. *Methods in Enzymology*. 518:121-144
- Digman, M. A., Sengupta P., Wiseman P. W., Brown C. M., Horwitz A. R., Gratton E. (2005) Fluctuation correlation spectroscopy with a laser-scanning microscope: exploiting the hidden time structure. *Biophysical Journal*. 88:L33-36
- Dorsch, S., Klotz K. N., Engelhardt S., Lohse M. J., Bünemann M. (2009) Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nature Methods*. 6:225-230
- Doumazane, E., Scholler P., Zwier J. M., Trinquet E., Rondard P., Pin J. P. (2011) A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:66-77
- Drab, M., Verkade P., Elger M., Kasper M., Lohn M., Lauterbach B., Menne J., Lindschau C., Mende F., Luft F. C., Schedl A., Haller H., Kurzchalia T. V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 293:2449-2452
- Drmotič, T., Gould G. W., Milligan G. (1998) Real time visualization of agonist-mediated redistribution and internalization of a green fluorescent protein-tagged form of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:24000-24008

- Du, D., Raaka B. M., Grimberg H., Lupu-Meiri M., Oron Y., Gershengorn M. C. (2005) Carboxyl tail cysteine mutants of the thyrotropin-releasing hormone receptor type 1 exhibit constitutive signaling: role of palmitoylation. *Molecular Pharmacology*. 68:204-209
- Elson, E. L., Magde D. (1974) Fluorescence Correlation Spectroscopy .1. Conceptual Basis and Theory. *Biopolymers*. 13:1-27
- Engel, S., Skoumbourdis A. P., Childress J., Neumann S., Deschamps J. R., Thomas C. J., Colson A. O., Costanzi S., Gershengorn M. C. (2008) A virtual screen for diverse ligands: discovery of selective G protein-coupled receptor antagonists. *Journal of the American Chemical Society*. 130:5115-5123
- Ferguson, S. S. G. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*. 53:1-24
- Filliol, D., Ghozland S., Chluba J., Martin M., Matthes H. W., Simonin F., Befort K., Gavériaux-Ruff C., Dierich A., LeMeur M., Valverde O., Maldonado R., Kieffer B. L. (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*. 25:195-200
- Flower, D. R. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1422:207-234
- Foster, L. J., De Hoog C. L., Mann M. (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:5813-5818
- Fra, A. M., Williamson E., Simons K., Parton R. G. (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:8655-9
- Fredriksson, R., Lagerström M. C., Lundin L. G., Schiöth H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*. 63:1256-1272
- Ganong, W. F. (2005) Přehled lékařské fyziologie. 20. vydání. Praha: Galén. ISBN: 8072623117
- Gao, C. J., Niu L., Ren P. C., Wang W., Zhu C., Li Y. Q., Chai W., Sun X. D. (2012) Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system. *Neuroscience*. 202:352-362



- García-Sáez, A. J., Chiantia S., Schwille P. (2007) Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 282:33537-33544
- Gavériaux-Ruff, C., Kieffer B. L. (2011) Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behavioural Pharmacology*. 22:405-414
- George, S. R., Fan T., Xie Z., Tse R., Tam V., Varghese G., O'Dowd B. F. (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:26128-26135
- Gershengorn, M. C., Osman R. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiological Reviews*. 76:175-191
- Gimpl, G., Burger K., Fahrenholz F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*. 36:10959-10974
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick J. G., Santini F., Gurevich V. V., Penn R. B., Gagnon A. W., Keen J. H., Benovic J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*. 383:447-450
- Gorter, E., Grendel F. (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of Experimental Medicine*. 41:439-443
- Graham, F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. 36:59-74
- Granier, S., Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Weis W. I., Kobilka B. K. (2012) Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*. 485:400-404
- Guo, W., Urizar E., Kralikova M., Mobarec J. C., Shi L., Filizola M., Javitch J. A. (2008) Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *The EMBO Journal*. 27:2293-2304
- Hall, R. A., Premont R. T., Chow C. W., Blitzer J. T., Pitcher J. A., Claing A., Stoffel R. H., Barak L. S., Shenolikar S., Weinman E. J., Grinstein S., Lefkowitz R. J. (1998) The  $\beta_2$ -adrenergic receptor interacts with the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger regulatory factor to control  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. *Nature*. 392:626-630
- Hanson, M. A., Stevens R. C. (2009) Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure*. 17:8-14

- Hanyaloglu, A. C., Seeber R. M., Kohout T. A., Lefkowitz R. J., Eidne K. A. (2002) Homo- and hetero-oligomerization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor subtypes. Differential regulation of  $\beta$ -arrestins 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:50422-50430
- Hebert, T. E., Moffett S., Morello J. P., Loisel T. P., Bichet D. G., Barret C., Bouvier M. (1996) A peptide derived from a  $\beta_2$ -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:16384-16392
- Heim, R., Prasher D. C., Tsien R. Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12501-12504
- Heim, R., Cubitt A. B., Tsien R. Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*. 373:663-664
- Horvat, R. D., Nelson S., Clay C. M., Barisas B. G., Roess D. A. (1999) Intrinsically fluorescent luteinizing hormone receptor demonstrates hormone-driven aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 255:382-385
- Hsieh, K. P., Martin T. F. (1992) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Molecular Endocrinology*. 6:1673-1681
- Chalfie, M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805
- Chini, B., Parenti M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *Journal of Molecular Endocrinology*. 32:325-338
- Chini, B., Parenti M. (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *Journal of Molecular Endocrinology*. 42:371-379
- Chu Sin Chung, P., Kieffer B. L. (2013) Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 140:112-120
- Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold R., Drummen G. P. (2012) Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. 17:4047-4132
- Janecka, A., Fichna J., Janecki T. (2004) Opioid receptors and their ligands. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 4:1-17
- Jones, B. W., Hinkle P. M. (2005)  $\beta$ -arrestin mediates desensitization and internalization but does not affect dephosphorylation of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:38346-38354

- Jones, B. W., Hinkle P. M. (2009) Subcellular trafficking of the TRH receptor: effect of phosphorylation. *Molecular Endocrinology*. 23:1466-1478
- Karnovsky, M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Klausner R. D. (1982) The concept of lipid domains in membranes. *The Journal of Cell Biology*. 94:1-6
- Kaupmann, K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A., Bettler B. (1998) GABA<sub>B</sub>-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. 396:683-687
- Kilsdonk, E. P., Yancey P. G., Stoudt G. W., Bangerter F. W., Johnson W. J., Phillips M. C., Rothblat G. H. (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:17250-17256
- Kobilka, B., Schertler G. F. X. (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29:79-83
- Kobilka, B. K., Deupi X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 28:397-406
- Kolakowski, L. F. (1994) GCRDb - a G-Protein-Coupled Receptor Database. *Receptors & Channels*. 2:1-7
- Kurose, H. (2003) G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$  as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sciences*. 74:155-161
- Kuzmin, P. I., Akimov S. A., Chizmadzhev Y. A., Zimmerberg J., Cohen F. S. (2005) Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt. *Biophysical Journal*. 88:1120-1133
- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. 3. vydání. New York: Springer. ISBN: 9780387463124
- Lapalu, S., Moisand C., Mazarguil H., Cambois G., Mollereau C., Meunier J. C. (1997) Comparison of the structure-activity relationships of nociceptin and dynorphin A using chimeric peptides. *FEBS Letters*. 417:333-336
- Law, P. Y., Wong Y. H., Loh H. H. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40:389-430
- Le, P. U., Guay G., Altschuler Y., Nabi I. R. (2002) Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:3371-3379
- Lee, A. G., Birdsall N. J., Metcalfe J. C., Toon P. A., Warren G. B. (1974) Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes. *Biochemistry*. 13:3699-3705

- Lechan, R. M., Fekete C. (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*. 153:209-235
- Levental, I., Byfield F. J., Chowdhury P., Gai F., Baumgart T., Janmey P. A. (2009) Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles. *Biochemical Journal*. 424:163-167
- Li, X., Zhang G., Ngo N., Zhao X., Kain S. R., Huang C. C. (1997) Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:28545-28549
- Lingwood, D., Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 327:46-50
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp E., Kenworthy A. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2:444-456
- Liu, W., Chun E., Thompson A. A., Chubukov P., Xu F., Katritch V., Han G. W., Roth C. B., Heitman L. H., AP I. J., Cherezov V., Stevens R. C. (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science*. 337:232-236
- Lohse, M. J. (2010) Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Current Opinion in Pharmacology*. 10:53-58
- Lowe, J. D., Celver J. P., Gurevich V. V., Chavkin C. (2002)  $\mu$ -Opioid receptors desensitize less rapidly than delta-opioid receptors due to less efficient activation of arrestin. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:15729-15735
- Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275
- Luttrell, L. M. (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular Biotechnology*. 39:239-264
- Lutz, P. E., Kieffer B. L. (2012) Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*. 36:195-206
- Malbon, C. C., Karoor V. (1998) G-protein-linked receptors as tyrosine kinase substrates: new paradigms in signal integration. *Cellular signalling*. 10:523-527
- Marguet, D., Spiliotis E. T., Pentcheva T., Lebowitz M., Schneck J., Edidin M. (1999) Lateral diffusion of GFP-tagged H2Ld molecules and of GFP-TAP1 reports on the assembly and retention of these molecules in the endoplasmic reticulum. *Immunity*. 11:231-240
- Matz, M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., Lukyanov S. A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*. 17:969-973

- Maurel, D., Comps-Agrar L., Brock C., Rives M. L., Bourrier E., Ayoub M. A., Bazin H., Tinel N., Durroux T., Prezeau L., Trinquet E., Pin J. P. (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nature Methods*. 5:561-567
- Maurisse, R., De Semir D., Enamekhoo H., Bedayat B., Abdolmohammadi A., Parsi H., Gruenert D. C. (2010) Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnology*. 10:9
- McVey, M., Ramsay D., Kellett E., Rees S., Wilson S., Pope A. J., 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:14092-14099
- Miller, W. E., Lefkowitz R. J. (2001) Expanding roles for  $\beta$ -arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*. 13:139-145
- Milligan, G., Kostenis E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*. 147:S46-S55
- Mitchell, F. M., Griffiths S. L., Saggerson E. D., Houslay M. D., Knowler J. T., Milligan G. (1989) Guanine-nucleotide-binding proteins expressed in rat white adipose tissue. Identification of both mRNAs and proteins corresponding to Gi1, Gi2 and Gi3. *Biochemical Journal*. 262:403-408
- Moon, H. E., Bahia D. S., Cavalli A., Hoffmann M., Milligan G. (2001) 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<sub>i1</sub> by mutation of a receptor/G protein contact interface. *Neuropharmacology*. 41:321-330
- Nelson, S., Horvat R. D., Malvey J., Roess D. A., Barisas B. G., Clay C. M. (1999) Characterization of an intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptor and effects of ligand binding on receptor lateral diffusion. *Endocrinology*. 140:950-957
- Nilni, E. A., Sevarino K. A. (1999) The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine Reviews*. 20:599-648
- Noda, M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S., Numa S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*. 295:202-206

- Norris, S. C., Humpolickova J., Amler E., Huranova M., Buzgo M., Machan R., Lukas D., Hof M. (2011) Raster image correlation spectroscopy as a novel tool to study interactions of macromolecules with nanofiber scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 7:4195-4203
- Nygaard, R., Frimurer T. M., Holst B., Rosenkilde M. M., Schwartz T. W. (2009) Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30:249-259
- Oh, P., Schnitzer J. E. (2001) Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G<sub>q</sub> binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G<sub>i</sub> and G<sub>s</sub> target lipid rafts by default. *Molecular Biology of the Cell*. 12:685-698
- Ormö, M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J. (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*. 273:1392-1395
- Ostasov, P., Bourova L., Hejnova L., Novotny J., Svoboda P. (2007) Disruption of the plasma membrane integrity by cholesterol depletion impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>α proteins. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 27:335-352
- Ostasov, P., Krusek J., Durchankova D., Svoboda P., Novotny J. (2008) Ca<sup>2+</sup> responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G<sub>11</sub>α protein overexpression on homologous and heterologous desensitization. *Cell Biochemistry and Function*. 26:264-274
- Ostrom, R. S., Liu X., Head B. P., Gregorian C., Seasholtz T. M., Insel P. A. (2002) Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Molecular Pharmacology*. 62:983-992
- Parton, R. G., del Pozo M. A. (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14:98-112
- Peng, J., Sarkar S., Chang S. L. (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug and Alcohol Dependence*. 124:223-228
- Petersen, N. O., Höddelius P. L., Wiseman P. W., Seger O., Magnusson K. E. (1993) Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: concept and application. *Biophysical Journal*. 65:1135-1146
- Philip, F., Sengupta P., Scarlata S. (2007) Signaling through a G Protein-coupled receptor and its corresponding G protein follows a stoichiometrically limited model. *The Journal of Biological Chemistry*. 282:19203-19216

- Pierce, K. L., Premont R. T., Lefkowitz R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3:639-650
- Pike, L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *The Journal of Lipid Research*. 44:655-667
- Pike, L. J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *The Journal of Lipid Research*. 47:1597-1598
- Pike, L. J. (2009) The challenge of lipid rafts. *The Journal of Lipid Research*. 50 Suppl:S323-328
- Piston, D. W., Kremers G. J. (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*. 32:407-414
- Pollard, T. D., Earnshaw W. C., Lippincott-Schwartz J. (2008) Cell biology. 2. vydání. Philadelphia: Saunders/Elsevier. ISBN: 9781416022558
- Pradhan, A. A., Befort K., Nozaki C., Gavériaux-Ruff C., Kieffer B. L. (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32:581-590
- Prasher, D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-233
- Pucadyil, T. J., Chattopadhyay A. (2006) Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Progress in Lipid Research*. 45:295-333
- Pucadyil, T. J., Chattopadhyay A. (2007) Cholesterol depletion induces dynamic confinement of the G-protein coupled serotonin<sub>1A</sub> receptor in the plasma membrane of living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1768:655-668
- Ramsay, D., Kellett E., McVey M., Rees S., 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. *Biochemical Journal*. 365:429-440
- Renner, U., Glebov K., Lang T., Papisheva E., Balakrishnan S., Keller B., Richter D. W., Jahn R., Ponimaskin E. (2007) Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Molecular Pharmacology*. 72:502-513
- Rodgers, W., Jordan S. J., Capra J. D. (2002) Transient association of Ku with nuclear substrates characterized using fluorescence photobleaching. *The Journal of Immunology*. 168:2348-2355

- Rossow, M. J., Sasaki J. M., Digman M. A., Gratton E. (2010) Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nature Protocols*. 5:1761-1774
- Rudajev, V., Novotny J., Hejnova L., Milligan G., 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 G<sub>q</sub> $\alpha$ /G<sub>11</sub> $\alpha$  protein. *The Journal of Biochemistry*. 138:111-25
- Rybin, V. O., Xu X., Lisanti M. P., 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:41447-41457
- Salahpour, A., Angers S., Mercier J. F., Lagace M., Marullo S., Bouvier M. (2004) Homodimerization of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:33390-33397
- Salomé, L., Cazeils J. L., Lopez A., Tocanne J. F. (1998) Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *European Biophysics Journal*. 27:391-402
- Santoni, V., Molloy M., Rabilloud T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*. 21:1054-1070
- Seifert, R., Wenzel-Seifert K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 366:381-416
- Shevchenko, A., Simons K. (2010) Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11:593-598
- Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*. 217:3-15
- Simons, K., van Meer G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 27:6197-6202
- Simons, K., Ehehalt R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Journal of Clinical Investigation*. 110:597-603
- Simons, K., Gerl M. J. (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11:688-699
- Simons, K., Sampaio J. L. (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3:a004697
- Singer, S. J., Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-731



- Song, G. J., Jones B. W., Hinkle P. M. (2007) Dimerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor potentiates hormone-dependent receptor phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:18303-18308
- Soumpasis, D. M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*. 41:95-97
- Sun, Y., Lu X., Gershengorn M. C. (2003) Thyrotropin-releasing hormone receptors - similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology*. 30:87-97
- Swaminathan, R., Hoang C. P., Verkman A. S. (1997) Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal*. 72:1900-1907
- Thomas, G. H. (2001) New routes to membrane protein structures. Practical course: current methods in membrane protein research. *EMBO Reports*. 2:187-191
- Thomas, P., Smart T. G. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 51:187-200
- Tohgo, A., Pierce K. L., Choy E. W., Lefkowitz R. J., Luttrell L. M. (2002)  $\beta$ -Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:9429-9436
- Tsamaloukas, A., Szadkowska H., Slotte P. J., Heerklotz H. (2005) Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophysical Journal*. 89:1109-1119
- Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*. 67:509-544
- Vaz, W. L., Clegg R. M., Hallmann D. (1985) Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory. *Biochemistry*. 24:781-786
- Vosahlikova, M., Jurkiewicz P., Roubalova L., Hof M., Svoboda P. (2014) High- and low-affinity sites for sodium in delta-OR-Gi1alpha (Cys (351)-Ile (351)) fusion protein stably expressed in HEK293 cells; functional significance and correlation with biophysical state of plasma membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 387:487-502

- Waldhoer, M., Bartlett S. E., Whistler J. L. (2004) Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry*. 73:953-990
- Wang, D., Sun X., Bohn L. M., Sadée W. (2005) Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Molecular Pharmacology*. 67:2173-2184
- Wang, W., Gershengorn M. C. (1999) Rat TRH receptor type 2 exhibits higher basal signaling activity than TRH receptor type 1. *Endocrinology*. 140:4916-4919
- Wunderlich, F., Ronai A., Speth V., Seelig J., Blume A. (1975) Thermotropic lipid clustering in tetrahymena membranes. *Biochemistry*. 14:3730-3735
- Wunderlich, F., Kreutz W., Mahler P., Ronai A., Heppeler G. (1978) Thermotropic fluid goes to ordered "discontinuous" phase separation in microsomal lipids of Tetrahymena. An X-ray diffraction study. *Biochemistry*. 17:2005-2010
- Zheng, H., Chu J., Qiu Y., Loh H. H., Law P. Y. (2008) Agonist-selective signaling is determined by the receptor location within the membrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:9421-9426

## 10. Elektronické zdroje

<http://www.tsienlab.ucsd.edu/HTML/Images/IMAGE%20-%20Rendered%20GFP%20-%201024.jpg>; ke dni 15.3.2014

<http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>; ke dni 15.3.2014