



Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



**Vliv deplece cholesterolu na signální dráhu
iniciovanou receptory spřaženými s G proteiny třídy
 G_q/G_{11}**

Mgr. Pavel Ostašov

Doktorandská disertační práce

2010

Školitel: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Fyziologický ústav AV ČR, Oddělení membránových receptorů;

Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Katedra fyziologie, Oddělení neurobiologie



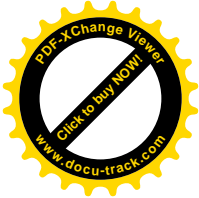
Děkuji svému školiteli **Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc., RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. a RNDr. Lence Bouřové, PhD** za odborné vedení, pomoc a veškerou podporu, kterou mi poskytli během mé práce na fyziologickém ústavu AV ČR v.v.i. a Přírodovědecké fakultě UK.

Dále děkuji **Mgr. Zdence Drastichové, Mgr. Zuzaně Burdíkové, Mgr. Daně Durchánkové PhD a RNDr. Lucii Hejnové, PhD** za pomoc při experimentální práci a vytvoření příjemného prostředí v laboratoři i jejím okolí. Rovněž děkuji řadě dalších kolegů, kteří se různou měrou podíleli na průběhu a dokončení mé disertační práce.



Obsah

| | |
|---|-----------|
| SEZNAM PUBLIKACÍ..... | 5 |
| Původní práce | 5 |
| Přehledný článek..... | 5 |
| Manuskript..... | 5 |
| ABSTRAKTA Z KONFERENCÍ..... | 6 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 8 |
| ÚVOD..... | 11 |
| CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE..... | 13 |
| LITERÁRNÍ PŘEHLED | 15 |
| Receptory spřažené s G proteiny | 15 |
| Struktura GPCR..... | 15 |
| Klasifikace GPCR | 21 |
| Trimerní G proteiny | 22 |
| Klasifikace trimerních G proteinů..... | 23 |
| Třída $G_s\alpha$, $G_{sXL}\alpha$, $G_{olf}\alpha$ | 23 |
| Třída $G_i\alpha$, $G_o\alpha$ | 24 |
| Třída $G_q\alpha$, $G_{11}\alpha$ | 25 |
| Třída $G_{12}\alpha$ a $G_{13}\alpha$ | 26 |
| $\beta\gamma$ podjednotky | 26 |
| Efektory trimerních G proteinů | 27 |
| Adenylylcyklázy | 27 |
| Fosfolipázy $C\beta$ | 28 |
| Fosfolipázy A_2 | 28 |
| cGMP fosfodiesteráza | 29 |
| PI_3 -Kinázy | 29 |
| Iontové kanály | 29 |
| Malé G proteiny | 30 |
| Signalizace s pomocí trimerních G proteinů a její regulace..... | 30 |
| AGS proteiny | 30 |
| GTP-exchange faktory..... | 31 |
| RGS proteiny..... | 31 |
| Desenzitizace hormonálního působení..... | 32 |
| Mechanismus desenzitizace..... | 32 |
| Organizace buněčné membrány..... | 37 |
| Membránové domény | 37 |
| Teorie stěsnání makromolekul (Macromolecular crowding)..... | 41 |
| Kaveoly..... | 42 |



| | |
|---|------------|
| Cytoskelet | 45 |
| MATERIÁLY A METODY | 47 |
| Chemikálie..... | 47 |
| Kultivace buněk | 47 |
| Stanovení koncentrace bílkovin..... | 48 |
| Deplece cholesterolu | 48 |
| Stanovení obsahu fosfolipidů v plazmatických membránách | 48 |
| Sledování hormonem indukované Ca^{2+} odpovědi | 49 |
| Konfokální fluorescenční mikroskopie (CLSM) | 49 |
| Metoda FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) | 50 |
| Internalizace receptoru | 52 |
| Příprava lehkých vezikulů a plazmatických membrán | 52 |
| Izolace plazmatických membrán | 53 |
| Izolace detergent rezistentních membránových domén | 53 |
| Elektroforéza a immunobloting | 54 |
| Vazebné studie s TRH receptorem..... | 55 |
| Vazba $GTP\gamma S$ | 55 |
| VÝSLEDKY | 57 |
| Deplece cholesterolu | 57 |
| Vliv inkubace s CDX na hladiny fosfolipidů v membráně | 57 |
| Buněčná morfologie..... | 59 |
| Vliv deplece cholesterolu na charakteristiku vazby ligandu na TRH-R..... | 59 |
| Vliv deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpověď indukovanou TRH | 59 |
| Desenzitizace Ca^{2+} odpovědi..... | 62 |
| Vliv teploty a deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpověď stimulovanou TRH..... | 62 |
| Vliv deplece cholesterolu na homologní a heterologní desenzitizaci Ca^{2+} odpovědi stimulované ANGII | 65 |
| Subcelurní distribuce $G_q/G_{11}\alpha$ proteinu..... | 70 |
| Vliv deplece cholesterolu na vazbu [^{35}S]GTP γS | 74 |
| Distribuce TRH-R-eGFP detekovaná metodou CLSM..... | 77 |
| Internalizace TRH-R-eGFP | 77 |
| Měření metodou FRAP | 79 |
| DISKUSE | 86 |
| ZÁVĚR | 97 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 100 |
| PŘÍLOHY | 116 |



Seznam publikací

Původní práce

Ostasov, P., Bourova, L., Hejnova, L., Novotny, J. and Svoboda, P. (2007) Disruption of the plasma membrane integrity by cholesterol depletion impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via $G_q/G_{11\alpha}$ proteins. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 27, 335–352

IF= 1.815

Ostasov, P., Krusek, J., Durchankova, D., Hejnova, L., Svoboda, P. and Novotny, J. (2008) Ca^{2+} responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of $G_{11\alpha}$ protein over-expression on homologous and heterologous desensitization of hormone response. *Cell Biochemistry and Function* 26, 264–274

IF= 1.561

Přehledný článek

Drastichova, Z., Bourova, L., Lisy, V., Hejnova, L., Rudajev, V., Stohr, J., Durchankova, D., Ostasov, P., Teisinger, J., Soukup, T., Novotny, J. and Svoboda, P. (2008) Subcellular redistribution of trimeric G-proteins – potential mechanism of desensitisation of hormone response; internalisation, solubilisation, down-regulation. *Phys. Res.* 57 (Suppl.) S1–S10, 2008

IF= 1.505

Manuskript

Ostasov, P., Burdikova, Z., Brejchova, J., Kubinova, L. and Svoboda, P. TRH-receptor internalization and mobility in cholesterol depleted cell membrane; *studies by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and recovery after photobleaching (FRAP)*.



Abstrakta z konferencí

Petr Svoboda, Petr Matousek, Dana Durchankova, Ivana Svandova, Pavel Ostašov and Jiri Novotny (2005) Agonist-induced tyrosine-phosphorylation of G_q/G₁₁α requires intact structure of membrane domains. **Gordon Research Conf. in Molecular Pharmacology, Ciocco (Italy), May 9–13, 2005**

Hejnova, L., Durchankova, D., Ostašov, P., Bourova, L., Novotny, J. and Svoboda, P. (2007) Disruption of the plasma membrane structure by depletion of cholesterol impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G_q/G₁₁α protein. J. Neurochem. 101 (Supl. 1) 52 **Proceedings of Meeting of International Society for Neurochemistry, Salamanca, Spain, June, 2007**

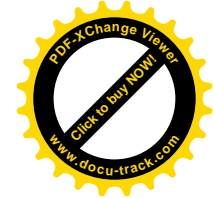
Ostašov, P., Drastichová, Z., Burdíková, Z., Krůšek, J., Novotný, J., Kubínová, L. and Svoboda, P. (2007) The effect of cholesterol depletion on the thyrotropin-releasing hormone receptor and its signaling cascade. Proceedings from **XXXII European Conference on Hormones and Cell Regulation, Mont. Ste. Odille (Alsace, France), September 13th–16th, 2007**

Novotny, J., Ostašov, P., Krusek, J., Durchankova, D. and Svoboda, P. (2007) Calcium responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II. The role of plasma membrane integrity and effect of G₁₁-α protein over-expression on homologous and heterologous desensitisation. **Proceedings of the 6th Conference of Czech Neuroscience Society, Prague, November 19–20, 2007**

Ostašov, P., Novotny, J., Bourova, L., Hejnova, L. and Svoboda, P. (2007) Disruption of the plasma membrane structure by depletion of cholesterol impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G_q/G₁₁-α protein. **Proceedings of the 6th Conference of Czech Neuroscience Society, Prague, November 19–20, 2007**

Pavel Ostašov, Jana Brejchova, Jiri Novotny and Petr Svoboda (2008) Distribution of TRH receptor in plasma (cell) membrane as revealed by confocal laser scanning microscopy of living cells expressing thyrotropin-releasing hormone receptor-GFP fusion protein (TRH-R-GFP). **Key-Stone Meeting “G protein-coupled Receptors: New Insights in Functional Regulation and Clinical Application”**

Jiri Novotny, Pavel Ostašov, Jan Krusek and Petr Svoboda (2008) Desensitization of Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and temperature. **Key-Stone Meeting “G protein-coupled Receptors: New Insights in Functional Regulation and Clinical Application” Killarney, Kerry, Ireland, May 18–23, 2008**

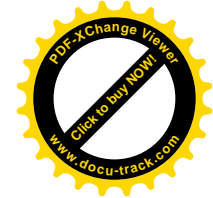


P. Ostasov, Z. Burdikova, L. Kubinova, P. Svoboda (2008) The effect of cholesterol depletion on the thyrotropin releasing hormone receptor distribution and mobility in intact cells. **Annual Meeting of Institute of Physiology AS CR, Seč, CZ, June 2008**

Pavel Ostasov, Zdena Burdíkova, Lucie Kubínová and Petr Svoboda (2008) Detection of the effects of cholesterol level alternations in plasma membrane on TRH receptor mobility with fluorescence recovery after photobleaching. **“13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry”** (Organizer Z. Kmiec, C.J.F. Van Noorden), Gdansk, Poland, August 24–28

Pavel Ostasov, Zuzana Burdikova, Jana Brejchova, Lucie Kubinova and Petr Svoboda (2010) TRH-receptor mobility in cholesterol depleted cell membrane; studies by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and fluorescence recovery after photobleaching. **Key-Stone Meeting “G protein-coupled Receptors: G Protein Coupled Receptors** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7–12, 2010

Jana Brejchova, Lenka Bourova, Pavel Ostasov, Jan Sykora and Petr Svoboda (2010) depletion alters DOR-G_i1 coupling but not the ligand binding site of δ -opioid receptor; *correlation with biophysical state of the plasma membrane*. **Key-Stone Meeting “G protein-coupled Receptors: G Protein Coupled Receptors** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7–12, 2010



Seznam použitých zkratk

| | |
|-----------|--|
| 5HT-1A | Serotoninový receptor typu 1A |
| AC | Adenylycykláza |
| AGS | Aktivátor G proteinové signalizace |
| ANGII | Angiotenzin II |
| ANGII-R | Receptor pro Angiotenzin II |
| APS | Amonium persulfát |
| ATP | Adenozin trifosfát |
| BARK1 | Kináza beta adrenergního receptoru 1 |
| cAMP | 3'-5' cyklický adenozin monofosfát |
| CDX | β -cyclodextrin |
| cGMP | 3'-5' cyklický guanozin monofosfát |
| CLSM | Konfokální laserová skenovací mikroskopie |
| DAG | Diacylglycerol |
| D_{app} | Zjevný difúzní koeficient |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DOR | δ opioidní receptor |
| DRMs | Detergent rezistentní membránové domény |
| E2 | Buňky HEK 293 exprimující TRH-R |
| E2M11 | Buňky HEK 293 exprimující TRH-R a $G_{11\alpha}$ protein |
| ECL | Enhanced chemiluminiscence |
| eGFP | Forma zeleného fluorescenčního proteinu |
| FITC | Fluorescein isothiokyanát |
| FRAP | Fluorescence Recovery After Photobleaching |
| GABA | Kyselina γ -aminomáselná |



| | |
|------------------|--|
| GABA-R | Receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou |
| GAP | Protein aktivující GTPázu |
| GDP | Guanozindifosfát |
| GEF | Výměnný faktor guaninového nukleotidu |
| GPCR | Receptory spřažené s trimerními G proteiny |
| GPI | Glykosylfosfatidylinozitol |
| GRK | Kináza receptorů spřažených s trimerními G proteiny |
| GTP | Guanozintrifosfát |
| GTP γ S | Nehydrolysovatelný analog GTP |
| HM | Pufr obsahující HEPES a hořečnaté ionty |
| HNM | Pufr obsahující HEPES, sodné a hořečnaté ionty |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trisfosfát |
| MAP kinázy | Proteinkináza aktivovaná mitogenem |
| NA | Numerická apertura |
| NCS | Newborn Calf Serum |
| NGB | Roztok obsahující Nonidet P-40, kozí sérum a bovinní albumin |
| PBS | Fosfátový pufr |
| PIP ₂ | Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát |
| PKA | Proteinkináza A |
| PKC | Proteinkináza C |
| PLC | Fosfolipáza C |
| RGS | Regulátor G proteinové signalizace |
| ROI | Oblast zájmu (region of interest) |
| SDS | Dodecylsulfát sodný |
| STME | Trisový pufr obsahující sacharózu |
| TBS | Trisový pufr |
| TM | Transmembránová doména |
| TME | Trisový pufr s hořečnatými ionty a EDTA |



| | |
|------------|---|
| TNEM | Trisový pufr s vysokou koncentrací NaCl |
| TRH | Thyreoliberin, thyreotropin releasing hormone |
| TRH-R | Receptor pro thyreoliberin |
| TRH-R-eGFP | Fúzní protein receptoru pro thyreoliberin a zeleného fluorescenčního proteinu |
| VTGP | Buňky HEK 293 exprimující TRH-R-eGFP |



Úvod

Buňky potřebují pro své přežití informace o okolním prostředí a jeho změnách, aby na ně mohly reagovat odpovídajícím způsobem. K detekci stavu prostředí a jeho změn slouží buňce specifické proteiny – receptory. Vzhledem k tomu, že pro většinu signálních molekul je buněčná membrána neprostupná, nachází se většina těchto receptorů právě v buněčné membráně. Mezi nejvýznamnější z těchto receptorů patří receptory charakterizované sedmi transmembránovými průniky a jejich podskupina – receptory spřažené s trimerními G proteiny (GPCR).

U těchto receptorů dochází při vazbě signální molekuly ke konformační změně receptoru, která se přenáší na trimerní G protein. Ten se skládá ze tří fyzických podjednotek – α podjednotky, která váže guanozinový nukleotid a podle které se obvykle klasifikují, a dimeru β a γ podjednotky. V inaktivním stavu je navázána molekula GDP na α podjednotce. Po aktivaci dojde k výměně GDP za GTP, disociaci α a $\beta\gamma$ podjednotek a ovlivnění funkce dalších členů signální dráhy interakcí s těmito podjednotkami. Mezi takto regulované proteiny patří například fosfolipázy, cyklázy, protein kinázy, iontové kanály nebo monomerní G proteiny. Které z těchto proteinů budou ovlivněny, pak záleží na typu podjednotek daného G proteinu.

Přestože trimerní G proteiny jsou nejznámějším proteinem aktivovaným konformační změnou GPCR, existují i jiné proteiny jako β -arrestin, které jsou takto ovlivněny a mohou dále regulovat kvalitu i kvantitu signálu nebo spouštět další specifické signální dráhy.

Tato signální dráha je samozřejmě na několika úrovních regulována. Ať už jde o regulaci pomocí fosforylace receptoru, která ovlivňuje jeho schopnost dále aktivovat G protein, nebo fosforylaci a lipidové modifikace podjednotek G proteinu. Při dlouhotrvající nebo opakované stimulaci receptoru pak dochází k jevu zvanému desenzitizace, při kterém se snižuje fyziologická odpověď buňky na podnět. Tento jev za normálních okolností přispívá k přežití buňky a potažmo organismu, kdy umožňuje odrušit přirozené pozadí, které nemá na buňku vliv. Nicméně může představovat i závažný problém. Buňky totiž nerozlišují mezi zdrojem podnětu a tak desenzitizace přispívá zřejmě i ke vzniku drogové závislosti a snižuje účinek léků při dlouhodobém podávání.



Proteiny, které se účastní této signalizace a její regulace, však nejsou náhodně rozptýleny v membráně, ale jsou organizovány. Jednou ze struktur podílející se na jejich organizaci jsou detergent rezistentní membránové domény (DRMs). Jejich základními složkami jsou cholesterol a sfingolipidy. Kombinace těchto lipidů pak propůjčuje DRMs charakteristickou nerozpustnost v některých detergentech. Některé proteiny, které se podařilo identifikovat jako součást těchto domén, jsou součástí signálních kaskád GPCR. Jsou mezi nimi trimerní G proteiny, jejich efekторы nebo jiné proteiny aktivované přímo GPCR. Je otázkou nakolik je asociace těchto proteinů s DRMs nezbytná pro signalizaci pro GPCR a jaký vliv na signalizaci by mělo jejich porušení.

Proto je zajímavé prozkoumat vztah mezi membránovými doménami, GPCR signalizací a desenzitizací a pokusit se odvodit z dat, které nám tato studie poskytne, informace o strukturní a funkční organizaci GPCR iniciovaných signálních drah v membránách buněk. Mnoho autorů se snaží o izolaci a následnou charakterizaci membránových domén. My jsme se rozhodli použít kromě klasických biochemických metod i metody, které nám umožňují pozorovat případné změny i v intaktních buňkách.



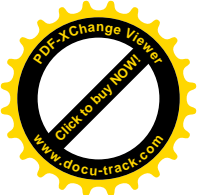
Cíle disertační práce

Cílem této disertační práce bylo prozkoumat vliv deplece cholesterolu na signální dráhu iniciovanou receptorem pro thyreoliberin (TRH-R). Deplece cholesterolu byla zvolena proto, že vzhledem k literárním údajům při ní dochází k destrukci membránových domén, specifických částí buněčné membrány které jsou resistantní vůči neiontovým detergentům (DRMs). Je známo, že mnoho signálních a strukturních proteinů se v těchto částech buněčné membrány nachází a řada dalších membránových i solubilních proteinů s těmito strukturami interaguje. Změny membránových domén vyvolané deplecí cholesterolu tak mohou ukázat na strukturní uspořádání dané signální kaskády.

Rámcovým cílem mé disertační práce bylo vzhledem k dlouhodobému zaměření naší laboratoře srovnat funkční vlastnosti TRH-R indukované signální kaskády v membránových doménách v intaktních buňkách s vlastnostmi izolovaných preparátů těchto struktur – DRMs. Při studiu intaktních buněk byla hormonální odpověď stanovena jako změna v koncentraci nitrobuněčných Ca^{2+} iontů, které jsou druhými posly při aktivaci TRH-R receptorů v cílových buňkách. Při studiu biochemických preparátů buněčné membrány a membránových domén jsme pro charakterizaci hormonální odpovědi použili stanovení funkční aktivity G proteinů třídy G_q/G_{11} , které jsou specificky aktivovány TRH. Funkční aktivita těchto G proteinů byla stanovena jako agonistou stimulovaná vysokoafinní vazba nehydrolyzovatelného analoga $\text{GTP} - [^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$.

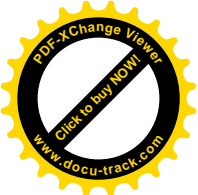
Deplece, tj. snížení obsahu cholesterolu v buněčné membráně bylo navozeno inkubací intaktních buněk s β -cyclodextrinem (CDX). Jedná se o makromolekulu, která je rozpustná ve vodném médiu a je složena ze sedmi podjednotek tvořených α -D-glucopyranosou. Molekuly α -D-glucopyranosy jsou vázány glykosidickou vazbou (tvoří α -D-glucopyranosid). Těchto sedm podjednotek α -D-glucopyranosy obklopuje vnitřní prostor, ve kterém mohou být vázány hydrofobní látky, jako je cholesterol. Vazba cholesterolu do tohoto prostoru umožňuje jeho (částečnou) rozpustnost ve vodném médiu. Interakce CDX s buněčnou membránou vede k extrakci cholesterolu z buněk.

V této disertační práci jsme pracovali se třemi modelovými buněčnými liniemi odvozenými od mateřské linie HEK293.



- 1) Funkční studie TRH-R stimulované signální kaskády, které byly zaměřeny na analýzu homologní a heterologní desenzitizace účinku TRH s pomocí stanovení změn v nitrobuněčných koncentracích Ca^{2+} iontů, pracovaly s klonem E2M11, který exprimuje velké množství TRH-R a trimerního G proteinu $\text{G}_{11\alpha}$. Vlastnosti hormonální odpovědi těchto buněk byly srovnány klonem E2, který exprimuje vysoké hladiny pouze TRH-R.
- 2) Buňky E2M11 byly rovněž použity pro izolaci buněčných membrán a membránových domén a následnou analýzou aktivity G proteinů.
- 3) Dynamika pohybu a strukturní uspořádání TRH-R v buněčné membráně byly studovány s pomocí linie HEK293, která exprimuje fúzní bílkovinu mezi TRH-R a eGFP (TRH-R-eGFP). Jedná se o fluoreskující verzi receptoru. Podrobná analýza molekuly TRH-R-eGFP v buněčné membráně živých buněk byla provedena:
 - v podmínkách dlouhodobé stimulace TRH-R která navozuje internalizaci receptoru,
 - v podmínkách deplece cholesterolu.

Změny v distribuci TRH-R na povrchu buněk a pohyb receptoru v rovině buněčné membrány byly studovány metodou konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM) a technikou FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching). Technika FRAP pro analýzu pohybu TRH-R ve světové literatuře nebyla dosud použita a ve spojení s funkčními studii spřažení receptor-G protein proto vytváří zcela originální celek.



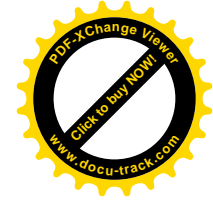
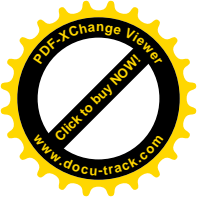
Literární přehled

Receptory spřažené s G proteiny

Receptory spřažené s trimerními G proteiny (GPCR) představují jednu z největších a nejrozmanitějších skupin buněčných receptorů u savců (Bockaert a Pin, 1999). V dnešní době jsou známy stovky druhů GPCR. U člověka jich například bylo s pomocí detailní analýzy celého genomu nalezeno přes 800, přičemž u přibližně 460 z nich se předpokládá, že se jedná o čichové receptory (Fredriksson a Schiöth, 2005). Geny, kterými jsou GPCR kódovány, zabírají téměř 2 % lidského genomu (Fredriksson a kol., 2003). U většiny se předpokládá, že jsou exprimovány pouze v malých množstvích. Převážná část těchto receptorů byla objevena na základě podobnosti sekvencí a tak u mnoha z nich stále není znám jejich ligand. Takovéto receptory se nazývají orphaned – sirotčí receptory. Historicky prvním sirotčím receptorem, u kterého se podařilo objevit ligand, byl receptor G-21 nyní známý jako serotoninový receptor 1A (5-HT_{1A}) (Fargin a kol., 1988). Vzhledem k široké škále výskytu a funkcí GPCR je velké množství nově vyvíjených léčiv určeno právě k ovlivňování jejich funkce a více než 30 % dnes prodávaných léků je cíleno na GPCR. Přesto se odhaduje, že tyto léky pokrývají pouze 10 % nativních receptorů a proto je vyvíjena velká snaha najít ligandy pro zbývající sirotčí receptory (Vassilatis a kol., 2003).

Struktura GPCR

Mezi GPCR najdeme receptory pro široké spektrum chemických látek, jako jsou odoranty, chuťové látky, hormony, neuropřenašeče a neuromodulátory a jiné biologicky aktivní látky, ale i receptory sloužící k detekci fotonů. Přes rozmanitost jejich ligandů je struktura receptorů poměrně konzervována. Jsou tvořeny jediným proteinovým řetězcem, který sedmkrát prochází membránou (Dixon a kol., 1986). Přestože přibližná podoba proteinu v membráně je známa již dlouhou dobu, přesnou krystalovou strukturu se podařilo určit až nedávno a to pouze u dvou receptorů – rodopsinu a β 2-adrenergního receptoru (Palczewski a kol., 2000; Cherezov a kol., 2007). GPCR jsou tedy tvořeny řetězcem se sedmi šroubovicovými transmembránovými doménami TMI–TMVII, přičemž jako první bývá označována doména blíže k N konci řetězce. Tyto domény obsahují přibližně 25–35

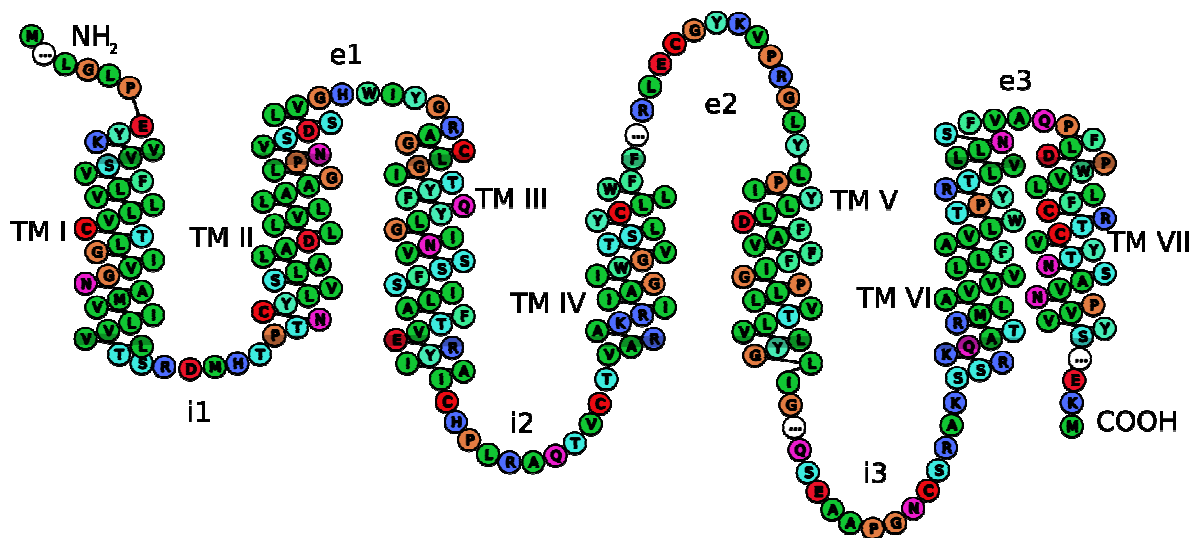


aminokyselin (Fredriksson a kol., 2003). Jednotlivé transmembránové domény pak propojuje 6 smyček, tři na extracelulární (e1–e3) a tři na intracelulární (i1–i3) straně membrány (**Obr. č. 1**). Vzájemné uspořádání jednotlivých domén je pak patrné z **obr. č. 2**.

Na extracelulární straně se nachází N konec řetězce (Baldwin, 1993; Palczewski a kol., 2000). Velikost N koncové domény se může pohybovat od 10 aminokyselin u receptorů pro monoamidy až po 600 aminokyselin u receptorů pro glykoproteiny a vykazuje nejvyšší variabilitu mezi jednotlivými receptory. To souvisí právě s širokou škálou ligandů, které GPCR rozeznávají (Kobilka, 2007). Malí organičtí agonisté se váží většinou do prostoru mezi transmembránovými segmenty, zatímco velké molekuly interagují s N koncovou doménou, extracelulárními smyčkami a extracelulárními konci α šroubovic (**Obr. č. 3**). Speciálním případem jsou pak trombinové receptory, u kterých nedochází přímo k vazbě externího ligandu, ale k proteolýze N koncové domény a vazbě vzniklého produktu do vazebného místa (Vu a kol., 1991). C konec řetězce se nachází na intracelulární straně membrány a může být palmitoylován, čímž dochází ke vzniku nepravé čtvrté intracelulární smyčky (i4), nebo u některých GPCR obsahuje osmou šroubovicovou doménu (Cherezov a kol., 2007). Spolu s intracelulárními smyčkami také obsahuje regulační místa pro fosforylaci receptoru a také vazebná místa pro další proteiny jako jsou G proteiny nebo β arrestin.

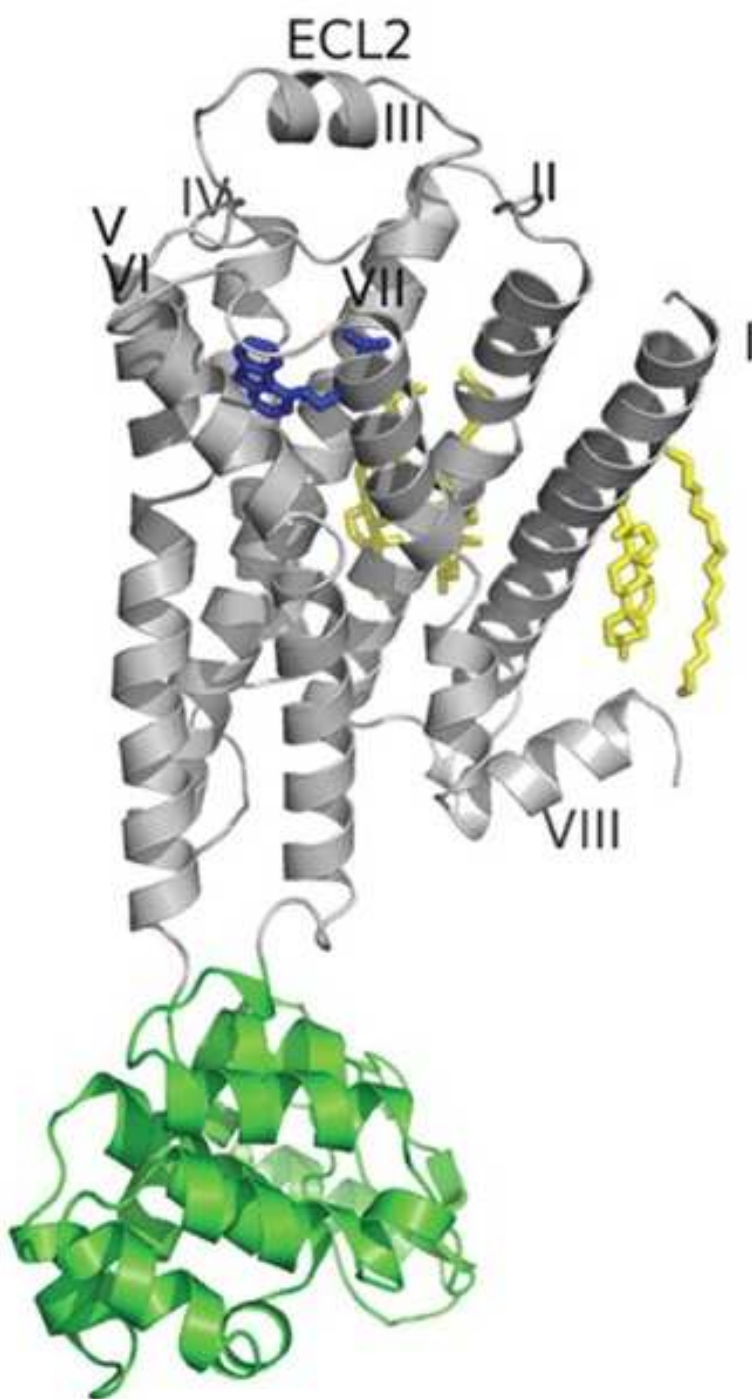
Při vazbě ligandu na receptor, dochází k rotaci a ohybu TMVI vzhledem k TMIII. Zároveň tím dojde k oddálení obou domén (Bourne, 1997). Tyto změny se pak přenáší na smyčky i2 a i3, které jsou přímo spojeny s TMIII a TMVI. Tyto intracelulární smyčky hrají klíčovou úlohu při interakci receptoru s trimerním G proteinem (Wess, 1997). Aktivní konformace receptoru je také stabilizována vazbou G proteinu. Bylo ukázáno, že vazba G proteinu na receptor mění afinitu receptoru k agonistům a tudíž mezi G proteinem a agonistou funguje alosterická modulace (Azzi a kol., 2001).

Zdá se, že části transmembránových domén I, II, III a IV také tvoří u některých receptorů vazebné místo pro cholesterol (**Obr. č. 4**). Do tohoto místa se váží dvě molekuly cholesterolu a zvyšují tak stabilitu konformace receptoru, především stabilizací domén II a IV. Mezi receptory, které mají toto vazebné místo, patří kromě β 2-adrenergního receptoru ještě například TRH receptor, nebo serotoninový receptor 1A (Hanson a kol., 2008).



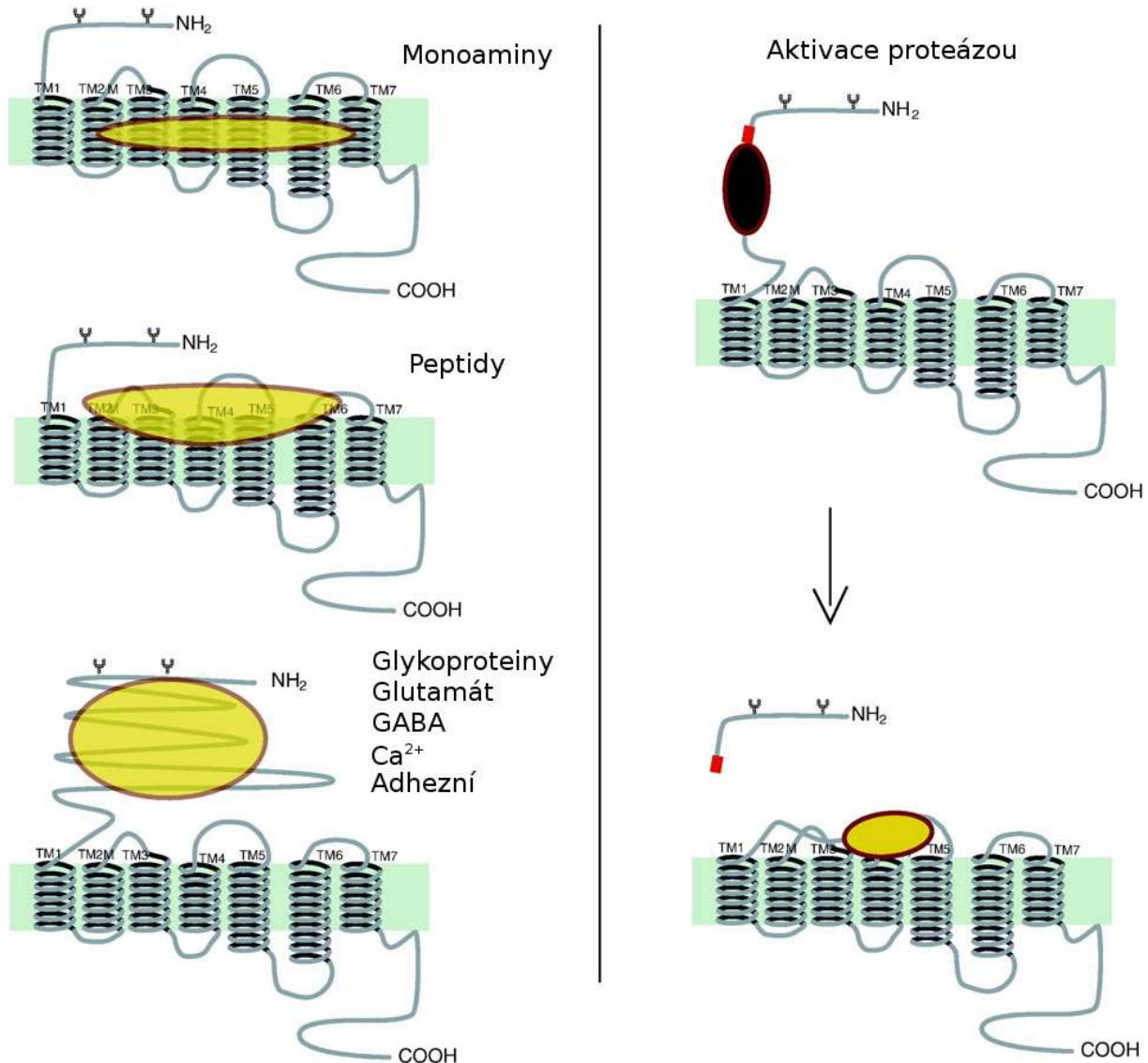
Obr. č. 1 Schematická struktura TRH receptoru v plazmatické membráně

TM I-TM VII – transmembránové úseky, e1-e3 – extracelulární smyčky, i1-i3 intracelulární smyčky, NH₂ - N koncová doména, COOH – C koncová doména (upraveno podle Konvicka a kol., 2000).



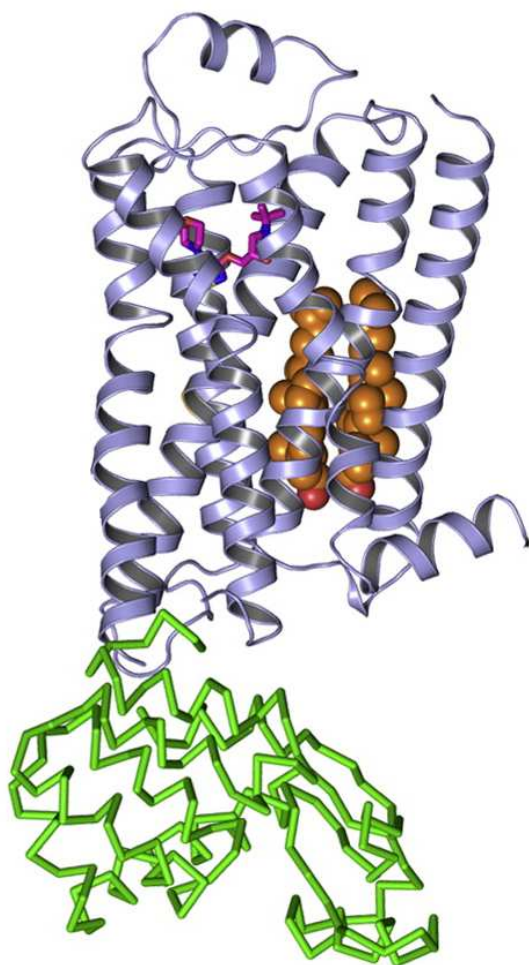
Obr. č. 2 Trojrozměrná struktura β_2 -adrenergního receptoru

I-IV – transmembránové šroubovice 1-7, IV – šroubovice 8, ECL2 – extracelulární smyčka 2, karazolol – modrá, cholesterol – žlutá. Pro potřeby krystalizace byla molekula stabilizována fúzí s T4-lysozymem – zelená (Cherezov a kol., 2007).



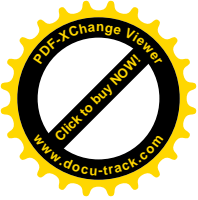
Obr. č. 3 Vazba různých typů agonistů na GPCR

Malí agonisté jako například monoaminy se váží do kapsy tvořené transmembránovými segmenty. Větší agonisté jako například peptidy využívají k vazbě vnější konce transmembránových úseků, extracelulární smyčky a N - koncovou doménu. Vazba glutamátu, Ca²⁺ nebo glykoproteinů pak probíhá téměř výhradně přes N koncovou doménu. U skupiny thrombinových receptorů (vpravo) dochází ke štěpení N koncové domény a tím i k uvolnění agonisty (upraveno podle Kobilka, 2007).



Obr. č. 4 Vazebná místa pro cholesterol na GPCR.

Krystalová struktura fúzního proteinu β 2-adrenergního receptoru (fialová) T4-lysozymbem (zelená) s navázanými molekulami cholesterolu (hnědá) a timololu (tmavě fialová). Jak je patrné, do vazebného místa se váží dvě molekuly cholesterolu (Hanson a kol., 2008).



Další důležitou roli v organizaci GPCR hraje jejich spojování do homo- nebo heterodimerů případně oligomerů. Míra oligomerizace může dosahovat až 85 % jako u β 2-adrenergických receptorů (Mercier a kol., 2002). Nicméně, takto vysoké hodnoty se netýkají všech receptorů, protože například u receptorů pro Y-peptid dosahují jen 26 % a u některých receptorů byly detekovány pouze monomery (Dinger a kol., 2003; Hern a kol., 2010). Oligomerizace byla přímo prokázána u rodopsinových receptorů v plochých membránových discích vnějších segmentů tyčinek, kde jsou s pomocí mikroskopie atomárních sil (Atomic force microscopy) zjevně viditelné řady dvojic těchto receptorů (Fotiadis a kol., 2004). Oligomerizace je v mnoha případech nezbytná ke správnému fungování receptoru. Nejlépe prozkoumaným příkladem je receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) – GABA_B receptor. U něj byl nejprve identifikován protomer nyní označovaný GABA_B R1, který sice vykazoval vysokou afinitu k antagonistům, ale velmi nízkou afinitu ke GABA (Kaupmann a kol., 1997). Později se podařilo identifikovat druhý protomer označovaný jako GABA_B R2, který ale nemá schopnost vázat GABA. Heterodimer těchto dvou proteinů však má vysokou afinitu k ligandům a je schopen efektivního přenosu signálu do buňky. Tento heterodimer je také příkladem, že v buňkách probíhá kontrola správné oligomerizace. GABA_B R1 totiž obsahuje lokalizační sekvenci do endoplazmatického retikula a je v něm tak zadržován. Vazbou GABA_B R2 je tato sekvence překryta a receptor je transportován do membrány (Margeta-Mitrovic a kol., 2000).

Oligomerizace byla potvrzena kromě výše uvedených receptorů například u mnoha opioidních receptorů, TRH-R, serotoninových receptorů a mnoha dalších (George a kol., 2000; Kroeger a kol., 2001).

Klasifikace GPCR

V současné době se pro klasifikaci GPCR používají dva systémy. Starší vznikl pro dnes již nefunkční databázi GCRDb a rozděloval receptory do sedmi rodin, A–F a O, na základě shody jejich primární sekvence (Kolakowski, 1994). Tento systém byl později upraven pro potřeby databáze GPCRDB a zredukován do šesti rodin A–F (Horn a kol., 2003).

Rodina A je největší a zahrnuje většinu známých receptorů. Patří mezi ně například receptory pro rodopsin, adrenergní receptory, TRH-R, ANGI-R, 5-HT_{1A} a hlavně celá skupina receptorů pro odoranty. Většina receptorů této třídy pravděpodobně obsahuje, kromě



sedmi transmembránových domén, ještě osmou šroubovicovou doménu na C konci řetězce, která však neprochází plazmatickou membránou (Katragadda a kol. 2004).

Rodina B má asi 25 členů a všechny aktivují G_s protein a adenylylcyklázu. Do této rodiny patří receptory pro rodinu hormonů gastrointestinálního peptidu, kortikotropin uvolňujícího hormonu, kalcitoninu a parathyroidního hormonu.

Rodina C je také relativně malá a zahrnuje metabotropní glutamátový receptor, oba typy $GABA_B$ receptorů a některé chuťové receptory. Všechny tyto receptory mají obzvláště velkou N koncovou doménu, která podle všeho hraje úlohu při vazbě ligandu a aktivaci receptoru.

Rodina D zahrnuje feromonové receptory STE2.

Rodina E obsahuje feromonové receptory STE3.

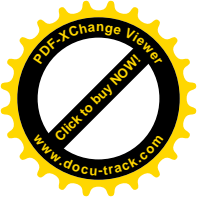
Rodina F pak zahrnuje receptory příbuzné cAMP receptorů hlenek.

Druhý typ dělení (GRAFS) rozděluje receptory do pěti tříd. Toto dělení není založeno jen na podobnosti primárních sekvencí, ale především na fylogenetických datech. Receptory se pak rozdělí do následujících skupin Glutamátové, Rodopsinové, Adhezní, Frizzled/Taste2 a Sekretinové. Toto dělení má tu nevýhodu, že prozatím kategorizuje především lidské GPCR a neobsahuje receptory z jiných druhů (Schiöth a Fredriksson, 2005).

Trimerní G proteiny

Trimerní G proteiny jsou proteiny s GTPázovou aktivitou tvořené třemi podjednotkami α , β a γ (Gilman, 1987). Tyto proteiny za klidových podmínek tvoří komplex s příslušným GPCR a zřejmě i dalšími proteiny. Nejdůležitější z hlediska klasifikace trimerních G proteinů je α podjednotka. Ta může tvořit komplexy s různými typy β a γ podjednotek (Hildebrandt, 1997). α podjednotka je největší a nese GTPázovou aktivitu. Obsahuje vazebná místa pro receptor, efektor a vysokoafinní vazebné místo pro guanozinový nukleotid (Conklin a Bourne, 1993; Rens-Domiano a Hamm, 1995).

Na rozdíl od receptorů spřažených s G proteiny, kterých bylo identifikováno již mnoho, vlastních G proteinů, respektive jejich α podjednotek, bylo určeno relativně málo – v současné době je známo něco přes 20 proteinů, které vznikají přepisem 17 genů. Trimerní G proteiny se rozdělují do čtyř tříd na základě primární struktury α podjednotky a jejich funkčních vlastnostech (Kaziro a kol., 1988). Tyto třídy jsou G_s , G_i/G_o , G_q/G_{11} , G_{12}/G_{13} .



Klasifikace trimerních G proteinů

Následující přehled byl vypracován na základě těchto článků: Hepler a Gilman, 1992; Hildebrandt, 1997; Jiang a Bajpayee, 2009; McIntire, 2009; Mizuno a Itoh, 2009; Su a kol., 2009; Suzuki a kol., 2009.

Třída $G_s\alpha$, $G_{sXL}\alpha$, $G_{olf}\alpha$

$G_s\alpha$ proteiny stimulují aktivitu adenylycyklázy a zvyšují tím hladinu cyklického AMP (cAMP) v buňce. Tyto proteiny mohou být ribosylovány působením cholera toxinu produkovaného *Vibrio cholerae*. Tato ribosylace brání hydrolyze GTP na GDP a G protein tak zůstává konstitutivně aktivní (Cassel a Pfeuffer, 1978). Existují čtyři izoformy $G_s\alpha$ podjednotky: G_{s1} , G_{s2} , G_{s3} a G_{s4} . Všechny formy vznikají alternativním sestřihem z jediného genu.

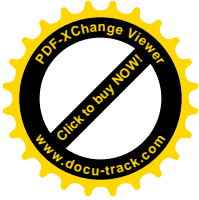
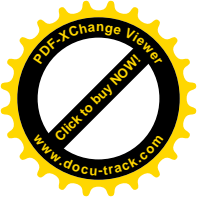
Izoformy G_{s1} a G_{s2} mají molekulovou hmotnost 52 kDa a označují se jako dlouhé izoformy (G_{sL}).

Izoformy G_{s3} a G_{s4} se nazývají krátké izoformy (G_{sS}) a mají molekulovou hmotnost 45 kDa. G_{sL} a G_{sS} se liší přítomností sekvence se 14 nebo 15 aminokyselinovými zbytky.

Proteiny $G_{sXL}\alpha$ jsou exprimovány v neuroendokrinních buňkách a jedná se o proteiny asociované s membránou. Jejich struktura se skládá z varianty $G_s\alpha$ domény a XL domény (37 kDa). Tento G protein je schopen vázat GTP a aktivovat cyklázu stejně jako běžná $G_s\alpha$ varianta a může být aktivován stejnými receptory. Byly detekovány ještě další varianty vzniklé alternativním sestřihem označené jako $G_{sXXL}\alpha$. Rozdíl v signalizaci těchto proteinů oproti normální variantě $G_s\alpha$ je zatím nejasný, ale je známo, že myši s poruchou v expresi tohoto proteinu vykazují značné problémy v postnatálním vývoji a mají vysokou úmrtnost.

$G_{olf}\alpha$ proteiny mají 88% homologii s $G_s\alpha$ proteiny. Opět stimulují adenylycyklázu a působením cholera toxinu se mohou stát konstitutivně aktivní. Jsou přítomny v čichových buňkách a jsou aktivovány receptory pro odoranty

Existují tři hlavní dráhy, které mohou být aktivovány $G_s\alpha$ proteiny. Všechny začínají aktivací adenylycyklázy a produkcí cAMP. To pak aktivuje proteinkinázu A (PKA), kanály



ovlivněné cyklickými nukleotidy nebo faktory pro výměnu GTP (GTP exchange factor – GEF) pro Rap proteiny.

Třída $G_i\alpha$, $G_o\alpha$

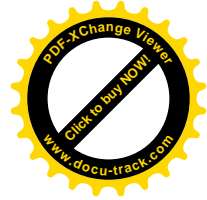
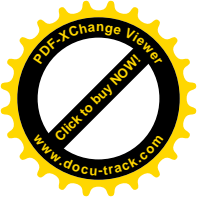
Mezi G proteiny této třídy se řadí kromě $G_i\alpha$ a $G_o\alpha$ proteinů také $G_z\alpha$, $G_{\text{gust}}\alpha$, $G_{t1}\alpha$ a $G_{t2}\alpha$. Tyto proteiny jsou citlivé k pertusis toxinu. Ten způsobuje podobně jako cholera toxin u $G_s\alpha$ proteinů ribosylaci α podjednotky G proteinu na C konci odpovědném za interakci s GPCR. Tím brání interakci α podjednotky s receptorem a brání tak aktivaci $G_{i/o}\alpha$ dráhy receptorem.

G_{i1} , G_{i2} a G_{i3} jsou produkty samostatných genů. Tyto proteiny jsou aktivovány toxinem izolovaným z *Pasterella multocida* (Orth a kol., 2008). Všechny inhibují adenylylcyklázu a zdá se, že jsou funkčně zaměnitelné, protože zvířata deficientní v jednom z těchto proteinů nevykazují žádné závažné problémy. Pouze v případě G_{i2} byl zjištěn problém v signalizaci B- a T-lymfocytů. Také se zdá, že na rozdíl od ostatních trimerních G proteinů nedochází při jejich aktivaci k disociaci α a $\beta\gamma$ podjednotek, ale pouze ke změnám v jejich vzájemné orientaci (Frank a kol., 2005).

G_{o1} , G_{o2} jsou produkty jednoho genu vzniklé alternativním sestřihem mRNA, ale G_{o3} vzniká posttranslační modifikací. Jsou ve velkém množství exprimovány v mozku, nicméně jejich exprese není homogenní. Jsou exprimovány především v kortexu, cerebellu, hippocampu, hypotalamu a v substantia nigra (Worley a kol., 1986). Inhibují adenylylcyklázu nebo například GTPázu aktivující proteiny (GAP) pro $G_z\alpha$ nebo Rap proteiny.

G_{t1} a G_{t2} se nazývají transduciny a jsou obsaženy v tyčinkách a čípcích oka obratlovců. Oba aktivují guanylylfosfodiesterázu. G_{gust} neboli gustducin se nachází hlavně v chuťovém epitelu. Transduciny spolu s gustduciny jsou exprimovány v buňkách chuťových pohárků jazyka, kde se účastní vyvolání sladké, slané, hořké a umami chuti. Navíc jsou spolu s příslušnými chuťovými receptory exprimovány i v dalších částech gastrointestinálního traktu, kde se účastní detekce toxinů a případného vyvolání zvracení.

G_z má sekvenci podobnou ostatním členům rodiny G_i/G_o , a je schopen inhibovat adenylylcyklázu a aktivovat některé fosfolipázy C (PLC). Jako jediný z třídy G_i/G_o proteinů je necitlivý k pertusis toxinu. V porovnání s ostatními $G_i\alpha$ proteiny má velmi nízkou (200× nižší) vlastní GTPázovou aktivitu. Nicméně bylo ukázáno, že interaguje s celou řadou



proteinů s funkcí GAP jako například RGS10. Navíc může být fosforylován pomocí proteinkinázy C (PKC) nebo p21-aktivované kinázy, což způsobí snížení jeho afinity k $\beta\gamma$ podjednotkám a tím i prodloužení doby jeho aktivace. Je exprimován hlavně v trombocytech a určitých oblastech mozku.

Třída $G_q\alpha$, $G_{11}\alpha$

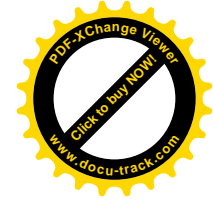
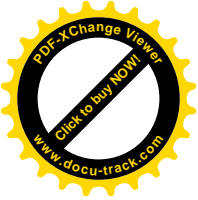
Do této třídy patří proteiny G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} a G_{16} . Všechny tyto proteiny mají schopnost aktivovat fosfolipázu $C\beta$ (PLC- β) a s výjimkou proteinů G_{15} a G_{16} jsou citlivé k látce YM-254890. Látka YM-254890 byla izolována z bakterií druhu *Chromobacterium* a funguje jako specifický inhibitor výměny GDP za GTP na α podjednotce (Takasaki a kol., 2004). G_q a G_{11} se přirozeně vyskytují ve všech tkáních, zatímco pro G_{14} je typický výskyt v játrech, ledvinách a plicích. G_{15} a G_{16} se vyskytují v hematopoetických buňkách. G_{16} může po exogenně navozené expresi působit jako přenašeč mezi širokou škálou receptorů a fosfolipázou C.

Výměnu nukleotidů po aktivaci na α podjednotce proteinů této třídy zajišťuje protein Ric-8A (Tall a kol., 2003).

Mezi efekторы těchto proteinů patří ještě p63RhoGEF, což je GEF urychlující výměnu nukleotidů u rodiny proteinů Rho. Tyto proteiny regulují přestavbu cytoskeletu, stejně jako expresi některých genů regulací aktivity serum response faktoru. Mezi jejich nejlépe charakterizované představitele patří RhoA, Rac1 a Cdc42.

Bylo ukázáno, že $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ proteiny jsou často lokalizovány do takzvaných membránových domén, u kterých se předpokládá významná úloha v signalizaci, přesněji do jednoho jejich typu nazývaných caveoly (Oh a Schnitzer, 2001). Pro ty je specifická přítomnost strukturního proteinu kaveolinu. U některých GPCR spřažených s $G_q\alpha$ bylo prokázáno, že potlačení exprese kaveolinu-1 vede ke snížení schopnosti vyvolávat odpověď (Bhatnagar a kol., 2004). Potlačení některých typů odpovědí bylo také zaznamenáno při potlačení exprese strukturního proteinu flotilin-2 (Sugawara a kol., 2007). Zdá se, že v těchto případech pomáhají tyto strukturní proteiny interakci receptoru s G proteinem.

G proteiny této třídy interagují s m1-acetylcholinovými muskarinovými receptory, serotoninovými receptory typu 2A, 2B, 2C, TRH-R, ANGI-R a receptory pro gastrin uvolňující peptid a další látky.



Třída $G_{12\alpha}$ a $G_{13\alpha}$

Proteiny této třídy jsou exprimovány ve všech tkáních, přičemž $G_{13\alpha}$ se ve velkém množství vyskytuje v krevních destičkách. Bylo identifikováno několik interakčních partnerů těchto proteinů zahrnujících nереceptorové kinázy, AKAP, Hsp60, RhoGEF a cadherin. Signální dráha této třídy G proteinů je často spojena se signalizací přes $G_q\alpha$ proteiny, protože mnoho GPCR, které aktivují G_{12} , G_{13} , zároveň aktivují G_q .

Stejně jako $G_{2\alpha}$ jsou i tyto podjednotky substrátem pro PKC a jejich fosforylace brání jejich reasociaci s $\beta\gamma$ podjednotkou.

Mezi jejich efektory patří molekuly p115RhoGEF a LARG. Překvapivě tyto molekuly fungují zároveň také jako GAP pro G_{12} , G_{13} proteiny.

$G_{13\alpha}$ hraje klíčovou úlohu ve vývoji krevního řečiště a jeho nedostatek je letální již v embryonálním stádiu. Také ovlivňuje agregaci vyvolanou aktivátory krevních destiček.

Oba proteiny hrají důležitou úlohu v chemotaxi a proto má jejich nedostatek zásadní vliv na imunitní systém stejně jako na vývoj a migraci neuronů v kůře mozku a mozečku.

$\beta\gamma$ podjednotky

V současné době je známo asi 7 isoform β podjednotek a 12 isoform γ podjednotek. V případě γ podjednotek se jedná o produkty různých genů. U β podjednotek jsou proteiny β_1 , β_2 , β_4 a β_5 produkty různých genů, zatímco alternativním sestřihem genu pro β_3 mohou vzniknout β_{3s} , β_{3s2} nebo β_{3v} varianty. Je také známa β_{5L} varianta vzniklá sestřihem genu β_5 . Proteiny β_1 – β_4 vykazují vysokou homologii (80–90 %) a jejich molekulová hmotnost je kolem 36 kDa. β_5 je s nimi homologní jen z 50 % a má molekulovou hmotnost 40 kDa. γ podjednotky jsou rozmanitější a jejich vzájemná homologie se pohybuje mezi 27–75 % a molekulová hmotnost mezi 6–9 kDa.

Dříve se předpokládalo, že aktivita trimerního G proteinu je čistě záležitostí α podjednotky a $\beta\gamma$ podjednotky ji pouze váží k membráně. Ukázalo se však, že $\beta\gamma$ dimer samostatně reaguje s efektory (Clapham a Neer, 1993). Například v přítomnosti $G_s\alpha$ inhibuje adenylylcyklázu typu I a stimuluje adenylylcyklázy typu II a IV (Tang a Gilman, 1991; Tang a Gilman, 1992). To, že se podjednotky $\beta\gamma$ přímo účastní přenosu signálu, znamená podstatně větší možnosti hormonální regulace. G proteiny se stejnou α podjednotkou a různými β a γ podjednotkami se budou chovat různě. Také to znamená, že jeden G protein může aktivovat



více efektorů, jako v případě G_s , který nejen aktivuje adenylycyklázu, ale otevírá i kanály pro vápenaté ionty.

Funkce podjednotek může být ještě ovlivněna různými posttranslačními modifikacemi. β podjednotka může být například fosforylována nukleosid difosfát kinázou. Zajímavé je, že v případě β podjednotek se nejedná o fosforylaci na klasickém aminokyselinovém zbytku serinu, threoninu nebo tyrosinu, ale na histidinu. Další možnou modifikací je mono-ADP-ribosylace, která snižuje efektivitu β podjednotky v ovlivňování jejích efektorů. U γ podjednotek je fosforylace známa pouze u γ_{12} , která je fosforylována proteinkinázou C na serinu, čímž se zvyšuje afinita $\beta\gamma$ dimeru k α podjednotce.

Většinou se předpokládá, že za fyziologických podmínek existují podjednotky β a γ v buňce ve formě dimeru. Nicméně v poslední době se ukazuje, že se může jednat pouze o specifický případ nejlépe prozkoumaných $\beta\gamma$ dimerů – $\beta_{1\gamma 1}$ a $\beta_{1\gamma 2}$. Množství ostatních kombinací podjednotek nelze izolovat jako dimery ani při nízkých koncentracích detergentu, přestože se podle studií *in vivo* ukazuje, že za fyziologických podmínek tyto dimery tvoří. Dále byly nalezeny monomery daných podjednotek za fyziologických podmínek a například β_5 podjednotka tvoří stabilní monomery vysoce odolné vůči trypsinu a navíc je schopná se vázat na RGS proteiny z rodiny R7.

Efektory trimerních G proteinů

G proteiny mají širokou škálu efektorů. Mezi hlavní skupiny efektorů regulovaných trimerními G proteiny patří:

Adenylycyklázy

Adenylycyklázy jsou enzymy, které katalyzují přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosin monofosfát (cAMP). Existuje devět různých savčích isoform adenylycykláz (AC I–IX) (Hurley, 1999). Všechny savčí adenylycyklázy jsou aktivovány $G_{s/golf\alpha}$ a cyklázy ACII a ACIV–VII jsou také aktivovány dimerem $\beta\gamma$. S výjimkou AC IX působí tento dimer na ostatní adenylycyklázy inhibičně. V závislosti na typu cyklázy pak může být jejich aktivita modulována $PKC\alpha$, kalmodulinem, vápenatými ionty nebo proteinkinázou A (PKA). Čistě inhibiční vliv pak mají na některé cyklázy proteiny $G_{i\alpha}$ a $G_{z\alpha}$. cAMP pak dále aktivuje proteinkinázu A, což je serin/threoninová kináza, která po aktivaci



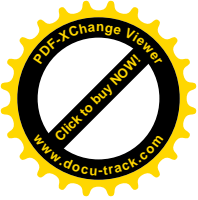
fosforyluje celou řadu dalších buněčných proteinů a ovlivňuje tak jejich funkci (Sadana a Dessauer, 2009). V případě $G_{olf\alpha}$ v olfaktorických buňkách se cAMP produkovaný adenylcyklázou váže na Na^+ kanály, a tím způsobí jejich otevření, vtok Na^+ iontů do buňky a následnou depolarizaci cytoplazmatické membrány. Stejně jako mnoho dalších proteinů fungují i adenylcyklázy jako oligomery (Cooper, 2005).

Fosfolipázy C β

Fosfolipázy C jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu fosfolipidu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂), který je přítomen v malém množství na vnitřní straně membrány především v membránových doménách. Celkem 11 známých savčích isoform se dělí do čtyř skupin β , γ , δ a ϵ . Pouze PLC β a PLC ϵ mohou být aktivovány trimerními G proteiny. PLC β je aktivována G proteiny třídy G_q/G₁₁ a PLC ϵ proteiny třídy G₁₂ (Fukami, 2002). Za kontrolních podmínek je fosfolipáza C β přítomná v DRMs a její podíl se ještě zvýší po její aktivaci (Weerth a kol., 2007). Fosfolipáza C tedy štěpí PIP₂ na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG) (Williams, 1999). Zde se signální dráha rozděluje. IP₃ je malá rozpustná molekula, která rychle difunduje v cytosolu a váže se na příslušné receptory v endoplazmatickém retikulu. Tím způsobuje otevření IP₃-řízených Ca²⁺ kanálů v jeho membráně, čímž dojde k úniku Ca²⁺ iontů z endoplazmatického retikula a zvýšení jejich koncentrace v cytosolu. DAG zůstává vázán v membráně, kde může mimo jiné sloužit jako kofaktor při aktivaci klíčové serin/threonin kinázy C (PKC). PKC je Ca²⁺ dependentní kináza, výlev Ca²⁺ způsobí její přesun z cytosolu k cytoplazmatické membráně, kde je aktivována vazbou na DAG a negativně nabitým fosfolipidem fosfatidyl serinem (Amadio a kol., 2006). Výlev Ca²⁺ také aktivuje kalmodulin, který funguje jako aktivátor kalmodulin dependentní proteinkinázy.

Fosfolipázy A₂

Fosfolipázy A₂ mají 12 známých členů, které lze rozdělit do dvou tříd – nízkomolekulární (sekreční) a vysokomolekulární (cytosolická). Obě formy jsou lokalizovány v cytoplazmě. Tato fosfolipáza odštěpuje z fosfolipidů mastnou kyselinu (obvykle kyselinu arachidonovou) na druhém uhlíku glycerolového řetězce. Vzniká volná kyselina arachidonová a příslušný lysofosfolipid. (Murakami a Kudo, 2002). Jedná se o první krok v syntéze prostaglandinů.



cGMP fosfodiesteráza

Tento protein je aktivován G_{11} proteiny, které se nazývají transduciny. Vliv trimerních G proteinů na tuto fosfodiesterázu je nejlépe prostudován ve světločivném epitelu oka, ale pravděpodobně se účastní i vnímání hořké chuti (Yan a kol., 2001). Ve světločivném epitelu se nachází GPCR receptory rodopsiny. Ty se skládají z proteinové části opsinu, na něž je vázána molekula retinalu. Tato molekula po absorpci fotonu změní konformaci a tím způsobí konformační změny rodopsinu a aktivaci transducinu. Ten aktivuje cGMPfosfodiesterázu, která začne štěpit 3'-5' cyklický guanozin monofosfát (cGMP), takže dojde k poklesu koncentrace cGMP v cytosolu. Tento pokles vede ke snížení množství cGMP vázaného na Na^+ kanály v membráně, ty se proto uzavřou a dojde k hyperpolarizaci membrány. Aktivovaný transducin také interaguje s RGS proteinem, který urychluje hydrolyzu GTP na α podjednotce (Arshavsky a kol., 2002).

PI₃-Kinázy

PI₃-kinázy jsou kinázy, které fosforylují PIP₂ nebo fosfatidylinositol-4-monofosfát na třetím uhlíku inositolového kruhu a jsou aktivovány $\beta\gamma$ podjednotkou. Takto vzniklé produkty nemohou být štěpeny PLC β . PI₃-kinázy se tím účastní regulace přenosu signálu a prostřednictvím interakce s mitogenem aktivovanými protein kinázami (MAP kinázy) ovlivňují apoptózu, buněčnou diferenciaci a také remodelaci cytoskeletu (Vanhaesebroeck a kol., 1997; Verkleij a Post, 2000)

Iontové kanály

K regulaci iontových kanálů G proteiny dochází buď nepřímo s pomocí druhých posílů jako jsou Ca^{2+} , Na^+ , cAMP nebo IP₃, nebo přímo interakcemi s β a γ podjednotkami nebo s α podjednotkou. G proteiny hrají důležitou roli v regulaci iontových kanálů pro všechny hlavní ionty. Například v buňkách srdečního svalu se acetylcholin váže na m2-acetylcholinové muskarinové receptory spřažené s $G_{i\alpha}$, $G_{o\alpha}$, které tímto aktivuje, a uvolněná $\beta\gamma$ podjednotka otevře dovnitř usměrňující K^+ kanály, čímž dojde k hyperpolarizaci membrány a zpomalení frekvence srdeční činnosti (Morris a Malbon, 1999).



Malé G proteiny

Malé G proteiny jsou skupinou monomerních signálních proteinů s GTPázovou aktivitou. Hrají úlohu v celé řadě signálních drah. V drahách iniciovaných GPCR jsou přímo aktivovány třídou G proteinů G_{12}/G_{13} . Patří mezi ně například rodina proteinů RhoA, která reguluje formaci aktinových vláken, genovou transkripci a kontroluje buněčný růst (Kjoller a Hall, 1999). Nepřímá regulace aktivity RhoA proteinů se pak odehrává s pomocí RhoGEF, které ovlivňují dobu trvání aktivního stavu příslušného malého G proteinu (Sternweis a kol., 2007).

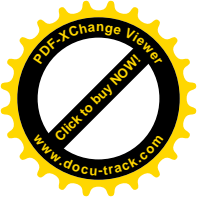
Signalizace s pomocí trimerních G proteinů a její regulace

Při aktivaci receptoru vazbou ligandu dojde podle klasického modelu aktivace G proteinu k výměně GDP na α podjednotce za GTP a disociaci G proteinu od receptoru. Komplex se pak dále rozpadá na α podjednotku a $\beta\gamma$ komplex, který za fyziologických podmínek nedisociuje. α a $\beta\gamma$ komplex pak dále interagují s dalšími konstituenty signální dráhy. Vzhledem k tomu, že aktivovaná molekula receptoru pravděpodobně aktivuje několik molekul G proteinu, dochází již na této úrovni k zesílení signálu. α podjednotka nese vlastní GTPázovou aktivitu a po jisté době, která závisí na typu podjednotky, dojde k hydrolyze GTP na GDP a fosfát. α podjednotka s navázaným GDP se stává neaktivní a dochází k reasociaci s $\beta\gamma$ komplexem. Hydrolyza GTP je také první nevratný krok v celé signální kaskádě a zajišťuje jednosměrnost celé reakce.

V poslední době se ukazuje, že po aktivaci nedochází vždy k disociaci trimerního G proteinu, ale u trimerních G proteinů třídy G_i dochází pouze ke změně v uspořádání podjednotek, kdy jejich rotací se odkrývají místa pro interakci s efektor (Frank a kol., 2005). Také, jak již bylo uvedeno dříve, může docházet na rozdíl od klasického schématu k disociaci $\beta\gamma$ komplexu.

AGS proteiny

Trimerní G proteiny nemusí být aktivovány pouze GPCR, ale existuje i speciální skupina proteinů nazývaná aktivátory G proteinové signalizace (activators of G protein signalling – AGS), které jsou schopné aktivovat trimerní G. Tyto proteiny jsou v současné době intenzivně studovány. Mezi širokou škálou funkcí, které jsou zatím známy, patří



zprostředkování signalizace přes NMDA receptory, dělení buněk, růst neuronů nebo regulace některých kanálů pro draselné ionty (Blumer a kol., 2007).

GTP-exchange faktory

Při aktivaci receptoru dochází k jeho konformačním změnám, tyto ovlivňují G protein asociovaný na intracelulární straně membrány a dochází k výměně GDP za GTP. Rychlost aktivace G proteinu je dána rychlostí této výměny. Tu urychlují GTP-exchange faktory (GEF). U trimerních G proteinů jsou známy dva. Prvním je Ric-8A neboli synembrin. Tento protein urychluje výměnu nukleotidů u G proteinů tříd G_q , G_i , G_o a G_{13} (Tall a kol., 2003). Předpokádalo se, že protein Ric-8B také funguje jako GEF a bylo zjištěno, že interaguje s proteiny tříd G_q a G_s (Von Dannecker a kol., 2005). Nicméně se zdá, že jeho úlohou je spíše zabránit ubiquitylaci α podjednotky a prodloužit tak dobu, po kterou je podjednotka aktivní (Nagai a kol., 2010).

RGS proteiny

α podjednotka trimerního G proteinu má sice vlastní GTPázovou aktivitu, ale ta je relativně nízká. Existují však proteiny, které fungují jako GTPázu aktivující proteiny (GAP) pro trimerní G proteiny. Tyto proteiny se nazývají regulátory funkce G proteinů (Regulators of G protein signalling – RGS). RGS regulují jak malé monomerní G proteiny, tak i trimerní G proteiny. Regulace aktivity α podjednotek byla prokázána u RGS2, RGS3, RGS4 a RGS18. Typická je pro ně doména o délce asi 120 aminokyselin označovaná jako RGS box, která má na svědomí GAP aktivitu. Proteiny obsahující tuto doménu jsou schopny zvýšit rychlost hydrolýzy GTP až 1000x (Posner a kol., 1999). Kromě toho mohou fungovat proteiny s RGS boxem i jako inhibitory signalizace, kdy váží aktivní α podjednotku G proteinu a brání tak aktivaci efektorů (Roy a kol., 2006). Bylo také ukázáno, že při vysoké koncentraci receptorů může při jejich aktivaci dojít k vyčerpání neaktivních $G\alpha$ podjednotek. RGS proteiny však svojí aktivitou pomáhají obnovovat zásobu neaktivních podjednotek a paradoxně tak posilují signalizaci přes trimerní G proteiny (Zhong a kol., 2003; Smith a kol., 2009). Další novou rolí RGS proteinů je funkce kinetických scaffoldů. Díky své aktivitě udržují aktivní G proteiny pouze v malé oblasti kolem receptoru a potlačují vliv aktivních G proteinů ze vzdálenějších oblastí membrány a pomáhají tak zvyšovat specifitu signálu (Zhong a kol., 2003).



Desenzitizace hormonálního působení

Desenzitizace GPCR může být popsána jako ztráta buněčné odpovědi po dlouhodobé nebo opakované stimulaci agonistou (Hausdorff a kol., 1990). Termín „dlouhodobé“ však může být poněkud zavádějící, protože se jím v literatuře označuje doba od několika sekund až po dny. Hlavní úlohou desenzitizace je zabránění poškození buňky v důsledku vysoké koncentrace druhých posílů a dalších meziproduktů signálních dráh a také odrušení přirozeného „pozadí“. Jedná se tedy především o obranný mechanismus. Tento proces hraje důležitou úlohu v drogové závislosti a je odpovědný také za problémy při dlouhodobé léčbě, kdy způsobuje ztrátu účinku léků (Drastichová a kol., 2008). Toto snížení odpovědi probíhá jednak na úrovni receptorů a jednak na úrovni G proteinů (Pierce a kol., 2002).

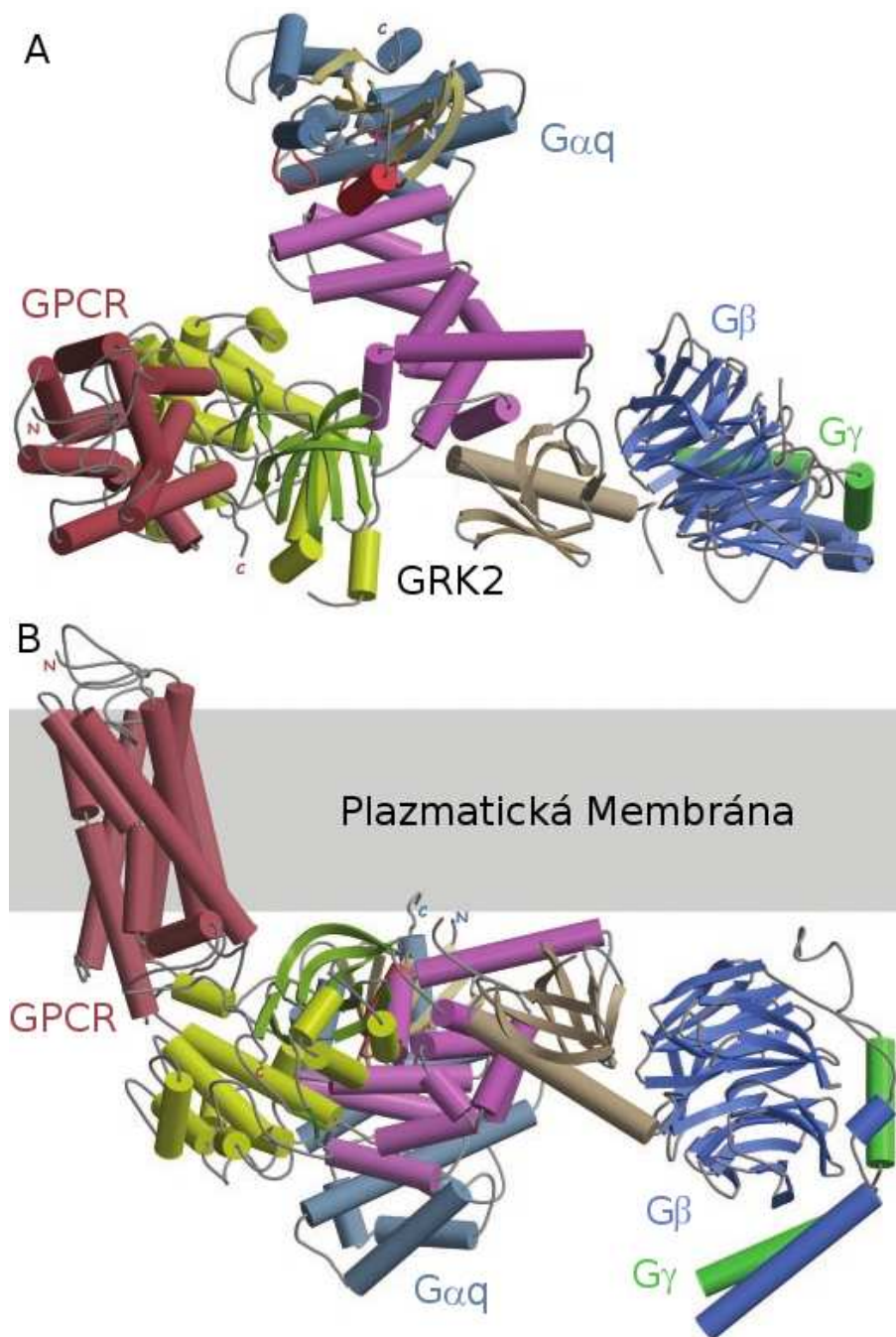
Mechanismus desenzitizace

Aktivovaný GPCR s navázaným ligandem představuje substrát pro kinázy asociované s GPCR (GRK). Tyto kinázy fosforylují receptor a snižují tak jeho schopnost aktivovat G protein. Fosforylace zároveň zvyšuje afinitu β -arrestinu k příslušnému receptoru (Lohse a kol., 1990). Tato fosforylace může být indukována aktivací stejného typu receptoru, pak mluvíme o desenzitizaci homologní, nebo může být indukována aktivací jiného typu GPCR a pak mluvíme o desenzitizaci heterologní. Homologní desenzitizace je většinou důsledkem aktivace GRK zatímco heterologní je důsledkem aktivace kináz aktivovaných druhými posly. Samotná fosforylace je obvykle příčinou stojící za rychlým potlačením funkce receptoru (Ferguson, 2001; Willets a kol., 2003).

Prvním krokem v desenzitizaci je tedy aktivace receptoru. Ta pak vede k aktivaci GRK, které se vážou na GPCR a fosforylují ho na serinových a threoninových zbytcích na třetí intracelulární smyčce receptoru, nebo C konci receptoru. Dnes je známo sedm rodin těchto receptorových kináz kódovaných samostatnými geny. GRK 1 a GRK 7 jsou exprimovány v sítnici oka a výskyt GRK 4 je specifický pro varlata a mozek. Zbylé GRK jsou exprimovány ve většině tkání a regulují tedy mnoho různých GPCR. Kinázy GRK 2 a GRK 3 se vyskytuje volně v cytosolu zatímco GRK 5 a 6 jsou membránově vázané. GRK 2, která fosforyluje β 2-adrenergní receptor, se také označuje také jako BARK1 (β 2-adrenergní receptor kináza) a byla objevena jako první (Ribas a kol., 2003).

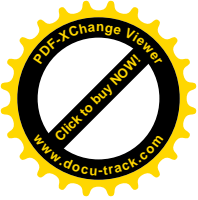


Vzhledem k tomu, že různé GRK mají různé preference ohledně fosforylačních míst, je zřejmé, že ve tkáních s různou expresí těchto kináz bude stejný receptor fosforylován různě a aktivace stejných receptorů v různých buňkách může vést k různým typům buněčné odpovědi (Torrecilla a kol., 2007). Proces fosforylace receptoru může být závislý i na tom, zda se receptor nachází ve formě monomeru nebo oligomeru. V případě TRH-R vede například vazba agonisty ke zvýšení oligomerizace receptoru a oligomerizace receptoru zase podporuje vazbu kináz a fosforylaci receptoru (Kroeger a kol., 2001; Song a kol., 2007). Kromě kompozice jednotlivých GRK v buňce hraje důležitou roli ve výsledné odpovědi i typ použitého ligandu, jak bylo ukázáno na CCR7 receptoru, kdy různí agonisté aktivují přednostně jiné kinázy a dochází tak k fosforylaci receptoru na různých místech. To opět vede k aktivaci různých signálních drah v buňce (Zidar a kol., 2009). Zvláštním případem receptorových kináz jsou třídy GRK 2 a GRK 3, které jsou spojeny především s receptory aktivujícími třídu G_q/G_{11} proteinů (Carman a kol., 1999b). Ty jsou za normálních okolností lokalizovány v cytoplasmě a po disociaci α a $\beta\gamma$ podjednotek se vážou na $\beta\gamma$ podjednotky v membráně. Tyto receptorové kinázy nemusí fungovat pouze na bázi fosforylace receptoru, ale díky RGS homologní doméně, která váže α podjednotku G proteinu, mohou fyzicky bránit interakci receptoru s G proteinem a reasociaci komplexu trimerního G proteinu (Benovic a kol., 2004). GRK2 tak tvoří komplex s $\beta\gamma$ podjednotkami a aktivovanou $G_q\alpha$, pravděpodobně spolu s aktivovaným receptorem (Lodowski a kol., 2003a; Tesmer a kol., 2005; Hague a kol., 2005). Předpokládanou strukturu tohoto komplexu ukazuje **obr. č. 5**. Ale například v případě internalizace metabotropního glutamátového receptoru 1 však není aktivace receptoru postačující pro vazbu GRK2, ale je nezbytná aktivace i PKC a kalmodulinem aktivované kinázy k tomu, aby došlo k vazbě receptorové kinázy a receptoru (McIlhinney a kol., 2004). Třída GRK 2 také obsahuje doménu pro přímou vazbu clathrinu (Ferguson, 2007).



Obr. č. 5 Komplex receptorové kinázy 2

Komplex receptorové kinázy 2 (GRK2) s navázaným GPCR (hnědá), α podjednotkou G proteinu (tmavě modrá) a $\beta\gamma$ dimerem (modrá a zelená) při pohledu od plazmatické membrány (A) a při pohledu ze strany (B) (upraveno podle Lodowski a kol., 2003a).

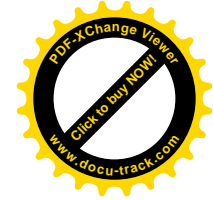
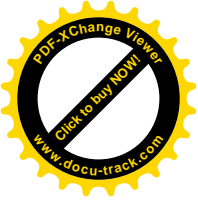


Dalším krokem je vazba β -arrestinu na fosforylovaný GPCR a další potlačení signalizace (Lohse a kol., 1992). Existují ale i receptory, které v aktivovaném stavu váží arrestin, aniž by byly fosforylovány jako například receptor pro leukotrien B₄ (Jala a kol., 2005). V současné době jsou známy 4 geny kódující arrestiny. Arrestin 1 a arrestin 4 jsou exprimovány pouze v sítnici oka. Zbylé arrestiny se vyskytují v řadě dalších tkání. Arrestin 2 je v literatuře také označován také jako β arrestin 1 a arrestin 3 jako β arrestin 2. Jednotlivé GPCR se vzájemně odlišují afinitou k těmto zástupcům arrestinů. Zatímco β -adrenergní, μ -opioidní nebo dopaminové receptory typu 1 dávají přednost vazbě s β arrestinem 2, receptory pro angiotensin, vasopressin nebo thyreoliberin mezi oběma typy β arrestinů nerozlišují (Pierce a kol., 2002; Lefkowitz a Shenoy, 2005).

K potlačení signalizace přispívá i navázání enzymů, které degradují druhé posly příslušné signální dráhy, jako je cAMP fosfodiesteráza v případě β 2-adrenergního receptoru (Perry a kol., 2002; Nelson a kol., 2007). Dalším krokem je vazba proteinů účastnících se internalizace receptoru, mezi něž patří například adaptorový protein AP2 a těžký řetězec clathrinu. Vazba arrestinu na clathrin pak vede k přesunu komplexu β arrestinu a GPCR do clathrinem obalených vchlípenin membrány, zatímco adaptorový komplex AP2 podporuje vznik clathrinem obalených váčků. Proces endocytózy je ukončen odštěpením váčku dynaminem, což je protein s GTPázovou aktivitou, který je považován za klíčový regulátor endocytózy. Účast enzymu štěpícího makroergní vazbu je nezbytná z energetického hlediska pro oddělení váčku od dvojvrstvy buněčné membrány (Ferguson, 2001). Internalizovaný receptor však zřejmě není zcela neaktivní, ale spouští další signální kaskády, které jsou odlišné od signálních kaskád na plazmatické membráně (Lohse a kol., 2010).

V buňce pak dochází k fúzi váčků za vzniku časných endozómů. V tomto okamžiku mohou být receptory defosforylovány a opětovně recyklovány na povrch membrány, nebo postupují dále do pozdních endozómů a jsou pak v lysozomech degradovány (Pitcher a kol., 1995; Krueger a kol., 1997). Pokud je rychlost degradace dostatečně vysoká, dojde ke snížení celkového počtu příslušného receptoru v buňce. Tento proces se nazývá downregulace. Ne všechny receptory, ale musí být internalizovány, aby došlo k jejich defosforylaci. Ukazuje se, že například β 2-adrenergní receptor a TRH-R mohou být defosforylovány i přímo na membráně (Jones a Hinkle, 2005; Tran a kol., 2007).

Kromě internalizace může mít vazba β arrestinu na receptor celou řadu jiných efektů. Například v případě TRH-R vede vazba ke zvýšení afinity receptoru pro agonistu (Hinkle a



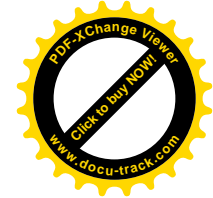
Jones, 2008). Arrestiny také mohou iniciovat signální dráhy, kde fungují jako adaptorové proteiny, což vede například k arrestin dependentní aktivaci MAPkináz (DeWire a kol., 2007; Ribas a kol., 2007).

Fosforylace a internalizace jsou procesy rychlé v řádu vteřin až minut. Například u TRH-R byla pozorována internalizace již po 3–5 minutách působení agonisty a po 10-15 minutách byl pozorován znatelný úbytek receptoru na membráně (Drmotá a kol., 1998a). Podobná dynamika byla pozorována také u β 2-adrenergního receptoru (Barak a kol., 1997). Internalizace G proteinu je naproti tomu záležitostí hodin, jako je tomu například u G proteinů třídy G_q/G_{11} , které jsou spřaženy s TRH-R (Drmotá a kol., 1998b; Pesanová a kol., 1999; Svoboda a Novotný, 2002). Z uvedených dat je zřejmé, že při internalizaci receptoru dojde k odpřažení receptoru a G proteinu, který zůstává na membráně (Svoboda a kol., 1999; Scarselli a Donaldson, 2009).

Přesun receptorů do clathrinem obalených váčků však nemusí být vždy doprovázen aktivací G proteinu. S pomocí tzv. „biased“ agonistů je možné aktivovat pouze vazbu arrestinu a indukovat tak internalizaci bez aktivace G proteinů. Na druhou stranu agonisté s „biasem“ pro aktivaci G proteinu mohou tento protein aktivovat a zároveň se vyhnout internalizaci receptoru zprostředkované arrestinem. Příkladem může být derivát angiotensinu II – SII (Kim a kol., 2009).

Pokud stimulace agonistou ustane, ať už odstraněním agonisty z prostředí, nebo přidáním antagonisty, většinou dochází k opačnému jevu zvanému resenzitizace. U obou procesů jak v případě desenzitizace, tak v případě resenzitizace závisí jejich rychlost na typu GPCR, ale i na stupni desenzitizace. Po endocytóze je receptor buď navrácen zpět na plazmatickou membránu nebo degradován. Proces návratu β -adrenergního receptoru na membránu se odehrává rychle – už během 15 minut, zatímco receptor pro vasopressin typu 2 je navrácen o poznání pomaleji (Morrison a kol., 1996; Innamorati a kol., 2001).

Desenzitizace může být také způsobena aktivitou RGS proteinů jako v případě μ -opioidních receptorů v mozku. Tato desenzitizace může probíhat procesy závislými na GAP aktivitě RGS proteinů jako v případě RGS-R4 nebo RGS-Rz, nebo sekvestrací aktivních α podjednotek jejich vazbou jako v případě RGS-R7. Ten je pravděpodobně také odpovědný vznik prvotní tolerance k morfinu (Garzón a kol., 2005).



Organizace buněčné membrány

V minulosti bylo navrženo několik modelů, které měly za úkol popsat strukturu buněčných membrán a jejich funkci. Původním modelem, od kterého se odvíjí naše současné představy uspořádání membrány, je model tekuté mozaiky. Tento model byl navržen v roce 1972. Základní představou je lipidová dvojvrstva, ve které jsou přítomny periferní a transmembránové proteiny. Podle této teorie nemá tato struktura žádnou vyšší organizaci, ale je pouze jakousi „polévkou“, ve které jsou proteiny a ostatní součásti membrány volně rozptýleny a k jejich interakci dochází v důsledku náhodných srážek (Singer a Nicolson, 1972).

Přestože tento model odpovídal naměřeným termodynamickým datům podstatně lépe než předchozí modely, vyvstal problém. Podle Singer Nicolsonova modelu tekuté mozaiky by byla totiž efektivita přenosu signálu přes membránu a efektivita interakcí membránových proteinů nižší, než ukazovaly experimenty. Už během 80. let byl navržen model lipidických domén, kdy v rámci plazmatické membrány existují struktury, které se liší svým lipidickým složením a organizací od okolní membrány (Karnovsky a kol., 1982; Simons a van Meer, 1988).

To vedlo až k teorii takzvaných lipidických raftů nebo detergent rezistentních membránových domén (DRMs).

Membránové domény

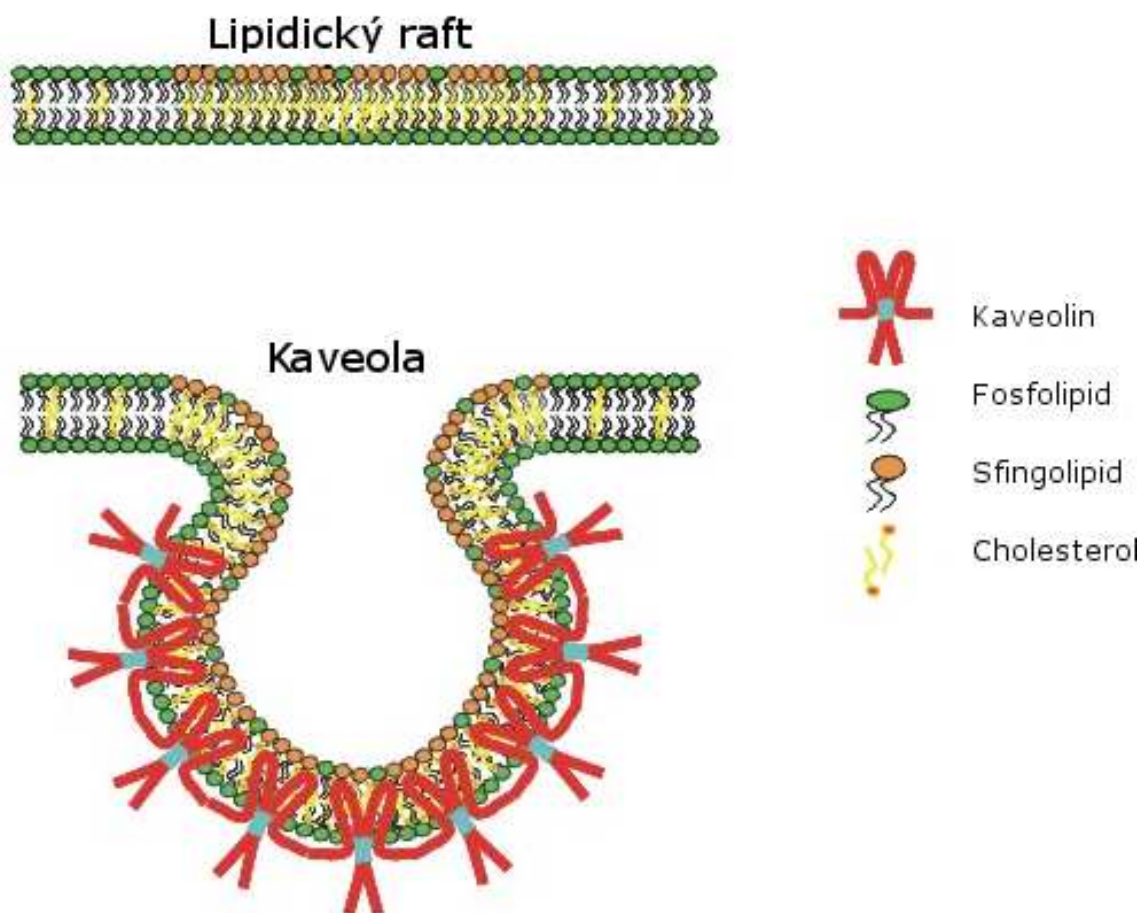
O přesném složení a struktuře DRMs se stále vedou spory. Jeden z názorů je, že DRMs jsou artefakty vzniklé detergentovou extrakcí, nicméně byly izolovány domény s velmi podobnými vlastnostmi jako DRMs s pomocí nedetergentových metod (Luria a kol., 2002). Hlavním znakem DRMs je, jak název napovídá, jejich nerozpustnost v neiontových detergitech. Buněčná membrána se totiž může nacházet v různých fyzikálních stavech. Lipidy, z kterých je složena mohou na jedné straně tvořit „krystalovou“ či „gelovitou“ strukturu (L_{β}) nebo tekutinu (L_{α}) na straně druhé. Tato struktura závisí na fyzikálních vlastnostech lipidů, které je tvoří, stejně jako na okolním prostředí, například teplotě a tlaku. L_{β} fáze je tvořena lipidy se zbytky nasycených mastných kyselin, které jsou k sobě těsně přiloženy a tvoří tak strukturu, kde dochází k minimální laterální difúzi. Na druhou stranu L_{α} fáze je tvořena lipidy se zbytky nenasycených mastných kyselin a je podstatně méně



kompaktní. Laterální difúze v ní probíhá vysokou rychlostí. Ukazuje se, že u buněčných membrán se uplatňuje ještě třetí stav tzv. uspořádané tekutiny L_o (Brown a London, 2000). Ta se vyznačuje podobně kompaktním uspořádáním jako L_β fáze a je tvořena stejnými lipidy. Právě tato struktura jim propůjčuje jejich typickou nerozpustnost v neiontových detergentech. Laterální difúze v ní však probíhá téměř stejnou rychlostí jako v L_α fázi (Silvius a kol., 1996).

Typická příprava DRMs spočívala v inkubaci buněk v pufru obsahujícím 1 % Triton X-100 a následné homogenizaci lyzátu. DRMs pak byly izolovány na flotačním kontinuálním gradientu 5 %–30 %, kde představovaly horních několik frakcí (Brown a Rose, 1992). Tento postup pro začátek definoval DRMs, ale se začátkem používání dalších detergentů stejně jako s úpravami postupu bylo potřeba představit konkrétní definici membránové domény. Proto byla v roce 2006 zavedena definice, která definuje membránové domény jako malé (10–200 nm), heterogenní, dynamické domény, které jsou obohaceny steroly a sfingolipidy a které soustřeďují specifické buněčné procesy. Malé rafty mohou někdy vytvářet větší platformy stabilizované protein-proteinovými nebo protein-lipidovými interakcemi (Pike, 2006). Tyto domény můžeme v zásadě rozdělit do dvou skupin – na lipidické rafty a kaveoly (**Obr. č. 6**).

Jak bylo řečeno, DRMs mají typické lipidové složení a obsahují vysoké koncentrace gangliosidů, sfingomyelinu, ceramidu a cholesterolu (Brown a Rose, 1992; Prinetti a kol., 2000). Fosfolipidové složení lipidové dvouvrstvy je samozřejmě i v doménách asymetrické. Ve vnějším listu membrány se nachází především sfingomyelin a glykosfingolipidy, zatímco v listu vnitřním především glycerolipidy jako fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin. Předpokládá se, že hlavní složkou dodávající DRMs rigiditu je právě cholesterol (5-cholesten-3 β -ol). S využitím fluorescenčních sterolů bylo zjištěno, že steroly nejsou v membráně distribuovány rovnoměrně, ale tvoří shluky, což odpovídá představě, že cholesterol je soustředěn převážně do membránových domén (Zhang a kol., 2005). Cholesterol obsahuje tetracyklickou kostru s jednou hydroxylovou skupinou a navázaným flexibilním uhlovodíkovým řetězcem isooktylu. Tato skupina zajišťuje cholesterolu jeho amfifilní charakter a správnou orientaci jeho molekuly v membráně. Všechna cyklická jádra se nacházejí v konformaci *trans*, což způsobuje, že molekula cholesterolu má planární strukturu. Bylo ukázáno, že přidání planárních molekul cholesterolu do umělé lipidové dvojvrstvy sníží pohyblivost molekul ostatních lipidů až o 50 % (Ladha a kol., 1996).



Obr. č. 6 Model struktury lipidických raftů a kaveol

V rámci plasmatické membrány lze rozlišit minimálně dva typy membránových domén – kaveoly a lipidické rafty.

(upraveno podle Galbiati a kol., 2001)



Cholesterol vyplňuje prostor mezi jednotlivými řetězci a díky své planární struktuře brání pohybu do stran. Na druhou stranu bylo prokázáno, že směs lipidů obsahující nasycené a nenasyčené mastné kyseliny bez přítomnosti cholesterolu vytvoří dvě fáze a dojde ke vzniku makroskopických domén. Pokud se ovšem ke směsi přidá cholesterol, tyto makrodomény postupně zanikají se zvyšující se koncentrací cholesterolu za vzniku nanoskopických domén (Feigenson a Buboltz, 2001). Také se ukazuje, že v případě membrán s velmi vysokou koncentrací sfingolipidů nemá koncentrace cholesterolu velký vliv a tyto membrány nejsou plně rozpustné Tritonem X-100 (Schroeder a kol., 1994). Podobné výsledky byly získány i na membránách izolovaných z buněk hovězího hippokampu (Pucadyil a Chattopadhyay, 2004). Zdá, že existují rozdíly ve struktuře v rámci jednotlivých DRMs – cholesterol není vázán v doméně všude stejnou silou a nejslaběji je vázán ve zranitelnějších hraničních zónách (Schwille a kol., 2004). Nicméně je jisté, že deplece cholesterolu z plazmatické membrány způsobí ztrátu některých proteinů z DRMs. Cholesterol je možno odstranit například pomocí cyklodextrinů, filipinu nebo cholesterol oxidázy (Christian a kol., 1997; Gimpl a Gehrig-Burger, 2007).

Dalším lipidem, který se nachází převážně v DRMs, je PIP_2 , který hraje důležitou úlohu v signalizaci s pomocí $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ proteinů a také při regulaci cytoskeletu (Pike a Casey, 1996; Liu a kol., 1998; Sheetz, 2001).

DRMs se od většinové části membrány liší také typy proteinů, které se v nich nacházejí nebo jsou s nimi asociovány. Proteiny, které se zde vyskytují, jsou především proteiny s glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, tyrosinové kinázy především z rodiny Src, kaveolin, flotilin, acylované proteiny, RGS, endotheliální NO syntáza a podjednotky G proteinů (Lisanti a kol., 1994b; Insel a kol., 2005). Membránové domény obsahují také velké množství cytoskeletálních proteinů jako jsou aktin, tubulin, supervilin, myosin a actinin, stejně jako proteiny regulující přestavbu cytoskeletu, například Cdc42 a Wiskott-Aldrich syndrome protein (Chichili a Rodgers, 2009; Sheetz, 2001). V mnoha případech obsahují lipidické rafty i GPCR receptory jako $GABA_B$ receptor, nebo receptory pro endothelin, bradykinin a gonadotropin uvolňující hormon. Některé GPCR receptory se zase nacházejí exkluzivně mimo membránové domény (receptor pro TRH nebo Bradykinin B1) a u jiných se liší jejich lokalizace v závislosti na jejich aktivaci (Chini a Parenti, 2003; Rudajev a kol., 2005).



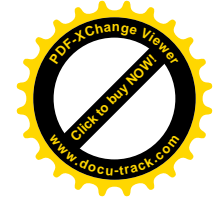
Bylo prokázáno, že alespoň u některých receptorů hrají fyzikální vlastnosti membrány podstatnou úlohu při jejich aktivaci. Při pokusech s rhodopsinovým receptorem bylo zjištěno, že při jeho aktivaci v rekonstituovaných membránách, které obsahují výlučně lipidy se zbytky nasycených mastných kyselin, je jeho aktivace výrazně nižší, než když membrána obsahovala i lipidy tvořící hexagonální fázi. Tyto změny nebyly závislé na konkrétních lipidech, ale pouze na jejich fyzikálních vlastnostech. Tato skutečnost pravděpodobně přímo souvisí se změnami konformace receptoru během aktivace a jejich stabilizací s pomocí přilehlých lipidů (Brown, 2010).

Rozdíly v aktivitě určitých proteinů jsou i mezi jednotlivými typy membránových domén, například NO syntáza je součástí DRMs, ale její lokalizace do caveol způsobuje její inhibici (Sowa a kol., 2001).

Vznik DRMs není zatím zcela objasněn. Přestože se pomocí pokusů na umělých membránách podařilo zjistit, že oblasti s podobnou charakteristikou, jako mají membrány, vznikají ve směsi fosfolipidů spontánně, podle dalších studií se jejich vzniku účastní i proteiny, které jsou v nich později obsaženy (Dietrich a kol., 2001; Epan, 2004). Také není jasné, zda DRMs vznikají až v plazmatické membráně, nebo již ve vnitřních organelách. Přestože již byly identifikovány detergent rezistentní struktury obsahující markery DRMs v Golgiho aparátu, ukázalo se, že mají unikátní složení, které se liší od DRMs v plazmatické membráně (Gkantiragas a kol., 2001).

Teorie stěsnání makromolekul (Macromolecular crowding)

Kromě teorie DRMs existuje ještě další teorie vysvětlující vysokou efektivitu interakcí – tzv. "macromolecular crowding". Jedním z opomíjených aspektů buněčného prostředí je skutečnost, že obsahuje obrovské množství makromolekul. Při velmi vysokých koncentracích makromolekul v roztoku, jako např. proteiny v buňce, se mění jejich vlastnosti. Přítomnost velkého množství makromolekul snižuje dostupnost rozpouštědla pro jiné makromolekuly, čímž efektivně dochází ke snižování objemu, ve kterém reakce probíhají a zvyšování efektivních koncentrací a chemické aktivity daných molekul. Díky tomu pak dochází ke změnám v řádech a rovnovážných konstantách reakcí a dochází k preferenci asociace makromolekul. Tato teorie se s teorií DRMs vzájemně nevylučují, ale doplňují (Ellis, 2001).

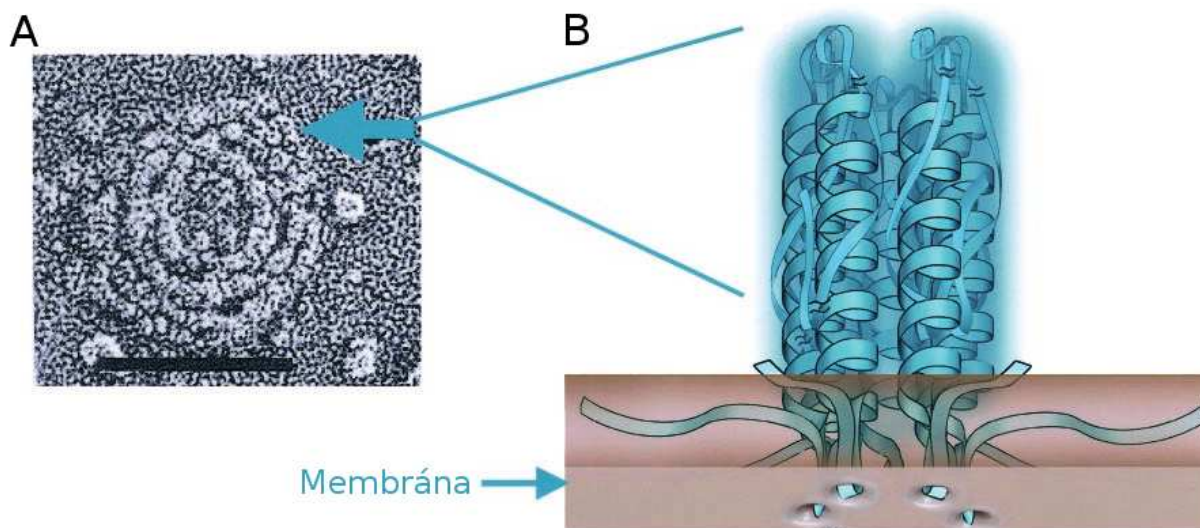


Kaveoly

Přestože termín “membránové domény” je poměrně recentní, byly první membránové domény pozorovány už v 50. letech s pomocí elektronového mikroskopu v endoteliálních buňkách. Jeví se jako malé invaginace lahvovitého tvaru v membráně, o průměru asi 50-100 nm v nejširším bodě, které jsou spojené s membránou, popřípadě tvoří malé měchýřky nacházející se těsně pod membránou. Podle svého tvaru dostaly jméno kaveoly (Yamada, 1955). Nacházejí se v mnoha typech buněk, nicméně jsou ve značném nadbytku přítomny v adipocytech, endoteliálních buňkách, epiteliálních buňkách a buňkách hladkého a příčně pruhovaného svalstva. Slouží také jako prostředek pro transcytózu, potocytózu a transport cholesterolu, ale také jako brána pro vstup některých virů do buněk (Anderson, 1998).

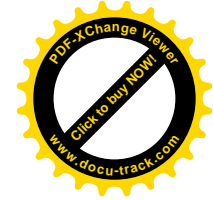
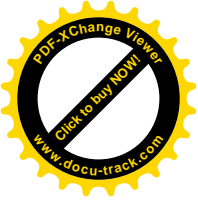
Základní složkou kaveol je protein kaveolin (Rothberg a kol., 1992). Jedná se o integrální membránový protein, který má v monomerní podobě hmotnost 17–24 kDa. Dosud byly identifikovány čtyři izoformy kaveolinu 1a (24 kDa), 1b (21 kDa), 2 (20 kDa) a 3 (17,2 kDa). Kaveoliny 1 a 2 jsou obsaženy hlavně v adipocytech a endoteliálních buňkách, zatímco kaveolin 3 se nachází pouze ve svalové tkáni (Fielding a Fielding, 2000). Nejlépe charakterizovaný je kaveolin 1. Je to monomerní integrální palmitoylovaný protein, který má převážně strukturu α helixu a jak C-konec, tak i N-konec jsou orientovány do cytoplazmy. Ve střední části se nachází 33 hydrofobních aminokyselin tvořících vlásenku, která prochází membránou (Fernandez a kol., 2002). C-konec kaveolinu je palmitoylován a N-konec je zodpovědný za vazbu bílkovin, včetně G proteinů, Src-kináz a PKC α (Dietzen a kol., 1995; Lisanti a kol., 1997a; Okamoto a kol., 1998).

Samotný kaveolin interaguje s některými proteiny signálních drah, jako je NOsyntáza, PKC β , PKC α a adenylylcykláza a ovlivňuje jejich aktivitu (Stubbs a kol., 2005; Allen a kol., 2009). Kaveolin také negativně ovlivňuje aktivitu serin/threoninových a tyrosinových kináz (Lisanti a kol., 1997a). Také je schopen vázat volné α podjednotky G $_q$, G $_{13}$ a G $_{i2}$ proteinů, a tak snižovat jejich aktivitu, čímž může přispívat k procesu desenzitizace (Lisanti a kol., 1997b; Murthy a Makhlof, 2000). Na druhou stranu kaveolin 1 také může posilovat signalizaci přes GPCR. V případě serotoninových receptorů 2A kaveolin interaguje s receptorem a podporuje tak interakci receptoru s G proteinem (Bhatnagar a kol., 2004). Kaveolin 1 se skládá do heptamerů, které pak slouží jako základní stavební jednotka kaveolinových filament (**Obr. č. 7**).



Obr. č. 7 Struktura kaveolinu a kaveolinových řetězců v plasmatické membráně

Kaveoly jsou v plasmatické membráně obaleny řetězci (A) složenými z heptamerů kaveolinu (B) (upraveno podle Fernandez a kol., 2002).



Nezdá se, že by kaveolin hrál roli v udržování tvaru kaveol, nicméně je možné, že k udržení tvaru a pozice kaveol navíc pomáhá interakce kaveolinu s cytoskeletem (Fernandez a kol., 2002). Kaveolin 1 totiž specificky váže protein filamin, který je zodpovědný za vazbu a stabilizaci aktinových filament (Stahlhut a van Deurs, 2000). Díky tomu jsou kaveoly pevně přivázány k cytoskeletu. Filamin také reguluje internalizaci a transport kaveol (Sverdlov a kol., 2009). Typicky mají kaveoly tvar řeckého písmene omega, ale jsou známy i typy kaveol, které jsou ploché nebo tvoří úzké trubice (Smart a kol., 1999; Gumbleton a kol., 2003).

Další důležitou úlohu hrají kaveoly při regulaci hladiny cholesterolu v buňce. Kaveoly stejně jako mnohé další membránové domény, obsahují vysoké množství cholesterolu a přenášejí ho mezi plazmatickou membránou a endoplazmatickým retikulem. Bylo prokázáno, že k formaci kaveol dochází již v Golgiho aparátu. Nicméně množství cholesterolu přímo reguluje transport kaveol, protože při nízkých hladinách cholesterolu v buňce nedochází k expozici kaveol do plazmatické membrány (Pol a kol., 2005; Le Lay a kol., 2006). Přesto se ukazuje, že kaveolin s cholesterolem interaguje jen velmi slabě a jeho sekvestrace do kaveol je pravděpodobně řízena jinými proteiny s nimi asociovanými (Epanand a kol., 2005).

Kaveoly hrají velkou roli při modulaci aktivity G proteinů a při přenosu signálu do buňky, protože shromažďují množství signálních molekul. V kaveolách jsou obsaženy κ , δ a μ opioidní receptory, β 2-adrenergní receptory, receptory pro endothelin a další (Chun a kol., 1994; Navratil a kol., 2003; Head a kol., 2005; Patel a kol., 2006; Zhao a kol., 2006; Xu a kol., 2006). Kromě toho obsahují proteiny, jako jsou Src kinázy, endoteliální NO syntázu a proteiny MAPkinázové dráhy (Lisanti a kol., 1994b). Také zde byly prokázány $G_q\alpha$ proteiny zatímco $G_i\alpha$ a $G_s\alpha$ jsou sice přítomny v DRM, ale nikoliv v kaveolách (Oh a Schnitzer, 2001). Jiné studie, ale ukazují že kaveoly hrají úlohu při desenzitizaci G proteinů a jsou nezbytné pro internalizaci G_s proteinů (Li a kol., 1995; Allen a kol., 2009). Není zcela jasné, jakým mechanismem je toto směřování zajištěno, ale zdá se, že hlavní roli hrají lipidové modifikace, nebo protein-proteinové interakce, jako vazba kaveolinu a $G\alpha$ podjednotky. V případě, že v membráně nejsou kaveoly přítomné, jsou všechny trimerní G proteiny lokalizovány v jiných typech membránových domén. Hlavním rozdílem při lokalizaci G_q/G_{11} do kaveol nebo jiných membránových domén je, že v kaveolách jsou α podjednotka a $\beta\gamma$ komplex disociovány. V ostatních membránových doménách se trimerní G proteiny nachází v asociovaném stavu (Oh a Schnitzer, 2001).



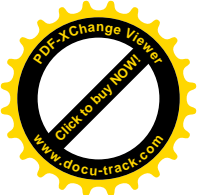
Cytoskelet

S problematikou DRMs je úzce spojena problematika cytoskeletu. Jak již bylo uvedeno, lipidické rafty i kaveoly obsahují jak proteiny účastníci se regulace cytoskeletu, tak i přímo strukturní proteiny (Stahlhut a van Deurs, 2000; Sheetz, 2001). Zdá se, že cytoskeletální proteiny zvyšují stabilitu DRMs. Například v intaktních MDCK buňkách nevedla ani 70% deplece k uvolnění markerů membránových domén. V homogenátu těch samých buněk však postačuje k uvolnění již 50% deplece cholesterolu, což poukazuje na stabilizaci DRMs strukturou, která je při homogenizaci porušena, což by mohl být právě cytoskelet (Schuck a kol., 2003).

Je také možné, že cytoskelet je přímo zodpovědný za vznik DRMs. Při interakci aktinových filament s membránou obohacenou o PIP₂ dojde k separaci membránových lipidů do rozdílných fází. Při interakci s lipidovou dvojrůstvou dochází ke zvýšení organizace lipidů v místě interakce a to může teoreticky vést až ke vzniku L_o fáze, která je jedním ze základních znaků DRMs (Liu a Fletcher, 2006).

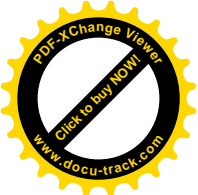
Cytoskelet se také přímo podílí na cílení proteinů do DRMs nebo většinové membrány, což bylo prokázáno například u Src kináz nebo komponent adenylylcyklázové signální dráhy (Head a kol., 2006; Chichili a Rodgers, 2007). Dále také přímo ovlivňuje účinnost signalizace iniciované GPCR. Narušení aktinových filament a mikrotubulů vede ke změně organizace signální dráhy β₂-adrenergního receptoru, její reorganizaci a překvapivě k posílení produkce cAMP indukované ligandem, stejně jako v případě 5HT-1A receptoru vede k posílení aktivace G_q proteinu (Head a kol., 2006; Ganguly a kol., 2008).

Dlouhou dobu bylo otázkou, proč jsou difúzní koeficienty molekul lipidů naměřené v buněčných membránách 10–100× nižší než koeficienty naměřené v rekonstituovaných membránách. Další otázkou bylo, proč v případě oligomerizace molekul dojde k podstatně většímu propadu jejich mobility než by bylo možné očekávat v dvourozměrné kapalině nebo dokonce k jejich imobilizaci (Nelson a kol., 1999; Hegener a kol., 2004). S rozvojem technologií se stalo možným sledovat pohyb jednotlivých molekul ve velmi krátkých časech. Tato pozorování ukázala, že molekuly v buněčné membráně se na delší vzdálenosti nepohybují obyčejným Brownovým pohybem, ale jejich pohyb je rozdělen do dvou fází. V jedné fázi se molekula po určitou dobu pohybuje v malé ohraničené oblasti a ve druhé dojde k jejímu přeskoku do jiné oblasti, kde se opět po určitou dobu zdržuje. V rámci těchto oblastí se



pak molekula pohybuje klasickým Brownovým pohybem. Celá membrána je tak vlastně rozdělena na malá políčka, ve kterých je možná difúze a mezi kterými je přechod relativně energeticky náročný (Fujiwara a kol., 2002; Kusumi a kol., 2004). Jednou z možných příčin tohoto dělení mohou být právě vlákna cytoskeletu. S membránou asociovaná vlákna tvoří na intracelulární straně membrány hustou síť. Takováto síť se samozřejmě projeví na pohybu molekul v plazmatické membráně a mohla by vysvětlit některé pozorované jevy ohledně pohybu molekul. Interakce membránového proteinu s jiným proteinem na cytoplazmatické straně pak může vést k imobilizaci nebo zpomalení difúze daného proteinu jednoduchou mechanickou cestou, kdy cytoskelet začne představovat větší překážku. Stejně tak by v případě oligomerizace fungoval cytoskelet jako brzda pohybu. Z měření vyplývá, že průměr polí, do kterých je rozdělena membrána, závisí kromě typu pozorované molekuly také na typu buňky a pohybuje se v řádech desítek až stovek nanometrů. Při pokusech s deplecí cholesterolu z buněčných membrán bylo zjištěno, že po depleci dochází ke zmenšení těchto polí a ke snížení rychlosti difúze molekul v membráně (Kusumi a kol., 2004). Tato zjištění jsou v souladu s efektem deplece cholesterolu na aktinová filamenta. Deplece cholesterolu totiž vede k aktivaci malých G proteinů z rodiny Rho s pomocí specifických Src kináz a fosforylaci kaveolinu. Tyto dva děje pak společně spouští tvorbu stresových aktinových vláken (Qi a kol., 2009).

Je tedy zřejmé, že deplece cholesterolu neovlivňuje signalizaci přes GPCR pouze změnami ve struktuře DRMs, ale i s pomocí změn ve struktuře cytoskeletu.



Materiály a metody

Chemikálie

Fura 2-AM, Amplex Red Cholesterol kit a ProLong Gold médium byly získány od firmy Molecular Probes. Percoll byl zakoupen od GE Healthcare Bio-Sciences AB. Protilátky byly získány od firmy Sata Cruz Biotechnology. Radioaktivně značené ligandy byly zakoupeny od Amersham-Pharmacia Biotech, [³H]TRH byl připraven Dr. Černým z Ústavu organické chemie a rostlinné fyziologie AVČR. Všechny ostatní chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich nebo Invitrogen-Gibco v nejvyšší dostupné čistotě.

Kultivace buněk

Všechny klony HEK 293 buněk – linie stabilně exprimující TRH-R spojený s vylepšenou formou zeleného fluorescenčního proteinu (VTGP) a buňky exprimující TRH-R (E2) – byly pěstovány v Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) doplněném o 8 % Newborn Calf Serum (NCS) a geneticin (800 µg/ml) při 37 °C ve vlhké atmosféře s 5 % CO₂. Ke kultivaci byly použity kultivační lahve Nunc s plochou dna 80 cm². Po dosažení 80% pokrytí dna buňkami bylo médium odsáto a buňky propláchnuty PBS (136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,2). Poté byly buď rozděleny do více inkubačních lahví nebo mechanicky sklizeny.

Linie buněk exprimujících TRH-R a G₁₁α (E2M11) byla pěstována stejně jako v předcházejícím případě, pouze bylo médium doplněno o hygromycin B (200 µg/mL). Při pasážování byly buňky po promytí s PBS inkubovány pět minut s roztokem 0,1 % trypsinu a 0,5 mM EDTA v PBS, aby došlo k jejich oddělení od podkladu a mezi sebou. Suspenze pak byla přenesena do kónické zkumavky o objemu 15 ml a centrifugována po dobu 3 minut při 1800×g. Supernatant byl pak odsát a buňky resuspendovány v DMEM a rozděleny do nových kultivačních lahví nebo nasazeny na krycí sklíčka.

Při sklizení byly buňky po propláchnutí PBS mechanicky sklizeny do ledového PBS a centrifugovány po dobu 10 minut při 1800×g v 50 ml kónické zkumavce. Supernatant byl pak odsát a buňky ihned zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C.



Pro fluorescenční měření byly buňky napěstovány na krycích sklíčkách potažených roztokem poly-L-lysinu o koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ve vodě. Potažená sklíčka byla vložena do Petriho misek o průměru 92 mm a překryta stejným médiem jako v případě kultivačních lahví. Pak byla na každé sklíčko nanášena suspenze buněk tak, aby v době experimentu dosáhly buňky správné hustoty pokrytí.

Stanovení koncentrace bílkovin

Bílkoviny byly stanoveny modifikovanou metodou podle Lowryho (Lowry a kol. 1951). Do zkumavek bylo napipetováno 10 μl postnukleárního supernatantu nebo percollových membrán a doplněno do objemu 500 μl deionizovanou vodou. Poté byl ke všem vzorkům přidán roztok složený z roztoků A (2 % Na_2CO_3 v 0,1 N NaOH), B (2 % Na, K-Tartrate) a C (1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) v poměru 50:1:1. Po 15 minutové inkubaci pak bylo přidáno 150 μl Folinova činidla naředěného v poměru 1:1 s deionizovanou vodou, vzorek protřepán a inkubován dalších 30 minut. Během inkubace byl vzorek přenesen do spektroskopické kyvety a přesně po 30 minutách inkubace změřena jeho absorbance na spektrometru Perkin-Elmer MBA 2000 při vlnové délce 700 nm.

Deplece cholesterolu

Pro depleci cholesterolu z buněk jsme použili roztok 10mM β -cyclodextrinu (CDX) rozpuštěného v DMEM bez přidaného séra. Buňky byly inkubovány s tímto roztokem po dobu 30 minut při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2 . Poté bylo médium odsáto a buňky propláchnuty vyhřátým PBS. Dále bylo PBS buď ihned nahrazeno DMEM bez přidaného séra a buňky byly okamžitě použity pro experiment, nebo byla provedena fixace buněk. V případě měření Ca^{2+} odpovědi bylo DMEM nahrazeno pufrém A (160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM glukóza, 10 mM HEPES, pH 7.2). Obsah cholesterolu byl určen pomocí enzymatické reakce za použití Amplex Red Cholesterol kit.

Stanovení obsahu fosfolipidů v plazmatických membránách

Ke stanovení hladiny fosfolipidů v plazmatické membráně byla použita kolorimetrická metoda založená na thiokyanatanu železnatém (Yoshida a kol., 1980). Ke vzorku izolovaných membrán o objemu 50 μl bylo přidáno s 50 μl absolutního etanolu a směs byla zahřáta na



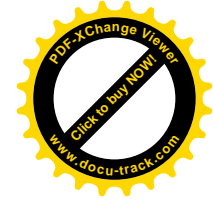
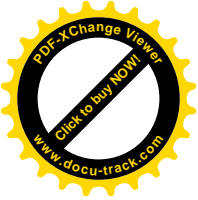
60 °C na dobu 5 minut. Pak bylo přidáno 125 μ l reagens s thiocyanatanem železnatým (0,97 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 15,2 g NH_4SCN , doplněno H_2O do 100 ml) a 75 μ l 0,17M HCl a tento roztok byl inkubován po dobu 5 minut při 37 °C. Pak bylo ke směsi přidáno 750 μ l 1,2-dichlorethanu a směs 2 minuty třepán. Poté vzorek centrifugován 5 minut při 200 \times g a odebrána spodní frakce a změřena její absorbance při 470 nm ve skleněné kyvetě na spektrometru MBA 2000 od firmy Perkin Elmer. Koncentrace fosfolipidů pak byla stanovena na základě srovnání se standardy.

Sledování hormonem indukované Ca^{2+} odpovědi

Buňky narostlé na krycích sklíčkách byly při dosažení 80 % konfluency vyjmuty z Petriho misky s kultivačním sérem a promyty puřrem A. Poté byly přemístěny do Petriho misek s puřrem A o teplotě 37 °C s přidanou 1mM Fura 2-AM a inkubovány po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Poté byla sklíčka opět promyta puřrem A a umístěna v komůrce invertovaného epifluorescenčního mikroskopu (Olympus IX 50 s 40x objektivem s olejovou imerzí) na platformě umožňující regulaci teploty. Teplota byla snímána přímo z komůrky. Experimentální měření bylo prováděno při celkem třech různých teplotách 15 °C, 25 °C a 37 °C. Fluorescenční obrázky změn $[\text{Ca}^{2+}]_i$ byly získány z emise 505 nm při střídavé excitaci Fura 2-AM světlem o vlnových délkách 340 nm a 380 nm. Změna osvětlení byla kontrolována počítačem (Polychrome II a Micromax hardware a software Metafluor) a data uložena pro pozdější analýzu. Jeden pár obrázků byl pořízen každé 2 vteřiny. Po odečtení pozadí byl spočítán poměr mezi intenzitou fluorescence při 340 nm a 380 nm. Testované hormony byly aplikovány při uvedených koncentracích přímo na experimentální skupinu buněk ze společného vyústění osmi hadiček napojených na zásobníky s testovacími roztoky. Ty byly aplikovány otevřením elektronických ventilů.

Konfokální fluorescenční mikroskopie (CLSM)

Buňky E2M11 byly v nízké hustotě nasazeny na krycí sklíčka potažená poly-L-lysinem 48 hodin před pokusem. V den pokusu bylo odstraněno kultivační médium a buňky propláchnuty PBS o teplotě 37 °C. Poté byly buňky ovlivněny β -cyclodextrinem. Poté byly buňky opět propláchnuty PBS a zafixovány ve 4 % paraformaldehydu v PBS po dobu 15 minut při 37 °C. Po fixaci byl paraformaldehyd odsán a vzorky ponořeny na dobu

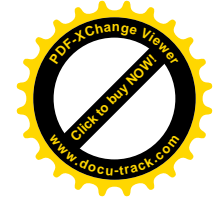


15 minut do roztoku 0,05 % Nonidet P-40 v PBS doplněném o 5 % kozí sérum a 1 % bovinní sérový albumin (NGB), aby došlo k permeabilizaci buněčné membrány. Následně byly buňky třikrát promyty PBS s 10mM glycinem. Poté byly k buňkám přidány primární protilátky proti $G_q/G_{11}\alpha$ naředěné v NGB v poměru 300:1. Vzorky pak byly inkubovány po dobu 1,5 hodiny při 37 °C v inkubátoru. Po ukončení inkubace byly opět třikrát promyty v PBS s 10 mM glycinem. Poté byl ke vzorkům přidán roztok sekundárních protilátek (kozí proti králičí protilátce spojené s FITC) v NGB naředěných v poměru 1:3000 pro vizualizaci proteinu. Vzorky pak byly inkubovány 1 hodinu opět při 37 °C. Po ukončení inkubace následovaly další tři promytí v PBS s 10mM glycinem. Vzorky pak byly zality ProLong Gold médiem, překryty krycími sklíčky a analyzovány s konfokálním mikroskopem Leica (TCS SP2 AOBS) s použitím argon-kryptonového laseru s excitační vlnovou délkou 488 nm při nastavené emisi 518 nm.

V případě pozorování živých buněk, byly tyto buňky po inkubaci s β -cyclodextrinem promyty v PBS o teplotě 37 °C a vloženy do komůrky a ta doplněna DMEM bez séra. Komůrka byla umístěna na vyhřívanou platformu (37 °C) invertovaného konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 AOBS. Pro excitaci eGFP byla použita vlnová délka 488 nm a pro detekci opět 518 nm. Velikost štěrbin byla nastavena na 1 Airy pro zobrazovací pokusy, ale pro pokusy FRAP byla její velikost nastavena na 1,6 Airy pro dosažení lepšího poměru signál/šum. Jako objektiv byl použit Plan-Apochromat 100 \times (1,4NA) objektiv s olejovou imerzí vyhřívaný na 37 °C, nebo apochromat 63 \times s vodní imerzí. Pro snímání sérií obrazů pokrývajících celou buňku v Z-ose byly řezy vzdáleny 0,5 μ m od sebe. Celá série byla nasnímana každých 5 minut.

Metoda FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Pro experimenty s FRAP byly použity buňky pěstované na krycích sklíčkách pokrytých poly-L-lysinem. K experimentům byl použit konfokální mikroskop Leica TCS2 AOBS založený na invertovaném mikroskopu Leica. Sklíčko s buňkami bylo umístěno do vyhřívané komůrky o teplotě 37 °C a s atmosférou s 5 % CO₂. Z každého experimentu byly pořízeny záznamy časových sérií. Každá série se skládala z 50 snímků, následovaných 5 vysvěcovacími pulzy, kdy nedocházelo k záznamu obrazu, a dále 250 snímků zaznamenávajících návrat fluorescence. Všechny snímky a pulzy byly od sebe vzdáleny



870 ms. Snímky byly pořizovány v 12bit hloubce šedi s rozlišením 512×512 pixelů rychlostí 800 Hz. Vysvěcovací pulzy byly provedeny laserovými paprsky o vlnových délkách 458 nm, 476 nm a 488 nm o maximální intenzitě (5 mW, 5 mW a 20 mW). Vlastní experiment byl proveden na fluorescenční periférii buňky reprezentující plazmatickou membránu. Na ní byla vybrána oblast zájmu (region of interest – ROI). Z praktických důvodů měla oblast tvar čtverce. Ta byla během vysvěcovacích pulzů vybělena. S výjimkou vysvěcovacích pulzů byl po celou dobu zaznamenáván obraz celé buňky, na které byl prováděn experiment, další buňky, která sloužila jako kontrola pro určení vysvěcování fluoroforu během snímání, a jejich okolí. Data pak byla extrahována z obrázků s „light“ verzí Leica confocal software. K vyhodnocení návratu fluorescence pak byly použity hodnoty intenzity pixelů nacházejících se v ROI.

Pro umožnění přesnější analýzy dějů byly zvoleny tři různé velikosti ROI o ploše 4, 9 a 36 μm^2 . Z technických důvodů nemohly být použity menší oblasti.

Získaná data byla nejprve korigována na vysvěcování na základě údajů získaných z druhé buňky ve snímaném poli, která ale nebyla podrobena experimentu. Od naměřených hodnot bylo také odečteno pozadí, které bylo získáno z týchž snímků.

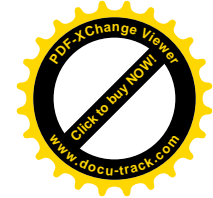
Nejprve byla z naměřených hodnot vypočítána mobilní frakce podle rovnice:

$$(1) \quad Mf = \frac{(I_E - I_0)}{(I_I - I_0)}$$

kde I_E je konečná hodnota navrácené intenzity fluorescence, I_0 je intenzita fluorescence těsně po vybělení a I_I původní intenzita. Mobilní frakce udává procento původní intenzity fluorescence na, kterou se vrátila po vysvěcení v čase, kdy návratová křivka dosáhla svého plató.

Pro účely prezentace byla data normalizována buď jako procenta z intenzity před vysvěcováním nebo podle rovnice:

$$(2) \quad I_{frap(norm)} = \frac{I_{frap(t)} - I_{frap(bleach)}}{I_{frap(pre)} - I_{frap(bleach)}}$$



kde $I_{frap(t)}$ je intenzita v čase t , $I_{frap(bleach)}$ je intenzita při prvním snímání po vybělení a $I_{frap(pre)}$ je původní intenzita před snímáním.

Poté byla normalizovaná data proložena funkcí:

$$(3) \quad I = I_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{\omega^2}{\omega^2 + 4\pi D_{app} t}} \right)$$

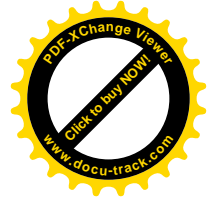
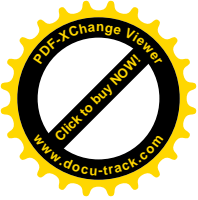
Kde I_{\max} je intenzita po návratu fluorescence, ω je šířka vybělené oblasti a t je čas. S pomocí této rovnice tak dostaneme D_{app} která vypovídá o zjevné rychlosti difúze v daném ROI. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a pro každou variantu bylo provedeno celkem 30 měření rozdělených do 3 nezávislých pokusů.

Internalizace receptoru

Buňky narostlé na krycích sklíčkách byly zbaveny cholesterolu, jak bylo popsáno dříve, nebo ponechány 30 minut v DMEM bez séra. Pak bylo do média přidáno TRH, aby jeho finální koncentrace byla $1\mu\text{M}$. Buňky byly poté inkubovány s TRH po dobu 1, 5, 10, 15, 30 nebo 60 minut tak, že celkový čas jejich expozice DMEM bez séra byl stejný. Po inkubaci bylo médium okamžitě odsáto, buňky propláchnuty PBS a okamžitě zafixovány s 4% paraformaldehydem při 37°C po dobu 15 minut. Poté byly opět promyty PBS a zality ProLong Gold médiem.

Příprava lehkých vezikulů a plazmatických membrán

Plně narostlé buňky z 9 lahví byly mechanicky sklizeny, centrifugovány a odebrán supernatant. Buňky pak byly resuspendovány do ledově chladného TME pufru s blokátorem proteáz (Complete Cocktail, Roche) a homogenizovány v těsném sklo-teflonovém homognizátoru Braun pod dobu 5 minut. Vzniklý homogenát byl centrifugován při $350\times g$ po dobu 3 minut. Mezi tím byl připraven zjednodušený sacharózový gradient skládající se z 9 ml 40% sacharózy převrstvené 18 ml 25% sacharózy. Na ten pak bylo navrstveno 5 ml supernatantu získaného z homogenátu. Tento gradient pak byl centrifugován 1 hodinu při $100000\times g$ v rotoru SW28. Po centrifugaci došlo k vytvoření dvou opaleskujících vrstev, kdy horní vrstva představuje lehké vezikuly a spodní vrstva plazmatické membrány. Obě vrstvy



byly odebrány a opět resuspendovány v TME pufru. Poté byly zcentrifugovány 1 hodinu při 110000×g na rotoru SW41. Pak byl z kyvet odebrán supernatant a pelet resuspendován v přiměřeném množství homogenizačního pufru. Pak bylo v získaných vzorcích stanoveno množství proteinu a cholesterolu.

Izolace plazmatických membrán

Buňky byly homogenizovány v těsném sklo-teflonovém homogenizátoru po dobu 7 minut na ledu. Buněčná drť a jádra byla odstraněna centrifugací po dobu 10 minut při 1000×g a 3 ml vzniklého postnukleárního supernatantu bylo nanášeno na 20 ml Percollového roztoku (30 % w/v) v STME pufru (250mM sacharóza, 20mM TRIS, 3mM MgCl₂, 1mM EDTA, pH 7,5) umístěného v polykarbonátové kyvetě. Po 20 minutové centrifugaci při 65,000×g v Beckman Ti 70.1 rotoru byla odebrána vrchní vrstva obsahující plazmatické membrány a naředěna v poměru 1:3 s TNEM puftrem (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, pH 7,5). Následovná centrifugace při 150000×g po dobu 90 min v Beckman Ti 70.1 rotoru umožnila pohodlné oddělení membrán od kompaktního gelovitěho sedimentu Percollu. Takto získané membrány pak byly ručně rehomogenizovány v malém množství TNEM pufru a okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C.

Izolace detergent rezistentních membránových domén

Pro izolaci membránových domén jsme použili neiontový detergent 1 % Triton X-100. Kontrolní nebo CDX ovlivněné buňky ze šesti 80 cm² kultivačních flašek byly mechanicky sklizeny a sedimentovány centrifugací při 600×g po dobu 10min. Pelet pak byl resuspendován v ledově chladném TME pufru (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, a 1 mM EDTA; pH 7,5) obsahujícím inhibitor proteáz Complete Cocktail a 2 mM PMSF do výsledného objemu 1,1 ml. Poté byl přidán stejný objem ledově chladného TME pufru s 2% Triton X-100 a buňky byly resuspendovány pipetou. Následně byla směs inkubována po dobu 60 minut na ledu. Buněčný lyzát byl smíchán v poměru 1:1 s 80% (w/v) vychlazenou sacharózou a převrstven vrstvami sacharózy o snižující se koncentraci 35 %, 30 %, 25 %, 20 % a 15 % – každá o objemu 1,5 ml. Poté byly gradienty centrifugovány po dobu 24 hodin při 188000×g (4 °C) v SW41 rotoru (Beckman Coulter, Palo Alto, CA). Po ukončení centrifugace, byl výsledný gradient rozebrán od shora dolů po 1ml frakcích. Tyto frakce pak byly zamrazeny v tekutém



dusíku a uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při použití tohoto typu gradientu se membránové domény nacházejí na rozhraní 20%/25% sacharózy, což jsou frakce 4–6, zatímco solubilizovaný materiál se nachází ve frakcích 8–12.

Elektroforéza a immunobloting

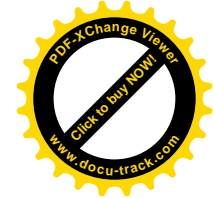
Vzorky byly solubilizovány (1:1) v Laemli pufru a nanесeny na standardní 10% gely připravené podle následující tabulky:

| | |
|-------------|-------------------|
| Voda | 8,0 ml |
| Pufř 1 | 5,0 ml |
| 30 % Ac-Bis | 6,7 ml |
| 10 % SDS | 200 μl |
| 10 % APS | 90 μl |
| TEMED | 8 μl |

Tento gel byl převrstven 300 ml nasyceného roztoku butanolu v H_2O . Po polymeraci gelu, která trvala zhruba jednu hodinu, byl gel opláchnut vodou a převrstven zaostřovacím gelem následujícího složení:

| | |
|-------------|-------------------|
| Voda | 6,0 ml |
| Pufř 2 | 2,5 ml |
| 30 % Ac-Bis | 1,3 ml |
| 10 % SDS | 100 μl |
| 10 % APS | 90 μl |
| TEMED | 8 μl |

Po nalití gelu byl ihned vložen hřebínek a gel polymeroval asi 30 minut. Poté byl gel opět propláchnut vodou umístěn to elektroforetické aparatury a ponořen do elektroforetického pufru (25 mM Tris, 188 mM glycin 0,1 % SDS). Vzorky inkubované po dobu 5 minut při $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ s SLB pufrem (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 8 % SDS, 40 % glycerol, 0,04 % bromfenolová modř, 0,4 M dithiotreitol) byly nanесeny do jednotlivých jamek v gelu a do jedné jamky byla nanесena směs standardů molekulových vah. Elektroforéza probíhala po dobu 45 minut při konstantním napětí 200 V, případně až do doby, kdy čelní zóna dosáhla spodního okraje gelu. Pro experimenty byla použita aparatura „mini protean“ od firmy Bio-Rad. Po rozdělení proteinů jsme použili Western blotting pro jejich přenos na nitrocelulóзовou membránu, na které pak probíhala jejich detekce. Byla použita tzv. „mokr



varianta“ této metody. Přenos probíhal po při konstantním napětí 30 V přes noc v zařízení od firmy Bio-Rad. Blotovací pufr obsahoval 25 mM Tris, 192 mM glycin a 20 % metanol. Po přenosu byla membrána blokována po dobu 1 hodiny v 5% roztoku nízkotučného mléka v TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0). Poté byla přenesena do roztoku 1% nízkotučného mléka v promývacím pufru s rozpuštěnou primární protilátkou a inkubována po dobu dvou hodin. V našem případě se jednalo o specifické anti-kaveolin 2 protilátky, anti- $G_q/G_{11}\alpha$ králičí protilátky proti C-terminálnímu dekaeptidu společnému $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ nebo protilátky proti proteinu flotilin. Ředění těchto protilátek se pohybovalo v rozmezí 300-1000:1. Poté byly membrány důkladně promyty 3×10 minut v promývacím pufru a inkubovány další hodinu v 1% nízkotučném mléce s naředěnými sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou. Membrány byly opět důkladně promyty v promývacím pufru, osušeny a proteiny byly vizualizovány pomocí metody indukované chemiluminiscence (ECL). Chemiluminiscence byla zaznamenána na filmy firmy Kodak. Tyto vyvolané bloty byly naskenovány s pomocí scanneru (Astra 610P, UMAX) a kvantitativně analyzovány s programem ImageQuant.

Vazebné studie s TRH receptorem

TRH receptory byly charakterizovány pomocí kompetitivního vytěšňování [^3H]TRH/TRH. Vazebná reakce byla spuštěna přidáním membrán (20 μg proteinu na zkumavku), inkubační médium (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 , pH7,4) obsahovalo 10nM [^3H]TRH spolu se zvyšujícími se koncentracemi TRH (10^{-10} – 10^{-5} M) v celkovém objemu 0,2 ml. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti 10^{-4} M TRH. Po 90 minutách při 4 °C byla vázaná a volná radioaktivita oddělena filtrací přes Whatman GF/B filtry na přístroji Brandell Cell harvesteru. Filtry byly třikrát promyty 3 ml ledově chladného 0,9% NaCl a radioaktivita zachycená na filtrech byla kvantifikována pomocí kapalinové scintilační spektrometrie. Výsledná data byla analyzována programem Prism 4 za použití formalismu DeBlasiho a kol. (1989).

Vazba $\text{GTP}\gamma\text{S}$

[^{35}S]GTP γS vazebná studie byla provedena podle Bourova a kol. (2003). Membrány (10 μg) byly inkubovány při 30 °C po dobu 30 minut v HNM pufru (20 mM HEPES, 100 mM



NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM askorbát; pH 7,4) v celkovém objemu 100 μl obsahujícím 0,5nM [³⁵S]GTPγS (přibližně 1,5×10⁵ dpm) s 2μM GDP a různé koncentrace TRH. Vazebná reakce byla ukončena filtrací přes Whatman GF/C filtry namočené HM pufrem (20 mM HEPES, 3 mM MgCl₂; pH 7,4). Filtry byly dvakrát promyty s 4 ml ledově chladného HM pufru a radioaktivita zachycená na filtrech byla určena jako v předchozím případě. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti 10μM neznačeného GTPγS. V případě měření vlivu deplece cholesterolu na asociaci GTPγS indukovanou TRH byla zahájena reakce ve velkém objemu při 30 °C opět v HNM pufru. Z něj pak byly ve stanovených časech odebírány vzorky o stejném objemu a nanášeny na Whatman GF/C filtry umístěné na filtračním zařízení připojeném na vývěvu. Po nanesení vzorku na filtr a první filtraci byl filtr dále dvakrát propláchnut ledovým HM pufrem. Po skončení pokusu byla zachycená radioaktivita opět stanovena pomocí scintilace. Statistické zpracování pak bylo provedeno za pomoci programu Prism 4. Ke zjištění signifikance rozdílů mezi jednotlivými vzorky byl standardně použit Studentův nepárový t-test.



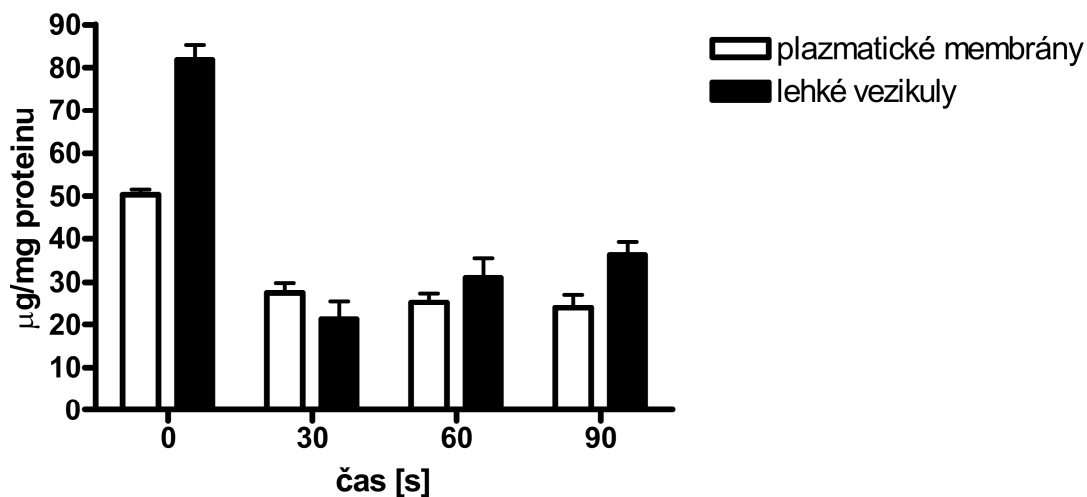
Výsledky

Deplece cholesterolu

Pro určení optimální doby působení CDX na buněčné membrány HEK293 buněk, jsme nejprve stanovili časovou závislost poklesu v obsahu cholesterolu při koncentraci 10mM CDX. Výsledky ukázaly, že 30 minutová inkubace s CDX způsobila pokles v obsahu cholesterolu o 50 %. Delší doba inkubace už neměla vliv na celkovou koncentraci cholesterolu. Proto byly pro další experimenty používány inkubace s dobou trvání 30 nebo 60 minut. Jak ukázaly pokusy se separací membrán na sacharózovém gradientu, dochází nejprve k depleci cholesterolu v plazmatické membráně a až posléze k poklesu množství cholesterolu ve frakci tzv. lehkých vezikulů (**Obr. č. 8**). Tento výsledek je konzistentní s faktem, že kaveoly nacházející se v Golgiho komplexu, který by měl být součástí lehkých vezikulů, obsahují vysoké množství cholesterolu a účastní se udržování jeho rovnováhy (Pol a kol., 2005; Le Lay a kol., 2006).

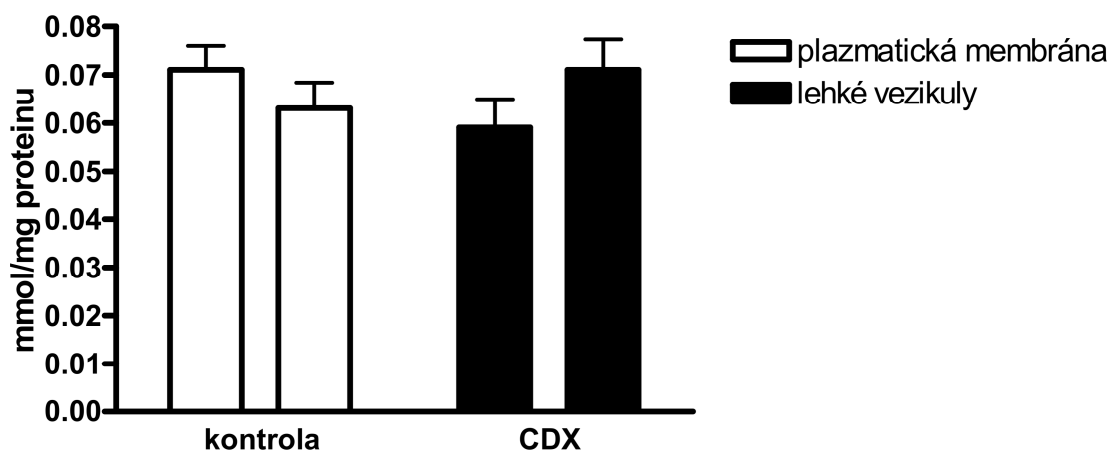
Vliv inkubace s CDX na hladiny fosfolipidů v membráně

Vzhledem k tomu, že se v literatuře vyskytují údaje o schopnosti CDX extrahovat z buněčné membrány lipidy, rozhodli jsme se zjistit, zda námi prováděná inkubace ovlivňuje poměr fosfolipidů a proteinů v plazmatické membráně. Proto byly z kontrolních a CDX ovlivněných buněk připraveny plazmatické membrány. Po naředění vzorků membrán na stejnou koncentraci proteinů byl změřen obsah fosfolipidů. Mezi kontrolními a CDX ovlivněnými vzorky nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl, v obou případech bylo naměřeno 60 nmol fosfolipidů na 1 mg proteinů (**Obr. č. 9**). Zajímavé je zjištění, že nebyl zaznamenán rozdíl mezi frakcí plazmatických membrán a lehkých vezikulů.



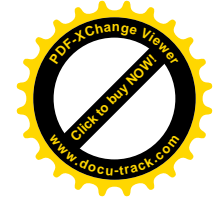
Obr. č. 8 Vliv inkubace s CDX na obsah cholesterolu v plazmatických membránách a lehkých vezikulech

Koncentrace cholesterolu byla určena s pomocí Amplex Red Cholesterol kit ve vzorcích připravených z buněk inkubovaných s $10 \mu\text{M}$ CDX po určenou dobu. Data představují průměr ze tří měření \pm standardní chyba.



Obr. č. 9 Vliv deplece cholesterolu na obsah fosfolipidů v plazmatické membráně a lehkých vezikulech

Fosfolipidy byly změřeny ve vzorcích připravených z kontrolních buněk (prázdné sloupce) a buněk inkubovaných s $10 \mu\text{M}$ CDX (plné sloupce) po dobu 30 minut. Data představují průměr ze tří měření \pm standardní chyba.



Buněčná morfologie

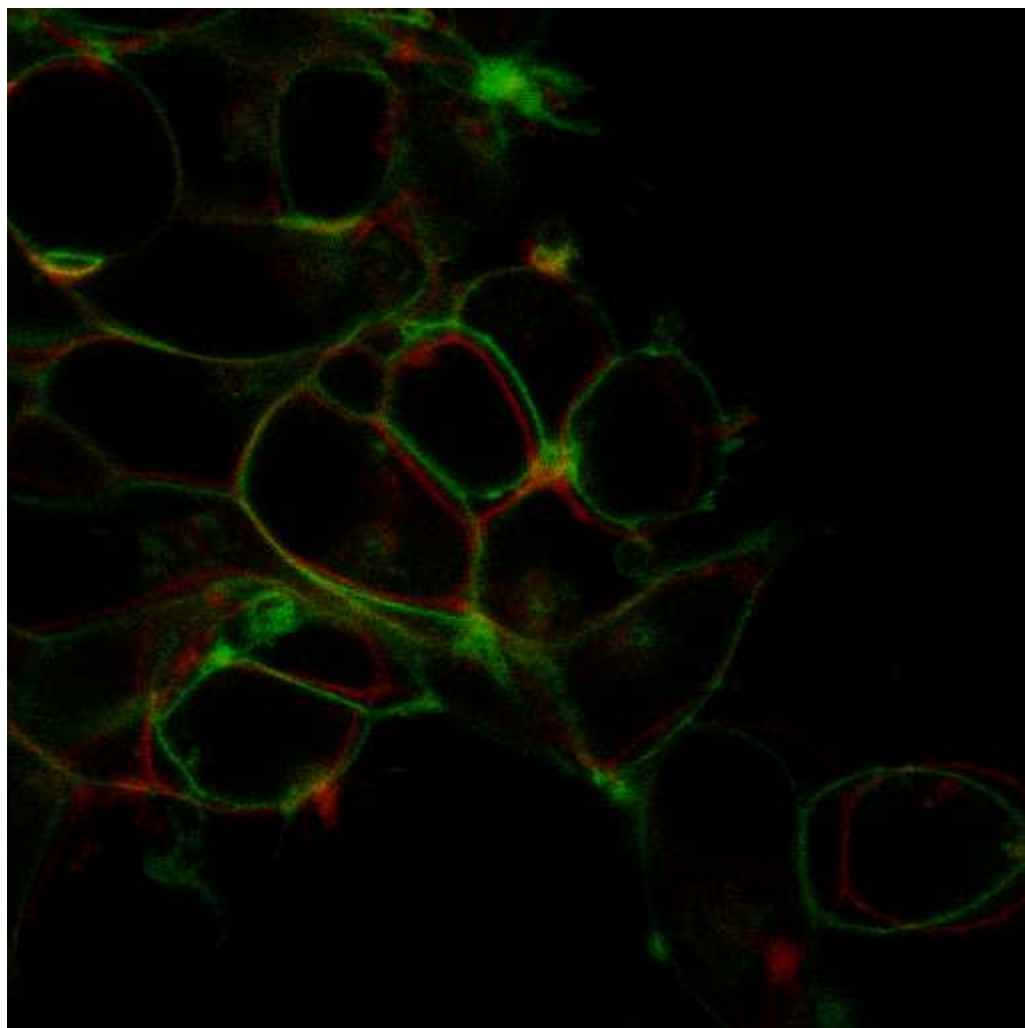
Dalším cílem bylo zjistit, zda deplece cholesterolu vyvolává u buněk zásadní fyziologické změny. Po 30 minutách působení CDX jsme zaznamenali menší změny v celkovém vzhledu VTGP buněk. Došlo k malým změnám v pozici a orientaci buněk. Tyto změny však nebyly odlišitelné od změn zaznamenaných za stejných podmínek u CDX neovlivněných buněk po 30 minutách snímání v komůrce konfokálního mikroskopu (**Obr. č. 10**).

Vliv deplece cholesterolu na charakteristiku vazby ligandu na TRH-R

Nejprve jsme zkoumali, zda deplece cholesterolu ovlivňuje vazbu ligandu na receptor. Po změření vazby [³H]TRH na TRH-R v Percollových membránách byla provedena analýza [³H]TRH/TRH vytěšňovacích vazebných křivek podle DeBlasiho. Membrány izolované z kontrolních buněk nevykazovaly signifikantní rozdíl ve srovnání s membránami izolovanými z buněk vystavených CDX (**Tab. 1**). Počet vazebných míst (B_{\max}) a afinita (K_D) TRH-R se mezi oběma typy membrán významným způsobem nelišila.

Vliv deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpověď indukovanou TRH

Vzhledem k tomu, že jsme nezjistili signifikantní rozdíl v charakteristikách vazby ligandu na receptor, které by byly způsobeny deplecí cholesterolu, rozhodli jsme se prozkoumat, jaký vliv bude mít deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpovědi indukované vazbou ligandu. Nejprve jsme stanovili s pomocí fluorescenční sondy Fura2-AM křivky dávka-odpověď. Koncentrace TRH se při měřeních pohybovaly v rozmezí 10^{-16} – 10^{-6} M (**Obr. č. 11**). Přestože jsou získaná data ovlivněna také afinitou fluorescenční sondy k Ca^{2+} , výsledky zcela jasně ukazují, že deplece cholesterolu způsobuje posun citlivosti Ca^{2+} odpovědi na stimulaci hormonem o dva řády směrem k vyšším hodnotám koncentrací TRH. Hodnoty EC_{50} vzrostly z 10^{-12} M na 3×10^{-10} M. Hodnota maximální odpovědi se nezměnila. Výsledky jasně ukázaly, že při depleci cholesterolu došlo k významné ztrátě efektivity signální dráhy, protože za kontrolních podmínek byla nejnižší koncentrace TRH, která vyvolala detekovatelnou odpověď 10^{-15} M, zatímco u buněk ovlivněných CDX to bylo až při koncentraci 10^{-11} M.

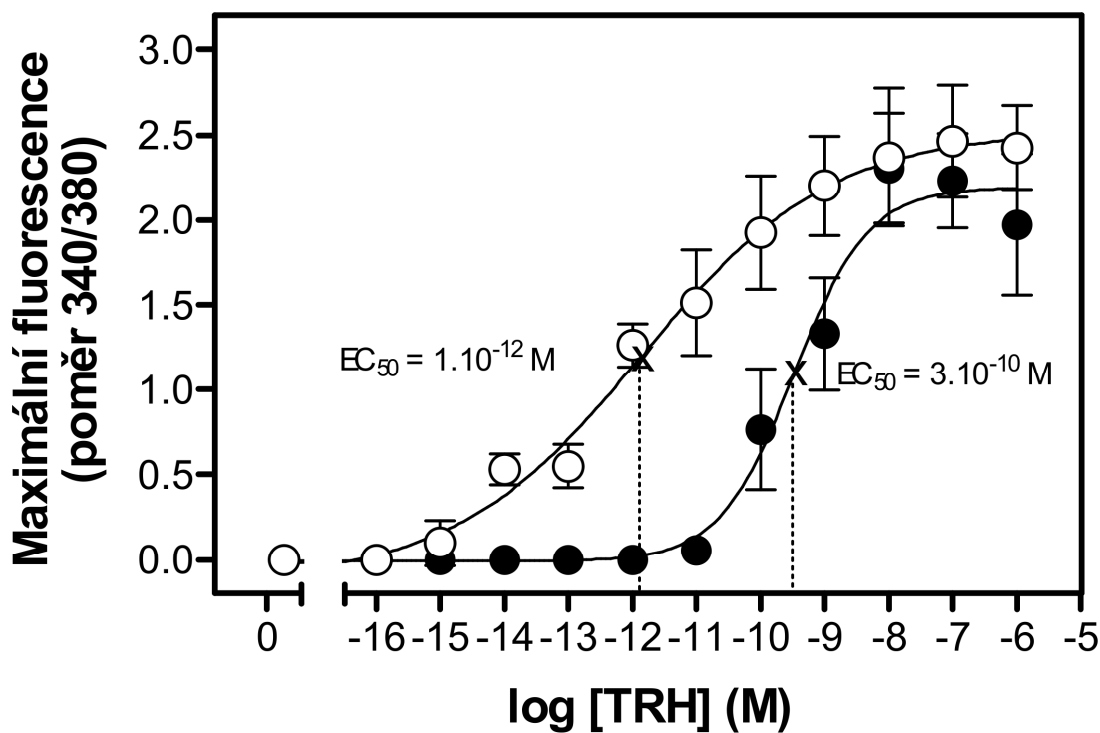
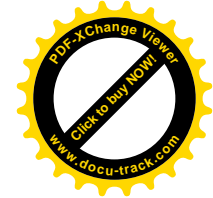


Obr. č. 10 Změny ve tvaru buněk po 30 minutách působení CDX

Buňky VTGP umístěné na konfokálním mikroskopu, byly inkubovány s 10 μ M CDX. Zelená barva označuje tvar buněk před inkubací a červená barva po 30 minutách působení CDX.

Tab. č. 1 Vliv deplece cholesterolu na vazbu TRH

| | Bmax (pmol/mg protein) | KD (nM) |
|-----------------|-------------------------------|----------------|
| Kontrola | 5,7 \pm 1,0 | 9,6 \pm 1,4 |
| CDX | 4,7 \pm 0,7 | 12,7 \pm 4,5 |



Obr. č. 11 Vliv deplece cholesterolu na hodnoty maximálních Ca^{2+} odpovědí indukovaných TRH

V kontrolních (prázdné symboly) a CDX ovlivněných (plné symboly) buňkách byly stanoveny maximální hodnoty Ca^{2+} odpovědí indukovaných TRH. Průměrné hodnoty EC_{50} pro obě křivky typu dávka-odpověď jsou vyznačeny v grafu. Data představují průměr \pm standardní odchylka z 20 buněk měřených ve třech nezávislých experimentech (Ostasov a kol., 2007).



Dále jsme podrobně prozkoumali dvě koncentrace TRH – nízkou (10^{-9}M) a vysokou (10^{-6}M). Při obou těchto koncentracích jsme podrobně zkoumali vliv deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpověď (**Obr. č. 12**). Za kontrolních podmínek je doba nutná k dosažení maximální odpovědi rozdílná u různých koncentrací ligandu. U vysokých koncentrací je čas kratší (6 s) než u nižších (8 s), přestože odpověď je vyšší. Po depleci cholesterolu se ukázalo, že kromě vlivu na velikost hormonální odpovědi dochází k prohloubení rozdílů v jejich rychlostech. U vysoké koncentrace TRH byl nástup odpovědi po CDX 10 s a u nižší dokonce 20 s, což je více než $2\times$ delší doba než u kontrolních buněk. ***Obecně se dá shrnout, že deplece cholesterolu snižuje efektivitu stimulace a prodlužuje dobu nástupu hormonálního efektu a tento jev je zřetelnější u nízkých koncentrací ligandu***

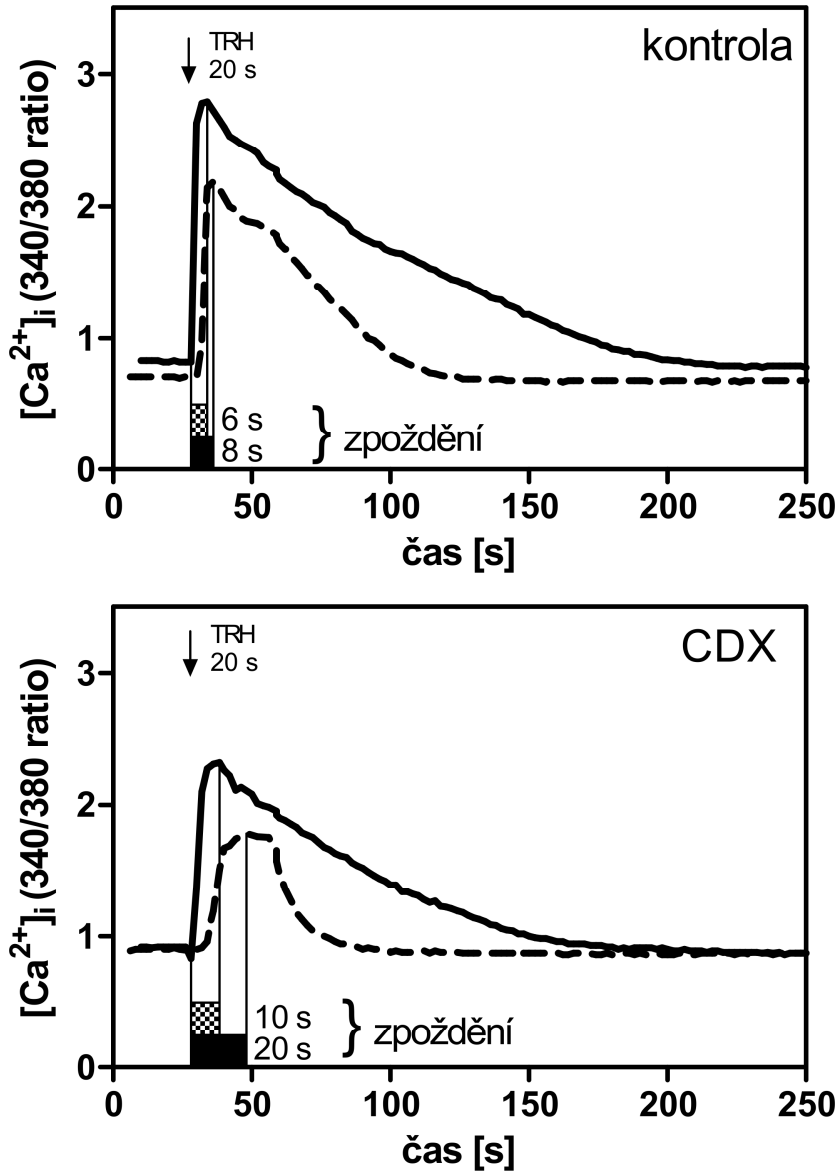
Desenzitizace Ca^{2+} odpovědi

V této sérii experimentů jsme prozkoumali a porovnali Ca^{2+} odpovědi na různé koncentrace TRH a desenzitizaci ve dvou různých typech buněčných linií odvozených od HEK293 buněk. Použity byly linie E2 a E2M11. Linie E2 exprimuje vysoké množství pouze TRH-R. Linie E2M11 exprimuje ještě navíc vysoké hladiny $\text{G}_{11\alpha}$ proteinu. Aplikace TRH v rozmezí 10^{-10} – 10^{-8}M nevedla k pozorovatelné desenzitizaci odpovědi na $1\mu\text{M}$ TRH u buněk E2. Vyšší koncentrace TRH, ale způsobily velmi zřetelnou desenzitizaci odpovědi na druhou dávku (**Obr. č. 13**).

U buněk E2M11 byla pozorována vysoká citlivost odpovědi na stimulaci TRH. Už koncentrace TRH 10^{-10}M byla schopná vyvolat téměř maximální měřitelnou odpověď Ca^{2+} . Na druhou stranu, stimulace buněk E2M11 různými koncentracemi TRH nevedla k potlačení zřetelné druhé odpovědi (**Obr. č. 13**).

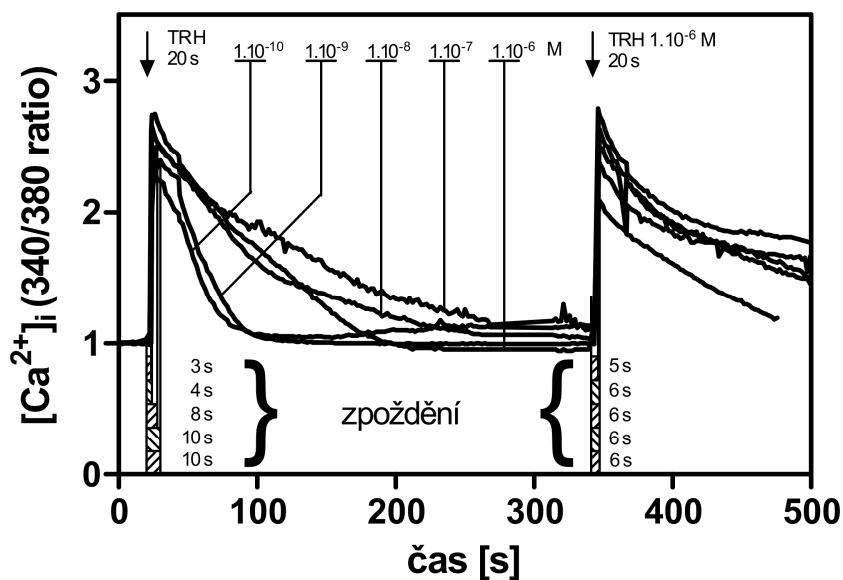
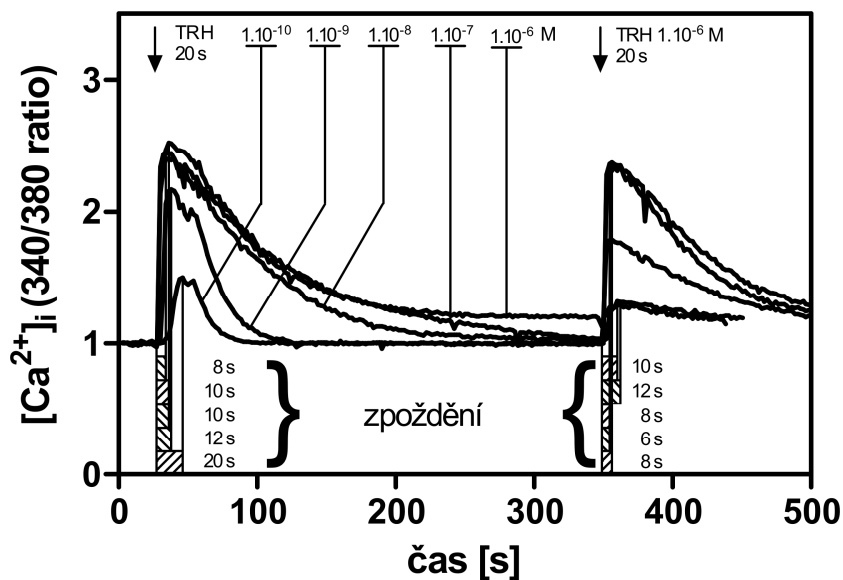
Vliv teploty a deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpověď stimulovanou TRH

Ca^{2+} odpovědi na TRH byly studovány v kontrolních a CDX ovlivněných buňkách a vlastnosti těchto odpovědí se ukázaly jako silně teplotně závislé. Obecně lze říci, že Ca^{2+} odpovědi stimulované TRH byly nižší a doba nutná k dosažení maximální odpovědi byla vyšší při nižších teplotách než při vyšších teplotách (**Obr. č. 14**).



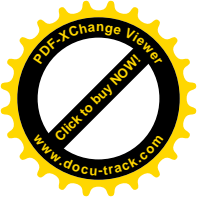
Obr. č. 12 Vliv deplece cholesterolu na Ca^{2+} odpověď vyvolanou TRH

Buňky kontrolní i buňky inkubované s $10 \mu\text{M}$ CDX po dobu 30 minut byly propláchnuty a stimulovány TRH po dobu 20s. Jak u buněk kontrolních (horní panel), tak u buněk ovlivněných CDX (spodní panel) byly monitorovány Ca^{2+} odpovědi na nízké (10^{-9} M, přerušovaná čára) a vysoké (10^{-6} M, plná čára) koncentrace hormonu. Průměrné hodnoty zpoždění jsou zobrazeny jako malé sloupce ve spodních částech grafů. Grafy představují průměry z minimálně 20 buněk měřených ve třech nezávislých experimentech (Ostasov a kol., 2007).



Obr. č. 13 Efekt zvyšujících se koncentrací TRH na Ca^{2+} odpovědi a desenzitizaci v E2 (horní panel) a E2M11 (spodní panel) buňkách.

Buňky obarvené s pomocí Fura-2AM byly nejprve inkubovány s různými koncentracemi TRH (10^{-10} – 10^{-6} M) po dobu 20s. Po odmytí první dávky bylo buňkám ponecháno 5 minut na regeneraci a poté byly inkubovány s druhou dávkou TRH o koncentraci 10^{-6} M po dobu 20s. Průměrné hodnoty zpoždění jsou zobrazeny jako malé sloupce ve spodních částech grafů. Grafy představují průměry z minimálně 15-20 buněk měřených při 25 °C (Ostasov a kol., 2008).

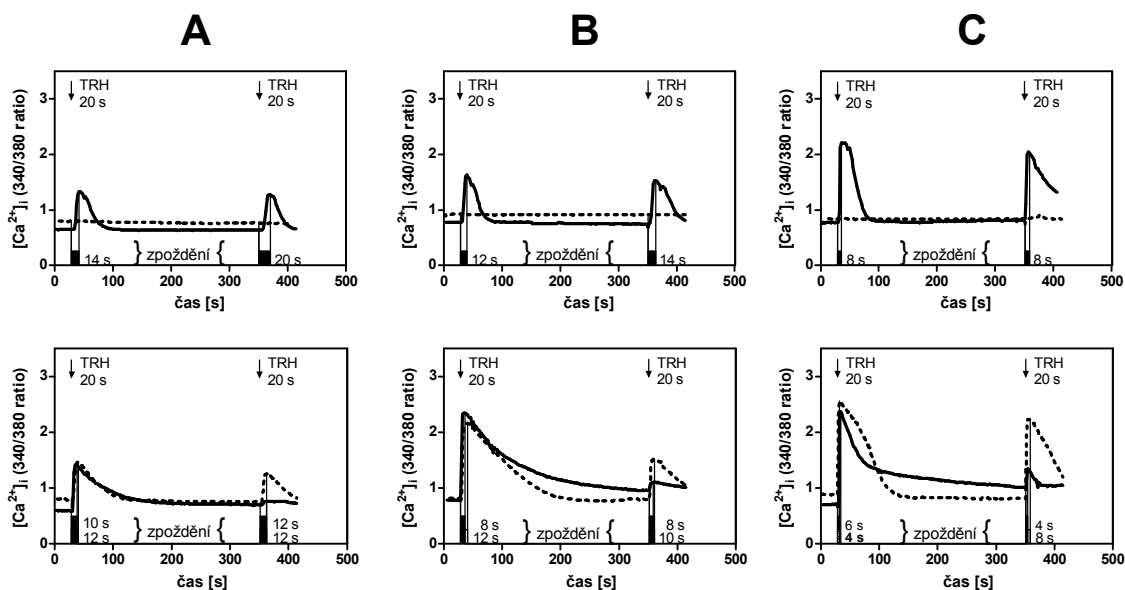


Navíc byla desenzitizace Ca^{2+} odpovědi na $1\mu\text{M}$ TRH pozorovaná u E2 buněk zřetelnější při $15\text{ }^\circ\text{C}$ než při $37\text{ }^\circ\text{C}$ a překvapivě byla odpověď E2M11 také desenzitizována při $15\text{ }^\circ\text{C}$ (**Obr. č. 15**).

Deplece cholesterolu u E2 buněk zcela zrušila Ca^{2+} odpověď na 1nM TRH, ale odpověď na $1\mu\text{M}$ TRH zůstala zachována. Neočekávaně však deplece cholesterolu umožnila u buněk E2 částečnou resenzitizaci po dávce $1\mu\text{M}$ TRH a umožnila odpověď na druhou dávku hormonu, především při vyšších teplotách (**Obr. č. 14**). Na druhou stranu, deplece cholesterolu v E2M11 buňkách snížila Ca^{2+} odpověď na TRH při $37\text{ }^\circ\text{C}$, ale nezpůsobila žádné podstatné změny v Ca^{2+} odpovědích na různé koncentrace TRH při nižších teplotách (**Obr. č. 15**). Také se ukázalo, že u buněk E2M11 docházelo k návratu hladiny intracelulárního Ca^{2+} rychleji, než u buněk E2. U E2 buněk se však tato rychlost zvýšila po depleci cholesterolu (**Obr. č. 14 a 15**).

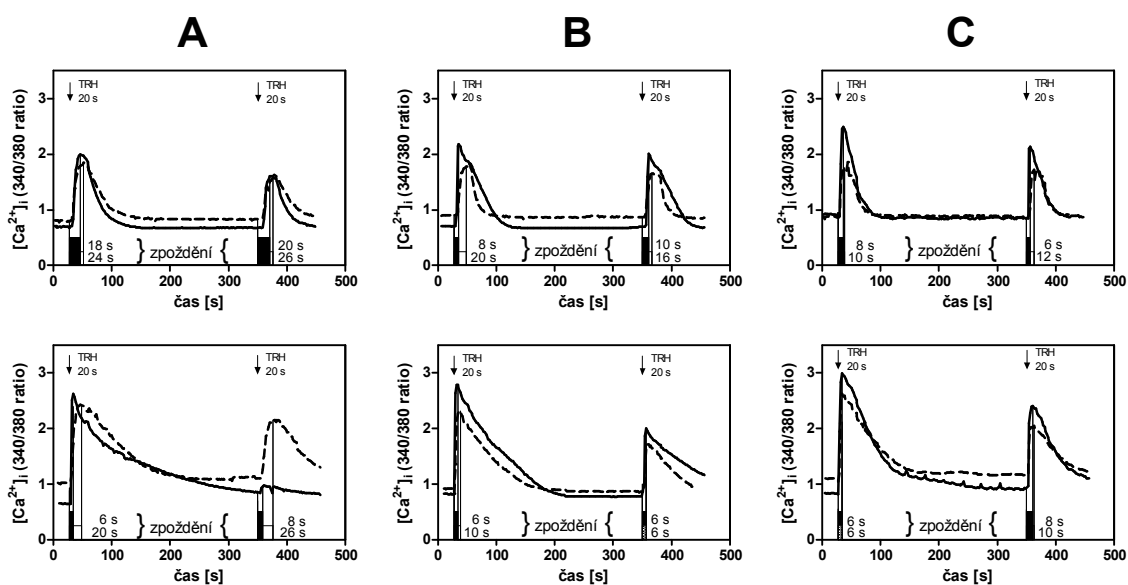
Vliv deplece cholesterolu na homologní a heterologní desenzitizaci Ca^{2+} odpovědi stimulované ANGII

Protože buňky HEK 293 přirozeně obsahují receptory pro angiotensin II, který také iniciuje signální dráhu přes proteiny G_q/G_{11} , rozhodli jsme se prozkoumat i heterologní desenzitizaci. Stimulace E2 buněk s $1\mu\text{M}$ ANGII vedla překvapivě ke kompletní homologní desenzitizaci Ca^{2+} odpovědi na další dávku tohoto hormonu, nicméně odpověď na $1\mu\text{M}$ TRH zůstala zachována. Tato desenzitizace nebyla pozorována u buněk E2M11 a u těchto buněk také zůstala plně zachována schopnost odpovídat na TRH (**Obr. č. 16**). Na druhou stranu u obou typů buněk způsobila stimulace $1\mu\text{M}$ TRH kompletní desenzitizaci Ca^{2+} odpovědi na ANGII. Také jsme chtěli prozkoumat vliv deplece cholesterolu na tyto odpovědi, nicméně se ukázalo, že inkubace buněk s CDX vede ke ztrátě odpovědi buněk obou linií na ANGII (**Obr. č. 17**), ale stejně jako v ostatních experimentech, schopnost $1\mu\text{M}$ TRH vyvolávat Ca^{2+} odpověď zůstala u obou buněčných linií zachována.



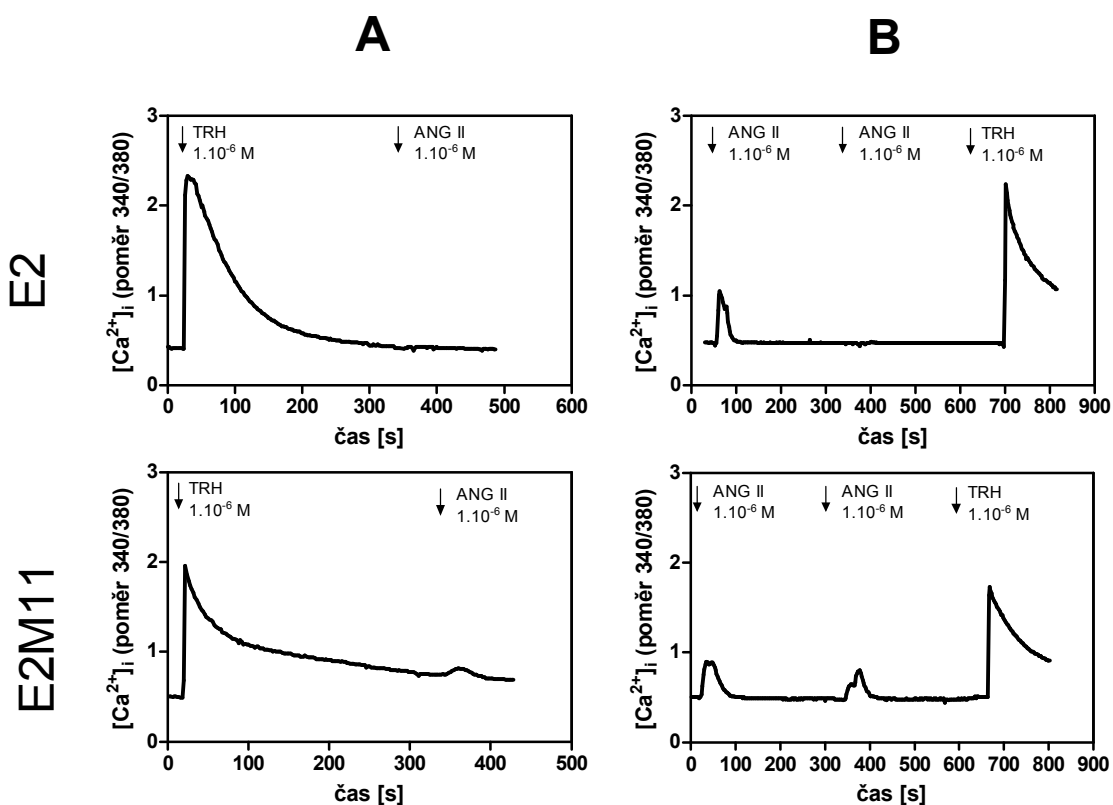
Obr. č. 14 Vliv deplece cholesterolu na homologní desenzitizaci u buněk E2

Neovlivněné buňky E2 (plná čára) a buňky inkubované 30 minut s 10 μ M CDX (přerušovaná čára) byly stimulovány dvěma dávkami TRH o koncentraci 10^{-9} M (horní panel) nebo 10^{-6} M (spodní panel), každá po dobu 20 s. Mezi oběma dávkami byl ponechán interval 5 minut. V obou případech byly měřeny odpovědi při 15 °C (A), 25 °C (B) a 37 °C (C). Průměrné hodnoty zpoždění jsou zobrazeny jako malé sloupce ve spodních částech grafů. Grafy představují průměry z 15 buněk měřených ve třech nezávislých experimentech (Ostasov a kol., 2008).



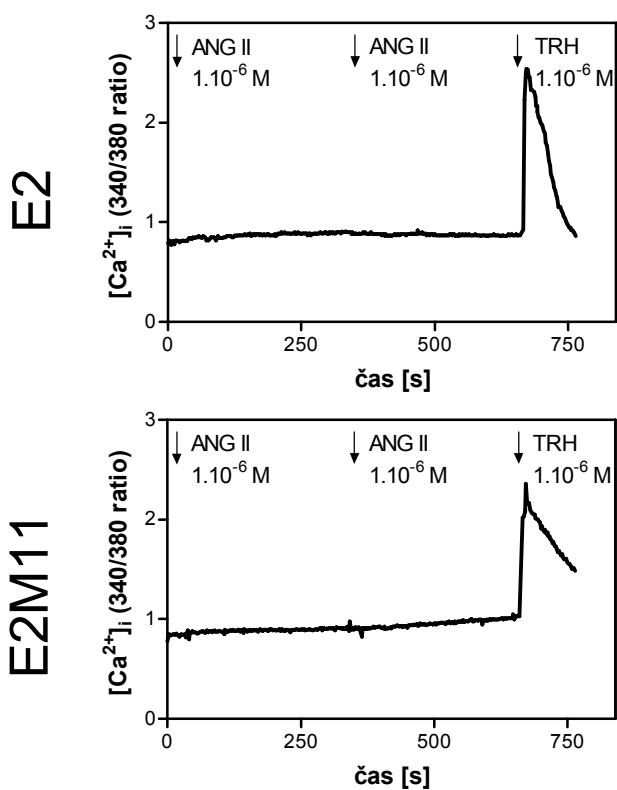
Obr. č. 15 Vliv deplece cholesterolu na homologní desenzitizaci u buněk E2M11

Neovlivněné buňky E2M11 (plná čára) a buňky inkubované 30 minut s 10 μM CDX (přerušovaná čára) byly stimulovány dvěma dávkami TRH o koncentraci 10^{-9} M (horní panel) nebo 10^{-6} M (spodní panel), každá po 20 s. Mezi oběma dávkami byl ponechán interval 5 minut. V obou případech byly měřeny odpovědi při 15 $^{\circ}\text{C}$ (A), 25 $^{\circ}\text{C}$ (B) a 37 $^{\circ}\text{C}$ (C). Průměrné hodnoty zpoždění jsou zobrazeny jako malé sloupce ve spodních částech grafů. Grafy představují průměry z 15 buněk měřených ve třech nezávislých experimentech (Ostasov a kol., 2008).



Obr. č. 16 Homologní a heterologní desenzitizace Ca²⁺ odpovědi indukovaná ANG II u buněk E2 a E2M11

(A) Buňky byly simulovány po dobu 20 s s TRH o koncentraci 10⁻⁶ M následované po 5 minutovém promytí stimulací s ANG II o téže koncentraci. (B) Buňky byly stimulovány dvěma následnými dávkami ANG II o koncentraci 10⁻⁶ M, které byly od sebe odděleny 5 minutovým promytím médiem bez hormonu. Poté následovala 20 s stimulace s TRH o koncentraci 10⁻⁶ M. Grafy představují reprezentativní záznamy pořízené při 25 °C (Ostasov a kol., 2008).



Obr. č. 17 Vliv deplece cholesterolu na Ca²⁺ odpověď indukovanou ANG II u buněk E2 a E2M11

Buňky byly nejprve inkubovány 30 minut s 10 μM CDX. Po propláchnutí pak byly inkubovány se dvěma následnými dávkami ANG II o koncentraci 10⁻⁶ M následovanými jednou dávkou TRH o téže koncentraci. Data představují průměry z minimálně 15 buněk měřených ve třech nezávislých experimentech (Ostasov a kol., 2008).



Subcelulární distribuce $G_q/G_{11}\alpha$ proteinu

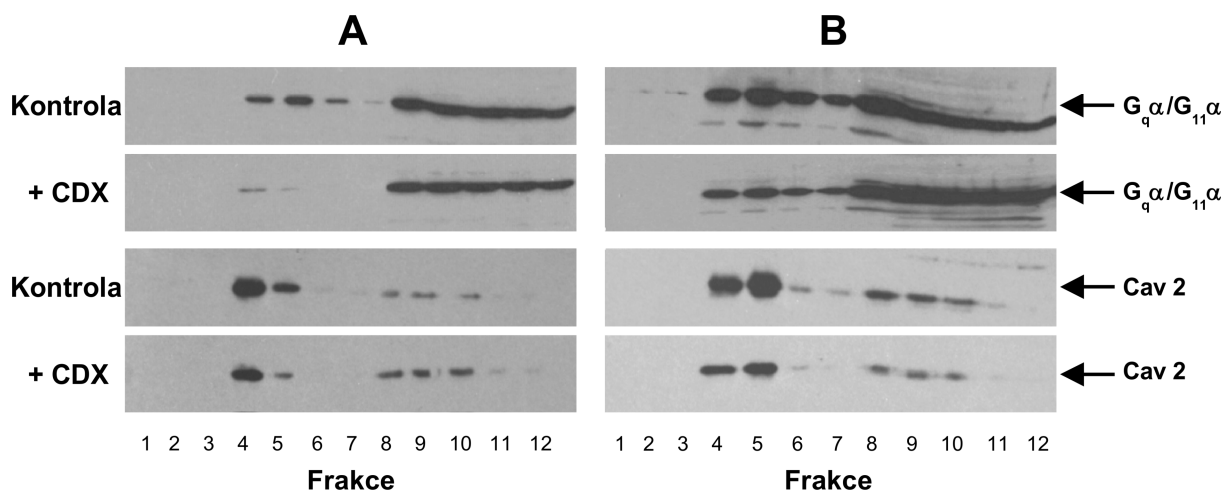
Pro získání bližšího pohledu do změn TRH-indukované signální dráhy jsme se pokusili detekovat, zda nedochází ke změnám v distribuci trimerního G proteinu vlivem deplece cholesterolu. Jak je známo z literatury, proteiny G_q/G_{11} se vyskytují v lipidických raftech nebo kaveolách, u kterých se předpokládá, že jsou deplecí cholesterolu ovlivněny. Proto jsme si kladli otázku, zda nedochází ke změnám v lokalizaci těchto proteinů. Tyto změny jsme detekovali dvěma imunohistochemickými metodami.

První metodou byla frakcionace buněk na sacharózovém gradientu a následná detekce G proteinu s pomocí elektroforézy a metody Western blot. Kromě G proteinu byl detekován i protein kaveolin. Bylo zjištěno, že zatímco v buňkách E2 bylo pouze 10 % celkového množství $G_q/G_{11}\alpha$ proteinu v buňce přítomno v membránových doménách, v buňkách E2M11 to byla více než jedna třetina (**Obr. č. 18**). Z téhož obrázku je patrné, že frakce gradientu 4–6 které jsou bohaté na DRMs, obsahují také významné množství kaveolinu 2.

Deplece cholesterolu pomocí inkubace s CDX zcela jasně vedla k destabilizaci struktury DRMs, protože bylo přítomno podstatně menší množství imunohistochemického signálu ve frakcích gradientu 4-6. Podle předpokladu bylo po depleci cholesterolu také podstatně sníženo množství $G_q/G_{11}\alpha$ v těchto frakcích.

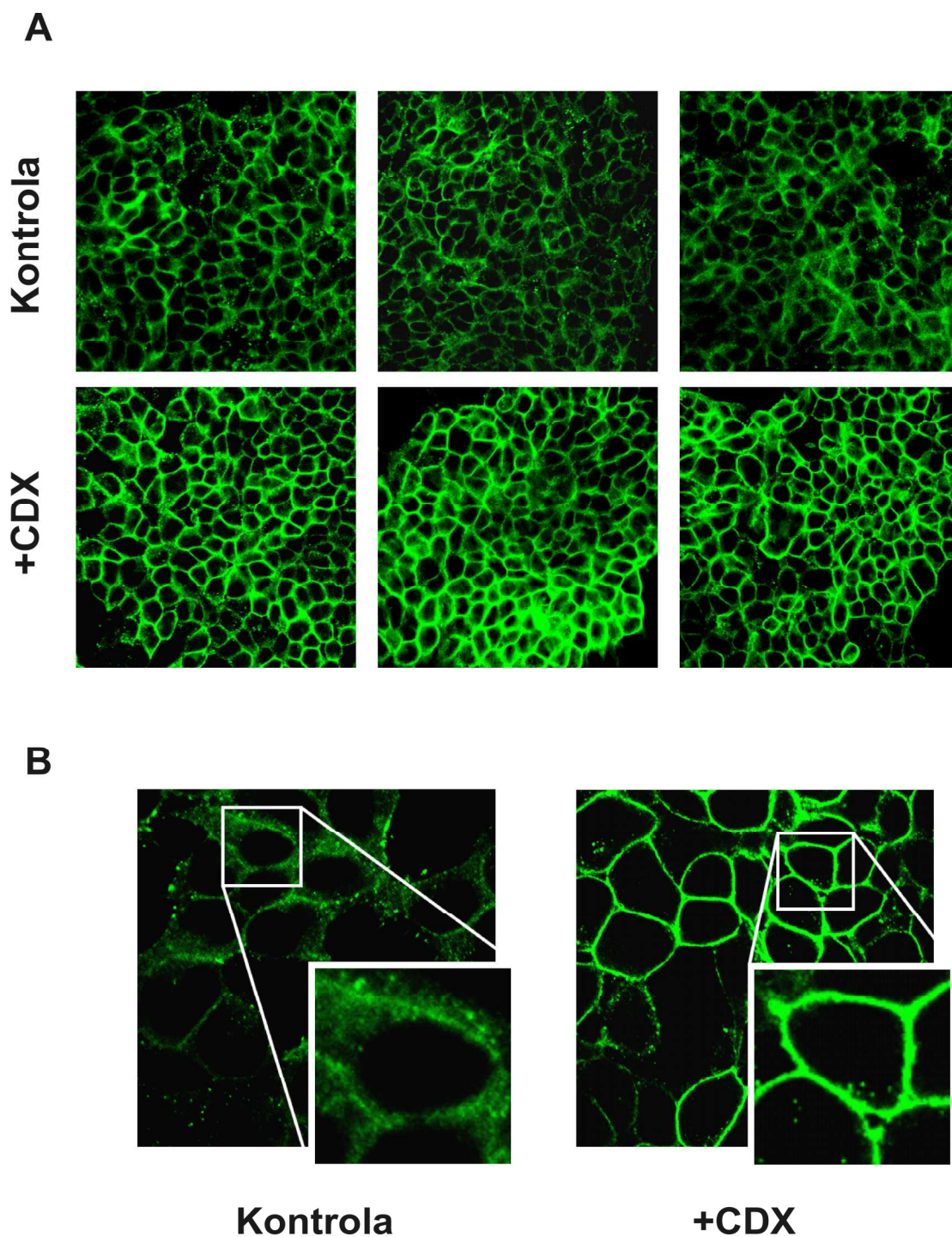
Ve druhém případě byly změny distribuce detekovány s pomocí fluorescenční mikroskopie. Buňky byly napěstovány na podložních sklíčkách a ovlivněny CDX. Poté byly zafixovány a lokalizace G proteinu byla detekována s pomocí příslušných protilátek. V obou případech byl fluorescenční signál označující G protein lokalizován výhradně na plazmatické membráně. Za kontrolních podmínek se jevila membrána jako linie s nejasnými okraji. Po inkubaci buněk s CDX se však membrána začala jevit jako ostrá linie. Kromě toho došlo i ke zvýšení intenzity fluorescence v porovnání s kontrolními buňkami (**Obr. č. 19**).

Provedli jsme také porovnání distribuce proteinu G_q/G_{11} v buňkách E2 a E2M11. Zatímco v buňkách E2 byly v membráně zřetelně patrné nehomogenity, v buňkách E2M11 již tyto nehomogenity patrné nebyly (**Obr. č. 20**). Navíc lze vidět, inkubace buněk s CDX způsobila již popisované zaostření signálu u obou linií.



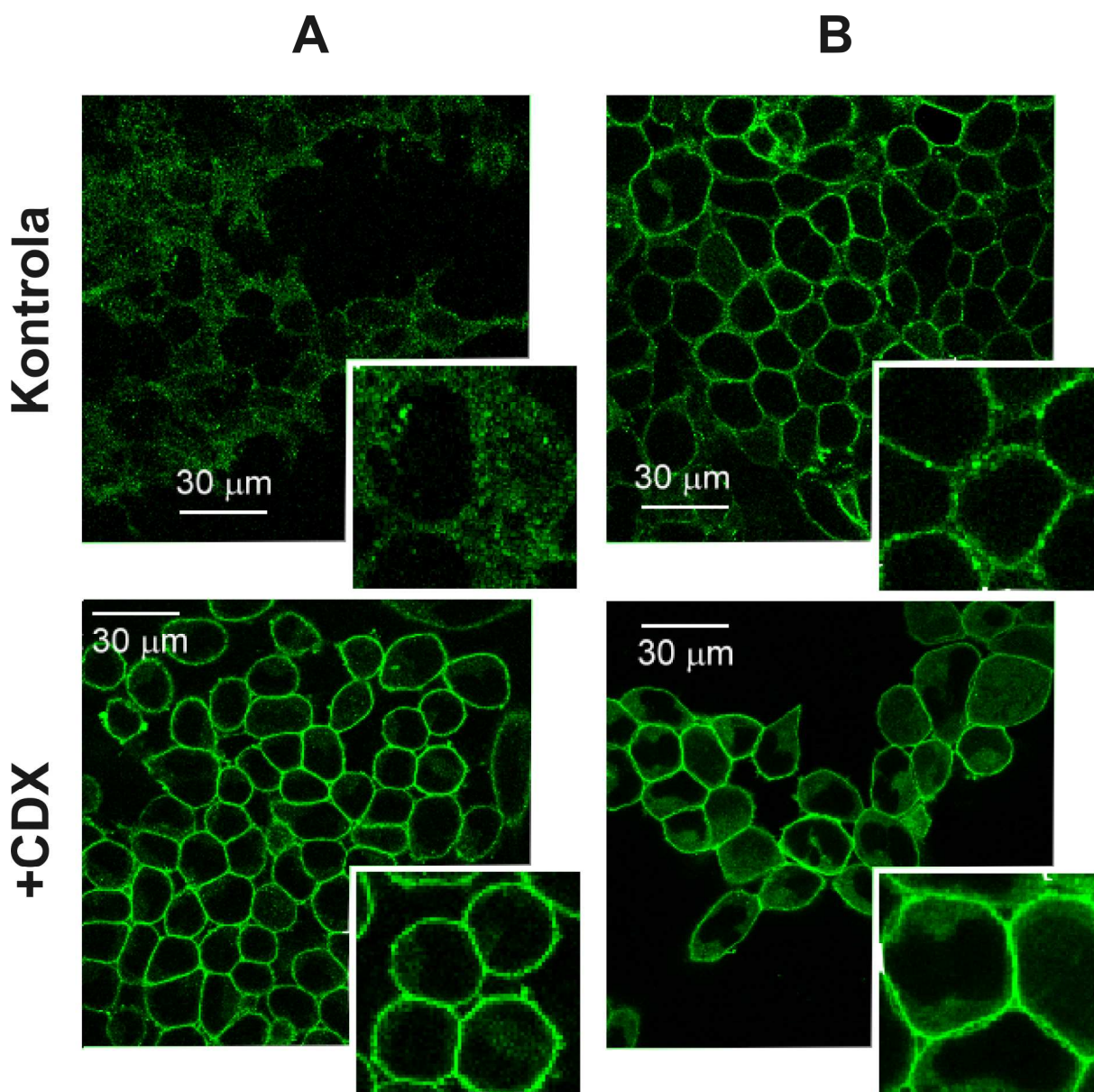
Obr. č. 18 Vliv deplece cholesterolu na distribuci $G_{q/11\alpha}$ proteinu a kaveolinu-2 ve frakcích gradientu z buněk E2 (A) a E2M11 (B).

Kontrolní buňky nebo buňky inkubované 30 minut s 10 μ M CDX byly solubilizovány v 0,5 % Triton X-100 a frakcionovány na flotačním sacharózovém gradientu. Typické bloty ukazují distribuci $G_{q/11\alpha}$ proteinu a kaveolinu 2 ve frakcích gradientu v kontrolních a CDX ovlivněných buňkách (Ostasov a kol., 2008).



Obr. č. 19 Vliv deplece cholesterolu na distribuci $G_{q/11\alpha}$ proteinu buňkách E2M11.

V kontrolních i CDX ovlivněných buňkách byl detekován $G_{q/11\alpha}$ protein metodou nepřímé imunofluorescence. Obrázky byly pořízeny s pomocí konfokálního mikroskopu s objektivem 40x (A) nebo 100x (B). Pro lepší možnosti srovnání byly části obrazů v panelu B zvětšeny (Ostasov a kol., 2007).



Obr. č. 20 Vliv deplece cholesterolu na distribuci $G_{q11}\alpha$ proteinu buňkách E2 a E2M11

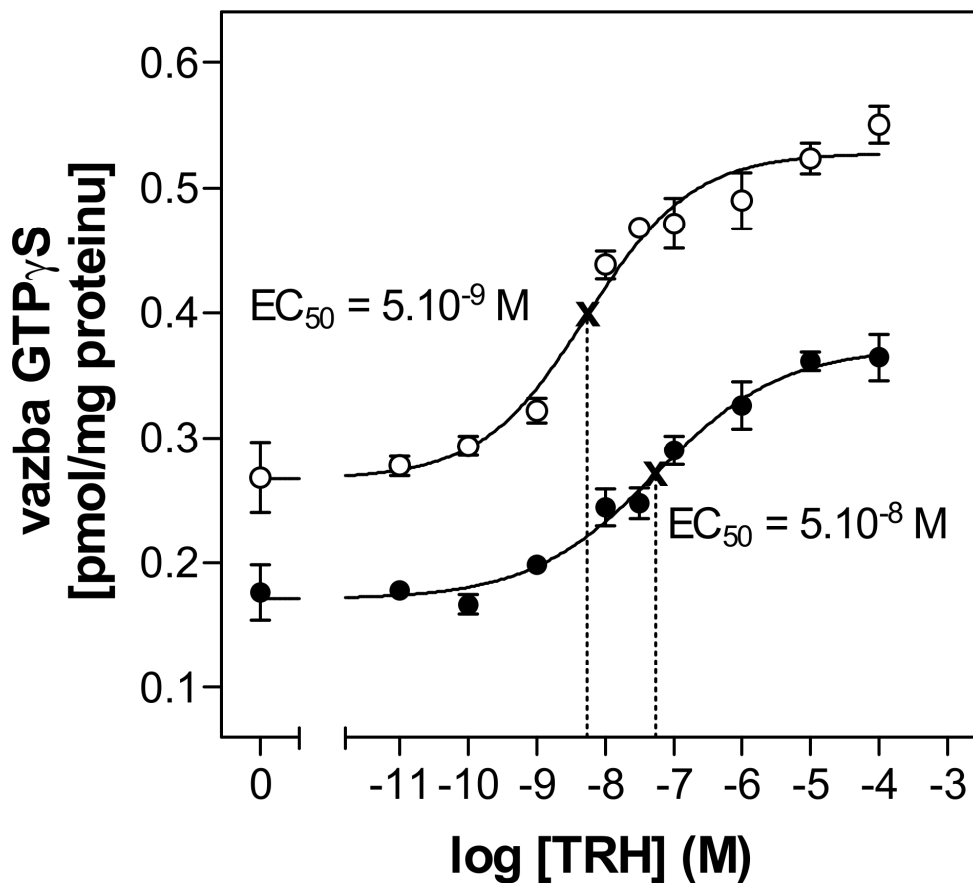
V kontrolních i CDX ovlivněných buňkách byl detekován $G_{q11}\alpha$ protein metodou nepřímé imunofluorescence. Pro srovnání jsou ukázány typické záznamy z buněk E2 (A) a E2M11 (B). Pro lepší viditelnost distribuce $G_{q11}\alpha$ proteinu v plazmatických membránách byly části obrazu zvětšeny (Ostasov a kol., 2008).



Vliv deplece cholesterolu na vazbu [³⁵S]GTP γ S

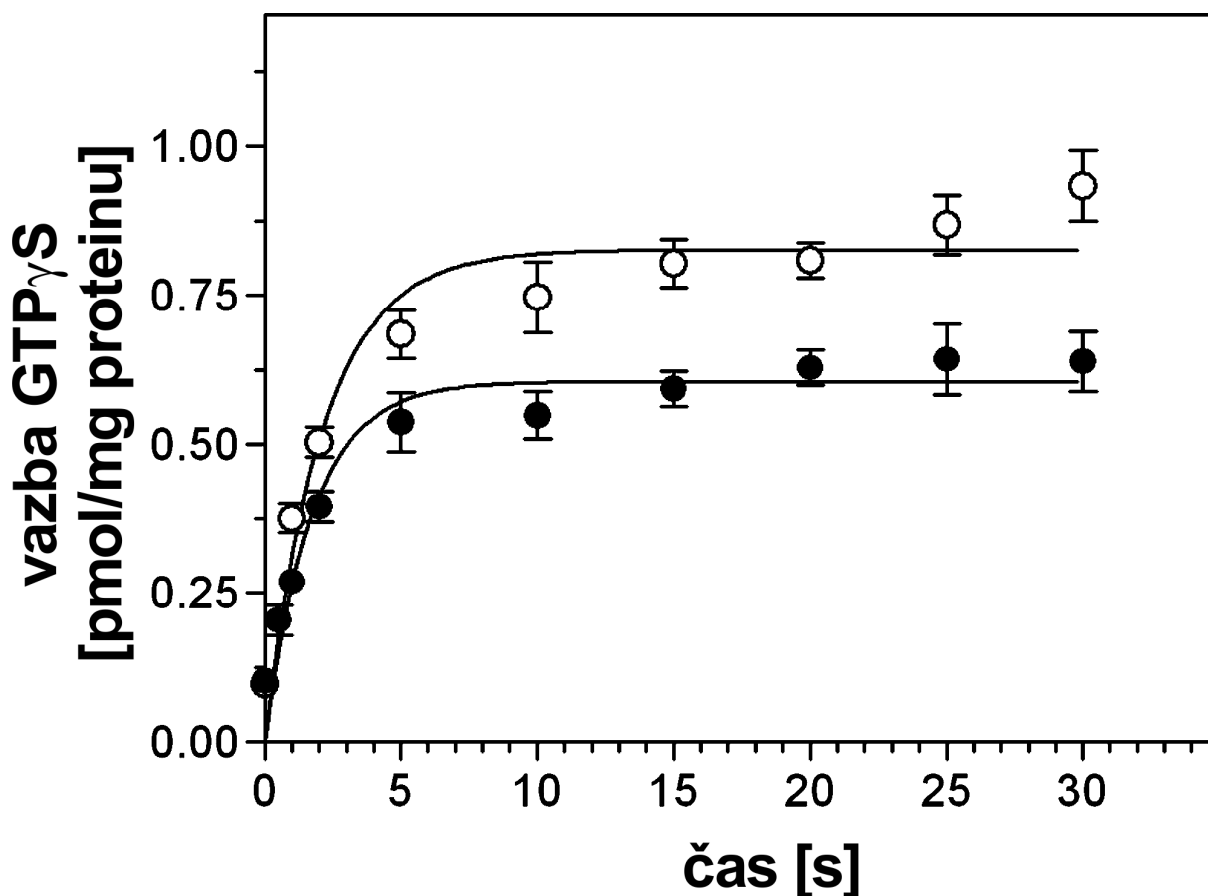
Zajímalo nás také, jaký vliv má deplece cholesterolu na funkční spřažení mezi TRH-R a G_q/G₁₁ α a také na kinetiku asociace GTP γ S s G proteinem. Tyto vlastnosti byly studovány s pomocí stanovení hormonem indukované vazby [³⁵S]GTP γ S. Pro studium funkčního spřažení byly použity koncentrace TRH v rozmezí 10⁻¹¹–10⁻⁴M. Ukázalo se, že deplece cholesterolu má silný tlumící vliv na aktivaci G_q/G₁₁ α proteinu (**Obr. č. 21**). Plazmatické membrány z buněk inkubovaných s CDX jednak vykazovaly o 36 % nižší bazální hodnotu vazby [³⁵S]GTP γ S než buňky kontrolní a rovněž maximální hodnota vazby [³⁵S]GTP γ S byla zřetelně menší než u membrán izolovaných z kontrolních buněk. Nicméně, rozdíl mezi celkovou a bazální hodnotou vazby (inkrement hormonální stimulace) byl u obou vzorků stejný. Nejvýznamnější změnou která byla v těchto studiích prokázána byl posun hodnot EC₅₀ z 5 \times 10⁻⁹M na 5 \times 10⁻⁸M TRH. Tento posun nebyl tak velký jako u živých buněk, je však zřejmé, že výsledky získané při studiu izolovaných membrán plně podpořily závěry získané při studiu změn nitrobuněčných koncentrací Ca²⁺ iontů. ***Deplece cholesterolu vede k výraznému snížení citlivosti (afinity) buněčné odpovědi na TRH.***

Dále jsme stanovili vliv deplece cholesterolu na časový průběh vazby [³⁵S]GTP γ S. Experiment byl proveden při 10⁻⁵M koncentraci TRH. Ukázalo se, že deplece cholesterolu v zásadě neovlivňuje časový průběh vazby [³⁵S]GTP γ S na buněčné membrány. Čas potřebný pro dosažení poloviny hodnoty maximální vazby [³⁵S]GTP γ S byl 2 minuty jak u membrán izolovaných z kontrolních, tak u membrán izolovaných z buněk které byly exponovány CDX. Deplece cholesterolu snižovala hodnotu maximální vazby [³⁵S]GTP γ S přibližně o 20 %. Výsledné hodnoty byly v dobrém souhlasu s hodnotami získanými při měření funkčního spřažení mezi TRH-R a G proteiny (**Obr. č. 22**).



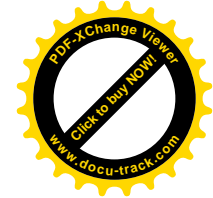
Obr. č. 21 Vliv deplece cholesterolu na rovnovážnou TRH stimulovanou vazbu [³⁵S]GTP γ S

Vazba [³⁵S]GTP γ S byla měřena ve vzorcích plazmatických membrán připravených z kontrolních (prázdné symboly) nebo CDX ovlivněných (plné symboly) buněk. Průměrné hodnoty EC₅₀ jsou vyznačeny v grafu. Data představují průměry ze tří nezávislých experimentů prováděných v triplikátech \pm standardní odchylka (Ostašov a kol., 2007).



Obr. č. 22 Vliv deplece cholesterolu na kinetiku TRH stimulované vazby [35 S]GTP γ S

Vzorky membrány byly připraveny z kontrolních (prázdné symboly) a CDX ovlivněných (plné symboly) buněk. Membrány byly inkubovány s [35 S]GTP γ S v přítomnosti 10 μ M TRH po uvedený časový interval. Data představují průměry ze tří nezávislých experimentů prováděných v duplikátech \pm standardní odchylka (Ostašov a kol., 2007).



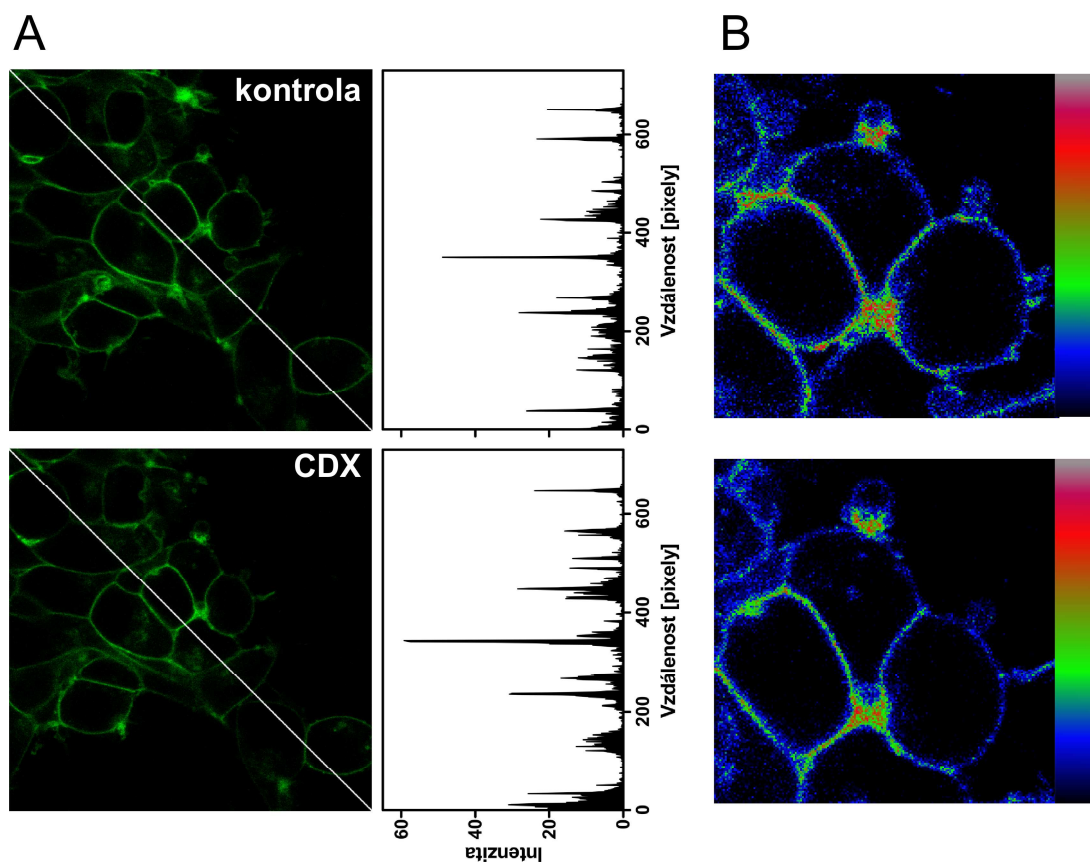
Distribuce TRH-R-eGFP detekovaná metodou CLSM

Kromě změn ve funkci a lokalizaci G proteinů jsme zjišťovali, zda jsou nějaké změny po CDX v distribuci TRH-R. Přestože měření vazby ligandu neprokázalo žádné signifikantní rozdíly, bylo možné předpokládat, že změny lokalizace TRH-R nebo jeho interakce s ostatními signálními proteiny by mohla vést ke změnám v signalizaci. Nejprve jsme studovali uspořádání receptoru na povrchu buněk s pomocí konfokální mikroskopie. Díky buňkám exprimujícím fúzní protein TRH-R-eGFP (linie VTGP), jsme mohli pozorovat distribuci TRH-R v nativních podmínkách. Živé buňky byly pozorovány konfokálním mikroskopem za kontrolních podmínek a po ovlivnění CDX. Na rozdíl od $G_q/G_{11}\alpha$, nebyly pozorovány žádné změny v distribuci receptoru na plazmatické membráně před a po inkubaci buněk s CDX (**Obr. č. 23**). V obou případech byla distribuce TRH-R-eGFP na buněčné membráně homogenní a stejně tak nebyl rozdíl v intenzitě fluorescence.

Internalizace TRH-R-eGFP

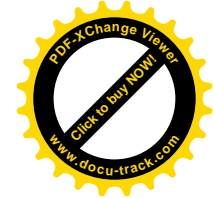
Vzhledem k tomu, že byla zjištěna snížená schopnost aktivovat signální dráhu inicializovanou TRH u buněk ovlivněných CDX, tedy snížení afinity v odpovědi vazebné reakce $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ a výlevu Ca^{2+} na hormonální stimulaci a rovněž byly prokázány rozdíly v desenzitizaci hormonální akce, zajímalo nás, zda se tyto buňky liší ve schopnosti a časovém průběhu internalizace receptoru pro TRH, která je indukována inkubací buněk s hormonem. Právě internalizace receptorů je dějem, který bezprostředně navazuje na funkční rozpražení mezi receptoru a G proteinu, které nastává při vypnutí hormonální stimulace a desenzitizaci.

Dřívější pokusy prokázaly, že již krátké působení (5 min) TRH je schopno vyvolat internalizaci receptoru. Proto jsme studovali průběh internalizace receptoru během hodinového působení TRH. Buňky byly exponovány TRH v rámci přesně definovaného časového intervalu a následně fixovány ve 4% paraformaldehydu.



Obr. č. 23 Vliv deplece cholesterolu na distribuci TRH-R-eGFP a intenzitu jeho fluorescence

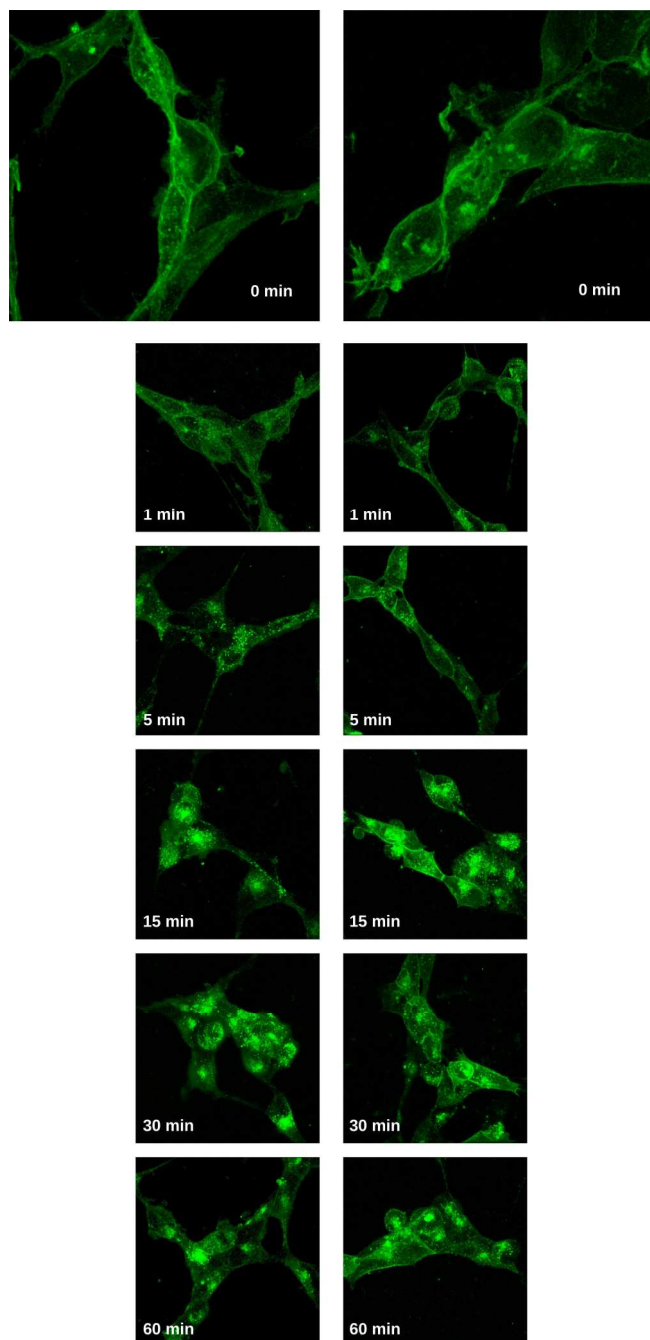
Snímky buněk před (horní panel) a po inkubaci buněk (spodní panel) s 10 μ M CDX po dobu 30 minut. Panel A ukazuje srovnání profilu intenzity fluorescence podél naznačené linie. Panel B ukazuje zvětšené výřezy z panelu A, kde je intenzita jednotlivých pixelů vyznačena barevně.



Při krátkých dobách expozice TRH (<5 min), tedy na začátku procesu internalizace, nebyly patrné žádné rozdíly mezi buňkami kontrolními a CDX ovlivněnými. Na obou typech buněk však bylo patrné shlukování receptoru. Po 15 minutách byl signál TRH-R-eGFP částečně lokalizován do cytosolu u obou typů buněk a začalo být zřejmé, že u CDX ovlivněných buněk zůstávalo více fluorescenčního signálu na povrchu buněk, než u kontrolních. Tento rozdíl byl nejpatrnější po 15 minutách působení hormonu. Po 30 minutách byl veškerý detekovaný signál lokalizovaný v cytosolu jak u kontrolních tak u CDX buněk. Deplece cholesterolu proto měla jednoznačně prokazatelný vliv i na internalizaci TRH-R (**Obr. č. 24**).

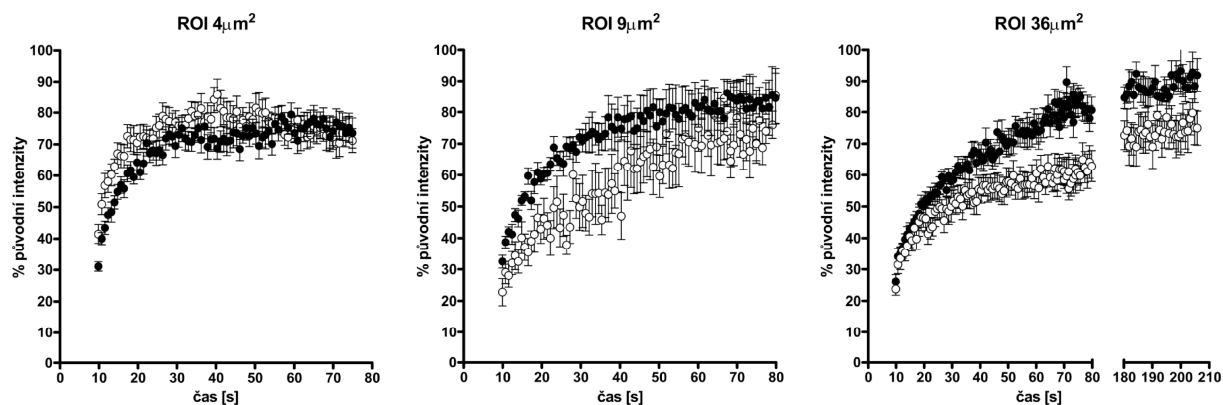
Měření metodou FRAP

Jako další metodický přístup, byla pro zjištění změn TRH signální kaskády ke kterým dochází při depleci cholesterolu v buněčné membráně, použita metoda Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Vzhledem k tomu, že zobrazování pomocí konfokální mikroskopie neodhalilo žádné změny v distribuci receptoru, pokusili jsme se detekovat možné změny v pohyblivosti resp. dynamice pohybu TRH-R v membráně s pomocí této metody. Při analýze metodou FRAP bylo provedeno celkem 30 měření na živých buňkách, kontrolních i ovlivněných CDX. Vzestup fluorescenčního signálu ve vybělené oblasti byl měřen v oblastech buněčné membrány různé velikosti [ROI], 4, 9 a 36 μm^2 (**Obr. č. 25**). Tento přístup umožnil zjistit nejen změny difúzního koeficientu (D_{app}), ale analyzovat i vlastnosti procesu difúze membránových komponent. První kvantitativní parametr byl stanoven dle rovnice (1), viz *Metody*, str. 44. Tato rovnice byla použita k určení mobilní frakce receptoru. Při hodnocení výsledků s pomocí tohoto parametru je zřejmé, že jak v případě CDXovlivněných, tak v případě kontrolních buněk, není signifikantní rozdíl ve výsledcích získaných při analýze ROI o velikostech 4 a 9 μm^2 . U největší oblasti je však tento rozdíl signifikantní (**Obr. č. 26**). *Tento výsledek ukazuje, že po depleci cholesterolu se receptor stává mobilnějším než za kontrolních podmínek.*



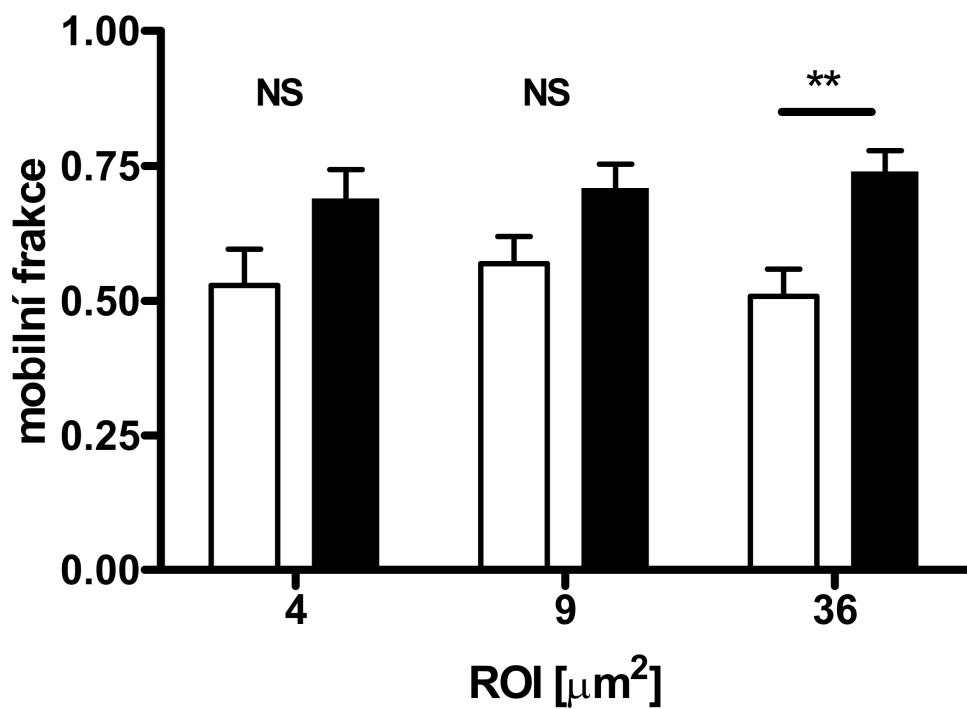
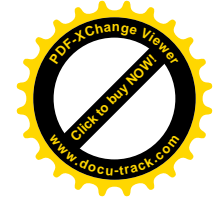
Obr. č. 24 Vliv deplece cholesterolu na internalizaci TRH-R-e-GFP indukovanou TRH

Kontrolní (levá část) nebo CDX ovlivněné (pravá část) buňky byly inkubovány s TRH o koncentraci 10^{-6} M po vyznačenou dobu. Po inkubaci byly okamžitě zafixovány 4 % paraformaldehydem a analyzovány s pomocí kofokálního mikroskopu jak je uvedeno v Metodách.



Obr. č. 25 Vliv deplece cholesterolu a velikosti ROI na obnovení fluorescence

Fluorescenční molekuly v ROI o příslušné velikosti byly zhasnuty intenzivním exitačním laserovým pulzem. Jednotlivé body v grafech pak představují detekovanou intenzitu fluorescence v příslušném ROI v daném čase od začátku experimentu. Měření bylo prováděno na kontrolních (prázdné symboly) a na CDX ovlivněných buňkách (plné symboly). Data představují průměr z 15 buněk \pm standardní chyba.



Obr. č. 26 Vliv deplece cholesterolu na mobilní frakci TRH-R-eGFP

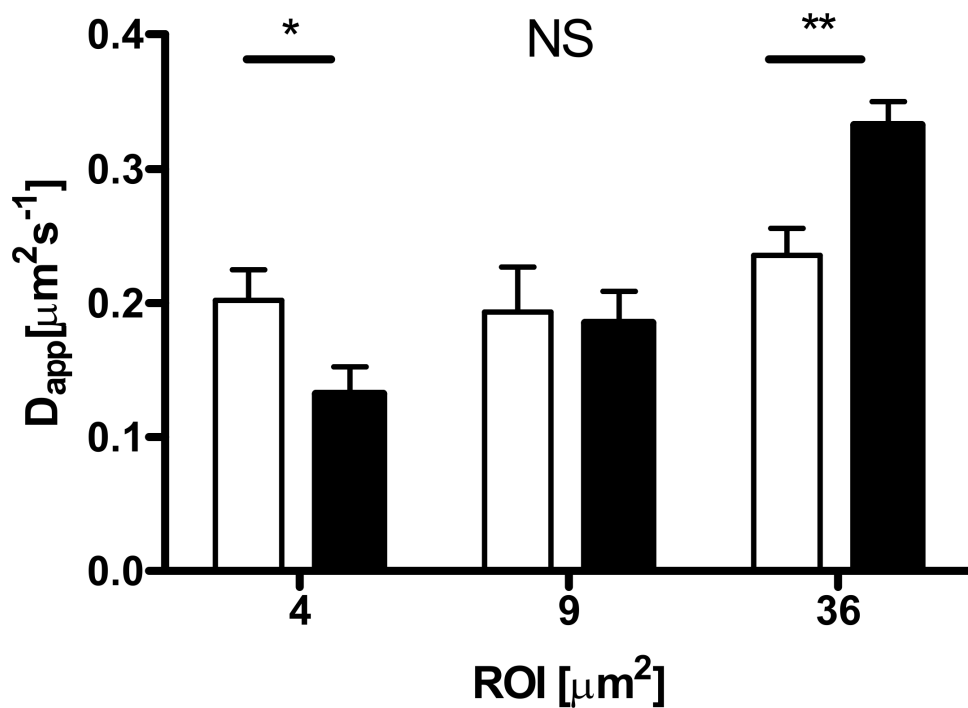
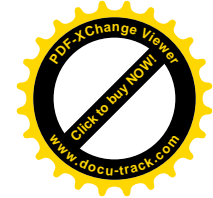
Pro každou velikost ROI byly vypočítány hodnoty mobilní frakce pro kontrolní (prázdné sloupce) a CDX ovlivněné (plné sloupce) buňky. Data představují průměr \pm standardní chyba. Rozdíly mezi jednotlivými koeficienty byly analyzovány nepárovým Studentovým t-testem.



Naměřená data byla normalizována s pomocí funkce vyjádřené rovnicí 2, viz. Metody, str. 44. Souborem normalizovaných dat byla následně proložena křivka, jejíž funkce je vyjádřena rovnicí 3, viz. Metody, str. 45. Tímto postupem jsme získali hodnoty zjevného difusního koeficientu (D_{app}). Tyto hodnoty vypovídají o rychlosti difúze TRH-R-eGFP v membráně.

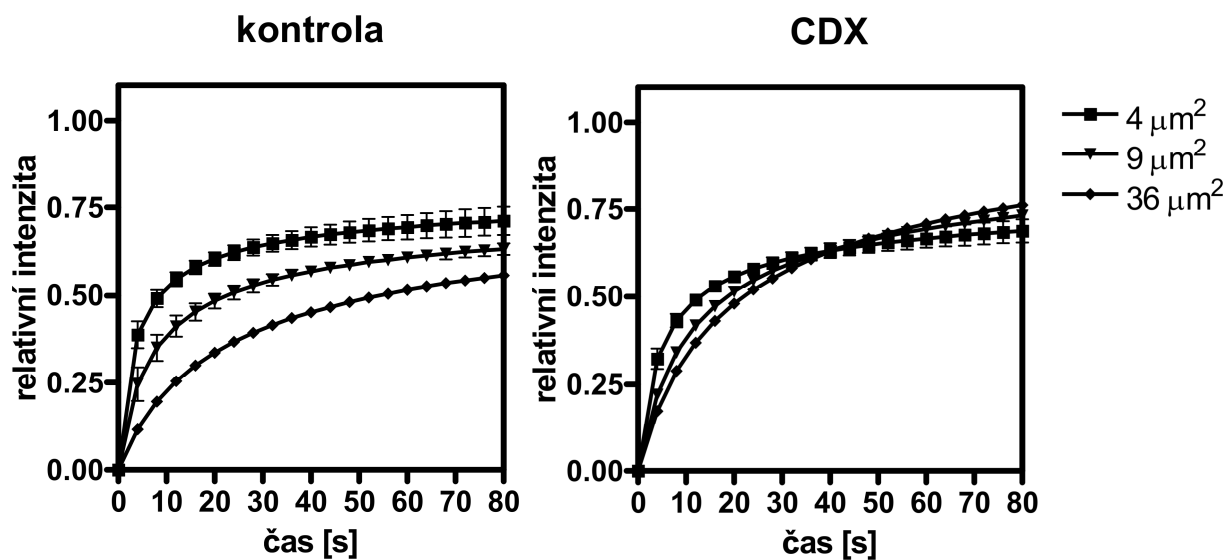
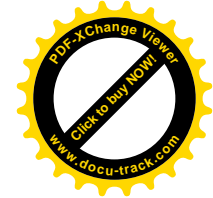
U kontrolních buněk nebyla detekována žádná signifikantní závislost D_{app} na velikosti ROI. Po depleci cholesterolu se však objevil významný rozdíl mezi výsledky získanými při různých velikostech ROI. V případě nejmenší a největší ROI byl rozdíl mezi kontrolními a CDX ovlivněnými buňkami signifikantní; v případě střední velikosti ROI tento rozdíl signifikantní nebyl (**Obr. č. 27**).

Rozdíly mezi jednotlivými ROI neodpovídají představě o průběhu difuze v rovině membrány, protože zjištěná rychlost difúze by měla být nezávislá na jejich velikosti. Z tohoto důvodu byly dále porovnány křivky, které vznikly fitováním normalizovaných dat podle funkce 3 (**Obr. č. 28**). Je zřejmé, že v případě kontrolních buněk se jednotlivé křivky liší, což odpovídá očekávání stejně jako zjištěné hodnoty D_{app} . V případě dat získaných z buněk ovlivněných CDX se však jednotlivé křivky významně neliší. Toto zjištění vysvětluje, proč se hodnoty D_{app} získané pro různé velikosti ROI liší. Při výpočtu dle rovnice 3, pokud jsou intenzity v daném čase stejné a liší se pouze velikost ROI, musíme získat různé hodnoty D_{app} . To tedy znamená, že některý z předpokladů platnosti rovnice 3 není splněn u buněk ovlivněných CDX. ***Platí proto, že deplece cholesterolu zásadním způsobem ovlivňuje pohyb TRH-R v plazmatické membráně.***



Obr. č. 27 Vliv deplece cholesterolu na zjevný difúzní koeficient TRH-R-e-GFP

Pro kontrolní (prázdné sloupce) a CDX ovlivněné buňky (plné sloupce) byly pro každou velikost ROI vypočítány zjevné difúzní koeficienty (D_{app}). Data představují průměr \pm standardní chyba. Rozdíly mezi jednotlivými koeficienty byly analyzovány nepárovým Studentovým t-testem.



Obr. č. 28 Křivky návratu fluorescence

Křivky představují nejlepší proložení experimentálních dat funkcí popsanou rovnicí (3). Data byla nejprve normalizována s pomocí funkce (2). Data představují teoretickou hodnotu intenzity fluorescence v daném čase $\pm 95\%$ interval spolehlivosti

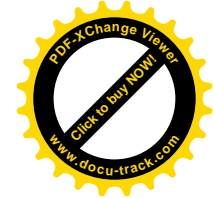


Diskuse

V této práci bylo našim hlavním cílem prozkoumat vliv deplece cholesterolu na signální dráhu iniciovanou GPCR, konkrétně receptorem pro TRH. Vycházeli jsme z předpokladu, že za normálních podmínek není membrána pouze tekutou mozaikou, ale je organizována do různých organizačních celků. Jedním ze stupňů této organizace jsou membránové domény neboli detergent rezistentní domény (DRMs), které jsou, jak vyplývá z výsledků této disertační práce (Ostašov a spol., 2008), při depleci cholesterolu poškozeny. Výsledky získané při aplikaci techniky FRAP ukazují na existenci dalších komplexů v buněčné membráně, které jsou závislé na cholesterolu, avšak nelze je izolovat s pomocí klasických detergentových postupů.

Cholesterol je důležitou součástí buněčných membrán a jedním ze základních stavebních kamenů jejich oblastí, označovaných jako detergent rezistentní membrány (DRMs). Na několika typech buněk bylo ukázáno, že za normálních podmínek existují až tři populace cholesterolu. V myších L fibroblastech tvoří molekuly cholesterolu s vysokou laterální dynamikou v membráně asi 10 % celkové populace, molekuly s pomalou dynamikou tvoří zhruba 30 % a stabilní nebo imobilní molekuly tvořily zbylých 50–60 % z celkového množství (Schroeder a kol., 1995). Pokusy s deplecí cholesterolu β -cyclodextrinem ve stejných buňkách pak ukázaly, že inkubace s 10mM β -cyclodextrinem po dobu 8 hodin vede k depleci přibližně 60 % z celkového množství cholesterolu v membráně, přičemž převážná část byla odstraněna již během první 1–2 hodin (Kilsdonk a kol., 1995). V našem případě deplece cholesterolu při stejné koncentraci β -cyclodextrinu na buňkách odvozených od linie HEK 293 způsobila ztrátu 50 % cholesterolu v plazmatických membránách již po 30 minutách inkubace a dále se již jeho množství neměnilo. Z tohoto výsledku vyplývá že již takto krátké působení β -cyclodextrinu je dostačující k dosažení maximálního účinku této látky a při delší inkubaci se již obsah cholesterolu příliš nemění.

Regulační mechanismy obsahu cholesterolu v buněčné membráně jsou přirozenou součástí metabolismu každé savčí buňky. Relativní změny v různých kompartmentech buněčných membrán však nebyly dosud podrobně zkoumány. Jak je vidět na obrázku (**Obr. č. 8**), deplece cholesterolu nemá stejný průběh v plazmatické membráně a v lehkých vezikulech. Při regulaci obsahu cholesterolu v buňce hrají jednu z nejdůležitějších rolí

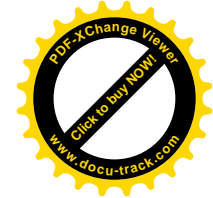


kaveoly (Pol a kol., 2005; Le Lay a kol., 2006). Kaveoly přenáší cholesterol mezi plazmatickou membránou a nitrobuněčnými kompartmenty. Právě kaveoly jsou jednou ze struktur izolovaných v rámci lehkých vezikulů. Výsledky znázorněné na **Obr. č. 8** ukazují, že při depleci cholesterolu dochází k většímu poklesu v lehkých váčcích ve srovnání s frakcí plasmatických membrán a pomalé obnově po ustanovení nové rovnováhy v obsahu cholesterolu. ***To ukazuje na schopnost buňky doplňovat cholesterol do buněčné membrány z intracelulárních zásob.***

Již dříve bylo prokázáno, že $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ proteiny, které se účastní signalizace přes TRH-R, jsou částečně lokalizovány v DRMs, přesněji právě v kaveolách, i když většina těchto molekul je součástí většinové fáze membrány (Oh a Schnitzer, 2001; Philip a Scarlata, 2004; Rudajev a kol., 2005). Experimenty této disertační práce potvrdily tyto předchozí výsledky a ukázaly, že vlivem deplece cholesterolu dojde k přesunu části $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ proteinů z DRMs do většinové fáze membrány. Stejně chování vykazoval i protein karolin 2, který je jedním z markerových proteinů kaveol (Rothberg a kol., 1992). Tato zjištění zcela odpovídají představě, že vlivem deplece cholesterolu dojde k narušení integrity DRMs (Bacia a kol., 2004).

Zajímavou skutečnost ukázalo porovnání distribuce $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ v rámci membrány mezi buňkami E2, které exprimují normální množství $G_{11}\alpha$ proteinu, a E2M11, u kterých dochází k overexpressi $G_{11}\alpha$ proteinu (Svoboda a kol., 1996). U obou typů buněk dochází k již popisované změně v distribuci $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ a kaveolinu 2 mezi DRMs a většinovou fází membrány. Za kontrolních podmínek je však u E2 buněk ve frakcích obsahujících DRMs přítomno pouze 10 % detekovaného $G_{11}\alpha$, zatímco u buněk E2M11 je to celých 35 %. Je tedy zřejmé, že koncentrace G proteinu ovlivňuje jeho lokalizaci.

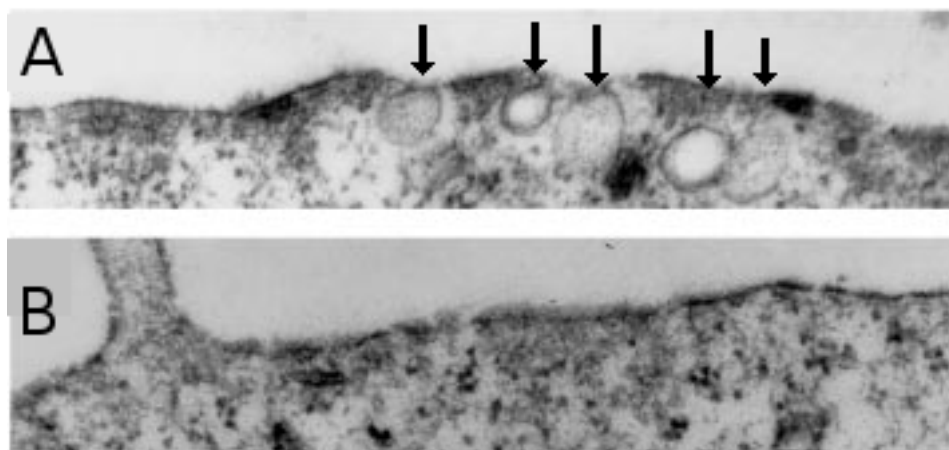
Zajímavé výsledky také přineslo stanovení distribuce $G_q\alpha$ proteinu s pomocí konfokální mikroskopie (Drmotá a spol., 1998; Ostašov a spol., 2008). K vizualizaci $G_q\alpha$ proteinu byla použita metoda nepřímé imunofluorescence. Opět byl zaznamenán rozdíl jak mezi buňkami E2 a E2M11, tak mezi buňkami kontrolními a buňkami, u kterých byla provedena deplece cholesterolu v membráně. Zatímco u buněk E2M11 se distribuce $G_q\alpha$ proteinu jevila téměř homogenní, u buněk E2 vykazovala drobné nehomogenity. Vizualně podobné nehomogenity byly zaznamenány i v případě distribuce fluorescenčních sterolů nebo například v distribuci kaveolinu, kde tyto nehomogenity dosahovaly velikosti až 2 μm (McIntosh a kol., 2003;



Zhang a kol., 2005; Sengupta a kol., 2008). Podobné nehomogenity $G\alpha$ podjednotek byly detekovány například u buněk hypofýzy nebo endoteliálních plicních buňkách (Cornea a kol., 1998; Oh a Schnitzer, 2001). Je tedy možné, že detekované nehomogenity jsou způsobené rozdělením podjednotek G proteinu mezi většinou membránu a DRMs. Rozdíly v pozorované distribuci mezi buňkami E2 a E2M11 je možné vysvětlit tak, že intenzita fluorescenčního signálu při overexpressi $G_{11}\alpha$ proteinu již dosahuje takové intenzity, že brání v rozpoznávání drobnějších struktur.

Po depleci cholesterolu došlo u buněk E2 i u E2M11 k „rozjasnění“ a „zaostření“ signálu na buněčné membráně, který představuje G protein. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je již dříve zmíněná snaha buněk během deplece cholesterolu jej doplňovat z intracelulárních zásob. Důležitou úlohu při kontrole cholesterolu hrají kaveoly, které zároveň obsahují i část populace proteinů $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ (Oh a Schnitzer, 2001; Pol a kol., 2005; Rudajev a kol., 2005; Le Lay a kol., 2006). Je proto možné, že při snaze udržet nepoškozenou strukturu membrány dochází ve větší míře než v kontrolních buňkách k fúzi kaveolínem obalených váčků s membránou. Tím dochází ke zvýšení koncentrace $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ proteinů v plazmatické membráně a tím i zesílení signálu. V buňkách NIH-3T3 bylo zaznamenáno vymizení kaveol po aplikaci methyl- β -cyclodextrinu, jak ukazuje **Obr. č. 29**. Vzhledem ke tvaru kaveol a jejich existenci i ve stavu, kdy nejsou přímou součástí membrány, pouze v její těsné blízkosti, by toto splývání vysvětlovalo i „zaostření“ signálu. Fúzí váčků a ztrátou typické lahvovité struktury kaveoly by došlo k vyhlazení membrány a tím i fluorescenčního signálu.

Bylo ukázáno, že stechiometrické poměry jednotlivých složek signální kaskády zásadně ovlivňují její funkci. V případě ANGII-R receptoru v buňkách HEK 293 vede exprese vyšší než 95 fmol/mg membránového proteinu ke ztrátě schopnosti buňky ukončit signalizaci vyvolanou vazbou ligandu a plně desenzitizovat receptor (Violin a kol., 2006). Podobné výsledky byly zjištěny i v případě TRH-R (Jones a Hinkle, 2005). Hlavní příčinou bylo porušení stechiometrických poměrů mezi receptorem a β arrestiny, které se váží na fosforylovaný receptor a účastní se tak procesu desenzitizace. V případě ANGII-R byl ještě prokázán vliv GRK2, která kromě účasti na desenzitizaci ve vysokých koncentracích zcela zabránila aktivaci G proteinu. Podle Violina a kol. (2006) šlo o důsledek kinázové aktivity tohoto proteinu, protože tento efekt chyběl u mutant receptoru nepodléhajících fosforylaci.



Obr. č. 29 Vliv methyl β -cyclodextrinu na existenci kaveol

Snímky z transmisního elektronového mikroskopu ukazují membránu buněk tvořících kaveoly (A - vyznačeny šipkami) a membránu buněk tvořících kaveoly po 90 minutové inkubaci s 5 mM methyl β -cyclodextrinem, kde již kaveoly chybí (B) (upraveno podle Le a kol., 2002).

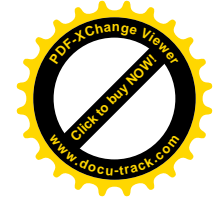


V případě těchto výsledků však není jasné, zda při mutaci potenciálních fosforylačních míst nedošlo k poškození vazebných míst pro GRK2.

V obou případech však po celou dobu snímání působil ligand na příslušné buňky. V případě pokusů uváděných v této práci byly použity relativně krátké 20s pulzy TRH. Přesto i v buňkách E2, které exprimují až 14 pmol/mg TRH-R, byl pozorován podobný efekt, kdy po aktivaci receptoru a výlevu vápenatých iontů nedošlo během sledované doby k návratu Ca^{2+} na úroveň před pulsem (Svoboda a kol., 1996; Ostasov a spol., 2007). V našem případě byl však tento efekt zrušen expresí vysokých hladin α podjednotky $G_{11\alpha}$ proteinu v buňkách E2M11.

To je však v rozporu s očekáváním založeném na výše zmíněných publikovaných výsledcích, protože v případě vysoké exprese $G_{11\alpha}$ proteinu by měl být průběh stejný. Limitujícím faktorem by totiž nebyl G protein, ale arrestin, jehož exprese se nezmění. *Je možné proto uzavřít, že v případě našich studií nejde o desenzitizaci způsobenou fosforylací receptoru a následně vazbou β arrestinu, ale hlavní úlohu hraje G protein.*

Bylo ukázáno, že molekula kaveolinu obsahuje vazebné místo pro α podjednotku G proteinu a v daných buňkách dochází k vazbě mezi aktivní $G\alpha$ podjednotkou a kaveolinem. To má za následek desenzitizaci signalizace přes $G_q/G_{11\alpha}$ podjednotku (Lisanti a kol., 1997b; Murthy a Makhlof, 2000). Na druhé straně tato interakce brání reasociaci disociovaných $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ podjednotek do neaktivní, heterotrimerní formy G proteinu a prodlužuje se tak doba po kterou jsou $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ podjednotky volně v membráně a mohou ovlivňovat/aktivovat své efekторы. Jedním z těchto efektorů jsou i fosfolipázy $C\beta_1$ a $C\beta_2$, které mohou být těmito podjednotkami aktivovány. Vazba $G\alpha$ podjednotky na kaveolin tak vede k prodloužení doby aktivace $PLC\beta$ a tím i následnému prodloužení doby Ca^{2+} odpovědi (Sengupta a kol., 2008). Po depleci cholesterolu dojde ke zkrácení doby odpovědi u E2 buněk, protože dojde k rozrušení struktury signálního komplexu a tudíž ke snížení vazby $G\alpha$ proteinu na kaveolin. Díky tomu je usnadněna i reasociace komplexu a tak i zrychlení ukončení signalizace. Můžeme tudíž předpokládat, že při vysoké expresi G proteinu dochází ke zvýšení neindukované vazby $G\alpha$ podjednotky na kaveolin. Pro tuto možnost jasně hovoří vyšší poměr $G\alpha$ podjednotky v DRMů u buněk E2M11. Takto dojde k nasycení vazebných míst kaveolinu pro $G\alpha$ podjednotku a při aktivaci pak již nedochází k její vazbě a prodloužení doby aktivace $PLC\beta$ a prodloužení Ca^{2+} odpovědi. Tak dojde k relativně rychlému ukončení Ca^{2+} signalizace, jak je pozorováno u buněk E2M11.



Jedním z mechanismů přispívajících k desenzitizaci je sekvestrace G_α a $G\beta\gamma$ podjednotek G proteinu v buněčné membráně. V případě $G_q/G_{11}\alpha$ proteinů byly popsány dva hlavní faktory, které k této sekvestraci přispívají. Jedná se o:

- již zmíněnou vazbu kaveolinu,
- interakci s receptorovou kinázou GRK2, která je typická pro GPCR signalizující přes $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ (Tesmer a kol., 2005).

Kromě fosforylace receptoru má GRK2 i schopnost fyzicky oddělit receptor od G proteinu. Jedná se o molekulu která obsahuje vazebná místa jak pro receptor, tak pro G_α a $G\beta\gamma$ podjednotky. Všechna tato vazebná místa mohou být obsazena v GRK2 zároveň (Lodowski a kol., 2003b). Zapojení těchto kináz do procesu desenzitizace by proto také mohlo vysvětlit její absenci v případě E2M11 buněk. Pokud by hlavní příčinou desenzitizace byla vazba G proteinu na GRK2, byla by účinnost signálního přenosu závislá na poměru v množství těchto molekul, podobně jako v případě arrestinů. Vysoká exprese GRK2 může vést k úplnému vymizení hormonální odpovědi, kterou je možné obnovit zvýšením exprese G_q/G_{11} (Violin a kol., 2006). Pokud je tedy exprese GRK nezávislá na expresi příslušných G proteinů, může dojít (při vysoké expresi G proteinu) k situaci, kdy je většina molekul GRK obsazena příslušným G proteinem, ale přesto se v buňce stále ještě nachází dostatek G proteinu k vyvolání odpovědi. V tomto případě by proto bylo možné připsat absenci desenzitizace u buněk E2M11 (opět) vysokým hladinám G proteinu v buněčné membráně.

Tomu napovídala i měření vlivu exprese G proteinu na desenzitizaci ANGII-R. Opět docházelo k desenzitizaci u E2 buněk, ale u E2M11 nikoliv. Toto zjištění naznačuje, že proteinový aparát zajišťující desenzitizaci, je organizován do stabilnějších struktur spojených se specifickým receptorem. *Desenzitizace v případě TRH-R a ANGII-R je tedy zřejmě způsobena aktivací proteinkináz GRK2.* Samotná GRK2 v buňkách je navíc ovlivňována kaveolinem (Carman a kol., 1999a).

Jak již bylo řečeno výše, cholesterol je důležitou součástí DRMs a jeho deplece ovlivňuje Ca^{2+} signalizaci. Při zjišťování vlivu deplece cholesterolu na homologní desenzitizaci se ukázalo, že zatímco u buněk E2M11 se žádné změny neprojeví, u buněk E2 dojde k vymizení desenzitizace. Ke správnému průběhu desenzitizace je tedy zapotřebí neporušená buněčná membrána. Při deplecí cholesterolu dojde k destrukci komplexu obsahujícího za normálních podmínek jak receptor, tak proteiny odpovědné za jeho



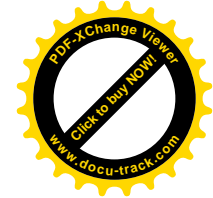
deaktivaci. Po destrukci komplexu dojde k disociaci těchto proteinů od receptoru a desenzitizace probíhá s podstatně nižší účinností. To opět naznačuje, že by receptor mohl být součástí organizovaných komplexů nebo membránových domén, které nejsou izolovatelné standardními postupy s použitím detergentů.

Při depleci cholesterolu dále dojde ke snížení efektivity přenosu signálu a tím ke snížení velikosti odpovědi a nižší aktivaci příslušné signální dráhy. U ANGI-R vede toto snížení až k úplné eliminaci měřitelné odpovědi, stejně jako u TRH receptorů při nízkých koncentracích ligandu. Při vysokých koncentracích ligandu se ale velikost a rychlost odpovědi na aktivaci receptoru liší jen velmi málo nebo vůbec ne. Jednou z příčin by mohl být fakt, že cyclodextrin narušuje fosforylaci $G_q\alpha$ a jak bylo prokázáno, fosforylovaný $G_q\alpha$ lépe aktivuje PLC a také je snáze aktivovatelný (Umemori et al., 1997; Novotny et al., 2005).

Svou roli může hrát i vazebné místo pro cholesterol, které se nachází na TRH-R. Vazba dvou molekul cholesterolu do tohoto vazebného místa způsobuje stabilizaci konformace receptoru (Hanson a kol., 2008). Při depleci cholesterolu z membrány je tak možné, že cholesterol v tomto vazebném místě chybí a receptor má vyšší pravděpodobnost zaujmout některou z nefunkčních konformací. To by mohlo vysvětlit nízkou bazální aktivitu G proteinů v porovnání s kontrolními buňkami. Snadný přechod mezi konformacemi by také mohl přispívat ke ztrátě desenzitizace, protože receptor s nesprávnou konformací nemusí být rozpoznán příslušnými proteiny.

Další oblastí, kterou jsme se zabývali, byl vliv deplece cholesterolu přímo na vazbu $GTP\gamma S$ a tedy na aktivaci G proteinu. Nejprve jsme se zaměřili na dynamiku této aktivace. Ve vzorcích z kontrolních i CDX ovlivněných buněk byla rychlost asociace přibližně stejná. Jediným signifikantním rozdílem byla maximální dosažená hodnota $GTP\gamma S$ vazby. Ta byla u kontrolních buněk vyšší a rozdíl odpovídal hodnotám zjištěným při měření závislosti vazby $GTP\gamma S$ na koncentraci TRH (viz. dále).

V další části jsme se zaměřili na vliv deplece cholesterolu na výlev Ca^{2+} z endoplazmatického retikula indukovaný vazbou ligandu na TRH-R. Naše výsledky ukazují, že deplece cholesterolu vede ke zvýšení EC_{50} . Na druhou stranu je maximální dosažitelná odpověď shodná jak u kontrolních buněk, tak u buněk s depletovaným cholesterolem. Poté jsme změřili průběh křivek „dávka-odpověď“ (dose-response curves) v závislosti na koncentraci TRH. V tomto případě se ukázal rozdíl jak v EC_{50} , tak i v bazálních hodnotách vazby $GTP\gamma S$ a také v hodnotách vazby při maximální stimulaci agonistou. V případě



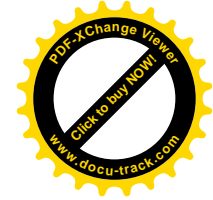
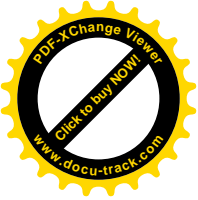
stanovení vazby GTP γ S jsou změny v hodnotách EC₅₀ menší než při měření Ca²⁺ odpovědi. To může být způsobeno faktem, že Ca²⁺ měření probíhala na intaktních buňkách, kdežto vazba GTP γ S byla měřena na izolovaných plazmatických membránách.

Dále jsme se zaměřili na samotný TRH receptor. Tento receptor byl spojen s fluorescenční molekulou GFP, díky které nebylo nutné pro jeho vizualizaci používat protilátky a receptor mohl být pozorován i v živých buňkách (Drmotá a spol., 1999). Pokusili jsme se detekovat změny v intenzitě fluorescence TRH-eGFP po depleci cholesterolu. Podrobná analýza fluorescence receptoru na povrchu buněk ukázala, že intenzita fluorescence se vlivem deplece cholesterolu nemění. Stejně tak se deplece cholesterolu neprojevila na morfologii buněk. Také distribuce TRH-R na povrchu buněk se ukázala jako homogenní jak u kontrolních, tak u depletovaných buněk. To vše by odpovídalo představě, že receptor není součástí membránových domén, ale je rovnoměrně rozptýlen v membráně, jak bylo zjištěno pomocí extrakce s detergenty (Rudajev a kol., 2005).

Jak již bylo prokázáno, asociace TRH receptoru a jeho následná internalizace je závislá na jeho fosforylaci na serinových a threoninových zbytcích. Tato fosforylace je podporována dimerizací a dimerizace zase aktivací receptoru (Song a kol., 2007; Hinkle a Jones, 2008).

Následující experimenty s internalizací receptoru ukázaly, že deplece cholesterolu ovlivňuje jeho internalizaci. Rychlost internalizace totiž byla u buněk s depletovaným cholesterolem nižší než u buněk kontrolních. Tento fakt může mít několik příčin, které se vzájemně nevylučují. Deplece cholesterolu může ovlivnit tvorbu klatrinem obalených váčků, které slouží k internalizaci receptoru. Dalším možným vysvětlením je opět narušení interakce GRK2 a receptoru. GRK2 totiž kromě jiného obsahuje i doménu pro vazbu na klatrinové řetězce. Tím může pomáhat při internalizaci aktivovaného receptoru. Při porušení této interakce se pak tato funkce ztrácí a k internalizaci dochází pomaleji.

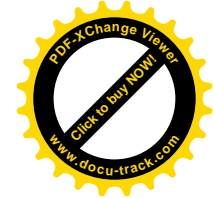
První dvě části disertační práce pojednávaly především o funkčních změnách v efektivitě přenosu TRH-indukovaného signálu do buňky. Poslední, třetí část disertační práce byla zaměřena na studium vlivu deplece cholesterolu na dynamiku pohybu TRH receptoru v buněčné membráně s pomocí techniky FRAP. Výsledky ukazují, že při depleci cholesterolu dochází ke změnám rychlosti difúze TRH-R v membráně. Tento výsledek odpovídá závěrům experimentu provedeného při studiu serotoninového receptoru 1A (5HT-1A) (Pucadyil a Chattopadhyay, 2007). Tento receptor stejně jako TRH-R patří do skupiny GPCR a oba aktivují signální kaskádu především přes G_q a G₁₁ proteiny. Zásadní rozdíl mezi těmito



receptory je však v jejich lokalizaci v plazmatické membráně; zatímco TRH-R se nepodařilo izolovat jako součást membránových domén (Rudajev a kol., 2005), u 5HT-1A bylo nalezeno až 33 % receptoru v membránových doménách (Kalipatnapu a Chattopadhyay, 2005; Renner a kol., 2007). Přesto se při depleci cholesterolu chovají oba typy receptorů velmi podobně. V obou případech dochází k tomu, že při zvětšujícím se průměru vybělené oblasti zdánlivě stoupá rychlost difúze receptoru. Pucadyil a kol. (2007) předpokládají, že při depleci cholesterolu dojde k oddělení nasycených a nenasycených lipidů do různých fází a vzniku makrodomén obsahujících především nasycené mastné kyseliny, protože bylo prokázáno, že DRMs obsahují především lipidy s nasycenými mastnými kyselinami. Rozdílné výsledky u ROI různého průměru pak tito autoři vysvětlují tím, že při dostatečně malé velikosti ROI snímáme pohyb molekuly v takto vzniklé doméně, kde je relativně pomalejší, a se zvětšujícím se průměrem dané ROI sledujeme molekulu už i v oblastech, kde se nacházejí nenasycené mastné kyseliny a její pohyb je rychlejší (Pucadyil a Chattopadhyay, 2007).

Výsledky například ukazují, že při zachování poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin v umělých membránách ve formě obřích lipozómů (giant unilamellar vesicles) se při nízkých koncentracích cholesterolu tvoří dvě fáze (fáze nasycených mastných kyselin a fáze nenasycených mastných kyselin), které zanikají se zvyšující se koncentrací cholesterolu (Feigenson a Buboltz, 2001).

Nicméně je možná i jiná interpretace výsledků než ta, kterou uvádějí Pucadyil a kol. (2007) a které lépe odpovídají i naše naměřená data. Předcházející vysvětlení totiž naráží na několik problémů. Prvním problémem je, že TRH-R vykazuje podobné známky chování jako 5HT-1A, když by se podle této teorie měl chovat právě opačně. Druhou námitkou je, že v nativních membránách deplece cholesterolu vede k alespoň částečné destrukci membránových domén (Schwille a kol., 2004). A nakonec při dostatečném množství měření, pokud nebude zatíženo metodickou chybou, by došlo k vyrušení tohoto jevu. Dle našeho názoru je možné získané výsledky popsat jako změnu z „diffusion-coupled“ na „diffusion-uncoupled“ model buněčné membrány, který formulovali Sprague a McNally (2005) – po depleci cholesterolu difunduje TRH-R v membráně tak rychle, že krokem určujícím rychlost návratu není difúze, která je z pohledu našeho měření téměř okamžitá, ale výměna receptoru na vazebných místech v membráně. Tomu odpovídají i výsledky výpočtů D_{app} , které se liší pro různé velikosti ROI, i fakt, že křivky návratu po depleci cholesterolu jsou si velmi podobné bez ohledu na velikost ROI. Vzorec, který jsme použili pro výpočet difúzního



koeficientu, je založen na předpokladu, že snímaný návrat je limitován především rychlostí difúze molekuly a počítá s průměrem ROI (Ellenberg a kol., 1997). To je pravděpodobně důvod, proč se D_{app} u různých velikostí ROI v cholesterol depletovaných buňkách liší. Tomu napovídá i výpočet mobilní frakce kerý ukazuje, že po depleci cholesterolu dojde ke zvýšení mobilní fáze TRH-R-eGFP a proto je možné se domnívat, že se zvýší mobilita tohoto receptoru v membráně. Bylo již dříve dokázáno, že difúze v plazmatické membráně je omezena i pro tak malé molekuly, jakými jsou lipidy (Kusumi a kol., 2004). Jednou z předpokládaných možností, která omezuje volný pohyb v membráně, je cytoskelet asociovaný s membránou. Proteinů kotvících cytoskelet do membrány je známa celá řada. Zdá se, že cytoskelet rozděluje membránu do malých oblastí (Sako a Kusumi, 1994). Tyto oblasti se liší v závislosti na typu buněčné linie (Kusumi a kol., 2005). Navíc se velikosti a vlastnosti těchto oblastí změní po depleci cholesterolu. Tyto oblasti se alespoň zdánlivě zmenší a přechod molekuly z jedné do druhé se znatelně sníží a tím dojde ke zpomalení difúze molekuly v membráně (Kusumi a kol., 2004). Jedním z možných mechanismů, které by mohly stát za tímto jevem, je kaveolinem indukovaná formace stresových vláken. Deplece cholesterolu totiž způsobuje aktivaci c-Src kináz a fosforylaci kaveolinu. Tyto dva děje pak indukují tvorbu již zmíněných stresových vláken (Qi a kol., 2009).

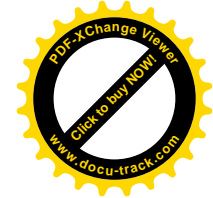
V souhrnu tyto výsledky ukazují na to, že TRH-R (a 5HT-1A) je za kontrolních podmínek součástí membránových domén nebo komplexů, které jsou závislé na cholesterolu. Nicméně není možné je vůbec nebo jen velmi obtížně extrahovat standardními metodami přípravy membránových domén. Vzhledem k výsledkům dřívějších pokusů, kdy byl sledován vliv deplece cholesterolu na signalizaci, lze předpokládat, že součástí tohoto komplexu jsou proteiny související přímo se signální drahou TRH-R jako G_q/G_{11} protein. Deplecí cholesterolu dojde k rozpadu tohoto komplexu, což umožňuje proteinu rychlejší difúzi membránou a také vysvětluje sníženou schopnost vyvolávat odpověď.

Je otázkou, co představují výše zmíněná imobilní vazebná místa pro TRH-R. Část receptorů může být součástí domén, ve kterých, díky vysoké koncentraci filament a cholesterolu, probíhá difúze velmi pomalu, respektive je výrazně pomalejší než difúze receptoru ve většinové fázi membrány po depleci cholesterolu. Pokud je rychlost difúze v membráně dostatečná, nebude tato hrát v našich záznamech velkou úlohu. Ale o to více se projeví pomalá difúze v doménách. Pokud budeme předpokládat, že každá ROI obsahuje více



těchto domén, získáme při každém měření průměrnou rychlost difúze v doménách. Za takových okolností získáme křivky, které nejvíce připomínají měřená data, nicméně ve skutečnosti jde o stanovení difúze v ROI stejné velikosti. Velikost vybělené oblasti tak nebude určující pro konečný výsledek, ale rozhodující faktorem bude průměrná velikost těchto domén, která bude vždy stejná. Vzhledem k tomu, že poměr oblasti kterou zaujímají domény k většinové fázi buněčné membrány, je vždy stejný bude i mobilní frakce **vždy stejná bez ohledu na velikost ROI**.

Poslední možností v našich úvahách při interpretaci výsledků získaných metodou FRAP je, že TRH-R není součástí specializovaných domén, ale nachází se v rozpustné, nicméně cholesterolem bohaté periférii DRMs. Vzhledem k předchozím výsledkům by se mohlo jednat přímo o kaveoly. Tuto možnost by bylo zajímavé dále prozkoumat.



Závěr

První část této práce se zabývala vlivem deplece cholesterolu na funkční spřažení mezi TRH receptorem a trimerními G proteiny třídy G_q/G_{11} v intaktních buňkách a v izolovaných preparátech membránových domén. Výsledky této části je možné shrnout do následujících bodů:

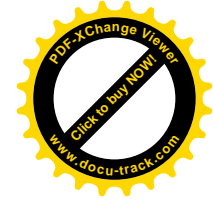
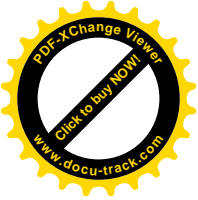
- snížení obsahu cholesterolu v buněčných membránách neovlivňuje vazbu radioaktivně značeného analoga TRH na receptor a afinita vazby (K_d) ani maximální vazebná kapacita (B_{max}) radioligandu se signifikantně nezměnily;
- deplece cholesterolu narušila schopnost TRH vyvolávat Ca^{2+} odpověď a došlo ke snížení afinity hormonální odpovědi, které se projevilo jako zvýšení hodnoty EC_{50} z $1 \times 10^{-12} M$ (kontrolní buňky) na $3 \times 10^{-10} M$ (buňky exponované CDX);
- podobný vliv jsme zaznamenali i v případě stanovení vazby $[^{35}S]GTP\gamma S$ v izolovaných buněčných membránách, kdy došlo k posunu hodnot EC_{50} z $5 \times 10^{-9} M$ na $5 \times 10^{-8} M$;
- maximální přírůstek hormonální odpovědi se nezměnil ani při stanovení změn v koncentraci nitrobuněčných Ca^{2+} iontů (intaktní buňky), ani v případě stanovení počtu vysoko-afinních míst pro $[^{35}S]GTP\gamma S$ (isolované membrány).

Deplece cholesterolu způsobila narušení funkčního spřažení mezi TRH receptorem a trimerními G proteiny třídy G_q/G_{11} ve smyslu snížení účinnosti hormonální odpovědi, aniž by došlo k podstatnému ovlivnění vlastností samotného receptoru. Přednostně došlo ke snížení afinity (citlivosti), zatímco maximální velikost odpovědi se nezměnila.

Výsledky získané v druhé části této disertační práci ukazují, že úlohu G proteinů při desensitizaci hormonální akce lze prokázat nejen v případě dlouhodobé stimulace hormony, jak ukázaly dřívější výsledky naší laboratoře, ale i v případě rychlých změn měřených jako změny v koncentraci nitrobuněčného kalcia indukované TRH nebo ANGIIL.

Při studiu buněk E2 exprimujících TRH-R a endogenní G proteiny $G_q\alpha$ a $G_{11}\alpha$ bylo prokázáno, že:

- stimulace TRH-R vede k blokádě účinku angiotensinu II - dochází k heterologní desensitizaci,



- stimulace angiotensinem II navodí homologní desenzitizaci, pro následné podání angiotensinu II,
- stimulace TRH-R navodí homologní desenzitizaci pro následné podání TRH.
- vznik desenzitizace je potlačen deplecí cholesterolu z buněčných membrán

Při studiu buněk E2M11 exprimujících TRH-R, endogenní G proteiny $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ a velké množství exogenního $G_{11\alpha}$ bylo prokázáno že:

- vysoký obsah $G_{11\alpha}$ v těchto buňkách zabrání vzniku homologní desenzitizace, vyvolané angiotensinem II, t.j. angiotensin II není schopen blokovat sebe sama při následném podání,
- vysoký obsah $G_{11\alpha}$ v těchto buňkách zabrání vzniku homologní desenzitizace pro TRH.

Intaktní struktura buněčné membrány je nezbytná nejen pro iniciaci signální dráhy zprostředkované aktivací G proteinů třídy G_q/G_{11} (viz. výše), ale i pro její ukončení mechanismem desenzitizace. Snížení obsahu cholesterolu v membráně ovlivňuje průběh homologní i heterologní desenzitizace.

G proteiny jsou schopny zajišťovat nejen přenos signálu do nitra buňky, ale jsou i cílem mechanismů zajišťujících desenzitizaci hormonální akce.

Práce také prokazuje existenci heterologní desenzitizace při vzájemném účinku angiotensinu II a TRH.

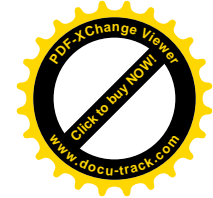
Třetí část této práce se zabývala studiem hormonem indukované internalizace TRH receptoru a dynamiky jeho pohybu na povrchu buněk, které stabilně exprimují fluoreskující formu tohoto receptoru (VTGP). Pohyb receptoru v rovině buněčné membrány byl sledován metodou FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Dosažené výsledky je možné shrnout do následujících bodů:

- snížení obsahu cholesterolu v buněčné membráně zpomaluje internalizaci receptoru, která je indukována dlouhodobou stimulací TRH-R s TRH;
- pohyb receptoru v buněčné membráně kontrolních buněk je možné popsat jako difusi v rovině membrány;
- v membráně se nacházejí dvě populace receptorů - první populace je vysoce mobilní, zatímco druhá se projevuje jako stacionární.



– mezi těmito dvěma populacemi receptorů dochází k výměně, která je za kontrolních podmínek rychlejší než rychlost vstupu receptorů z okolních, nevybělených částí membrány do vybělené oblasti. Za podmínek deplece cholesterolu je však rychlost vstupu receptorů z okolních, nevybělených částí membrány do vybělené oblasti vyšší než výměna mezi dvěma populacemi receptorů.

Optimální formou interpretace těchto výsledků je obraz takového uspořádání buněčné membrány, ve kterém je TRH-R za normálních podmínek součástí supra-molekulárního komplexu nebo membránové domény, která je závislá na obsahu cholesterolu. Jedná se o strukturu, která existuje pouze v intaktních, živých buňkách.





Seznam použité literatury

- Allen, J. A., Yu, J. Z., Dave, R. H., Bhatnagar, A., Roth, B. L. and Rasenick, M. M. (2009). Caveolin-1 and lipid microdomains regulate Gs trafficking and attenuate Gs/adenylyl cyclase signaling. *Molecular Pharmacology* 76:1082-1093.
- Amadio, M., Battaini, F. and Pascale, A. (2006). The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacological Research* 54:317-325.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry* 67:199-225.
- Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D. and Pugh, E. N. (2002). G proteins and phototransduction. *Annual Review of Physiology* 64:153-187.
- Azzi, M., Piñeyro, G., Pontier, S., Parent, S., Ansanay, H. and Bouvier, M. (2001). Allosteric effects of G protein overexpression on the binding of β -adrenergic ligands with distinct inverse efficacies. *Molecular Pharmacology* 60:999-1007.
- Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N. and Schwille, P. (2004). Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophysical Journal* 87:1034-1043.
- Baker, A., Saulière, A., Dumas, F., Millot, C., Mazères, S., Lopez, A. and Salomé, L. (2007). Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors. *European Biophysics Journal*: EBJ 36:849-860.
- Baldwin, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *The EMBO Journal* 12:1693-1703.
- Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T. and Caron, M. G. (1997). Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact β 2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Molecular Pharmacology* 51:177-184.
- Benovic, J. L., Day, P. W., Tesmer, J. J., Sterne-Marr, R., Freeman, L. C. and Wedegaertner, P. B. (2004). Characterization of the GRK2 binding site of $G_{\alpha q}$. *The Journal of Biological Chemistry* 279:53643-53652.
- Bhatnagar, A., Sheffler, D. J., Kroeze, W. K., Compton-Toth, B. and Roth, B. L. (2004). Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected $G_{\alpha q}$ -coupled protein receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 279:34614-34623.
- Blumer, J. B., Smrcka, A. V. and Lanier, S. M. (2007). Mechanistic pathways and Biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacology and Therapeutics* 113:488-506.
- Bockaert, J. and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* 18:1723-1729.
- Bourne, H. R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 9:134-142.

- Bourova, L., Kostrnova, A., Hejnova, L., Moravcova, Z., Moon, H.E., Novotny, J., Milligan, G. and Svoboda, P. (2003). Delta-Opioid receptors exhibit high efficiency when activating trimeric G proteins in membrane domains. *Journal of Neurochemistry* 85:34-49.
- Brown, D. A. and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *The Journal of Biological Chemistry* 275:17221-17224.
- Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544.
- Brown, M. F. (2010). The Role of Lipids in GPCR Structure and Function. In *G Protein-Coupled Receptors*. Breckenridge, Colorado, USA: Keystone Symposia on Molecular Biology.
- Carman, C. V., Lisanti, M. P. and Benovic, J. L. (1999a). Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *The Journal of Biological Chemistry* 274:8858-8864.
- Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman, A. G., Benovic, J. L. and Kozasa, T. (1999b). Selective regulation of $G\alpha(q/11)$ by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *The Journal of Biological Chemistry* 274:34483-34492.
- Cassel, D. and Pfeuffer, T. (1978). Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:2669-2673.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. a., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. and Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318:1258-1265.
- Chichili, G. R. and Rodgers, W. (2007). Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 282:36682-36691.
- Chichili, G. R. and Rodgers, W. (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS 66:2319-2328.
- Chini, B. and Parenti, M. (2003). G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *Journal of Molecular Endocrinology* 32:325-338.
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research* 38:2264-2272.
- Chun, M., Liyanage, U. K., Lisanti, M. P. and Lodish, H. F. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11728-11732.
- Clapham, D. E. and Neer, E. J. (1993). New roles for G-protein β γ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365:403-406.
- Conklin, B. R. and Bourne, H. R. (1993). Structural elements of G α subunits that interact with G β γ , receptors, and effectors. *Cell* 73:631-641.

- Cooper, D. M. (2005). Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochemical Society Transactions* 33:1319-1322.
- Cornea, A., Janovick, J. A., Stanislaus, D. and Conn, P. M. (1998). Redistribution of G(q/11) α in the pituitary gonadotrope in response to a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Endocrinology* 139:397-402.
- DeBlasi A., O'Reilly K. and Motulsky H. J. (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends in Pharmacological Sciences* 10, 227-229.
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2007). B-arrestins and cell signaling. *Annual Review of Physiology* 69:483-510.
- Dietrich, C., Bagatolli, L. a., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K. and Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal* 80:1417-1428.
- Dietzen, D. J., Hastings, W. R. and Lublin, D. M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *The Journal of Biological Chemistry* 270:6838-42.
- Dinger, M. C., Bader, J. E., Kobor, A. D., Kretschmar, A. K. and Beck-Sickinger, A. G. (2003). Homodimerization of neuropeptide y receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278:10562-10571.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Strader, C. D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321:75-79.
- Drastichová, Z., Bourová, L., Lisý, V., Hejnová, L., Rudajev, V., Stöhr, J., Durchánková, D., Ostasov, P., Teisinger, J., Soukup, T., Novotný, J. and Svoboda, P. (2008). Subcellular redistribution of trimeric G-proteins--potential mechanism of desensitization of hormone response: internalization, solubilization, down-regulation. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 57 Suppl 3:S1-S10.
- Drmotá, T., Gould, G. W. and Milligan, G. (1998a). 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.
- Drmotá, T., Novotný, J., Kim, G. D., Eidne, K. a., Milligan, G. and Svoboda, P. (1998b). Agonist-induced internalization of the G protein G11 α and thyrotropin-releasing hormone receptors proceed on different time scales. *The Journal of Biological Chemistry* 273:21699-21707.
- Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J. and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *The Journal of Cell Biology* 138:1193-1206.

- 
- 
- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current opinion in structural Biology* 11:114-119.
- Epanand, R. M. (2004). Do proteins facilitate the formation of cholesterol-rich domains? *Biochimica Et Biophysica Acta* 1666:227-238.
- Epanand, R. M., Sayer, B. G. and Epanand, R. F. (2005). Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *Journal of Molecular Biology* 345:339-350.
- Fargin, A., Raymond, J. R., Lohse, M. J., Kobilka, B. K., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1988). The genomic clone G-21 which resembles a β -adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 335:358-60.
- Feigenson, G. W. and Buboltz, J. T. (2001). Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophysical Journal* 80:2775-2788.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews* 53:1-24.
- Ferguson, S. S. (2007). Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends in Pharmacological Sciences* 28:173-179.
- Fernandez, I., Ying, Y., Albanesi, J. and Anderson, R. G. (2002). Mechanism of caveolin filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11193-11198.
- Fielding, C. J. and Fielding, P. E. (2000). Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529:210-222.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. and Palczewski, K. (2004). The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Letters* 564:281-288.
- Frank, M., Thümer, L., Lohse, M. J. and Bünemann, M. (2005). G Protein activation without subunit dissociation depends on a G α (i)-specific region. *The Journal of Biological Chemistry* 280:24584-24590.
- Fredriksson, R. and Schiöth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular Pharmacology* 67:1414-1425.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. and 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.
- Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A. (2002). Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *The Journal of Cell Biology* 157:1071-1081.
- Fukami, K. (2002). Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *Journal of Biochemistry* 131:293-299.
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M.P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106:403-411.

- Ganguly, S., Pucadyil, T. J. and Chattopadhyay, A. (2008). Actin cytoskeleton-dependent dynamics of the human serotonin_{1A} receptor correlates with receptor signaling. *Biophysical Journal* 95:451-463.
- Garzón, J., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P. and Rodríguez-Muñoz, M. (2005). Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of μ -opioid receptors in the CNS. *Psychopharmacology* 180:1-11.
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry* 56:615-649.
- Gimpl, G. and Gehrig-Burger, K. (2007). Cholesterol reporter molecules. *Bioscience Reports* 27:335-358.
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X. Y., Löhr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T. and Helms, J. B. (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell* 12:1819-1833.
- Gumbleton, M., Hollins, A. J., Omid, Y., Campbell, L. and Taylor, G. (2003). Targeting caveolae for vesicular drug transport. *Journal of Controlled Release* 87:139-151.
- Hague, C., Bernstein, L. S., Ramineni, S., Chen, Z., Minneman, K. P. and Hepler, J. R. (2005). Selective inhibition of α 1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. *The Journal of Biological Chemistry* 280:27289-27295.
- Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V., Chien, E. Y., Velasquez, J., Kuhn, P. and Stevens, R. C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human β 2-adrenergic receptor. *Structure (London, England: 1993)* 16:897-905.
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *The FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4:2881-2889.
- Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Lai, N. C., Niesman, I. R., Farquhar, M. G. and Insel, P. A. (2005). G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 280:31036-31044.
- Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Murray, F., Swaney, J. S., Niesman, I. R., Farquhar, M. G. and Insel, P. a. (2006). Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *The Journal of Biological Chemistry* 281:26391-26399.
- Hegener, O., Prenner, L., Runkel, F., Baader, S. L., Kappler, J. and Häberlein, H. (2004). Dynamics of β 2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* 43:6190-6199.
- Hepler, J. R. and Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 17:383-387.
- Hern, J. A., Baig, A. H., Mashanov, G. I., Birdsall, B., Corrie, J.E., Lazareno, S., Molloy, J. E. and Birdsall, N. J. (2010). Single Molecule Imaging of GPCR Monomers and Dimers in

- Living Cells. In *G Protein-Coupled Receptors*. Breckenridge, Colorado, USA: Keystone Symposia on Molecular Biology.
- Hildebrandt, J. D. (1997). Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochemical Pharmacology* 54:325-39.
- Hinkle, P. M. and Jones, B. W. (2008). Arrestin binds to different phosphorylated regions of the thyrotropin-releasing hormone receptor with distinct functional consequences. *Molecular Pharmacology* 74:195-202.
- Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E. and Vriend, G. (2003). GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Research* 31:294-297.
- Hurley, J. H. (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *The Journal of Biological Chemistry* 274:7599-7602.
- Innamorati, G., Le Gouill, C., Balamotis, M. and Birnbaumer, M. (2001). The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 276:13096-13103.
- Insel, P. a., Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Bunday, R. a. and Swaney, J. S. (2005). Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochemical Society Transactions* 33:1131-1134.
- Jala, V. R., Shao, W. and Haribabu, B. (2005). Phosphorylation-independent β -arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 280:4880-4887.
- Jiang, M. and Bajpayee, N. S. (2009). Molecular mechanisms of go signaling. *Neuro-Signals* 17:23-41.
- Jones, B. W. and Hinkle, P. M. (2005). B-arrestin mediates desensitization and internalization but does not affect dephosphorylation of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 280:38346-38354.
- Kalipatnapu, S. and Chattopadhyay, A. (2005). Membrane organization of the human serotonin(1A) receptor monitored by detergent insolubility using GFP fluorescence. *Molecular Membrane Biology* 22:539-547.
- Karnovsky, M. J., Kleinfeld, a. M., Hoover, R. L. and Klausner, R. D. (1982). The concept of lipid domains in membranes. *The Journal of Cell Biology* 94:1-6.
- Katragadda, M., Maciejewski, M. W. and Yeagle, P. L. (2004). Structural studies of the putative helix 8 in the human beta(2) adrenergic receptor: an NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663:74-81.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P. J., Bischoff, S., Mickel, S. J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W. and Bettler, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Toyama, R., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., Nakafuku, M., Obara, T., Takagi, T. and Hernandez, R. (1988). Structures of the genes coding for G-

- protein α subunits from mammalian and yeast cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 53 Pt 1:209-220.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *The Journal of Biological Chemistry* 270:17250-17256.
- Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, K. and Lefkowitz, R. J. (2009). Independent β -arrestin2 and Gq/protein kinase Czeta pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 284:11953-11962.
- Kjoller, L. and Hall, a. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Experimental Cell research* 253:166-179.
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768:794-807.
- Kolakowski, L. F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels* 2:1-7.
- Konvicka, K., Campagne, F. and Weinstein, H.(2000). Iterative construction of residue-based diagrams of proteins: the RbDe web service. *Protein Engineering* 13:395-396.
- Kroeger, K. M., Hanyaloglu, a. C., Seeber, R. M., Miles, L. E. and Eidne, K. a. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry* 276:12736-12743.
- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. and Lefkowitz, R. J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of β 2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *The Journal of Biological Chemistry* 272:5-8.
- Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R. S., Kondo, J. and Fujiwara, T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 34:351-378.
- Ladha, S., Mackie, A. R., Harvey, L. J., Clark, D. C., Lea, E. J., Brullemans, M. and Duclouhier, H. (1996). Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophysical Journal* 71:1364-1373.
- Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M. R., Le Lièvre, X., Thiele, C., Ferré, P., Parton, R. G., Kurzchalia, T., Simons, K. and Dugail, I. (2006). Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7:549-561.
- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y. and 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.

- Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J. E., Hansen, S. H., Nishimoto, I. and Lisanti, M. P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *The Journal of Biological Chemistry* 270:15693-15701.
- Lisanti, M. P., Chun, M., Liyanage, U. K. and Lodish, H. F. (1994a). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11728-11732.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, a., Tu, Y. H., Cook, R. F. and Sargiacomo, M. (1994b). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *The Journal of Cell Biology* 126:111-126.
- Lisanti, M. P., Couet, J. and Sargiacomo, M. (1997a). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *The Journal of Biological Chemistry* 272:30429-30438.
- Lisanti, M. P., Okamoto, T., Couet, J., Li, S. and Ikezu, T. (1997b). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 272:6525-6533.
- Liu, A. P. and Fletcher, D. a. (2006). Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophysical Journal* 91:4064-4070.
- Liu, Y., Casey, L. and Pike, L. J. (1998). Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in low density membrane domains in the absence of caveolin. *Biochemical Biophysical Research Communication* 45:684-690.
- Lodowski, D. T., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J. and Tesmer, J. J. (2003). Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G $\beta\gamma$. *Science* 300:1256-1262.
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of Biological Chemistry* 267:8558-64.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* 248:1547-1550.
- Lohse, M. J., Calebiro, D., Maier-Peuschel, M., Frölich, N. and Nikolaev, V. O. (2010). Real-Time Monitoring of GPCR Signalling in Living Cells. In *G Protein-Coupled Receptors*. Breckenridge, Colorado, USA: Keystone Symposia on Molecular Biology.
- Luria, A., Vegelyte-Avery, V., Stith, B., Tsvetkova, N. M., Wolkers, W. F., Crowe, J. H., Tablin, F. and Nuccitelli, R. (2002). Detergent-free domain isolated from *Xenopus* egg plasma membrane with properties similar to those of detergent-resistant membranes. *Biochemistry* 41:13189-13197.

- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
- McIlhinney, R. A., Mundell, S. J., Pula, G., Roberts, P. J. and Kelly, E. (2004). Desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptor 1a following activation of heterologous Gq/11-coupled receptors. *Biochemistry* 43:7541-7551.
- McIntire, W. E. (2009). Structural determinants involved in the formation and activation of G protein β dimers. *Neuro-Signals* 17:82-99.
- McIntosh, A. L., Gallegos, A. M., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Kannoju, D. and Schroeder, F. (2003). Fluorescence and multiphoton imaging resolve unique structural forms of sterol in membranes of living cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278:6384-6403.
- Mercier, J., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. and Bouvier, M. (2002). Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry* 277:44925-44931.
- Mizuno, N. and Itoh, H. (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neuro-Signals* 17:42-54.
- Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological Reviews* 79:1373-1430.
- Morrison, K. J., Moore, R. H., Carsrud, N. D., Trial, J., Millman, E. E., Tuvim, M., Clark, R. B., Barber, R., Dickey, B. F. and Knoll, B. J. (1996). Repetitive endocytosis and recycling of the β 2-adrenergic receptor during agonist-induced steady state redistribution. *Molecular Pharmacology* 50:692-699.
- Murakami, M. and Kudo, I. (2002). Phospholipase A2. *Journal of Biochemistry* 131:285-292.
- Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R., Yamashita, H., Saito, M., Murakoshi, H., Ritchie, K. and Kusumi, A. (2004). Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophysical Journal* 86:4075-4093.
- Murthy, K. S. and Makhlof, G. M. (2000). Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. *The Journal of Biological Chemistry* 275:30211-30219.
- Nagai, Y., Nishimura, A., Tago, K., Mizuno, N. and Itoh, H. (2010). Ric-8B stabilizes the α subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry* 285:11114-11120.
- Navratil, A. M., Bliss, S. P., Berghorn, K. a., Haughian, J. M., Farmerie, T. a., Graham, J. K., Clay, C. M. and Roberson, M. S. (2003). Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *The Journal of Biological Chemistry* 278:31593-31602.
- Nelson, C. D., Perry, S. J., Regier, D. S., Prescott, S. M., Topham, M. K. and Lefkowitz, R. J. (2007). Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by β -arrestins. *Science* 315:663-666.

- Nelson, S., Horvat, R. D., Malvey, J., Roess, D. a., Barisas, B. G. and 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.
- Novotny, J., Durcha, D., Matous, P. and Svoboda, P. (2005). Agonist-induced tyrosine phosphorylation of G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328:526-532.
- Oh, P. and Schnitzer, J. E. (2001). Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Molecular Biology of the Cell* 12:685-698.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 273:5419-5422.
- Orth, J. H., Fester, I., Preuss, I., Agnoletto, L., Wilson, B. a. and Aktories, K. (2008). Activation of G α (i) and subsequent uncoupling of receptor-G α (i) signaling by *Pasteurella multocida* toxin. *The Journal of Biological Chemistry* 283:23288-23294.
- Ostasov, P., Bourova, L., Hejnova, L., Novotny, J. and Svoboda, P. (2007). Disruption of the plasma membrane integrity by cholesterol depletion impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G(q)/G(11) α proteins. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 27:335-352.
- Ostasov, P., Krusek, J., Durchankova, D., Svoboda, P. and Novotny, J. (2008). Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G11 α protein overexpression on homologous and heterologous desensitization. *Cell Biochemistry and Function* 26:264-274.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.
- Patel, H. H., Head, B. P., Petersen, H. N., Niesman, I. R., Huang, D., Gross, G. J., Insel, P. A. and Roth, D. M. (2006). Protection of adult rat cardiac myocytes from ischemic cell death: role of caveolar microdomains and δ -opioid receptors. *American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291:H344-H350.
- Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D. and Lefkowitz, R. J. (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to β 2-adrenergic receptors by β -arrestins. *Science* 298:834-836.
- Pesanová, Z., Novotný, J., Cerný, J., Milligan, G. and Svoboda, P. (1999). Thyrotropin-releasing hormone-induced depletion of G(q) α /G(11) α proteins from detergent-insensitive membrane domains. *FEBS Letters* 464:35-40.
- Philip, F. and Scarlata, S. (2004). Influence of membrane components in the binding of proteins to membrane surfaces. *Biochemistry* 43:11691-11700.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3:639-650.

- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research* 47:1597-1598.
- Pike, L. J. and Casey, L. (1996). Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem* 271:26453-26456.
- Pitcher, J. A., Payne, E. S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A. A. and Lefkowitz, R. J. (1995). The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8343-8347.
- Pol, A., Martin, S., Fernández, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C. and Parton, R. G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Molecular Biology of the Cell* 16:2091-2105.
- Posner, B. A., Mukhopadhyay, S., Tesmer, J. J., Gilman, A. G. and Ross, E. M. (1999). Modulation of the affinity and selectivity of RGS protein interaction with G α subunits by a conserved asparagine/serine residue. *Biochemistry* 38:7773-7779.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Tettamanti, G. and Sonnino, S. (2000). Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *The Journal of Biological Chemistry* 275:11658-11665.
- Pucadyil, T. J. and Chattopadhyay, A. (2004). Exploring detergent insolubility in bovine hippocampal membranes: a critical assessment of the requirement for cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1661:9-17.
- Pucadyil, T. J. and Chattopadhyay, A. (2007). Cholesterol depletion induces dynamic confinement of the G-protein coupled serotonin(1A) receptor in the plasma membrane of living cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768:655-668.
- Qi, M., Liu, Y., Freeman, M. R. and Solomon, K. R. (2009). Cholesterol-regulated stress fiber formation. *Journal of Cellular Biochemistry* 106:1031-1040.
- Renner, U., Glebov, K., Lang, T., Papusheva, E., Balakrishnan, S., Keller, B., Richter, D. W., Jahn, R. and Ponimaskin, E. (2007). Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine (1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Molecular Pharmacology* 72:502-513.
- Rens-Domiano, S. and Hamm, H. E. (1995). Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *The FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:1059-1066.
- Ribas, C., Penela, P. and Mayor, F. (2003). Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cellular Signalling* 15:973-981.
- Ribas, C., Penela, P., Murga, C., Salcedo, A., García-Hoz, C., Jurado-Pueyo, M., Aymerich, I. and Mayor, F. (2007). The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768:913-922.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-682.

- Roy, A. A., Baragli, A., Bernstein, L. S., Hepler, J. R., Hébert, T. E. and Chidiac, P. (2006). RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. *Cellular Signalling* 18:336-348.
- Rudajev, V., Novotny, J., Hejnova, L., Milligan, G. and Svoboda, P. (2005). Dominant portion of thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and Gq α /G11 α protein. *Journal of Biochemistry* 138:111-125.
- Sadana, R. and Dessauer, C. W. (2009). Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neuro-Signals* 17:5-22.
- Sako, Y. and Kusumi, A. (1994). Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *The Journal of Cell Biology* 125:1251-1264.
- Scarselli, M. and Donaldson, J. G. (2009). Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 284:3577-3585.
- Schiöth, H. B. and Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology* 142:94-101.
- Schroeder, F., Woodford, J. K., Kavecansky, J., Wood, W. G. and Joiner, C. (1995). Cholesterol domains in Biological membranes. *Molecular Membrane Biology* 12:113-119.
- Schroeder, R., London, E. and Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12130-12134.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. and Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5795-5800.
- Schwille, P., Kahya, N., Scherfeld, D. and Bacia, K. (2004). Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Structural Biology* 147:77-89.
- Sengupta, P., Philip, F. and Scarlata, S. (2008). Caveolin-1 alters Ca(2+) signal duration through specific interaction with the G α q family of G proteins. *Journal of Cell Science* 121:1363-1372.
- Sheetz, M. P. (2001). Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:392-396.
- Silvius, J. R., del Giudice, D. and Lafleur, M. (1996). Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. *Biochemistry* 35:15198-15208.
- Simons, K. and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* .

- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T. and Lisanti, M. P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and cellular Biology* 19:7289-7304.
- Smith, B., Hill, C., Godfrey, E. L., Rand, D., van den Berg, H., Thornton, S., Hodgkin, M., Davey, J. and Ladds, G. (2009). Dual positive and negative regulation of GPCR signaling by GTP hydrolysis. *Cellular Signalling* 21:1151-1160.
- Song, G. J., Hinkle, P. M. and Jones, B. W. (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.
- Sowa, G., Pypaert, M. and Sessa, W. C. (2001). Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:14072-14077.
- Sprague, B. L. and McNally, J. G. (2005). FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends in Cell Biology* 15:84-91.
- Stahlhut, M. and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell* 11:325-337.
- Sternweis, P. C., Carter, A. M., Chen, Z., Danesh, S. M., Hsiung, Y. and Singer, W. D. (2007). Regulation of Rho guanine nucleotide exchange factors by G proteins. *Advances in Protein Chemistry* 74:189-228.
- Stubbs, C. D., Botchway, S. W., Slater, S. J. and Parker, A. W. (2005). The use of time-resolved fluorescence imaging in the study of protein kinase C localisation in cells. *BMC Cell Biology* 6:22.
- Su, Y., Ho, M. K. and Wong, Y. H. (2009). A hematopoietic perspective on the promiscuity and specificity of Gα16 signaling. *Neuro-Signals* 17:71-81.
- Sugawara, Y., Nishii, H., Takahashi, T., Yamauchi, J., Mizuno, N., Tago, K. and Itoh, H. (2007). The lipid raft proteins flotillins/reggies interact with Gαq and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase. *Cellular Signalling* 19:1301-1308.
- Suzuki, N., Hajicek, N. and Kozasa, T. (2009). Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neuro-Signals* 17:55-70.
- Sverdlov, M., Shinin, V., Place, A. T., Castellon, M. and Minshall, R. D. (2009). Filamin A Regulates Caveolae Internalization and Trafficking in Endothelial Cells. *Molecular Biology of the Cell* 20:4531- 4540.
- Svoboda, P. and Novotny, J. (2002). Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59:501-512.
- Svoboda, P., Drmota, T., Novotny, J., Milligan, G. and Gould, G. W. (1999). Visualization of distinct patterns of subcellular redistribution of the thyrotropin-releasing hormone

- receptor-1 and $gq\alpha$ /G11 α induced by agonist stimulation. *The Biochemical Journal* 340 (Pt 2):529-538.
- Svoboda, P., Kim, G. D., Grassie, M. A., Eidne, K. A. and Milligan, G. (1996). Thyrotropin-releasing hormone-induced subcellular redistribution and down-regulation of G11 α : analysis of agonist regulation of coexpressed G11 α species variants. *Molecular Pharmacology* 49:646-655.
- Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M., Kawasaki, T., Moritani, Y., Hayashi, K. and Kobori, M. (2004). A novel G α q/11-selective inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* 279:47438-47445.
- Tall, G. G., Krumin, A. M. and Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry* 278:8356-8362.
- Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T. and Tesmer, J. J. (2005). Snapshot of activated G proteins at the membrane: the G α q-GRK2-G β γ complex. *Science* 310:1686-1690.
- Torrecilla, I., Spragg, E. J., Poulin, B., McWilliams, P. J., Mistry, S. C., Blaukat, A. and Tobin, A. B. (2007). Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *The Journal of Cell Biology* 177:127-137.
- Tran, T. M., Friedman, J., Baameur, F., Knoll, B. J., Moore, R. H. and Clark, R. B. (2007). Characterization of β 2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Molecular Pharmacology* 71:47-60.
- Umemori, H., Inoue, T., Kume, S., Sekiyama, N., Nagao, M., Itoh, H., Nakanishi, S., Mikoshiba, K. and Yamamoto, T. (1997). Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the α subunit. *Science* 276:1878-1881.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. and Waterfield, M. D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in biochemical sciences* 22:267-272.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E. and Gaitanaris, G. a. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4903-4908.
- Verkleij, A. J. and Post, J. A. (2000). Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. *The Journal of Membrane Biology* 178:1-10.
- Violin, J. D., Dewire, S. M., Barnes, W. G. and Lefkowitz, R. J. (2006). G protein-coupled receptor kinase and β -arrestin-mediated desensitization of the angiotensin II type 1A receptor elucidated by diacylglycerol dynamics. *The Journal of Biological Chemistry* 281:36411-36419.
- Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F. and Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein G α olf. *The Journal of Neuroscience* 25:3793-3800.

- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. and Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068.
- Weerth, S. H., Holtzclaw, L. A. and Russell, J. T. (2007). Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca²⁺ wave propagation in glial cells. *Cell Calcium* 41:155-167.
- Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *The FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11:346-354.
- Willets, J. M., Challiss, R. A. and Nahorski, S. R. (2003). Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends in Pharmacological Sciences* 24:626-633.
- Williams, R. L. (1999). Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochimica et Biophysica Acta* 1441:255-267.
- Worley, P. F., Baraban, J. M., Van Dop, C., Neer, E. J. and Snyder, S. H. (1986). Go, a guanine nucleotide-binding protein: immunohistochemical localization in rat brain resembles distribution of second messenger systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4561-4565.
- Xu, W., Yoon, S., Huang, P., Wang, Y., Chen, C., Chong, P. L. and Liu-Chen, L. (2006). Localization of the kappa opioid receptor in lipid rafts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317:1295-1306.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1:445-458.
- Yan, W., Sunavala, G., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J. G. and Spielman, a. I. (2001). Bitter taste transduced by PLC- β (2)-dependent rise in IP(3) and α -gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 280:C742-C751.
- Yoshida, Y., Furuya, E. and Tagawa, K. (1980). A direct colorimetric method for the determination of phospholipids with dithiocyanatoiron reagent. *Journal of Biochemistry* 88:463-468.
- Zhang, W., McIntosh, A. L., Xu, H., Wu, D., Gruninger, T., Atshaves, B., Liu, J. C. and Schroeder, F. (2005). Structural analysis of sterol distributions in the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* 44:2864-2884.
- Zhao, H., Loh, H. H. and Law, P. Y. (2006). Adenylyl cyclase superactivation induced by long-term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid rafts and is independent of receptor internalization. *Molecular Pharmacology* 69:1421-1432.
- Zhong, H., Wade, S. M., Woolf, P. J., Linderman, J. J., Traynor, J. R. and Neubig, R. R. (2003). A spatial focusing model for G protein signals. Regulator of G protein signaling (RGS) protien-mediated kinetic scaffolding. *The Journal of Biological Chemistry* 278:7278-7284.



Zidar, D. a., Violin, J. D., Whalen, E. J. and Lefkowitz, R. J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:9649-9654.