

Katedra biochemie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

**Aplikace 2D elektroforesy pro rozlišení proteinového
složení buněk HEK293. Vliv dlouhodobé
hormonální stimulace.**

Zdeňka Drastichová

Diplomová práce

2006

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

Velmi děkuji vedoucímu mé diplomové práce Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení a podporu během mé diplomové práce.

Dále děkuji RNDr. Jiřímu Novotnému, CSc. a RNDr. Lence Bouřové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při sepisování této práce.

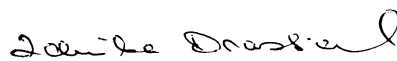
Velký dík patří RNDr. Denise Petráčkové a Mgr. Lence Šemberové za trpělivost a především čas, který mi věnovaly při seznámení s metodou dvourozměrná elektroforesa.

Děkuji také Mgr. Pavlu Ostašovi za veškerou pomoc a především za psychickou podporu.

Mým rodičům velice děkuji za trpělivost, lásku a psychickou i materiální podporu.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury.

V Praze dne 20. 4. 2006



.....

Zdeňka Drastichová

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylylcyklasa
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
β -AR	β -adrenergní receptor
ARF	faktor ADP-ribosylace
APS	persíran amonný
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	3',5'-cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DAG	diacylglycerol
DIGs	detergent-nerozpustné glykosfingolipidové membránové domény (<i>detergent insoluble glycosphingolipid enriched membranes</i>)
DIMs	detergent-rezistentní membránové domény (<i>detergent-insensitive membrane domains</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> – médium pro kultivaci buněk
DRMs	detergent-rezistentní membránové domény (<i>detergent resistant membranes</i>)
DTT	dithiotreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminisce</i>
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EF	elongační faktor
EF-Tu, EF-G	elongační faktory proteosyntézy Tu a G
GABA _B	metabotropní glutamátové receptory
GAP	protein aktivující GTPasu
GDI	inhibitor disociace GTPasy
GDP	guanosindifosfát
GEF	protein katalyzující výměnu guanin nukleotidu
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
G-proteiny	trimerní GTP-vazebné bílkoviny
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GRK	proteinkinasy receptorů spřažených s G-proteiny

GTP	guanosintrifosfát
G _x α	α-podjednotka příslušného trimerního GTP vazebného proteinu
HEK cells	<i>human embryonal kidney cells</i> , lidské embryonální ledvinné buňky
CHAPS	3-{{(3-cholamidopropyl)dimethylammonio}}-1-1propansulfonát
IAA	jodacetamid
IgG	imunoglobulin G
IP ₃	inositol-1, 4, 5-trisfosfát
IPG	imobilizované pH gradienty
MAP	proteinkinasa aktivovaná mitogeny
M _r	molekulová hmotnost
NCS	Newborn Calf Serum
PBS	<i>fosfate buffered saline</i> , fyziologický fosfátový pufr
PDE	fosfodiesterasa
PH	pleckstrin homology
pI	isoelektrický bod
PI	fosfatidylinositol
PIP ₂	fosfatidylinositolbisfosfát
PI3-kinasa	fosfoinositid-3-kinasa
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLA	fosfolipasa A
PLC	fosfolipasa C
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
RGS	regulátory signální dráhy spřažené s G-proteiny
SDS	dodecylsulfát sodný
TBS	trisový pufr
TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminomethan
TRH	thyreoliberin
TRH-R	receptor pro thyreoliberin
Tris	tris-(hydroxymetyl)-aminometan
TSH	thyreotropin

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	2
3.	LITERÁRNÍPŘEHLED.....	3
3.1.	Receptory spřažené s G-proteiny.....	3
3.2.	GTP-vazebné proteiny, G-proteiny.....	6
3.2.1.	Trimerní G-proteiny.....	6
3.2.2.	G α podjednotka.....	7
3.2.3.	G $\beta\gamma$ podjednotky.....	8
3.2.4.	Aktivace a deaktivace trimerních G-proteinů.....	8
3.2.5.	Klasifikace G-proteinů.....	9
3.2.6.	Lipidové modifikace signálních molekul.....	11
3.3.	Efektory.....	13
3.3.1.	Adenylylcyklasy.....	13
3.3.2.	Fosfolipasy C.....	14
3.3.3.	Fosfolipasy A ₂	15
3.3.4.	cGMP fosfodiesterasa.....	15
3.3.5.	PI3-kinasy.....	15
3.3.6.	Iontové kanály.....	15
3.3.7.	Tyrosinové kinasy a MAP kinasová dráha.....	16
3.4.	Membránové mikrodomény.....	16
3.5.	Desensibilizace.....	21
3.5.1.	Desensibilizace na úrovni receptorů.....	21
3.5.2.	Desensibilizace na úrovni trimerních G-proteinů.....	23
4.	MATERIÁL A METODY.....	27
4.1.	Chemikálie a materiál.....	27
4.2.	Kultivace buněk.....	27
4.3.	Homogenizace a stočení postnukleárního supernatantu.....	28
4.4.	Stanovení množství proteinů.....	28
4.5.	2D elektroforesa.....	29
4.5.1.	Příprava vzorku pro 2D elektroforesu.....	33

4.5.2.	Isoelektrická fokusace.....	34
4.5.3.	Ekvibrace stripů.....	34
4.5.4.	SDS-polyakrylamidová elektroforesa.....	35
4.5.5.	Barvení gelů stříbrem.....	36
4.5.6.	Barvení gelů pomocí fluorescenčních barev.....	37
4.5.7.	Technika imunoblot (western blotting).....	37
4.5.8.	Analýza 2D map.....	38
5.	VÝSLEDKY.....	40
5.1.	Rozlišení α podjednotek G-proteinů třídy G_q/G_{11} pomocí 2D elektroforesy.....	40
5.2.	Porovnání celkového proteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyroliberinem.....	40
5.3.	Porovnání fosfoproteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyroliberinem pomocí fluorescenčního barvení.....	41
6.	DISKUSE.....	50
7.	ZÁVĚR.....	55
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56

1. ÚVOD

Signalizace je životně důležitý děj pro všechny buňky. Veškeré organismy potřebují vnímat své okolí a odpovídat na jeho podněty. Reagují na množství živin, růstové faktory, iontové složení okolí, teplotu, tlak, světlo a další vnější podněty a jsou schopny vzájemné komunikace. Tato komunikace se uskutečňuje převážně působením látkových (chemických) signálů.

Jednou z možností, jak je signál přenesen přes plasmatickou membránu do nitra buňky, je navázání signální molekuly na receptor, nacházející se na vnějším povrchu membrány. Reakce buněk, které mají receptor pro stejnou signální molekulu, se mohou výrazně lišit v závislosti na příslušném podtypu receptoru a typu efektoru. Citlivost k danému signálu mohou zvýšit zvětšením počtu receptorů na svém povrchu nebo snížit různými způsoby desensitizace.

Přenos signálu z receptoru na efektor se děje různými způsoby, jeden z nich je uskutečňován pomocí G-proteinů. Tento způsob přenosu je již dobře znám, v roce 1994 byla za jeho objev udělena Nobelova cena A. Gilmanovi a M. Rodbellovi. Receptory, pomocí kterých jsou G-proteiny aktivovány, se nazývají receptory spřažené s G-proteiny a jsou nyní nejpočetnější a nejlépe prostudovanou skupinou membránových receptorů.

Významnou úlohu v procesu přenosu signálu do buňky má struktura plasmatické membrány, v jejíž tekutém prostředí se nacházejí tzv. membránové mikrodomény. Ty jsou charakteristické svým lipidovým a proteinovým složením a jsou obohaceny o některé typy signálních molekul.

Velmi důležitým dějem je také desensibilizace. Jedná se o snížení biologické odpovědi na signál, který na buňku působí ve vysokých koncentracích, dlouhodobě nebo opakovaně. To se děje pomocí buněčné redistribuce a degradace receptorů. Při dlouhodobém působení hormonu dochází také ke změnám na úrovni G-proteinů. Bylo zjištěno, že dlouhodobá aktivace receptorů spřažených s G-proteiny vede ke specifickému snížení v obsahu příslušného G-proteinu v buňce.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo studium změn proteinového složení po dlouhodobém hormonálním působení. Experimenty vycházely z ovlivnění buněčné linie E2M11, odvozené od buněk HEK293 (human embryonic kidney cells), působením hormonu TRH (thyrotropin releasing hormone, thyreoliberin). Proteinové složení (proteom) kontrolních buněk a buněk ovlivněných TRH bylo studováno pomocí metody s vysokou rozlišovací schopností, dvourozměrné elektroforesy na imobilizovaných pH gradientech. Porovnání těchto dvou proteomů zahrnovalo studium kvalitativních i kvantitativních změn. Zvláštní pozornost pak byla věnována tomu, jaký vliv má dlouhodobé působení TRH na G-proteiny třídy $G_{q/11}$. Důležitou součástí náplně diplomové práce bylo zavedení barvení dvourozměrných gelů pomocí fluorescenčních barev.

Konkrétním cílem této práce bylo

- 1) identifikace α podjednotek G-proteinů třídy $G_{q/11}$ ve vzorku kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyreoliberinem
- 2) kvalitativní a kvantitativní porovnání proteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyreoliberinem pomocí barvení stříbrem
- 3) kvalitativní a kvantitativní porovnání proteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyreoliberinem pomocí fluorescenčního barvení (Sypro Ruby)
- 4) kvalitativní a kvantitativní porovnání fosfoproteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyreoliberinem pomocí fluorescenčního barvení (Pro-Q Diamond)

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Receptory spřažené s G-proteiny

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) tvoří největší skupinu membránových receptorů. Jejich počet se zatím odhaduje na 1000 členů (počet genů), z nichž většina jsou receptory pro odoranty. Geny kódující GPCR tvoří přibližně 1% savčího genomu a jsou tedy nejrozsáhlejší skupinou bílkovin, která vykazuje strukturní a funkční podobnost. Mezi ligandy, kterými jsou GPCR aktivovány, patří rozličné nervové přenašeče - neurotransmitery, neuropeptidy, hormony, glykoproteiny a vápenaté ionty. Patří sem také senzorické receptory pro fotony a odoranty (Birbaumer a kol., 1990; Morris a Malbon, 1999).

GPCR mají podobnou strukturu (Obr.1). Jedná se o transmembránové proteiny, obsahující sedm transmembránových domén (TM I-VII). Tyto domény jsou tvořeny α -helixy o 20-27 aminokyselinách, jsou hydrofobní a procházejí lipidovou dvojvrstvou. Jsou spojeny třemi intracelulárními (i1-i3) a třemi extracelulárními (e1-e3) smyčkami, které jsou hydrofilní. N-koncová doména, která může být glykosylována, je orientována extracelulárně. C-koncová doména je orientována dovnitř buňky a může být fosforylována nebo palmitoylována, což je důležité při desensibilizaci a internalizaci receptorů. Jednotlivé receptory se liší svou délkou (300-800 aminokyselin), velikostí N-konce (7-595 aminokyselin) a C-konce (12-359 aminokyselin) a také délkou intracelulární smyčky i3 (Baldwin, 1993). U většiny GPCR se objevuje disulfidový můstek, který spojuje extracelulární smyčku e2 a TM III, účastníci se konformačních změn receptoru po navázání agonisty (Pederson a Ross, 1985).

Jednotlivé transmembránové domény jsou sbaleny do prstencovitého útvaru, do kterého jsou uspořádány po směru hodinových ručiček (Baldwin, 1993). Unger a kol. (1997) s pomocí elektronových hustotních map předpověděli model receptoru, ve kterém TM helixy IV, VI a VII jsou orientovány kolmo na rovinu membrány, zatímco osy zbývajících TM helixů, TM I, II, III a V, jsou k rovině membrány nakloněny až o 25° . Domény se na vnitřní straně přibližují a na vnější straně se rozcházejí, a tím vytvářejí dutinu pro navázání ligandu.

GPCR mají vazebné místo pro ligand a místo interagující s G-proteinem. Vazebné místo pro ligand tvoří N-koncová doména receptoru, jeho extracelulární smyčky a

extracelulárně orientované části TM domén. Rozsah navázání ligandu závisí na jeho velikosti. Malé ligandy (např. katecholaminy) se váží do dutiny tvořené TM doménami III a VI. Peptidy (např. TRH) interagují s extracelulárními smyčkami a jádrem receptoru, polypeptidy pak s extracelulárními smyčkami a N-koncovou doménou. Glykoproteiny se váží pouze k N-koncové doméně (Bockaert a Pin, 1999).

Pro interakci G-proteinů jsou důležité oblasti intracelulární smyčky i2, N- a C-konec i3 a blízká část C-konce molekuly receptoru (Moro, 1993). Specifitu GPCR pro určitý G-protein určuje pravděpodobně C-koncová doména. Tato doména může být fosforylována na serinových nebo threoninových zbytcích. Fosforylovaný receptor má sníženou schopnost aktivovat G-proteiny (Albert a kol., 1998).

Po navázání agonisty a aktivaci receptoru dochází v molekule receptoru ke konformační změně. Dochází k mírné rotaci a posunu transmembránových segmentů; tím dojde k odkrytí aminokyselinových zbytků interagujících s G-proteiny (Conklin a Bourne, 1993; Högger a kol., 1995).

Některé studie odhalily, že GPCR existují jako homo- nebo heterodimery, zřejmě v rámci *coiled-coil* uspořádání některých částí jejich transmembránových domén TM VI (Maggio a kol., 1993; Monnot a kol., 1996). Jedná se především o receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_B), glutamovou, β_2 -adrenergní receptory a receptory aktivované vápníkem (Romano a kol., 1996; Herbert a kol., 1996; Bai a kol., 1998).

Podle sekvenční podobnosti můžeme rozdělit receptory spřažené s G-proteiny do tří skupin. Každá skupina vykazuje 25% identitu aminokyselinové sekvence v transmembránové oblasti a řadu konzervovaných zbytků a motivů (Pierce, 2002).

První skupina, která je nejrozsáhlejší, zahrnuje receptory pro světlo v sítnici (rhodopsin), pro malé ligandy jako jsou aminokyseliny (noradrenalin, adrenalin; adrenergní receptory) a odoranty v čichové sliznici. Do třídy I rovněž patří některé receptory aktivované krátkými peptidy a glykoproteiny, například pro TRH (Bockaert a Pin, 1999).

Druhá skupina obsahuje přibližně 25 členů, a to receptory pro gastrointestinální peptidové hormony (sekretin, glukagon, vasoaktivní intestinální peptid a somatoliberin), adrenokortikotropní hormon (ACTH), kalcitonin a parathyroidní hormon. Většina členů této rodiny receptorů aktivuje adenylylcyklastu s pomocí G_s-proteinu.

Třetí skupina je poměrně malá, patří do ní metabotropní glutamátové receptory, GABA_B receptory, receptory aktivované extracelulárním vápníkem a některé chuťové receptory. Receptory této skupiny mají velmi dlouhý extracelulární N-konec, který je důležitý pro navázání ligandu a aktivaci (Kristen a kol., 2002).

Toto rozdělení nezahrnuje tzv. *frizzled/smoothened* receptory pro glykoproteinové ligandy zvané *Wnts*. Účastní se vývoje embrya a hrají důležitou roli v regulaci buněčné polarity (Bockaert a Pin, 1999), pro tvorbu nervové synapse a regulaci proliferace buněk (Huang a Klein; 2004).

Thyreoliberinový receptor

Mezi receptory spřažené s G-proteiny patří také thyreoliberinový receptor (thyreotropin-releasing hormone receptor, TRH-R). Jedná se tedy o glykoproteinový receptor, obsahující sedm transmembránových domén, jehož molekulová váha je 45 kDa (Hinkle, 1989). Gen odpovědný za jeho expresi se u člověka nachází na chromosomu 8 (Morrison a kol, 1994). Nachází se v centrálním a periferním nervovém systému a je nezbytný pro správnou funkci štítné žlázy, neboť jeho aktivací je stimulována sekrece TSH (thyroideu stimulující hormon, thyreotropin) a prolaktin. (Yu a kol., 1998).

Ligandem tohoto receptoru je thyreoliberin (thyrotropin-releasing hormone, TRH), tripeptid se sekvencí pyroGlu-His-Pro-NH₂. Působí jako neurotransmiter a neuromodulátor. V hypotalamo-hypofyzární ose u savců je TRH syntetizován v hypotalamu a uvolňován do krevního řečiště. Jeho cílem jsou specifické buňky v adenohipofýze, kde po působení TRH dochází k produkci thyreotropinu a prolaktinu. Thyreotropin pak ve štítné žláze ovlivňuje produkci tyroxinu a trijodthyroninu, jež jsou nezbytné pro správný růst a vývoj organismu a mají vliv na iontovou rovnováhu a citlivost hormonální odpovědi na jiné hormony (Gershengorn a Osman, 1996).

Signální kaskáda iniciovaná TRH-R probíhá tak, že aktivovaný receptor (tj. konformace s navázaným ligandem) aktivuje fosfolipasu C pomocí G-proteinů třídy G_{q/11} (Aragay a kol., 1992; Gershengorn, 1989; Hsieh a Martin, 1992). V podmínkách dlouhodobé nebo opakované stimulace receptoru podstupuje TRH receptor relativně rychlou internalizaci (minuty), která následuje po fosforylaci receptoru, navázání β-arrestinu. TRH-R je přesunut z povrchu buněčné membrány do klathrinových váčků (Drmosa a Milligan, 2000). Část internalizovaných receptoru je degradována (Tsao a von Zastrow, 2001). Po působení TRH je také snižována transkripce příslušného genu pro TRH receptor a následně destabilizována vzniklá mRNA, což přispívá k down-regulaci (Gershengorn, 1993).

U myši a potkanů existují dvě isoformy THR receptoru, TRH-R1 (dlouhá isoforma, 412 aminokyselin) a TRH-R2 (krátká isoforma, 387 aminokyselin u potkanů nebo 393 aminokyselin u myši). U člověka nebyla zatím krátká isoforma nalezena. Obě isoformy jsou produktem jednoho genu, vznikají tedy rozdílným sestřihem na úrovni mRNA. Vykazují

stejnou vazebnou afinitu k TRH a aktivují stejné signalizační dráhy. TRH-R2 je mnohem rychleji internalizován než TRH-R1. Výše uvedené isoformy receptoru jsou exprimovány různě v rozdílných částech mozku a míchy; v některých oblastech se ale vyskytují společně (Cao a kol., 1998; O'Dowd a kol., 2000).

3.2. GTP-vazebné proteiny, G-proteiny

GTP-vazebné proteiny (G-proteiny) jsou regulační proteiny, které hrají důležitou roli v dějích signální transdukce. Lze je nalézt v rozličných organismech, od bakterií až po savce. Jsou schopny navázat molekulu guanosintrifosfátu (GTP) a štěpit ji, mají tedy GTPasovou aktivitu. G-proteiny se dělí na monomerní (malé) a trimerní (velké).

Monomerní neboli malé G-proteiny regulují různé intracelulární procesy - řídí regulaci buněčného růstu, proteosyntézu a molekulární buněčný transport (*membrane traffic*). Jejich velikost je 20-30 kDa (Bourne a kol., 1991). Bylo jich identifikováno více než 150 a patří mezi ně např. Ras, Rab, Rho, Rac, Ran, ARF, faktory EF-Tu a EF-G (Takai a kol., 2001). Vzhledem k jejich nízké GTPasové aktivitě a rychlosti disociace GDP je jejich regulace uskutečňována pomocí inhibitorů (*GTPase dissociation inhibitors*, GDI), GTPasu aktivujících proteinů (*GTPase activating proteins*, GAP) a proteinů katalyzujících výměnu guanin nukleotidu (*guanine nucleotide exchange factor proteins*, GEF). GDI udržují monomerní G-protein v neaktivním stavu, kdy je k němu navázáno GDP. GEF katalyzuje výměnu GTP za GDP, čímž dochází k aktivaci monomerního G-proteinu a jeho interakci s cílovými proteiny. Nízká GTPasová aktivita je stimulována pomocí GAP, a tím je obnoven neaktivní stav monomerního G-proteinu (Bourne, 1991).

3.2.1. Trimerní G-proteiny

Trimerní G-proteiny jsou důležitými článkem signální dráhy, kdy je signál přenášen z receptoru na vnější straně membrány k efektoru dovnitř buňky (Gilman, 1987). Aktivací efektorů jsou dále spuštěny složitější vnitrobuněčné regulační procesy.

Trimerní G-proteiny jsou složeny ze tří strukturně i funkčně odlišných polypeptidů – podjednotky α , β , a γ (Gilman, 1987). Podjednotka α je periferní bílkovinou, která je k buněčné membráně vázána s pomocí post-translační modifikace mastnými kyselinami (palmitová, myristová); podjednotky $\beta\gamma$ vytvářejí pevný dimer a jsou značně hydrofobní.

V klidovém stavu buněčného metabolismu jsou všechny tyto podjednotky pevně spojeny jak mezi sebou (neaktivní, trimerní stav G proteinu), tak s buněčnou membránou.

Dnes je známo 19 $G\alpha$ podjednotek o velikosti 39-45 kDa a kódovaných 16 geny, 6 β podjednotek o velikosti 35-36 kDa a 12 γ podjednotek o velikosti 6-9 kDa (McCudden a kol., 2004; Nurnberg a kol., 1995; Clapham a Neer, 1997). Teoreticky tedy může existovat více než tisíc kombinací mezi různými podjednotkami (Hildebrandt, 1997). Ve skutečnosti je ale počet kombinací (z funkčního hlediska) omezen, protože ne všechny $\beta\gamma$ -dimery jsou funkční (Yan a kol., 1996) a výskyt některých podjednotek G-proteinů je tkáňově specifický (Jones a Reed, 1989; Lerea a kol., 1986; McLaughlin a kol., 1992; Peng a kol., 1992). Nicméně i tak lze mít na paměti, že teoreticky může existovat několik stovek strukturních kombinací různých podjednotek trimerních G proteinů. Zájem o studium této oblasti poklesl, nicméně tento problém není vyřešen, především z fyziologického hlediska.

3.2.2. $G\alpha$ podjednotka

Pouze $G\alpha$ podjednotka vykazuje GTPasovou aktivitu, tj schopnost hydrolyzovat vázané GTP. GTPasová doména $G\alpha$, která vykazuje vysokou homologii vůči monomerním G-proteinům třídy Ras, je složena ze šesti β listů obklopených šesti α helixy. Tato doména interaguje s receptorem a efektorovými molekulami a také s $\beta\gamma$ dimerem. Druhá helikální doména se skládá z centrálního α helixu obklopeného pěti krátkými helixy a napomáhá GTPasové doméně vytvořit vazebné místo (kapsu) pro guaninové nukleotidy. Rovněž se účastní na procesu rozpoznávání efektoru (Wall a kol., 1995; Lambright a kol. 1996). $G\alpha$ podjednotka obsahuje tři flexibilní oblasti, tzv. switch I, II a III., které při navázání nebo hydrolyze GTP mění konformaci (Lambright a kol., 1994). $G\alpha$ podjednotka obsahuje také vazebné místo pro hořečnaté ionty, bez nichž probíhá její aktivace pomaleji (Gilman, 1987). Za interakci $G\alpha$ podjednotky s $G\beta\gamma$ dimerem je zodpovědná její N-koncová oblast (prvních 25 aminokyselin) a část tvořící α_2 helix; s efektořem (příkladně adenylylcyklasou) interagují helixy α_2 - α_4 ; pro interakci s receptorem je zvažován α_5 helix a C-konec $G\alpha$ podjednotky (Conklin a Bourne, 1993; Neer, 1995).

3.2.3. G $\beta\gamma$ podjednotky

Podjednotky β a γ tvoří stabilní funkční heterodimer, který disociuje pouze za silných denaturačních podmínek (Schmidt a kol., 1992). G $\beta\gamma$ dimery interagují nejen s G α podjednotkou, ale také s efektor jako jsou fosfolipasy C, adenylylcyklasy a PI3-kinasy (Clapham a Neer, 1993; Crespo a kol., 1994; Thomason a kol., 1994). Rovněž interagují s receptory (Phillips a Cerione, 1992). G $\beta\gamma$ dimery složené z různých β a γ podjednotek se liší ve schopnosti vázat G α podjednotku i aktivovat efektor (Cerione a kol., 1987; Logothetis a kol., 1988).

Různé β podjednotky vykazují relativně vysokou podobnost v aminokyselinové sekvenci (50 – 83 %) a obsahují přibližně 340 aminokyselin (Hamm a Gilchrist, 1996). G β podjednotka obsahuje sedm tzv. WD-40 motivů. Tyto motivy jsou sekvence s často se vyskytujícím tryptofanem a asparagovou kyselinou, které se opakují po 40 aminokyselinách a tvoří krátké antiparalelní β listy (Simon a kol., 1991). Těchto sedm WD-40 motivů je složeno do vrtule se sedmi listy (*seven-bladed β -propeller*); N-konec pak tvoří α helix (Wall a kol., 1995; Lambright a kol. 1996). G γ podjednotky navzájem vykazují nižší sekvenční identitu (27-75 %). Jsou složeny ze dvou α helixů. N-koncový α helix tvoří *coiled-coil* strukturu s α helixem G β podjednotky, zatímco C-koncový α helix je uložen do hydrofobní oblasti G β podjednotky, a tím určuje specifitu interakcí různých podtypů β a γ podjednotek (Spring a Neer, 1997).

3.2.4. Aktivace a deaktivace trimerních G-proteinů

Základem aktivace a deaktivace G-proteinů je cyklický děj, při kterém G-proteiny existují v aktivním stavu s navázaným GTP a v neaktivním stavu s navázaným GDP (Obr.2). To se děje pomocí GTPasové aktivity G α podjednotky, kdy je GTP hydrolyzováno na GDP a fosfát.

V neaktivním stavu je GDP navázáno ke G α podjednotce, která v tomto stavu interaguje s G $\beta\gamma$ dimerem, a tvoří tak neaktivní heterodimer asociující s receptorem (G $\alpha\beta\gamma$). Po navázání agonisty na receptor dochází k jeho aktivaci a následně k jeho konformačním změnám, které následně vyvolají změnu konformace G α podjednotky. To způsobí zvýšení afinity G-proteinu ke GTP a k výměně GDP za GTP na vazebném místě G α . Navázání GTP opět mění konformaci G-proteinu. Dochází k uvolnění G-proteinu od receptoru a oddělení

(disociaci) $G\alpha$ podjednotky od $G\beta\gamma$ dimeru. Volné $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ potom interagují s příslušnými efektory a ovlivňují jejich aktivity. Aktivní stav G-proteinů končí ve chvíli, kdy je GTP díky GTPasové aktivitě $G\alpha$ podjednotky štěpeno na GDP a fosfát. Čím déle mají efekторы navázanou $G\alpha$ podjednotku nebo $G\beta\gamma$ dimer, tím je předávaný signál silnější a delší. Po hydrolyze GTP dochází k reasociaci $G\alpha$ podjednotky s $G\beta\gamma$ dimerem za vzniku neaktivního heterotrimeru $G\alpha\beta\gamma$. Tím je ukončen aktivační/deaktivační cyklus a G-protein je znovu připraven pro aktivaci receptorem (Gilman, 1987; Kaziro a kol., 1991; Simon a kol., 1991; Neer, 1994).

Důležitým článkem tohoto cyklu jsou také tzv. regulátory proteinové signalizace (*regulators of G-protein signaling*, RGS), což jsou proteiny regulující dobu existence aktivního komplexu $G\alpha$ podjednotky a GTP, zvětšují tedy vnitřní GTPasovou aktivitu $G\alpha$ podjednotky, působí jako GAP proteiny. RGS proteiny mohou být samy regulovány, čímž vzniká systém zpětnovazebných obvodů, což umožňuje regulaci funkce buněk za fyziologických podmínek (Hepler, 1999).

3.2.5. Klasifikace G-proteinů

G-proteiny jsou klasifikovány podle struktury a funkčních vlastností $G\alpha$ podjednotek. Na základě aminokyselinové sekvence je můžeme rozdělit do čtyř tříd: G_s/G_{olf} , G_i/G_o , G_q/G_{11} a G_{12}/G_{13} (Simon a kol., 1991).

Třída G_s/G_{olf}

Třída G_s/G_{olf} obsahuje dva členy, G_s a G_{olf} , které vykazují 88% homologii. Váží se s receptory pro β -adrenergní aminy, glukagon, histamin, serotonin, odoranty a další hormony a nervové přenašeče. G_{olf} se liší od G_s , který není tkáňově specifický, nachází výhradně v čichovém epitelu. Aktivují všechny typy adenylcykly a jsou citlivé vůči cholera toxinu, produkovaného bakterií *Vibrio cholerae*, který způsobuje ADP-ribosylaci α podjednotky G-proteinu. Tato modifikace inhibuje vnitřní GTPasovou aktivitu G-proteinu a vede tedy k permanentní aktivaci $G\alpha$ podjednotky (Jones a Reed, 1989). Existují 4 isoformy $G_{s\alpha}$, $G_{s\alpha1}$ až $G_{s\alpha4}$. Vznikají alternativním sestřihem jediného genu. Tzv. dlouhé isoformy, $G_{s\alpha1}$ a $G_{s\alpha2}$ (52 kDa) se liší od tzv. krátkých isoform, $G_{s\alpha3}$ a $G_{s\alpha4}$ (45 kDa) sekvencí 14-15 aminokyselin (Bray a kol., 1986).

Třída G_i/G_o

Do této třídy G-proteinů patří tři isoformy $G_i\alpha$ proteinů - $G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$ a $G_{i\alpha3}$; dvě hlavní isoformy $G_o\alpha$ - $G_{o\alpha1}$ a $G_{o\alpha2}$; transduciny světločivného epitelu oka - $G_{i\alpha1}$ a $G_{i\alpha2}$; G-protein chuťového epitelu gustducin - $G_{gust\alpha}$ a G-protein označovaný jako $G_{z\alpha}$. G-proteiny třídy $G_i\alpha$ interagují s α_2 -adrenergními receptory, muskarinovými receptory typu 2 a 4 (acetylcholinové receptory muskarinového typu, podtyp 2 a 4), některými receptory pro serotonin a dalšími agonisty.

Tyto G-proteiny s výjimkou $G_{z\alpha}$ jsou citlivé vůči pertussis-toxinu, který je produkován bakterií *Bordetella pertussis*. Tím dochází k ADP-ribosylaci C-koncového cysteinu $G_i\alpha$ podjednotky a funkčnímu rozpřažení G-proteinu od aktivovaného receptoru. Aktivovaný receptor tak není schopen vyvolat výměnu pevně vázaného GDP za GTP (Homburger a kol., 1987).

$G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$ a $G_{i\alpha3}$ proteiny jsou produkty tří různých genů. Jejich molekulová hmotnost je 40-41 kDa a vyskytují se ve většině savčích tkání. Inhibují aktivitu adenylcyklyasy, stimulují aktivitu fosfolipázy C a ovlivňují některé draselné kanály (Suki a kol., 1987).

$G_{o\alpha1}$ a $G_{o\alpha2}$ proteiny vznikají alternativním sestřihem jednoho genu a nacházejí se ve velkém množství v mozku. Inhibují adenylcyklyasu typu I a ovlivňují některé vápenaté kanály (Taussig a kol., 1992, 1994).

Transduciny $G_{i\alpha1}$ a $G_{i\alpha2}$ se nacházejí výhradně ve světločivném epitelu oka, sítnici. Přenášejí signál z receptoru pro světlo, rhodopsinu, na cGMP fosfodiesterázu. Jsou citlivé jak k cholera-toxinu, tak i k pertussis-toxinu (Arshavsky a kol., 1992).

Gustducin $G_{gust\alpha}$ se nachází v chuťovém epitelu a jeho efekторы jsou cAMP a cGMP fosfodiesterasy (Yan a kol., 2001).

$G_{z\alpha}$ protein inhibuje adenylcyklyasu typu I a V (Taussig a Gilman, 1995).

Třída G_q/G_{11}

Tato třída G-proteinů obsahuje pět členů - $G_q\alpha$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$, $G_{15\alpha}$ a $G_{16\alpha}$. G-proteiny této třídy nejsou citlivé k pertussis-toxinu ani k cholera-toxinu a aktivují fosfolipasy $C\beta$ (PLC) (Smrcka a kol., 1991), přičemž jednotlivé G-proteiny této třídy se liší v účinnosti aktivace $PLC\beta$ v závislosti na příslušné isoformě (Lee a kol., 1992). $G_q\alpha$ a $G_{11\alpha}$ proteiny jsou exprimovány ve většině tkání, zatímco výskyt ostatních členů této třídy je omezen. $G_{14\alpha}$ protein je exprimován ve slezině, plicích, ledvinách, slinivce, játrech, varlatech a v kostní

dřeni některých buněk. $G_{15\alpha}$ a $G_{16\alpha}$ proteiny se nacházejí v tkáních, kde se hojně vyskytují krvinky (Wilkie a kol., 1991).

Třída G_{12}/G_{13}

Oba členové této třídy, $G_{12\alpha}$ a $G_{13\alpha}$, jsou resistantní vůči pertussis- a cholera-toxinu, vyskytují se ve všech tkáních a jejich aminokyselinové sekvence jsou ze 67% identické (Simon a kol., 1991). Tyto proteiny ovlivňují regulaci výměny Na^+ a H^+ iontů (Aragay a kol., 1992) a aktivitu fosfolipasy A2 (Xu a kol., 1993), aktivují jun NH_2 -terminální kinasy (Jho a kol., 1997).

3.2.6. Lipidové modifikace signálních molekul

Post-translační kovalentní modifikace mastnými kyselinami jsou nezbytné pro správnou funkci a membránovou lokalizaci signálních molekul. Připojení mastných kyselin poskytuje proteinům hydrofobní vazebnou část, pomocí které se mohou vázat do membrány (Cassey, 1994; Mumby, 1997). Nejběžnějšími kovalentními modifikacemi bílkovin jsou palmitoylace – vazba kyseliny palmitové C_{16} ; myristoylace – vazba kyseliny myristové C_{14} ; prenylace, která zahrnuje farnesylyaci – vazba isoprenoidu farnesyly C_{15} nebo geranylgeranylyaci – vazba isoprenoidu geranylgeranyly C_{20} (Casey, 1994; Milligan a kol., 1995).

Při palmitoylaci dochází k post-translačnímu vytvoření thioesterové vazby mezi kyselinou palmitovou a cysteinem příslušného proteinu (zřejmě v Golgiho aparátu). U prenylace a myristoylace se děje připojení polyisoprenoidů a mastné kyseliny během translace v endoplasmatickém retikulu. Při prenylaci je vytvořena thioesterová vazba, při myristoylaci je vytvořena amidová vazba k N-koncovému glycinu bílkoviny (Casey, 1994; Resh, 1999). Prenylace a myristoylace G-proteinů a membránových regulačních bílkovin se obecně od palmitoylace liší také tím, že příslušné struktury jsou k molekule cílového proteinu připojeny nevratně a zůstávají zde až do okamžiku jeho degradace. Palmitoylace je naproti tomu děj reverzibilní a časově dynamický (Loisel a kol., 1999; Qanbar a Bouvier, 2003).

Pomocí výše uvedených mastných kyselin mohou být modifikovány jak G-proteiny, tak receptory s nimi spřažené. $G\alpha$ podjednotky G-proteinů mohou být palmitoylovány a/nebo myristoylovány. Nejenže se tyto lipidové modifikace podílí na membránové lokalizaci $G\alpha$

podjednotek, ale také regulují interakce s jinými proteiny jako jsou adenylylcyklasy, $G\beta\gamma$ dimery a GPCR (Kisselev a kol., 1995; Moffett a kol., 2000; Myung a kol., 1999).

Zbytek kyseliny myristové je připojen ke glycinu na N-konci proteinu za současného odstranění iniciačního methioninu. Tato reakce je katalyzována N-myristoyl-transferasou. Přítomnost N-koncového glycinu je pro myristoylaci $G\alpha$ podjednotky nezbytná, ovšem ne všechny proteiny, který tento glycin obsahují, myristoylaci podléhají. N-myristoyl-transferasa totiž specificky rozpoznává a interaguje jen s určitou sekvencí aminokyseliny, kdy reaguje s proteiny, které mají serin nebo threonin v pozici 6 nebo arginin v pozici 7 nebo 8 (Resh, 1999).

Všechny $G\alpha$ podjednotky, kromě transducinu, jsou reversibilně palmitoylovány vytvořením thioesterové vazby k cysteinu blízko N-konce (Wedegaertner a kol., 1995).

Všechny $G\gamma$ podjednotky jsou na C-koncových cysteinech prenylovány: k podjednotkám γ_1 , γ_8 a γ_{11} je připojen farnesylový zbytek, k ostatním pak geranylgeranylová skupina (Wedegaertner a kol., 1995). Prenylace $G\gamma$ podjednotky je důležitá pro výslednou membránovou lokalizaci $G\beta\gamma$ dimeru a interakci s $G\alpha$ podjednotkou (Iniguez-Lluhi a kol., 1992).

GPCR třídy I jsou palmitoylovány na cysteinu lokalizovanému v blízkosti C-konce receptoru, nicméně palmitoylované cysteiny se objevují také v intracelulárních smyčkách (Resh, 1999). Reversibilita palmitoylace souvisí s desensibilizací, například u β_2 -adrenergických receptorů vede zvýšená fosforylace receptoru k jeho depalmitoylaci a následně desensibilizaci (Moffet a kol., 1993). Při spuštění signální dráhy navázáním agonisty na receptor dochází ke zvýšení obratu palmitátu vázaného jak na receptor, tak na příslušný G-protein (Degtyarev a kol., 1993; Mumby a kol., 1994; Wedegaertner a Bourne, 1994). Trimerní komplex $G\alpha$ podjednotky s $G\beta\gamma$ dimerem je odolnější vůči působení palmitoylthioesterasy než samostatné podjednotky. Aktivovaná $G\alpha$ podjednotka je tedy lepším substrátem pro palmitoylthioesterasu než její neaktivní forma v trimerním komplexu (Iiri a kol., 1996).

Význam acylace a deacylace proteinů signálních kaskád spočívá v možnosti dynamické regulace jejich buněčné lokalizace. Palmitoylace $G\alpha$ podjednotek, které neobsahují myristát, je nezbytná pro asociaci s membránou. Podle některých autorů dochází po depalmitoylaci k uvolnění $G\alpha$ podjednotky z plasmatické membrány do cytosolu (Wedegaertner a Bourne, 1994; Wedegaertner a kol., 1995; McCallum a kol., 1995; Iiri a kol., 1996; Svoboda a kol., 1996; Drmota a kol., 1998). Jiní autoři se domnívají, že $G\alpha$ podjednotka po depalmitoylaci neopouští plasmatickou membránu, ale dochází pouze k redistribuci proteinu v rámci membrány (Mumby, 1997; Huang a kol., 1999).

Palmitoylace má také význam při inkorporaci proteinů do membránových domén, což ovlivňuje jejich signalizační funkci. Například palmitoylace (již dříve) myristoylované $G_{i1}\alpha$ je nezbytná pro plnou asociaci této podjednotky k membránovým doménám typu kaveol (Galbiati a kol., 1999).

3.3. Efektory

$G\alpha$ -podjednotka a $G\beta\gamma$ dimer trimerních G-proteinů regulují aktivity různých efektorových molekul, jako jsou enzymy účastníci se syntézy a degradace intracelulárních druhých poslů (cAMP, cGMP, IP₃, DAG), iontové kanály a proteiny MAP-kinasové dráhy. Některé efektory, jako je fosfolipáza typu β (PLC β) a cGMP-fosfodiesterasy, ovlivňují GTPasovou aktivitu G-proteinů, působí tedy zpětnovazebně (Morris a Malbon, 1999).

3.3.1. Adenylylcyklasy

Existuje devět různých savčích isoform adenyllylcyklasy (AC). Jedná se o membránově vázané proteiny, jejichž molekulová váha je přibližně 120 kDa. Jsou složeny ze dvou transmembránových oblastí, z nichž každou tvoří šest α helixů (Krupinski a kol, 1989). Tyto transmembránové oblasti jsou spojeny dvěma cytoplazmatickými doménami, které jsou nezbytné pro katalytickou aktivitu (Tang a Gilman, 1995).

Adenylylcyklasa katalyzuje přeměnu ATP na cAMP (cyklický 3', 5'-adenosinmonofosfát) za přítomnosti hořčnatých iontů. Tento druhý posel následně aktivuje cAMP-dependentní proteinkinasu (PKA), jejímž úkolem je fosforylovat aminokyseliny serin a threonin vnitrobuněčných bílkovin. Tyto fosforylace jsou nezbytné pro mnoho funkcí, jako je růst, dělení, diferenciaci a sekrece (Antoni, 2000).

Všechny isoformy adenyllylcyklasy jsou stimulovány $G_s\alpha$, liší se však v citlivosti vůči $G\beta\gamma$ dimeru, Ca^{2+} /kalmodulinu a PKC (proteinkinasa C).. Za inhibici adenyllylcyklasové aktivity je odpovědná $G_i\alpha$ (Iyengar, 1993).

Důležitým regulátorem AC aktivity je intracelulární Ca^{2+} . Některé typy adenyllylcyklas jsou aktivované Ca^{2+} /kalmodulinem, zatímco jiné jsou tímto systémem inhibovány (Wayman a kol., 1996). Další možnou regulací AC aktivity je fosforylace proteinkinasa A a C (Iwami a kol., 1995; Zimmermann a Taussig, 1996).

3.3.2. Fosfolipasy C

V savcích buňkách jsou známy tři třídy PLC, a to β , γ , δ . Každá třída zahrnuje několik isoenzymů (Rhee, 1992). Byly identifikovány čtyři typy PLC β (β_1 - β_4), liší se lokalizací ve tkáních i specifickou aktivitou (Rebecchi, 2000; Rhee, 2001).

Fosfolipasy jsou enzymy, které hydrolyticky štěpí membránové fosfolipidy. Fosfolipasa C β katalyzuje přeměnu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na dva druhé posly diacylglycerol (DAG) a 1,4,5-inositoltrifosfát (IP₃) (Berridge, 1987). IP₃ putuje k endoplasmatickému retikulu, v jehož membráně vyvolává otevření Ca²⁺ kanálů. Uvolněné vápenaté ionty proudí do cytosolu, čímž vzrůstá vnitrobuněčná koncentrace volných Ca²⁺ iontů. Ty se váží na Ca²⁺-vázající protein, např. kalmodulin, který po navázání Ca²⁺ mění svou konformaci. Tato změna má za následek aktivaci různých proteinů, např. CaM-kinasy, které fosforylují specifické proteiny (Exton, 1994).

DAG, který zůstává vázaný v membráně, aktivuje proteinkinasu C. Pro aktivaci PKC musí být přítomny Ca²⁺. Aktivovaná PKC fosforyluje serin nebo threonin u specifických proteinů (Nishizuka, 1988). Isoenzymy PLC β jsou aktivovány G α podjednotkou i G $\beta\gamma$ dimerem trimerních G-proteinů třídy G_{q/11} (Smrcka, 1993).

PLC β jsou složeny z PH domény, EF (*elongation factor*) ramínka, katalytické domény s X/Y linkerem, C2 domény a C-koncové části. PH doména (*pleckstrin-homology domain*) je proteinový motiv přibližně o 100 aminokyselinových zbytcích (Haslam, 1993). Je složena ze sedmi antiparalelních β listů, složených do struktury soudku, s jedním α helixem na C-konci (Williams, 1999). Funguje zřejmě jako adaptor nebo vazba k povrchu membrány (Ferguson, 1995). EF-*hand* doména je oblast enzymu, která tvoří flexibilní vazbu mezi PH doménou a katalytickou doménou. Je složena ze čtyř *helix-loop-helix* motivů složených do dvou laloků (každý obsahuje dvě EF ramínka) (Williams, 1999). Následuje katalytická doména, α/β soudek tvořený charakteristickými X a Y oblastmi, které jsou spojeny X/Y linkerem (William, 1996). Kofaktorem PLC β jsou Ca²⁺ (William, 1999). Na katalytickou doménu navazuje C-koncová C2 doména, složená z osmilistového antiparalelního β -*sandwiche*, a C-konec ze 400 aminokyselinových zbytků, který společně s C2 doménou slouží k aktivaci enzymu pomocí G-proteinů třídy G_{q/11} (Williams, 1999).

3.3.3. Fosfolipasy A₂

Fosfolipasa A₂ (PLA₂) katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mezi C₂ glycerolu a karboxylovou skupinou kyseliny arachidonové. Z membránových lipidů tak vzniká volná kyselina arachidonová a příslušný fosfolipid. Existují dvě formy PLA₂ - nízkomolekulární sekreční a vysokomolekulární cytosolická (Dennis, 1997). Gβγ dimer aktivuje PLA₂ v sítnici a tím reguluje vznik prostanoidů (Jelsema, 1987).

3.3.4. cGMP fosfodiesterasa

cGMP fosfodiesterasa (PDE) hraje důležitou roli v excitaci světločivných buněk u obratlovců. Absorpce fotonu pomocí rhodopsinu vede přes transducin (G_t) k aktivaci PDE. Ta katalyzuje hydrolýzu cGMP, což má za následek uzavření cGMP ovládaných sodných kanálů a hyperpolarizaci buněčné membrány (Hamm, 1991). cGMP PDE existuje ve dvou formách - jako membránově vázaná a solubilní. Jsou to heterotetramery složené z polypeptidů Pα, Pβ a dvou Pγ. Pα podjednotka a Pβ podjednotka tvoří katalytické místo enzymu, zatímco Pγ podjednotka inhibuje jejich enzymatickou aktivitu (Bowes, 1987). Po aktivaci transducinu se Pγ podjednotka váže ke G_tα-GTP a přestává tak inhibovat Pα a Pβ podjednotky. Pγ podjednotka funguje také jako GTPasu aktivující protein (GAP) pro G_t, čímž vzrůstá rychlost hydrolýzy G_tα-GTP. Tím dochází ke snížení afinity G_tα k Pγ podjednotce, která se reasociuje s katalytickými podjednotkami enzymu (Arshavsky, 1992).

3.3.5. PI3-kinasy

PI3-kinasy (phosphoinositide-3-kinases) jsou ATP-dependentní enzymy. Katalyzují fosforylaci D-3 hydroxyskupinu fosfatidylinositolu (PI), fosfatidylinositol 4-fosfátu a PIP₂ za vzniku fosfatidylinositol 3-fosfátu, fosfatidylinositol 3,4-bisfosfátu a fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátu. Existují tři třídy PI3-kinas - I, II a III (Vanhaesebroeck a kol., 1997).

3.3.6. Iontové kanály

G-proteiny mohou také ovlivňovat iontové kanály pro K⁺, Na⁺, Ca²⁺ a Cl⁻ (Jan a Jan, 1997). Tato regulace může probíhat buď přímou interakcí s Gα podjednotkou nebo Gβγ dimerem nebo nepřímo pomocí druhých posílů (Clapham, 1994).

3.3.7. Tyrosinové kinasy a MAP kinasová dráha

GPCRs mohou stimulovat MAP kinasovou dráhu (mitogen-activated kinases), která reguluje genovou expresi, růst a proliferaci buněk (Schlesinger, 1998). Děje se tak pomocí receptorů spřažených s G_i - nebo G_q -proteiny (Hawes, 1995).

3.4. Membránové mikrodomény

Singer-Nicolsonův model uspořádání plasmatické membrány, tzv. model tekuté mozaiky, vycházel z představy, že v lipidové dvojvrstvě buněčné membrány jsou rozpuštěny signální molekuly (Singer a Nicolson, 1972). Předpokládalo se také, že se proteiny v tekutém prostředí membrány volně pohybují a jejich interakce jsou určovány náhodnými kolizemi (Cuatrecasas, 1974). Od roku 1994 (Neubig, 1994) jsou tyto názory přehodnocovány, neboť se ukazuje, že membránové proteiny jsou méně pohyblivé a jsou v prostoru a čase více organizovány (Neubig, 1994). Později vznikla představa, že v plasmatické membráně existují struktury, které se liší svým složením a rigiditou od svého okolí (Simons a van Meer, 1988).

V současné době je přijat názor, že plasmatická membrána nemá pouze charakter neuspořádané tekutiny (*disordered state, liquid state*), ale obsahuje také tzv. *membránové domény*, což jsou oblasti, které mají vzhledem ke svému specifickému lipidovému složení charakter uspořádané tekutiny (*ordered state of biomembrane, hexagonální fáze, gel phase*). Tyto membránové domény neboli *rafty* se liší od okolní (většinové) membrány – *bulk membrane phase* fyzikálními vlastnostmi, obsahem proteinů a obohacením o sfingolipidy a cholesterol (Simons a Ikonen, 1997). Vnější list lipidové dvouvrstvy membránových domén obsahuje velké množství sfingolipidů s nasycenými řetězci mastných kyselin, ke kterým je těsně navázán cholesterol. Vnitřní list je obohacen o cholesterol, fosfatidyletanolaminy, fosfatidylseriny a fosfatidylinosotoly s vysokým obsahem nasyceným mastných kyselin. Vysoký obsah nasycených mastných kyselin a cholesterolu má za následek vyšší rigiditu (nízkou mikroviskozitu) membránových domén, na rozdíl od okolí, které obsahuje fosfolipidy s nenasycenými mastnými kyselinami (Brown a London, 1997; Simons a Toomre, 2000).

Membránové mikrodomény mají také své specifické proteinové složení, a to proteiny s glykosylfosfatidylinositolovou kotvou (GPI-vázané bílkoviny), caveolin, α podjednotky G-proteinů, Src-kinasy, Fyn-kinasy, RGS proteiny, NO-syntasu, proteinkinasy C, MAP kinasy a

některé GPCR (Simons a Ikonen, 1997; Hooper, 1999; Resh, 1999). Obsah těchto bílkovin v membránových doménách závisí na stavu buněčného metabolismu (příkladem dietetické změny měnící spektrum mastných kyselin) i metodě, která je izoluje či je používána pro jejich charakterizaci. Také odhady velikosti membránových domén (10-1000 nm) závisí na použité metodě (NMR, ESR, FRET, FLIM, FRAP, dynamická depolarisace fluorescenčních sond = rotačně relaxační rychlost/čas).

Jak již bylo řečeno, pro domény je charakteristický vysoký obsah GPI-proteinů. Jsou to proteiny zakotvené v membráně prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové kotvy, kdy je protein se svým C-koncem polypeptidového řetězce kovalentně navázán na glykolipid glykosylfosfatidylinositol (GPI), zakotvený v plasmatické membráně. I když GPI-proteiny nejsou přímou součástí membrány a nemají tedy přístup k signálním molekulám na cytosolární straně membrány, jsou schopny iniciovat signály vyplývající v různé buněčné odpovědi (Horejsí a kol., 1998). Mezi GPI-proteiny patří lipopolysacharidové receptory myeloidních buněk CD14, granulocytový nízkofinitní IgG receptor CD16B, adhezní molekuly CD58 a CD48, molekuly regulující komplement CD55 a CD59, ektoenzymy CD73 a RT6, alkalická fosfatasa (Horejsí a kol., 1999).

Na základě většiny získaných výsledků se odhaduje, že se velikost membránových domén v živé buňce pohybuje mezi 50-300 nm (Hooper, 1999). Charakteristické lipidové složení membránových domén určuje jejich nerozpustnost v neiontových detergentech, např. Tritonu X-100, za nízkých teplot (Brown a Rose, 1992), proto jsou domény také nazývány „*detergent resistant membranes (DRMs)*“, „*detergent insoluble glycosphingolipid enriched membranes (DIGs)*“ nebo „*detergent-insensitive membrane domains (DIMs)*“ (Brown a London, 1997; Simons a Ikonen, 1997; Simons a Toomre, 2000). Tato jejich nerozpustnost a dále jejich nízká vznášivá hustota je využívána při jejich izolaci, která zahrnuje extrakci domén detergentem a flotaci v hustotním sacharosovém gradientu (Simons a Ikonen, 1997). Není však jasné, zda je složení membránových domén izolovaných detergentem stejné jako složení domén, které se vyskytují za přirozených podmínek v membránách. Je totiž možné, že při solubilizaci domén se mohou přesunout do domén některé komponenty, které se původně nacházejí mimo ně. Jedním z příkladů objasňující tuto otázku je, že působením detergentu lipidy, nacházející se mimo domény, nepřechází do domény a nedochází také k přesunu alkalické fosfatasy, která je jednou z typických bílkovin membránových domén (Schroeder a kol., 1998). Silné detergenty (CHAPS, cholát, desoxycholát), ale i Triton X100 při vysokých koncentracích a vyšších teplotách, mohou naopak převádět z domén do většinové membránové frakce bílkoviny, které jsou v doméně vázány jen velmi slabě. Tento problém je

významný při úvahách o lokalizaci GPCR v membránových doménách/raftech – palmitoylace $G\alpha$ podjednotky vede k přednostní lokalizaci $G\alpha$ v membránových doménách (1% Triton X100-detergent resistant membrane domains); hydrolýza thioesterové vazby naopak vede k uvolnění G proteinu do „detergentem rozpustné fáze“ buněčné membrány, která neflotuje v hustotních sacharosových gradientech.

Detergentová metoda izolace domén však čelila řadě připomínek; byl kritizován fakt existence membránových domén v intaktních buňkách a membránové domény byly označeny jako artefakt, který vzniká právě působením detergentu při nízké teplotě. Jedním z dalších důkazů jejich existence však byla izolace při 37°C za využití detergentu na bázi polyoxyethylen etheru (Brij). Byla prokázána přítomnost membránových domén, které vykazovaly své charakteristické vlastnosti a obsahovaly sfingomyelin a cholesterol, zatímco fosfolipidy byly zastoupeny jen nepatrně (Galbiati a kol., 2001). Dnes je existence membránových domén v intaktních buňkách zcela obecně přijímána a výzkum složení a strukturní organizace těchto specifických a vysoce dynamických kompartmentů buněčné membrány je v popředí zájmu moderní biologie, biochemie a medicíny.

Dalšími metodami, které podporují existenci membránových domén za fyziologických podmínek, jsou postupy tzv. nedetergentové, které využívají chemických a fyzikálních sil během izolace. Jedná se např. o tzv. alkalickou metodu, která používá kombinaci účinku alkalického uhličitanu sodného při vysokém pH (pH 11) a ultrazvuku (sonikace) na buněčné membrány (Song a kol., 1996).

Podle obsahu proteinu zvaného kaveolin můžeme rozdělit membránové domény na kaveoly (*caveolae*) a lipidové rafty, kdy kaveolin je obsažen pouze v kaveolách. Kaveoly jsou neznámější skupinou membránových domén. Vzhledem ke své typické morfologii byly pozorovány na povrchu endotheliálních buněk krevních kapilár pomocí elektronového mikroskopu už v 50. letech minulého století (Palade, 1953). Jedná se o invaginace plasmatické membrány, které mají lahvovitý tvar (*flask* nebo *omega-shaped invaginations*) a velikosti 50-100 nm v nejširší části (Yamada, 1955).

Charakteristickým proteinem kaveol je kaveolin (Glenney a Soppet, 1992). Je to palmitoylovaný integrální membránový protein, který je těsně vázán k cholesterolu a jehož molekulová hmotnost je 21-24 kDa (Parton, 1996). Jak N-konec, tak C-konec kaveolinu jsou orientovány do cytosolárního prostoru (Dupree a kol., 1993). Zbylých 32 hydrofóních aminokyselin vytváří krátkou transmembránovou doménu. Molekuly kaveolinu jsou schopny oligomerizace, tím vzniká charakteristický tvar kaveol. C-konec kaveolinu je palmitoylován

na cysteinových zbytcích, N-konec je zodpovědný za vazbu bílkovin včetně G-proteinů (Fielding a Fielding, 2000).

Dosud byly identifikovány čtyři typy kaveolinu. Kaveolin-1 α a -1 β vznikají alternativním sestřihem jednoho genu, kaveolin-2 a kaveolin-3 jsou si strukturně velmi podobné, ale liší se svou tkáňovou distribucí. Kaveolin-1 a -2 se nacházejí v adipocytech a endotheliálních buňkách, zatímco kaveolin-3 je pouze ve svalové tkáni (Scherer a kol., 1996; Tang a kol., 1996). Kaveoliny se přímo váží a ovlivňují aktivitu proteinů signálních kaskád. Např. polypeptid z N-konce kaveolinu-2 působí jako inhibitor disociace GDP z vazebného místa pro guaninové nukleotidy na G α podjednotce (Li a kol., 1995), N-koncová část kaveolinu-3 potlačuje či stimuluje GTPasovou aktivitu G α podjednotky (Tang a kol., 1996).

Další důležitou složkou kaveol je cholesterol (5-cholesten-3 β -ol), obsahující tetracyklickou kostru s jednou hydroxylovou skupinou. Tato skupina zajišťuje cholesterolu 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. Cholesterol má vyšší afinitu ke sfingolipidům v doméně než k nenasyceným fosfolipidům v okolí domén (většinová membránová fáze). Odstraněním cholesterolu z kaveol dochází k disociaci většiny proteinů z domén, které se tak stávají nefunkčními a rozpadají se (Simons a Ehehalt, 2002). Cholesterol může být z domén odstraněn pomocí β -cyklodextrinu, 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu, methyl- β -cyklodextrinu, filipinem či saponinem (Simons a Ehehalt, 2002).

Kaveoly také obsahují dynamin, což je GTPasa o molekulové hmotnosti 100kDa (Shpetner a Vallee, 1989). Zprostředkovává odtržení/internalizaci kaveolárních vesikul z plasmatické membrány, tj. dodává energii pro přerušení kontinuity hydrofobní zóny kaveol s hydrofobní zónou většinové membránové fáze (Conrad a kol., 1995).

Kaveoly hrají důležitou roli v endocytóze, potocytóze a v buněčné signalizaci. Membránové mikrodomény jsou místa, kde jsou shromážděny signální bílkoviny. Tím dochází k zvýšení efektivity přenosu (amplifikace, znásobení signálu). Je tak zajištěna i prostorová separace (a naopak blízká funkční komunikace v případě potřeby) proteinů různých signálních kaskád. V závislosti na fyziologickém stavu buňky se mnohé signální proteiny mohou pohybovat mezi doménami a jejich okolím – většinovou membránovou fází (Simons a Ikonen, 1997).

Kaveoly se také podílí na regulaci signalizace přes trimerní G-proteiny. Studium funkční interakce mezi α podjednotkami G-proteinů a kaveolinu ukázalo, že tato interakce s α podjednotkami G_s, G_o a G_{i2} závisí na jejich funkčním stavu, kdy se kaveolin přednostně váže

k volné G α podjednotce s navázaným GDP. Kaveolin tedy brání reasociaci G α podjednotky a G $\beta\gamma$ dimeru (Li a kol., 1995; Murthy a Makhlouf, 2000).

Kaveolin obsahuje vazebné domény i pro další proteiny signálních kaskád. Interakce kaveolinu s těmito proteiny potlačuje jejich aktivitu. Příkladem může být proteinkinasa A (Razani a kol., 1999), proteinkinasa C α (Oka a kol., 1997), adenylylcyklasa (Toya a kol., 1998), GRK (Carman a kol., 1999) a mnoho dalších.

Ze signálních molekul se v kaveolách nacházejí také některé typy receptorů spřažených s G-proteiny. Např. hladina endothelinového ET_A-receptoru není závislá na působení agonisty (Chun a kol., 1994), β_1 -adrenergní receptor se přesouvá do domén nebo do jejich okolí v závislosti na aktivačním stavu (Rybin a kol., 2000).

Distribuce membránových domén na buněčném povrchu závisí na typu buňky. Polarizovaná distribuce membránových domén se vyskytuje u epiteliálních buněk a neuronů, zatímco v lymfocytech nebo fibroblastech jsou membránové domény rozptýlené po celém buněčném povrchu (Simons a Ikonen, 1997). Domény se specifickým lipidovým složením se nachází i v membránách Golgiho aparátu, s čímž souvisí jejich funkce v transportu a třídění nově syntetizovaných lipidů a proteinů z trans Golgiho aparátu do plasmatické membrány u epiteliálních buněk a neuronů (Brown a London, 1998; Simons a Ikonen, 1997; Simons a van Meer, 1988). Do buněk mohou být endocytovány samotné domény, které jsou pak přímo recyklovány zpět na povrch buňky nebo se vrací k němu vrací přes Golgiho aparát (Simons a Toomre, 2000).

Endocytóza pomocí kaveol není tak prozkoumaná jako endocytóza pomocí klathrinových váčků. Obě formy endocytózy se výrazně liší - internalizace pomocí kaveol je mnohem pomalejší (Smart a kol., 1999) a jsou blokovány různými inhibitory. Inhibitor fosfatas, kyselina okadaová inhibuje vznik klathrinových váčků, endocytózu pomocí kaveol naopak stimuluje (Parton a kol., 1994). Odstranění cholesterolu filipinem klathrinovou cestu neovlivňuje, avšak tvorbu kaveol blokuje (Schnitzer a kol., 1994). Společnou vlastností obou cest je účast dynaminu jako motoru pro oddělení membránového kontinua hydrofobní zóny buněčné membrány (Schnitzer a kol., 1996).

Za zmínku i stojí, že se kaveoly účastní i potocytózy, při které se kaveolární dutina uzavře, ale nedojde k oddělení váčku od plasmatické membrány jako u endocytózy. Transportovaná látka je do nitra buňky transportována s pomocí specifických přenašečů (Anderson a kol., 1992).

3.5. Desensibilizace

Při opakovaném nebo dlouhodobém působení signálu dochází ke snížení biologické odpovědi neboli desensibilizaci. Tento zpětnovazebný mechanismus rychle snižuje citlivost receptorů k signálu a chrání tak buňku před nadměrným drážděním a jejím poškozením. Molekulární mechanismy tohoto složitého děje probíhají na úrovni GPCR, G-proteinů i řady dalších signálních molekul. Vzhledem ke specifitě buněčné odpovědi na hormon lze desensibilizaci rozlišit na homologní a heterologní. Při homologní (specifické) desensibilizaci dochází ke snížení buněčné odpovědi pouze na hormon, který vyvolává primární stimulaci. Při heterologní desensibilizaci dochází ke snížení odpovědi na více hormonů (nespecifická, refraktilita). Při aktivaci receptoru vysokou koncentrací agonisty (příkladně β -AR dochází k fosforylaci receptoru s pomocí β -ARK (*β -adrenergic receptor receptor kinase*), která je specifická pro tento receptor. Následně dochází k desensibilizaci specifické kaskády iniciované tímto receptorem. Při nízké koncentraci ligandu může dojít ke zvýšení hladin cAMP a následně ke stimulaci cAMP-závislé protein kinázy (PKA). PKA je nespecifická a může tudíž fosforylovat a internalizovat i jiné receptory. Může tak dojít i k ovlivnění (snížení odpovědi) signálních kaskád stimulovaných jinými receptory. Takový mechanismus může sloužit pro vznik heterologní desensibilizace – aktivace jednoho receptoru vede k fosforylaci a internalizaci jiného typu receptoru, který daným agonistou aktivován není (Pierce, 2002).

3.5.1. Desensibilizace na úrovni receptorů

Tento mechanismus zahrnuje fosforylaci receptorů a jejich následné (funkční) rozpřažení od heterotrimerních G-proteinů (Bouvier a kol., 1988), internalizaci receptorů z plasmatické membrány do intracelulárních membránových kompartmentů (Hermans, 1997) a (konečně) degradaci receptorů v lysosomech (Doss a kol., 1981).

Internalizace (endocytóza) receptoru může probíhat různými způsoby – klathrinovou cestou, kaveolami nebo jinými neobalenými váčky (uncoated pits). Nejlépe prozkoumaný je klathrinová cesta. Rozpřažení receptorů s G-proteiny je důsledkem kovalentní modifikace receptorů po jeho fosforylaci pomocí intracelulárních kinas. Fosforylace receptoru probíhá na aminokyselinách serinu a threoninu třetí intracelulární smyčky a C-konce receptoru.

Existují dva typy proteinkinasy, které fosforylaci zajišťují:

- 1) proteinkinasy, jejichž aktivita je řízena intracelulárními hladinami druhých posílů (*second-messenger regulated kinases*) – PKA, PKC,
- 2) GRK (*G-protein-coupled receptor kinases*), které fosforylují pouze receptory obsazené atomistou (Lefkowitz, 1993).

Proteinkinasy A a C katalyzují přenos γ -fosfátu z ATP na serin nebo threonin, které se nacházejí ve specifické aminokyselinové sekvenci receptoru (většinou i3 a C-konec). Aktivace PKC vede k fosforylaci a desensibilizaci receptorů spřažených s G-proteiny třídy G_q a G_i (Diviani a kol., 1997).

Skupina GRKs obsahuje sedm členů. GRK1 (*rhodopsin kinase*) se nachází v sítnici (Shichi a Somers, 1978). GRK2 ovlivňuje β -adrenergní signalizaci v srdci a cévách (Rockman, 1998; Eckhart, 2002). GRK3 hraje důležitou roli v desensibilizaci čichových a muskarinových receptorů (Peppel, 1997; Walker 1999). GRK4 má vliv na hypertenzi a desensitizaci D1 dopaminergních receptorů (Felder a kol., 2002). Exprese GRK5 je vysoká v srdci a působí na β -adrenergní a muskarinové receptory (Rockman et al., 1996). GRK6 fosforyluje chemokinní receptor, který umožňuje lymfocytům odpovědět na chemotaktická činidla (Fong et al., 2002). GRK7 se stejně jako GRK1 nachází v sítnici oka a jsou to tedy kinasy specifické pro tyčinky a čípky (Hisatomi a kol., 1998).

Některé GRKs jsou vázány k plasmatické membráně pomocí kovalentní vazby jejich karboxylového konce na mastné kyseliny nebo polyisoprenoidy: GRK4 (Premont et al., 1996) a GRK6 (Stoffel et al., 1994) jsou palmitoylovány, GRK1 je farnesylována (Inglese et al. 1992).

GRKs jsou složeny ze tří domén. N-koncová doména je podobná RGS doméně, proto je nazývána RH (*RGS homology*) doména a působí jako GAP (*GTPase-activating protein*), inhibuje tedy aktivitu G_α podjednotky v tom smyslu, že snižuje rovnováhu mezi G_α -GTP a G_α -GDP. Centrální kinasová doména je katalytickým místem a interaguje s cytoplasmatickou oblastí 7TM receptorů. C-koncová doména GRKs se liší. GRK2 a GRK3 mají PH doménu, která se váže k $G\beta\gamma$ dimeru a PIP_2 , což umožňuje navázání GRKs k membráně. U dalších GRKs je za jejich navázání k membráně odpovědná jejich palmitoylace (GRK4, GRK6) nebo farnesylace (GRK1, GRK7) (Pitcher a kol., 1996; Stoffel a kol., 1999).

Fosforylace receptorů pomocí GRKs je nutným předpokladem pro následující vazbu β -arestinu, což je velká molekula, která mechanicky oddělí receptor od G-proteinu, a tak zabráni další interakci receptoru s G-proteinem (Ferguson, 1996). U savců jsou známy čtyři isoformy β -arestinu, které lze rozdělit do dvou skupin podle sekvenční homologie, funkce a

distribuce v tkáních. První skupina zahrnuje *visual* arestin (Shinohara et al., 1987) a *cone* arestin (Murakami et al., 1993). Nacházejí se pouze v sítnici (Smith, 1994; Craft, 1994). Druhou skupinu pak tvoří β -arrestin1 a β -arrestin2 (Lohse, 1990). Jsou lokalizovány v nervových tkáních a slezině (Attramadal et al., 1992).

β -arestin se poté váže k těžkému řetězci klathrinu a β 2-adaptorové podjednotce heterotetramerního AP2 adaptorového komplexu. Tím dochází k přesunu navázaného receptoru do klathrinem obalených jamek na povrchu membrány. Pomocí GTPasy dynaminu jsou klathrinové váčky odškrceny od membrány a receptor je internalizován do intracelulárních váčků (lehkých neboli malých vezikulů, endosomů) (Damke, 1994; Goodman, 1997; Krupnick a Benovic, 1998; Laporte, 2000). Receptory jsou dále buď defosforylovány pomocí fosfatas, které se nacházejí v endosomech (Pitcher a kol., 1995; Krueger a kol., 1997), anebo jsou, po splynutí endosomů s lysosomy, degradovány, tzv. *down-regulace* (Tsao a von Zastrow, 2002). Fosforylace a internalizace receptorů je velmi rychlý proces (v řádu sekund až minut), zatímco jejich degradace nastává až po několika hodinách působení agonisty.

Působením TRH na TRH-receptor dochází k internalizaci tohoto receptoru. Je pozorovatelná již po 1 minutě od počátku expozice cílové buňky hormonu. Již po jedné minutě dochází ke zvýšení fluorescečního signálu VSV-TRH-R-GFP proteinu (derivát přirozenou fluorescencí) uvnitř buněk, které exprimují tuto hybridní molekulu. Při delší inkubaci s TRH lze pozorovat i snížení fluorescečního signálu na povrchu buněk, který je velmi silný - dochází ke snížení množství TRH-receptoru na povrchu buněk - v plasmatické membráně (Drmotá a kol., 1998a). Internalisaci lze rovněž prokázat s pomocí vazebných studií s radioaktivně značeným TRH, kdy dochází k poklesu povrchových vazebných míst. Povrchová a nitrobuněčná vazebná místa lze rozlišit promytím ředěnou kyselinou chlorovodíkovou.

3.5.2. Desensibilizace na úrovni trimerních G-proteinů

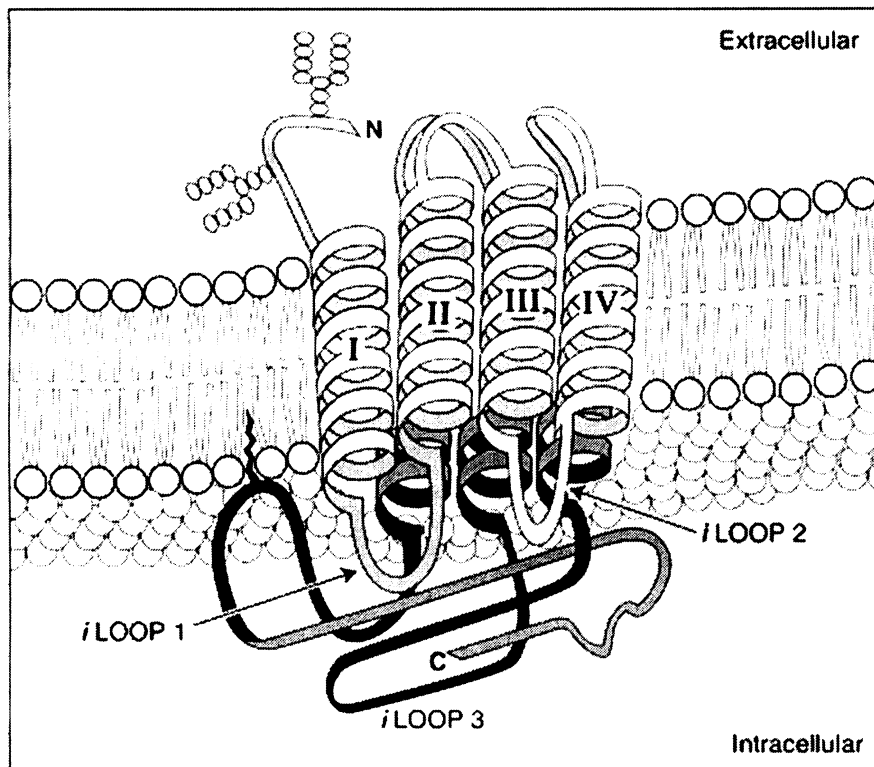
Dlouhodobá stimulace buňky vede také k poklesu G-proteinů v plasmatické membráně (Haraguchi a Rodbell, 1990) a později i k poklesu celkového množství G-proteinů v buňce (tzv. *downregulace*) (Mullaney a kol., 1993; Adie a Milligan, 1994). Tento pokles hladiny G-proteinu v plasmatické membráně může probíhat jednak jako přesun $G\alpha$ podjednotek do frakce lehkých vesikulů (nízkohustotních membránových frakcí), endosomů (Haraguchi a

Rodbell, 1990), a jednak jako přesun $G\alpha$ podjednotek do cytosolární frakce, solubilizaci (Lynch a kol., 1986).

V roce 1989 bylo poprvé prokázáno, že G-proteiny jsou z plasmatické membrány uvolněny přímým vlivem hormonálního působení (Ransnas a kol., 1989). Redistribuce trimerních G-proteinů byla poprvé zjištěna pomocí stimulace bílých tukových buněk isoproterenolem, což vedlo k translokaci $G_s\alpha$ a $G_i\alpha$ proteinů z plasmatické membrány do frakce lehkých vesikulů, endosomů (Haraguchi a Rodbell, 1990).

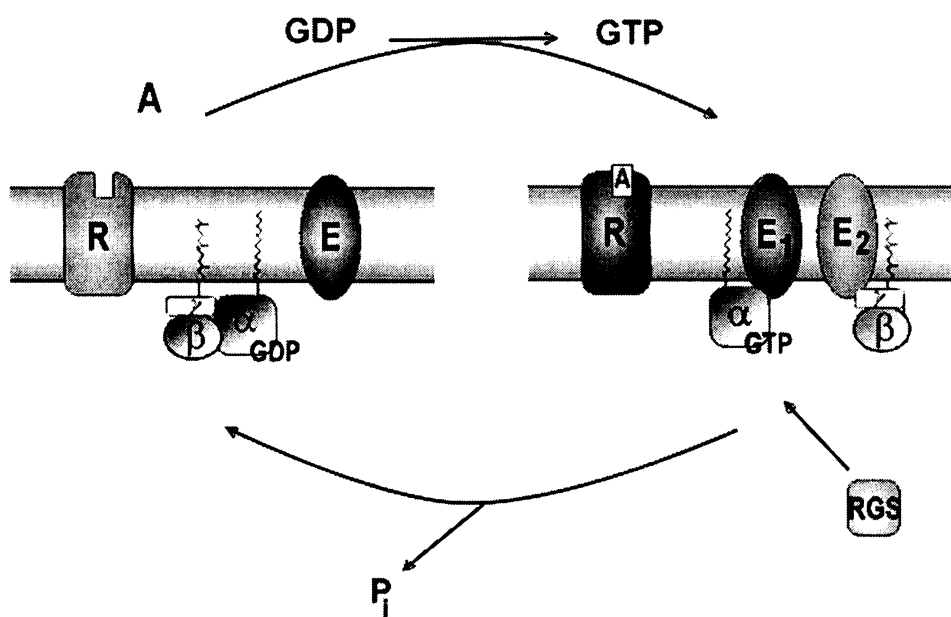
Později byla provedena řada pokusů na klonu odvozeném od buněčné linie HEK293 – buňky E2M11, který byl dvakrát transfekován a produkuje velké množství TRH-receptoru a myšího $G_{11}\alpha$ proteinu. Dlouhodobá stimulace těchto buněk agonistou TRH vede k přenosu exogenní (myší) a endogenní (lidské) formy $G_{11}\alpha$ proteinu z plasmatické membrány do membránových frakcí s nízkou hustotou. Současně dochází ke zvýšení obsahu tohoto proteinu v cytosolární frakci (supernatant 250000 x g) a následně k down-regulaci (Svoboda a kol., 1996).

Internalizace $G_{11}\alpha$ proteinu byla také ukázána pomocí imunofluorescenční mikroskopie (Drmota a kol., 1998b). Za kontrolních podmínek je fluorescenční signál $G_{11}\alpha$ proteinu lokalizován homogenně na povrchové buněčné membráně. Po 30-60 minutách inkubace s TRH dochází ke shlukování $G_{11}\alpha$ proteinu do diskrétních agregátů v rámci plasmatické membrány. Po 2-4 hodinách této inkubace dochází ke zvýšení intracelulárního fluorescenčního signálu v podobě drobných granulí a paralelnímu snížení fluorescence na povrchu buňky. Delší inkubace (8-16 hodin) vede k drastickému snížení fluorescenčního signálu $G_{11}\alpha$ proteinu na povrchu i uvnitř buněk (down-regulace).



Obr. 1. Schéma hypotetické organizace receptorů spřažených s G-proteiny - model savčího β_2 -adrenergního receptoru.

I - IV = transmembránové segmenty; iLOOP 1 - 3 = intracelulární smyčky; N = aminový konec; C = karboxylový konec; Extracellular = extracelulární prostor; Intracelullar = intracelulární prostor (Morris a Malbon, 1999).



Obr.2. Schéma signalizace pomocí GPCR a trimerních G proteinů

A – agonista; R – receptor; E – efektor; RGS – protein regulující signalizaci trimerními G proteiny; GTP – guanosintrifosfát; GDP-guanosindifosfát; α , β , γ – podjednotky trimerního G proteinu

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Chemikálie a materiál

Immobiline™ Dry Strips byly zakoupeny od firmy Amersham Biosciences (17-6001-13), fluorescenční barvy SYPRO^R Ruby Protein Stain (S12000) a Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (P33300) od firmy Molecular Probes; kit pro barvení stříbrem ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit (PROT-SIL2) byl zakoupen od firmy Sigma. Primární protilátky proti α podjednotce G-proteinů třídy G_q/G_{11} byly získány od Dr. Kovářů (LF UK, Praha). Sekundární podjednotky značené křenovou peroxidasou byly od firmy Amersham, substráty pro ECL od firmy Pierce. Nitrocelulosová membrána byla zakoupena od firmy Schleicher&Schuell. Materiál pro pěstování tkáňových kultur byl zakoupen u firem Sigma, Nunc a GIBCO.

4.2. Kultivace buněk

Pro pokusy byly použity buňky E2M11 odvozené z linie lidských embryonálních buněk ledvinového epitelu HEK293 (human embryonic kidney). Klon E2M11 je dvakrát tranfekován tak, aby stabilně exprimoval vysoké hladiny receptoru pro thyreoliberin (TRH) a $G_{11\alpha}$ proteinu (Svoboda a kol., 1996).

Buňky byly pěstovány v kultivačním médiu DMEM (Dublecco Eagle's modified medium) doplněném L-glutaminem o koncentraci 0,6 g/l a 8% tepelně inaktivovaným NCS (Newborn Calf Serum). Kultivace probíhala při teplotě 37°C v atmosféře s obsahem 5% CO₂ v kultivačních lahvích, jejichž plocha dna činila 80 cm². Pro udržení stabilní transfekce linií buněk bylo do média přidáván geneticin o koncentraci 0,8 mg/ml a hygromycin B o koncentraci 0,2 mg/ml.

Při 70-80% pokrytí dna byly buňky mechanicky sklizeny v PBS.

Složení PBS pufru

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

8,1 mM Na₂HPO₄

pH 7,2

Buněčná suspenze byla centrifugována 10 minut při 1800 otáčkách za minutu. Supernatant byl slit a sklizené buňky byly zmrazeny při -80°C .

Při sledování vlivu hormonu TRH na buněčné linie E2M11 byly buňky ovlivňovány $10\ \mu\text{M}$ TRH po dobu 16 hodin.

4.3. Homogenizace a stočení postnukleárního supernatantu

Sklizené buňky byly homogenizovány v homogenizačním pufru s 1 mM PMSF (fenylmetylsulfonylfluorid, inhibitor proteas) v Elvehjem-Potterově sklo-teflonovém homogenizátoru při vysokých otáčkách po dobu 5 minut při 0°C .

Složení homogenizačního pufru

20 mM Tris

3 mM MgCl_2

1 mM EDTA

0,15 M NaCl

pH 8,0

Homogenát byl stočen v mikrozkuvkách při 1500 otáčkách za minutu po dobu 3 minut na centrifuze Hettich Universal 30 RF. Od peletu (jádra) byl odebrán postnukleární supernatant, který byl zamražen při -80°C .

4.4. Stanovení množství proteinů

Pro zjištění množství proteinů ve vzorcích byl použit modifikovaný postup podle Lowryho (Lowry a kol., 1951). Jako standard kalibrační křivky byl použit BSA. Do jednotlivých zkuvek bylo napipetováno $10\ \mu\text{l}$ vzorku, doplněno do $500\ \mu\text{l}$ destilovanou vodou a přidáno 1,5 ml roztoku, který byl smíchán z 50 ml roztoku A, 1 ml roztoku B a 1 ml roztoku C.

roztok A 2% Na_2CO_3 a 0,1 M NaOH,

roztok B 2% Na,K tartát

roztok C 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Vzorky byly s tímto roztokem inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno $150\ \mu\text{l}$ Folinova činidla, které bylo zředěno 1:1 destilovanou vodou, vzorky ve zkuvkách krátce promíchány a inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla

měřena absorbance vzorků při 720 nm na spektrometru Beckman DU 530. Naměřená data byla vyhodnocena programem GraphPad Prism. Data kalibrační křivky byla proložena nelineární regresní analýzou podle rovnice $y=ax^2+bx+c$. Koncentrace proteinů jednotlivých vzorků byla odečtena z kalibrační křivky.

4.5. 2D elektroforesa

Tato metoda byla zavedena v roce 1975 (O'Farrell, 1975), kdy první rozměr separace proteinů probíhal v úzkých trubičkách v polyakrylamidovém gelu s amfoliny. Tyto amfoliny vytvořily pomocí elektrického proudu gradient pH. Vzorek byl aplikován na jednu stranu trubičky a dělen při vysokém napětí. Po proběhnutí isoelektrické fokusace byl gel z trubičky vytlačen a ekvilibrován ve vzorkovém pufru obsahujícím SDS. Poté byl gel umístěn na SDS elektroforesu ve vertikálním provedení. Separované proteiny byly detekovány autoradiografií. Už v této době bylo pomocí této techniky rozlišeno 1100 odlišných proteinů bakterie *Escherichia coli*.

Velmi důležitým krokem bylo zavedení imobilizovaných pH gradientů (IPG) v prvním rozměru, kdy byl gel v trubičkách nahrazen stripy, což jsou proužky z pevného plastického filmu s ukotveným akrylamidovým gelem, obsahující pufrující skupiny, Immobiliny (Bjellqvist, 1982). Immobilin je redukováná kyselina nebo báze, definovaná pomocí její hodnoty pK. V praxi jsou imobilizované gradienty připraveny směřováním dvou různých polymerizačních roztoků pomocí gradientítka, kdy jeden roztok obsahuje pufr vytvářející kyselý konec gradientu, druhý pufr vytvářející zásaditý konec gradientu.

I nadále byly 2D techniky zdokonalovány. Důraz byl kladen především na vyšší rozlišení a vyšší reprodukovatelnost výsledků. Velký rozvoj těchto technik je spojen s rozvojem proteomiky, která zahrnuje systematickou separaci, identifikaci a kvantifikaci proteinů. Pomocí 2D elektroforesy je možno oddělit tisíce proteinů a sledovat kotranslační a posttranslační modifikace proteinů, které nelze předpovědět z genetické sekvence. Dále lze aplikovat tuto metodu pro sledování a analýzu diferenciac buněk, detekce markerů chorob, monitorování terapie, výzkum rakoviny nebo kontrolu čistoty preparátu.

Příprava vzorku spočívá v solubilizaci TCA precipitátu, kdy jsou vzorky rozpuštěny ve vzorkovém pufru pro první rozměr. Tento krok je velmi důležitý, protože proteiny musí být plně degradovány a rozpuštěny. Z tohoto důvodu obsahuje vzorkový pufr ureu a minimálně jeden detergent. Urea solubilizuje a rozkládá většinu proteinů (Molloy a kol.,

1998). Pro vyšší solubilizaci membránových proteinů je do vzorkového pufru přidávána thiourea. Do solubilizačního roztoku se často přidává i redukční činidlo (např. DDT) k rozrušení disulfidových můstků. Amfoliny slouží ke zvýšení rozpustnosti proteinů tím, že zabraňují tvorbu agregátů na základě elektrostatických interakcí. Po solubilizaci vzorků jsou vzorky zapuštěny do IPG stripů – rehydratace IPG stripů. Dělení vzorku pomocí isoelektrické fokusace (první rozměr) je prováděno horizontálně při vysokých napětích za aktivního chlazení aparátu. Po rozdělení proteinů podle jejich pI jsou stripy ekvilibrovány nejprve v roztoku s DTT (dithiotreitol), který rozruší disulfidové můstky, a poté v roztoku s IAA (jodacetamid), který tyto rozrušené disulfidové můstky alkyluje. Stripy jsou po ekvilibraci umístěny pro dělení ve vertikálním směru za použití SDS polyakrylamidové elektroforesy (druhý rozměr). Posledním krokem je zviditelnění signálu pomocí Coomassie Brilliant Blue, stříbra, fluorescenčních barev nebo isotopů a následná analýza získaných výsledků.

Detekce proteinů

Po separaci proteinů pomocí 2D elektroforesy jsou pro jejich zviditelnění použity různé chemické metody. Jedná se o barvení pomocí organických barev, chelátů s kovy, fluorescenčních barev, stříbra, o označení vzorků pomocí fluoroforů nebo o použití autoradiografie. Všechny tyto metody se odlišují svou citlivostí a obnovením peptidů pro identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro kvantifikaci proteinů mají široký dynamický rozsah i lineární závislost mezi kvantitou proteinu a intenzitou barvení.

Coomassie Brilliant Blue

Jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci proteinů v polyakrylamidovém gelu je barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue (Fazekas de St. Groth a kol., 1963). Coomassie Blue je organický trifenylmethan a existuje ve dvou modifikacích: Coomassie R-250 (červený odstín) a Coomassie G-250 (zelený odstín), který obsahuje navíc dvě methylové skupiny. V kyselém prostředí interagují tyto barvy s aminoskupinami proteinů pomocí elektrostatických a hydrofóbních sil. Tato metoda ovšem postrádá reprodukovatelnost a není kvantitativní, protože v přítomnosti alkoholu během odbarvování pozadí uvolňují Coomassie Blue také některé proteiny. Dalším případem, proč není tato metoda kvantitativní, je, že se některé proteiny, např. kolagen, odbarvují rychleji než polyakrylamidový gel.

Více reprodukovatelná a citlivá je metoda barvení pomocí koloidní Coomassie Blue (Neuhoff a kol., 1988).

Nevýhodami těchto metod je časová náročnost, relativně nízká citlivost a nízký dynamický rozsah. Jsou ale využívány pro následnou analýzu proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Barvení stříbrem

Metoda barvení stříbrem byla poprvé použita v roce 1979 (Merrill a kol., 1979). Dnes existuje mnoho modifikací tohoto původního protokolu. Lze je rozdělit do tří skupin.

První skupinou je barvení agarosových gelů podle Kerenyie a Gallyase (Kerenyi a Gallyas, 1972). Toto barvení je sice velmi málo citlivé, nicméně je kompatibilní s hmotnostní spektrometrií.

Druhou skupinou je barvení pomocí dusičnanu stříbrného. Prvním krokem je zafixování proteinů v gelu a vmytí SDS a pufru. Pomocí glutaraldehydu jsou proteiny v gelu zesíťovány a poté sensitizovány pomocí thiosulfátu sodného. Po promytí gelů v roztoku dusičnanu stříbrného s nízkým obsahem formaldehydu jsou vyvolány pomocí formaldehydu v basickém prostředí (Heukeshoven a Dernick, 1985; Blum a kol., 1987). Pro analýzu hmotnostní spektrometrií nelze použít glutaraldehyd v sensitizačním roztoku a formaldehyd v roztoku dusičnanu stříbrného (Shevchenko a kol., 1996).

Poslední skupinou jsou metody barvení využívající komplexů stříbra a amoniaku. V těchto protokolech je často sloučena fixace gelů s jejich sensitizací. Gely jsou promyty v roztoku stříbra s amoniakem a vyvolány pomocí kyseliny citronové a formaldehydu. Vyvolávací reakce je ukončena přidáním kyseliny octové a ethanolaminu (Eschenbruch a Bürk, 1982; Rabilloud, 1992).

Nevýhodou těchto metod je změna intenzity obarvení mezi gely a nízký dynamický rozsah. Tato metoda není spolehlivá pro kvantifikaci výsledků.

Fluorescenční barvy

Fluorescenční barvení je velmi citlivé a zároveň spolehlivé pro kvantifikaci výsledků. Má široký dynamický rozsah. Výsledky jsou vysoce reprodukovatelné. První fluorescenčním barvením bylo Nile Red Staining (Bermudez a kol., 1994). Od té doby vzniklo mnoho dalších různých fluorescenčních barev.

Skupina barev Sypro (Orange, Red, Tangerine, Ruby) se vyznačují různou citlivostí a vlastnostmi (Steinberg a kol., 1996, Berggren a kol., 2002). Zatímco citlivost Sypro Orange, Red a Tangerine je podobná citlivosti Coomassie Blue, pomocí Sypro Ruby lze detekovat i množství 1 ng proteinu. Sypro Ruby je založena na bázi ruthenia (Rabilloud a kol., 2001).

Mnohem vyšší citlivost (100 pg) než Sypro Ruby má barva zvaná Deep Purple, která obsahuje fluorofor *epicocconone* z houby *Epicoccum nigrus* (Mackintosh a kol., 2003).

Důležité je také studium posttranslačních modifikací, jako je glykosylace a fosforylace. Pro detekci glykoproteinů se užívá Schiffovo činidlo (Zacharius a kol., 1969), pro detekci fosfoproteinů fluorescenční barva zvaná Pro-Q Diamond (Steinberg a kol., 2003).

Označení proteinů pomocí fluoroforů

Před samotnou separací proteinů pomocí 2D elektroforesy lze vzorky označit pomocí fluorescenčních barev. Toto fluorescenční značení vykazuje vysokou citlivost a široký dynamický rozsah. Metoda nazvaná DIGE – „difference gel electrophoresis“ – využívá tři fluorescenčních barev s odlišnými excitačními a emisními vlnovými délkami (Ünlü a kol., 1997). Vzhledem k vyloučení variací mezi gely lze díky této metodě získat přesné kvalitativní a kvantitativní výsledky.

Značení isotopy

Radioaktivní značení neboli autoradiografie je velmi citlivá metoda. Značení se provádí pomocí ^{35}S -methioninu a/nebo ^{32}P -ortofofosfátu. Lze také označit proteiny pomocí ^{125}I nebo alkylovat cysteinové zbytky ^{14}C - nebo ^3H -jodacetamidem.

Technika přenosu proteinů na membránu

Proteiny mohou být po elektroforetickém rozdělení přeneseny na membránu z nitrocelulosity nebo polyvinylidenfluoridu.

Pro obarvení všech proteinů na membráně se užívají barvy Ponceau red, Amido Black, Fast Green a Indian ink, pro větší citlivost pak koloidní zlato, Deep Purple, Sypro Rose a Sypro Ruby. Pro obarvení fosfoproteinů a glykoproteinů mohou být aplikována stejná barvení jako v případě gelů.

Proteiny na membráně lze také detekovat pomocí protilátek, tzv. imunodetekce neboli Western blotting.

Porovnání barvení stříbrem a barvení pomocí SYPRO Ruby

Barvení gelů stříbrem a Sypro Ruby jsou v současné době velmi často používané metody. Obě barvení se vyznačují vysokou citlivostí, lze jimi detekovat 1 ng proteinu. Liší se však lineárním dynamickým rozsahem. To je podíl integrovaných intenzit nejvíce a nejméně intenzivních spotů. Barvení pomocí Sypro Ruby je lineární přibližně od 1-2 ng do 1-2 μg

proteinu, zatímco barvení pomocí stříbra od 8 ng do 60 ng proteinu (Berggren a kol., 2000). Lineární dynamický rozsah je mnohem vyšší u Sypro Ruby. Kvantitativní rozdíly v expresi proteinů jsou tedy snáze detekovatelné. Barvení pomocí Sypro Ruby je více reprodukovatelné než u barvení stříbrem. Jak již bylo poznamenáno výše, barvení gelů stříbrem není kompatibilní s hmotnostní spektrometrií.

4.5.1. Příprava vzorku pro 2D elektroforesu

Ze vzorku postnukleárního supernatantu o známé koncentraci bílkovin byl na jeden strip odebrán objem, který obsahoval příslušné množství bílkovin. Pro barvení stříbrem bylo na jeden strip použito 400 µg vzorku, pro fluorescenční barvení 100 µg. Toto odebrané množství bylo naředěno destilovanou vodou do objemu 90 µl a pro precipitaci vzorku přidáno 30 µl 24 % kyseliny trichloroctové (TCA), tedy v poměru vzorek:TCA 3:1. Vzorek byl srážen 60 minut na ledu v lednici.

Po vysrážení bílkovin byl vzorek 10 minut centrifugován v centrifuze vychlazené na 4°C při 10 000 otáčkách za minutu. Supernatant byl odlit a k peletu bylo přidáno 200 µl ledového ethanolu. Pelet s ethanolem byl krátce promíchán a opět 10 minut centrifugován v centrifuze vychlazené na 4°C při 10 000 otáčkách za minutu.

Byl připraven vzorkový pufr.

Složení 1 ml vzorkového pufru

7 M močovina	420,7 mg
2 M thiomočovina	152,2 mg
4% CHAPS	40 mg
dithiotreitol (DTT)	10 mg
1% amfoliny	10 µl
bromfenolová modř	1 mg

Po centrifugování vzorku s ethanolem byl supernatant odebrán a ke každému vzorku přidáno 250 µl vzorkového pufru. Poté probíhala solubilizace vzorků po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Pro lepší solubilizaci byly vzorky promíchány a resuspendovány ustříženou špičkou.

Po solubilizaci byl každý vzorek krátce stočen na malé centrifuze, čímž byly odstraněny shluky proteinů, které vedou ke špatné fokusaci vzorku, a nanесeny do jednotlivých žlábků rehydratační vaničky Immobilin DryStrip Reswelling Tray (Amersham Pharmacia). Na vzorky v rehydratační vaničce byly přeneseny stripy gelem dolů.

Pomocí jehly byly odstraněny bubliny mezi gelem stripu a vzorkem. Vanička byla uzavřena, aby vzorky nevysychaly. Rehydratace stripů probíhala 16 hodin při laboratorní teplotě.

4.5.2. Isoelektrická fokusace

Pro všechny experimenty byly vzorky při isoelektrické fokusaci rozděleny na lineárním pH gradientu 4 - 7.

Po rehydrataci vzorků byly na aparaturu Multiphore II (Amersham Pharmacia) přeneseny stripy gelem nahoru tak, aby bazický konec směřoval ke katodě a kyselý konec k anodě. Na konce stripů byly položeny elektrodové papírové stripy o délce 11,5 cm, které byly napuštěny 700 μ l destilované vody. Po zapojení chlazení na 15 °C byl nastaven zdroj EPS 3501XL na program pro isoelektrickou fokusaci podle následujícího schématu:

napětí	čas
150 V	1 Vh
150 V	750 Vh
500 V	500 Vh
3500 V	10 kVh
3500 V	32 kVh
500 V	6000 Vh

Po 6-8 hodinách byl průběh isoelektrické fokusace přerušen a každý papírový strip zvlhčen 200 μ l destilované vody. Poté byla isoelektrická fokusace opět spuštěna. Isoelektrická fokusace probíhá celkově cca 24 hodin. Stripy po isoelektrické fokusaci byly buď ihned použity nebo zataveny do fólie a uloženy v mrazicím boxu při -20°C.

4.5.3. Ekvilibrace stripů

Pro ekvilibraci stripů v dithiotreitolu (DTT) a jodacetamidu (IAA) byl použit ekvilibrační roztok.

Složení ekvilibračního roztoku

- 2% SDS
- 6 M urea
- 0,1 mM EDTA (chelaton 3)
- 0,01% bromfenolová modř
- 50 mM Tris HCl (pH 6,8)

30 % glycerol

Byly připraveny dva ekvilibrační roztoky, z nichž první obsahoval 1 % (w/v) dithiotreitol a druhý obsahoval 2,5 % (w/v) jodacetamid. Stripy po isoelektrické fokusaci byly promyty nejprve ve 4 ml ekvilibračního roztoku s DTT 15 minut na třepačce. Poté byly promyty ve 4 ml ekvilibračního roztoku s IAA opět 15 minut na třepačce.

4.5.4. SDS-polyakrylamidová elektroforesa

Pro dělení ve druhém rozměru 2D-elektroforesy byla použita SDS-polyakrylamidová elektroforesa, která probíhala v aparatuře Hoefer SE 600 (velikost skel 18x16 cm; Amersham Pharmacia). Pro dělení bílkovin jsem použila 10% základní gel (výška 12 cm). Složení 10% základního gelu (uvedeno množství pro nalití 4 gelů, velikost 1 gelu 15x11 cm, šířka 1 mm) bylo následující:

41,6 ml destilované vody

26 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (*lower buffer*), dolní pufr

34,8 ml 30% akrylamidu s 0,8% N,N'-methylen bis-akrylamidem

1040 μ l 10% SDS

470 μ l 10% APS (persíran amonný)

40 μ l TEMED

Gel byl převrstven 300 μ l nasyceného vodného roztoku butanolu a ponechán 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po polymerování byl gel promyt od butanolu a převrstven zaostřovacím gelem do výšky 3 cm od základního gelu. Složení 4% zaostřovacího gelu:

24 ml destilované vody

10 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (*upper buffer*), horní pufr

5,2 ml 30% akrylamidu s 0,8% N,N'-methylen bisakrylamidem

400 μ l 10% SDS

360 μ l 10% APS

32 μ l TEMED

Po odmytí butanolu byl na levý kraj zaostřovacího gelu vsunut *spacer* pro vytvoření jamky pro standard molekulových hmotností. Zaostřovací gel byl opět přelit nasyceným vodným roztokem butanolu.

Stripy byly po ekvilibraci vloženy mezi skla na gel směrem kyselou oblastí stripu k jamce standardu. Aparatura byla zapojena ke zdroji EPS 3501XL (High-voltage). První fáze

probíhala 20 minut při 20 mA (pro 4 gely zapojené v sérii). Poté byla elektroforesa přerušena a do jamek byl přidán standard v množství 3 µl. Dělení bílkovin probíhalo 2,5-3 hodiny při 80 mA (pro 4 gely zapojené v sérii) za intenzivního chlazení. Elektroforesa probíhala v předem vychlazeném elektroforetickém pufru (tzv. nádobový pufr, *running buffer*):

Složení elektroforetického pufru

25 mM Tris-HCl

188 mM glycin

0,1 % SDS

Elektroforesa byla ukončena ve chvíli, kdy čelo dosáhlo výšky 1 cm od spodního okraje skel. Gely byly následně buď vloženy do fixačního roztoku anebo přeneseny na nitrocelulosoovou membránu.

4.5.5. Barvení gelů stříbrem

Pro barvení gelů stříbrem byl použit ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit (obsahující *sensitizer solution*, *silver solution*, *developer solution* a *stop solution*). Po rozdělení bílkovin při elektroforéze byly gely vloženy do 125 ml fixačního roztoku obsahujícího 40% ethanol, 10% kyselinu octovou, 50% destilovanou vodu. V tomto roztoku byly gely vždy nechány přes noc, příp. i déle, do samotného barvení.

Barvení probíhalo na třepačce při mírných otáčkách v digestoři. Pro přípravu roztoků byla vždy použita deionizovaná voda. *Sensitizer solution*, *silver solution* a *developer solution* byly před použitím promíchány. *Developer solution* byl připravován 15 minut před použitím.

Postup barvení obsahoval tyto kroky (množství pro jeden gel)

- 1) promývání ve 100 ml 30% ethanolu po dobu 10 minut
- 2) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 10 minut
- 3) promývání ve 100 ml roztoku, obsahujícího 1 ml *sensitizer solution*, po dobu 10 minut
- 4) 2x promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 10 minut
- 5) promývání ve 100 ml roztoku, obsahujícího 1 ml *silver solution*, po dobu 10 minut
- 6) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 1 minuty
- 7) promývání ve 100 ml roztoku, obsahujícího 5 ml *developer solution* 1 a 0,1 ml *developer solution* 2, po dobu 3-7 minut dle potřeby
- 8) přidání 5 ml *stop solution* do roztoku, obsahující *developer solution*, inkubace 5 minut
- 9) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 15 minut

Gely byly dále uchovávány ve vodě nebo ihned usušeny. Před sušením byly gely promývány 20 minut v sušícím roztoku, obsahujícím 25% methanol a 3% glycerol a poté sušeny v celofánu na sušičce 75 minut při 80°C.

4.5.6. Barvení gelů pomocí fluorescenčních barev

Pro detekci všech proteinů byla použita fluorescenční barva Sypro Ruby, pro detekci fosforylovaných proteinů Pro-Q Diamond. Po ukončení elektroforesy byly gely vloženy do fixačního roztoku, obsahujícího 50% methanol a 10% octovou kyselinu, na dobu 30 minut a poté přeneseny do čerstvého fixačního roztoku a v něm ponechány přes noc. Po promytí gelů deionizovanou vodou 3x10 minut byly barveny v 160 ml Pro-Q Diamond po dobu 2 hodin. Pozadí bylo odbarveno pomocí odbarvovacího roztoku, obsahujícího 20 % acetonitril a 50 mM acetát sodný. Před skenováním byly gely promyty deionizovanou vodou 2x5 minut. Po naskenování gelů v Pro-Q Diamond byly dále barveny přes noc v 80 ml Sypro Ruby. Po obarvení byly promyty v 10 % methanolu a 7 % octové kyselině po dobu 30 minut a před skenováním opět v deionizované vodě 2x5 minut.

Skenování gelů probíhalo na *skeneru* Molecular Imager FX ProPlus od firmy BioRad pomocí programu PDQuest 7.3.1. Basic, rovněž od Bioradu. Excitační vlnová délka 532 nm a emisní vlnová délka 555 nm byly použity jak pro skenování gelů obarvených v Sypro Ruby, tak v Pro-Q Diamond. Gely byly skenovány při rozlišení 100 mikrometrů a střední intenzitě.

4.5.7. Technika imunoblot (western blotting)

Pro analýzu elektroforeticky rozdělených proteinů byla použita technika imunoblotu (tzv. Western blotting). Přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu probíhal v aparatuře Hoefer 1,5 hodiny při 1300 mA v *blotovacím* pufu.

Složení *blotovacího* pufu

25 mM Tris-HCl

192 mM glycin

20% methanol

doplnit destilovanou vodou do 1 litru

Pro následující inkubace byl připraven 10x koncentrovaný TBS pufr (pH 8,0)

Složení TBS pufu

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

V dalším stupni bylo provedeno vysycení bílkovinou neobsazených vazebných míst na nitrocelulose nespecifickými bílkoviny, tzv. *blokace*. Po opláchnutí v destilované vodě byla membrána inkubována přes noc v *blokovacím* pufru obsahujícím

5 % sušené nízkotučné mléko

1 % Tween 20

v 50 ml roztoku/pufu TBS

Následující den byla opláchnuta destilovanou vodou a inkubována 2 hodiny v primárních protilátkách anti-G_{q/11} (84/1) naředěné 5000x v promývacím pufru obsahujícím

1% sušené nízkotučné mléko

1 % Tween 20

v konečném objemu 50 ml TBS

Primární protilátky proti α podjednotce G-proteinů třídy G_q/G₁₁ jsou obsaženy v králíčím séru, které bylo získáno imunizací proti peptidu, jehož sekvence je identická s C-koncovým deka-peptidem těchto G α podjednotek

Po opláchnutí membrány destilovanou vodou byla membrána 3x promyta po dobu 10 minut ve 100 ml promývacího pufru (washing buffer) obsahujícího detergent - 3% Tween 20 v TBS. Membrána byla opět opláchnuta destilovanou vodou a následně inkubována 1 hodinu se sekundárními protilátkami anti-rabbit IgG značenými křenovou peroxidasou, naředěnými 40 000x v TBS (metoda nazývaná ECL, *enhanced chemiluminescence*).

Po inkubaci membrány se sekundárními protilátkami a následném opláchnutí destilovanou vodou byla membrána opět promývána 3x po dobu 10 minut ve 100 ml promývacího pufru. Poté byla membrána vysušena pomocí filtračního papíru a pokryta 1 ml substrátu pro křenovou peroxidasu (substrát Pierce-Super Signal) po dobu 1 minuty. V temné komoře byl k membráně přiložen film (Kodak: X-OMAT K film), který byl vyvolán na vyvolávacím přístroji Optimax (Fomei). Doba expozice byla 10 minut.

4.5.8. Analýza 2D map

Naskenované gely byly hodnoceny pomocí programu PDQuest od firmy BioRad. Po detekci skvrn byl programem vytvořen tzv. *master gel*, který je společným průnikem všech bodů zobrazených při analýze všech 2D map kontrolních a hormonem ovlivněných vzorků, tzn. byly vyloučeny skvrny přítomné pouze ojedinele na některých 2D mapách. Poté byly

porovnávají 2D mapy kontrolních vzorků a 2D mapy hormonem ovlivněných vzorků, čímž byly zdetekovány kvalitativní a kvantitativní změny.

5. VÝSLEDKY

5.1. Rozlišení α podjednotek G-proteinů třídy G_q/G_{11} pomocí 2D elektroforesy

Pro identifikaci $G\alpha$ proteinů třídy $G_{q/11}$ u kontrolních buněk a buněk ovlivněných TRH byla použita separace proteinů pomocí 2D elektroforesy a po následném přenosu na nitrocelulosoovou membránu vyvolání pomocí specifických protilátek a metody ECL.

U kontrolního vzorku byly identifikovány pět bodů odpovídajících $G_{q/11}\alpha$ proteinům (Obr. 3). U vzorku buněk ovlivněných TRH byly identifikovány pouze tři body (Obr. 4). Zároveň zde byla také zjištěna snížená intenzita těchto bodů. Po působení TRH byly tedy pomocí imunodetekce zaznamenány výrazné změny v hladinách α podjednotek $G_{q/11}$ proteinů jak v kvalitativním měřítku, tak i kvantitativním.

5.2. Porovnání celkového proteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyreoliberinem

Dalším úkolem bylo porovnat proteinové složení buněk za kontrolních podmínek a buněk ovlivněných TRH. Po separaci proteinů pomocí 2D elektroforesy byly gely obarveny a následně vyhodnoceny pomocí programu PDQuest. Pro hodnocení bylo k dispozici 8 dvojic gelů, přičemž každá dvojice obsahovala gel se vzorkem kontrolních buněk a gel se vzorkem buněk ovlivněných TRH.

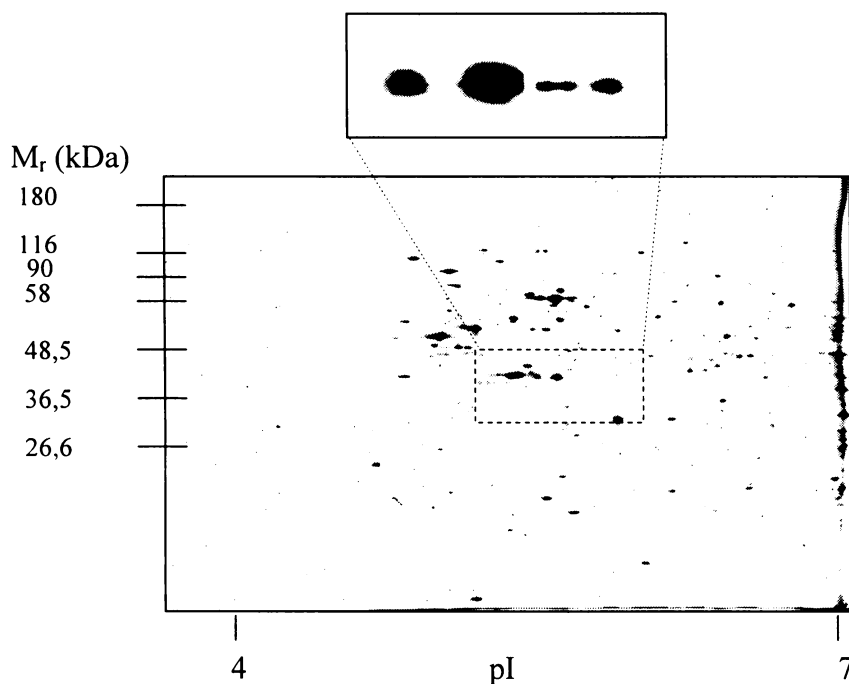
V první fázi byly gely barveny pomocí stříbra (Obr. 5, Obr. 6). Vzhledem k malému dynamickému rozsahu stříbra byla věnována pozornost pouze kvalitativním změnám. Bylo rozlišeno celkem 263 proteinů. Kvalitativní změny nebyly nalezeny žádné.

V další fázi byly gely barveny fluorescenční barvou Sypro Ruby (Obr. 7, Obr. 8), pomocí níž lze na rozdíl od stříbra detekovat kvantitativní změny. Tímto barvením bylo rozlišeno celkem 217 proteinů a byly identifikovány čtyři změny (Obr. 11). Kvantitativní změna byla nalezena u 2 skvrn, v oblasti pI 4,8 – 5,0 a molekulové váhy 30 kDa. Intenzita skvrn byla vyšší u vzorku buněk ovlivněných TRH. Překvapivě byly po obarvení gelů pomocí Sypro Ruby nalezeny také 2 kvalitativní změny. Jedná se o skvrny v oblasti pI 5,0 a molekulové váhy 40 kDa, vyskytující se u kontrolních buněk. U vzorku buněk ovlivněných TRH tyto proteiny nejsou (Tab. 1).

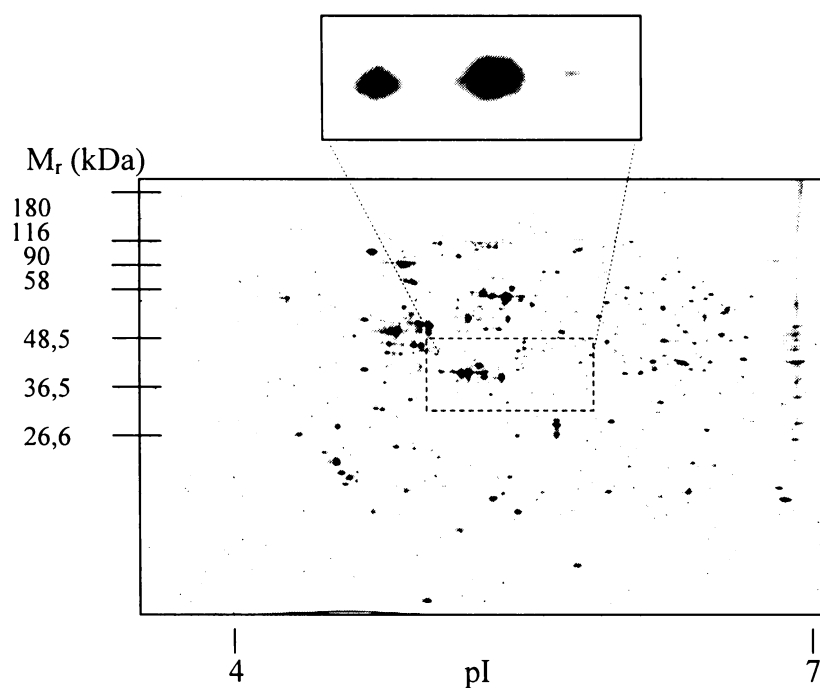
5.3. Porovnání fosfoproteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných thyreoliberinem pomocí fluorescenčního barvení

Další součástí této práce je porovnání fosfoproteinového složení kontrolních buněk a buněk ovlivněných TRH. Opět byly proteiny separovány pomocí 2D elektroforesy a dále barveny pomocí fluorescenční barvy Pro-Q Diamond (Obr. 9, Obr. 10). Pro hodnocení pomocí PDQuestu bylo jako u předchozích pokusů k dispozici 8 dvojic gelů.

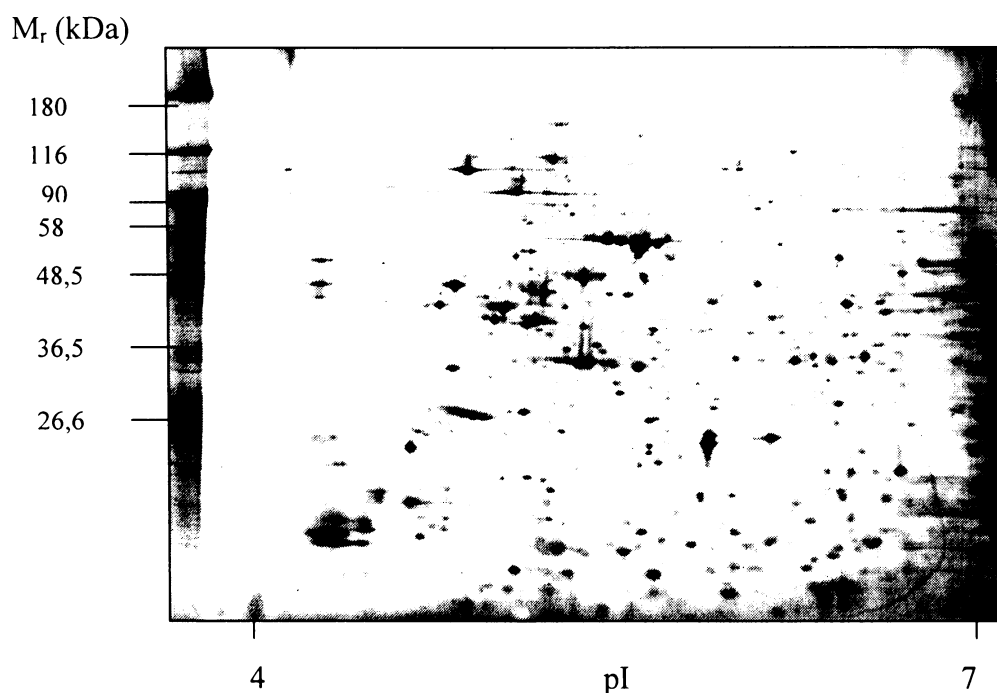
Bylo rozlišeno celkem 118 fosfoproteinů. V tomto případě byly identifikovány 4 kvalitativní a 3 kvantitativní změny (Obr. 12). Jedna kvalitativní změna se nacházela okolo pI 5,5 a molekulové váhy 80 kDa a další tři se nacházely blízko sebe v rozmezí pI 5,1 – 5,4 molekulové váhy 60 kDa. Tyto 4 proteiny, u nichž byla zaznamenána kvalitativní změna, se nacházely na 2D mapách kontrolního vzorku. Kvantitativní změny byly nalezeny u dvou proteinů v rozmezí pI 5,2 – 5,5 a okolo molekulové váhy 65 kDa, třetí pak u proteinů s pI 5,0 a molekulovou váhou 35 kDa. Intenzita těchto skvrn byla vyšší u vzorku buněk ovlivněných TRH (Tab. 2).



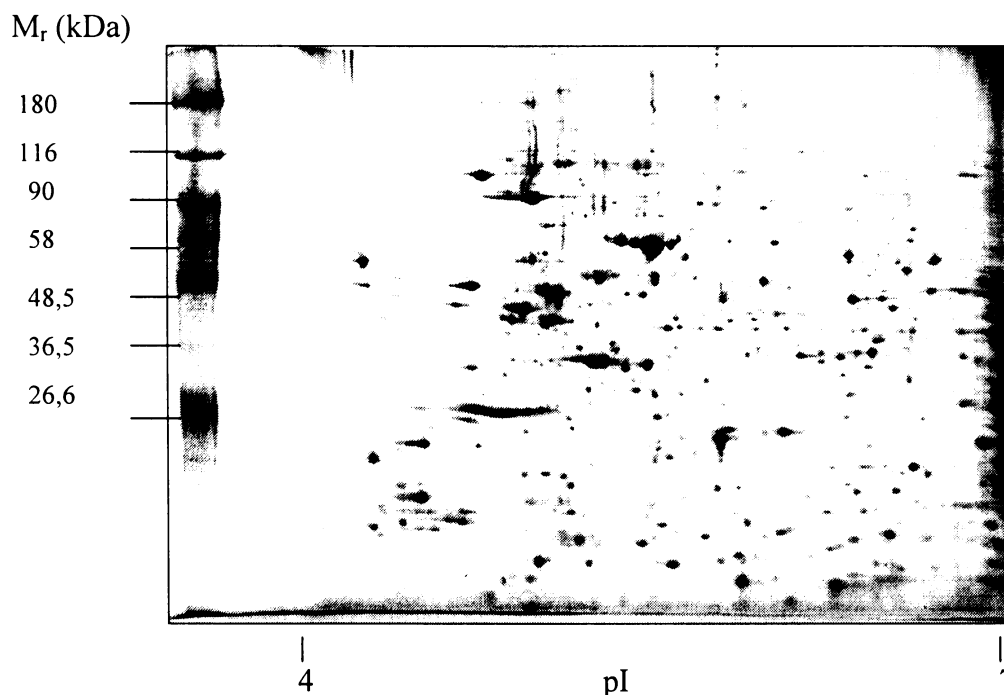
Obr. 3. 2D separace proteinů kontrolního vzorku buněčné linie HEK293-E2M11. Horní panel ukazuje reprezentativní 2D Western blot α podjednotek $G_{q/11}$ proteinů. Spodní panel představuje reprezentativní 2D mapu celkového proteinového složení této buněčné linie a přibližnou oblast výskytu $G_{q/11}\alpha$ proteinů na této 2D mapě.



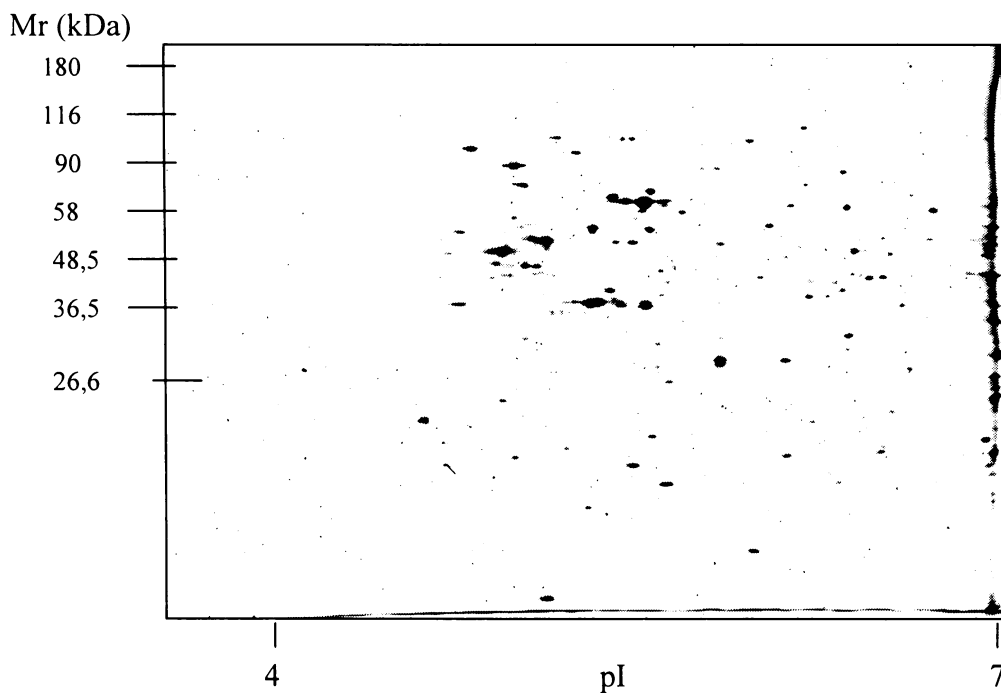
Obr. 4. 2D separace proteinů vzorku hormonem ovlivněných buněk ($TRH 10^{-5} M$, 16 hodin) buněčné linie HEK293-E2M11. Horní panel ukazuje reprezentativní 2D Western blot α podjednotek $G_{q/11}$ proteinů. Spodní panel představuje reprezentativní 2D mapu celkového proteinového složení této buněčné linie a přibližnou oblast výskytu $G_{q/11}\alpha$ proteinů na této 2D mapě.



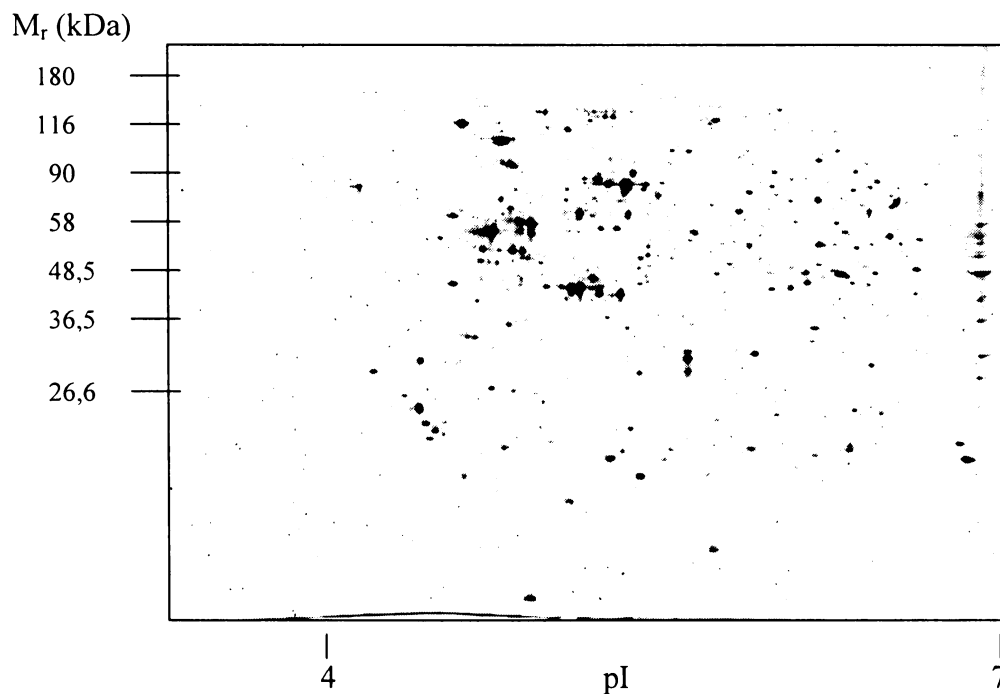
Obr. 5. Reprezentativní 2D mapa celkového proteinového složení kontrolního vzorku buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení gelů stříbrem.



Obr. 6. Reprezentativní 2D mapa celkového proteinového složení vzorku hormonem ovlivněných buněk (TRH 10^{-5} M, 16 hodin) buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení gelů stříbrem.

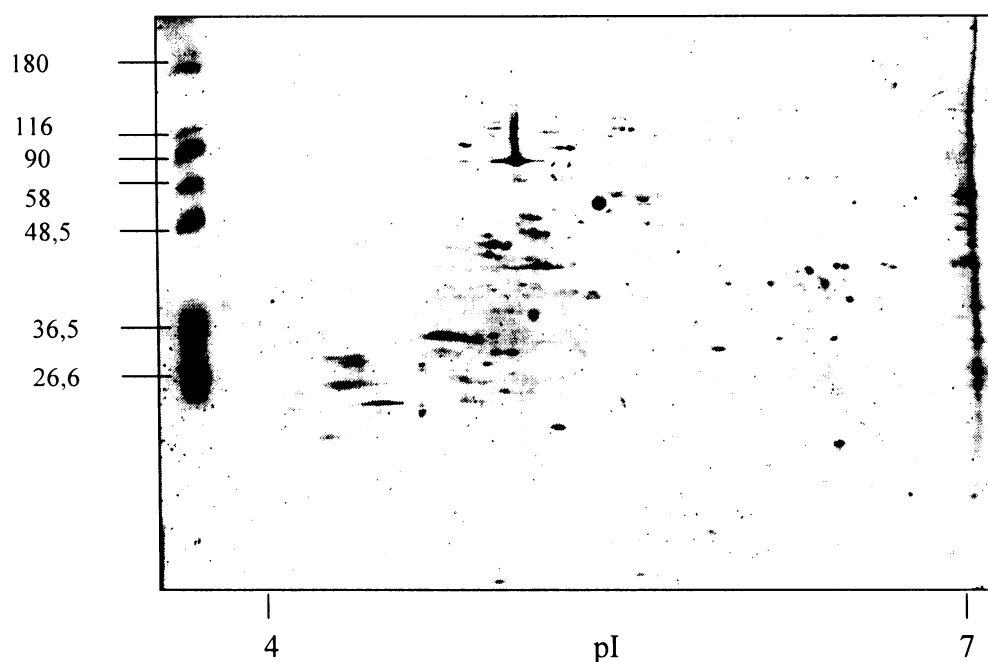


Obr. 7. Reprezentativní 2D mapa celkového proteinového složení kontrolního vzorku buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení gelů fluorescenční barvou Sypro Ruby.



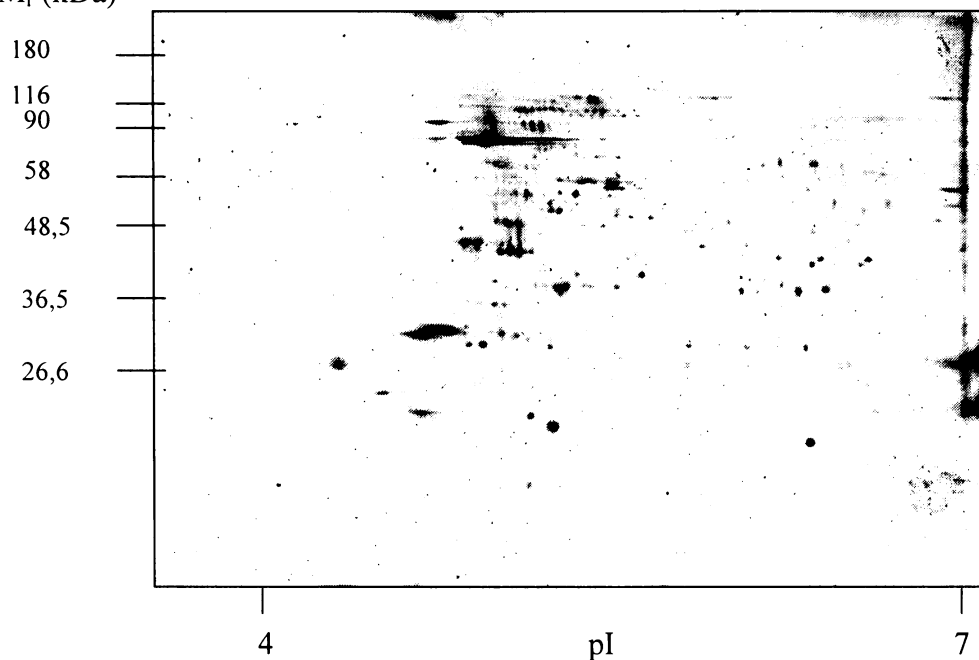
Obr. 8. Reprezentativní 2D mapa celkového proteinového složení vzorku hormonem ovlivněných buněk ($\text{TRH } 10^{-5} \text{ M}$, 16 hodin) buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení gelů fluorescenční barvou Sypro Ruby.

M_r (kDa)

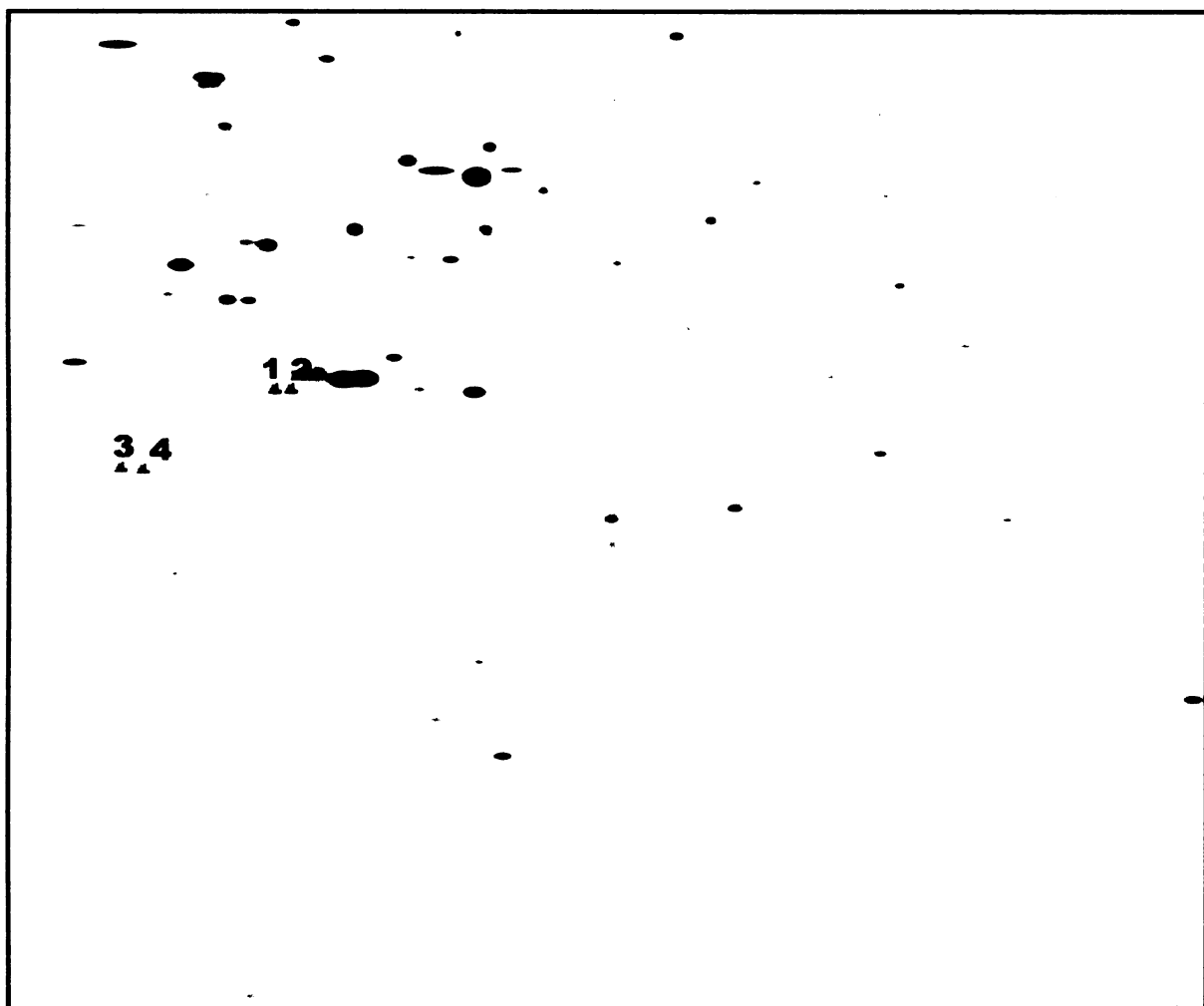


Obr. 9. Reprezentativní 2D mapa fosfoproteinového složení kontrolního vzorku buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení gelů fluorescenční barvou Pro-Q Diamond.

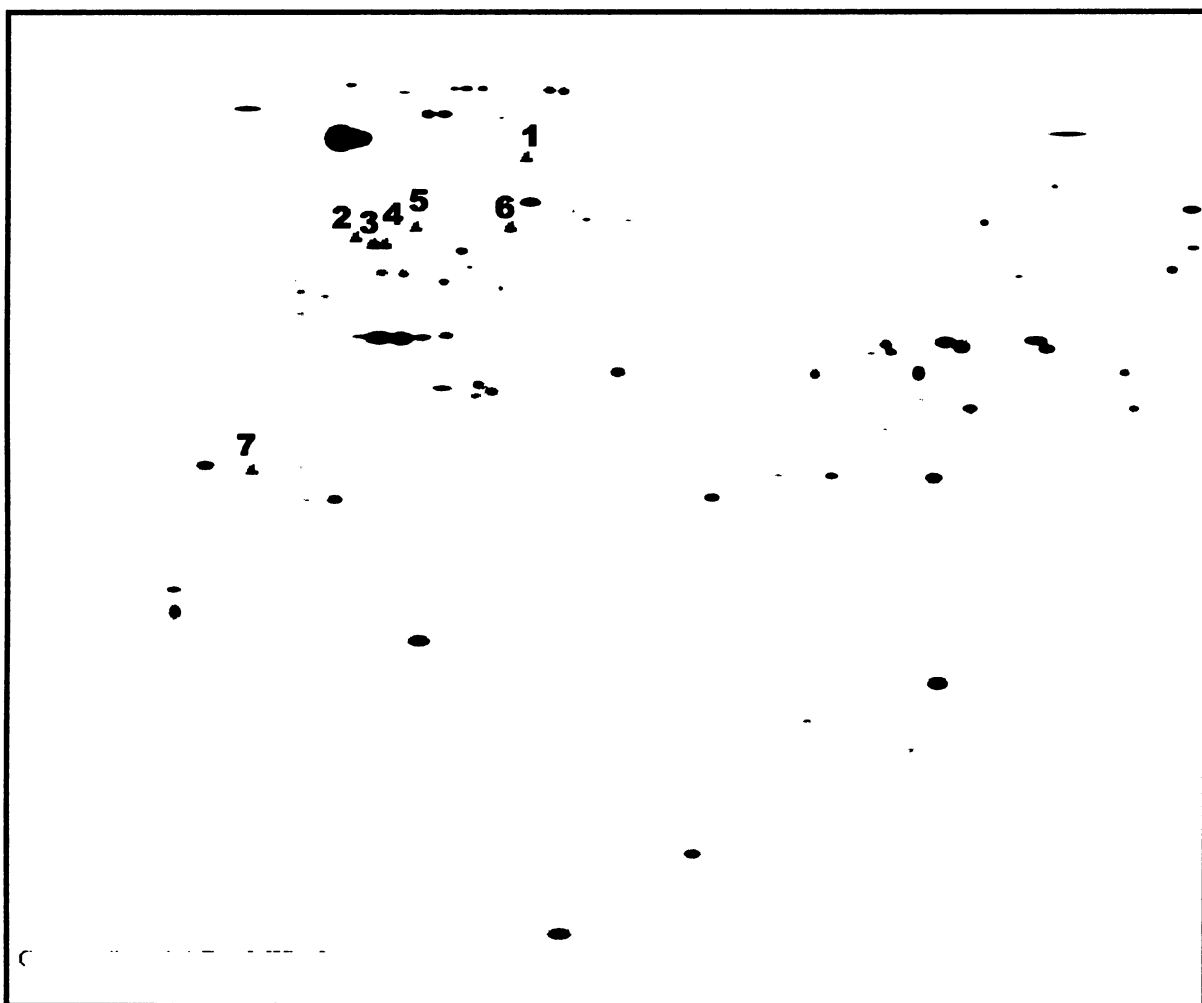
M_r (kDa)



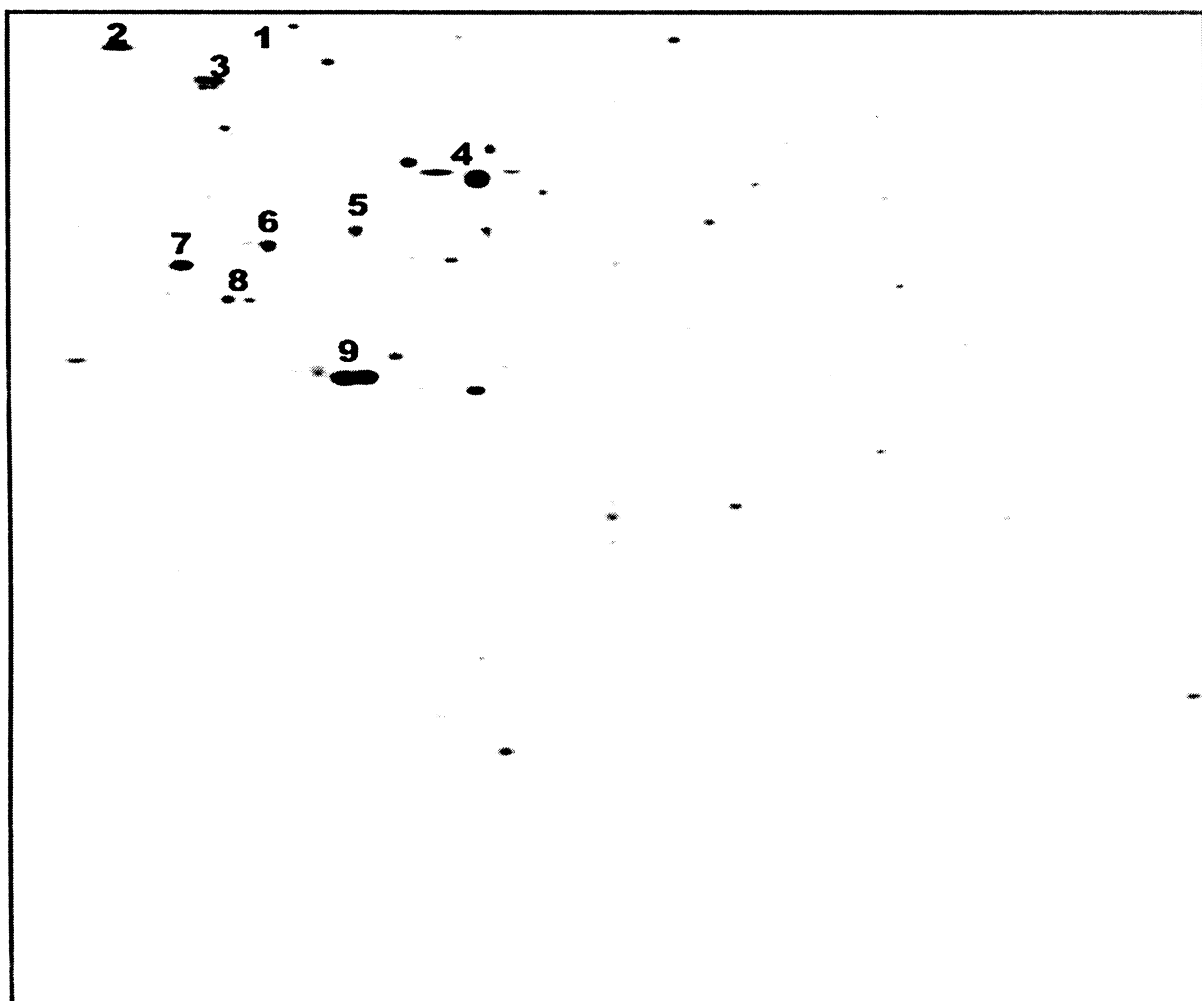
Obr. 10. Reprezentativní 2D mapa fosfoproteinového složení vzorku hormonem ovlivněných buněk ($TRH 10^{-5} M$, 16 hodin) buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení gelů fluorescenční barvou Pro-Q Diamond.



Obr. 11. Master gel proteinového složení buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení fluorescenční barvou Sypro Ruby s vyznačenými kvalitativními (skvrny označené čísly 1 a 2) a kvantitativními (skvrny označené čísly 3 a 4) změnami.



Obr. 12. Master gel fosfoproteinového složení buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení fluorescenční barvou Pro-Q Diamond s vyznačenými kvalitativními (skvrny označené čísly 1 - 4) a kvantitativními (skvrny označené čísly 5 - 7) změnami.



Obr. 13. Master gel proteinového složení buněčné linie HEK293-E2M11 po barvení fluorescenční barvou Sypro Ruby. Vyznačené skvrny reprezentují některé majoritní proteiny.

Tab. 1. Kvalitativně a kvantitativně změněné proteiny kontrolního vzorku a vzorku hormonem ovlivněných buněk (TRH 10^{-5} M, 16 hodin) po barvení fluorescenční barvou Sypro Ruby.

č. proteinu	M_r (kDa)	pI	I (kontrola)	I (TRH)
1	40	5,0	396197,7	0
2	40	5,0	319504,3	0
3	30	4,8 – 5,0	162593,3	616172,1
4	30	4,8 – 5,0	90142,6	605166,7

Č. proteinu odpovídá číslům označených skvrn v obr. 11, M_r označuje jejich molekulovou váhu v kDa, pI jejich isoelektrický bod, I (kontrola) odpovídá jejich intenzitám změřených u vzorku kontrolních buněk, I (TRH) intenzitám změřených u vzorku hormonem ovlivněných buněk.

Tab. 2. Kvalitativně a kvantitativně změněné fosfoproteiny kontrolního vzorku a vzorku hormonem ovlivněných buněk (TRH 10^{-5} M, 16 hodin) po barvení fluorescenční barvou Pro-Q Diamond.

č. proteinu	M_r (kDa)	pI	I (kontrola)	I (TRH)
1	80	5,5	15107,1	0
2	60	5,1 – 5,4	48225,9	0
3	60	5,1 – 5,4	42788,4	0
4	60	5,1 – 5,4	5992,9	0
5	65	5,2 – 5,5	18143,6	53421,2
6	65	5,2 – 5,5	35079,0	105907,4
7	35	5,0	72270,8	205995,9

Č. proteinu odpovídá číslům označených skvrn v obr. 12, M_r označuje jejich molekulovou váhu v kDa, pI jejich isoelektrický bod, I (kontrola) odpovídá jejich intenzitám změřených u vzorku kontrolních buněk, I (TRH) intenzitám změřených u vzorku hormonem ovlivněných buněk.

6. DISKUSE

Příjem informace do buňky a vzájemná komunikace mezi nimi je životně důležitým dějem. Děje se tak přenosem signálu do buňky. Jednou z možností, jak je signál do buňky přes plasmatickou membránu přenesen, je navázání signální molekuly (např. hormonu) na receptor na povrchu buňky. Dlouhodobá stimulace hormonem ovšem může vést k poškození nebo až smrti buňky. Tomu je zabráněno pomocí zpětnovazebného ochranného mechanismu, který je nazýván desensibilizace (snížení biologické odpovědi). Tento proces zahrnuje řadu kroků a bývá zpravidla doprovázen de/fosforylací příslušných signálních proteinů a změnou jejich buněčné distribuce a případně také exprese.

Tato práce byla zaměřena na analýzu proteinového složení buněk E2M11 a možných změn vyvolaných dlouhodobým působením hormonu thyreoliberinu (TRH). Buněčná linie HEK293-E2M11 exprimuje vysokou hladinu TRH receptorů a kromě lidských endogenních G_{α_q} a $G_{\alpha_{11}}$ obsahuje také myší exogenní $G_{\alpha_{11}}$ protein. Separace proteinů proběhla pomocí 2D elektroforesy, přičemž byly proteiny v prvním rozměru separovány na pH gradientech 4-7. Imunodetekcí pomocí příslušných protilátek bylo identifikováno pět bodů odpovídající $G_{q/11\alpha}$ proteinům. Dva větší body odpovídají exogenně exprimovanému $G_{\alpha_{11}}$ a endogenně exprimovanému G_{α_q} . Další menší body s nižším isoelektrickým bodem mohou být endogenně exprimovaný $G_{11\alpha}$ a post-translační modifikace těchto G-proteinů. Mohlo by se jednat zejména o fosforylaci. Tento předpoklad souhlasí s poznatkem, že fosforylace proteinu snižuje jeho pI. Dalšími post-translačními modifikacemi pak může být navázání mastné kyseliny.

V paralelních experimentech byly identifikovány G_{α} proteiny třídy $G_{q/11}$ u vzorku buněk ovlivněných TRH o koncentraci 10^{-5} M a po dobu 16 hodin. V tomto případě byly detekovány pouze 3 proteiny, odpovídající nejméně intenzivnějším bodům u vzorku kontrolních buněk, tedy exogenně exprimovanému $G_{\alpha_{11}}$ a endogenně exprimovanému G_{α_q} . Snížila se také intenzita těchto bodů. Tyto výsledky ukazují, že po dlouhodobé stimulaci TRH dochází k poklesu množství $G_{q/11\alpha}$ proteinů.

Toto zjištění odpovídá již dřívějším výsledkům, získaným pomocí konfokální mikroskopie (Drmotá a kol., 1998b). Za použití konfokální mikroskopie bylo ukázáno, že za kontrolních podmínek je fluorescenční signál $G_{11\alpha}$ proteinu homogenně lokalizován na povrchu buněčné membrány. Po 2-4 hodinách se zvýšila intenzita intracelulární fluorescence za paralelního snížení fluorescenčního signálu na povrchu buňky. Po 16

hodinách došlo k jeho velkému snížení na povrchu i uvnitř buňky. Pokles množství G α proteinů po dlouhodobé stimulaci byl pozorován i pomocí 2D elektroforesy a následné imunodetekce G $_{q/11}\alpha$ a G $_{s}\alpha$ proteinů (Matousek a kol., 2005).

V této souvislosti se nabízela otázka, zda dlouhodobá hormonální stimulace ovlivňuje celkové složení proteinů. Pro tyto účely byla opět použita buněčná linie E2M11, která byla ovlivněna TRH o koncentraci 10^{-5} M a po dobu 16 hodin. Na gel bylo nanášeno 400 μ g vzorku. Proteiny byly v prvním rozměru rozděleny na pH gradientu 4-7. Gely po 2D elektroforese byly obarveny stříbrem. Pozornost byla v tomto případě upřena pouze na kvalitativní změny, vzhledem k nízkému dynamickému rozsahu stříbra. Ačkoli bylo rozlišeno 263 bílkovin, žádná z nich se kvalitativně nezměnila. To ukazuje, že dlouhodobé působení hormonem o vysoké koncentraci nevede k úplnému odbourávání majoritních proteinů, ale případně pouze ke změně množství proteinů, translokaci v rámci buňky a post-translačním modifikacím. Dlouhodobá hormonální stimulace je vysoce specifická a nemění proteinové složení buněk.

Aby bylo možné určit, zda po dlouhodobé hormonální stimulaci dochází ke kvantitativním změnám v proteinovém složení buněčné linie E2M11, byla pro barvení gelů použita fluorescenční barva Sypro Ruby, jejíž lineární dynamický rozsah je o 3 řády vyšší než lineární dynamický rozsah stříbra. Oproti stříbru bylo na gel nanášeno pouze 100 μ g vzorku, ostatní podmínky pro 2D elektroforesu byly zachovány. V tomto případě bylo rozlišeno 217 bílkovin a byly identifikovány 2 kvalitativní a 2 kvantitativní změny.

Dvě kvantitativní změny se nacházely blízko sebe v oblasti isoelektrických bodů 4,8 – 5,0 a molekulové hmotnosti 30 kDa. Dvě kvalitativní změny se vyskytovaly pouze na 2D mapách u vzorku kontrolních buněk, v oblasti pI 5,0 a molekulové váhy 40 kDa. V obou případech se může jednat o dva odlišné proteiny, dvě isoformy jednoho proteinu nebo protein a jeho příslušnou post-translační modifikaci.

Barvením gelů pomocí Sypro Ruby se tedy podařilo najít 4 změny, což svědčí o tom, že toto barvení je v porovnání s barvením stříbrem (vzhledem k jeho nekvantitativnosti) výhodnější. Ačkoli barvení pomocí fluorescenčních barev je velmi citlivá metoda, při použití 100 μ g vzorku na gel bylo rozlišeno méně proteinů (217 skvrn) než v případě barvení stříbrem (263 skvrn), kdy bylo použito 400 μ g vzorku na gel. Lze však očekávat, že při zvýšení nanášky vzorku na gel by se mohla detekovatelnost minoritních proteinů výrazně zlepšit, což by bylo dobré ověřit v budoucích experimentech. Gely barvené pomocí Sypro Ruby jsou v porovnání s gely barvených stříbrem mezi sebou navzájem méně variabilní a mají také nižší pozadí.

Barvení stříbrem je metoda s vysokou citlivostí. Pomocí ní lze detekovat i 1 ng proteinu, nicméně má mnoho nevýhod, jako je nízký lineární dynamický rozsah, nestechiometrické barvení proteinů, nekombatibilnost s přípravou proteinů pro identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie a velmi subjektivní ukončení barvení. Fluorescenční barvení pomocí Sypro Ruby má stejnou citlivost jako barvení stříbrem, ale je navíc také reprodukovatelné a kompatibilní s hmotnostní spektrometrií a má vyšší lineární dynamický rozsah (White a kol., 2004).

Na různých úrovních a v různých fázích přenosu signálů do buňky hrají klíčovou úlohu de/fosforylace různých bílkovin. Fosforylace intracelulárních proteinů specifickými proteinkinasami a defosforylace pomocí fosfatas zajišťuje propojení důležitých buněčných dějů a jejich aktivaci a deaktivaci. Tyto procesy zahrnují celou řadu regulačních mechanismů, jako metabolismus, buněčné dělení, buněčný růst a diferenciaci. Fosforylační reakce jsou tedy významné v regulaci a průběhu intracelulární signalizace. V současné době je známo několik set různých typů proteinkinas, které lze rozdělit podle toho, kterou aminokyselinu proteinu fosforylují. Nejčastěji je fosforylován serin (~ 90%), méně threonin (~ 10%). Fosforylace tyrosinu je málo častá (~ 0,05%) (Salih, 2004).

Fosforylované proteiny lze detekovat autoradiografií, imunodetekcí a v současné době pomocí specifické fluorescenční barvy Pro-Q Diamond, která se váže na serinové, threoninové a tyrosinové zbytky. Imunodetekce fosforylace je prováděna pomocí specifických protilátek, tato metoda ovšem není aplikovatelná pro analýzu gelů. Detekci fosforylace autoradiografií lze aplikovat na gely, jedná se totiž o inkorporaci radioaktivního fosfátu ^{32}P , nicméně má mnoho nevýhod, např. krátká životnost radioaktivního fosfátu, relativně dlouhá expozice pro detekci, neschopnost rozlišit fosforylované aminokyseliny, práce s radioaktivitou.

V souvislosti s těmito poznatky byl zkoumán vliv dlouhodobého působení TRH na fosfoproteom. Experimenty byly prováděny za stejných podmínek jako pro barvení gelů Sypro Ruby. Pro analýzu gelů byla použita specifická fluorescenční barva Pro-Q Diamond. Bylo rozlišeno 118 bílkovin. 4 kvalitativní změny se nacházely pouze na 2D mapách u vzorku kontrolních buněk. Tři kvalitativní změny byly nalezeny blízko sebe v rozmezí pI 5,1 – 5,4 molekulové váhy 60 kDa a čtvrtá okolo pI 5,5 a molekulové váhy 80 kDa. Kvantitativně se změnilo 3 proteiny, dva v rozmezí pI 5,2 – 5,5 a okolo molekulové váhy 65 kDa, třetí pak okolo pI 5,0 a molekulové váhy 35 kDa.

Nález většího počtu změn ve fosforylaci proteinů není velkým překvapením, neboť lze očekávat, že dlouhodobé působení TRH může vést k ovlivnění řady buněčných procesů a molekulárních interakcí.

Změny, které zde byly popsány, jsou vzhledem k zadanému parametru vyhodnocování výraznými rozdíly v 2D mapách kontrolních a ovlivněných buněk. Bylo by možné identifikovat i několik dalších méně významných změn, které však zřejmě nemusí mít velký fyziologický význam.

V současné době vzrůstá zájem o využití fluorescenčních barev Sypro Ruby a Pro-Q Diamond pro proteomickou analýzu. Barvení pomocí Pro-Q Diamond bylo využito pro studium fosfoproteomu buněk, které hrají důležitou roli ve struktuře a funkci glomerulu. Byl identifikován proteom obsahující 157 proteinů, z nichž 37 proteinů bylo fosforylováno (Jiang a kol., 2005). Provádí se také analýzy vytipovaných buněčných frakcí (např. cytosol, membrány). Byl také studován fosfoproteom mitochondriální matrix. Bylo takto detekováno 200 skvrn, z nichž 45 fosforylovaných proteinů bylo identifikováno pomocí hmotnostní spektrometrie (Hopper a kol., 2006).

Barvení pomocí Sypro Ruby bylo využito pro porovnání proteomu zdravých nadledvinek a nadledvinek s nádorem. Proteiny, které byly rozdílně exprimovány, byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Jednalo se např. o adrenodoxin, stathmin (onkoprotein 18), 14-3-3 protein zeta/delta (Campostrini a kol., 2004). Toto barvení bylo také využito pro porovnání proteomu cerebrospinální tekutiny zdravých pacientů a pacientů s Alzheimerovou nemocí. Snahou bylo identifikovat proteiny důležité u této choroby. Bylo nalezeno 17 výrazně změněných proteinů, ty byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (Puchades a kol., 2003). Dalším výzkumem, kde bylo toto barvení využito, bylo studium sérových proteinů jako biomarkerů rakoviny vaječníků. Bylo identifikováno 10 proteinů, jejichž množství bylo u nemocných pacientek v porovnání se zdravými pacientkami zvýšeno či sníženo (Ahmed a kol., 2005).

Tento typ barvení lze tedy s výhodou využít pro vytipování změněného obsahu bílkovin nebo určení fosforylovaných bílkovin. Tyto bílkoviny je možno následně identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

Pomocí 2D elektroforesy a hmotnostní spektrometrie byla identifikována většina proteinů, vyskytujících se na 2D mapách hovězích ledvinových buněk (Talamo a kol., 2003). Při porovnání získané 2D mapy buněčné linie HEK293-E2M11 s 2D mapou z výše uvedeného článku a 2D mapami z databáze SwissProt/TrEMBL (www.expasy.org) bylo možné určit alespoň přibližně několik významnějších proteinů. Ty jsou vyznačeny na obr. 13.

Skvrny, označené číslem 9 na tomto master gelu, jsou s nejvyšší pravděpodobností isoformy aktinu. Hodnoty M_r a pI těchto skvrn souhlasí přibližně i s hodnotami M_r (42,5 kDa) a pI (5,3) isoform aktinu, získanými z databáze SwissProt/TrEMBL. Dalšími přibližně určenými proteiny jsou ATPasa endoplasmatického retikula (skvrna č. 1), glukosou regulovaný *heat shock* protein grp94 (č. 2), *heat shock* protein hsp71 (č. 3), sérový albumin (č. 4), *heat shock* protein hsp60 (č. 5), vimentin (č. 6), tubulinový řetězec $\beta 2$ (č. 7) a řetězec D F1 ATPasy (č. 8).

Snahou této práce bylo také určit alespoň přibližnou oblast výskytu $G_{q/11}\alpha$ proteinů. S pomocí imunodetekce těchto proteinů a databáze SwissProt/TrEMBL bylo možné určit, že se na 2D mapách nacházejí v blízkosti aktinu. To souhlasí také s faktem, že hodnoty M_r (41,5 kDa) a pI (5,5) $G_{q/11}\alpha$ proteinů, získané z databáze, jsou blízké hodnotám M_r a pI isoform aktinu. Tato přibližná oblast je vyznačena na obr. 3 a 4.

2D elektroforesa je prvním stupněm komplexní analýzy proteomu. Proteomika je rozsáhlé studium genové exprese na úrovni proteinů, které může poskytnout přímé zjišťování hladin exprimovaných proteinů, jejich případných modifikací i jejich interakcí. Pomocí proteomiky lze získat mnoho poznatků o stovkách až tisících proteinů ve vzorku. Existuje několik aplikací proteomiky – určení proteomu, komparativní charakteristika proteinové exprese, určení post-translačních modifikací a mapování vzájemných interakcí proteinů. Limitací této metody je skutečnost, že neumožňuje detekovat minoritní proteiny. Z tohoto důvodu je výhodné provádět analýzu vybraných buněčných frakcí jako je cytosol, membrány, mitochondrie. Proteomika má velký význam i pro analýzu bílkovin podílejících se na buněčné signalizaci (Naaby-Hansen a kol., 2001; Freeman a Hemby, 2003).

Nástrojem pro samotnou identifikaci proteinů je hmotnostní spektrometrie, která navazuje na separaci proteinů pomocí 2D elektroforesy. Pokračováním výsledků této práce bude snaha pomocí této metody identifikovat G_α proteiny třídy $G_{q/11}$ na 2D mapě buněčné linie HEK293-E2M11 a identifikace kvalitativně a kvantitativně změněných proteinů a fosfoproteinů, nalezených při porovnání 2D map kontrolních buněk a buněk dlouhodobě ovlivněných hormonem.

7. ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce bylo identifikovat G-proteiny třídy $G_{q/11}$ u vzorku kontrolních HEK293-E2M11 buněk a vzorku buněk ovlivněných TRH (10^{-5} M, 16 hodin). Dalšími cíli bylo porovnat proteomy a fosfoproteomy těchto dvou vzorků a identifikovat tak kvalitativně a kvantitativně změněné proteiny po dlouhodobém působení hormonu.

- u vzorku kontrolních buněk bylo pomocí imunoblotu identifikováno pět bodů, reprezentující $G_{q/11}\alpha$ proteiny, případně jejich post-translační modifikace; u vzorku hormonem ovlivněných buněk byly identifikovány pouze tři body, což značí pokles celkového množství $G_{q/11}\alpha$ proteinu v buňce; pomocí imunodetekce byla určena přibližná oblast $G_{q/11}\alpha$ proteinu na 2D mapě proteomu.

- porovnáním 2D map proteomů kontrolních buněk a buněk ovlivněných TRH po barvení stříbrem nebyly nalezeny žádné kvalitativní změny (kvantitativní nebylo možné vzhledem k nízkému dynamickému rozsahu stříbra analyzovat); bylo rozlišeno 263 proteinů.

- porovnáním 2D map proteomů kontrolních buněk a buněk ovlivněných TRH po barvení fluorescenční barvou Sypro Ruby byly nalezeny 2 kvalitativní a 2 kvantitativní změny; bylo celkem rozlišeno 217 proteinů.

- porovnáním 2D map fosfoproteomů kontrolních buněk a buněk ovlivněných TRH po barvení fluorescenční barvou Pro-Q Diamond byly nalezeny 4 kvalitativní a 3 kvantitativní změny; bylo rozlišeno 118 fosfoproteinů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adie, E.J. a Milligan, G. (1994) Regulation of basal adenylate cyclase activity in neuroblastoma x glioma hybrid, NG108-15, cells transfected to express the human β 2-adrenoreceptor: evidence for empty receptor stimulation of the adenylate cyclase cascade. *Biochem. J.* 303, 803-808

Ahmed, N., Oliva, K.T., Barker, G., Hoffmann, P., Reeve, S., Smith, I.A., Quinn, M.A., Rice, G.E. (2005) Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics* 5, 4625-4636

Albert, P.R., Morris, S.J., Ghahremani, M.H., Storrington, J.M., Lembo, P.M. (1998) A putative α -helical G $\beta\gamma$ -coupling domain in the second intracellular loop of the 5-HT1A receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 861, 146-161

Anderson, R.G., Kamen, B.A., Rothberg, K.G., Lacey, S.W. (1992) Potocytosis. sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255, 410-411

Aragay, A.M., Katz, A., Simon, M.I. (1992) The $G\alpha_q$ a $G\alpha_{11}$ proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH3 rat pituitary cells. *J.Biol. Chem.* 267, 24983-24988

Arshavsky, V.Y., Dumke, C.L., Zhu, Y., Artemyev, N.O., Skiba, N.P., Hamm, H.E., Bownds, M.D. (1994) Regulation of transducin GTPase activity in bovine rod outer segments. *J.Biol.Chem.* 269, 19882-19887

Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992) β -arrestin2, a novell member of the arrestin/ β -arrestin gene family. *J.Biol.Chem.* 267, 17882-17890

Bai, M., Trivedi, S., Brown, E.M. (1998) Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on cell surface of CaR-transfected HEK 293 cells. *J.Biol.Chem.* 273, 23605-23610

Baldwin, J.M. (1993) The probable arrangement of the helices in G-protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12, 1693-1703

Bergren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P., Patton, W.F (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21, 2509-2521

Berggren, K.N., Schulenberg, B., Lopez, M.F., Steinberg, T.H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A., Patton, W.F. (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* 2, 486-498

Bermudez, A., Daban, J.R., Garcia, J.R. Mendez, E. (1994) Direct blotting, sequencing and immunodetection of proteins after five-minute staining of SDS and SDS treated IEF gels with Nile Red. *Biotechniques* 16, 621-624

Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu.Rev.Biochem.* 56, 159-193

Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Brown, A.M. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1031, 163-224

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J.Biochem.Biophys.Methods* 6, 317-339

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

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

Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: A conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127

Bouvier, M., Haudorff, W.P., De Blasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilka, B.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1988) Removal of phosphorylation sites from the β 2-adrenergic receptor delays the onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333, 370-373

Bowes, C. a Farber, D.B. (1987) mRNAs coding for protein of the cGMP cascade in the degenerative retina of the rd mouse. *Exp.Eye Res.* 45, 467-480

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

Brown, D.A. a 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

Campostrini, N., Pascali, J., Hamdan, M., Astner, H., Marimpietri, D., Pastorino, F., Ponzoni, M., Righetti, P.G. (2004) Proteomic analysis of an orthotopic neuroblastoma xenograft animal model. *J.Chromatogr.B.Analyt.Technol.Biomed Life Sci.* 808, 279-286

Cao, J., O'Donell, D., Vu, H., Payza, K., Pou, C., Godbout, C., Jakob, A., Pelletier, M., Lembo, P., Ahmad, S., Walker, P. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J.Biol.Chem.* 273, 32281-32287

Carman, C.V., Parent, J.L., Day, P.W., Pronin, A.N., Sternweis, P.M., Wedegaertner, P.B., Gilman, A.G., Benovic, J.L., Kozasa, T. (1999) Selective regulation of $G\alpha_{q/11}$ by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J.Biol.Chem.* 274, 34483-34492

Cassey, P.J. (1994) Lipid modifications of G proteins. *Curr.Opin.Cell.Biol.* 6, 219-225

Cerione, R.A., Gierschik, P., Staniszewski, C., Benovic, J.L., Codina, J., Somers, R., Birnbaumer, L., Spiegel, A.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1987) Functional differences in the $\beta\gamma$ complexes of transducin and the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Biochemistry* 26, 1485-1491

Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P., Lodish, H.F. (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 11728-11732.

Clapham, D.E. (1994) Direct G protein activation of ion channels? *Annu.Rev. Neurosci.* 17, 441-464

Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1993) New roles for G protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403-406

Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu.Rev. Pharmacol.Toxicol.* 37, 167-203

Conklin, B.R. and Bourne, H.R. (1993) Structural elements of $G\alpha$ -subunits that interact with $G\beta\gamma$, receptors and effectors. *Cell* 73, 631-641

Conrad, P.A., Smart, E.J., Ying, Y.S., Anderson, R.G.W., Bloom, G.S. (1995) Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J.Cell Biol.* 131, 1421-1433

Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkin, J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 369, 418-420

Cuatrecasas, P. (1974) Membrane receptors. *Ann.Rev.Biochem.* 43, 169

Degtyarev, M.Y., Spiegel, A.M., Jones, T.L. (1993) Increased palmitoylation of the G_s protein α subunit after activation by the β -adrenergic receptor or cholera toxin. *J.Biol.Chem.* 268, 23769-23772

Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem.Sci.* 22, 1-2

Diviani, D., Lattion, A.L., Cotecchia, S. (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G-protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α -adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* 272, 28712-28719

Doss, R.C., Perlina, J.P., Harden, T.K. (1981) Recovery of β -adrenergic receptors following longterm exposure of astrocytoma cells to catecholamine. *J.Biol.Chem.* 256, 12281-12286

Draft, C.M., Whitmore, D.H., Wiechmann, A.F. (1994) Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J.Biol.Chem.* 269, 4613-4619

Drmota, T., Gwyn, W. Gould, 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. *J.Biol.Chem* 273, 24000-24008

Drmota, T. a Milligan, G. (2000) Kinetic analysis of the internalization and recycling of [³H]TRH and C-terminal truncations of the long isoform of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1. *Biochem.J.* 346, 711-718

Drmota, T., Novotny, J., Kim, G.D., Eidne, K.A., Milligan, G., Svoboda, P. (1998b) Agonist-induced internalization of the G protein G₁₁ α and thyrotropin-releasing hormone receptors proceed on different time scales. *J.Biol.Chem.* 273, 21699-21707

Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V., Simons, K. (1993) Caveolae and sorting of the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* 12, 1597-1605

Eckhart, A.D., Ozaki, T., Tevaearai, H., Rockman, H.A., Koch, W.J. (2002) Vascular-targeted overexpression of G-protein-coupled receptor dinase 2 in transgenic mice attenuates β -adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. *Mol.Pharmacol.* 61, 749-758

Eschenbruch, M. a Bürk, R.R (1982) Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver staining of protein in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 125, 96-99

Exton, J.H. (1994) Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr.Opin. Cell.Biol.* 6, 226-229

Fazekas de St. Groth, S., Webster, R.G., Datyner, A. (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins in electrophoresis strips. *Biochim.Biophys.Acta* 71, 377-391

Felder, R.A., Sanada, H., Xu, J., Yu, P.Y., Wang, Z., Watanabe, H., Asico, L.D., Wang, W., Zheng, S., Yamaguchi, I. (2002) G-protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 3872-3877

Ferguson, K.M., Lemmon, M.A. Sigler, P.B., Schlessinger, J. (1995) Scratching the surface with the PH domain. *Nature Struct.Biol.* 2, 715-718

Ferguson, S.S., Downey, W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Medard, L., Caron, M.G. (1996) Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366

Fielding, C.J. a Fielding, P.E. (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim.Biophys.Acta* 1529, 210-222

Fong, A.M., Remont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.R., Lefkowitz, R.J., Patel, D.D. (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in β -arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 7478-7483

Freeman, W.M. a Hemby, S.E. (2004) Proteomics for protein expression profiling in neuroscience. *Neurochem.Res.* 29, 1065-1081

Galbiati, F., Volonte, D., Meani, D., Milligan, G., Lublin, D.M., Lisanti M.P., Parenti, M. (1999) The dually acylated NH₂-terminal domain of G_{i1} α is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of cavelin-1 is required for the recognition of dually acylated G-protein α subunits in vivo. *J.Biol.Chem.* 274, 5843-5850

Galbiati, F., Razani, B., Lisanti, M.P. (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403-411

Gershengorn, M.C. (1989) Mechanism of signal transduction by TRH. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 553, 191-196

Gershengorn, M.C. (1993) Thyrotropin-releasing hormone receptor: cloning and regulation of its expression. *Recent Prog.Horm.Res.* 48, 341-363

Gershengorn, M.C. a Osman, R. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol.Rev.* 76, 175-191

Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann.Rev. of Biochem.* 56, 615-649

Glenny, J.R Jr a Soppet D. (1992) Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89(21), 10517-10521

- Hamm, H.E. (1991) Molecular interactions between the photoreceptor G-protein and rhodopsin. *Cell.Mol.Neurobiol.* 11, 563-578
- Hamm, H.E. a Gilchrist, A. (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr.Opin.Cell.Biol.* 8, 189-196
- Haraguchi, K. a Rodbell, M. (1990) Isoproterenol stimulates shift of G-proteins from plasma membrane to pinocytic vesicles in rat adipocytes: a possible means of signal dissemination. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, 1208-1212
- Haslam, R.J., Koide, H.B., Hemmings, B.A. (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature* 363, 309-310
- Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995) Distinct pathways of G_i or G_q mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J.Biol. Chem.* 270, 17148-17153
- Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 376-382
- Herbert, T.E., Moffett, S., Morelo, J.P., Loisel, T.P., Vicher, D.G., Barret, C., Bouvier, M. (1996) A peptide derived from a β 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J.Biol.Chem.* 271, 16382-16392
- Hermans, E., Vanisberg, M.A., Geurts, M., Maloteaux, J.M. (1997) Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem.Int.* 31, 291-299
- Heukeshoven, J. a Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112
- Hildebrandt, J.D. (1997) Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem.Pharmacol.* 54, 325-339
- Hinkle, P.M. (1989) Pituitary TRH receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 553, 176-187
- Hisatomi, O., Matsuda, S., Satoh, T., Kotaka, S., Imanishi, Y., Tokunaga, F. (1998) A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors. *FEBS Lett.* 424, 159-164
- Homburger, V., Brabet, P., Audigier, Y., Pantaloni, C., Bockaert, J., Rouot, B. (1987) Immunological localization of the GTP-binding protein G_o in different tissues of vertebrates and invertebrates. *Mol.Pharmacol.* 31, 313-319
- Hooper, N.M. (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid (cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol.Membr.Biol.* 16(2), 145-156

Hooper, R.K., Carroll, S., Aponte, A.M., Johnson, D.T., French, S., Shen, R.F., Witzmann, F.A., Harris, R.A., Balaban, R.S. (2006) Mitochondrial matrix phosphoroteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* 45, 2524-2536

Horejsi, V., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., Drbal, K. (1998) Signal transduction in leucocytes via GPI-anchored proteins: an experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function? *Immunol.Lett.* 63, 63-73

Horejsi, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., Stockinger, H. (1999) GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol. Today* 20, 356-361

Hsieh, K.P. a Martin, T.F. (1992) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins G_q and G_{11} . *Mol.Endocrinol.* 6, 1673-1681

Huang, C. a Klein, P.S. (2004) The Frizzled family: receptor for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology* 5, 234

Huang, C., Duncan, J.A., Gilman, A.G., Mumby, S.M. (1999) Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein α subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 412-417

Iiri, T., Backlund, P.S., Jones, T.L.Z., Wedegaertner, P.B., Bourne, H.R. (1996) Reciprocal regulation of $G_s\alpha$ by palmitate and the β/γ subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 14592-14597

Inglese, J., Koch, W.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* 359, 147-150

Iniguez-Lluhi, J.A., Simon, M.I., Robishaw, J.D., Gilman, A.G. (1992) G protein $\beta\gamma$ subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of γ . *J.Biol.Chem.* 267, 23409-23417

Iwami, G., Kawabe, J. I., Ebina, T., Cannon, P. J., Homey, C. J., Ishikawa, Y. (1995) Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J.Biol.Chem.* 270, 12481-12484

Iyengar, R. (1993) Molecular and functional diversity of mammalian G_s -stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J.* 7, 768-775

Jan, L.Y. a Jan, Y.N. (1997) Receptor-regulated ion channels. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 155-160

Jelsema, C.L. a Axelrod, J. (1987) Stimulation of phospholipase A_2 activity in bovine rod outer segments by the $\beta\gamma$ subunits of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 84, 3623-3627

Jho, E.H., Davis, R.J., Malbon, C.C. (1997) c-Jun amino-terminal kinase is regulated by $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ and obligate for differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid. *J.Biol.Chem.* 272, 24468-244474

Jiang, X.S., Tang, L.Y., Cao, X.J., Zhou, H., Xia, Q.C., Wu, J.R., Zeng, R. (2005) Two-dimensional gel electrophoresis maps of the proteome and phosphoproteome of primitively cultured rat mesangial cells. *Electrophoresis* 26, 4540-4562

Jones, D.T. a Reed, R.R. (1989) G_{olf} : an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790-795

Kerenyi, L. a Gallyas, F. (1972) A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. *Clin.Chim.Acta* 38, 465-467

Kisselev, O., Ermolaeva, M., Gautam, N. (1995) Efficient interaction with a receptor requires a specific type of prenyl group on the G protein γ subunit. *J.Biol.Chem.* 270, 25356-25358

Kortison, N., Duthie, S.M., Boyd, E., Eidne, K.A., Conner, J.M. (1994) Assignment of the gene encoding the human thyrotropin-releasing hormone receptor to 8q23 by fluorescence in situ hybridization. *Hum.Genet* 93, 716-718

Krueger, K.M., Daaka, Y., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1997) The role of sequestration in G-protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J.Biol.Chem.* 272, 5-8

Krupinski, J., Coussen, F. Bakalyar, H., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R., Gilman, A. G. (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244, 1558-1564

Lambright, D. G., Noel, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369, 621-628

Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319

Lee, C., Park, D., Wu, D., Rhee, S., Simon, M. (1992) Members of the G_q α subunit gene family activate phospholipase $C\beta$ isozymes. *J.Biol.Chem.* 267, 16044-16047

Lefkowitz, R.J. (1993) G-protein-coupled receptor kinases. *Cell* 74, 409-412

Lerea, C.L., Somers, D.E., Hurley, J.B., Klock, I.B., Bunt-Milam, A.H. (1986) Identification of specific transducin α subunits in retinal rod and cone photoreceptors. *Science* 234, 77-80

Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J.E., Hansen, S.H., Nishimoto, I., Lisanti, M.P. (1995) Characterization of the phosphotyrosine-binding domain of the Drosophila Shc protein. *J.Biol.Chem.* 271, 31855-31862

Logothetis, D.E., Kim, D., Norhup, J.K., Neer, E.J., Clapham, D.E. (1988) Specificity of action of guanine nucleotide-binding regulatory protein subunits on the cardiac muscarinic K⁺ channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 5815-5818

Loisel, T.P., Ansanay, H., Adam, L., Marullo, S., Seifert, R., Lagace, M., Bouvier, M. (1999) Activation of the β_2 -adrenergic receptor-G α_s complex leads to rapid depalmitoylation and inhibition of repalmitoylation of both the receptor and G α_s . *J.Biol.Chem.* 274, 31014-31019

Lose, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990) β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science (Wash DC)* 248, 1547-1550

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randell, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275

Lynch, C.J., Morbach, L., Blackmore, P.F., Exton, J.H. (1986) α -subunits of Ns are released from the plasma membrane following cholera toxin activation. *FEBS Lett.* 200, 333-336

Macintosh, J.A., Choi, H.Y., Bae, S.H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., van Dyk, D.D., Verrills, N.M., Paik Y.K., Karuso, P. (2003) A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 2273-2288

Maggio, R., Vogel, Z., Weiss, J. (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular 'cross-talk' between G-protein-linked receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 3103-3107

Matousek, P., Novotny, J., Rudajev, V., Svoboda, P. (2005) Prolonged agonist stimulation does not alter the protein composition of membrane domains in spite of dramatic changes induced in a specific signaling cascade. *Cell Biochem.Biophys.* 42, 21-40

McCallum, J.F., Wise, A., Grassie, M.A., Magee, A.I., Guzzi, F., Parenti, M., Milligan, G. (1995) The role of palmitoylation of the guanine nucleotide binding protein G $_{11}$ α in defining interaction with the plasma membrane. *Biochem.J.* 310, 1021-1027

McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., Willard, F.S. (2004) G-protein signaling: back to future. *Cell.Mol.Life Sci.* 62, 551-577

McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J., Margolskee, R.F. (1992) Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357, 563-569

Merril, C.R., Switzer, R.C., van Keuren, M.L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 4335-4339

Milligan, G., Parenti, M., Magee, A. I. (1995) The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trend.Biol.Sci.* 20, 181-186

Moffett, S., Brown, D.A., Linder, M.E. (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J.Biol.Chem.* 275, 2191-2198

Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H, Bouvier, M (1993) Altered phosphorylation and desensitization patterns of human β_2 -adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.* 12, 349-356

Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, C., Curnow, K.M., Corvol, P., Clauser, E. (1996) Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. *J.Biol.Chem.* 271, 1507-1513

Moro, O., Lamah, J., Högger, P., Sadee, W. (1993) Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *J.Biol.Chem.* 268, 22273-22276

Morris, A.J. a Malbon, C.C. (1999) Physiological regulation of G-protein-linked signaling. *Physiological Reviews* 79, 1373-1430

Mullaney, I., Mitchell, F.M., McCallum J.F., Buckley N.J., Milligan, G. (1993) The human muscarinic M1 acetylcholine receptor, when expressed in CHO cells, activates and downregulates both G_q and $G_{11} \alpha$ equally and non-selectively. *FEBS Lett.* 324, 241-245

Mumby, S.M. (1997) Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr.Opin.Cell.Biol.* 9, 148-154

Mumby, S.M. (1994) Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 148-154

Murakami A., Yajima T., Sakuma H., McLaren M.J., Inana G. (1993) X-arrestin: A new retina arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett* 334, 203-209

Murthy, K.S., Makhlof, G.M. (2000) Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. *J.Biol.Chem.* 275, 30211-30219

Myung, C.S., Yasuda, H., Liu, W.W., Harden, T.K., Garrison, J.C. (1999) Role of isoprenoid lipids on the heterotrimeric G protein γ subunit in determining effector activation. *J.Biol.Chem.* 274, 16595-16603

Naaby-Hansen, S., Waterfield, M.D., Cramer, R. (2001) Proteomics - post-genomic cartography to understand gene function. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 376-384

Neer, E.J. (1994) G-proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* 3, 3-14

Neer, E.J.(1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257

Neubig, R.R. (1994) Membrane organization in G protein mechanisms. *FASEB J.* 8, 939-946

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262

Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665

Nurnberg, B., Gudermann, T., Schultz, G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part2: structure and function. *J.Mol.Med.* 73, 123-132

O'Dowd, B.F., Lee, D.K., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., Wang, B., Gershengorn, M.C., George, S.R. (2000) TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *J.Mol.Endocrinol.* 14, 183-193

O'Farrell, H. (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250, 4007-4021

Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M.P., Ishikawa, Y. (1997) Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J.Biol.Chem.* 272, 33416-33421

Palade, G.E. (1953) The fine structure of blood capillaries. *J.Appl.Phys.* 24, 1424

Parton, R.G., Joggerst, B., Simons, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* 127, 1199-1215

Parton, R.G. (1996) Caveolae and caveolins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8, 542-548

Pederson, S.E. a Ross, E.M. (1985) Functional activation of β -adrenergic receptors of thiols in the presence or absence of agonist. *J. Biol.Chem.* 260, 14150-14157

Peng, Y.W., Robishaw, J.D., Levine, M.A., Yau, K.W. (1992) Retinal rods and cones have distinct G protein β and γ subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 10882-10886

Peppel, K., Boekhoff, I., Macdonald, P., Breer, H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1997) G-protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J.Biol.Chem.* 272, 25425-25428

Phillips, W.J. a Cerione, R.A. (1992) Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin- $\beta\gamma$ subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. *J.Biol.Chem.* 267, 17032-17039

Pierce, K.L., Remont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews* 3, 639-650

Pitcher, J.A., Fredericks, Z.L., Stone, W.C., Premont, R.T., Stoffel, R.H., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J.Biol.Chem.* 271, 24907-24913

Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A.A., Lefkowitz, R.J. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 8343-8347

Puchades, M., Hansson, S.F., Nilsson, C.L., Andreasen, N., Blennow, K., Davidsson, P. (2003) Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Mol.Brain Res.* 118, 140-146

Qanbar, R., Bouvier, M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol.Ther.* 97, 1-33

Rabilloud, T. (1992) A comparison between low background silver diammine and silver nitrate proteins stains. *Electrophoresis* 13, 429-439

Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Orsselaer, A., Lunardi, J. (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1, 699-704

Ransnas, L.A., Svoboda, P., Jasper, J.R., Insel, P.A. (1989) Stimulation of β -adrenergic receptors of S49 lymphoma cells redistributes the α subunit of the stimulatory G protein between cytosol and membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 7900-7903

Razani, B., Rubin, C.S., Lisanti, M.P. (1999) Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J.Biol.Chem.* 274, 26353-26360

Remont, R.T., Macrae, A.D., Stoffel, R.H., Chung, N., Pitcher, J.A., Ambrose, C., Inglese, J., MacDonald, M.E., Lefkowitz, R.J. (1996) Characterization of the G-protein-

coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J.Biol.Chem.* 271, 11707-11710

Rebecchi, M.J. a Pentylala, S.N. (2000) Structure, function and controle of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews* 80, 1291-1335

Resh, M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1451, 1-16

Rhee, S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu.Rev.Biochem.* 70, 281-312

Rhee, S.G. a Choi, K.D. (1992) Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 26, 35-61

Rockman, H.A., Choi, D.J., Akhter, S.A., Jaber, M., Giros, B., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Koch, W.J. (1998) Control of myocardial contractile function by the level of β -adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J.Biol.Chem.* 273, 18180-18184

Rockman, H.A., Choi, D.J., Rahman, N.U., Akhter, S.A., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J. (1996) Receptor-specific in vivo desensitization by the G-protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 93, 9954-9959

Romano, C., Yang, W.L., O'Malley, K.L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J.Biol.Chem* 271, 28612-28616

Rybin, V.O., Xu, X., Lisanti, M.P., Steinberg, S.F. (2000) Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J.Biol.Chem* 275, 4144741457

Salih, E. (2004) Phosphoproteomics by mass spectrometry and classsical protein chemistry approaches. *Mass Spectrom.Rev.* 24, 828-846

Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F., Lisanti, M.P. (1996) Identification, sequence, and expression of cavelin-2 defines a caveolin gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 131-135

Schlesinger, T.K., Langer, G.R., Yujiri, T., Johnson, G.L. (1998) The TAO of MEKK. *Front.Biosci.*3,1181-1186

Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., Neer, E.J. (1992) Specificity of G protein β and γ subunit interactions. *J.Biol.Chem.* 267, 13807-13810

Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., Allard, J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J.Cell Biol.*, 127, 1217-1232

Schnitzer, J.E., Oh, P., McIntosh, D.P. (1996) Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science*, 274, 239-242

Schroeder, R.J., Ahmed, S.N., Zhu, Y., London, E., Brown, D.A. (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J.Biol.Chem.* 273, 1150-1157

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal.Chem.* 68, 850-858

Shichi, H. a Somers, R.L. (1978) Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification and properties of rhodopsin kinase. *J.Biol.Chem.* 253,7040-7046

Shinohara, T., Dietzschold, B., Draft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., Tao, R. (1987) Primary and secondary structure of bovine retina S antigen (48-kDa protein). *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 84, 6975-6979

Shpetner, H.S. a Vallee, R.B. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59, 421-432

Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N. (1991) Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808

Simons, K. a Ehehalt R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J.Clin.Invest.* 110, 597-603

Simons, K. a Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572

Simons, K. a Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Mol.Cell.Biol.*1, 31-40

Simons, K. a van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202

Singer, S.J. a Nicolson, G.L. (+972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731

Smith, W.C., Milam, A.H., Digger, D., Arendt, A., Hargrave, P.A., Palczewski, K. (1994) A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *J.Biol.Chem.* 269, 15407-15410

Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Schere, P.E., Okamoto, T., Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol.Cell Biol.* 19, 7289-7304.

Smrcka, A.V., Neplet, J.R., Brown, K.O., Sternweis, P.C. (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q. *Science* 251, 804-807

Smrcka, A.V. a Sternweis, P.C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G-protein α a G β subunits. *J.Biol.Chem.* 268, 9667-9674

Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M., Lisanti, M.P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J.Biol.Chem.* 271, 15160-15165

Spring, D.J. a Neer, E.J. (1994) A 14 amino-acid region of the G protein γ subunit is sufficient to confer selectivity of γ binding to the β subunit. *J. Biol. Chem.* 269, 22882-22886

Steinberg, T.H., Hangland, R.P., Singer, V.I. (1996) Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains. *Anal.Biochem.* 239, 238-245

Steinberg, T.H., Agnew, B.J., Gee, K.R., Leung, W.Y., Goodman, T., Schulenberg, B., Hendrickson, J., Beechem, J.M., Haugland, R.P., Patton, W.F. (2003) Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics* 3, 1128-1144

Sternweis, P.C., Smrcka, A.V., Gutowski, S. (1992) Hormone signalling via G-protein: regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by G_q. *Philos.Trans. R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 336, 35-41

Stoffel, R.H., Randall, R.R., Remont, R.T., Lefkowitz, R.J., Inglese, J. (1994) Palmitoylation of G-protein-coupled receptor kinase, GRK6- Lipid modification diversity in the GRK family. *J.Biol.Chem.* 269, 27791-27794

Suki, W.N., Abramowitz, J., Mattera, R., Codina, J., Birnbaumer, L. (1987) The human genome encodes at least three non-allelic G proteins with α i-type subunits. *FEBS Lett.* 220, 187-192

Svoboda, P., Kim, G.D., Grassie, M.A., Eidne, K.A., Milligan, G. (1996) Thyrotropin-releasing hormone-induced subcellular redistribution and down-regulation of G_{11 α} species variants. *Mol.Pharmacol.* 49, 646-655

Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol.Rev.* 81, 153-208

Talamo, F., D'Ambrosio, C., Arena, S., Prisco, D.V., Ledda, L., Zehender, G., Ferrara, L., Scaloni, A. (2003) Proteins from bovine tissues and biological fluids: Defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics* 3, 440-460

- Tang, W. J. a Gilman, A. G.(1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by G_s alpha and forskolin. *Science* 268, 1769-1772
- Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., Lisanti, M.P. (1996) Molecular cloning of caecolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J.Biol.Chem.* 271, 2255-2261
- Taussig, R., Sanchez, S., Rifo, M., Gilman, A.G., Belardetti, F. (1992) Inhibition of the omega-conotoxin-sensitive calcium current by distinct G proteins. *Neuron* 8, 799-809
- Taussig, R., Tang, W.J., Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1994) Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylylcyclases. *J.Biol.Chem.* 269, 6093-6100
- Taussig, R. a Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J.Biol.Chem.* 270, 1-4
- Thomason, P.A., James, S.R., Casey, P.J., Downes, C.P. (1994) A G protein $\beta\gamma$ subunit responsive phosphoinositide 3-kinase activity in human platelet cytosol. *J.Biol.Chem.* 269, 16525-16528
- Toya, Y., Schwencke, C., Couet, J., Lisanti, M.P., Ishikawa, Y. (1998) Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides. *Endocrinology* 139, 2025-2031
- Tsao, P. a von Zastrow, M. (2000) Downregulation of G-protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Neurobiol.* 10(3), 365-369
- Tsao, P. a von Zastrow, M. (2001) Type-specific sorting of G-protein-coupled receptors after endocytosis. *Pharmacol.Ther.* 89, 139-147
- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F.X. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane α -helices. *Nature* 389, 203-206
- Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077
- Vanhaesebroeck, B., Leervers, S.J., Panayotou G., Waterfield, M.D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem.Sci.* 22, 267-272
- Walker, J.K., Peppel, K., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Fisher, J.T. (1999) Altered airway and cardiac response in mice lacking G-protein-coupled receptor kinase 3. *Am.J.Physiol.* 276, R1214-R1221
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., Sprang, S.R. (1995) The structure of the G-protein heterotrimer G_i α 1 β 1 γ 2. *Cell* 83, 1047-1085
- Wayman, G.A., Wei, J., Wong, S., Storm, D.R. (1996) Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol.Cell Biol.* 16, 6075-6082

Wedegaertner, P.B. a Bourne, H.R. (1994) Activation and depalmitoylation of G_s α . *Cell* 77(7), 1063-1070

Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T., Bourne, H.R. (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J.Biol.Chem.* 270, 503-506

White, I.R., Pickford, R., Wood, J., Skehel, J.M., Gangadharan, B., Cutler, P. (2004) A statistical comparison of silver and SYPRO Ruby staining for proteomic analysis. *Electrophoresis* 25, 3048-3054

Wilkie, T.M., Scherle, P.A., Strathmann, M.P., Slepak, V.Z., Simon, M.I. (1991) Characterization of G-protein α subunits in the G_q class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 10049-10053

Williams, R.L. (1999) Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim.Biophys.Acta* 1441, 255-267

Williams, R.L. a Katan, M. (1996) Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure* 4, 1387-1394

Xu, N., Bradley, L., Ambdukar, I., Gutkind, S. (1993) A mutant α subunit of G₁₂ potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 6741-6745

Yamada, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys.Biochem.Cytol.* 1, 445-458

Yan, K., Kalyanaraman, V., Gautam, N. (1996) Differential ability to form the G protein $\beta\gamma$ complex among members of the β and γ subunit families. *J.Biol.Chem.* 271, 7141-7146

Yan, W., Sunavala, G., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J.G., Spielman, A.I. (2001) Bitter taste transduced by PLC- β_2 -dependent rise in IP₃ and α -gustducin-dependent fall in cyclec nucleotides. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 280, 742-751

Yu, R., Ashworth, R., Hinkle, P.M. (1998) Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid* 8, 887-894

Zimmermann, G. a Taussig, R. (1996) Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J.Biol.Chem.* 271, 27161-27166

Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., Woodlock, J.J. (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal.Biochem.* 30, 148-152

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka