

Závěr

Naším cílem bylo izolovat frakci plasmatické membrány charakterisovanou jako lipidové rafty (membránové domény) a nalézt míru asociace receptorů spřažených s trimerními G proteiny (GPCRs) s těmito membránovými strukturami. Pro separaci raftů jsme použili tři různé postupy – detergentovou extrakci, alkalickou preparaci se sonikací a mechanickou homogenisací. Zjistili jsme, že pouze aplikace Tritonu X-100 vedla k oddělení lipidových raftů od většinové membránové fáze. Pro charakterisaci hustotních sacharosových gradientů získaných z homogenátu, alkalického či detergentového extraktu jsme použili celou řadu bílkovin vyskytujících se po centrifugaci v oblastech gradientů odpovídajících sacharosám o nízké (15-25%) i vysoké (40%) hustotě. Nízkohustotní, detergent resistantní membránové fragmenty byly charakterisovány přítomností proteinů membránových domén caveolinu, flotillinu a GPI vázaných alkalické fosfatasy, CD55, CD58 a CD59, zatímco vysokohustotní gradientové frakce obsahovaly převážnou většinu neraftových proteinů Na/K-ATPasy, MHC I, CD147, calnexinu a transferinového receptoru. Alkalická extrakce ani homogenisace buněčného materiálu nevedla k izolaci membránových domén oddělených od nedoménové fáze plasmatické membrány.

Kromě různých „markerových“ proteinů jsme analysovali především gradientové distribuce trimerních G proteinů G_{α} , $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$, $G_{i1,2\alpha}$, G_{β} a receptorů spřažených s trimerními G proteiny. V gradientech, které byly připraveny bez použití detergentu, všechny sledované proteiny vykazovaly podobnou či shodnou distribuci a vyskytovaly se především na rozhraní 35-40% sacharosy. Naproti tomu, aplikace Tritonu X-100 nám umožnila zjistit rozsah lokalisace trimerních G proteinů v membránových doménách, které představovaly asi 20-50% celkového buněčného množství G proteinů. G_{α} protein pak v membránových doménách specificky klesal po dlouhodobém hormonálním (iloprost) působení, jak bylo ukázáno na HEK293 buňkách stabilně exprimujících lidský IP prostacyklinový receptor značený antigenní sekvencí Flag (FhIPR) a fusní protein mezi G_{α} a FhIPR (FhIPR- G_{α}). Nicméně, gradientová distribuce receptoru se po hormonálním působení neměnila a téměř veškeré množství receptoru zůstalo ve většinové, detergentem solubilisované fázi plasmatické membrány. Podobný výsledek byl zaznamenán i pro TRH receptor (receptor pro thyreotropin releasing hormone) exprimovaný také v HEK293 buňkách jako fusní protein mezi antigenní

sekvenci VSV (vesicular stomatitis virus), GFP (zelený fluorescenční protein) a TRH receptorem. I tento receptor se vyskytoval především mimo membránové domény.

Také analýza Tritonem izolovaných domén z mozkové kůry potkana ukázala nízkou míru asociace β adrenergických receptorů s membránovými doménami, podobně jako bylo zjištěno pro IP prostacyklinový a TRH receptor na buněčné linii HEK293. Tyto domény ovšem obsahovaly významné množství GABA_B receptoru. Lze tedy vyslovit závěr, že po působení Tritonu X-100 dojde k oddělení lipidových raftů od okolní plasmatické membrány, a tyto rafty jsou bohaté na raftové proteiny caveolin, flotillin aj., a obsahují podstatný podíl trimerních G proteinů. S výjimkou GABA_B receptoru se v těchto doménách téměř nevyskytují ostatní námi sledované receptory spřažené s trimerními G proteiny.