Universita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fysiologie živočichů a vývojové biologie

Receptory spřažené s trimerními G proteiny v membránových doménách

RNDr. Vladimír Rudajev

Doktorandská disertační práce

2007

Školitel: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Katedra fysiologie živočichů a vývojové biologie
Fysiologický ústav AV ČR, Oddělení membránových receptorů

Poděkování

Za veškerou podporu a zajištění podmínek pro mou práci děkuji školiteli Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. Za užitečné rady, ochotnou pomoc a přátelské prostředí nejen v laboratorní práci patří můj dík kolegům RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc., PharmDr. Jiřímu Stöhrovi, RNDr. Zuzaně Moravcové, PhD., RNDr. Lence Bouřové, PhD. a RNDr. Václavu Lisému, CSc. Za provedení některých vazebných pokusů děkuji RNDr. Lucii Hejnové, PhD. a za poskytnutí výsledků z dvourozměrné elektroforesy jsem vděčný RNDr. Petru Matouškovi, PhD. Můj dík patří i rodičům, kteří mi poskytli vhodné zázemí, a také mnoha dalším, kteří se různou mírou podíleli na dokončení mé práce.

Obsah

Seznam publikací ... 5
Publikační podklad pro disertační práci ... 5
Abstrakta z konferencí ... 6
Seznam použitých zkratek ... 7
Úvod ... 10
Cíle práce ... 12
Literární přehled ... 13
Signální dráha trimerních G proteinů ... 13
Receptory spřažené s trimerními G proteiny ... 13
Trimerní G proteiny ... 16
Efektorové systémy a regulace signalisace G proteinů ... 20
Lipidové rafty ... 24
Struktura lipidových raftů ... 24
Diversita lipidových raftů ... 27
Proteiny lipidových raftů ... 29
Signální dráha trimerních G proteinů a lipidové rafty ... 33
Metody ... 41
Chemikálie ... 41
Použité metody ... 41
Experimentální model ... 41
Kultivace buněk ... 42
Stanovení koncentrace bílkoviny ... 42
Isolace detergent resistentních membránových domén z buněčných linií HEK293 a S49 lymfomových buněk ... 43
Subcelulární frakcionace homogenisací ... 44
Subcelulární frakcionace alkalickou extrakcí ... 44
Isolace plasmatických membrán na Percollovém gradientu ... 44
Separace nízkohustotních membránových fragmentů a detergent resistentních membránových domén z plasmatických membrán mozku potkana ... 45
Elektronová mikroskopie ... 45
SDS-PAGE a detekce proteinů imunoblotem ... 45
2D elektroforesa ... 47
Stanovení aktivity alkalické fosfatasy ... 47
Měření GFP fluorescence ... 47
Stanovení aktivity adenylylcyklasy ... 47
Vazba GTPγS ... 48
Stanovení agonistou stimulované vysokoafinní GTPasové aktivity ... 48
Vazba radioligandů ... 48

Výsledky ... 50
Lokalisace proteinů signálních drah v lipidových raftech HEK293 buněk exprimujících IP prosthacyklinový receptor ... 50
TX-100 isolace ... 50
Trimerní G proteiny v lipidových raftech ... 51
Optimální koncentrace TX-100 ... 52
Vliv hormonálního působení na lokalisaci Gsα proteinu ... 52
Distribuce Flag-hIPR ... 53
Distribuce Gsα a IP receptoru v HEK293 buňkách exprimujících Flag-hIPR-Gsα ... 53
Alkalická (nedetergentová) extrakce ... 54
Distribuce bílkovin v homogenisačním gradientu ... 54
Lokalisace trimerních G proteinů a receptoru pro thyreoliberin (TRH receptoru) v lipidových raftech HEK293 buněk exprimujících VSV-TRH-R-GFP ... 55
Detergentová a bezdetergentová fragmentace buněčných membrán ... 55
Distribuce bílkovin plasmatické membrány podél gradientů ... 56
Distribuce VSV-TRH-R-GFP ... 57
2D analysa složení nízkodensních membránových frakcí po dlouhodobém hormonálním působení ... 58
Signální proteiny a detergent resistentní membránové domény v mozkovém kortexu potkana ... 60
Subcelulární frakcionace mozkového kortexu potkana ... 60
Frakcionace plasmatických membrán mozkového kortexu po působení 1% Tritonu-100 ... 60
Distribuce β-adrenergních a $GABA_B$ receptorů ... 61
Frakcionace plasmatických membrán mozkového kortexu po působení detergentu Brij 58 ... 62
Diskuse ... 63
Závěr ... 74
Seznam použité literatury ... 76
Příloha I – OBRÁZKY ... 86
Příloha II – TABULKY ... 126
Příloha III – PUBLIKACE ... 127

Seznam publikací

Publikační podklad pro disertační práci

Původní práce:

Moravcová, Z., **Rudajev, V.**, Stöhr, J., Novotný, J., Černý, J., Parenti, M., Milligan, G. and Svoboda, P. (2004). Long-term agonist stimulation of IP prostanoid receptor depletes the cognate G(s)alpha protein in membrane domains but does not change the receptor level. ***Biochim Biophys Acta*** 1691(1): 51-65.

Rudajev, V., Novotný, J., Hejnová, L., Milligan, G. and Svoboda, P. (2005). Dominant portion of thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and Gqalpha/G11alpha protein. ***J Biochem (Tokyo)*** 138(2): 111-125.

Matoušek, P., Novotný, J., **Rudajev, V.** and 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(1): 21-40.

Zasláno do tisku :

Rudajev, V., Stöhr, J., Bouřová, L., Lisý, V., Novotný, J. and Svoboda, P. Different behaviour of GPCRs when exposed to non-ionic detergents. *GPCR/G protein coupling in detergent-resistant membrane domains.*

Abstrakta z konferencí

Novotný, J., Bouřová, L., Stöhr, J., **Rudajev, V.**, Chalupová, A., Lisý, V. and Svoboda, P. (2003). Different activity of adenylyl cyclase and agonist-stimulated GTPase in low-density membrane fragments and bulk-plasma membranes from at brain cortex. 8th Int. Dahlem Symposium on "Cellular Signal Recognition and Transduction", June 18-21, 2003.

Novotný, J., Bouřová, L., Stöhr, J., **Rudajev, V.**, Lisý, V. and Svoboda, P. (2003) Adenylyl cyclase and GTPase activity in rat brain cortex: difference between light-density membrane fragments and bulk-membrane phase. Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduction, Brussels, July 3-8, 2003.

Stöhr, J., Bouřová, L., Hejnová, L., Novotný, J., **Rudajev, V.** and Svoboda, P. (2004). Vliv RGS1 a RGS16 na baclofenem stimulovanou vysokoafinní GTPázu v mozku mladých a dospělých zvířat. 46. česko-slovenská psychofarmakologická konference, Lázně Jeseník, 7.-11. ledna 2004, *Psychiatrie* 8: *56 (Poster 71)*.

Rudajev, V., Stöhr, J., Moravcová, Z., Novotný, J. and Svoboda, P. (2004). IP prostanoid receptor is not present in detergent-insensitive memebrane domains. 80. fyziologické dny, Praha, 3.-5. února 2004, *Physiol Res* 53: *33P (Přednáška)*.

Stöhr, J., Bouřová, L., **Rudajev, V.**, Novotný, J. and Svoboda, P. (2004). Modulation of adenylyl cyclase activity and [3H]forskolin binding in young and adult rat brain cortex. BioScience2004 - from molecules to organisms, SECC Glasgow, GB, July 18-22, 2004, *Abstract Book 83a (Poster B321)*.

Svoboda, P., Moravcová, Z., **Rudajev, V.**, Stöhr, J., Novotný, J., and Milligan, G. (2005). Catalytically small amount of IP prostanoid receptor is present in caveolin-enriched membrane domains; long-term agonist stimulation depletes the cognate Gsalpha protein but does not change receptor level. Fifth Conference of the Czech Neuroscience Society and The Annual Meeting of the Network of European Neuroscience Institutes, Prague, November 19-21, 2005.

Rudajev, V., Novotný, J., Hejnová, L., Milligan, G., and Svoboda, P. (2005). Dominant portion of thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and Gqalpha/G11alpha protein. Fifth Conference of the Czech Neuroscience Society and The Annual Meeting of the Network of European Neuroscience Institutes, Prague, November 19-21, 2005, *(Poster 68)*.

Rudajev, V., Stöhr, J., Bouřová, L., Novotný, J., and Svoboda, P. (2006) Different behaviour of GPCRs when exposed to non-ionic detergents. GPCR/G protein coupling in detergent-resistant membrane domains. Keystone Symposia. Lipid Rafts and Cell Function. Steamboat Springs, Colorado, March 23-28, 2006 *(poster 331)*.

Seznam použitých zkratek

AC	–	adenylylcyklasa
amk	–	aminokyselina
AMP	–	adenosinmonofosfát
APS	–	persíran amonný
ATP	–	adenosintrifosfát
BSA	–	hovězí sérový albumin
cAMP	–	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	–	cyklický guanosinmonofosfát
CMC_{eff}	–	efektivní kritická micelární koncentrace
DAG	–	diacylglycerol
DHA	–	dihydroalprenolol
DRMs	–	detergent resistentní membránové domény
ECL	–	enhanced chemiluminiscence
EDTA	–	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	–	epidermální růstový faktor
EGFR	–	receptor pro EGF
ERK	–	extracelulárním signálem regulovaná kinasa (=MAP kinasa)
E2M11	–	HEK293 buňky exprimující dlouhou isoformu potkaního TRH receptoru a myší G11α protein
FhIPR	–	„Flag-tagged form of human IP prostanoid receptor“ – lidský IP prosthacyklinový receptor značený antigenní sekvencí Flag
FhIPR-Gsα	–	fusní bílkovina mezi FhIPR a Gsα proteinem
fr.	–	frakce
FRET	–	fluorescence resonance energy transfer
GAP	–	GTPasu aktivující protein
$GABA_BR$	–	receptor pro γ-aminomáselnou kyselinu (GABA)
GDI	–	inhibitor disociace GDP
GDP	–	guanosindifosfát
GEF	–	guanine-nucleotide exchange factor
GFP	–	green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)
GPCR	–	receptory spřažené s trimerními G proteiny

GPI	–	glykosylfosfatidylinositol
GRK	–	kinasa receptorů spřažených s trimerními G proteiny
GsαL	–	dlouhá isoforma Gsα proteinu
GsαS	–	krátká isoforma Gsα proteinu
GTP	–	guanosintrifosfát
GTPγS	–	nehydrolysovatelný analog GTP
HEK293	–	buňky lidského embryonálního ledvinného epithelu, human embryonal kidney cells
HEPES	–	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonová kyselina
HPM	–	vysokohustotní membránová frakce (high-density plasma membranes)
CHAPS	–	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IP	–	iloprost
IP_3	–	inositoltrifosfát
LPM	–	nízkohustotní membránová frakce (low-density plasma membranes)
MAP kinasa	–	proeteinkinasa aktivovaná mitogeny
MHC I	–	major histocompatibility complex I
MITO	–	mitochondrie
PBS	–	fosfátový pufrovací roztok
PM	–	plasmatická membrána
PMSF	–	fenylmethylsulfonylfluorid
RGS	–	regulátor funkce trimerních G proteinů
rpm	–	rounds per minute, otáčky za minutu
SDS	–	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	–	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforesa
SLB	–	vzorkový pufr (sample loading buffer)
TEMED	–	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TBS	–	Trisový pufrovací roztok
TCA	–	kyselina trichloroctová
TfR	–	transferinový receptor
TM	–	transmembránový
TRH	–	thyreoliberin, thyreotropin releasing hormon
TRH-R	–	receptor pro thyreoliberin
Tris	–	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	–	Triton X-100

VSV	–	vesicular stomatitis virus
VTGP	–	linie HEK293 buněk exprimující VSV a GFP značený TRH-R
2D	–	dvourozměrný
7TM	–	sedmi-transmembránový

Úvod

Současná literatura zabývající se tzv. membránovými mikrodoménami či lipidovými rafty oplývá množstvím údajů o celé řadě různých signálních, strukturních, přenašečových a regulačních bílkovin, u nichž byl zjištěn výskyt v těchto membránových strukturách. Nás zajímala míra lokalisace komponent signální dráhy trimerních G proteinů v lipidových raftech isolovaných různými technikami a také případné změny distribuce po dlouhodobém hormonálním působení.

Signalisace přes trimerní G proteiny patří mezi nejvýznamnější signální dráhy, které buňka používá pro přijetí a zpracování signálu. Podstatnými vlastnostmi této signalisace jsou jak možnost zesílení, takže k funkčnímu přenosu signálu stačí i aktivace jen několika povrchových receptorů, tak i rozmanitost regulačních mechanismů, které na různých úrovních od zachycení signálu působí. Po navázání molekuly ligandu, kterým mohou být rozličné hormony, neuropřenašeče, neuromodulátory, odoranty a mnohé jiné signální molekuly, mění transmembránový receptor svou konformaci, což vede k aktivaci dalšího článku signální sítě – trimerního G proteinu. Interakce s aktivovaným receptorem v něm vyvolá také změnu konformace, která je spojena s výměnou v klidu vázaného guanosindifosfátu (GDP) za guanosintrifosfát (GTP), a rozpad trimerního proteinu na α-GTP a βγ podjednotky, které regulují činnost různých efektorových molekul (adenylylcyklasy, fosfolipasy, iontové kanály, fosfodiesterasy, aj.). GTPasová aktivita podjednotky α vede ke štěpení GTP na GDP a fosfát, což je následováno obnovením neaktivního stavu heterotrimeru.

Efektorové bílkoviny přenášejí signál dál do buňky přes různé proteinkinasy či změny koncentrace intracelulárních iontů a ovlivňují tak mnoho buněčných dějů na různých úrovních. Samotná dráha od receptorů spřažených s trimerními G proteiny je na mnoha místech modulována, v závislosti na aktivačním stavu může být inhibována či přesměrována k regulaci jiných procesů. To se děje regulací funkce samotného receptoru, podjednotek trimerních G proteinů i následných signálních komponent především následkem fosforylace, lipidových modifikací, nejrůznějších protein-proteinových interakcí a změn v buněčné a submembránové lokalisaci. Pro všechny tyto regulační děje pak má význam přímý kontakt různých interagujících molekul. Proto hraje v signalisaci a její modulaci významnou úlohu kompartmentalisace, tedy uspořádání signálních molekul v různých oddílech a obklopených odlišnými soustavami rozličných bílkovin. Z tohoto pohledu se jako velmi zajímavé jeví ne

příliš dávno objevené a v posledním desetiletí usilovně zkoumané membránové mikrodomény či lipidové rafty.

Lipidové rafty byly původně pozorovány jako vchlípeniny plasmatické membrány o velikosti 50-100 nm a nazvány caveolae. Charakterisované jsou specifickým lipidovým složením, bohaté jsou zejména na sfingolipidy, cholesterol a lipidy s dlouhými nasycenými uhlíkatými řetězci, které membránovým doménám udělují větší rigiditu a míru uspořádání, než je obvyklá pro většinovou fázi buněčných membrán. V rámci lipidových raftů však byla pozorována různorodost typů, která úzce souvisí i s metodami jejich isolace, jež jsou založeny především na odolnosti raftů vůči působení slabých neiontových detergentů. Nejrozšířenější a nejpůvodnější je isolace pomocí 1% Tritonu X-100, ale rafty isolované jinými detergenty (řada detergentů Brij, CHAPS, Lubrol, Tween, aj.) či bezdetergentovou extrakcí (např. pomocí 1M Na_2CO_3), mohou být co do svého lipidového i proteinového složení poněkud odlišné, takže se v současnosti zdá, že pod pojmem membránové domény či lipidové rafty je zahrnuta směs těchto membránových struktur různých vlastností, nicméně odlišná od většinové fáze plasmatické membrány.

Různí autoři pak popisují rozdílnou míru asociace jednotlivých proteinů s membránovými doménami v závislosti na typu raftu, modifikacích sledovaných proteinů, aktivačním stavu či experimentálním modelu. V souvislosti s trimerními G proteiny byly nejrůznější komponenty této signální kaskády v lipidových raftech nalezeny, počínaje samotnými trimerními G proteiny, které se v membráně vyskytují jak ve frakci lipidových raftů, tak i mimo ně, a rovněž byla částečně popsána i dynamika submembránových redistribucí po hormonálním působení. V membránových doménách byly nalezeny i efektorové molekuly adenylylcyklasy či fosfolipasy C. Poměrně rozdílné údaje pak přicházejí o lokalisaci receptorů v doménách isolovaných různými metodickými postupy. Řada receptorů spřažených s trimerními G proteiny tak v lipidových raftech v různé míře či v závislosti na hormonálním působení v raftech pozorována byla, jiné pak nikoliv. Jedná se tedy o problematiku ještě značně otevřenou, neboť některé receptory mohou být asociovány s doménami odolnými vůči určitému typu extrakce, s jinými ovšem nikoliv. Dynamické přesuny po aktivaci signální dráhy a jejich význam pro regulaci signálního procesu jsou také intensivně zkoumány. Do značné míry tedy zůstává stále nezodpovězenou otázkou podstata diversity raftových struktur a vztah různých proteinů k jednotlivým podtypům membránových domén i dynamika tohoto vztahu při aktivaci signálních drah. Odlišný výskyt a vzájemné poměry proteinů jedné signální dráhy v doménách a mimo ně pak naznačují podstatnou úlohu lipidových raftů v regulaci dějů spojených s přenosem signálu.

Cíle práce

Cílem této práce bylo nalezením optimálních podmínek pro isolaci detergent resistentních membránových domén zjistit míru lokalisace receptorů spřažených s trimerními G proteiny a ostatních komponent této signální dráhy v lipidových raftech a také zaznamenat případné změny po dlouhodobém hormonálním působení. Lipidové rafty byly isolovány jako membránové fragmenty o nízké vznášivé hustotě na diskontinuitním hustotním sacharosovém gradientu po fragmentaci buněčného materiálu homogenisací, alkalickou extrakcí (1M Na_2CO_3) a detergentovou lysí pomocí 1% Tritonu X-100. Srovnání ekvivalence těchto isolačních postupů pro separaci membránových mikrodomén bylo také jedním z našich cílů.

Jako modelový systém byly zvoleny buněčné linie HEK293 exprimující lidský IP prosthacyklinový receptor (linie FhIPR a FhIPR-Gsα) a potkaní TRH receptor (linie VTGP). Přítomnost antigenních sekvencí (Flag u FhIPR a FhIPR-Gsα, VSV a GFP u VTGP buněk) umožnila zjištění submembránové distribuce IP prosthacyklinového a TRH receptoru technikou imunoblot v klidovém stavu, a v případě FhIPR i po dlouhodobé stimulaci hormonem. Současně byly sledovány i hladiny a distribuce různých G proteinů, s rafty asociovaných bílkovin i proteinů v raftech nepřítomných, které sloužily jako identifikační prvky odpovídající isolace lipidových raftů.

Podobně jako na transfekovaných buněčných liniích bylo naším cílem také zjistit, zda s rafty isolovanými jako detergent resistentní domény pomocí Tritonu X-100 asociují $GABA_B$ receptor a β-adrenergní receptory na přirozené tkáni – kortexu telencefalonu potkana. V této souvislosti byly na gradientech Percollu a sacharosy isolovány plasmatické membrány, které byly charakterisovány detekcí řady proteinů jak pomocí vazebných studií radioligandů, tak na imunoblotu. V tritonových doménách pak byla sledována lokalisace receptorů i trimerních G proteinů, a dalších raftových i neraftových bílkovin. V neposlední řadě jsme se zaměřili i na isolaci nízkohustotních membránových fragmentů pomocí detergentu Brij 58 a zjištění funkční aktivity trimerních G proteinů v těchto membránových strukturách.

Literární přehled

Signální dráha trimerních G proteinů

Tradiční učebnicové dělení vyčleňuje několik různých skupin membránových receptorů, kterými buňka zachycuje a zaznamenává signál z vnějšího prostředí. Mezi nejhojnější patří skupina receptorů spřažených s trimerními G proteiny (G protein coupled receptors – GPCR), nebo obecněji, receptory charakterisované sedmi transmembránovými průniky – 7TM receptory. Dalšími povrchovými receptory jsou thyrosinkinasy a jiné proteiny spojeny s kinasovou aktivitou, receptory spojené s proteolysou, receptory typu iontových kanálů atd. Vzhledem k zaměření práce bude stručně nastíněna jen signalisace přes trimerní G proteiny.

Receptory spřažené s trimerními G proteiny

Jedná se o nejrozšířenější skupinu buněčných receptorů vůbec. V současné době je známo několik set různých druhů receptorů spojených s trimerními G proteiny. Mezi látky, které působí přes tyto receptory, patří rozličné neuropřenašeče, neuromodulátory, hormony a četné jiné biologicky aktivní látky. Trimerní G proteiny také přenášejí signály pocházející od receptorů, které reagují na chuťové a čichové podněty. Geny kódující všechny tyto receptory (více než 1000 různých receptorů) tvoří asi 1% savčího genomu (Birnbaumer a kol., 1990; Baldwin, 1994; Morris a Malbon, 1999).

Jsou to membránové proteiny obsahující sedm transmembránových segmentů (α-helixy, TM I-VII). Primární aminokyselinová sekvence transmembránových úseků je u různých typů receptorů relativně dost podobná, zvláště jedná-li se o receptory pro stejný ligand (Zhu a kol., 1994). N konec je orientován extracelulárně, kdežto C konec se nachází ve vnitřním prostředí buňky. Jednotlivé transmembránové segmenty jsou navzájem spojeny různě dlouhými extracelulárními nebo intracelulárními smyčkami. Zatímco části receptoru tvořící jeho vnější povrch (N koncová doména, 3 extracelulární smyčky a vně orientované části jednotlivých TM domén) jsou zodpovědné za vazbu konkrétního ligandu, tak jeho do

intracelulárního prostředí obrácená část (smyčky i1-i3, intracelulární konce TM domén a C konec receptoru) určuje interakci s G proteinem (Wess, 1997).

Jednotlivé receptory se mohou značně lišit svou délkou, která se pohybuje řádově od tří set do více než osmi set aminokyselin. Receptory se liší především velikostí N a C konce, velký rozdíl bývá i v délce intracelulární smyčky i3 (Baldwin, 1993). Každou transmembránovou doménu pak tvoří kolem 26 aminokyselinových zbytků (Baldwin, 1994).

Podle podobnosti aminokyselinové sekvence lze receptory spřažené s trimerními G proteiny dělit do několika skupin. Ale ne všechny receptory vykazující strukturu sedmi transmembránových úseků jsou spojeny s trimerními G proteiny, proto širší klasifikace zahrnuje i receptory, u nichž je způsob signalisace ještě ne zcela objasněný, nebo probíhá přes jinou než G proteinovou dráhu (např. receptory Frizzled). V různých třídících systémech bývají zahrnuty buď jen receptory obratlovců, nebo i jiných organismů, kde variabilita typů narůstá zejména u eubakterií, archaebakterií i různých „jednodušších“ eukaryot. Typické s G proteiny spojené receptory obratlovců se člení do tří skupin: třída A je nejobsáhlejší a zahrnuje rhodopsin, adrenergní receptory, čichové receptory a mnoho dalších, do třídy B patří receptory pro gastrointestinální hormony a jiné, především s Gsα a adenylylcyklasou spojené receptory, a nakonec třída C obsahující chuťové receptory, receptory pro vápenaté ionty, kyselinu γ-aminomáselnou ($GABA_B$ receptory) a metabotropní glutamátové receptory. Pro poslední skupinu je charakteristický dlouhý N konec nutný pro vazbu ligandu (Pierce a kol., 2002; Fredriksson a kol., 2003).

Jednotlivé transmembránové helixy jsou uspořádány a těsně sbaleny do nepravidelného prstencovitého útvaru, kde membránou procházející domény TM IV, VI a VII jsou na rovinu membrány téměř kolmé, kdežto průniky TM I, II, III a V jsou více či méně nakloněné (Baldwin, 1993). Celý receptor má pak na příčném průřezu oválný tvar, kde transmembránové domény (I-VII) jsou do prstencové struktury uspořádány po směru hodinových ručiček (Baldwin, 1993; Wess, 1997).

Funkce s G proteiny spojených receptorů je úzce spjata s jejich strukturou. Po navázání ligandu dochází v molekule receptoru ke konformačním změnám (posun domén TM III a TM VI)(Bourne, 1997), které mají za následek uvolnění intracelulárního vazebného místa pro trimerní G protein. Selektivita jednotlivých typů receptorů pro různé G proteiny je dána především jejich primární aminokyselinovou sekvencí, ale také hustotou a lokalisací receptorů a G proteinů v rámci plasmatické membrány (Wess, 1997). Za interakci s G proteiny jsou odpovědné především aminokyseliny v oblasti smyčky i2 a N i C konec smyčky i3. K vazbě G proteinu k receptoru přispívá také membráně blízká část C konce

molekuly receptoru (Conklin a Bourne, 1993; Hogger a kol., 1995). Například Blin a kol. ukázali na systému muskarinových acetylcholinových receptorů a s nimi spojených G proteinů, že pro aktivaci dráhy vedoucí k hydrolyse fosfatidylinositolu (viz dále) jsou za klíčovou interakci Gqα/G11α proteinu s receptorem odpovědny čtyři aminokyseliny smyčky i2, čtyři aminokyseliny na C konci a krátký segment na N konci i3 smyčky. Specifickou interakci receptorů s určitými G proteiny tak umožňuje relativně málo aminokyselin různých oblastí intracelulárního povrchu receptoru (Blin a kol., 1995).

Zdá se tedy, že v systému interakce receptoru s trimerním G proteinem jsou v konkrétních případech za vazbu a její specifitu odpovědná různá seskupení aminokyselin, což nakonec umožňuje poměrně malému množství typů podjednotek trimerních G proteinů přejímat signál od bohaté škály různých receptorů. Je však známá řada případů, kdy i jeden receptor může aktivovat různé G proteiny, a tím dráhy vedoucí k regulaci odlišných efektorových molekul, a tedy vyvolat různé výsledné fysiologické efekty. Odlišný výběr jednotlivých G proteinů může záviset na aktivačním stavu receptoru v závislosti na typu ligandu, který vyvolává konformační změnu molekuly, tak, že různé konformace umožňují interakci receptoru s odlišnými G proteiny (Perez a kol., 1996; Howlett, 2004), nebo na submembránové lokalisaci signálních komponent (Guzzi a kol., 2002).

Důležitým faktorem pro signalisaci přes receptory spřažené s trimerními G proteiny je jejich schopnost vytvářet dimery či oligomery, které mají pro funkci receptoru velký význam. Minimálně ve formě dimeru je tak schopen fungovat $GABA_B$ receptor, kde $GABA_BR1$ váže ligand, ale dimerisace s $GABA_BR2$, který zprostředkovává interakci s G proteinem, je nutná pro lokalisaci receptoru v plasmatické membráně (Kaupmann a kol., 1998; Bowery a Smart, 2006). Také β1 a β2 adrenergní receptory se v membráně vyskytují převážně jako dimery, a množství dimerů (80% v membráně přítomného receptoru) nezávisí na úrovni exprese, zatímco poměr homooligomerů a heterooligomerů na hladině jednotlivých typů β adrenergních receptorů závisí (Mercier a kol., 2002). Dimerisace těchto receptorů také ovlivňuje následnou signalisaci a v tomto případě např. brání aktivaci ERK prostřednictvím β2 adrenergního receptoru, a také internalisaci receptoru (Lavoie a kol., 2002). Dalšími receptory, u kterých byla zjištěna dimerisace, jsou CCR2 a CXCR4 chemokinové receptory vytvářející také jak homo, tak i heterodimery. Zajímavým nálezem je, že navázání ligandu i na jen jeden ze vzájemně vázaných receptorů vede ke změnám konformací obou interagujících receptorových molekul, a tato změna konformace závisí na typu ligandu (Percherancier a kol., 2005). Oligomerisace byla objevena i u dopaminových D3 receptorů

(Nimchinsky a kol., 1997), nebo u receptorů pro thyreoliberin (TRH receptor), u kterého se míra oligomerisace ještě zvyšuje po hormonální stimulaci (Kroeger a kol., 2001). δ opioidní receptory vytvářejí také homooligomery (McVey a kol., 2001), a míra homo i heterooligomerisace podtypů opioidních i dalších receptorů v klidovém stavu či v závislosti na hormonální stimulaci, spojená i s odlišnou farmakologií di- či oligomerů je shrnuta v řadě přehledných článků (např. (Devi, 2001; Milligan a kol., 2003; Milligan, 2004)). Přinejmenším se tak zdá, že pro řadu receptorů je dimer základní funkční jednotkou pro signalisaci (Milligan, 2004).

Trimerní G proteiny

Trimerní GTP vazebné proteiny (trimerní G proteiny) jsou bílkoviny, které jsou schopny vázat molekulu guanosintrifosfátu (GTP) a štěpit ji na guanosindifosfát (GDP) a fosfát (jedná se tedy o GTPasy). Trimerní G proteiny se v signální dráze, kdy je signál přenášen z vnějšího, extracelulárního prostředí do nitra buňky, uplatňují jako mezičlánek mezi receptorem a efektorem (Gilman, 1987; Simon a kol., 1991). Aktivace efektorových molekul přímo přes podjednotky G proteinů obvykle teprve spouští mnohem složitější a rozsáhlejší vnitrobuněčné regulační procesy, často končící až změnou genové exprese.

Trimerní G proteiny jsou složeny ze tří podjednotek: α, β a γ (Gilman, 1987). Tyto podjednotky vykazují ve své struktuře a funkci menší různorodost než s G proteiny spojené receptory, ale fakt, že je dnes známo 16 různých genů pro α podjednotky (podle kterých je ustavena klasifikace G proteinů), 5 genů pro β podjednotky a 11 genů pro γ podjednotky, umožňuje úvahu nad množstvím existujících kombinací jednotlivých podjednotek v rámci trimerní molekuly. Takových kombinací pak teoreticky existuje více než tisíc (Hildebrandt, 1997). Ovšem je nutné si uvědomit, že ne všechny typy α podjednotek se vyskytují rovnoměrně ve všech tkáních, naopak, např. transduciny, gustducin, αolf a některé typy γ podjednotek mají jasně určenou lokalisaci pouze v jistých typech tkání. Dále ne všechny kombinace β a γ podjednotek tvoří funkční βγ dimer. Přesto ale v jednotlivých buňkách mohou vznikat stovky funkčních kombinací mezi různými α, β a γ podjednotkami. Na druhé straně se však nezdá, že by jednotlivé kombinace v různých buňkách vznikaly čistě náhodně, význam v uspořádání molekuly heterotrimeru má specifita interakcí mezi různými podjednotkami, exprese jednotlivých isoforem G proteinových podjednotek a jejich distribuce v rámci buňky (ibid.). Různé typy βγ podjednotek jsou v buňce volně přístupné pro α podjednotky z různých tříd, takže během cyklu aktivace a deaktivace G proteinu může

docházet i k výměně βγ dimeru mezi rozličnými α podjednotkami. Jistá specifita v této interakci však existuje, jak je zmíněno již výše, a to zvláště co se týče interakce podjednotky γ s podjednotkou α. To, jaké jednotlivé typy podjednotek tvoří heterotrimer, pak může být významné i z hlediska specifity interakce G proteinu s receptorem (Neubig, 1994). V zásadě lze tedy shrnout, že uspořádání podjednotek v molekule trimerního G proteinu není čistě náhodné a že toto uspořádání hraje roli v procesu přenosu signálu (Hildebrandt, 1997).

Proces aktivace a inaktivace trimerních G proteinů je cyklický děj, při kterém se na molekulu G proteinu váže střídavě guanosindifosfát (GDP) v neaktivním stavu nebo guanosintrifosfát (GTP) ve stavu aktivním. Ten je díky vnitřní GTPasové aktivitě α podjednotky štěpen na GDP a fosfát (Gilman, 1987; Kaziro a kol., 1991; Simon a kol., 1991). Tři stavy G proteinu (navázáno GDP, GTP nebo nic) jsou následkem rozsáhlých konformačních změn, ke kterým dochází při interakci s příslušným aktivovaným receptorem. Po navázání agonisty na receptor dochází nejprve ke konformačním změnám na úrovni receptoru, a ty jsou následně přeneseny na molekulu trimerního G proteinu, který s receptorem reaguje prostřednictvím α i βγ podjednotek. Tyto konformační změny vedou k uvolnění navázaného GDP a ke zvýšení afinity ke GTP, který tak GDP na molekule G proteinu nahradí. Navázání GTP způsobí další konformační změnu G proteinu, která vyústí v disociaci heterotrimeru na dimer podjednotek βγ a podjednotku α s GTP. Jak α-GTP, tak i βγ podjednotky mají schopnost regulovat aktivitu molekul efektorů a přenášejí tak signál z vnějšího prostředí dále do buňky. V důsledku vnitřní GTPasové aktivity α podjednotky a účasti tzv. regulátorů funkce G proteinové signalisace (RGS proteinů), které urychlují GTPasovou aktivitu G proteinu, dochází relativně rychle k odštěpení koncového fosfátu z navázaného GTP a znovu vzniklá α-GDP vykazuje vysokou afinitu ke zbytku heterotrimeru, čímž je obnoven původní neaktivní stav αβγ-heterotrimeru s navázaným GDP (Kaziro a kol., 1991; Simon a kol., 1991; Neer, 1995; Hollinger a Hepler, 2002).

α podjednotky

Podle α podjednotek byla vytvořena klasifikace trimerních G proteinů. α podjednotky jsou kódovány 16 různými geny a díky alternativnímu sestřihu některých z těchto genů existuje 21 různých typů α podjednotek. Tyto α podjednotky mají relativní molekulovou hmotnost od 39000 do 52000 a podobnost aminokyselinové sekvence mezi nimi dosahuje 56-95%. Následný přehled je sestaven podle Birnbaumer a kol., 1990; Simon a kol., 1991; Neer, 1995; Hamm a Gilchrist, 1996; Hildebrandt, 1997; Pierce a kol., 2002.

Třída Gsα /Golfα

Do této třídy patří G proteiny stimulující adenylylcyklasu (viz dále) a jejich význačnou charakteristikou je jejich citlivost k cholerovému toxinu (toxin produkovaný bakterií *Vibrio cholerae*). Z jediného genu pro Gsα protein vznikají díky alternativnímu sestřihu čtyři isoformy Gsα proteinu, Gsα1-Gsα4. Gsα1 a Gsα2 jsou tzv. dlouhé varianty lišící se od krátkých variant Gsα3 a Gsα4 sekvencí 14-15 aminokyselin (přítomnost či nepřítomnost aminokyseliny serinu odlišuje Gsα1 a Gsα2, respektive Gsα3 a Gsα4). Golfα je G protein čichového epitelu, který také stimuluje adenylylcyklasu a s Gs proteiny vykazuje 88% aminokyselinovou podobnost.

Třída Giα/Goα

G proteiny této skupiny mají schopnost jednak inhibovat funkci adenylylcyklasy, jednak stimulovat fosfolipasu Cβ, a také ovlivňovat iontové kanály. Jsou citlivé na toxin z bakterie *Bordetella pertussis.* Patří sem proteiny Gi: Giα1, Giα2 a Giα3, které jsou produkty separátních genů, a spolu s proteiny Goα1 a Goα2 (produkty jednoho genu vzniklé alternativním sestřihem) mohou působit inhibičně na adenylylcyklasu a iontové kanály. Transduciny, Gtα1 a Gtα2 , jsou G proteiny světločivného epitelu oka a přenášejí signál z molekuly rhodopsinu (receptor) na fosfodiesterasu (efektor, viz dále). Do této třídy patří i gustducin, Ggustα, G protein chuťového epitelu, a Gzα.

Třída Gqα/G11α

Tyto proteiny také stimulují fosfolipasu Cβ, ale oproti G proteinům předchozí skupiny nejsou tyto citlivé k pertusis toxinu. Patří sem Gα proteiny Gq, G11, G14, G15 a G16.

Třída G12α/G13α

Tyto G proteiny se účastní především interakce s MAP kinasovými drahami prostřednictvím regulace funkce faktoru způsobujícího výměnu GDP za GTP (guanine-nucleotide exchange factor - GEF) u malého G proteinu Rho.

S výjimkou těch G proteinů, které se účastní přenosu specifických smyslových signálů, jako jsou Gtα, Ggustα a Golfα a několika typů α podjednotek, které jsou exprimovány především v nervových buňkách (Goα) a krevních buňkách (G16α), je většina

Gα proteinů přítomna v širokém spektru tkání, takže jednotlivé buňky vlastní výbavu přinejmenším čtyř až pěti různých typů α podjednotek (Simon a kol., 1991; Neer, 1995).

Co se týče struktury α podjednotky, tato se skládá ze dvou domén. GTPasová doména obsahuje místo pro navázání guaninového nukleotidu a místa zodpovědná za interakci s receptorem, efektorem a βγ dimerem. Funkce druhé domény, tzv. helikální domény, souvisí se štěpením GTP a také přispívá k vazbě α podjednotky k molekule efektoru (Neer, 1995). Na povrchu molekuly α podjednotky jsou tři oblasti, které jsou odpovědné za interakci s βγ podjednotkou (prvních 25 aminokyselin N konce a tzv. α2 helix), s efektorem (helixy α2-α4) a s receptorem (α5 helix a především C konec alfa podjednotky G proteinu, uplatňuje se i její N konec) (Conklin a Bourne, 1993; Neer, 1995).

βγ podjednotky

Za fysiologických podmínek se β a γ podjednotky vyskytují pouze ve formě heterodimeru (Hamm a Gilchrist, 1996). Kromě toho, že se účastní přímo přenosu signálu, napomáhají i specifické interakci mezi G proteinem a receptorem. Pět známých typů β podjednotek vykazuje v aminokyselinové sekvenci 50-83% podobnost. Všechny typy mají přibližnou relativní molekulovou hmotnost okolo 36000. Ve struktuře β podjednotek je zajímavá přítomnost sedmkrát se opakujícího sekvenčního motivu o přibližně 43 aminokyselinách, kde se hojně vyskytuje aminokyselinový pár tryptofan-aspartát (tzv. WD opakování) (Simon a kol., 1991; Neer, 1995). U γ podjednotek je patrná mnohem větší různorodost než u β podjednotek. Tyto podjednotky vykazují jen 27-75% homologii, takže se předpokládá, že to jsou právě γ podjednotky, které určují funkční specifitu βγ komplexu. γ podjednotky jsou ze všech tří podjednotek trimerních G proteinů nejmenší, jejich relativní molekulová hmotnost je jen 6-9000. Struktura γ podjednotek je převážně α helikální. Selektivita γ podjednotky pro podjednotku β je dána sekvencí 14 aminokyselin ve střední části molekuly γ podjednotky. V souvislosti s γ podjednotkou je funkčně velice významná její posttranslační modifikace – prenylace na C konci. Přítomnost prenylové skupiny je zásadní pro zakotvení βγ dimeru v membráně (Simon a kol., 1991; Neer, 1995; Hamm a Gilchrist, 1996).

Efektorové systémy a regulace signalisace G proteinů

α a βγ podjednotky trimerních G proteinů regulují aktivitu různých typů efektorových molekul. Těmi jsou enzymy účastnící se synthesy a degradace molekul intracelulárních druhých poslů, iontové kanály a také proteiny MAP kinasové dráhy (Hamm a Gilchrist, 1996; Morris a Malbon, 1999; Pierce a kol., 2002).

Adenylylcyklasy

Adenylylcyklasy katalysují přeměnu molekuly adenosintrisfosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Ten, jakožto jeden z nejvýznamnějších intracelulárních tzv. druhých poslů, aktivuje proteinkinasu A, a tím signální dráhu zahrnující fosforylace a defosforylace proteinů (Simonds, 1999).

Membránové adenylylcyklasy jsou proteiny o relativní molekulové hmotnosti 120-140000 s intracelulárním C koncem, dvěma transmembránovými doménami, které jsou propojeny první cytosolickou smyčkou C1, a N koncem, který tvoří druhou (C2) cytosolickou doménu. C1 a C2 oblast pak tvoří katalytické místo. Zdá se, že podobně jako receptory, adenylylcyklasy fungují jako dimery či oligomery (Cooper, 2005). V současné době je známo devět typů membránových adenylylcyklas (I-IX). Všechny membránové adenylylcyklasy jsou stimulované α podjednotkou Gs proteinu, jejich aktivitu také ovlivňuje βγ dimer, a to jak pozitivně (AC II, AC IV, možná AC VII), tak negativně (AC I). Je zajímavé, že účinek βγ komplexu se projeví jen za přítomnosti Gsα. Inhibičně na některé AC působí Giα, Goα a Gzα proteiny (Simonds, 1999).

Kromě G proteinů reguluje činnost adenylylcyklas také proteinkinasa C a calmodulin/Ca^{2+}. Tím jsou adenylylcyklasy spojeny i s jinými signálními drahami než s těmi, které působí přes trimerní G proteiny (Simonds, 1999; Cooper, 2005).

Fosfolipasy Cβ

Za hydrolysu fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu jsou odpovědné fosfolipasy, z nichž fosfolipasy C katalysují hydrolytické štěpení, při kterém vznikají molekuly tzv. druhých poslů: diacylglycerol (DAG) a 1,4,5-inositoltrifosfát (IP_3). Fosfolipas C jsou známy tři typy: β, γ a δ. Pouze fosfolipasy Cβ jsou regulované trimerními G proteiny, zatímco k aktivaci fosfolipas Cγ dochází působením různých růstových faktorů prostřednictvím receptorových a non-receptorových thyrosinkinas. V regulaci fosfolipas Cδ hraje významnou úlohu interakce proteinu s membránovými fosfolipidy (Toker, 1998).

Působením fosfolipas Cβ dochází k hydrolytickému štěpení molekul membránového fosfolipidu fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu na DAG a IP_3, což vede k následné aktivaci proteinkinasy C (prostřednictvím DAG, případně DAG a Ca^{2+}) a uvolnění intracelulárního Ca^{2+} (působením IP_3)(Exton, 1994; Divecha a Irvine, 1995; Newton, 1997; Toker, 1998). Jsou známy čtyři typy fosfolipas Cβ: β_1–β_4, které se liší svou citlivostí k α a βγ podjednotkám (Morris a Malbon, 1999). Za regulaci fosfolipas Cβ jsou odpovědné α podjednotky trimerních G proteinů třídy Gqα/G11α (Clapham, 1995). Kromě α podjednotek trimerních G proteinů působí na fosfolipasy Cβ i βγ podjednotky G proteinů, přičemž α a βγ podjednotky se na molekule efektoru váží na různá místa, což naznačuje nezávislou regulaci α a βγ podjednotkami (ibid.).

cGMP fosfodiesterasa

Jediná trimerními G proteiny ovládaná fosfodiesterasa, cGMP fosfodiesterasa, hraje ústřední roli v procesu excitace fotoreceptorových buněk visuálního systému obratlovců. Absorpce fotonu molekulou rhodopsinu vede k aktivaci fosfodiesterasy, která následně katalysuje hydrolysu cGMP (cyklický guanosinmonofosfát), což způsobí uzavírání cGMP ovládaných sodných kanálů a následnou hyperpolarisaci buněčné membrány. G proteinem, regulujícím přenos signálu z molekuly rhodopsinu na molekulu fosfodiesterasy, je transducin (Gtα), jehož GTPasová aktivita je významně stimulována specifickým RGS proteinem (Morris a Malbon, 1999; Arshavsky a kol., 2002).

PI 3-kinasy

PI kinasy jsou ATP-dependentní enzymy, které katalysují fosforylaci inositol obsahujících fosfolipidů. Trimerními G proteiny ovládané PI 3-kinasy katalysují fosforylaci tří membránových fosfolipidů: fosfatidylinositolu (PI) na fosfatidylinositol 3-fosfát, fosfatidylinositol 4-fosfátu na fosfatidylinositol 3,4-bisfosfát a fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu na fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát. PI 3-kinasy se tak účastní regulace přenosu signálu, a prostřednictvím interakce s MAP kinasovými drahami modulují uspořádání cytoskeletu, průběh mitosy, buněčné diferenciace a dějů spojených s apoptosou (Vanhaesebroeck a kol., 1997; Toker, 1998; Verkleij a Post, 2000).

Iontové kanály

Řada receptorů spřažených s trimerními G proteiny hraje důležitou roli také v ovládání a modulaci činnosti iontových kanálů, selektivních pro Na^+, K^+ a Ca^{2+} (Birnbaumer a kol.,

1990; Jan a Jan, 1997; Morris a Malbon, 1999). Tato regulace probíhá jak nepřímo, tedy přes druhé posly, tak i přímým ovlivněním iontových kanálů podjednotkami G proteinů (působí tak α i βγ podjednotka). To je prokázáno u srdečních draslíkových kanálů, ovládaných Giα i Gβγ. G proteiny ovládané jsou i některé Cl^- kanály (Jan a Jan, 1997; Morris a Malbon, 1999).

Mezi proteiny, jejichž funkce je modulována trimerními G proteiny, patří i mnoho dalších různých regulačních a signál přenášejících bílkovin. Mezi ně patří fosfolipasa A_2, jejímž působením je započata enzymatická dráha vedoucí k synthese prosthanoidů, které mají významný fysiologický účinek v řadě tkání a procesů. Dále trimerní G proteiny ovlivňují funkci thyrosinové kinasy c-Src, faktorů odpovědných za GDP/GTP výměnu u různých malých G proteinů (RhoGEF), GTPasu aktivující protein pro malý G protein Rap (RapGAP), kinas receptorů spřažených s trimerními G proteiny (GRK) aj. (Morris a Malbon, 1999; Pierce a kol., 2002). Spektrum proteinů hrajících úlohu v signalisaci, jejichž funkce je ovlivněna aktivací receptoru spřaženého s trimerním G proteinem, umožňuje bohaté a významné křížení a vzájemné modulování signálních drah různých typů. Kromě výše zmíněných nejnápadnějších efektorových systémů jsou to např. změny aktivit bílkovin MAP kinasových drah – receptorovými kinasami počínaje a samotnými MAP kinasami konče, což se děje přes kinasu c-Src, PI3-kinasu, změnu nitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů, proteinkinasu A a C, které fosforylacemi různých substrátů navozují změny ve funkci mnoha molekul, dále jsou to přímé protein-proteinové interakce mezi trimerními G proteiny a jinými bílkovinami, nebo funkční kontakt receptoru s proteiny poskytujícími lešení – vazebné domény – pro jiné signální proteiny, atd. Výsledkem pak jsou změny v uspořádání cytoskeletu, změny genové exprese, aktivace stresových odpovědí a řada jiných rozmanitých buněčných reakcí. Pochopitelně, nejen signalisace přes trimerní G proteiny ovlivňuje ostatní signální dráhy, ale i sama je aktivitou jiných proteinů poznamenána. Aktuální stav buňky a lokalisace v určitém prostředí (kompartmentalisace) tak mají klíčový význam pro směr, který bude probíhajícímu signálu udán (Cordeaux a Hill, 2002; Hur a Kim, 2002; Lowes a kol., 2002; Pierce a kol., 2002).

Dalším důležitým faktorem signalisace trimerních G proteinů je kromě kvalitativní výbavy buňky (kompartmentu) co se týče povahy přítomných molekul, také aspekt kvantitativní, tedy vzájemné poměry signálních komponent. V procesu zesílení signálu ve směru od aktivovaného receptoru je prvním významným jevem nadbytek množství G proteinu oproti membránovému receptoru. Každá molekula receptoru je tak schopna vyvolat výměnu GDP za GTP až na několika desítkách α podjednotek G proteinu (Gierschik a kol., 1991). Na

srdečních myocytech byl naměřen více než 200-násobný počet molekul Gsα vzhledem k β adrenergním receptorům, což je jistě poměr naznačující možnost zesílení signálu na této úrovni, ale na druhou stranu, poměru receptoru ke G proteinu 1:200 odpovídaly jen 3 molekuly adenylylcyklasy. Čili míra a místa zesílení signálu patrně závisí na více různých faktorech, včetně odlišného výskytu proteinů účastnících se signalisace v buněčných kompartmentech (Ransnas a Insel, 1988; Post a kol., 1995).

Subcelulární distribuce a aktivita či schopnost aktivace proteinů signálních drah se může poměrně dramaticky měnit po stimulaci hormonem. To bylo prokázáno pro receptory i trimerní G proteiny v různých časových škálách hormonálního působení. Především je třeba zabránit trvalé aktivaci signální dráhy a přenos signálu omezit či zastavit. V procesu desensitisace (snížení biologické odpovědi při setrvalé stimulaci ligandem) je třeba uvést především inaktivaci receptoru způsobenou fosforylací. K té dochází následkem negativní zpětné vazby působením proteinkinas A a C, které fosforylují nejen aktivované receptory, ale i mnoho dalších substrátových molekul. Specifické vůči aktivovaným receptorům jsou pak kinasy receptorů spřažených s trimerními G proteiny, tzv. GRKs – „G protein coupled receptor kinases“. Těch je známo šest typů, vykazujících odlišnou tkáňovou distribuci a substrátovou specifitu vůči různým receptorům (Moffett a kol., 1993; Carman a Benovic, 1998). Fosforylované aminokyseliny vytvářejí nový vazebný motiv pro další regulační protein – arrestin. Visuální a tyčinkový arrestin jsou omezeny pouze na sítnici oka, zatímco β-arrestin 1 a 2 jsou exprimovány v řadě tkání. Svou vazbou na fosforylovaný receptor dále brání aktivaci trimerního G proteinu, a také samy poskytují četné interakční povrchy pro vazbu dalších bílkovin. Způsobují tak i vazbu na clathrin a tvorbu clathrinových váčků, čímž vyvolají endocytosu receptoru, ale β-arrestin také může vázat MAP kinasy a jiné signální molekuly, což má za následek nejen inhibici signalisace přes trimerní G proteiny, ale i odklon k jiným signálním drahám. Interakce receptoru s arrestinem a následné děje však jsou kontextuálně i receptorově specifické (Zhang a kol., 1999; Luttrell a Lefkowitz, 2002; Pierce a kol., 2002).

Subcelulární redistribuce po vazbě ligandu byla pozorována u řady různých receptorů (acetylcholinový M1 i M2 muskarinový, β2 adrenergní, μ opioidní, A1 angiotensinový aj.). Jednotlivé receptory tak mohou sdílet poněkud odlišný osud, endocytosa může vést k defosforylaci a návratu receptoru do plasmatické membrány (resensitisaci), nebo k jeho proteolytické degradaci (down-regulaci) (Tolbert a Lameh, 1996; Kallal a kol., 1998; Zhang a kol., 1999). Desensitisace na úrovni receptoru je děj poměrně rychlý a nastává během jedné

minuty, jak bylo ukázáno např. na receptorech pro bradykinin a TRH (Anderson a kol., 1995). K internalisaci TRH receptoru dochází již během několika minut hormonálního působení, naproti tomu, internalisace příslušného G proteinu (Gqα/G11α) je děj řádově pomalejší, a předchází jí shlukování (sekvestrace) molekul G proteinu během desítek minut působení TRH. Internalisace je pak pozorována až po několika hodinách a probíhá za pomoci endocytárního aparátu odlišného od receptorového (Drmota a kol., 1998b; Drmota a kol., 1999). Internalisace G proteinu může být vedle odštěpení G protein obsahujících váčků od plasmatické membrány provázena i jeho solubilisací, tedy uvolněním od membrány do cytosolu, jak bylo ukázáno na Gsα proteinu (Ransnas a kol., 1989; Negishi a kol., 1992; Svoboda a kol., 1996; Lee a kol., 1999; Svoboda a Novotny, 2002). Podobně jako u receptorů, i množství G proteinu může být jeho směrováním k degradaci sníženo po dlouhodobém vystavení hormonu (Mullaney a kol., 1993; Svoboda a Milligan, 1994; Svoboda a Novotny, 2002).

V regulaci signalisace prostřednictvím změny lokalisace signálních komponent v membránových/buněčných kompartmentech a směrováním proteinů do odlišného prostředí charakterisovaného jinými potenciálními interakčními partnery hraje významnou roli i nehomogenita samotných membránových struktur a existence tzv. lipidových raftů či membránových domén, o kterých pojednává následující část.

Lipidové rafty

Struktura lipidových raftů

V minulosti bylo navrženo několik modelů, které měly vysvětlit a popsat strukturu a funkci buněčných membrán. Učebnicovým příkladem se stal model tzv. tekuté mosaiky (Singer a Nicolson, 1972), který charakterisoval plasmatickou membránu jakožto v zásadě dvourozměrnou kapalnou fázi, ve které se molekuly lipidů a bílkovin volně pohybují na základě difuse. Vzájemné srážky mezi molekulami jsou pak podkladem pro jejich případné interakce. Nicméně, na základě podrobnějšího výzkumu musel být tento model poněkud opraven a rozšířen, neboť bylo zjištěno rozdílné strukturní uspořádání různých typů membránových lipidů v rámci membránové fáze. První nehomogenita buněčné membrány byla pozorována již v 50. letech v podobě drobných (50-100 nm) lahvicovitých či jamkovitých vchlípenin plasmatické membrány, které byly příznačně nazvány caveolae

(caveoly) (Lisanti a kol., 1994; Parton, 1996). Jako strukturní protein zodpovědný za formování caveol byl o několik desítek let později odhalen protein caveolin, který má schopnost interagovat s membránovými lipidy (sfingolipidy a cholesterolem) a různými proteiny. Jsou známy tři geny pro caveolin, přičemž caveolin-1 (původně pojmenovaný „vesikulární integrální membránový protein o 21 kDa“ - VIP21 (Monier a kol., 1995; Parton, 1996)) se vyskytuje ve dvou formách (caveolin-1α a 1β), je znám z celé řady tkání a spolu s caveolinem-2 vytváří caveoly v různých buněčných typech. Naproti tomu caveolin-3 je typický pro plasmatické membrány svalových buněk a vláken (Parton, 1996; Way a Parton, 1996; Scherer a kol., 1997). Relativní molekulová hmotnost caveolinu (M_r) je 21-24 000 (Scherer a kol., 1997). Caveolin je integrální membránová bílkovina, jejíž N i C terminální oblast je orientována intracelulárně a hydrofobní úsek zanořený do membrány tvoří smyčku o 33 aminokyselinách. Za tvorbu caveolinových oligomerů je odpovědný především N konec a transmembránová oblast molekuly, a tak vznikají oligomery tvořené 14-16 molekulami caveolinu. C konec se pak zdá být důležitý pro interakce mezi těmito oligomery a vznik caveol (Song a kol., 1997). Kromě této strukturní funkce, intracelulární konce caveolinu poskytují vazebné motivy pro řadu bílkovin různých typů (α podjednotky trimerních G proteinů, Ras, Src aj.). Interakce těchto bílkovin s caveolinem pak má význam nejen pro jejich soustředění v oblasti caveol, ale tato vazba může mít i inhibiční nebo aktivační vliv na funkci příslušných signálních proteinů (Lisanti a kol., 1994; Scherer a kol., 1997; Shaul a Anderson, 1998; Jacobson a Dietrich, 1999; Murthy a Makhlouf, 2000).

Funkčnímu vysvětlení caveolárních struktur se věnovala a věnuje celá řada autorů a výzkumných skupin. Nejprve byl popsán význam caveol v endocytose (endocytosou přes caveoly vstupuje do buňky např. cholerový toxin - (Le a Nabi, 2003)) a v ději nazvaném potocytosa (Parton, 1996). Princip potocytosy spočívá v tom, že v caveole se hojně nacházejí receptory pro určitou látku (např. folát), jejíž koncentrace v okolí buňky může být i velmi nízká, a to umožňuje lokální zvýšení koncentrace vychytávané látky právě v caveole, která se následně uzavře, ale od plasmatické membrány neoddělí. Molekuly zachycené látky jsou pak pomocí specifických přenašečů po koncentračním spádu vpraveny do buňky a caveola se opět otevírá (Anderson, 1993). Dále v 90. letech minulého a na počátku tohoto století je postupně odhalován další význam caveol, a to především v buněčné signalisaci, protože celá řada rozličných komponent různých signálních systémů je v caveolách ve svém výskytu značně obohacena. Jedná se především o různé povrchové receptory a bílkoviny vázané do membrány pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI vázané proteiny), o intracelulární thyrosinové kinasy rodiny Src, o trimerní G proteiny a receptory s nimi spřažené, stejně jako

efektory trimerních G proteinů (např. některé adenylylcyklasy), NO synthasu a pestrou škálu dalších signální přenos modulujících bílkovin (Lisanti a kol., 1994; Li a kol., 1995; Shaul a Anderson, 1998; Jacobson a Dietrich, 1999; Pesanova a kol., 1999; Rybin a kol., 2000; Foster a kol., 2003).

Caveolin po synthese na endoplasmatickém retikulu prochází přes Golgiho aparát a následně je dopraven do plasmatické membrány. Celý tento transport, zvláště pak skrze Golgiho komplex a do plasmatické membrány, je silně závislý na cholesterolu. Podstatným faktem také je, že k formování caveol oligomerisací molekul caveolinu a interakcí s cholesterolem dochází až za Golgiho aparátem, čili že v rámci Golgiho komplexu struktura caveol stále ještě není vytvořena (Pol a kol., 2005).

Ovšem není to jen samotná přítomnost caveolinu, která zajišťuje formování a existenci těchto specifických membránových struktur. Bylo zjištěno, že i v buněčných liniích, kde exprese caveolinu nebyla pozorována (některé lymfocytární a nervové buňky (Fra a kol., 1994; Gorodinsky a Harris, 1995)), existují v rámci plasmatické membrány útvary organisovanější a rigidnější struktury, než je typická pro většinovou fázi plasmatické membrány. Tyto útvary byly nazvány lipidovými rafty (vory) a jejich odolnost vůči působení slabých neiontových detergentů umožnila jejich bližší charakterisaci. Samotný metodický nástroj pro jejich isolaci, tedy působení slabého detergentu (původně 1% Tritonu X-100 při 4°C) a následná separace na diskontinuitních flotačních sacharosových gradientech, umožnil lipidové rafty definovat jako detergent resistentní/insensitivní či Triton insensitivní membránové domény (mikrodomény) – DRMs, DIMs, TIMs, které při centrifugaci flotují do oblasti sacharos o nízké hustotě (často rozhraní 5 a 30% sacharosy) (Simons a Ikonen, 1997; Jacobson a Dietrich, 1999; Pike, 2003). Analysa složení membránových domén – lipidových raftů – ukázala, že podstatou jejich rigidnější struktury je výskyt specifických lipidů charakterisovaných dlouhými a rovnými (nasycenými) mastnými řetězci raftových lipidů (především sfingolipidů) a vyšším podílem cholesterolu oproti okolní, většinové fázi plasmatické membrány. Těsnější uspořádání takovýchto lipidových molekul, kde prostory mezi nimi jsou vyplněny cholesterolem, udává membránovým mikrodoménám vyšší bod tání a o něco uspořádanější strukturu (tzv. liquid-ordered phase) (Ahmed a kol., 1997; Brown a London, 1997). Význam cholesterolu je přitom nezastupitelný a jeho extrakce např. pomocí methyl-β-cyklodextrinu vede k rozpadu lipidových raftů (Navratil a kol., 2003; Hur a kol., 2004). Výskyt sfingolipidů je omezen pouze na vnější list buněčné membrány, zatímco na vnitřní straně jsou v oblasti lipidových raftů zastoupeny glycerofosfolipidy s rovnými (nasycenými) mastnými řetězci (Pike, 2004).

Diversita lipidových raftů

Byla již zmíněna existence necaveolárních lipidových raftů v buňkách, které patrně caveolin postrádají. Přítomnost lipidových raftů neobsahujících caveolin však byla dokázána i v membránách, kde morfologicky i funkčně caveoly vyvinuty jsou. Tyto se pak liší lipidovým i proteinovým složením, což umožnilo jejich experimentální oddělení. Oh a Schnitzer ukázali odlišné preference jednotlivých podjednotek trimerních G proteinů ke caveolám nebo lipidovým raftům odlišným od caveol – Gqα byl specificky koncentrován v caveolách, zatímco Giα, Gsα a Gβγ v odlišném typu membránových mikrodomén (Oh a Schnitzer, 2001). Na druhou stranu, caveolin má schopnost prostřednictvím přímé interakce (amk 82-101) vázat α podjednotky G proteinů Gs, Gi a Go v jejich neaktivním stavu a tím inhibičně působit na příslušnou signální dráhu (Li a kol., 1995), ale odlišné zastoupení i jiných raftových proteinů v různých typech membránových mikrodomén bylo zaznamenáno např. pro GPI vázané bílkoviny (Schnitzer a kol., 1995; Wang a kol., 2002). Zdá se tedy, že přinejmenším caveolae a od nich odlišné lipidové rafty vedle sebe existují, ale různorodost výsledků ohledně zastoupení různých proteinů a lipidů v membránových doménách v závislosti na použité technice isolace raftů naznačuje ještě větší různorodost in vivo existujících membránových domén.

Původní postup využívající působení 1% Tritonu X-100 a následné separace na 5-40% sacharosovém gradientu byl postupně doplňován aplikací celé řady jiných detergentů o různých koncentracích. Lipidové rafty jsou tak isolovány nejen jako Triton resistentní membránové domény, ale také pomocí neiontových detergentů Brij (Brij 56, Brij 58, Brij 96, Brij 98), Tween 20, Nonidet NP-40, Lubrol, či zwitteriontového detergentu CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát). Metodu pro isolaci raftů bez použití detergentu působením silné zásady a sonikací zavedl Song (Song a kol., 1996).

Detergenty jsou solubilní látky amfifilního charakteru, které pro interakce s ostatními molekulami poskytují hydrofilní i hydrofobní skupiny, přičemž obvykle jsou hydrofilnější než většina lipidů biologických membrán. Podle náboje lze detergenty dělit na aniontové (např. dodecyl-sulfát sodný, SDS), kationtové, zwitteriontové (CHAPS) a neiontové (řada polyoxyethylenglykolových detergentů – Brij, TX-100, Tween, Lubrol, aj.). Pro isolaci membránových domén jsou pro své mírné účinky používány právě detergenty neiontové, případně CHAPS (zwitterion) (le Maire a kol., 2000; Kalipatnapu a Chattopadhyay, 2005).

Práce Schuck a kol., 2003 se obšírně zabývá povahou membránových fragmentů získaných pomocí různých detergentů. Pro jejich charakterisaci autoři použili mimo jiné imunobloty, na kterých pozorovali distribuci různých proteinů, typických pro rafty (caveolin, GPI vázanou placentální alkalickou fosfatasu aj.), či naopak, v raftech nepřítomných (transferinový receptor, calnexin). Ne všechny „markerové“ proteiny se však v sacharosových gradientech připravených pomocí různých detergentů chovaly stejně. Užití Lubrolu vedlo k solubilisaci jen calnexinu (protein endoplasmatického retikula - (Wada a kol., 1991)), kdežto většina ostatních proteinů zůstala asociována s flotujícími fragmenty membránových struktur; naopak, jako nejsilněji působící detergent se ukázal být Triton X-100, který způsobil kromě jiných i solubilisaci transferinového receptoru, který bývá mnohdy udáván jako protein neasociovaný s lipidovými rafty (Lasley a kol., 2000; Chamberlain a Gould, 2002). Ostatní detergenty pak byly většinou mírnější než Triton X-100 a silnější než Lubrol, případně byl jejich účinek těmto dvěma detergentům podobný, a tak lze sledované detergenty zhruba dělit na mírnější, tedy ty, které dovolí více proteinům flotovat v rámci sacharosového gradientu (Lubrol, Tween, Brij 58), a na ty, jejichž působení je poměrně silné a rafty jimi získané obsahují proteinů méně (Triton X-100, CHAPS). Ostatní detergenty (Brij 98, Brij 96) tvořily ve svém účinku přechod mezi poměrně mírným (Lubrol, Tween 20, Brij 58) a silným (TX-100, CHAPS) působením (Schuck a kol., 2003).

Kromě typu detergentu, který lze pro isolaci lipidových raftů – membránových mikrodomén použít, je rovněž důležitá jeho koncentrace, tedy poměr použitého detergentu k množství lipidů a proteinů (membrán) ve vzorku. Faktorem, jenž působení konkrétního detergentu v daných podmínkách popisuje, je tzv. efektivní kritická micelární koncentrace (effective critical micellar concentration – CMC_{eff}), která udává takovou koncentraci detergentu, kdy se jeho monomerní molekuly začnou v roztoku samy shlukovat a tvořit micely. Pokud je koncentrace detergentu ve vzorku nižší než příslušná CMC_{eff}, molekuly detergentu se pouze začlení do lipidové dvouvrstvy membrány, aniž by podstatně narušily její strukturu. Dochází-li však ke zvyšování poměru detergent/lipidy, molekuly detergentu způsobí roztrhání membrány a následný vznik směsných micel, ve kterých jsou zastoupeny molekuly lipidů, detergentu a proteinů (Kalipatnapu a Chattopadhyay, 2005). Pro isolaci raftů je tedy potřeba použít koncentraci lipidů vyšší než CMC_{eff}, avšak ne příliš vysokou, aby struktura raftů zůstala zachována, nicméně takovou, aby domény byly odděleny od většinové, detergentem rozpuštěné fáze.

Rozmanitostí isolovaných membránových fragmentů získaných za použití různých detergentů či bezdetergentové metody se zabývá Linda Pike (Pike, 2004) a navrhuje tři

modely vysvětlující tuto různorodost. První model předpokládá existenci raftů tvořených koncentricky uspořádanými vrstvami charakterisovanými poněkud odlišným proteinovým a lipidovým složením. Relativně silné detergenty (Triton X-100, CHAPS) pak způsobí rozpuštění vnějších vrstev raftu a jako detergent resistentní membránové domény jsou isolována pouze vnitřní „jádra“ raftu. Mírněji působící detergenty (Brij 96, Brij 98) nebo alkalická extrakce zachovají větší oblast raftu a víceméně celý lipidový raft je isolován po působení velmi mírných detergentů Lubrol či Tween. Druhý model je založen na existenci homogenních raftů, vůči kterým se různé detergenty chovají různě. Podle autorky je pak nejpravděpodobnější vysvětlení pomocí třetího modelu, který pozorovanou různorodost vysvětluje jako důsledek skutečně existujících různých typů raftů o odlišném proteinovém a lipidovém složení, z nichž jednotlivé typy jsou různě citlivé k vybraným typům isolace (detergentové i nedetergentové techniky).

Existence lipidových raftů různých typů (přinejmenším caveolae a ty ostatní, patrně však o větší rozmanitosti) byla tedy prokázána mnoha výzkumnými skupinami za použití pestré škály rozličných metod a technik. Nicméně v jaké formě se v různých buněčných typech vyskytují, které proteiny v nich jsou či nejsou přítomny, mnohdy zůstává stále nezodpovězenou otázkou.

Proteiny lipidových raftů

Kromě již zmíněného caveolinu, strukturní funkci v membránových raftech zastává přinejmenším další membránový protein, flotillin (Reggie) (M_r 45 000). Flotillin-1 (Reggie-1) a flotillin-2 (flotillin-2/ESA, Reggie-2) jsou exprimovány i v buňkách neexprimujících caveolin-1 a umožňují existenci caveolám podobným váčkům. Jedná se o bílkoviny zastoupené v různých tkáních (zvláště flotillin-2) a tam, kde se vyskytují společně s caveolinem, mohou s ním vytvářet oligomerní struktury a podílet se tak na tvorbě lipidových raftů caveolárního typu (Bickel a kol., 1997; Volonte a kol., 1999; Neumann-Giesen a kol., 2004). Široký výskyt tohoto proteinu a lokalisace v membránových mikrodoménách umožnila používat jej vedle caveolinu a různých GPI vázaných proteinů jako „marker“ lipidových raftů.

Caveolin i flotillin jsou membránové bílkoviny se strukturní funkcí významnou pro tvorbu a udržení specifických membránových struktur. Jako další transmembránové bílkoviny lipidových raftů byly zjištěny četné signální molekuly (např. některé adenylylcyklasy, receptory spřažené s trimerními G proteiny aj.). Zmíněny byly GPI vázané bílkoviny a také proteiny cytosolárního listu plasmatické membrány (podjednotky trimerních G proteinů, Ras,

kinasy rodiny Src, NO synthasa a mnoho dalších). Interakce proteinů s lipidovými rafty může být dosaženo různými mechanismy. Pro extracelulárně orientované bílkoviny jsou to především různé variace glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy, které se mohou lišit např. typem mastné kyseliny i vazby, kterou je mastná kyselina vázána ke zbytku molekuly. Tato rozmanitost GPI kotev může vést k odlišnému směrování různých GPI vázaných proteinů do různých typů membránových mikrodomén (Pike, 2004). Přítomnost GPI vázaných bílkovin v lipidových raftech byla zjištěna již na samém počátku výzkumu těchto membránových struktur (Lisanti a kol., 1994; Gorodinsky a Harris, 1995; Shaul a Anderson, 1998; Jacobson a Dietrich, 1999; Foster a kol., 2003).

Pro bílkoviny postrádající GPI kotvu zdá se být nejvýznamnějším způsobem začlenění do lipidových raftů modifikace vazbou zbytku nebo zbytků mastných kyselin. Požadována je minimálně dvojí acylace palmitátem nebo palmitátem a myristátem. Např. Giα1 je na svém N konci myristoylován a palmitoylován, a tato modifikace vede k lokalisaci proteinu v lipidových raftech. Mutanty postrádající tyto mastné kyseliny v membránových mikrodoménách přítomny nejsou (Galbiati a kol., 1999). Pro interakci acylovaného G proteinu a caveolinu-1 je také vyžadována palmitoylace přímo caveolinu (na třech cysteinech), a pokud caveolin není takto modifikován, interakce s Giα1 je narušena (ibid.). Palmitoylace proteinů je děj reversibilní (Degtyarev a kol., 1993), což umožňuje regulaci lokalisace palmitoylované bílkoviny nejen do frakce lipidových raftů, ale také do samotné plasmatické membrány, jak bylo pozorováno např. pro Gsα (Wedegaertner a Bourne, 1994; Iiri a kol., 1996) nebo G11α s odpovídajícím významem pro funkční signální přenos (Wise a kol., 1997). Kromě α podjednotek trimerních G proteinů i další bílkoviny přítomné v lipidových raftech bývají takto modifikovány. Myristoylovány a/nebo palmitoylovány tak jsou i kinasy rodiny Src, endotheliální NO synthasa, receptory spřažené s trimerními G proteiny, caveolin, flotillin aj. (Resh, 1999; Mukherjee a kol., 2003; Neumann-Giesen a kol., 2004; Lei a kol., 2005). Pro lokalisaci v membránových mikrodoménách je však důležitá především přítomnost palmitátu – např. kinasa Src je pouze myristoylována, a tak míra jejího výskytu v membránových mikrodoménách je značně nižší než u ostatních thyrosinových kinas této rodiny (Fyn, Lyn, Lck aj.), které jsou modifikovány také palmitátem (Mukherjee a kol., 2003).

Lipidové modifikace různých proteinů však nemusí být pro raftovou lokalisaci vždy postačující, a zacílení příslušné bílkoviny do membránové domény může být výsledkem i dalších protein-lipidových a protein-proteinových interakcí. Význam transmembránové

oblasti bílkoviny pro začlenění do lipidového raftu byl dobře dokumentován na případu haemaglutininu chřipkového viru – po záměně transmembránového úseku za jiný tento protein vymizel z membránových mikrodomén. Podstatnou úlohu zde hrála interakce hydrofobních aminokyselin s membránovým cholesterolem (Scheiffele a kol., 1997). V mechanismech lokalisace proteinů do lipidových raftů se v různé míře mohou uplatňovat i rozličné protein-proteinové interakce (již byly zmíněny přímé interakce α podjednotek trimerních G proteinů s caveolinem), přičemž specifita protein-proteinových interakcí může vést i k odlišným preferencím jednotlivých bílkovin pro odlišné typy membránových mikrodomén (Pike, 2004).

Membránová organisace lipidových raftů vyvolává otázku na jejich vztah k nejpodstatnější strukturní soustavě buňky – k cytoskeletu. Samotná úloha raftů při endocytose interakci s cytoskeletem přepokládá. Např. v lymfocytech endocytosa GPI vázaného CD 59 úzce souvisí s organisací aktinových polymerů v oblasti raftů za kontroly proteinkinas A a C (Deckert a kol., 1996). Podobně, restrukturalisace aktinových filament je vyžadována pro endocytosu caveolinu související s aktivací MAP kinasové dráhy prostřednictvím epidermálního růstového faktoru (EGF) (Pol a kol., 2000). Na molekulární úrovni vazbu mezi caveolinem a aktinovými filamenty patrně zprostředkovává aktin vázající protein filamin, jehož C konec funguje jako interakční vazebná doména pro N konec caveolinu-1 (Stahlhut a van Deurs, 2000). Jak ukazuje studie Nebla a kol., zastoupení různých cytoskeletárních proteinů v detergent resistentních membránových doménách je patrně daleko obsáhlejší a nezahrnuje jen interakce s aktinem. V lipidových raftech tak byly zjištěny i různé typy nesvalových myosinů, α-aktinin, vimentin aj. (Nebl a kol., 2002). Dramatický dopad depolymerace cytoskeletu působením colchicinu (inhibitor výstavby mikrotubulů) a cytochalasinu D (blokátor tvorby aktinových filament) na signální systém β1 a β2 adrenergního receptoru, Gsα a adenylylcyklasy V/VI lokalisovaný v caveolách ukazují výsledky Heada a kol. Působení těchto inhibitorů cytoskeletu vedlo k výraznému snížení caveolinu i všech sledovaných v caveolách přítomných proteinů v oblasti nízkohustotních frakcí sacharosového gradientu, což naznačuje význam mikrotubulů i mikrofilament pro tvorbu a vůbec existenci lipidových raftů (Head a kol., 2006). Jako další význam caveolinu byla zjištěna jeho schopnost inhibovat funkci stathminu, proteinu, který má destabilisační efekt na strukturu mikrotubulů, a tak interakce stathminu s caveolinem vede ke zvýšení množství polymerní formy tubulinu (Kawabe a kol., 2006).

Při sledování kolokalisace různých bílkovin s membránovými mikrodoménami zůstává zásadním problémem výše zmíněná heterogenita lipidových raftů získaných pomocí různých isolačních technik. V současnosti je známa celá řada prací, které se zabývaly porovnáním bezdetergentového s různými typy detergentových postupů, za použití nejen Tritonu X-100, ale také výše zmíněných detergentů CHAPS, Brij aj. (např. už zmíněný Schuck a kol., 2003). Lokalisace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v lipidových raftech zajímala Pike a kol. (Pike a kol., 2005). Pro isolaci lipidových raftů použili 1% Triton X-100, 2% oktylglukosid, 1% Brij 96, 1% Brij 98, 1% Tween 20 a bezdetergentovou extrakci. Za pomoci Tritonu X-100 a oktylglukosidu separovali membránové domény obohacené flotillinem, ale EGFR se v nich nevyskytoval. Naproti tomu nedetergentová isolace a extrakce pomocí Brije 98 umožnila oddělení raftů obsahujících určitý podíl EGFR, což se nepodařilo užitím Tweenu 20, který vůbec neoddělil membránové domény od většinové membránové fáze. Vzhledem k výsledkům jiných skupin (Schuck a kol., 2003) byl neočekávaný výsledek s Brijem 96, který solubilisoval veškeré sledované proteiny s výjimkou caveolinu. Tento rozdíl ale může být vysvětlitelný odlišnou koncentrací detergentu, protože pokud byl použit nižší poměr detergent/bílkovina, lipidové rafty isolované Brijem 96 obsahovaly v daleko vyšší míře s rafty asociované tyrosinové kinasy Lyn, Yes aj., než pokud byl použit Triton X-100. Na druhou stranu, podobně jako Triton, Brij 96 solubilisoval s rafty neasociovaný transferinový receptor (Radeva a Sharom, 2004). Podobného výsledku jako Pike ohledně výskytu EGFR v lipidových raftech dosáhli i jiní autoři za použití Brije 58 a v menší míře pomocí Brije 56, zatímco Triton X-100 veškerý receptor solubilisoval. Lokalisace v membránových doménách pak negativně ovlivňuje vazebné schopnosti tohoto receptoru a tím i celou signální dráhu (Roepstorff a kol., 2002). Ačkoli (Pike a kol., 2005) nedocílili isolace raftů pomocí Tweenu 20, zdá se, že membránové domény solubilisované Tritonem X-100, ale resistentní vůči Tweenu, hrají podstatnou roli v diferenciaci proteinového transportu na basolaterální a apikální membránu epitheliálních buněk. Zatímco TX-100 resistentní membránové domény se formují až na úrovni trans-Golgi a dál, Tweenu odolné membránové rafty mohou vznikat uspořádáním specifických lipidů už na cis-Golgi či dokonce v rámci endoplasmatického retikula. A tak různé proteiny apikální membrány jsou obsaženy v Tween resistentních doménách a některé z nich i v Triton resistentních raftech, ale proteiny basolaterální oblasti vykazují sensitivitu nejen k Tritonu, ale i Tweenu, který je rovněž solubilisuje (např. MHCI) (Alfalah a kol., 2005). Odlišná citlivost k Tritonu X-100 (1%) a Briji 98 (1%) byla zjištěna také u $GABA_A$ receptoru a Na/K-ATPasy. Oba tyto proteiny byly solubilisovány Tritonem, ale byly lokalisovány v Brij 98 resistentních

membránových fragmentech (Dalskov a kol., 2005). Také transportér serotoninu (SERT) je lokalisován v raftech charakterisovaných rozdílnou odolností k různým detergentům. Triton X-100 tento protein plně solubilisoval, zatímco Brij 58 jej ponechal asociovaný s frakcí membránových mikrodomén (Magnani a kol., 2004). Další porovnání membránových fragmentů isolovaných alkalickou extrakcí s extrakcí pomocí Tritonu X-100 a Brije 35 opět odhalilo jejich odlišné proteinové složení. Insulinový receptor byl resistentní pouze vůči působení Brije 35, kdežto působení Tritonu X-100 vedlo k jeho solubilisaci. Titíž autoři potvrdili podstatně větší proteinové zastoupení v brijových oproti tritonovým raftům za užití 2D elektrofores, nicméně oba typy domén byly závislé na cholesterolu a extrakce cholesterolu pomocí methyl-β-cyklodextrinu vedla k významnému snížení množství detekovaných bílkovin. To však nebyl případ domén isolovaných bez použití detergentu, kde aplikace methyl-β-cyklodextrinu nevedla k podstatným změnám na 2D gelu. Oproti 2D mapám detergent resistentních domén analysované fragmenty získané alkalickou extrakcí obsahovaly mnohem více různých proteinů, což spolu s jejich necitlivostí k množství membránového cholesterolu poukazuje na značnou míru jejich kontaminace bílkovinami, které v lipidových raftech ve skutečnosti nejsou (Kim a kol., 2004). Byly také pozorovány rozdíly mezi alkalickou a tritonovou extrakcí membránových domén v distribuci GPI vázané alkalické fosfatasy, flotillinu, cholesterolu a sfingomyelinu, které byly v Tritonových doménách oproti alkalickou metodou získaným fragmentům relativně obohaceny, a Na/K-ATPasy, která naopak vykazovala vyšší výskyt spíše v alkalických než detergentových membránových strukturách (Eckert a kol., 2003). Zdá se tedy, že technika isolace lipidových raftů pomocí alkalické extrakce nemusí vždy vést k separaci in vivo reálně existujících membránových domén, ale patrně velmi záleží na konkrétních experimentálních podmínkách.

Signální dráha trimerních G proteinů a lipidové rafty

Bílkoviny spojené se signální dráhou trimerních G proteinů, ať už receptory, samotné G proteiny či jejich efektory, byly v různé míře v detergent resistentních membránových doménách/lipidových raftech nalezeny na samém počátku zkoumání těchto membránových struktur. Nejprve to byly samotné trimerní G proteiny, později přibývaly informace o jejich efektorech a receptorech s nimi spřažených.

Hledání míry lokalisace receptorů spřažených s trimerními G proteiny v membránových mikrodoménách je záležitostí problematickou, a snad více než u jiných proteinů vyskytuje se zde různorodost výsledků v závislosti na použité metodě, biologickém

modelu či stimulaci hormonem. A tak rozdíly v metodách zahrnujících isolace pomocí různých detergentů a vedoucí k separaci detergent resistentních membránových domén (DRMs), které obsahují směs frakce caveol i jiných lipidových raftů, či isolace nedetergentové (např. alkalická extrakce), poskytující membránové fragmenty s poněkud odlišnou proteinovou výbavou, mohou v důsledku vést i ke zcela odlišným údajům o jednom a tom samém receptoru a jeho vztahu k membránové doméně (Chini a Parenti, 2004). První výsledky získané pomocí elektronové mikroskopie intaktní plasmatické membrány ukazují, že angiotensinový AT1 receptor je v membráně uspořádán ve shlucích odlišných od caveol, ale po hormonálním působení se do caveol částečně přesouvá. Autoři této studie také zjistili, že přímá interakce receptoru s caveolinem je nepostradatelná pro začlenění AT1 receptoru do plasmatické membrány. Je-li této interakci zabráněno, receptor vůbec není přítomen na povrchové membráně buňky (Wyse a kol., 2003). Z dalších technik umožňujících sledování kolokalisace receptorů s caveolami či membránovými rafty lze uvést konfokální mikroskopii, jejíž rozlišovací schopnost (min. 200 nm) ovšem nedovoluje sledování raftových struktur, umožňuje však pozorování intracelulárních přesunů, např. internalisaci caveolinovou nebo clathrinovou cestou. Velmi blízkou vzdálenost bílkovin (méně než 100 nm) lze měřit pomocí techniky FRET (fluorescence resonance energy transfer). Koimunoprecipitace je častým nástrojem, ale je limitována přímou interakcí dvou imunoprecipitovaných bílkovin (Chini a Parenti, 2004). Ačkoliv tedy současná literatura poskytuje již poměrně obsáhlý přehled rozdílných vztahů receptorů k lipidovým raftům a jejich funkčního významu (receptory mohou být přítomny v detergent resistentních doménách nebo v caveolární frakci, v klidu nebo po působení hormonu se lokalisace v raftech může měnit oběma směry, může docházet k přímé interakci s caveolinem, receptor může být caveolární/raftovou cestou internalisován,...), rozdílnost metod i poněkud odlišné cíle jednotlivých prací ještě dlouho nedovolí tuto problematiku uzavřít. Nejpravděpodobnějším závěrem vyplývajícím z jednotlivých studií je nejspíš odlišná preference jednotlivých receptorů k různým typů raftů za různých podmínek (klid nebo aktivace, rozdílné tkáně atd.).

Mezi prvními receptory spřaženými s trimerními G proteiny byl v caveolách/raftech nalezen endothelinový receptor ET-A. Konfokální mikroskopie a imunoprecipitační technika jej odhalila s rafty asociovaný ve stavu s navázaným agonistou i ve stavu klidovém (Chun a kol., 1994). Dále byl v caveolách (srdečních myocytů) zjištěn m2 muskarinový acetylcholinový receptor. Za použití bezdetergentové (alkalické) extrakce v klidovém stavu, v buňkách nestimulovaných hormonem, tento receptor však v nízkohustotních gradientových frakcích přítomen nebyl, a k redistribuci došlo až po aplikaci hormonu, který vyvolal přesun

asi jedné třetiny množství receptoru do frakce caveolární (Feron a kol., 1997). Podobná pozorování byla provedena i v případě B2 bradykininového receptoru, který se přesouvá do lipidových raftů (zde isolovaných bez i s 1% Tritonem X-100) také až po navázání hormonu (de Weerd a Leeb-Lundberg, 1997). Také bradykininový receptor B1 podstupuje agonistou stimulovaný přesun do shluků v rámci plasmatické membrány (pozorováno mikroskopicky – receptor byl značený žlutým fluorescenčním proteinem – YFP), doprovázený kolokalisací s caveolinem-1 (Sabourin a kol., 2002). Podobnou dynamiku má také raftová lokalisace receptoru pro sfingosin-1-fosfát (EDG-1 receptoru), sledovaná na raftech získaných alkalickou cestou a koimunoprecipitací. V klidovém stavu byl receptor přítomen jak v doménách, tak mimo ně v poměru zhruba 1:1, po vazbě sfingosin-1-fosfátu vzrostlo s rafty asociované množství receptoru až na 90% (Igarashi a Michel, 2000). Vzestup hladiny receptoru v lipidových raftech je znám také u chemokinového CXCR-1 receptoru, kde výskyt v raftu je důležitý pro odpovídající průběh signalisace (Jiao a kol., 2005). Víceméně opačný děj byl zaznamenán pro β2 adrenergní receptor, jehož množství v doménách isolovaných alkalickou metodou po působení agonisty isoproterenolu významně pokleslo, což nebyl případ β1 adrenergního receptoru nebo m2 muskarinového acetylcholinového receptoru, které oba měly distribuci víceméně duální a byly lokalisovány ve většinové i doménám odpovídající fázi plasmatické membrány (Rybin a kol., 2000). Podobný výsledek, kdy β2 adrenergní receptor v alkalickou metodou isolovaných raftech hojně přítomný po hormonálním působení oproti β1 adrenergnímu receptoru z domén ubyl, zaznamenali Ostrom a kol. (Ostrom a kol., 2001). Interakci obou β adrenergních receptorů s caveolami ukázali také Schwencke a kol (Schwencke a kol., 1999a). Avšak tritonová isolace domén na krysích C6 gliomových buňkách ponechala s rafty asociovanou jen malou část celkového množství β2 adrenergního receptoru, ale pokles v doménách po aplikaci isoproterenolu byl zaznamenán také (Allen a kol., 2005). Přesun receptoru z caveol po vazbě ligandu byl zaznamenán rovněž u adenosinového A1 receptoru (Lasley a kol., 2000; Lasley a Smart, 2001). V srdečních komorových buňkách má působení adenosinu podobný účinek jako acetylcholinu, proto autoři předpokládali podobný vztah sledovaného A1 receptoru k doménám, jako byl zjištěn u m2 muskarinového receptoru, tedy jeho zvýšenou raftovou lokalisaci po působení agonisty (Feron a kol., 1997). Výsledek však byl opačný – z původních 67% množství angiotensinového receptoru v caveolách v nich nezbyl po 15 minutách hormonálního působení žádný (Lasley a kol., 2000; Lasley a Smart, 2001). Poněkud rozporuplné zůstávají údaje o metabotropním glutamátovém receptoru 1, který koimunoprecipitoval s caveolinem a po alkalické separaci na

hustotním sacharosovém gradientu flotoval (Burgueno a kol., 2003), ale v doménách isolovaných Tritonem X-100 naopak přítomen nebyl (Becher a kol., 2001). V těchto tritonových doménách však bylo zaznamenáno asi 30-40% metabotropního receptoru pro γ-aminomáselnou kyselinu $GABA_BR$, a to jak v přirozené tkáni potkaního mozku, tak u transfekované buněčné linie, což naznačuje tkáňově nezávislou distribuci tohoto receptoru (Becher a kol., 2001; Becher a kol., 2004). Úloha caveolinu a caveol v internalisaci receptorů byla také předmětem několika studií. Internalisace caveolární cestou má patrně význam např. u somatostatinového Sst2 receptoru (Held-Feindt a kol., 2000) a již zmíněného angiotensinového AT1 receptoru, který se po navázání agonisty do caveol přesouvá a je jejich prostřednictvím internalisován (Escriche a kol., 2003). Na druhou stranu, pro internalisaci receptorů zřejmě obvyklejší cesta pomocí klathrinových váčků je typická pro m1 muskarinový acetylcholinový receptor, kde inhibice caveolární endocytosy internalisaci receptoru nijak neovlivňuje (Tolbert a Lameh, 1996). Rozdílně mohou být internalisovány i receptory pro tentýž ligand, jako tomu je v případě chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4, kde první obsahuje na svém C konci palmitoylované cysteiny směrující receptor do lipidových raftů, kterými je internalisován. Tato cesta je však pomalejší než internalisace pomocí clathrinových váčků, kterou podstupuje druhý ze dvou receptorů, CXCR4. Chimerní protein, CXCR4 receptor obsahující C konec CC5 receptoru, pak také podléhal pomalejší, caveolinové internalisaci (Venkatesan a kol., 2003). V TX-100 resistentních doménách byly dále zjištěny např. receptor pro gonadotropin-releasing hormon (Navratil a kol., 2003) a luteinisační hormon (Lei a kol., 2005), a s rafty za různých okolností kolokalisují i další receptory, jako např. receptory pro cholecystokinin, kyselinu lysofosfatidovou, serotonin, dopamin aj. (Chini a Parenti, 2004; Insel a kol., 2005). I když tedy řada receptorů je alespoň za nějakých podmínek lokalisována v raftech (přinejmenším těch isolovaných bezdetergentovými technikami), u některých receptorů to zatím vypadá, že se v žádném typu raftů nevyskytují. Např. EP_2 a EP_4 prostaglandinové receptory v raftech isolovaných za použití silné zásady a sonikace zjištěny nebyly (Ostrom a kol., 2001; Ostrom a kol., 2002). Také oxytocinový receptor v mikrodoménách isolovaných pomocí 1% Tritonu X-100 vykazoval jen malou míru asociace s rafty, zatímco převážná většina (>90%) tohoto receptoru byla přítomna v detergentem solubilní fázi plasmatické membrány (Guzzi a kol., 2002).

Výsledky ohledně výskytu podjednotek trimerních G proteinů v lipidových raftech zdají se být o poznání jednoznačnější než ty týkající se receptorů. I zde však existují přinejmenším odlišné preference jednotlivých podjednotek (α i βγ) ke caveolám nebo raftům

necaveolárního typu; jak již bylo zmíněno výše. Oh a Schnitzer vyvinuli metodu umožňující oddělení caveol od ostatních lipidových raftů a zjistili, že pouze Gqα je specificky koncentrován v caveolách, zatímco Giα a Gsα jsou mnohem více soustředěny v odlišném typu lipidových raftů charakterisovaném přítomností GPI vázaných bílkovin 5´nukleotidasy a folátového receptoru. V neuronálních buňkách postrádajících caveoly byl Gqα přítomen spolu s Gβγ, Giα a Gsα v lipidových raftech (Oh a Schnitzer, 2001). Na druhou stranu, přímá negativní regulace caveolinem po aktivaci signální dráhy byla pozorována pro Gsα, Giα a Goα. N konec caveolinu váže α podjednotku trimerního G proteinu ve stavu navázaného GDP a brání jeho výměně za GTP (čili působí jako GDI – „GDP dissociation inhibitor“). Caveolin dokonce obsahuje homologní sekvenci aminokyselin s GDI pro monomerní G protein Rab. Může to tedy být právě interakce s caveolinem, která napomáhá snížení basální aktivity trimerních G proteinů in vivo (Li a kol., 1995). Podobný výsledek byl zaznamenán při aktivaci Gqα/G11α signální dráhy cholecystokininem a substancí P a Giα3 cyklopentyladenosinem. Během 5-20 min působení jednotlivých ligandů se v caveolinovém imunoprecipitátu výrazně zvýšilo množství příslušných Gα proteinů, což svědčí pro zvýšenou míru interakce caveolinu s G proteiny. Po delším působení se množství G proteinů v imunoprecipitátech opět snížilo. Dopad interakce s caveolinem na signální dráhu byl jasně inhibiční a v daném případě souvisel s mechanismem desensitisace (Murthy a Makhlouf, 2000). Také už zmíněná práce de Weerda a kol. se kromě sledování submembránové redistribuce B2 bradykininového receptoru po hormonálním působení zabývala i změnami lokalisace dvou G proteinů aktivovaných tímto receptorem: Gqα a Giα. Už po pěti minutách aktivace hormonem byly tyto G proteiny přesunuty do frakce membránových domén, nicméně po 10-20 minutách jejich hladina v caveolách opět klesala (de Weerd a Leeb-Lundberg, 1997). Celý tento děj je současně doprovázen snížením aktivity efektorového systému (fosfolipasa C), což opět nasvědčuje pro inhibiční roli caveol pro signální dráhu trimerních G proteinů (ibid.). Také rozdílný význam raftové lokalisace pro přenos signálu byl zjištěn pro Giα na jedné straně a Gq a Gzα na druhé. Obě dráhy jsou aktivovány adenosinovými nukleotidy, a to buď přes P2Y12, nebo P2Y1 receptor. Po odstranění membránového cholesterolu methyl-β-cyklodextrinem byla snížena buněčná odpověď přes Gi, zatímco odpověď přes Gq a Gz změněna nebyla. Autoři tento výsledek vysvětlují odlišnou závislostí obou větví signální dráhy na lokalisaci příslušných G proteinů v membránových mikrodoménách (Quinton a kol., 2005). Internalisaci Gsα proteinu po působení hormonu cestou lipidových raftů – Triton resistentních membránových domén – popisují Allen a kol.

(Allen a kol., 2005). Hladina Gsα proteinu ve frakci membránových domén významně stoupla už po 10 minutách aktivace β-adrenergních receptorů (agonista isoprotenerol) a tyto domény se přesouvaly do intracelulárního prostředí buňky. Zvýšení výskytu Gsα proteinu v lipidových raftech zaznamenané touto skupinou je tedy v souladu s výsledky Li a kol. (Li a kol., 1995), ale autoři novější studie naznačují i možnost odlišné funkce Gsα proteinu v intracelulárních signálních procesech (Allen a kol., 2005).

Naopak, dlouhodobé hormonální působení může vést ke snížení množství G proteinu v detergent resistentních membránových doménách. Práce Pešanové a kol. ukazuje, že v HEK293 buňkách exprimujících thyreoliberinový receptor (TRH-R) a G11α protein dochází po 2 hod působení TRH k významnému poklesu G11α proteinu ve frakcích odpovídajících membránovým doménám. Tento pokles byl specifický, netýkal se jiných s rafty asociovaných bílkovin a byl doprovázen odpovídajícím vzestupem G proteinu v Tritonem solubilisované fázi buněčných membrán (Pesanova a kol., 1999). Ačkoliv je tedy zřejmý význam lipidových raftů pro signalisaci přes trimerní G proteiny, detailní procesy týkající se lokalisace jednotlivých typů podjednotek v různých typech membránových domén a dynamika přesunu signálních komponent v procesech aktivace, desensitisace a regulace G proteinové signalisace stále ještě čekají na své odhalení.

V souvislosti se signální dráhou trimerních G proteinů, které spolu s četnými receptory jsou v určité míře v lipidových raftech přítomny, soustředil se od samého počátku výzkumu raftů zájem badatelů i na případnou lokalisaci efektorů G proteinů v těchto membránových strukturách.

Mezi prvními byla v caveolách/raftech zjištěna přítomnost aktivity adenylylcyklasy (Huang a kol., 1997; Shaul a Anderson, 1998). Avšak vzhledem k existenci devíti membránových isoforem tohoto enzymu, nemusí funkční měření odrážet reálnou distribuci různých typů adenylylcyklasových molekul. Naopak, jako pravděpodobnější se může zdát odlišná membránová lokalisace, která by odrážela rozdílnou tkáňovou distribuci a způsoby regulace jednotlivých isoforem (Simonds, 1999). Tomuto předpokladu odpovídají i výsledky zjištěné různými skupinami. Rybin a kol. koimunoprecipitovali adenylylcyklasu V/VI s caveolinem-3, což předpokládá jejich vzájemnou interakci. Také detekcí na imunoblotu po alkalické extrakci lokalisovali tuto isoformu do nízkohustotních frakcí membránových mikrodomén (Rybin a kol., 2000). Detailnější analysa na srdečních fibroblastech ukázala, že z detekovaných adenylylcyklas (AC) pouze AC III a AC V/VI jsou přednostně lokalisovány v caveolární frakci, kdežto AC II, IV a VII v caveolární frakci přítomny nebyly (Ostrom a

kol., 2003). Určující signál pro začlenění adenylylcyklasy je nesen na intracelulárních smyčkách molekuly a patrně souvisí s tím, zda je daná adenylylcyklasa regulována vápníkem (Crossthwaite a kol., 2005). Vazebná doména pro calmodulin však tuto úlohu zřejmě neplní, jak bylo prokázáno u AC VIII, která je Ca^{2+}-sensitivní a v raftech lokalisovaná (Smith a kol., 2002). V membránových doménách byla zjištěna i frakce proteinkinasy A (Schwencke a kol., 1999b; Rybin a kol., 2000), což spolu s výskytem Gsα a receptorů naznačuje význam caveol pro přenos signálu a regulaci této signální dráhy (ibid.).

Také signalisace přes fosfolipasu Cβ může probíhat přes lipidové rafty. Samotný enzym, stejně jako jeho substrát fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, byl v lipidových raftech nalezen (Morris a kol., 2006). Kromě fosfolipasy Cβ byla v Triton resistentních membránových mikrodoménách zjištěna i proteinkinasa C a další proteiny vápníkové signalisace (Weerth a kol., 2006).

Zvýšená míra lokalisace různých signálních a regulačních proteinů ve specialisovaných kompartmentech především umožňuje vyšší účinnost přenosu signálu tím, že jednotlivé komponenty signální dráhy jsou soustředěny blízko u sebe. Význam raftové lokalisace pro funkční signální přenos je znám např. pro aktivaci MAP kinasové dráhy přes proteinkinasu C aktivovanou cestou od metabotropního glutamátového receptoru 1, kde narušení struktury raftů vedlo ke snížení fosforylace substrátů efektorovou ERK (Burgueno a kol., 2003). Také signalisace přes chemokinový receptor CXCR, trimerní G proteiny a fosfolipasu C je na lokalisaci receptoru v raftu závislá, a po narušení raftů methyl-β-cyklodextrinem receptoru do určité míry zůstává jen schopnost vázat ligand a být fosforylován na trimerních G proteinech nezávislou cestou (Jiao a kol., 2005). Na druhou stranu, především v caveolách byl často zaznamenán inhibiční vliv raftové lokalisace signálních proteinů na přenos informace. To je příklad EDG-1 receptoru pro sfingosin-1-fosfát, kde jednou z aktivovaných efektorových molekul je endotheliální NO synthasa, také obohacena v caveolární frakci. Po vazbě ligandu na receptor dojde ke zvýšení množství receptoru v caveole, což je doprovázeno značně sníženou aktivitou NO synthasy (Igarashi a Michel, 2000). Rovněž signální dráha β adrenergních receptorů stimulujících adenylylcyklasu je závislá na lokalisaci příslušných proteinů v membránových doménách – po snížení množství membránového cholesterolu pomocí methyl-β-cyklodextrinu vedoucímu k rozpadu lipidových raftů se produkce cAMP zvýšila, což jasně ukazuje inhibiční vliv raftů na signální přenos (Rybin a kol., 2000). Aplikace methyl-β-cyklodextrinu zvýšila také basální i stimulovanou aktivitu fosfolipasy A_2 po působení agonisty na B1 bradykininový receptor

(Sabourin a kol., 2002), a také lokalisace $GABA_B$ receptoru v detergent resistentních membránových doménách má na signalisaci negativní vliv (Becher a kol., 2004). Kromě inhibičních interakcí mezi jednotlivými bílkovinami může ve zpomalení signalisace přes receptory lokalisované v membráně ve shlucích hrát úlohu i nižší pravděpodobnost setkání ligandu s takto distribuovanými receptory, než kdyby tyto byly v membráně difusně rozptýleny (Lim a Yin, 2005). Zajímavým příkladem významu caveolární lokalisace proteinů pro směrování signalisace je vliv asociace oxytocinového receptoru s rafty na to, zda buňka po stimulaci hormonem zastaví svůj růst (většina receptoru není v caveolách), nebo vstoupí do proliferační fáze (receptor je v caveole), což je mimo jiné následkem poměrně široké promiskuity tohoto receptoru k různým G proteinům a efektorovým systémům (Guzzi a kol., 2002).

Závěrem lze tedy shrnout, že lipidové rafty představují významnou funkční strukturu v rámci plasmatické membrány, která umožňuje rozličným proteinům vcházet do vzájemných interakcí důležitých pro přenos a regulaci signálu. Mnoho prací naznačuje inhibiční působení caveolinu, přesuny bílkovin po aktivaci signální dráhy z raftů či do nich, nebo mezi caveolami a necaveolárními membránovými doménami, odlišnou efektivitu signálního přenosu atd., což vše spolu se samotnou heterogenitou a dynamikou těchto lipidových struktur činí další výzkum domén velmi aktuálním a žádoucím.

Metody

Chemikálie

Potřeby pro tkáňové kultury (média, glutamin, séra aj.) jsme získali od firem Gibco nebo Sigma. Geneticin a hygromycin pocházely také od Sigmy. Inhibitor proteas Complete byl od Roche Applied Sciences.

Protilátky proti caveolinu a flotillinu-2/ESA byly od Transduction Laboratories, od Sigmy byly protilátky proti Flag a VSV, od Santa Cruz Biotechnology protilátky proti GFP, β1 a β2 adrenergnímu receptoru, Gsα, Gβ, transferinovému receptoru, calnexinu, adenylylcyklase I, IV a $GABA_BR1$. Protilátky anti-CD 29, CD 55, CD 58, CD 59, CD 147, MHC I, Tapa 1, Na/K ATPase jsme obdrželi darem z laboratoře prof. RNDr. Václava Hořejšího, CSc, ÚMG AVČR. Protilátky proti Gi1,2α a Gqα/G11α byly získány imunisací králíka proti C terminálním dekapeptidům Gtα (proti Gi – KENLKDCGLF) a Gqα/G11α (QLNLKEYLNV), jak je uvedeno v (Rudajev a kol., 2005).

[α-^{32}P]ATP (30 Ci/mmol), [^{3}H]cAMP (37 Ci/mmol), [^{3}H]CGP12177 (46 Ci/mmol), [^{3}H]ouabain (32 Ci/mmol), [^{35}S]GTPγS (1115 Ci/mmol) a [^{3}H]dihydroalprenolol (40 Ci/mmol) byly zakoupeny od Amersham-Pharmacia Biotech. [^{3}H]CGP54626 (41,5 Ci/mmol) a [^{3}H]baclofen (47 Ci/mmol) od firmy Tocris a ICN. [^{3}H]TRH byl připraven Dr. Hlaváčkem a Dr. Černým Ústavu organické chemie a rostlinné fysiologie AVČR. [γ^{32}P]GTP (30 Ci/mmol) byl od Perkin-Elmer, NEN Life Science.

Ostatní chemikálie pocházely od Sigmy, Servy nebo Fluky.

Použité metody

Experimentální model

Pokusy byly prováděny na buněčných liniích FhIPR, FhIPR-Gsα, VTGP, E2M11, myších S49 lymfomových buňkách a na mozkovém kortexu potkana. Klony FhIPR, FhIPR-Gsα, VTGP a E2M11 byly odvozeny od mateřské linie lidských embryonálních buněk ledvinového epitelu HEK293. Buňky **FhIPR** exprimují lidský IP prosthacyklinový receptor (hIPR), který na N konci nese antigenní epitop FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)(Fong a kol., 1998). Buňky **FhIPR-Gsα** exprimují fusní bílkovinu mezi lidským IP receptorem s epitopem FLAG a dlouhou isoformou potkaního Gsα-proteinu, která byla

připojena k C konci receptoru (Fong a kol., 1998). Linie **VTGP** buněk byla také vyvinuta z HEK293 buněk. Tato linie exprimovala dlouhou isoformu krysího TRH receptoru ve formě fusního proteinu se sekvencí VSV (vesicular stomatitis virus) na C konci receptoru a zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) na N konci (Drmota a kol., 1998a). Buňky **E2M11** – tato buněčná linie byla připravena dvojnásobnou transfekcí HEK293 – plasmidem nesoucím gen pro dlouhou isoformu krysího TRH receptoru a plasmidem, jenž nese gen pro myší G11α protein (Svoboda a kol., 1996). Způsob transfekce a další informace jsou uvedeny v přiložených a citovaných publikacích. Linie **S49** lymfomových buněk byla popsána jako vhodná pro studium vztahu mezi β-adrenergními receptory a Gsα proteiny (Ransnas a kol., 1989).V pokusech, kde jsme sledovali vliv hormonu na distribuci vybraných proteinů, jsme buňky inkubovali s 10 μM TRH (E2M11 buňky), s 1 μM stabilním analogem prosthacyklinu iloprostem (FhIPR buňky, FhIPR-Gs buňky), či 10 μM isoprenalinem (linie S49).

Mozkový kortex potkana byl isolován z 90-denních (160-180g) samců kmene Wistar. Zvířata byla usmrcena dekapitací (narkosa etherem) a mozková tkáň byla rychle odebrána a mozkový kortex (telencefalonu) oddělen od bílé hmoty, zamrazen v tekutém dusíku a uložen v –80°C.

Kultivace buněk

Buňky byly pěstovány v kultivačním mediu DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s medium) obohaceném o tepelně inaktivované sérum (8 % v/v) a L-glutamin (0,6 g/l) při teplotě 37°C a 5% CO_2, v 80 cm^2 inkubačních lahvích. K udržení stabilní transfekce linií buněk jsme používali selekční antibiotikum geneticin (800 μg/ml), v případě E2M11 buněk jsme kromě geneticinu (800 μg/ml) přidávali k buňkám ještě hygromycin (200 μg/ml) k selekci buněk exprimujících exogenní G11α protein. Při dosažení 60 - 80% konfluence byly kontrolní či hormonem ovlivněné buňky opláchnuty PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,8 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4, pH 7,4) a do PBS sklizeny. Suspense buněk byla centrifugována při 1 800 x g (10 min) a sediment buněk byl buď okamžitě použit k experimentu, nebo zamražen v tekutém dusíku a uchován při –80°C.

Stanovení koncentrace bílkoviny

Koncentraci proteinů v experimentálních vzorcích jsme stanovili modifikovanou metodou podle Lowryho (Lowry a kol., 1951). Do zkumavek bylo pipetováno 5-10 μl buněčného homogenátu/lysátu nebo 5-100 μl frakce z gradientu. Objem byl pak doplněn

vodou do 500 µl. Do všech zkumavek bylo přidáno 1,5 ml roztoku A (2% Na_2CO_3 v 0,1 N NaOH), B (2% vínan sodno-draselný) a C (1% $CuSO_4$ x 5 H_2O)(50:1:1). Po 15 minutové inkubaci bylo přidáno 150 µl Folinova činidla. Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena po 30 min při vlnové délce 720 nm na spektrofotometru Specol 11 (Carlzeiss, Jena).

Isolace detergent resistentních membránových domén z buněčných linií HEK293 a S49 lymfomových buněk

Pro isolaci lipidových raftů jsme použili definiční metodu založenou na odolnosti membránových mikrodomén k působení 1% Tritonu X-100 a isolovali jsme lipidové rafty jako detergent resistentní membránové domény. Po působení Tritonu byly membránové domény získány po oddělení od většinové membránové fáze na diskontinuitním sacharosovém gradientu. V případe různých linií HEK293 buněk bylo sklizeno 6 x 80 cm^2 (10-20 mg bílkoviny) inkubačních lahví na jeden gradient. Pelet sklizených buněk byl resuspendován v centrifugační kyvetě v 1000 µl ledového TME pufru (20 mM Tris, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7,5), jenž obsahoval 2 mM PMSF a směs inhibitorů proteas (Complete). Poté bylo přidáno 1000 µl ledového TME pufru s 2% Tritonem X-100 (v případech méně koncentrovaného detergentu bylo přidáno odpovídající množství pro dosažení výsledné koncentrace) a buňky byly pipetou pečlivě resuspendovány. Následovala 45 minutová inkubace na ledu. Následně byl buněčný lysát smíchán 1:1 s vychlazenou 80% sacharosou (získány 4 ml buněčného lysátu ve 40% sacharose) a převrstven sacharosami o snižující se koncentraci. Použity byly tři typy gradientů – 1) 40% sacharosa byla převrstvena 4 ml 30% sacharosy a 3,5 ml 5% sacharosy (analysa domén isolovaných z FhIPR a FhIPR-Gsα buněk), 2) 40% sacharosa byla převrstvena 1 ml sacharosy o koncentraci 35%, 30%, 25%, 20%, 15% a 10% a nakonec 1,5 ml sacharózy o hustotě 5% (analysa domén isolovaných z E2M11, S49, FhIPR a FhIPR-Gsα buněk) a 3) 40% sacharosa byla převrstvena 1,5 ml 35%, 30%, 25%, 20% a 15% sacharosou (analysa domén isolovaných z FhIPR, FhIPR-Gsα a VTGP buněk). Takto připravený hustotní sacharosový gradient (centrifugace 24 hod, 39000 rpm – 187000xg při 4°C, Beckman SW41 rotor) byl rozebrán do 11-12 (dle typu gradientu) 1 ml frakcí odshora dolů. Membránové domény jsou charakterisovány svou nízkou vznášivou hustotou při flotaci na hustotním sacharosovém gradientu a vyplavávají do gradientových frakcí obsahujících 15 – 25% (nebo rozhraní 5/30%) sacharosu (frakce 2-6), zatímco solubilní a detergentem solubilisované bílkoviny zůstávají v dolní, 40% sacharose (frakce 8-12). Takto

připravené frakce sacharosového flotačního gradientu byly zamraženy v tekutém dusíku a uchovány při –80°C.

Subcelulární frakcionace homogenisací

Sklizené buňky byly homogenisovány ve 2 ml ledového TME pufru (2 mM PMSF a směs inhibitorů proteas). Homogenisace byla prováděna 10 min při 2 500 otáček/min a 4°C sklo-teflonovým Elvehjm-Potterovým homogenisátorem. Takto připravený homogenát byl smíchán 1 : 1 s 80% sacharosou. Následný postup se opět shodoval s přípravou detergentového flotačního gradientu s tím, že v případě homogenisačního gradientu byl aplikován postup za použití gradientů o koncentracích sacharos 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% (po 1 ml) a 5% (1,5 ml)(E2M11, S49, FhIPR a FhIPR-Gsα) a po 1,5 ml 35%, 30%, 25%, 20% a 15% sacharosy (FhIPR, FhIPR-Gsα a VTGP).

Subcelulární frakcionace alkalickou extrakcí

Bezdetergentová extrakce nízkohustotních membránových fragmentů byla provedena podle (Song a kol., 1996). Buněčná suspense (6x80cm^2) s inhibitory proteas v TME pufru byla smíchána 1 : 1 s vychlazeným 1 M Na_2CO_3, pH 11. Následovala sonikace 3 x 10 sekund (na ledu). K takto připravenému vzorku byla 1 : 1 přidána 80% sacharosa. Další postup byl stejný jako při přípravě detergentového flotačního gradientu.

Isolace plasmatických membrán na Percollovém gradientu

Isolovaný kortex telencefalonu potkana s 1mM PMSF a Complete (inhibitory proteas) ve STE pufru (250 mM sacharosa, 20 mM Tris-HCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, pH 7,6) byl jemně homogenisován 7 min (1-2g tkáně/ 10 ml) a centrifugován 3 min při 1500 rpm. Takto získaný postnukleární supernatant byl dán na kontinuitní percollový gradient (30% Percoll ve STE pufru) připravený v rotoru Beckman Ti60. Centrifugace při 27000 rpm (65000xg) trvala 30 min a vyústila v separaci dvou jasně viditelných vrstev. Horní vrstva představovala směs různých měchýřků plasmatické membrány a myelinu a byla výchozím materiálem pro další analysu (vrstva plasmatických membrán – PM). Dolní vrstva po oddělení na percollovém gradientu poskytla purifikovanou mitochondriální frakci (MITO). Obě vrstvy byly naředěny 1:3 ve STE pufru a centrifugovány v Ti60 Beckman rotoru 2 hod (50000 rpm). Membránové sedimenty byly odděleny od zbytků Percollu a homogenisovány v malém objemu roztoku STE.

Separace nízkohustotních membránových fragmentů a detergent resistentních membránových domén z plasmatických membrán mozku potkana

2 ml plasmatických membrán získaných na percollovém gradientu byly dány na dno centrifugační kyvety (Beckman SW41 rotor) a převrstveny 1,5 ml 35%, 30%, 25%, 20% a 15% sacharosou. Po 24 hod centrifugaci (39000 rpm, 187000xg, 4°C) byl gradient odshora dolů rozebrán do 12 1 ml frakcí, přičemž takto byla oddělena nízkohustotní membránová frakce (20/25% sacharosa, LPM) od většinové fáze plasmatické membrány (35/40% sacharosa, HPM). Podobně byly odděleny detergent resistentní membránové domény, jen na dno kyvety byly dány 2 ml tritonového lysátu připraveného z plasmatických membrán přidáním 1/10 objemu 10% Tritonu X-100 (tedy 1% TX-100 lysátu). Po výše popsané centrifugaci byly detergent resistentní domény získány jako flotující membránové fragmenty lokalisované v 15-25% sacharose. Při použití detergentu Brij 58 byl místo Tritonu X-100 aplikován odpovídajícím způsobem koncentrovaný tento detergent.

Elektronová mikroskopie

Elektronmikroskopické snímky membránových frakcí byly získány díky RNDr. Tomáši Soukupovi, CSc. Alikvoty membránových frakcí byly zkoncentrovány centrifugací na centrifuze Sorwall RC M100 (75000 rpm, 45 min), fixovány v 1% glutaraldehydu / 1% paraformaldehydu / 0,12 M fosfátovém pufru (pH 7,4) a obarveny 2% kyselinou osmiovou.

SDS-PAGE a detekce proteinů imunoblotem

Pro elektroforetické dělení bílkovin byla použita metoda standardní SDS-polyakrylamidové elektroforesy (SDS-PAGE; dle (Svoboda a Milligan, 1994)). Ke vzorkům byl před nanesením na gel přidán vzorkový pufr – SLB (Sample Loading Buffer – 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 8% SDS, 40% glycerol, 0,04% bromfenolová modř, 0,4 M dithiotreitol (v případě následného použití monoklonálních protilátek při imunoblotu byl použit neredukující vzorkový pufr – tj. bez dithiotreitolu). Většinou byly analysovány jednotlivé frakce, ze kterých bylo odebíráno 18 µl a přidáno 6 µl SLB v případě elektrofores Mini-Protean (na gel nanášeno 20-24 µl) a 75 µl frakce plus 25 µl SLB pro elektroforesu Hoefer (na gel nanášeno 100 µl). V některých případech bylo zapotřebí koncentrovat vzorky pomocí precipitace kyselinou trichloroctovou (TCA), kdy ke třem dílům vzorku byl přidán jeden díl 24% TCA a po opatrném promíchání a hodinové inkubaci na ledu byly vysrážené proteiny stočeny centrifugací na stolní centrifuze (4500xg). Rozpuštění peletu proběhlo pomocí 20 µl 1M Trisu a přidáním 20 µl SLB byly vzorky připravené k dalšímu zpracování. Následně byly vzorky

zahřáté na 95°C (5 minut). Elektroforetická separace byla provedena v dělících gelech obsahujících 10% akrylamid/ 0,26% bis-akrylamid či 13% akrylamid /0,35% bis-akrylamid. Dělící gel obsahoval 375 mM Tris-Cl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persíran amonný (APS) a 0,04% TEMED. Dělící gel byl převrstven zaostřovacím gelem – 3,9% akrylamid/0,1% bis-akrylamid, 125 mM Tris-Cl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS a 0,08% TEMED.

K elektroforese jsme používali buď aparaturu Mini-Protean (BIO-RAD) nebo aparaturu Hoefer SE 600 (Pharmacia-Biotech). V závislosti na použité aparatuře probíhala elektroforesa buď za konstantního napětí 200 V (Mini-Protean) nebo za konstantního proudu cca 30 mA (Hoefer). Použitý elektroforetický pufr obsahoval 25 mM Tris, 188 mM glycin, 0,1% SDS. Po elektroforetickém rozdělení byly bílkoviny přeneseny na nitrocelulosovou membránu v aparatuře Mini-Protean nebo Hoefer. Přenos probíhal v pufru obsahujícím 25 mM Tris, 192 mM glycin a 20% methanol. V případě malých gelů (Mini-Protean) bylo použito konstantní napětí 15 – 25 V po dobu 15 hodin, v případě velkých gelů z aparatury Hoefer přenos probíhal za konstantního proudu 1300 mA po dobu 2 hodin. Nitrocelulosová membrána byla po přenosu 1 hodinu blokována v roztoku odtučněného mléka s 0,1% Tweenem 20 v TBS pufru (TBS: 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 8,0) a poté následovala dvouhodinová inkubace s primárními protilátkami ředěnými v ředícím pufru (1% odtučněné mléko, 0,05% Tween 20 v TBS pufru). Ředění primárních protilátek se v závislost na typu protilátky pohybovalo v rozmezí 250 – 10000-krát. Po inkubaci s primárními protilátkami byly membrány promyty (3 x 10 minut) tzv. promývacím pufrem (3% Tween 20 v TBS pufru) a hodinu inkubovány se sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidasou (ředění 40 000 x). Pro vyvolání byl použit substrát od firmy Pierce – Super Signal West Dura. Chemiluminiscence (ECL, enhanced chemiluminiscence) byla detekována exposicí na film (Kodak X-OMAT K), jenž byl vyvolán na přístroji Optimax (Fomei).

Obrázky vyvolaných imunoblotů jsme digitalisovali (skener UMAX Astra 610P) a následně kvantifikovali za použití programu ImageQuant 3.0 či Aida. Grafické zpracování obrázků bylo provedeno v programu PhotoImpact 6.0 a 8.0 a GraphPad Prism 3.02. Pro statistické zpracování výsledků jsme použili program Excel 2000. V grafech jsou uvedeny průměry naměřených hodnot a střední chyby průměru. Statistická významnost byla hodnocena pomocí nepárového Studentova t-testu.

2D elektroforesa

Analysa nízkohustotních fragmentů pomocí dvourozměrné (2D) elektroforesy byla provedena RNDr. Petrem Matouškem, PhD a příslušný postup je uveden v přiložené publikaci (Matousek a kol., 2005).

Stanovení aktivity alkalické fosfatasy

Aktivita alkalické fosfatasy byla stanovena metodou dle DeChateleta (DeChatelet a Cooper, 1970). Substrátem fosfatasové reakce byl p-nitrofenylfosfát. Alikvoty frakcí flotačního sacharosového gradientu (10 µl) byly ředěny 100 µl pufrem obsahujícím kyselinu barbiturovou (100 nM Na-barbital, 0,6 mM $MgCl_2$, pH 10,5) a 100 µl roztoku p-nitrofenylfosfátu (0,25% p-nitrofenylfosfát v 0,15 M NaCl). Následovala inkubace při 20°C po dobu 1 hodiny. Množství vzniklého produktu bylo stanoveno měřením absorbance při 410 nm.

Měření GFP fluorescence

Endogenní fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) byla měřena v 0,1 ml gradientových frakcí na spektrofluorometru Wallac Victor pomocí fluoresceinisothiokyanátu (485/520 nm).

Stanovení aktivity adenylylcyklasy

Enzymatická aktivita adenylylcyklasy byla stanovena ve frakcích sacharosového gradientu, jež byly zamraženy v tekutém dusíku a následně pouze jedenkrát rozmraženy. K analyse byl používán konstantní objem frakcí 40 µl. Frakce byly inkubovány 30 minut při 30°C v roztoku obsahujícím 70 mM HEPES-HCl, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 16 mg/ml pyruvátkinasy, 10 mM fosfoenolpyruvátu draselného, 160 mg/ml BSA, 0,1 mM askorbátu, 0,01 mM RO-201724 (inhibitor fosfodiesteras) a 0,15 mM ATP plus [^{32}P]ATP (cca 1 x 10^6 cpm na jeden vzorek). Celkový objem vzorku s inkubačním roztokem byl 100 µl. Aktivátory adenylylcyklasy (20 µM GTP, 50 µM forskolin či 10 mM $MnCl_2$, 10 µM iloprost v závislosti na daném pokusu) byly přidány 5 minut před zahájením enzymové reakce směsí ATP/[^{32}P]ATP. Enzymová reakce byla ukončena přidáním 0,1 ml 0,25% SDS/5 mM ATP/ 0,175 mM cAMP plus [^{3}H]cAMP (20 000 cpm na vzorek, [^{3}H]cAMP slouží jako interní standard) a zahřátím vzorků na 95°C (5 minut). Oddělení cAMP od ostatních nukleotidů a

anorganického fosfátu bylo prováděno chromatograficky na kolonách z oxidu hlinitého dle Whita (White, 1974).

Vazba GTPγS

Funkční stav GTP vázajících proteinů byl měřen pomocí agonistou stimulované vazby [^{35}S]GTPγS, jak je uvedeno v (Fong a kol., 1998; Fong a Milligan, 1999). 30 µl gradientových frakcí (nebo přibližně 10 µg proteinu u jiných vzorků) bylo inkubováno s radioligandem (okolo 1,5x10^{5} dpm/vzorek) v konečném objemu 100 µl reakční směsi 20mM HEPES (pH 7,4), 3mM $MgCl_2$, 100mM NaCl, 2µM GDP, 0,2mM kyseliny askorbové, a to s 1mM baclofenem (total) nebo bez něj (basal) po 30 min při 30 °C. Vazebná reakce byla ukončena filtrací přes Whatman GFC filtr s následujícím promytím (3 x 3 ml) ledově studeným 20mM HEPES (pH 7,4), 3mM $MgCl_2$ na Brandel cell-harvesteru. Radioaktivita zachycena na filtrech byla změřena scintilačním detektorem.

Stanovení agonistou stimulované vysokoafinní GTPasové aktivity

GTPasová aktivita membránových vzorků byla určena měřením radioaktivity anorganického fosfátu ^{32}P, uvolněného z [γ-^{32}P]GTP, jak je popsáno ve (Fong a kol., 1998; Fong a Milligan, 1999). Reakční směs o konečném objemu 0,1 ml obsahovala 30 µl gradientových frakcí, 10mM kreatinfosfát, 0,05 jednotek/µl kreatin kinasy, 100µM App(NH)p, 1mM ATP, 1 mM ouabain, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 2mM EDTA (pH 7,4), 40mM Tris-HCl pufr (pH 7,4), 0,5µM GTP, [γ-^{32}P]GTP (okolo 2x10^{6} dpm na vzorek). GTPasová aktivita byla stanovena buď bez přítomnosti stimulačního ligandu (basální aktivita) nebo v přítomnosti 1mM baclofenu (agonistou stimulovaná aktivita). 30min inkubace při 37 °C byla ukončena přidáním 5% aktivního uhlí v 10mM kyselině fosforečné. Po oddělení aktivního uhlí centrifugací (10 000 x g po 20 min) byla radioaktivita ^{32}P změřena scintilačním detektorem. Nespecifická GTPasová aktivita byla určena za přítomnosti 100 µM GTP.

Vazba radioligandů

TRH receptory – distribuce TRH receptoru byla určena jednobodovou vazebnou studií radioligandu za užití 10 nM [^{3}H]TRH. Konstantní objem (100 µl) gradientových frakcí byl inkubován s radioligandem po 30 min při 30°C v celkovém objemu 0,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA. Nespecifická vazba byla měřena v přítomnosti 10 µM

neznačeného TRH. Vázaná a volná radioaktivita byly odděleny filtrací přes filtry Whatman GFB na přístroji Brandel Cell harvestor.

Na/K-ATPasa – distribuce Na,K-ATPasy podél sacharosového gradientu byla měřena pomocí vazby [^{3}H]ouabainu. 100 µl gradientových frakcí bylo inkubováno s [^{3}H]ouabainem v 0,5 ml 5 mM NaH_2PO_4, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) při 37°C. Vazebná reakce byla zahájena přidáním [^{3}H]ouabainu (výsledná koncentrace 5 nM) a ukončena po 90 min přidáním 5 ml studeného inkubačního roztoku a filtrací přes Whatman GFB filtry. Nespecifická vazba byla měřena v přítomnosti 1 µM neznačeného ouabainu.

β-adrenergní receptory – množství β-adrenergních receptorů bylo měřeno vazbou agonisty [^{3}H]dihydroalprenololu (DHA)(2,1 nM) a antagonisty [^{3}H]CGP12177 (2 nM) v 50 µl gradientových frakcí. Inkubace probíhala v celkovém objemu 0,5 ml (pro DHA: 50 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,4, 20°C, 30 min, pro CGP12177: 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM kyselina askorbová, 37°C, 2 hod) a byla zastavena studeným inkubačním pufrem a filtrací přes Whatman GFB filtry. Nespecifická vazba byla měřena v přítomnosti L-propranololu (10 µM pro DHA a 1 µM pro CGP12177).

$GABA_B$ receptory – obsah $GABA_B$ receptoru v gradientových frakcích byl měřen specifickým agonistou [^{3}H]baclofenem a antagonistou [^{3}H]CGP54626. 20 µl alikvoty gradientových frakcí byly inkubovány s 2,5 nM [^{3}H]CGP54626 nebo 5 nM [^{3}H]baclofenem v 0,5 ml 75 mM Tris-HCl, 12,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, pH 7,4 60 min při 25°C. Vázaná od volné radioaktivity byly odděleny filtrací přes filtry Whatman GFB na přístroji Brandel Cell harvestor. Podobně jako u ostatních radioligandů, filtry byly 3x promyty 3 ml ledového inkubačního pufru a po převedení do scintilačních lahviček bylo ve 4 ml scintilačního roztoku (CytoScint, ICN) měřeno množství radioaktivity.

Všechny uvedené grafy a obrázky imunoblotů, pokud není uvedeno jinak, představují representativní data minimálně ze tří nezávislých pokusů.

Výsledky

Lokalisace proteinů signálních drah v lipidových raftech HEK293 buněk exprimujících IP prosthacyklinový receptor

TX-100 isolace

Jako nejrozšířenější technika pro isolaci lipidových raftů bývá uváděna detergentová extrakce pomocí 1% Tritonu X-100 (TX-100). Jelikož se jedná o metodu v podstatě definující lipidové rafty, byly tyto nazvány též detergent resistentní, detergent insensitivní či Triton insensitivní membránové domény (mikrodomény). Tento způsob extrakce je založen na 45-60 minutovém působení 1% TX-100 a následném rozdělení membránových fragmentů o různé vznášivé hustotě na diskontinuitním flotačním sacharosovém gradientu po 24 hodinové centrifugaci při vysokých otáčkách (39 000 rpm – 187 000 xg). Jako nejvhodnější se ukázalo takové uspořádání, kde na dno centrifugační kyvety byly dány 4 ml tritonového lysátu ve 40% sacharose a převrstveny vždy 1,4 nebo 1,5 ml 35, 30, 25, 20 a 15% sacharosy. Po centrifugaci byl gradient rozebrán do 11 nebo 12 frakcí (po 1 ml, odshora dolů, tedy od 15 po 40% sacharosu). Membránové fragmenty o rozdílné vznášivé hustotě se vyskytovaly v různě koncentrovaných sacharosách, přičemž detergent resistentním membránovým doménám odpovídaly frakce 2-6, tedy 15-30% sacharosa. V některých případech jsme však užívali jednodušší gradienty, kdy na 40% sacharosu se vzorkem byly navrstveny jen 4 ml 35% a 3,5 ml 5% sacharosy, a detergent resistentní membránové domény pak byly lokalisovány na rozhraní těchto dvou sacharos (frakce 3-6). V jednotlivých frakcích sacharosových gradientů (1 ml frakce 1-11 nebo 1-12, podle typu gradientu) byla následně měřena distribuce vybraných proteinů sloužících jako „markery“ detergent solubilní a detergent resistentní fáze plasmatické membrány. Na obrázku 1A je znázorněna distribuce transmembránových bílkovin, které se v lipidových raftech nevyskytují – glykosylovaná a neglykosylovaná forma CD 147, MHC I, CD 29, Tapa 1, Na/K-ATPasa, transferinový receptor či calnexin. Tyto bílkoviny zůstávají ve 40% sacharose (frakce 8-11(12)) a během centrifugace se tato jejich lokalisace nemění. Naproti tomu, četné jiné, zvláště GPI vázané bílkoviny, CD 55, CD 59 a CD 58, pro které je výskyt v lipidových raftech charakteristický, stejně jako caveolin a flotillin-2/ESA, mají maximum lokalisace v nízkohustotních frakcích 3-6 (20-30% sacharosa)(obr. 1B). Obr. 1C ukazuje gradientový profil alkalické fosfatasy, která jakožto GPI vázaný protein rovněž představuje s rafty asociovanou bílkovinu. Z obrázku je patrná

společná lokalisace všech těchto raftových proteinů v oblasti méně koncentrovaných sacharos, tedy frakcí 2-6.

Zajímavá je koncentrace bílkoviny v jednotlivých gradientových frakcích. Zatímco frakce 8-12, představující detergentem rozpuštěnou fázi buněčných membrán, obsahovaly převážnou většinu celkové bílkoviny gradientu (ve 40% sacharose byl obsažen rovněž cytosol, který representuje podstatnou část buněčných bílkovin), ve frakcích 2-6 bylo množství bílkovin jen velmi nízké (1-3%). Tedy přesto, že v těchto frakcích odpovídajících detergent resistentním membránovým doménám bylo přítomno jen takto málo celkové bílkoviny, některé vybrané typy molekul (caveolin, flotillin-2/ESA, CD 55, CD 58, CD 59) byly lokalisovány víceméně jen v této oblasti gradientu, což svědčí pro potvrzení specifického bílkovinného složení lipidových raftů.

Při analyse gradientových profilů lze porovnávat vzorky buď o stejném množství bílkoviny, nebo lze z různých vzorků o odlišné koncentraci bílkovin odebrat pro porovnání vždy stejný objem. Při sledování distribuce různých proteinů podél gradientů bývá většinou z každé frakce odebrán konstantní objem, ale někteří autoři porovnávají jednotlivé frakce za užití konstantního množství proteinu. Rozdíl v těchto dvou přístupech k analyse gradientových profilů je znázorněn na obrázku 2. Protože ve frakcích o nižších hustotách sacharosy je obsaženo jen zcela malé množství celkové bílkoviny gradientu, vede analysa založená na porovnání frakcí obsahujících stejné množství bílkovin k silnému nadhodnocení míry výskytu s rafty asociovaných bílkovin v membránových doménách. A naopak, množství specifických bílkovin ve frakcích odpovídajících 40% sacharose je oproti detergent resistentním doménám relativně sníženo. Tyto výsledky nás vedly k závěru, že porovnávání konstantních objemů z jednotlivých frakcí je pro popis distribucí různých signálních, regulačních a jiných bílkovin podél gradientů vhodnější, a ve všech následujících pokusech jsme gradienty analysovali tímto způsobem.

Trimerní G proteiny v lipidových raftech

Z obrázku 2 je také patrné „chování“ trimerních G proteinů ve vztahu k membránovým mikrodoménám. Ve srovnání s caveolinem, flotillinem-2/ESA či různým GPI kotveným bílkovinám na straně jedné a calnexinem, transferinovým receptorem, CD 147 a jinými neraftovými bílkovinami na straně druhé, vykazují trimerní G proteiny distribuci v podstatě duální, kdy určité množství je přítomno v membránových doménách (na gradientu kolokalisace s GPI vázanými proteiny a caveolinem), a naopak, určité množství se nachází v detergentem rozpuštěné části plasmatické membrány. Tento typ distribuce byl zřejmý u

všech námi sledovaných podjednotek trimerních G proteinů, tedy Gβ, GsαL i GsαS, Gqα/G11α i Gi1,2α (obr. 2, 3 a 4). Jednotlivé podjednotky G proteinů se však poněkud lišily mírou výskytu v membránových mikrodoménách, a jak je patrné z obrázků 3 a 4, nejvyššího zastoupení v doménách byl dosaženo u Giα proteinů, nejnižšího pak u Gqα/G11α proteinu. Jasně však lze pozorovat, že za optimálního poměru detergent/bílkovina bývá v lipidových raftech isolovaných pomocí Tritonu X-100 přítomno 20-50% G proteinů, a naopak, mimo mikrodomény je to 50-80%.

Optimální koncentrace TX-100

Výsledky znázorněné na obrázcích 3 a 4 také ukazují význam koncentrace detergentu použitého pro isolaci lipidových raftů. Ačkoli nejčastěji bývá užíván 1% Triton X-100, naše výsledky naznačují, že i tato koncentrace může být příliš vysoká a vést k solubilisaci bílkovin lipidových raftů. Tak při poměrech TX-100/bílkovina 1,6/1-1,2/1 je většina caveolinu solubilisována (frakce 8-11, 40% sacharosa), a jen malé množství se nachází ve flotujících frakcích gradientu (fr. 2-6, 15-30% sacharosa). Podobně tomu bylo u flotillinu-2/ESA, i když zde byl efekt snižující se koncentrace detergentu méně nápadný, a i při aplikaci 1% TX-100 byla většina flotillinu-2 asociována s nízkodensními membránovými fragmenty (obr. 5). Poměr detergent/bílkovina v rámci použitých koncentrací TX-100 (1%-0,1%) měl tedy vliv na gradientovou distribuci těch bílkovin, které se alespoň částečně nacházejí v lipidových raftech, na druhou stranu distribuce calnexinu, transferinového receptoru a jiných ne-raftových proteinů změněna nebyla a tyto i při nízkých poměrech detergent/bílkovina (0,16/1) setrvávaly ve 40% sacharose, tedy frakcích 8-11(12). Tento výsledek byl zaznamenán i pro adenylylcyklasu IV (obr. 6).

Vliv hormonálního působení na lokalisaci Gsα proteinu

Kromě zjištění, jakým způsobem jsou jednotlivé sledované bílkoviny distribuovány ve vztahu k membránovým mikrodoménám v klidovém stavu, zajímaly nás rovněž případné změny po hormonálním působení. Dlouhodobé hormonální působení bylo pozorováno na buněčné linii HEK293 buněk, které stabilně exprimovaly IP prosthacyklinový receptor nebo fusní protein mezi tímto receptorem a GsαL proteinem. Pro aktivaci příslušné dráhy byl použit agonista iloprost (1 μM, 2 h), a byly sledovány hladiny G proteinů a jiných vybraných bílkovin, jak je znázorněno na obrázku 7. Obrázek ukazuje výsledky na buňkách exprimujících IP receptor značený antigenní sekvencí Flag (buňky FhIPR). Srovnány jsou buňky kontrolní (bez aplikace hormonu – levý sloupec) a buňky, na které bylo působeno

hormonem (iloprost – pravý sloupec). Výskyt jednotlivých sledovaných bílkovin v membránových doménách byl zaznamenán pomocí specifických protilátek proti Gsα a Gi1,2α proteinům, dále proti caveolinu a také v raftech nepřítomnému MHC I. Po dlouhodobém působení hormonu došlo ke změně v distribuci pouze u Gsα proteinu, a to k významnému snížení jeho množství v detergent resistentních membránových doménách (ze 43 na 13%), zatímco distribuce ostatních sledovaných molekul se nezměnila. Kromě snížení hladiny Gsα proteinu v detergent resistentních membránových doménách došlo i ke snížení jeho množství v detergentem solubilisované fázi buněčných membrán, toto snížení bylo však daleko menšího rozsahu než u mikrodomén, a souvisí patrně s celkovým snížením (down-regulací) množství Gsα proteinu v buňce po dlouhodobé hormonální stimulaci.

Distribuce Flag-hIPR

Nejen míra lokalisace Gsα proteinu v membránových mikrodoménách a její změny po dlouhodobém hormonálním působení byla cílem naší práce, ale rovněž vztah IP prosthacyklinového receptoru (hIPR) k detergent resistentním membránovým doménám v klidu i po hormonální aktivaci. Flagem značený hIPR (FhIPR) byl detekován na imunoblotu specifickými protilátkami proti antigenní sekvenci Flag, a to v buňkách kontrolních, i po 2 h působení iloprostu (1 μM). Výsledek znázorněný na obrázku 8 ukazuje, že ani za kontrolních podmínek, ani po dlouhodobém hormonálním působení, se tento receptor v membránových mikrodoménách nevyskytuje. Pouze při delší exposici filmu při ECL se určitá, velmi malá část imunoblotového signálu objevila i ve frakcích membránových domén. Toto množství, pokud vůbec detekovatelné, však nepřekročilo 3% celkového signálu. Ani dlouhodobé (2 h) působení hormonu nemělo vliv na tuto lokalisaci a receptor nadále zůstal v detergentem solubilisované membránové fázi.

Distribuce Gsα a IP receptoru v HEK293 buňkách exprimujících Flag-hIPR-Gsα

HEK293 buňky byly upraveny ke stabilní expresi Flagem značeného fusního proteinu mezi IP receptorem a Gsα proteinem (buněčná linie FhIPR-Gsα). Oproti buněčné linii exprimující pouze FhIPR, bylo nyní možné detekovat na imunoblotu FhIPR-Gsα fusní protein i pomocí protilátek proti Gsα (obr. 9). I zde, za pomoci těchto protilátek, převážná většina signálu, nebo dokonce veškerý signál na imunoblotu příslušející FhIPR-Gsα byl lokalisován mimo detergent resistentní membránové mikrodomény, a to i za podmínek sníženého poměru TX-100/bílkovina až na 0,16/1, jak vyplývá z výsledků ukázaných na obrázku 4. I na této buněčné linii detekce protilátkami anti-Flag potvrdila jednoznačně tento typ distribuce, na

druhou stranu, protilátky anti-Gsα neposkytovaly žádný imunoblotový signál v oblasti molekulární hmotnosti odpovídající FhIPR-Gsα (M_r 90 000) na buněčných liniích tuto fusní bílkovinu neexprimujících.

Podobně jako u HEK293 buněk exprimujících FhIPR, také buňky linie FhIPR-Gsα byly vystaveny působení hormonu (iloprost, 1 μM, 2 h). Výsledky u obou linií byly obdobné, i zde došlo ke specifickému poklesu množství Gsα v membránových mikrodoménách, zatímco hladina Gi1,2α proteinu se neměnila (obr. 10). Také IP receptor (FhIPR-Gsα) i po hormonální stimulaci setrvával mimo detergent resistentní membránové domény (data neukázána).

Alkalická (nedetergentová) extrakce

Podle Songa a kol. (Song a kol., 1996) lze lipidové rafty isolovat rovněž bez použití detergentu, tzv. alkalickou extrakcí (viz. Metody). Použitím této metody jsme dospěli k výsledkům podobným jako při tritonové extrakci. I když distribuce G proteinů a IP receptoru byla poněkud odlišná oproti detergentové přípravě membránových domén, zaznamenán byl pokles Gsα proteinu po působení iloprostu, zatímco hladina ani distribuce FhIPR detekovaného anti-Flag protilátkami se nezměnila (obr. 11). Podobný výsledek byl získán pomocí protilátek proti Gsα u buněčné linie FhIPR-Gsα (obr. 11 dole).

Distribuce bílkovin v homogenisačním gradientu

Kromě detergentové a alkalické extrakce jsme provedli i gradientovou separaci membránových fragmentů získaných pouhou homogenisací buněčného materiálu. Distribuce rozličných membránových proteinů (caveolin, flotillin-2/ESA, Gβ, Gqα/G11α, Gi1,2α, Gsα, FhIPR-Gsα a transferinový receptor) se v zásadě nelišila (obr. 12A), a většina imunoblotového signálu všech těchto proteinů (z nichž caveolin a flotillin-2/ESA jsou typické raftové bílkoviny, a naopak, transferinový receptor se v membránových doménách nenachází) byla přítomna ve stejných gradientových frakcích 5-7 (25-35% sacharosa), s maximem signálu ve frakci 6 (30-35% sacharosa). Výjimku tvořil calnexin, který se jakožto protein endoplasmatického retikula vyskytoval spíše v oblasti 40% sacharosy (obr. 12B). Kolokalisace různých proteinů plasmatické membrány ve frakcích 5-7 poukazuje na přítomnost většiny fragmentů plasmatické membrány právě v těchto frakcích. Naproti tomu, v žádném případě nelze hovořit o isolaci lipidových raftů, neboť nedošlo k oddělení jednotlivých „markerových“ bílkovin raftové a neraftové fáze plasmatické membrány.

Distribuce celkové bílkoviny podél sacharosových gradientů tritonových a homogenisačního FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buněk je znázorněna na obrázku 13, kde je zřejmý vliv koncentrace detergentu na celkové proteinové množství v gradientových frakcích. Klesající množství bílkoviny podél gradientu s klesající koncentrací Tritonu X-100 je vyrovnáno jeho narůstajícím množstvím v příslušných peletech, které se vytvořily při dlouhodobé centrifugaci na dně kyvet (Tabulka 1). U homogenisačního gradientu oproti gradientům tritonovým je také patrný vyšší obsah bílkovin ve frakci 6, který pravděpodobně souvisí s přítomností většiny bílkovin plasmatické membrány, jak je zmíněno výše. Po působení Tritonu X-100 tento vrchol proteinu ve frakci 6 mizí.

Lokalisace trimerních G proteinů a receptoru pro thyreoliberin (TRH receptoru) v lipidových raftech HEK293 buněk exprimujících VSV-TRH-R-GFP

Pro sledování subcelulární lokalisace receptoru pro thyreoliberin (thyreotropin releasing hormon - TRH) byla vyvinuta buněčná linie HEK293 stabilně exprimující tento receptor ve formě fusního proteinu s antigenní sekvencí VSV (vesicular stomatitis virus) a GFP (zeleným fluorescenčním proteinem) – VSV-TRH-R-GFP, tzv. VTGP buňky. Přítomnost VSV a GFP pak umožnila detekci receptoru specifickými protilátkami, a v případě GFP také zaznamenat endogenní fluorescenci této bílkoviny.

Detergentová a bezdetergentová fragmentace buněčných membrán

Buňky exprimující VSV-TRH-R-GFP (VTGP buňky) byly sklizeny vždy ze 6 kultivačních lahví (80cm^2) a podrobeny třem různým fragmentačním procedurám – homogenisaci, alkalické/sonikační a detergentové (tritonové) extrakci. 2 ml homogenátu nebo alkalického či detergentového lysátu byly následně dány na dno centrifugační kyvety (cca 22 mg proteinu), smíchány s 80% sacharosou 1:1 a převrstveny sacharosami o snižující se koncentraci (po 1,5 ml 35, 30, 25, 20 a 15% sacharosy). Po centrifugaci (39 000 rpm, 24 h) byl gradient odshora rozebrán po 1 ml do 12 frakcí (12. frakce jen 0,5 ml). Obrázek 14 ukazuje centrifugační kyvetu s navrstveným sacharosovým gradientem před centrifugací (0) a po centrifugaci. Opticky densní materiál byl nejnápadnější v oblasti 30-35% sacharosy (frakce 6-8) u gradientů homogenisačních a alkalických (A a C), zatímco po detergentové (1% TX-100) extrakci (B) vyflotovaly membránové fragmenty (detergent resistentní domény) až do 20-25% sacharosy (frakce 3-5).

Tyto tři různé způsoby frakcionace buněčných membránových struktur nám umožnily vzájemné porovnání proteinového složení membránových fragmentů připravených detergentovou a bezdetergentovou extrakcí. Distribuce bílkovin plasmatické membrány podél flotačních sacharosových gradientů je znázorněna na obrázku 15, kde je patrný rozdíl v celkovém množství bílkoviny v gradientových frakcích mezi jednotlivými gradienty. Podobně jako u FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buněk, i zde ve frakcích homogenisačního gradientu bylo přítomno méně proteinu než ve frakcích gradientu tritonového, což bylo opět kompensováno množstvím bílkoviny v gradientovém peletu (45% u homogenisačního oproti 39% u tritonového). Nejméně bílkoviny obsahovaly pelety alkalického gradientu (okolo 7%), kde většina celkové bílkoviny byla distribuována v gradientových frakcích – podobně jako u ostatních typů frakcionace – především ve frakcích 7-12.

Distribuce bílkovin plasmatické membrány podél gradientů

V jednotlivých gradientech připravených z různých buněčných preparátů (1% TX-100, 1 M Na_2CO_3 a sonikace, homogenát) byla měřena přítomnost a aktivita některých bílkovin plasmatické membrány (obr. 16-18). Z obrázku 16, kde je zachycena aktivita adenylylcyklasy (A) a vazba ^{3}[H]ouabainu (distribuce Na/K-ATPasy – B), ^{3}[H]TRH (distribuce TRH receptoru – C) a ^{3}[H]CGP12177 (distribuce β-adrenergních receptorů – D) v homogenisačních gradientech, vyplývá jejich kolokalisace především ve frakcích 6-8, které odpovídaly 30-35% sacharose (v některých případech byl patrný signál i na rozhraní 35 a 40% sacharosy, nebo i v horní oblasti 40% sacharosy, což mohlo být dáno drobnými rozdíly při homogenisaci a přípravě gradientů).

Distribuce Na/K-ATPasy v jednotlivých typech gradientů měřená vazbou ^{3}[H]ouabainu je porovnána na obrázku 17. Zřejmá je podobnost distribuce mezi gradienty připravenými z buněčného homogenátu a z preparátu připraveného alkalickou extrakcí. U alkalického/sonikačního gradientu je však patrný určitý posun maxima vazby radioligandu poněkud doleva, což souvisí pravděpodobně s o něco málo nižší vznášivou hustotou těchto fragmentů (patrné i při makroskopickém pohledu na gradienty po centrifugaci). Celkově vyšší množství vazby ^{3}[H]ouabainu v alkalickém gradientu může být dáno jednak celkově vyšším obsahem proteinu v gradientových frakcích, a také odlišnou přístupností vazebných míst pro radioligand v jednotlivých typech separací. Vazba ^{3}[H]ouabainu v tritonovém gradientu byla celkově nižší a zachytitelná pouze v oblasti flotujících frakcí membránových mikrodomén (frakce 3-5, 20-25% sacharosa).

Aktivita adenylylcyklasy podobně jako vazba radioligandů ^{3}[H]CGP12177 a ^{3}[H]TRH (obr. 18) nebyla v detergentových gradientech měřitelná. Pravděpodobné zničení vazebných míst těchto receptorů působením Tritonu nám znemožnilo pomocí vazby radioligandu zjistit míru výskytu TRH receptoru v membránových mikrodoménách. Podobně jako v případě Na/K-ATPasy, i pro vazbu ^{3}[H]TRH byl zjištěn podobný průběh distribuce pro homogenisační a alkalický gradient, s rozdílem v celkovém množství vazby, jak je zdůvodněno výše (obr.18).

Analysa průběhu distribuce caveolinu a podjednotek trimerních G proteinů Gβ, Gqα/G11α a Gi1,2α podél homogenisačního a alkalického gradientu potvrdila kolokalisaci těchto proteinů v 30-35% sacharose a poukázala tak opět na podobnost těchto dvou typů membránové frakcionace (obr. 19). Naproti tomu, pokud byly buňky lysovány Tritonem X-100, fragmenty plasmatických membrán vyskytující se v homogenisačním a alkalickém gradientu především v oblasti 30-35% sacharosy (frakcích 6-8) byly rozděleny na dvě odlišné fáze – detergent resistentní membránové domény (20-30% sacharosa, frakce 3-6) a detergentem rozpuštěnou fázi plasmatické membrány (40% sacharosa, frakce 8-12). Na obrázku 20 je znázorněna závislost distribuce Gqα/G11α, Gβ, caveolinu a flotillinu-2/ESA na koncentraci Tritonu X-100 použitého pro extrakci membránových domén. Distribuce těchto v doménách přítomných proteinů byla duální, s odlišnou mírou lokalisace v doménách v závislosti na použité koncentraci detergentu.

Distribuce VSV-TRH-R-GFP

Na obrázcích 16 – 19 je ukázána kolokalisace TRH receptoru (ve formě fusního proteinu – VSV-TRH-R-GFP) s ostatními proteiny plasmatických membrán v 30-35% sacharose homogenisačního nebo alkalického gradientu. Vazba radioligandu v detergentovém gradientu byla znemožněna působením Tritonu X-100, a tak pro zjištění distribuce VSV-TRH-R-GFP byla využita endogenní fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Porovnání všech tří typů gradientů pomocí GFP fluorescence je znázorněno na obrázku 21, ze kterého je zřejmý soulad distribuce sledované vazbou radioligandu a GFP fluorescencí pro homogenisační a alkalický gradient, je zde však rovněž zachycena distribuce VSV-TRH-R-GFP v tritonovém gradientu. Ta se významně liší a připomíná distribuci proteinů v detergent resistentních doménách nepřítomných (CD 29, CD 147, MHC I, Tapa 1, transferinový receptor, aj. – obr. 1A). Podobně jako u FhIPR-Gsα, snížení koncentrace TX-100 až na 0,1% nevedlo k výrazné změně distribuce a v oblasti 20-25% sacharosy odpovídající membránovým doménám tak nebylo přítomno více než 9% celkového množství receptoru

(obr. 22). Za této snížené koncentrace detergentu už bylo v příslušných gradientových frakcích přítomno více než 90% signálu caveolinu a flotillinu-2/ESA, i podstatná část signálu trimerních G proteinů (obr. 20, tab. 2). Tyto výsledky tedy jasně naznačují téměř úplnou absenci VSV-TRH-R-GFP v Triton resistentních membránových mikrodoménách.

Přítomnost antigenních epitopů VSV a GFP ve struktuře fusního proteinu VSV-TRH-R-GFP nám umožnila i detekci na imunoblotu. Využili jsme protilátky proti oběma těmto epitopům a na obrázku 23 je porovnána distribuce fusního proteinu VSV-TRH-R-GFP v detergentovém gradientu (1% TX-100) sledovaná anti-GFP protilátkami (A) a GFP fluorescencí (B). Obě techniky poskytly v podstatě shodný výsledek, který podporuje závěr, že VSV-TRH-R-GFP není přítomen v detergent resistentních membránových mikrodoménách isolovaných pomocí 1% TX-100. Imunoblotová analysa distribuce VSV-TRH-R-GFP pomocí protilátek anti-VSV v tritonovém gradientu (obr. 24B) je srovnána s distribucí v gradientu homogenisačním (obr. 24A) a alkalickém (obr. 24C). Signál příslušející fusnímu proteinu dobře odpovídá výsledkům z vazby ^{3}[H]TRH (obr. 18) i GFP fluorescence (obr. 21) jak u homogenisačního, tak u alkalického gradientu, a potvrzuje kolokalisaci s ostatními proteiny plasmatické membrány, zatímco u tritonového gradientu detekce protilátkami proti VSV a GFP, srovnatelná s výsledky GFP fluorescence (obr. 23), potvrzuje absenci VSV-TRH-R-GFP v detergent resistentních membránových mikrodoménách.

2D analysa složení nízkodensních membránových frakcí po dlouhodobém hormonálním působení

Případnou podobností flotujících membránových fragmentů získaných homogenisací, alkalickou/sonikační a tritonovou (1% TX-100) extrakcí za použití 2D elektroforesy a případnou změnou jejich proteinového složení po hormonální stimulaci se zabýval především kolega RNDr. Petr Matoušek, PhD. (Matousek a kol., 2004; Matousek a kol., 2005). Pro analysu byly použity dvě odlišné buněčné linie představující dva různé receptor-G proteinové systémy. Linie E2M11 buněk byla vyvinuta z HEK293 buněk (stabilní exprese potkaního TRH receptoru a myšího G11α proteinu) a umožnila nám studovat případné změny v hladinách a subcelulární redistribuci G11α proteinu po dlouhodobém hormonálním působení (Pesanova a kol., 1999). Linie S49 lymfomových buněk představovala vhodný modelový systém pro studium signální dráhy β-adrenergního receptoru (stimulace isoprenalinem) a Gsα proteinu. Homogenisační, alkalické i tritonové gradienty byly

připraveny podobným způsobem jako v předcházejících případech. Na gradient bylo dáno 20-30 mg proteinu (materiál z 15 75 cm^2 kultivačních lahví) a jednotlivé sacharosy (35, 30, 25, 20, 15,10%) byly na diskontinuitní gradient nanášeny po 1 ml, plus 1,5 ml 5% sacharosy. Gradient byl po 24 h centrifugaci (39 000 rpm) rozebrán odshora do jedenácti 1 ml frakcí a pro následnou analysu pomocí 2D elektroforesy byly z jednotlivých gradientů použity frakce 3-5, jakožto flotující, nízkohustotní fragmenty buněčných membrán.

Buňky kontrolní byly porovnány s hormonálně ovlivněnými (v případě linie E2M11 16 h působení 1.10^{-5} M TRH, v případě linie S49 lymfomových buněk 16 h 1.10^{-5} M isoprenalin). Obrázek 25 představuje 2D gely značené stříbrem a imunobloty oblastí obsahujících příslušné trimerní G proteiny (pro detailnější porovnání viz. přiloženou publikaci (Matousek a kol., 2005)). V případě E2M11 buněk byly na 2D gelu rozlišeny Gqα a G11α proteiny, a u obou z nich byl jasně patrný pokles v množství přítomném v analysovaných gradientových frakcích 3-5 po dlouhodobém vystavení TRH. Toto snížení hladiny G proteinu bylo zřejmé u nízkohustotních fragmentů získaných na sacharosových gradientech z homogenátu (A), alkalického/sonikovaného preparátu (B) i tritonového lysátu (C). Současně se nezměnila hladina ostatních přibližně 150-170 bílkovin obarvených a visualisovaných na příslušném 2D gelu, což svědčí pro specifitu redistribučních dějů souvisejících s dlouhodobou hormonální stimulací příslušné signální dráhy. V podstatě shodné výsledky byly zaznamenány pro S49 lymfomovou linii po stimulaci isoprenalinem (obr. 26). Také zde došlo k poklesu až vymizení všech čtyř isoforem Gsα proteinu (na 2D gelu od sebe odděleny dlouhé GsαL ± Ser a krátké varianty GsαS ± Ser) z nízkohustotních membránových fragmentů připravených homogenisací (A), alkalickou (B) nebo 1% TX-100 extrakcí (C). Stejně jako u E2M11 buněk po stimulaci hormonem, celkové složení nízkohustotních membránových fragmentů buněk S49 lymfomové linie se podle hladin zobrazených 150-170 bílkovin neměnilo. U tritonového gradientu analysovaný průběh distribuce Gi1,2α (obr. 27) stejně jako četných dalších GPI vázaných a transmembránových bílkovin zůstal po působení hormonu nezměněn (10 nM TRH, 16 hod, buňky E2M11). Na druhou stranu, z poněkud odlišných proteinových map 2D gelů z analysovaných gradientových frakcí 3-5 vyplývá odlišné bílkovinné složení nízkohustotních membránových fragmentů získaných homogenisací, alkalickou/sonikační extrakcí či detergentovou (1% Triton X-100) lysí, čili že tyto fragmenty nejsou co do svého složení totožné a na základě těchto dat tedy nelze vyvodit závěr, že všechny flotující membránové fragmenty charakterisované nízkou vznášivou hustotou při flotaci na diskontinuitním sacharosovém gradientu představují isolované lipidové rafty.

Signální proteiny a detergent resistentní membránové domény v mozkovém kortexu potkana

Subcelulární frakcionace mozkového kortexu potkana

Kromě studie signální dráhy trimerních G proteinů na buněčných liniích HEK293 a S49 lymfomových buněk zaměřili jsme pozornost také na přirozenou živočišnou tkáň, konkrétně na kortex telencefalonu potkana. Před vlastní separací nízkohustotních membránových fragmentů na diskontinuitním sacharosovém gradientu jsme pro následnou analysu nejprve isolovali plasmatické membrány (podle Rybin a kol., 2000). Využili jsme Percollového gradientu a po 30 min centrifugaci (blíže viz Metody) byly na gradientu odděleny dvě zřetelné vrstvy (obr. 28A), spodní, odpovídající mitochondriím (obr. 29B), a horní, odpovídající fragmentům plasmatické membrány. Tato vrstva byla tvořena heterogenní směsí měchýřků rozličné velikosti i tvaru (obr. 29A). Zatímco s mitochondriální frakcí se již dále nepracovalo, pro separaci nízkohustotních membránových fragmentů na sacharosovém gradientu (15/20/25/30/35/40% sacharosa) byla použita plasmatickou membránou obohacená vrstva. Plasmatické membrány tak byly po 24 h centrifugaci rozděleny na vysokohustotní frakci (35-40% sacharosa, „high-density plasma membrane“ (HPM) – obr. 28B a 29D) a nízkohustotní frakci obsahující myelin (20-25% sacharosa, „low-density plasma membrane“ (LPM) – obr. 28B a 29C). Právě rozhraní 35-40% sacharosy, podobně jako na materiálu získaném z tkáňových kultur buněčných linií, zahrnovalo nejvyšší množství Na/K-ATPasy měřené jak vazbou ^{3}[H] ouabainu (obr. 30 vlevo nahoře), tak analysou na imunoblotu (obr. 30 vlevo dole).

Frakcionace plasmatických membrán mozkového kortexu po působení 1% Tritonu-100

Podobně jako na buněčných liniích, i na přirozené mozkové tkáni nás zajímal vztah receptorů spřažených s trimerními G proteiny k detergent resistentním membránovým mikrodoménám. Využili jsme opět 1% Triton X-100, který byl použit jako definiční nástroj pro isolaci těchto domén. Distribuce Na/K-ATPasy je znázorněna na obrázku 30 vpravo, přičemž po působení Tritonu byla zaznamenána jen velmi slabá vazba ^{3}[H]ouabainu v nízkohustotních frakcích a detekce specifickými protilátkami na imunoblotu ukázala, že převážná většina Na/K-ATPasy je lokalisována mimo detergent resistentní membránové mikrodomény (srovnej s obr. 1A).

Distribuce caveolinu a G proteinu Gi1,2α v gradientech z mozkové tkáně rovněž odpovídala homogenisačním a tritonovým gradientům na různých liniích HEK293 buněk (obr. 31). Za použití membránové frakce bez detergentu, gradientová distribuce caveolinu, Gi1,2α, adenylylcyklasy I a Na/K-ATPasy byla v podstatě totožná, s maximem lokalisace na rozhraní 35-40% sacharosy (frakce 7-8); a naopak, po působení 1% Tritonu X-100, s lipidovými rafty asociované bílkoviny caveolin a částečně Gi1,2α protein vykazovaly duální distribuci, kde část imunoblotového signálu souvisela s nízkohustotními frakcemi 2-6 (sacharosy 20-25%) a část s vysokohustotními frakcemi 8-12 (40% sacharosa). Některé adenylylcyklasy bývají udávány jako proteiny, které se nacházejí v lipidových raftech, a naše výsledky tento údaj podporují i pro adenylylcyklasu I.

Funkce adenylylcyklasy byla Tritonem X-100 negativně ovlivněna a její aktivita v TX-100 gradientech nebyla měřitelná. Tento destruktivní efekt byl zaznamenán i na funkční aktivitu G proteinů, což dokumentuje obrázek 32. Agonistou (baclofenem) stimulovaná vazba GTPγS byla přítomností Tritonu X-100 zcela zničena, což jasně poukazuje na nevhodnost TX-100 isolovaných domén pro měření funkčních aktivit bílkovin signální dráhy trimerních G proteinů.

Distribuce β-adrenergních a $GABA_B$ receptorů

Jak bylo zmíněno v předcházejících oddílech, zjistili jsme, že převážná většina TRH receptoru a IP prosthacyklinového receptoru v HEK293 buňkách je lokalisována v Tritonem X-100 rozpuštěné fázi plasmatické membrány. Na mozkové tkáni jsme se pokusili o zjištění rozsahu výskytu β-adrenergních a $GABA_B$ receptorů v membránových doménách pomocí vazby radioligandu. V horní části obrázku 33 je znázorněna distribuce β-adrenergních receptorů zaznamenaná pomocí vazby agonisty ^{3}[H]dihydroalprenololu (DHA) a antagonisty ^{3}[H]CGP12177. Maximum vazby ve frakci sedm (35% sacharosa) u homogenisačního gradientu jasně odpovídá distribuci Na/K-ATPasy a ostatních proteinů plasmatické membrány (obr. 30 a 31). Triton X-100 je ovšem odpovědný za pravděpodobné zničení schopnosti některých receptorů vázat ligandy, což nám znemožnilo zjistit jejich pomocí distribuci β-adrenergních receptorů v tritonovém gradientu. Tu však bylo lze zaznamenat pomocí specifických protilátek proti β1 a β2 adrenergnímu receptoru na imunoblotu (jen β1 adrenergní receptor znázorněn na obr. 34). Oba dva receptory poskytly většinu imunoblotového signálu ve frakcích 7-8 homogenisačního gradientu (shoda s vazbou radioligandu - ^{3}[H]DHA) a ve vysokohustotních frakcích 8-12 TX-100 gradientu. Odlišná situace nastala u vazby ^{3}[H]CGP54626A, tedy antagonisty $GABA_B$ receptorů, jež měla své

maximum v nízkohustotních frakcích 4-6, které odpovídají detergent resistentním membránovým mikrodoménám (obr. 33 dole). Vazba ^{3}[H]baclofenu (agonisty) byla oproti vazbě ^{3}[H]CGP54626A velmi slabá a vykazovala značnou nespecifitu (>95%), takže pro ověření výskytu $GABA_B$ receptoru v mikrodoménách nebyla vhodná. Nicméně detekce na imunoblotu ukázala gradientovou distribuci $GABA_B$ receptoru jako duální s přibližně polovinou množství lokalisovanou v detergent resistentních membránových doménách (obr. 35).

Frakcionace plasmatických membrán mozkového kortexu po působení detergentu Brij 58

Vzhledem ke skutečnosti, že Triton X-100 znemožňoval měření funkční aktivity G proteinů i adenylylcyklasy, a ničil vazebné schopnosti některých receptorů, pokusili jsme se nalézt jiný detergent, který by příslušné vlastnosti sledovaných bílkovin zachoval nepozměněné. Jako vhodný kandidát se ukázal málo koncentrovaný Brij 58. U gradientů, které obsahovaly 5-6 mg bílkoviny (plasmatických membrán potkaního kortexu isolovaných na Percollu), 0,025% a 0,05% Brij 58 (45-60min působení) zachoval funkční baclofenem stimulovanou GTPasovou aktivitu Giα proteinů, zatímco 0,1% Brij 58 tuto aktivitu už inhiboval (obr. 36). Zajímavá byla distribuce celkové bílkoviny podél jednotlivých gradientů, kde v závislosti na použití Brije 58 a jeho koncentraci docházelo ke změně průběhu množství bílkoviny v gradientových frakcích. Vrchol bílkoviny ve frakci 8 (35/40% sacharosa) se po působení Brije 58 posouval do oblastí méně koncentrovaných sacharos, což svědčilo o snižující se vznášivé hustotě těchto Brijem isolovaných membránových fragmentů, a současně se množství bílkoviny v těchto fragmentech oproti bezdetergentové frakcionaci poněkud snížilo (obr. 36 dole a obr. 37).

Při podrobnější analyse vlivu Brije 58 na funkční aktivitu trimerních G proteinů měřenou jako vazbu GTPγS (obr. 38) bylo možné pozorovat efekt v rozmezí 0,05-0,1%, kde sama přítomnost tohoto detergentu vedla až k pětinásobnému zvýšení baclofenem stimulované vazby GTPγS, zatímco koncentrace nižší (0,001-0,025%) ponechávaly měřitelnou funkční aktivitu Giα/Goα proteinů na hladině podobné té bez použití detergentu, a naopak, koncentrace vyšší než 0,1% vedly postupně k inhibici agonistou stimulované G proteinové aktivity.

Diskuse

Výsledky získané v rámci hledání míry výskytu jednotlivých složek signalisace trimerních G proteinů v tzv. membránových mikrodoménách ukazují odlišnou preferenci jednotlivých bílkovin k mikrodoménám a možnou změnu této preference po dlouhodobém hormonálním působení. Membránové mikrodomény (domény, lipidové rafty) byly původně isolovány jako detergent resistentní, detergent insensitivní či Triton insensitivní membránové domény na základě jejich odolnosti vůči působení slabého neiontového detergentu, původně Tritonu X-100 (TX-100), a jejich nízké vznášivé hustoty po separaci na hustotním sacharosovém gradientu (Simons a Ikonen, 1997; Jacobson a Dietrich, 1999; Pike, 2003). Prvními pozorovanými membránovými doménami byly caveoly, drobné (50-100 nm) jamkovité či lahvicovité vchlípeniny plasmatické membrány na buněčném povrchu. Základním strukturním proteinem caveol je caveolin (M_r 21-24000), který je kódován třemi různými geny, jejichž proteinové produkty se liší svými interakčními doménami, strukturními vlastnostmi i tkáňovou distribucí (Monier a kol., 1995; Parton, 1996; Way a Parton, 1996; Scherer a kol., 1997). I když byla popsána úloha caveol či samotného caveolinu v řadě různých dějů spojených s přímými protein-proteinovými interakcemi či membránovým transportem, nás zajímala především úloha caveol jakožto míst v plasmatické membráně, kde jsou koncentrovány signální a regulační bílkoviny signální dráhy trimerních G proteinů. Nejsou to však jen caveoly, které oproti většinové membránové fázi vynikají svým uspořádáním, jedná se i o lipidové rafty či membránové domény v širším smyslu slova, které neobsahují caveolin a v membráně se vyskytují na základě samouspořádání specifických lipidů a proteinů. Lipidové rafty jsou tak tvořeny především lipidy s dlouhými nasycenými uhlíkatými řetězci a zvláště ve vnějším listu plasmatické membrány glykosfingolipidy a sfingomyelinem. Klíčovým pro formování a udržení struktury membránových mikrodomén je pak cholesterol, jehož odstranění z membrány vede k rozpadu původně existujících a cholesterolem obohacených lipidových raftů (Ahmed a kol., 1997; Brown a London, 1997; Navratil a kol., 2003; Hur a kol., 2004).

Vzhledem k širokému výskytu nejrůznějších signálních a regulačních molekul v membránových doménách, předpokládá se významná úloha těchto struktur při modulaci a směrování signálního přenosu. Oproti většinové, detergentem rozpustné fázi plasmatické membrány jsou tak v lipidových raftech či caveolách ve svém výskytu významně obohaceny

povrchové receptory typu GPI vázaných proteinů, thyrosinové kinasy rodiny Src, ze signální dráhy trimerních G proteinů pak samotné podjednotky G proteinů, podobně jako četné receptory spřažené s trimerními G proteiny, některé adenylylcyklasy, aj. (Lisanti a kol., 1994; Gorodinsky a Harris, 1995; Shaul a Anderson, 1998; Jacobson a Dietrich, 1999; Rybin a kol., 2000; Ostrom a kol., 2001; Foster a kol., 2003). Samotná interakce proteinů s caveolinem může mít modulační vliv na signální přenos, jako např. inhibice funkce G proteinů, pro které má molekula caveolinu specifické vazebné místo (Lisanti a kol., 1994; Scherer a kol., 1997; Shaul a Anderson, 1998; Jacobson a Dietrich, 1999; Murthy a Makhlouf, 2000).

Otevřenou problematikou zůstává vlastní povaha a možná různorodost membránových domén. Pomocí odlišných separačních technik jsou isolovány lipidové rafty poněkud rozdílných vlastností, lipidového i proteinového složení (Schuck a kol., 2003; Pike, 2004). Zatímco existence caveol byla prokázána i přímým sledováním za užití různých mikroskopických technik, takové pozorování pro ostatní membránové mikrodomény pro jejich malou velikost víceméně chybí, i když shluky některých s rafty asociovaných proteinů do oblastí odlišných od caveol už pozorovány byly (Wyse a kol., 2003). Ačkoli původně byly lipidové rafty isolovány jako detergent resistentní membránové domény pomocí 1% Tritonu X-100, objevila se časem řada dalších postupů pro separaci raftů pomocí jiných detergentů (CHAPS, Lubrol, Tween, Brij 35, 56, 58, 96, 98 aj.) (Roepstorff a kol., 2002; Schuck a kol., 2003; Pike a kol., 2005) či bezdetergentovou cestou, např. alkalickou extrakcí (Song a kol., 1996; Rybin a kol., 2000; Kim a kol., 2004). Přes odlišnosti ve složení membránových fragmentů získaných za použití různých separačních technik, při aplikaci shodného postupu bývá dosahováno v zásadě velmi podobných výsledků. Výsledkem těchto analys může být pravděpodobný závěr o nezávislé existenci více typů lipidových raftů různě odolných k různým detergentům či isolačním postupům, ale také existence jen několika málo typů lipidových raftů (např. jen caveol a ostatních, necaveolárních membránových domén), vůči kterým vykazují jednotlivé detergenty odlišnou schopnost narušit jejich strukturu (Pike, 2004). U některých postupů pak vyvstává otázka, zda jimi isolované membránové struktury jsou vůbec lipidové rafty, nebo zda se jedná jen o nespecificky získané fragmenty buněčných membrán, jak bylo zjištěno na základě výskytu s rafty neasociovaných bílkovin v některých isolovaných membránách (Eckert a kol., 2003; Schuck a kol., 2003; Kim a kol., 2004; Pike a kol., 2005). Původní extrakce pomocí 1% Tritonu X-100 poskytuje domény obsahující relativně nejméně proteinů, na druhé straně takto získané domény vykazují výrazné obohacení o specifické lipidy typu sfingolipidů a cholesterol, jsou tedy nejméně kontaminované lipidovými molekulami většinové, nedoménové membránové fáze. Isolace poměrně čistých a

pomocí různých tzv. markerových bílkovin jasně charakterisovaných membránových domén byla důvodem, proč jsme pro extrakci caveol a raftů používali právě 1% Triton X-100, a srovnávali tuto metodu i s isolací bezdetergentovou pomocí extrakce silnou zásadou a sonikací, homogenisací, a i pomocí jiných detergentů.

V první části práce jsme se pokusili zjistit, zda a v jakém množství je v lipidových raftech přítomen receptor pro prosthaglandin (prosthacyklin) PGI_2 (tzv. iloprostový – IP - receptor). Prosthacyklinový IP receptor je spojen se signalisací přes Gsα a produkci cAMP (Fong a Milligan, 1999; Zhang a kol., 2006), proto jsme sledovali i distribuci Gsα proteinu za kontrolních podmínek i po stimulaci iloprostem. Jako modelový systém nám sloužila buněčná linie HEK293 upravená ke stabilní expresi lidského IP prosthacyklinového receptoru (hIPR) značeného antigenní sekvencí Flag (FhIPR) a linie HEK293 buněk exprimující fusní protein mezi FhIPR a Gsα proteinem (FhIPR-Gsα). Vazebné schopnosti takto upravených receptorů a jejich schopnost aktivovat Gsα protein zůstaly zachovány, jak bylo ověřeno (Fong a kol., 1998; Fong a Milligan, 1999).

Pro charakterisaci námi isolovaných membránových domén získaných po působení 1% Tritonu X-100 na flotačním sacharosovém gradientu jsme na imunoblotu detekovali celou řadu různých proteinů, které jsou známy jako v raftech nepřítomné – transmembránové bílkoviny CD 147, MHC I, CD 29, Tapa I, Na/K-ATPasa, transferinový receptor a calnexin (Horejsi a kol., 1998; Pesanova a kol., 1999; Eckert a kol., 2003; Foster a kol., 2003; Alfalah a kol., 2005)(obr. 1A), a s rafty asociované – GPI vázané CD 55, CD 58, CD 59, caveolin a flotillin-2/ESA (Horejsi a kol., 1998; Horejsi a kol., 1999; Volonte a kol., 1999; Foster a kol., 2003) (obr. 1B). Měřením aktivity alkalické fosfatasy (obr. 1C), která je bílkovinou často užívanou pro určení frakce membránových domén (Foster a kol., 2003; Schuck a kol., 2003), bylo podobně jako sledováním gradientové distribuce ostatních proteinů potvrzeno oddělení membránových domén/lipidových raftů od většinové membránové fáze do oblasti 15-30% sacharosy, tedy gradientových frakcí 3-6. Naproti tomu, s rafty neasociované bílkoviny plasmatické membrány a většina celkové buněčné bílkoviny zůstala po gradientové centrifugaci ve 40% sacharose, tedy frakcích 8-12. Na obrázku 1C je také zaznamenán vliv snížené koncentrace Tritonu X-100 až na 0,1%. Snížení koncentrace použitého detergentu tak vedlo ke zvýšení množství sledovaného proteinu (alkalické fosfatasy) ve frakcích odpovídajících detergent resistentním membránovým doménám.

Pro analysu gradientových profilů na imunoblotu jsme aplikovali nanášení konstantního objemu vzorku na SDS-PAGE z jednotlivých frakcí tak, jak je znázorněno na obrázku 2 vlevo, kde je zachycena gradientová distribuce Gsα proteinu, caveolinu a flotillinu-

2/ESA. Vzhledem k výrazně rozdílnému množství bílkoviny mezi jednotlivými gradientovými frakcemi vedlo nanášení stejného množství bílkoviny z každé frakce (obr. 2 vpravo) k nadhodnocení výskytu sledovaných bílkovin v nízkohustotních gradientových frakcích, pro které je typická relativně velmi malá koncentrace bílkovin, protože membránové mikrodomény představují jen minimum celkového proteinového obsahu buňky. Naproti tomu, nanášení konstantního proteinu na elektroforesu způsobilo, že některé proteiny (např. caveolin) nebyly ve vysokohustotních gradientových frakcích vůbec detekovány, i když se v této detergentem rozpuštěné fázi buněčných membrán vyskytují. Proto byly ve všech následných elektroforetických a imunoblotových analysách, pokud není uvedeno jinak, nanášeny vždy konstantní objemy ze všech frakcí hustotních sacharosových gradientů.

Distribuci trimerních G proteinů jsme dále sledovali při různých koncentracích Tritonu X-100 použitých pro buněčnou lysi. Obrázky 3 a 4 ukazují posun imunoblotového signálu G proteinů do nízkohustotních frakcí detergent resistentních membránových domén v souvislosti se snižující se koncentrací detergentu. Nejvyšší míru výskytu v membránových doménách vykazoval Gi1,2α protein, naproti tomu, Gqα/G11α protein byl s lipidovými rafty jen velmi málo asociován. Většinou jsou trimerní G proteiny uváděny jako přítomné v lipidových raftech obecně, i když preference jednotlivých podjednotek pro různé typy raftů byly pozorovány (Gqα byl zaznamenán přímo v caveolách, kdežto Gsα, Giα a Gβγ spíše v raftech necaveolárního typu, (Oh a Schnitzer, 2001)). Také Quinton a kol. (Quinton a kol., 2005) pozorovali odlišnou míru asociace podjednotek G proteinů s membránovými doménami isolovanými pomocí 1% Tritonu X-100. Porovnáním výskytu Giα, Gqα a Gzα proteinu v detergent resistentních membránových doménách dospěli rovněž k závěru, že nejvíce je v lipidových raftech přítomen Giα protein, zatímco Gqα a Gzα v nich téměř nebyly.

Kromě ověření výskytu trimerních G proteinů v detergent resistentních membránových doménách naše výsledky také ukazují význam poměru detergent/bílkovina pro isolaci těchto membránových struktur. Zdá se, že optimální poměr leží mezi 0,1-0,4, jak je kromě obrázků 3 a 4 patrné i z obrázku 5, kde je ukázán gradientový profil caveolinu a flotillinu-2/ESA, tedy pro rafty typických bílkovin. Také tento výsledek potvrzuje význam použité koncentrace detergentu, a rozdíly v distribuci těchto dvou proteinů zvláště za vyšších poměrů Triton/bílkovina dále naznačují možnou alespoň částečně odlišnou preferenci pro lipidové rafty či pro různé typy raftů. I v případě použití 0,1% TX-100 (poměr detergent/bílkovina 0,16/1), tedy kdy téměř veškerý imunoblotový signál caveolinu a flotillinu-2/ESA souvisel s nízkohustotními gradientovými frakcemi 2-6 (15-30% sacharosa), proteiny s rafty neasociované (calnexin, transferinový receptor) zůstaly plně solubilisovány a

byly detekovány jen v gradientových frakcích vysokohustotních (frakce 8-11, 40% sacharosa, tato data nejsou ukázána). Použitá koncentrace detergentu, a tedy následný poměr detergent/bílkovina se tak jeví jako velmi významný pro isolaci raftů, a bývá proto důležité v každém případě nalézt tento optimální poměr (Chamberlain a Gould, 2002).

Podobnou gradientovou distribuci jako transmembránové a s rafty neasociované proteiny calnexin a transferinový receptor, či CD 147, MHC I aj., vykazovala i adenylylcyklasa IV (obr. 6), která je isoformou adenylylcyklasy v ledvinném epithelu exprimovanou (Simonds, 1999). Vzhledem k výsledkům Ostroma a kol. (Ostrom a kol., 2003), kteří v raftech isolovali adenylylcyklasu III a V/VI, nikoliv však adenylylcyklasy II, IV a VII, jsme očekávali, že adenylylcyklasa IV nebude v membránových doménách přítomna, a tato domněnka se potvrdila. Ani při použití nejnižší koncentrace Tritonu X-100 jsme na imunoblotu pomocí specifických protilátek proti adenylylcyklase IV nezjistili žádný signál v oblasti nízkohustotních gradientových frakcí.

Vzhledem k tomu, že už dříve byl v naší laboratoři zjištěn specifický pokles množství Gqα/G11α proteinu v detergent resistentních membránových doménách po dlouhodobé stimulaci hormonem (TRH)(Pesanova a kol., 1999), zajímal nás vliv dlouhodobého hormonálního působení na lokalisaci signálních proteinů i na liniích HEK293 buněk exprimujících IP prosthacyklinový receptor (FhIPR a FhIPR-Gsα). Po 2 hod. inkubaci s iloprostem jsme zaznamenali pokles hladiny Gsα proteinu ve frakcích membránových domén isolovaných z buněk exprimujících FhIPR, který nebyl doprovázen přesuny jiných sledovaných proteinů (Gi1,2α, caveolin, MHC I aj.), jak je znázorněno na obrázku 7. Protilátkami proti antigenní sekvenci Flag jsme detekovali i molekulu receptoru (obr. 8), který svou gradientovou distribucí připomínal proteiny v raftech nepřítomné (CD 147, Tapa 1, Na/K-ATPasa, calnexin, transferinový receptor, AC IV, aj.), a ani dlouhodobé vystavení iloprostu nevedlo ke změně jeho lokalisace. Pro IP prosthacyklinový receptor jsme tak zaznamenali podobný vztah k membránovým doménám, jako byl zjištěn např. pro EP_2 a EP_4 prosthaglandinové receptory (Ostrom a kol., 2001; Ostrom a kol., 2002) v souvislosti s doménami isolovanými pomocí silné zásady, a také pro metabotropní glutamátový receptor 1 ve vztahu k doménám tritonovým (Becher a kol., 2001). Tento výsledek byl potvrzen i na buněčné linii exprimující fusní bílkovinu mezi FhIPR a Gsα detekcí protilátkami proti Gsα (obr. 9), kde po hormonální stimulaci iloprostem došlo rovněž ke specifickému poklesu v hladině Gsα proteinu (obr. 10). Srovnáním tritonové isolace lipidových raftů s postupem separace domén pomocí silné zásady (1 M Na_2CO_3, pH 11) a sonikace jsme sice také zaznamenali pokles Gsα v nízkohustotních frakcích, ale celkový gradientový profil se oproti

detergentové isolaci poněkud lišil. Při použití alkalické preparace byl i Flagem značený receptor přítomen v nízkohustotních gradientových frakcích, celkově však jeho distribuce byla odlišná od profilu Gsα proteinu v FhIPR i FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buňkách (obr. 11). Jistá odlišnost alkalické a tritonové extrakce membránových domén byla zmíněna v řadě prací (Burgueno a kol., 2003; Eckert a kol., 2003; Chini a Parenti, 2004; Kim a kol., 2004; Allen a kol., 2005; Pike a kol., 2005).

Pro srovnání s alkalickou a tritonovou frakcionací isolovali jsme nízkohustotní membránové fragmenty také z buněčného preparátu připraveného jen homogenisací. V takto isolovaných fragmentech o vznášivé hustotě odpovídající přibližně 35% sacharose byla přítomna většina imunoblotového signálu všech námi sledovaných proteinů plasmatické membrány včetně trimerních G proteinů, FhIPR-Gsα, proteinů membránových domén (caveolin, flotillin-2/ESA) i proteinů v doménách nepřítomných (transferinový receptor). Gradientový profil calnexinu, membránového proteinu endoplasmatického retikula (Wada a kol., 1991), byl od proteinů plasmatické membrány odlišný a většina tohoto proteinu byla ve vysokohustotních gradientových frakcích 40% sacharosy. Tyto výsledky tak ukazují, že po prosté homogenisaci buněčného materiálu a jeho frakcionaci na hustotním sacharosovém gradientu lze isolovat frakci plasmatických membrán, ale nedojde k oddělení lipidových raftů od okolní plasmatické membrány (obr. 12). Distribuce celkové bílkoviny v gradientech připravených na základě detergentové lyse pomocí různě koncentrovaného Tritonu X-100 nebo jen na základě homogenisace vzorku ukazuje, že čím vyšší je koncentrace použitého Tritonu X-100, tím méně bílkoviny zůstává v gradientových peletech (obr. 13, tab. 1), a zaznamenán byl i efekt detergentu na snížení množství bílkoviny v oblasti 30-35% sacharosy (kde jsou koncentrovány bílkoviny plasmatické membrány), což ukazuje na destruktivní vliv Tritonu na nativní strukturu plasmatické membrány (obr. 13).

Výsledky na buněčných liniích HEK293 exprimujících Flagem značený IP prosthacyklinový receptor tak jasně ukazují význam aplikované metody pro isolaci lipidových raftů, které, jsou-li separovány jako Triton insensitivní membránové domény, neobsahují IP prosthacyklinový receptor a po dlouhodobé hormonální stimulaci v nich specificky klesá množství Gsα proteinu.

Už dříve jsme se zabývali signální dráhou receptoru pro thyreoliberin (TRH-R) a změnami v hladinách Gqα/G11α proteinu při aplikaci hormonu (Pesanova a kol., 1999). Subcelulární redistribuce TRH receptoru a Gqα/G11α proteinu spojené s internalisací popsal Drmota a kol. (Drmota a kol., 1998a; Drmota a kol., 1998b; Drmota a kol., 1999), který vyvinul buněčnou linii HEK293 stabilně exprimující fusní protein mezi antigenní sekvencí

viru vesikulární stomatitidy (VSV), TRH receptorem a zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), tzv. lini VTGP. Přítomnost antigenních motivů ve struktuře fusní bílkoviny VSV-TRH-R-GFP umožnila detekci receptoru pomocí specifických protilátek proti VSV a GFP.

Také v případě VTGP buněk jsme pro isolaci nízkohustotních membránových fragmentů použili tři typy isolace – pomocí 1% Tritonu X-100, 1 M Na_2CO_3 o pH 11 (plus sonikace) a homogenisace. Gradienty homogenisační a alkalické byly podobné, jak bylo patrné už při pohledu na hustotní sacharosové gradienty po centrifugaci, kde opticky densní materiál byl nejvíce lokalisován v oblasti 30-35% sacharosy (frakce 6-8), zatímco po působení Tritonu byl zákal v kyvetách pozorován ve frakcích o nižší koncentraci sacharosy (20-25% sacharosa, frakce 3-5)(obr. 14). Srovnání celkové bílkoviny v gradientových frakcích poskytlo podobný profil jako u FhIPR a FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buněk, s tím, že nejvíce proteinu v gradientových frakcích bylo obsaženo po alkalické extrakci (obr. 15). Gradientová distribuce bílkovin, kdy v oblasti domén je přítomno jen velmi malé množství celkového buněčného proteinu je při isolaci raftů obvyklá (Feron a kol., 1997; Igarashi a Michel, 2000; Becher a kol., 2001; Rybin a kol., 2003). V homogenisačních a alkalických gradientech jsme měřili distribuci Na/K-ATPasy, adenylylcyklasové aktivity, TRH receptoru a β-adrenergních receptorů. TX-100 však ničí vazebné schopnosti některých receptorů (Kalipatnapu a Chattopadhyay, 2005), a tak nebylo možné zjistit distribuci těchto proteinů v tritonových gradientech pomocí vazby radioligandů tak, jako u bezdetergentových extrakcí. U homogenisačního i alkalického gradientu byly v oblasti 30-35% sacharosy lokalisovány veškeré sledované proteiny plasmatické membrány (obr. 16-19), měřené jak vazbou radioligandů, zjištěním adenylylcyklasové aktivity i imunoblotovou analysou. Obecně vyšší vazba radioligandů u alkalických oproti homogenisačním gradientům může souviset s podstatně nižším obsahem proteinu v gradientovém peletu alkalického/sonikačního gradientu, a také odlišnou povahou isolovaných membránových struktur, u kterých mohou být vazebná místa pro radioligandy různě přístupná. Po aplikaci Tritonu X-100 o různých koncentracích (0,1%-1%) došlo k rozdělení frakce membránových proteinů vyskytujících se na rozhraní 30-35% sacharosy do dvou fází – detergent resistentní a detergent solubilní fáze (obr. 20). V sacharose o 20-25% koncentraci se v závislosti na použité koncentraci detergentu vyskytovala podstatná část caveolinu a flotillinu-2/ESA, a menší množství podjednotek trimerních G proteinů (tab. 2), podobně, jak bylo pozorováno na FhIPR a FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buňkách, ale o něco vyšší podíl flotujících proteinů souvisí s téměř dvojnásobným množstvím proteinu dávaným na gradient v případě VTGP buněk, a tedy odlišným poměrem detergent/bílkovina.

Hlavním cílem této části práce však bylo zodpovězení otázky, zda se TRH receptor nalézá v membránových mikrodoménách. Vzhledem k pozměněné schopnosti receptoru vázat hormon po působení Tritonu X-100 jsme nemohli využít vazebné studie radioligandu pro zjištění gradientové distribuce. Nicméně, díky přítomnosti GFP v molekule fusního proteinu, bylo lze zaznamenat endogenní fluorescenci tohoto proteinu, jak je znázorněno na obrázku 21 ve všech třech typech separace nízkohustotních membránových fragmentů. Výsledky u homogenisačního a alkalického/sonikačního gradientu byly víceméně shodné s daty získanými vazbou tritiovaného TRH, ale fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu byla detekována i ve frakcích tritonového gradientu. Tyto údaje pak jasně poukazují na nepřítomnost GFP, a tedy i fusního proteinu s TRH receptorem, v membránových doménách isolovaných jako Triton resistentní membránové mikrodomény a distribuce receptoru byla shodná s distribucí transmembránových proteinů s lipidovými rafty neasociovaných. Také snížení koncentrace Tritonu X-100 nevedlo k výraznému zvýšení množství receptoru detergent resistentní fázi plasmatické membrány, i když určitá míra lokalisace (<10%) byla pozorována (obr. 22, tab. 2). Detekce protilátkami proti GFP i VSV potvrdila tento typ submembránové lokalisace receptoru (obr. 23 a 24), a detekce na imunoblotu rovněž potvrdila výsledky vazby [^{3}H]TRH a GFP fluorescence u homogenisačního a alkalického gradientu (obr. 24). Závěrem k této části práce lze tedy uvést, že ani TRH receptor není přítomen v Triton resistentních membránových doménách, což bylo potvrzeno jak detekcí specifickými protilátkami na imunoblotu, tak endogenní fluorescencí GFP, a také, že homogenisace ani alkalická/sonikační extrakce a následná separace na hustotním sacharosovém gradientu nevedla k isolaci lipidových raftů, protože ve flotujících gradientových frakcích byly kolokalisovány všechny sledované membránové bílkoviny, a nedošlo k jejich rozdělení na s rafty asociovanou a v raftech nepřítomnou frakci. Podobný výsledek, kdy použitá metoda nevedla k oddělení lipidových raftů od většinové membránové fáze je udáván např. při použití Tweenu 20 (Pike a kol., 2005), ale i některými autory u alkalické extrakce (Chini a Parenti, 2004; Kim a kol., 2004).

Srovnání homogenisační, alkalické a tritonové separace nízkohustotních membránových fragmentů pomocí dvourozměrné elektroforesy jsme provedli na buněčné linii HEK293 exprimující potkaní TRH receptor a myší G11α protein a na linii S49 lymfomových buněk. Cílem této části práce bylo zjistit změny v proteinovém složení na sacharosovém gradientu isolovaných nízkodensních membránových struktur po dlouhodobém hormonálním působení. Výsledky znázorněné na obr. 25-27 a v přiložené publikaci (Matousek a kol., 2005) ukazují specifický pokles Gqα/G11α a všech čtyřech isoforem Gsα proteinu jak v lipidových

raftech isolovaných pomocí 1% Tritonu X-100, tak i ve flotujících membránách alkalického a homogenisačního gradientu. Tento pokles byl specifický a týkal se jen těchto G proteinů, změny v hladinách ostatních bílkovin zaznamenány nebyly. Celkový pohled na 2D mapy nízkohustotních frakcí 3-5 (20-30% sacharosa) získaných všemi třemi typy membránové desintegrace však odhaluje rozdíly v jejich složení, což nás opět vedlo k závěru, že tyto tři metody nevedou k isolaci ekvivalentních membránových domén. Nerovnocennost bezdetergentových a tritonové separace domén už byla zmíněna (Eckert a kol., 2003) a analysou na 2D gelech se zabývali Kim a kol. (Kim a kol., 2004), kteří isolovali rafty alkalickou i tritonovou cestou a zjistili, že membrány isolované pomocí vysokého pH obsahovaly daleko více různých proteinů oproti tritonovým doménám a alkalické preparáty také nevykazovaly citlivost k methyl-β-cyklodextrinu a tedy závislost na cholesterolu, která je pro lipidové rafty typická. Kim a kol. tak vyvozují, že alkalické domény obsahují i s rafty neasociované membránové struktury. Detailní analysou proteinového složení alkalických a detergentových struktur bylo také zjištěno, že membránové fragmenty získané po působení silné zásady obsahují dokonce i mitochondriální bílkoviny, které by se vzhledem k lipidovému složení mitochondriálních membrán v raftech vyskytovat neměly (Foster a kol., 2003).

V neposlední řadě jsme se zabývali i membránovou frakcionací přirozené živočišné tkáně, konkrétně kortexu potkaního telencefalonu. Pro vlastní charakterisaci komponent signalisace trimerních G proteinů v detergent resistentních membránových doménách nebyl použit přímo homogenisovaný či lysovaný mozkový kortex, ale isolované plasmatické membrány této tkáně. Pro purifikaci plasmatických membrán byla použita metoda separace na gradientu Percollu podle Rybina a kol. (Rybin a kol., 2000). Plasmatické membrány tak byly isolovány jako horní vrstva po centrifugaci buněčného materiálu (obr. 28), zatímco spodní vrstva odpovídala purifikovaným mitochondriím (obr. 29). Na hustotním sacharosovém gradientu byly následně odděleny nízkohustotní membránové fragmenty (20-25% sacharosa) od vysokohustotních (rozhraní 35-40% sacharosy), které bez aplikace detergentu představovaly směs drobných membránových měchýřků a obsahovaly téměř veškeré množství Na/K-ATPasy detekované vazbou [^{3}H]ouabainu i imunoblotem (obr. 30). Ve frakcích 6-8 byla rovněž přítomna většina imunoblotového signálu caveolinu, Gi1,2α proteinu a adenylylcyklasy I (obr. 31). Také receptory spřažené s trimerními G proteiny – $GABA_B$ receptor a β-adrenergní receptory vykazovaly maximum lokalisace v této oblasti gradientu, měřeno jak vazbou radioligandů, tak detekcí na imunoblotu (obr. 33-35).

Podobně jako na buněčných liniích HEK293, aplikace 1% Tritonu X-100 vedla k rozdělení membránových proteinů kolokalisovaných ve 35-40% sacharose (frakce 6-8) do dvou odlišných fází – lipidových raftů isolovaných jako detergent resistentní membránové domény a fáze detergentem solubilisované. Gradientová distribuce Na/K-ATPasy, caveolinu a Gi1,2α proteinu v tritonovém gradientu (obr. 30 a 31) plně odpovídala našim výsledkům získaným pro tyto bílkoviny na transfekovaných buněčných liniích, jak je popsáno výše. Také jsme zjistili, že v mozku hojná adenylylcyklasa I patří k těm adenylylcyklasám, které jsou s rafty asociovány, tedy podobně jako adenylylcyklasa III, V/VI a VIII (Rybin a kol., 2000; Smith a kol., 2002; Ostrom a kol., 2003). Působení Tritonu X-100 však opět inhibovalo funkční aktivitu adenylylcyklasy i trimerních G proteinů, takže agonistou stimulovaná vazba GTPγS v tritonovém gradientu byla negativně ovlivněna (obr. 32), což potvrzuje nevhodnost Tritonem isolovaných domén pro měření funkční aktivity bílkovin signální dráhy trimerních G proteinů.

Podobně jako v případě TRH receptoru na VTGP buňkách, také vazebné schopnosti β-adrenergních receptorů na mozku potkana byly působením 1% Tritonu X-100 zničeny, a nebylo možné zaznamenat gradientový profil vazby agonisty dihydroalprenololu, ani antagonisty CGP12177 (obr. 33 nahoře). Naproti tomu, $GABA_B$ receptor byl vazbou antagonisty CGP54626A detekovaný ve frakci nízkohustotních membránových domén, což svědčí pro lokalisaci tohoto receptoru v Triton resistentních membránových mikrodoménách. Analysa na imunoblotu (obr. 35) tento výsledek potvrdila s tím, že specifickými protilátkami proti $GABA_B$ receptoru 1 byl detekován receptor (podle relativní molekulové hmotnosti ve formě dimeru) i v detergentem solubilisované fázi plasmatické membrány. Výsledný poměr distribuce tohoto receptoru v raftech a mimo ně přibližně 1:1 pak odpovídal údajům uvedeným v pracích Becher a kol., 2001 a Becher a kol., 2004. Přítomnost více pruhů o různých molekulových hmotnostech na imunoblotu při detekci β-adrenergních receptorů (obr. 34) může souviset jednak s oligomerisací molekul receptorů, a jednak s různě glykosylovanými formami, které se i v rámci jedné tkáně vyskytují, jak ukázali Rybin a kol., kteří detekovali β1-adrenergní receptor jako imunoblotový signál o různých velikostech od 45000 do 150000 (Rybin a kol., 2000). Na základě našich imunoblotů lze soudit, že v námi isolovaných Triton resistentních membránových doménách je přítomna jen malá část celkového membránového β1- i β2- (data neukázána) adrenergního receptoru, kdežto většina je přítomna v detergentem rozpuštěné fázi plasmatické membrány. Ačkoliv se tyto výsledky zdají být v rozporu s většinou literárních údajů o výskytu β-adrenergních receptorů v lipidových raftech, většinou isolovaných alkalickou preparací (Schwencke a kol., 1999a;

Rybin a kol., 2000; Ostrom a kol., 2001), tak např. jen velmi malá část celkového množství β2-adrenergního receptoru byla zaznamenána v Tritonem isolovaných membránových doménách Allenem a kol., kteří navíc zaznamenali jeho další úbytek v doménách po hormonální stimulaci (Allen a kol., 2005). Podobně jako u jiných bílkovin, i ve sledování distribuce β-adrenergních receptorů je tedy nutné zvážit užitou metodu pro isolaci nízkohustotních membránových fragmentů a následnou interpretaci získaných dat.

Protože funkční aktivita trimerních G proteinů nebyla v tritonových gradientech měřitelná, pokusili jsme se nalézt takový detergent, který by poskytl nízkohustotní membránové fragmenty, kde jsou vazebné schopnosti receptoru a funkční spřažení s trimerním G proteinem zachovány. Zvolili jsme jeden z mírněji působících detergentů Brij, konkrétně Brij 58, jehož schopnost zachovat rafty poměrně bohaté na různé bílkoviny i lipidy byla opakovaně pozorována (Roepstorff a kol., 2002; Schuck a kol., 2003; Magnani a kol., 2004). Srovnáním baclofenem stimulované vysokoafinní GTPasové aktivity Giα/Goα proteinů v homogenisačním a různě koncentrovaných detergentových gradientech získaných lysí plasmatických membrán potkaního kortexu pomocí Brije 58 jsme zjistili, že na mozku tento detergent poskytuje separované membránové fragmenty o nízké vznášivé hustotě, u kterých je zachována funkční aktivita G proteinů (obr. 36). Se vzrůstající koncentrací Brije 58 byly separovány fragmenty o snižující se vznášivé hustotě, jak je patrno z průběhu celkové bílkoviny měřené v jednotlivých gradientových frakcích (obr. 36 dole a obr. 37), ale tento efekt byl spojen i s postupnou inhibicí GTPasové aktivity, a tak v hustotních sacharosových gradientech připravených z lysátu obsahujícím 0,1% Brij 58 stimulace funkční aktivity trimerních G proteinů už nebyla zaznamenána. Na druhou stranu, kromě inhibičního vlivu více koncentrovaného Brije, v určitém rozmezí poměru detergent/bílkovina byl zaznamenán i vliv stimulační (obr. 38), kdy při 0,05-0,1% koncentraci Brije 58 ve vzorcích na Percollu isolovaných plasmatických membrán byla oproti vzorkům bez detergentu měřena agonistou stimulovaná aktivita G proteinu až pětkrát vyšší. Tento efekt Brije 58 jsme pozorovali i na buněčných liniích, a možná isolace lipidových raftů, ve kterých bude zachováno funkční spřažení mezi receptorem a následnými signálními proteiny i pomocí Brije 58, by měla být předmětem našeho dalšího zájmu.

Závěr

Tato práce se zabývala organisačním vztahem signalisace trimerních G proteinů a membránových mikrodomén, jakožto struktur plasmatické membrány charakterisovaných specifickým lipidovým a proteinovým složením a nízkou vznášivou hustotou při centrifugaci na hustotním sacharosovém gradientu. Pro isolaci membránových domén byla vyvinuta řada různých technik, nejčastěji založených na působení slabých neiontových detergentů, z bezdetergentových postupů je nejvýznamnější alkalická extrakce pomocí 1M Na_2CO_3.

V nízkohustotních membránových fragmentech isolovaných pomocí lyse Tritonem X-100, alkalickou extrakcí či homogenisací jsme sledovali distribuci trimerních G proteinů, četných s rafty asociovaných GPI vázaných proteinů, caveolinu, flotillinu-2/ESA a proteinů v raftech nepřítomných, transmembránových MHC I, Na/K-ATPasy, transferinového receptoru aj. Na buněčných liniích HEK293 exprimujících lidský IP prosthacyklinový receptor a fusní protein mezi tímto receptorem a Gsα proteinem (linie FhIPR a FhIPR-Gsα) a potkaní TRH receptor ve formě fusního proteinu s antigenní sekvencí VSV a zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) (linie VTGP) jsme isolovali membránové domény jako Triton resistentní membránovou frakci, zatímco homogenisace či alkalická extrakce obvykle vedly k isolaci fragmentů víceméně odpovídajících plasmatické membráně, jak bylo patrné z gradientových profilů analysovaných membránových bílkovin. Bezdetergentové frakcionace tak nevedly k oddělení lipidových raftů od většinové fáze plasmatické membrány. Na základě extrakce domén pomocí Tritonu X-100 jsme v příslušných lipidových raftech lokalisovali frakci trimerních G proteinů, přičemž v závislosti na typu G proteinu bylo v membránových doménách přítomno přibližně 20-50% jejich celkového buněčného množství. Na liniích FhIPR a FhIPR-Gsα byl rovněž sledován vliv hormonálního působení, které vedlo ke specifickému úbytku příslušného G proteinu Gsα v separovaných detergent resistentních membránových doménách. Pokles Gsα po stimulaci isoprenalinem v S49 lymfomových buňkách a Gqα/G11α po stimulaci TRH na HEK293 buňkách exprimujících exogenní potkaní TRH receptor a myší G11α protein zjištěný analysou na 2D elektroforese byl rovněž specifický a nebyl doprovázen změnami v hladinách dalších sledovaných proteinů.

Hlavním cílem této práce bylo zjištění míry výskytu receptorů spřažených s trimerními G proteiny v membránových mikrodoménách. V námi isolovaných Triton resistentních doménách bohatých na raftové proteiny caveolin, flotillin, alkalickou fosfatasu aj. jsme

detekcí na imunoblotu pomocí specifických protilátek proti Flag, Gsα, VSV a GFP či pomocí fluorescence GFP zjistili jen minimální množství sledovaných receptorů FhIPR, FhIPR-Gsα a VSV-TRH-R-GFP. Podobný výsledek byl zaznamenán na plasmatických membránách kortexu koncového mozku potkana i pro β-adrenergní receptory, které rovněž většinu svého výskytu soustředí do většinové, detergentem rozpustné fáze membrány. Naproti tomu, v lipidových raftech isolovaných 1% Tritonem X-100 byla na této tkáni shledána podstatná část (1/2) celkového množství $GABA_B$ receptoru, což svědčí pro odlišnou preferenci různých receptorů pro lipidové rafty.

Nežádoucím následkem působení 1% Tritonu X-100 bylo poškození vazebných míst receptorů a zablokování funkčního spřažení s G proteiny, takže Triton resistentní domény se pro vazebné studie a měření funkční aktivity ukázaly jako nevhodné. Pokusili jsme se proto hledat takové podmínky isolace membránových domén, kde by funkční aktivita trimerních G proteinů zůstala zachována. Jako nadějný se ukázal Brij 58, který při nízkých koncentracích (0,025-0,05%) funkční aktivitu G proteinů zachoval, ale vlastní povaha jím isolovaných membránových struktur by měla být ještě dále analysována. V budoucnosti je tedy třeba pokračovat v hledání optimálních podmínek pro isolaci in vivo existujících lipidových raftů a zjistit reálné míry výskytu a vzájemné poměry signálních bílkovin a také případné změny po hormonálním působení, pokud možno se zachováním funkčních aktivit receptorů i G proteinů.

Seznam použité literatury

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

Alfalah, M., Wetzel, G., Fischer, I., Busche, R., Sterchi, E.E., Zimmer, K.P., Sallmann, H.P. and Naim, H.Y. (2005). A novel type of detergent-resistant membranes may contribute to an early protein sorting event in epithelial cells. ***J Biol Chem*** 280(52): 42636-42643.

Allen, J.A., Yu, J.Z., Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (2005). Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells. ***Mol Pharmacol*** 67(5): 1493-1504.

Anderson, L., Alexander, C.L., Faccenda, E. and Eidne, K.A. (1995). Rapid desensitization of the thyrotropin-releasing hormone receptor expressed in single human embryonal kidney 293 cells. ***Biochem J*** 311 (Pt 2): 385-392.

Anderson, R.G. (1993). Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. ***Trends Cell Biol*** 3(3): 69-72.

Arshavsky, V.Y., Lamb, T.D. and Pugh, E.N., Jr. (2002). G proteins and phototransduction. ***Annu Rev Physiol*** 64: 153-187.

Baldwin, J.M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. ***Embo J*** 12(4): 1693-1703.

Baldwin, J.M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. ***Curr Opin Cell Biol*** 6(2): 180-190.

Becher, A., Green, A., Ige, A.O., Wise, A., White, J.H. and McIlhinney, R.A. (2004). Ectopically expressed gamma-aminobutyric acid receptor B is functionally down-regulated in isolated lipid raft-enriched membranes. ***Biochem Biophys Res Commun*** 321(4): 981-987.

Becher, A., White, J.H. and McIlhinney, R.A. (2001). The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. ***J Neurochem*** 79(4): 787-795.

Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P. and Lodish, H.F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. ***J Biol Chem*** 272(21): 13793-13802.

Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. ***Biochim Biophys Acta*** 1031(2): 163-224.

Blin, N., Yun, J. and Wess, J. (1995). Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. ***J Biol Chem*** 270(30): 17741-17748.

Bourne, H.R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. ***Curr Opin Cell Biol*** 9(2): 134-142.

Bowery, N.G. and Smart, T.G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. ***Br J Pharmacol*** 147 Suppl 1: S109-119.

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

Burgueno, J., Enrich, C., Canela, E.I., Mallol, J., Lluis, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003). Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. ***J Neurochem*** 86(4): 785-791.

Carman, C.V. and Benovic, J.L. (1998). G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. ***Curr Opin Neurobiol*** 8(3): 335-344.

Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. ***Cell*** 80(2): 259-268.

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(4): 631-641.

Cooper, D.M. (2005). Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. ***Biochem Soc Trans*** 33(Pt 6): 1319-1322.

Cordeaux, Y. and Hill, S.J. (2002). Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors. ***Neurosignals*** 11(1): 45-57.

Crossthwaite, A.J., Seebacher, T., Masada, N., Ciruela, A., Dufraux, K., Schultz, J.E. and Cooper, D.M. (2005). The cytosolic domains of Ca2+-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. ***J Biol Chem*** 280(8): 6380-6391.

Dalskov, S.M., Immerdal, L., Niels-Christiansen, L.L., Hansen, G.H., Schousboe, A. and Danielsen, E.M. (2005). Lipid raft localization of GABA A receptor and Na+, K+-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells. ***Neurochem Int*** 46(6): 489-499.

de Weerd, W.F. and Leeb-Lundberg, L.M. (1997). Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. ***J Biol Chem*** 272(28): 17858-17866.

Deckert, M., Ticchioni, M. and Bernard, A. (1996). Endocytosis of GPI-anchored proteins in human lymphocytes: role of glycolipid-based domains, actin cytoskeleton, and protein kinases. ***J Cell Biol*** 133(4): 791-799.

Degtyarev, M.Y., Spiegel, A.M. and Jones, T.L. (1993). Increased palmitoylation of the Gs protein alpha subunit after activation by the beta-adrenergic receptor or cholera toxin. ***J Biol Chem*** 268(32): 23769-23772.

DeChatelet, L.R. and Cooper, M.R. (1970). A modified procedure for the determination of leukocyte alkaline phosphatase. ***Biochem Med*** 4(1): 61-68.

Devi, L.A. (2001). Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. ***Trends Pharmacol Sci*** 22(10): 532-537.

Divecha, N. and Irvine, R.F. (1995). Phospholipid signaling. ***Cell*** 80(2): 269-278.

Drmota, T., Gould, G.W. and Milligan, G. (1998a). Real time visualization of agonist-mediated redistribution and internalization of a green fluorescent protein-tagged form of the thyrotropin-releasing hormone receptor. ***J Biol Chem*** 273(37): 24000-24008.

Drmota, T., Novotny, J., Gould, G.W., Svoboda, P. and Milligan, G. (1999). Visualization of distinct patterns of subcellular redistribution of the thyrotropin-releasing hormone receptor-1 and gqalpha /G11alpha induced by agonist stimulation. ***Biochem J*** 340 (Pt 2): 529-538.

Drmota, T., Novotny, J., Kim, G.D., Eidne, K.A., Milligan, G. and Svoboda, P. (1998b). Agonist-induced internalization of the G protein G11alpha and thyrotropin-releasing hormone receptors proceed on different time scales. ***J Biol Chem*** 273(34): 21699-21707.

Eckert, G.P., Igbavboa, U., Muller, W.E. and Wood, W.G. (2003). Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. ***Brain Res*** 962(1-2): 144-150.

Escriche, M., Burgueno, J., Ciruela, F., Canela, E.I., Mallol, J., Enrich, C., Lluis, C. and Franco, R. (2003). Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine

receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. ***Exp Cell Res*** 285(1): 72-90.

Exton, J.H. (1994). Messenger molecules derived from membrane lipids. ***Curr Opin Cell Biol*** 6(2): 226-229.

Feron, O., Smith, T.W., Michel, T. and Kelly, R.A. (1997). Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. ***J Biol Chem*** 272(28): 17744-17748.

Fong, C.W., Bahia, D.S., Rees, S. and Milligan, G. (1998). Selective activation of a chimeric Gi1/Gs G protein alpha subunit by the human IP prostanoid receptor: analysis using agonist stimulation of high affinity GTPase activity and [35S]guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding. ***Mol Pharmacol*** 54(2): 249-257.

Fong, C.W. and Milligan, G. (1999). Analysis of agonist function at fusion proteins between the IP prostanoid receptor and cognate, unnatural and chimaeric G-proteins. ***Biochem J*** 342 (Pt 2): 457-463.

Foster, L.J., De Hoog, C.L. and Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 100(10): 5813-5818.

Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R.G. (1994). Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. ***J Biol Chem*** 269(49): 30745-30748.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G. and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. ***Mol Pharmacol*** 63(6): 1256-1272.

Galbiati, F., Volonte, D., Meani, D., Milligan, G., Lublin, D.M., Lisanti, M.P. and Parenti, M. (1999). The dually acylated NH2-terminal domain of gi1alpha is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein alpha subunits in vivo. ***J Biol Chem*** 274(9): 5843-5850.

Gierschik, P., Moghtader, R., Straub, C., Dieterich, K. and Jakobs, K.H. (1991). Signal amplification in HL-60 granulocytes. Evidence that the chemotactic peptide receptor catalytically activates guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in native plasma membranes. ***Eur J Biochem*** 197(3): 725-732.

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

Gorodinsky, A. and Harris, D.A. (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. ***J Cell Biol*** 129(3): 619-627.

Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M. and Chini, B. (2002). Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. ***Oncogene*** 21(11): 1658-1667.

Hamm, H.E. and Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. ***Curr Opin Cell Biol*** 8(2): 189-196.

Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Murray, F., Swaney, J.S., Niesman, I.R., Farquhar, M.G. and Insel, P.A. (2006). Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. ***J Biol Chem*** 281(36): 26391-26399.

Held-Feindt, J., Krisch, B., Forstreuter, F. and Mentlein, R. (2000). Somatostatin receptors in gliomas. ***J Physiol Paris*** 94(3-4): 251-258.

Hildebrandt, J.D. (1997). Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. ***Biochem Pharmacol*** 54(3): 325-339.

Hogger, P., Shockley, M.S., Lameh, J. and Sadee, W. (1995). Activating and inactivating mutations in N- and C-terminal i3 loop junctions of muscarinic acetylcholine Hm1 receptors. ***J Biol Chem*** 270(13): 7405-7410.

Hollinger, S. and Hepler, J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. ***Pharmacol Rev*** 54(3): 527-559.

Horejsi, V., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P. and Drbal, K. (1998). Signal transduction in leucocytes via GPI-anchored proteins: an experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function? ***Immunol Lett*** 63(2): 63-73.

Horejsi, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P. and Stockinger, H. (1999). GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. ***Immunol Today*** 20(8): 356-361.

Howlett, A.C. (2004). Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. ***Br J Pharmacol*** 142(8): 1209-1218.

Huang, C., Hepler, J.R., Chen, L.T., Gilman, A.G., Anderson, R.G. and Mumby, S.M. (1997). Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. ***Mol Biol Cell*** 8(12): 2365-2378.

Hur, E.M. and Kim, K.T. (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. ***Cell Signal*** 14(5): 397-405.

Hur, E.M., Park, Y.S., Lee, B.D., Jang, I.H., Kim, H.S., Kim, T.D., Suh, P.G., Ryu, S.H. and Kim, K.T. (2004). Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. ***J Biol Chem*** 279(7): 5852-5860.

Chamberlain, L.H. and Gould, G.W. (2002). The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. ***J Biol Chem*** 277(51): 49750-49754.

Chini, B. and Parenti, M. (2004). G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? ***J Mol Endocrinol*** 32(2): 325-338.

Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P. and Lodish, H.F. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 91(24): 11728-11732.

Igarashi, J. and Michel, T. (2000). Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. ***J Biol Chem*** 275(41): 32363-32370.

Iiri, T., Backlund, P.S., Jr., Jones, T.L., Wedegaertner, P.B. and Bourne, H.R. (1996). Reciprocal regulation of Gs alpha by palmitate and the beta gamma subunit. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 93(25): 14592-14597.

Insel, P.A., Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Bundey, R.A. and Swaney, J.S. (2005). Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. ***Biochem Soc Trans*** 33(Pt 5): 1131-1134.

Jacobson, K. and Dietrich, C. (1999). Looking at lipid rafts? ***Trends Cell Biol*** 9(3): 87-91.

Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1997). Receptor-regulated ion channels. ***Curr Opin Cell Biol*** 9(2): 155-160.

Jiao, X., Zhang, N., Xu, X., Oppenheim, J.J. and Jin, T. (2005). Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling. ***Mol Cell Biol*** 25(13): 5752-5762.

Kalipatnapu, S. and Chattopadhyay, A. (2005). Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin 1A receptors. ***IUBMB Life*** 57(7): 505-512.

Kallal, L., Gagnon, A.W., Penn, R.B. and Benovic, J.L. (1998). Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. ***J Biol Chem*** 273(1): 322-328.

Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. and Bettler, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. ***Nature*** 396(6712): 683-687.

Kawabe, J., Okumura, S., Nathanson, M.A., Hasebe, N. and Ishikawa, Y. (2006). Caveolin regulates microtubule polymerization in the vascular smooth muscle cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 342(1): 164-169.

Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. and Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. ***Annu Rev Biochem*** 60: 349-400.

Kim, K.B., Kim, S.I., Choo, H.J., Kim, J.H. and Ko, Y.G. (2004). Two-dimensional electrophoretic analysis reveals that lipid rafts are intact at physiological temperature. ***Proteomics*** 4(11): 3527-3535.

Kroeger, K.M., Hanyaloglu, A.C., Seeber, R.M., Miles, L.E. and Eidne, K.A. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. ***J Biol Chem*** 276(16): 12736-12743.

Lasley, R.D., Narayan, P., Uittenbogaard, A. and Smart, E.J. (2000). Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae. ***J Biol Chem*** 275(6): 4417-4421.

Lasley, R.D. and Smart, E.J. (2001). Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. ***Trends Cardiovasc Med*** 11(7): 259-263.

Lavoie, C., Mercier, J.F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.R., Zhu, W.Z., Xiao, R.P., Lakatta, E.G., Bouvier, M. and Hebert, T.E. (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. ***J Biol Chem*** 277(38): 35402-35410.

le Maire, M., Champeil, P. and Moller, J.V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. ***Biochim Biophys Acta*** 1508(1-2): 86-111.

Le, P.U. and Nabi, I.R. (2003). Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. ***J Cell Sci*** 116(Pt 6): 1059-1071.

Lee, T.W., Seifert, R., Guan, X. and Kobilka, B.K. (1999). Restricting the mobility of Gs alpha: impact on receptor and effector coupling. ***Biochemistry*** 38(42): 13801-13809.

Lei, Y., Hagen, G.M., Smith, S.M., Barisas, B.G. and Roess, D.A. (2005). Chimeric GnRH-LH receptors and LH receptors lacking C-terminus palmitoylation sites do not localize to plasma membrane rafts. ***Biochem Biophys Res Commun*** 337(2): 430-434.

Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J.E., Hansen, S.H., Nishimoto, I. and Lisanti, M.P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. ***J Biol Chem*** 270(26): 15693-15701.

Lim, K.I. and Yin, J. (2005). Localization of receptors in lipid rafts can inhibit signal transduction. ***Biotechnol Bioeng*** 90(6): 694-702.

Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Tang, Z. and Sargiacomo, M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. ***Trends Cell Biol*** 4(7): 231-235.

Lowes, V.L., Ip, N.Y. and Wong, Y.H. (2002). Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. ***Neurosignals*** 11(1): 5-19.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. ***J Biol Chem*** 193(1): 265-275.

Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. ***J Cell Sci*** 115(Pt 3): 455-465.

Magnani, F., Tate, C.G., Wynne, S., Williams, C. and Haase, J. (2004). Partitioning of the serotonin transporter into lipid microdomains modulates transport of serotonin. ***J Biol Chem*** 279(37): 38770-38778.

Matousek, P., Novotny, J., Rudajev, V. and 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(1): 21-40.

Matousek, P., Novotny, J. and Svoboda, P. (2004). Resolution of G(s)alpha and G(q)alpha/G(11)alpha proteins in membrane domains by two-dimensional electrophoresis: the effect of long-term agonist stimulation. ***Physiol Res*** 53(3): 295-303.

McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A.J. and Milligan, G. (2001). Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta - opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. ***J Biol Chem*** 276(17): 14092-14099.

Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. and Bouvier, M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. ***J Biol Chem*** 277(47): 44925-44931.

Milligan, G. (2004). G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. ***Mol Pharmacol*** 66(1): 1-7.

Milligan, G., Ramsay, D., Pascal, G. and Carrillo, J.J. (2003). GPCR dimerisation. ***Life Sci*** 74(2-3): 181-188.

Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H. and Bouvier, M. (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. ***Embo J*** 12(1): 349-356.

Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. and Kurzchalia, T.V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. ***Mol Biol Cell*** 6(7): 911-927.

Moravcova, Z., Rudajev, V., Stohr, J., Novotny, J., Cerny, J., Parenti, M., Milligan, G. and Svoboda, P. (2004). Long-term agonist stimulation of IP prostanoid receptor depletes the cognate G(s)alpha protein in membrane domains but does not change the receptor level. ***Biochim Biophys Acta*** 1691(1): 51-65.

Morris, A.J. and Malbon, C.C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. ***Physiol Rev*** 79(4): 1373-1430.

Morris, J.B., Huynh, H., Vasilevski, O. and Woodcock, E.A. (2006). Alpha1-adrenergic receptor signaling is localized to caveolae in neonatal rat cardiomyocytes. ***J Mol Cell Cardiol*** 41(1): 17-25.

Mukherjee, A., Arnaud, L. and Cooper, J.A. (2003). Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. ***J Biol Chem*** 278(42): 40806-40814.

Mullaney, I., Dodd, M.W., Buckley, N. and Milligan, G. (1993). Agonist activation of transfected human M1 muscarinic acetylcholine receptors in CHO cells results in down-regulation of both the receptor and the alpha subunit of the G-protein Gq. ***Biochem J*** 289 (Pt 1): 125-131.

Murthy, K.S. and Makhlouf, G.M. (2000). Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. ***J Biol Chem*** 275(39): 30211-30219.

Navratil, A.M., Bliss, S.P., Berghorn, K.A., Haughian, J.M., Farmerie, T.A., Graham, J.K., Clay, C.M. and Roberson, M.S. (2003). Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. ***J Biol Chem*** 278(34): 31593-31602.

Nebl, T., Pestonjamasp, K.N., Leszyk, J.D., Crowley, J.L., Oh, S.W. and Luna, E.J. (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. ***J Biol Chem*** 277(45): 43399-43409.

Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. ***Cell*** 80(2): 249-257.

Negishi, M., Hashimoto, H. and Ichikawa, A. (1992). Translocation of alpha subunits of stimulatory guanine nucleotide-binding proteins through stimulation of the prostacyclin receptor in mouse mastocytoma cells. ***J Biol Chem*** 267(4): 2364-2369.

Neubig, R.R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. ***Faseb J*** 8(12): 939-946.

Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Luers, G., Stuermer, C.A., Herzog, V. and Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. ***Biochem J*** 378(Pt 2): 509-518.

Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. ***Curr Opin Cell Biol*** 9(2): 161-167.

Nimchinsky, E.A., Hof, P.R., Janssen, W.G., Morrison, J.H. and Schmauss, C. (1997). Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. ***J Biol Chem*** 272(46): 29229-29237.

Oh, P. and Schnitzer, J.E. (2001). Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. ***Mol Biol Cell*** 12(3): 685-698.

Ostrom, R.S., Gregorian, C., Drenan, R.M., Xiang, Y., Regan, J.W. and Insel, P.A. (2001). Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. ***J Biol Chem*** 276(45): 42063-42069.

Ostrom, R.S., Liu, X., Head, B.P., Gregorian, C., Seasholtz, T.M. and Insel, P.A. (2002). Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. ***Mol Pharmacol*** 62(5): 983-992.

Ostrom, R.S., Naugle, J.E., Hase, M., Gregorian, C., Swaney, J.S., Insel, P.A., Brunton, L.L. and Meszaros, J.G. (2003). Angiotensin II enhances adenylyl cyclase signaling via Ca2+/calmodulin. Gq-Gs cross-talk regulates collagen production in cardiac fibroblasts. ***J Biol Chem*** 278(27): 24461-24468.

Parton, R.G. (1996). Caveolae and caveolins. ***Curr Opin Cell Biol*** 8(4): 542-548.

Perez, D.M., Hwa, J., Gaivin, R., Mathur, M., Brown, F. and Graham, R.M. (1996). Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. ***Mol Pharmacol*** 49(1): 112-122.

Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M. and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. ***J Biol Chem*** 280(11): 9895-9903.

Pesanova, Z., Novotny, J., Cerny, J., Milligan, G. and Svoboda, P. (1999). Thyrotropin-releasing hormone-induced depletion of G(q)alpha/G(11)alpha proteins from detergent-insensitive membrane domains. ***FEBS Lett*** 464(1-2): 35-40.

Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 3(9): 639-650.

Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. ***J Lipid Res*** 44(4): 655-667.

Pike, L.J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. ***Biochem J*** 378(Pt 2): 281-292.

Pike, L.J., Han, X. and Gross, R.W. (2005). Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. ***J Biol Chem*** 280(29): 26796-26804.

Pol, A., Lu, A., Pons, M., Peiro, S. and Enrich, C. (2000). Epidermal growth factor-mediated caveolin recruitment to early endosomes and MAPK activation. Role of cholesterol and actin cytoskeleton. ***J Biol Chem*** 275(39): 30566-30572.

Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C. and Parton, R.G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. ***Mol Biol Cell*** 16(4): 2091-2105.

Post, S.R., Hilal-Dandan, R., Urasawa, K., Brunton, L.L. and Insel, P.A. (1995). Quantification of signalling components and amplification in the beta-adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes. ***Biochem J*** 311 (Pt 1): 75-80.

Quinton, T.M., Kim, S., Jin, J. and Kunapuli, S.P. (2005). Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y12 receptor during ADP-mediated platelet activation. ***J Thromb Haemost*** 3(5): 1036-1041.

Radeva, G. and Sharom, F.J. (2004). Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. ***Biochem J*** 380(Pt 1): 219-230.

Ransnas, L.A. and Insel, P.A. (1988). Quantitation of the guanine nucleotide binding regulatory protein Gs in S49 cell membranes using antipeptide antibodies to alpha s. ***J Biol Chem*** 263(19): 9482-9485.

Ransnas, L.A., Svoboda, P., Jasper, J.R. and Insel, P.A. (1989). Stimulation of beta-adrenergic receptors of S49 lymphoma cells redistributes the alpha subunit of the stimulatory G protein between cytosol and membranes. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 86(20): 7900-7903.

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

Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K. and van Deurs, B. (2002). Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. ***J Biol Chem*** 277(21): 18954-18960.

Rudajev, V., Novotny, J., Hejnova, L., Milligan, G. and Svoboda, P. (2005). Dominant portion of thyrotropin-releasing hormone receptor is excluded from lipid domains. Detergent-resistant and detergent-sensitive pools of TRH receptor and Gqalpha/G11alpha protein. ***J Biochem (Tokyo)*** 138(2): 111-125.

Rybin, V.O., Pak, E., Alcott, S. and Steinberg, S.F. (2003). Developmental changes in beta2-adrenergic receptor signaling in ventricular myocytes: the role of Gi proteins and caveolae microdomains. ***Mol Pharmacol*** 63(6): 1338-1348.

Rybin, V.O., Xu, X., Lisanti, M.P. and Steinberg, S.F. (2000). Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. ***J Biol Chem*** 275(52): 41447-41457.

Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D.R. and Marceau, F. (2002). Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. ***Mol Pharmacol*** 61(3): 546-553.

Shaul, P.W. and Anderson, R.G. (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. ***Am J Physiol*** 275(5 Pt 1): L843-851.

Scheiffele, P., Roth, M.G. and Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. ***Embo J*** 16(18): 5501-5508.

Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P. and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific

expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. ***J Biol Chem*** 272(46): 29337-29346.

Schnitzer, J.E., McIntosh, D.P., Dvorak, A.M., Liu, J. and Oh, P. (1995). Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. ***Science*** 269(5229): 1435-1439.

Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. and Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 100(10): 5795-5800.

Schwencke, C., Okumura, S., Yamamoto, M., Geng, Y.J. and Ishikawa, Y. (1999a). Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. ***J Cell Biochem*** 75(1): 64-72.

Schwencke, C., Yamamoto, M., Okumura, S., Toya, Y., Kim, S.J. and Ishikawa, Y. (1999b). Compartmentation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in caveolae. ***Mol Endocrinol*** 13(7): 1061-1070.

Simon, M.I., Strathmann, M.P. and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. ***Science*** 252(5007): 802-808.

Simonds, W.F. (1999). G protein regulation of adenylate cyclase. ***Trends Pharmacol Sci*** 20(2): 66-73.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. ***Nature*** 387(6633): 569-572.

Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. ***Science*** 175(23): 720-731.

Smith, K.E., Gu, C., Fagan, K.A., Hu, B. and Cooper, D.M. (2002). Residence of adenylyl cyclase type 8 in caveolae is necessary but not sufficient for regulation by capacitative Ca(2+) entry. ***J Biol Chem*** 277(8): 6025-6031.

Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M. and Lisanti, M.P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. ***J Biol Chem*** 271(16): 9690-9697.

Song, K.S., Tang, Z., Li, S. and Lisanti, M.P. (1997). Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. ***J Biol Chem*** 272(7): 4398-4403.

Stahlhut, M. and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. ***Mol Biol Cell*** 11(1): 325-337.

Svoboda, P., Kim, G.D., Grassie, M.A., Eidne, K.A. and Milligan, G. (1996). Thyrotropin-releasing hormone-induced subcellular redistribution and down-regulation of G11alpha: analysis of agonist regulation of coexpressed G11alpha species variants. ***Mol Pharmacol*** 49(4): 646-655.

Svoboda, P. and Milligan, G. (1994). Agonist-induced transfer of the alpha subunits of the guanine-nucleotide-binding regulatory proteins Gq and G11 and of muscarinic m1 acetylcholine receptors from plasma membranes to a light-vesicular membrane fraction. ***Eur J Biochem*** 224(2): 455-462.

Svoboda, P. and Novotny, J. (2002). Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. ***Cell Mol Life Sci*** 59(3): 501-512.

Toker, A. (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. ***Curr Opin Cell Biol*** 10(2): 254-261.

Tolbert, L.M. and Lameh, J. (1996). Human muscarinic cholinergic receptor Hm1 internalizes via clathrin-coated vesicles. ***J Biol Chem*** 271(29): 17335-17342.

Vanhaesebroeck, B., Leevers, S.J., Panayotou, G. and Waterfield, M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. ***Trends Biochem Sci*** 22(7): 267-272.

Venkatesan, S., Rose, J.J., Lodge, R., Murphy, P.M. and Foley, J.F. (2003). Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. ***Mol Biol Cell*** 14(8): 3305-3324.

Verkleij, A.J. and Post, J.A. (2000). Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. ***J Membr Biol*** 178(1): 1-10.

Volonte, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T. and Lisanti, M.P. (1999). Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. ***J Biol Chem*** 274(18): 12702-12709.

Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J., 2nd, Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. ***J Biol Chem*** 266(29): 19599-19610.

Wang, J., Gunning, W., Kelley, K.M. and Ratnam, M. (2002). Evidence for segregation of heterologous GPI-anchored proteins into separate lipid rafts within the plasma membrane. ***J Membr Biol*** 189(1): 35-43.

Way, M. and Parton, R.G. (1996). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. ***FEBS Lett*** 378(1): 108-112.

Wedegaertner, P.B. and Bourne, H.R. (1994). Activation and depalmitoylation of Gs alpha. ***Cell*** 77(7): 1063-1070.

Weerth, S.H., Holtzclaw, L.A. and Russell, J.T. (2006). Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca(2+) wave propagation in glial cells. ***Cell Calcium***: v tisku.

Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. ***Faseb J*** 11(5): 346-354.

White, A.A. (1974). Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. ***Methods Enzymol*** 38: 41-46.

Wise, A., Parenti, M. and Milligan, G. (1997). Interaction of the G-protein G11alpha with receptors and phosphoinositidase C: the contribution of G-protein palmitoylation and membrane association. ***FEBS Lett*** 407(3): 257-260.

Wyse, B.D., Prior, I.A., Qian, H., Morrow, I.C., Nixon, S., Muncke, C., Kurzchalia, T.V., Thomas, W.G., Parton, R.G. and Hancock, J.F. (2003). Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. ***J Biol Chem*** 278(26): 23738-23746.

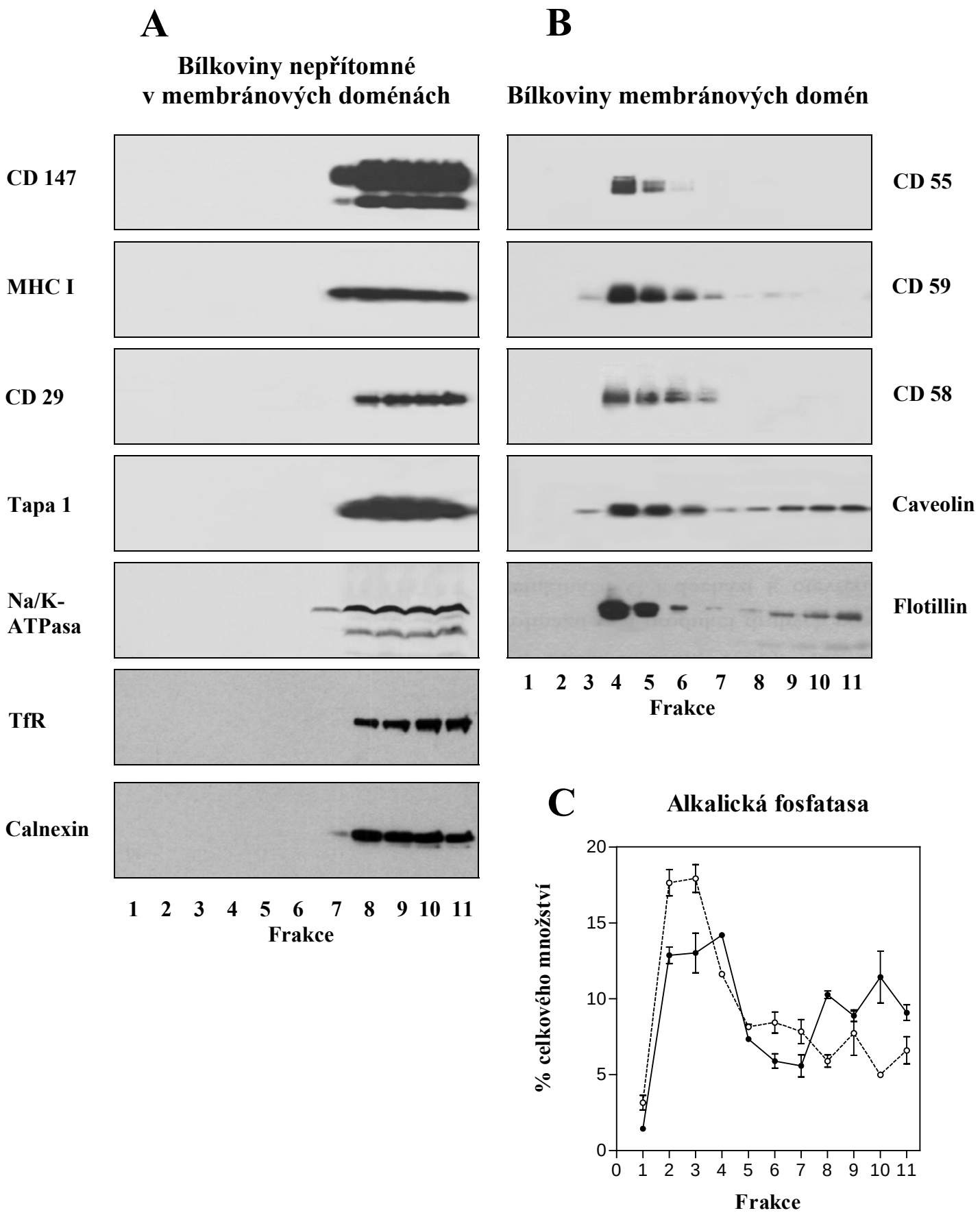
Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G. and Ferguson, S.S. (1999). Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. ***J Biol Chem*** 274(16): 10999-11006.

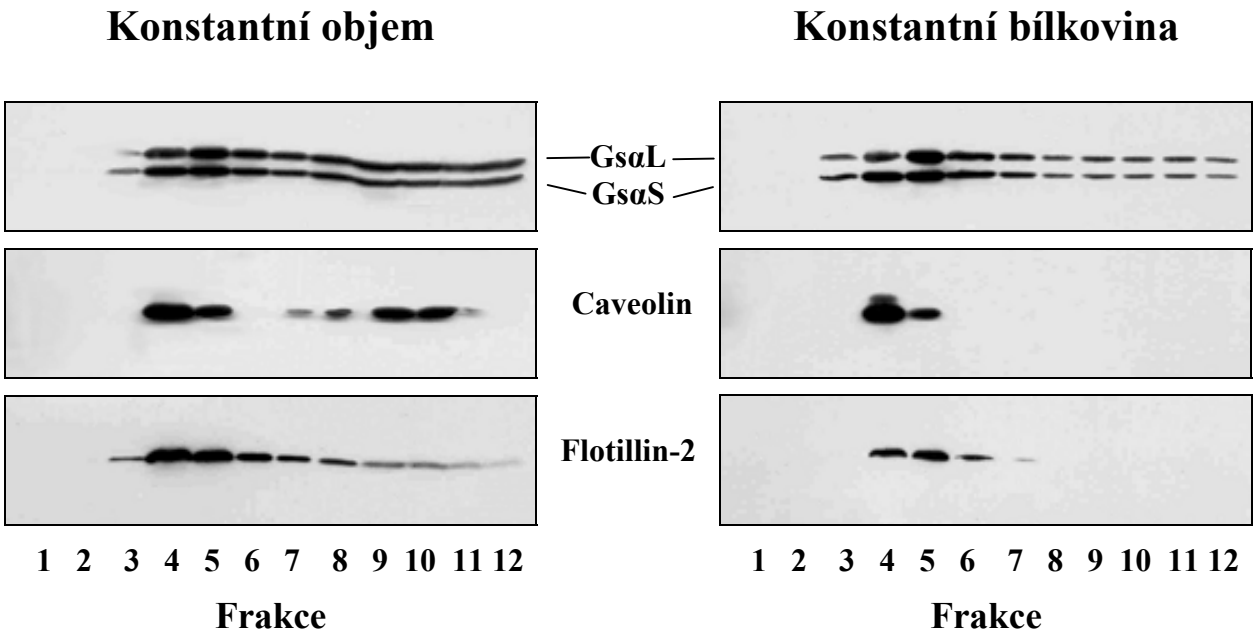
Zhang, L., Bastepe, M., Juppner, H. and Ruan, K.H. (2006). Characterization of the molecular mechanisms of the coupling between intracellular loops of prostacyclin receptor with the C-terminal domain of the Galphas protein in human coronary artery smooth muscle cells. ***Arch Biochem Biophys*** 454(1): 80-88.

Zhu, S.Z., Wang, S.Z., Hu, J. and el-Fakahany, E.E. (1994). An arginine residue conserved in most G protein-coupled receptors is essential for the function of the m1 muscarinic receptor. ***Mol Pharmacol*** 45(3): 517-523.

Příloha I – OBRÁZKY

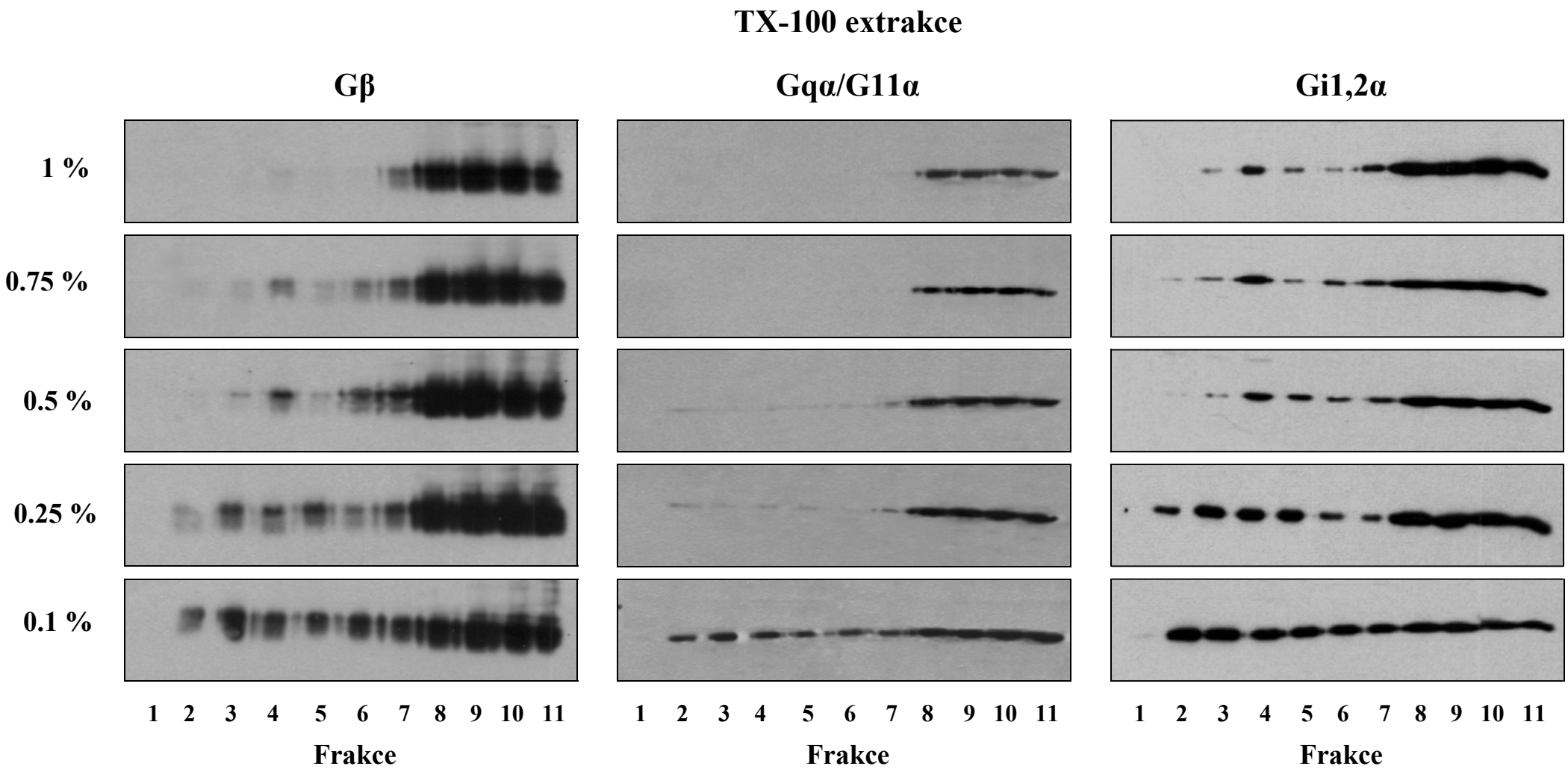
Obr. 1 *(násl. strana)* Distribuce bílkovin plasmatické membrány v diskontinuitním sacharosovém gradientu (15/20/25/30/35/40% sacharosa) po extrakci 1% Tritonem X-100. Na SDS-PAGE bylo nanášeno 24 µl každé frakce (18 µl frakce + 6 µl SLB) HEK293 buněk. Analysována byla distribuce transmembránových bílkovin CD 147 (M6), MHC I, CD 29 (β1 integrin), Tapa 1, Na/K-ATPasy, transferinového receptoru (TfR) a calnexinu coby proteinů v detergent resistentních doménách nepřítomných (**A**) a GPI vázaných CD 55 (complement decay accelerating factor), CD 59 (complement protectin) a CD 58 (LFA-3), caveolinu a flotillinu-2/ESA jakožto proteinů s lipidovými rafty asociovaných (**B**). Profil aktivity alkalické fosfatasy byl měřen ve 100 µl každé frakce v gradientech FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buněk za použití 1% (–●–) a 0,1% (···○···) TX-100 (**C**).

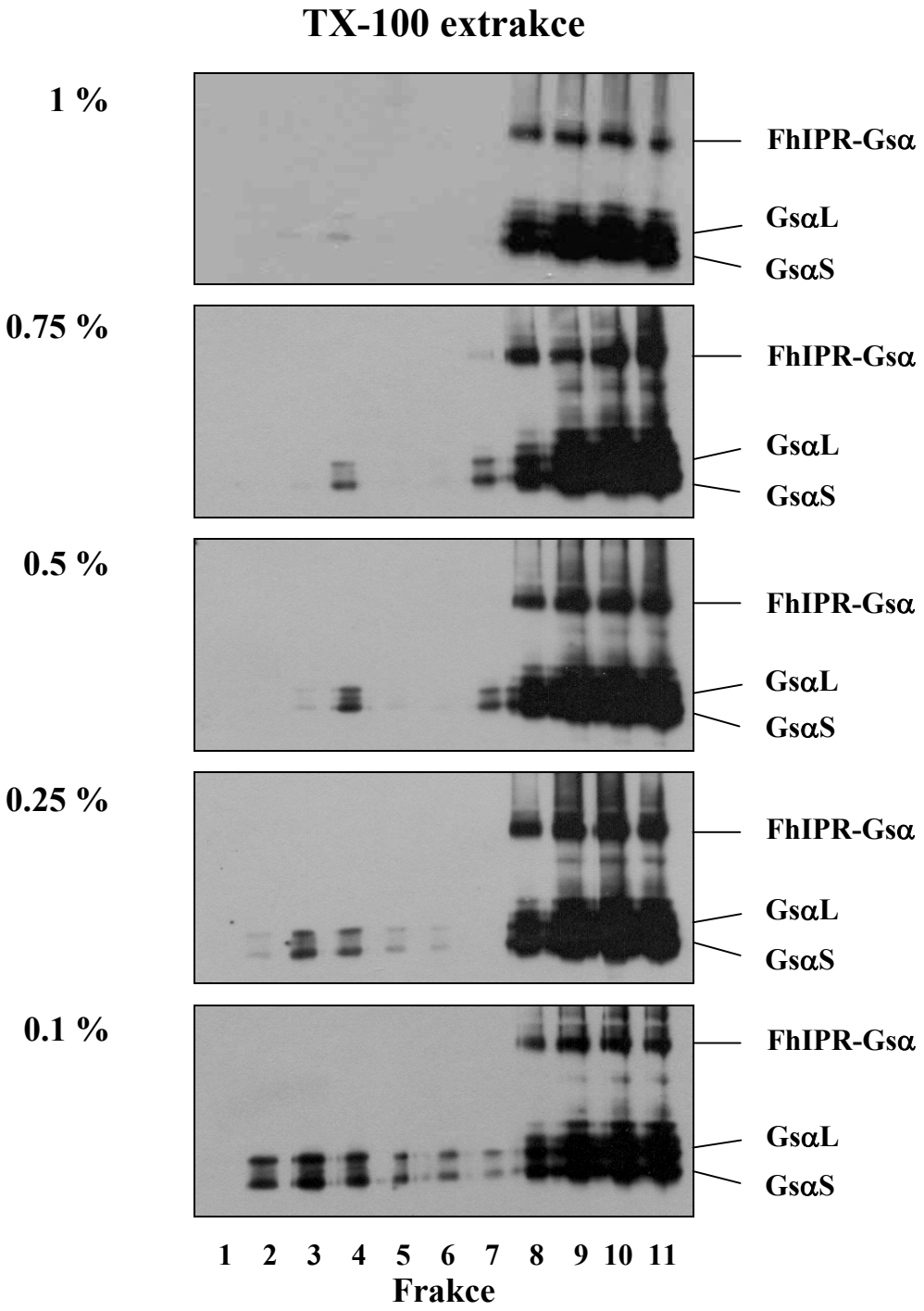

A
Bílkoviny nepřítomné v membránových doménách
CD 147
MHC I
CD 29
Tapa 1
Na/K-ATPasa
TfR
Calnexin
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Frakce
B
Bílkoviny membránových domén
CD 55
CD 59
CD 58
Caveolin
Flotillin
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Frakce
C
Alkalická fosfatasa
% celkového množství
0
5
10
15
20
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Frakce



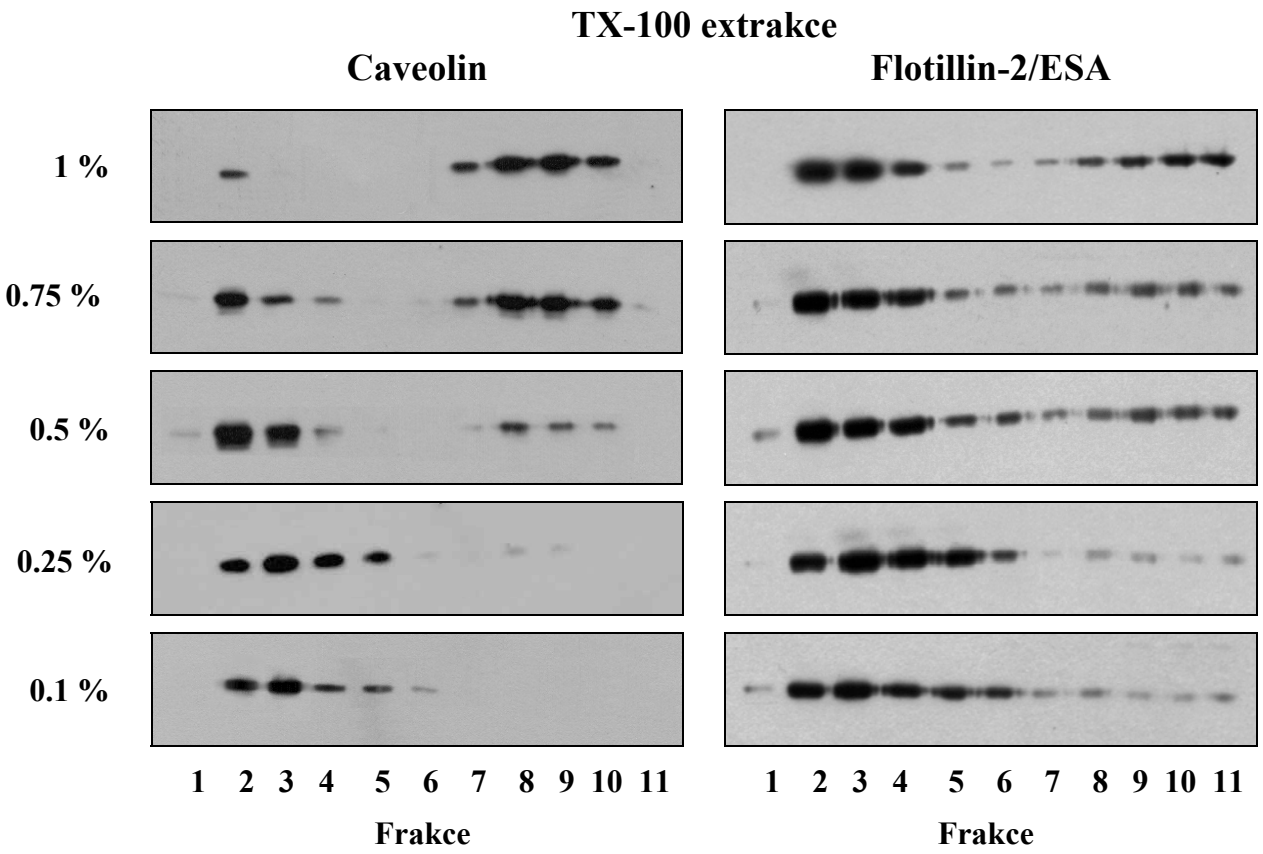
Obr. 2 Porovnání gradientových profilů při nanášení konstantního objemu frakce (75 μl každé frakce – levý sloupec) a konstantní bílkoviny (15 μg každé frakce – pravý sloupec). Na imunoblotu byla analysována distribuce G proteinů GsαL a GsαS, caveolinu a flotillinu-2/ESA v gradientech HEK293 buněk exprimujících fusní protein mezi TRH receptorem a GFP po extrakci 1% Tritonem X-100.

Obr. 3 *(násl. strana)* Distribuce podjednotek trimerních G proteinů Gβ, Gqα/G11α a Gi1,2α ve frakcích flotačního sacharosového gradientu po působení různě koncentrovaného (1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% a 0,1% - shora dolů) Tritonu X-100. Analysovány byly vzorky HEK293 buněk exprimujících fusní protein IP prosthacyklinového receptoru, Gsα proteinu a antigenní sekvence Flag. Na SDS-PAGE bylo nanášeno 24 μl každé frakce.

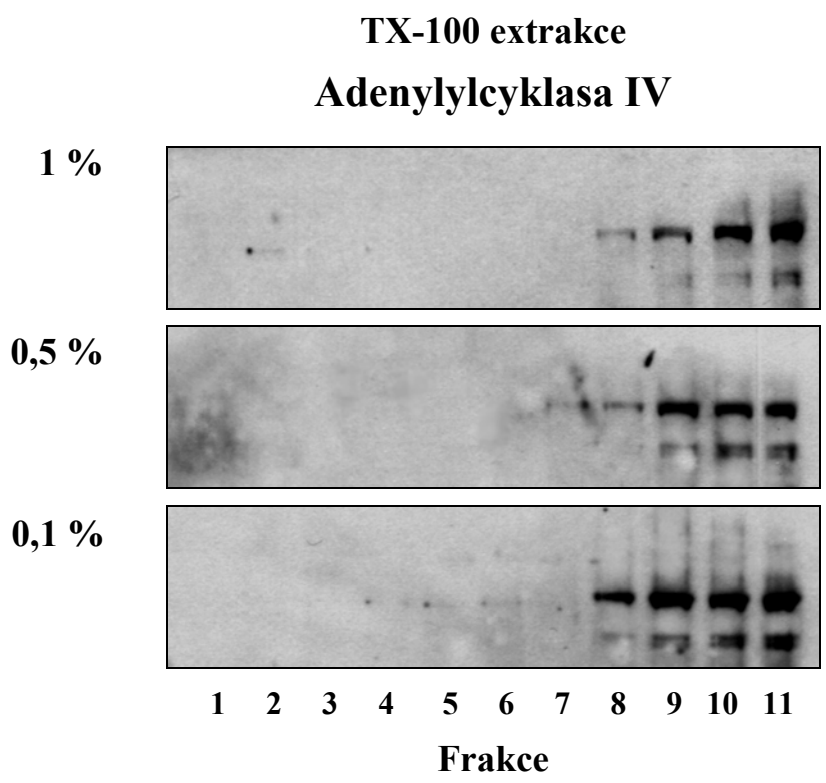

TX-100 extrakce
Gβ
Gqα/G11α
Gi1,2α
1 %
0.75 %
0.5 %
0.25 %
0.1 %
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Frakce
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Frakce
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Frakce



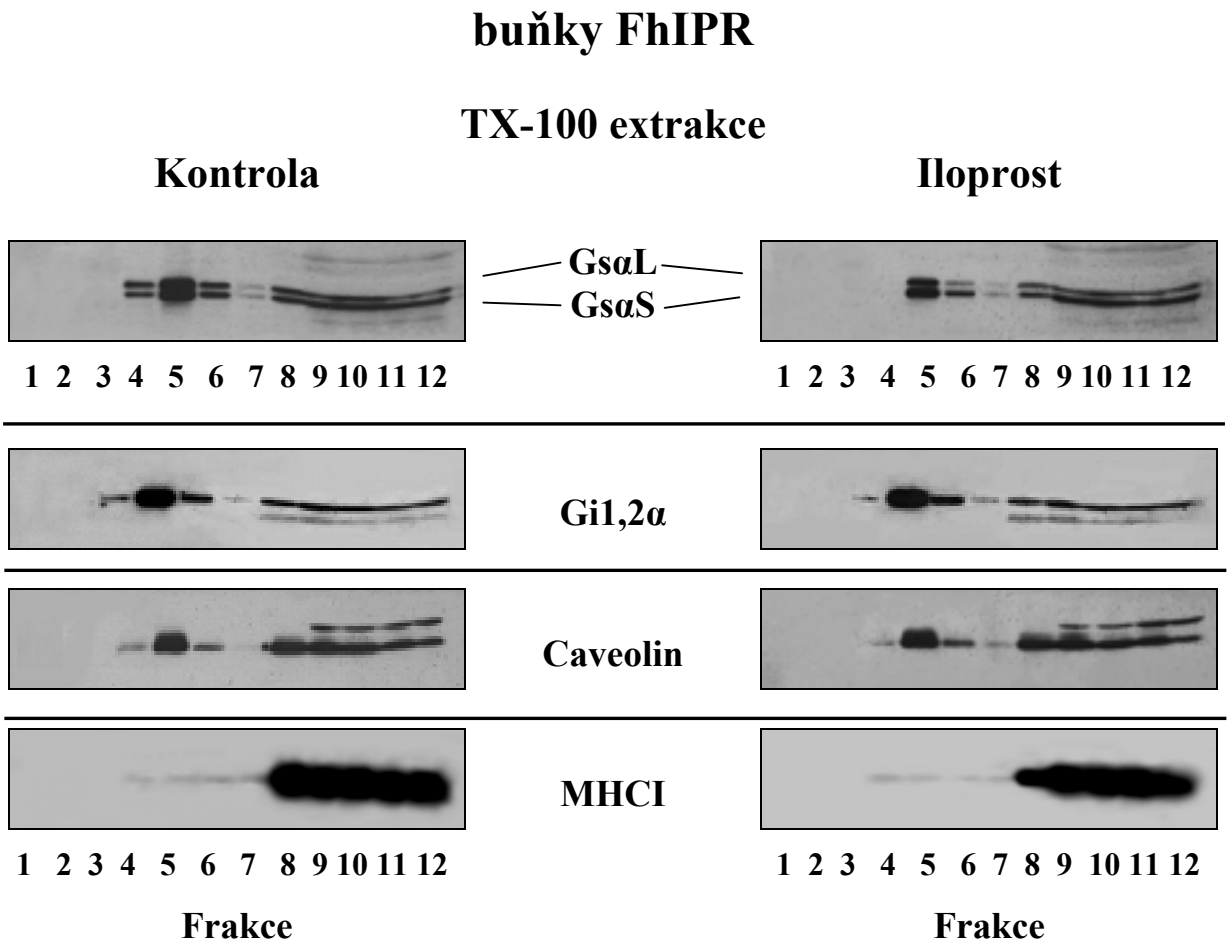
Obr. 4 Gradientové profily GsαL, GsαS a Flagem značeného fusního proteinu IP prosthacyklinového receptoru a Gsα (FhIPR-Gsα). Porovnáno bylo pět koncentrací Tritonu X-100 (1%-0,1%, shora dolů) použitého pro isolaci detergent resistentních membránových domén. Na elektroforesu bylo nanášeno 24 µl gradientových frakcí.



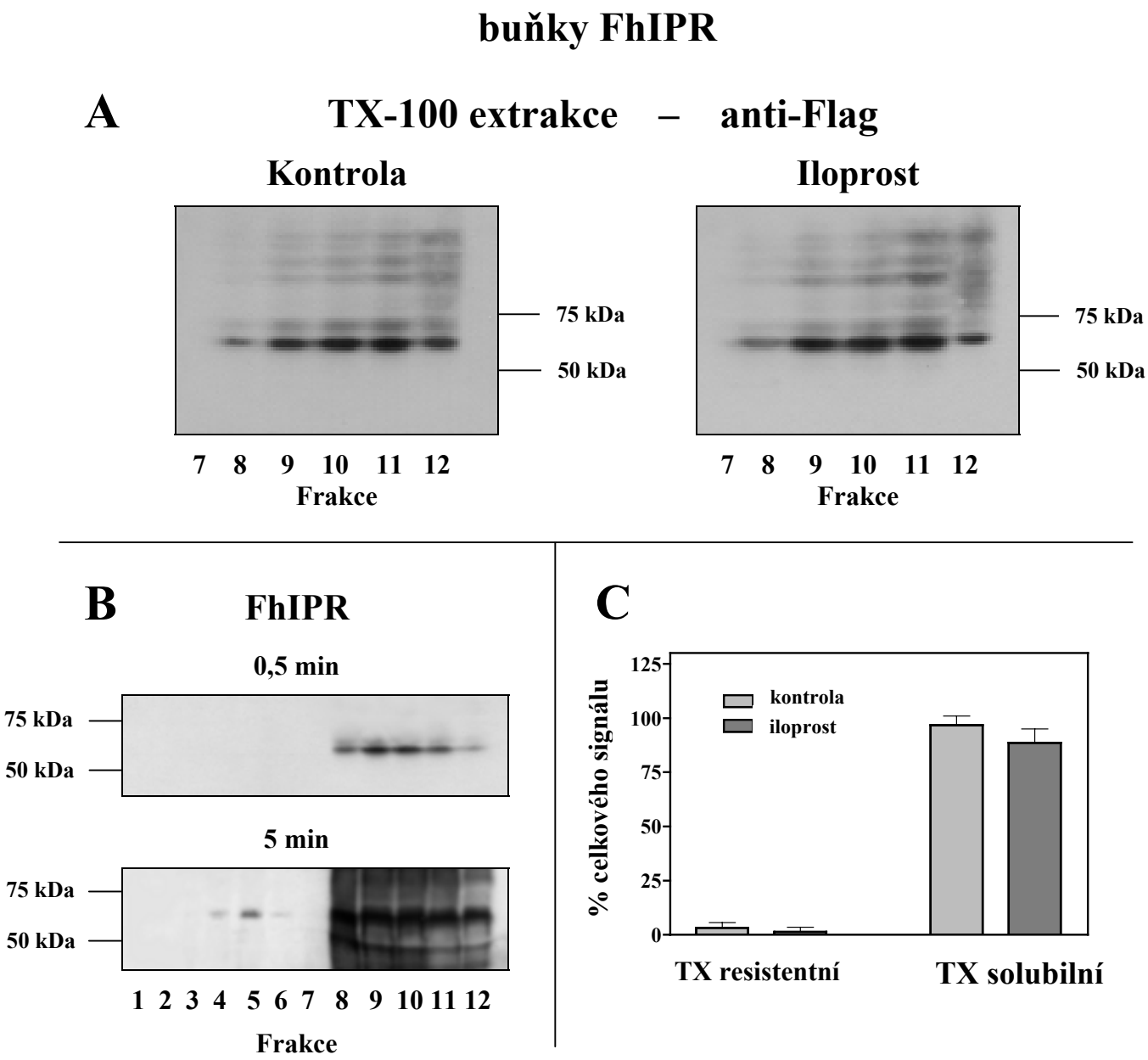
Obr. 5 Analysa působení různě koncentrovaného detergentu (Tritonu X-100) na průběh gradientové distribuce s rafty asociovaných proteinů caveolinu (vlevo) a flotillinu-2/ESA (vpravo). Buňky HEK293 exprimující Flagem značený fusní protein mezi IP prosthacyklinovým receptorem a Gsα proteinem byly lysovány 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% a 0,1% Tritonem X-100 (shora dolů). Z každé frakce byl pro SDS-PAGE použit konstantní objem 24 μl.



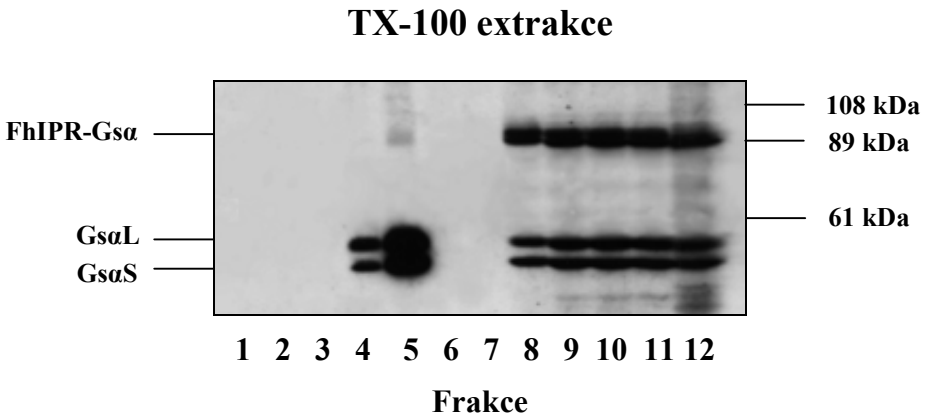
Obr. 6 Distribuce adenylylcyklasy IV v gradientech isolovaných Tritonem X-100 za použití různých jeho koncentrací (1%, 0,5% a 0,1%, shora dolů) v HEK293 buňkách exprimujících Flagem značený fusní protein mezi IP prosthacyklinovým receptorem a Gsα. Pro elektroforetickou a imunoblotovou analysu použito 24 μl gradientových frakcí.



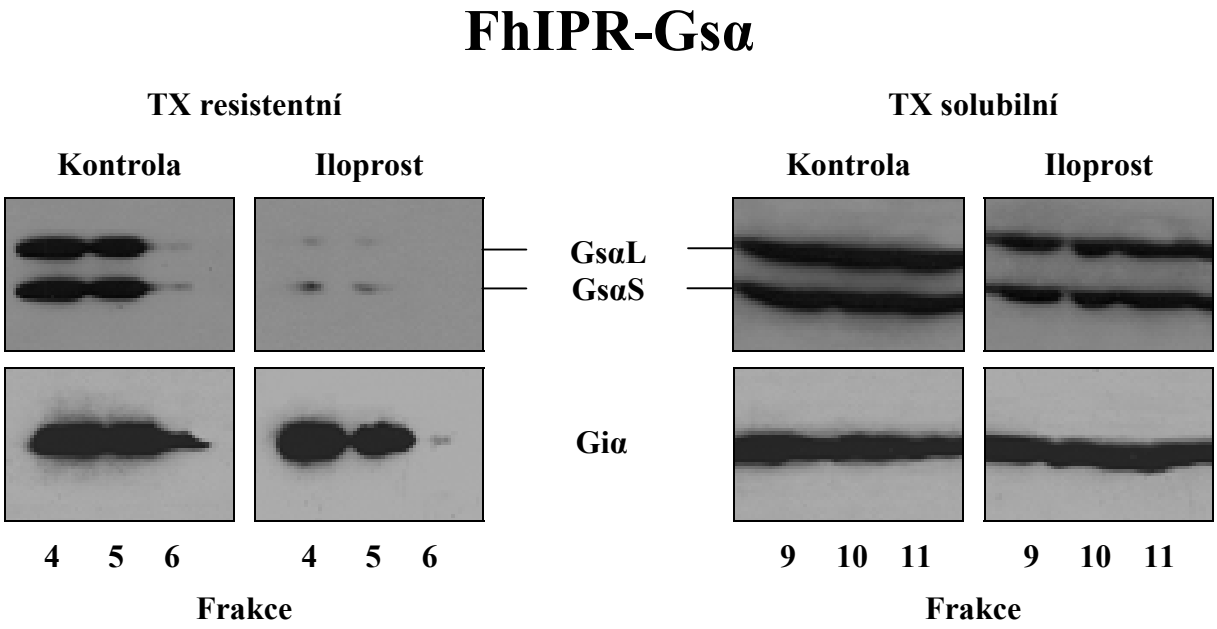
Obr. 7 Působení iloprostu (1 μM, 2 h) na HEK293 buňky exprimující Flagem značený IP prosthacyklinový receptor (FhIPR buňky). V gradientech získaných po lysi 1% Tritonem X-100 byl sledován pokles GsαL i GsαS ve frakcích 4-6 odpovídajících membránovým doménám (nahoře). Gradientový profil Gi1,2α, caveolinu a MHCI se po působení hormonu neměnil (uprostřed a dole).



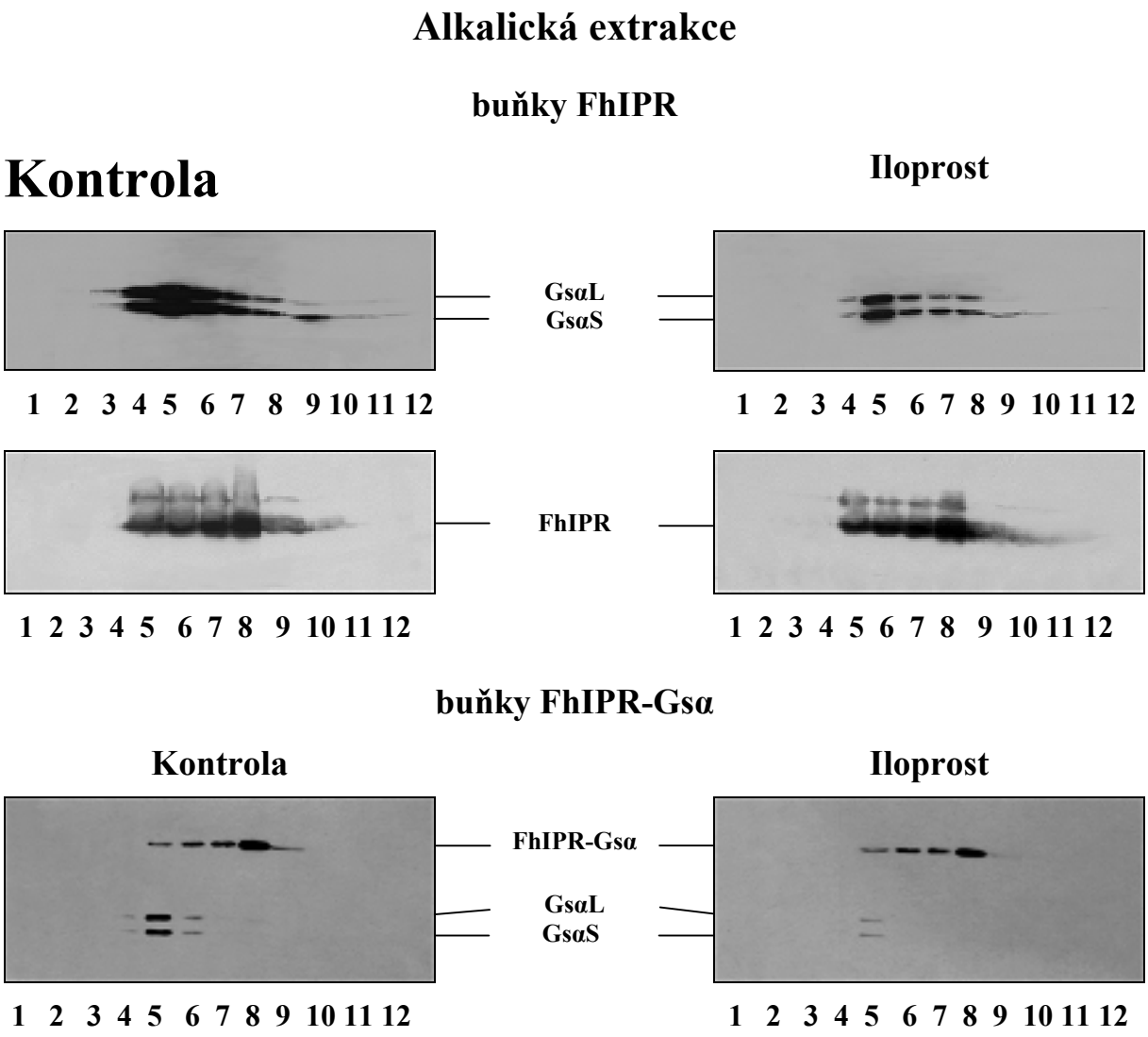
Obr. 8 Detekce Flagem značeného IP prosthacyklinového receptoru (FhIPR) protilátkami anti-Flag v gradientových frakcích (1% Triton X-100). A – lokalisace FhIPR ve vysokohustotních frakcích 8-12 (40% sacharosa) před (kontrola – vlevo) a po hormonálním působení (1 μM iloprost, 2 h, na obrázku vpravo), B - distribuce FhIPR ve všech gradientových frakcích při různě dlouhé exposici filmu (ECL). Při 0,5 min vystavení filmu byl imunoblotový signál receptoru jen ve vysokohustotních frakcích 8-12 (B-nahoře), při delší exposici (5 min, B-dole) byl velmi malý signál zaznamenán i v nízkohustotních frakcích 4-5 (5/35% sacharosa). C – znázornění lokalisace FhIPR v TX-100 resistentní (frakce 4-6) a TX-100 solubilní (fr. 9-12) fázi plasmatické membrány před a po působení iloprostu.



Obr. 9 Gradientová distribuce GsαL, GsαS a FhIPR-Gsα detekovaná protilátkami proti Gsα na jednom imunoblotu. Pro separaci detergent resistentních membránových mikrodomén byl aplikován 1% Triton X-100.

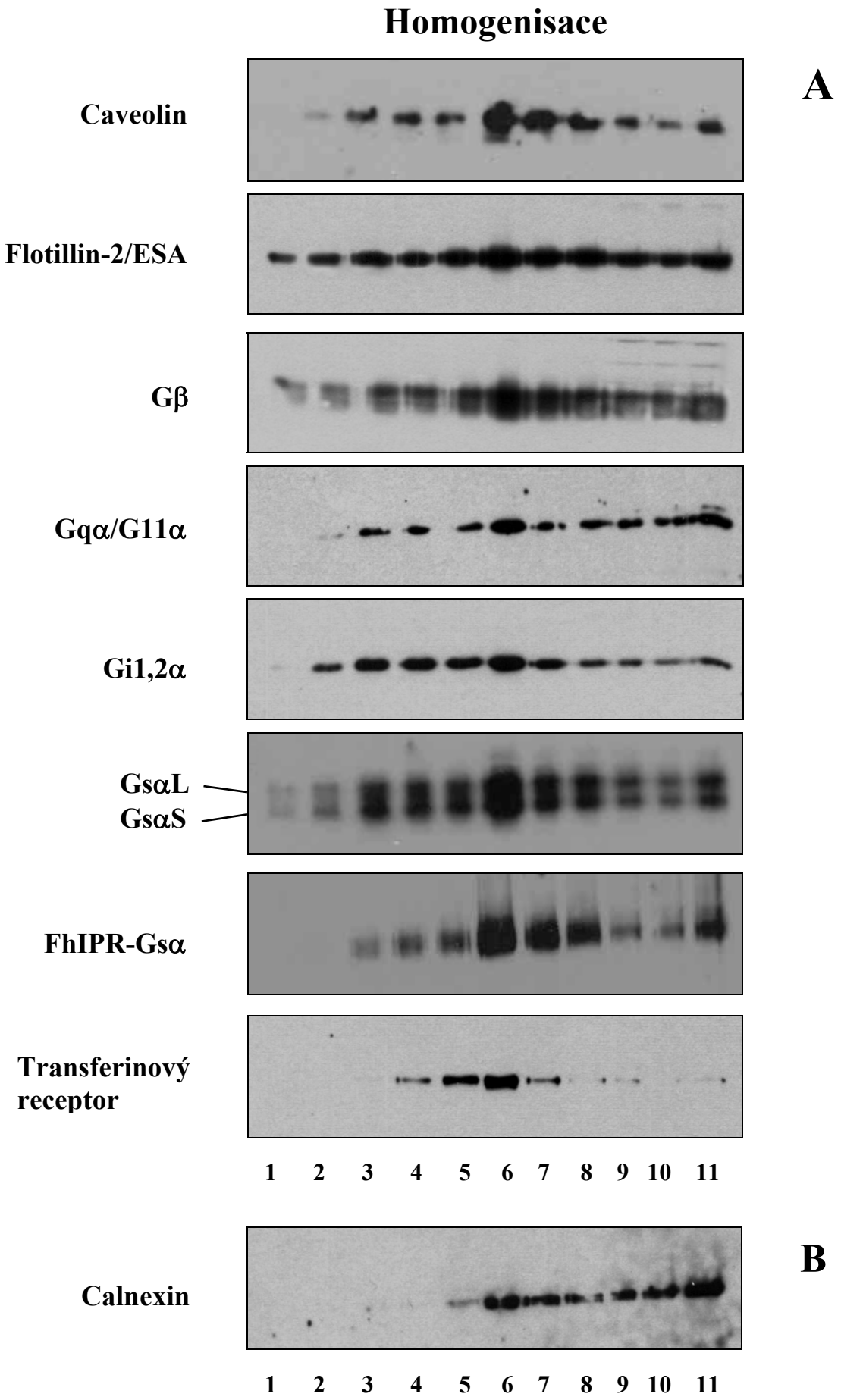


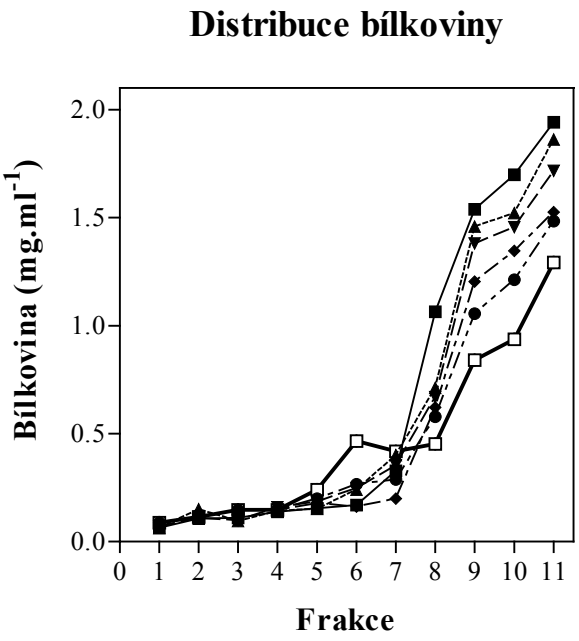
Obr. 10 Srovnání nízko- (4-6) a vysokohustotních (9-11) frakcí flotačního sacharosového gradientu FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buněk po působení 1 μM iloprostu (2 h). V TX-100 resistentních frakcích 4-6 byl zachycen výrazný pokles v množství GsαL i GsαS, který nebyl doprovázen poklesem Gi1,2α proteinu (vlevo). Mírnější snížení Gsα proteinu bylo zaznamenáno i v TX-100 solubilní membránové fázi (fr. 9-11, obr. vpravo), hladina Gi1,2α zůstala opět nezměněna.



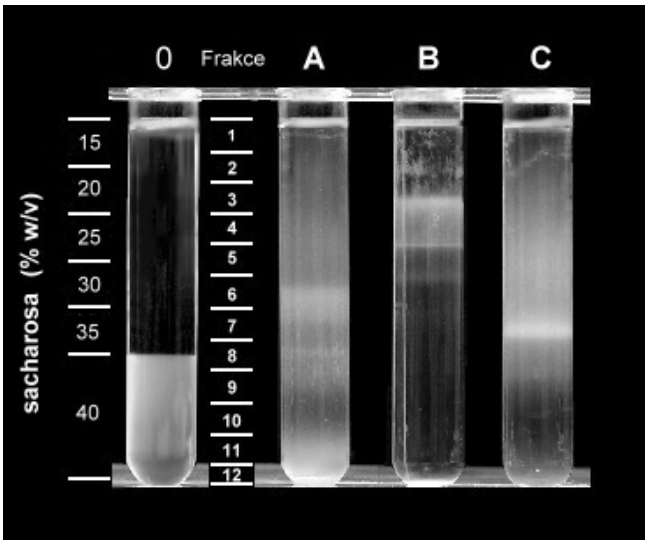
Obr. 11 Distribuce GsαL, GsαS, FhIPR a FhIPR-Gsα před a po hormonálním působení (1 μM iloprost, 2 h) v gradientech HEK293 buněk exprimujících FhIPR (nahoře) a FhIPR-Gsα (dole). Lipidové rafty byly isolované alkalickou extrakcí. GsαL, GsαS a FhIPR-Gsα byly na imunoblotu detekovány protilátkami proti Gsα, FhIPR byl detekován protilátkami proti antigenní sekvenci Flag.

Obr. 12 *(násl. strana)* Kolokalisace proteinů plasmatické membrány a endoplasmatického retikula na sacharosových gradientech získaných z homogenátu HEK293 buněk exprimujících FhIPR-Gsα. **A** – Bílkoviny plasmatické membrány caveolin, flotillin-2/ESA, Gβ, Gqα/G11α, Gi1,2α, GsαL, GsαS, FhIPR-Gsα a transferinový receptor byly přítomny především v oblasti 30-35% sacharosy (fr. 5-7). **B** – protein endoplasmatického retikula calnexin byl v homogenisačním gradientu lokalisován především ve vysokohustotních frakcích 6-11.

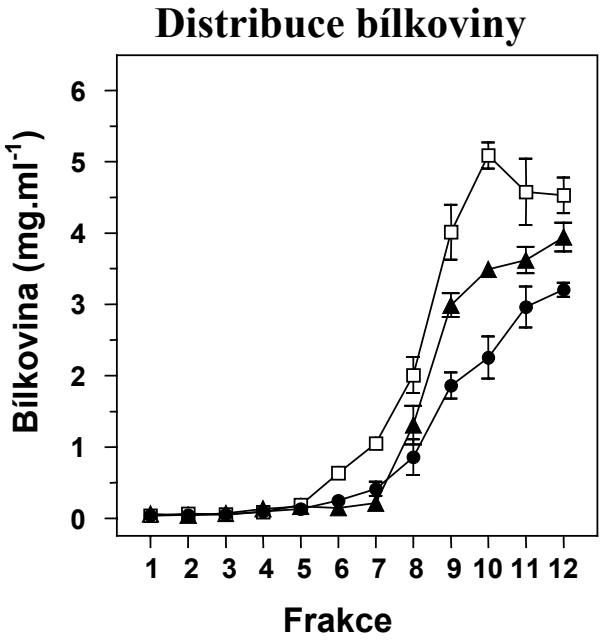

Homogenisace
A
Caveolin
Flotillin-2/ESA
Gβ
Gqα/G11α
Gi1,2α
GsαL
GsαS
FhIPR-Gsα
Transferinový receptor
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
B
Calnexin
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Obr. 13 Distribuce celkové bílkoviny v gradientových frakcích FhIPR-Gsα exprimujících HEK293 buněk. Porovnány jsou gradienty tritonové – 1% (■), 0,75% (▲), 0,5% (▼), 0,25% (♦), 0,1% (●) – a homogenisační (□). Na všechny gradienty bylo nanášeno 12 mg proteinu a rozdílné koncentrace Tritonu X-100 představují odlišné poměry detergent/bílkovina.

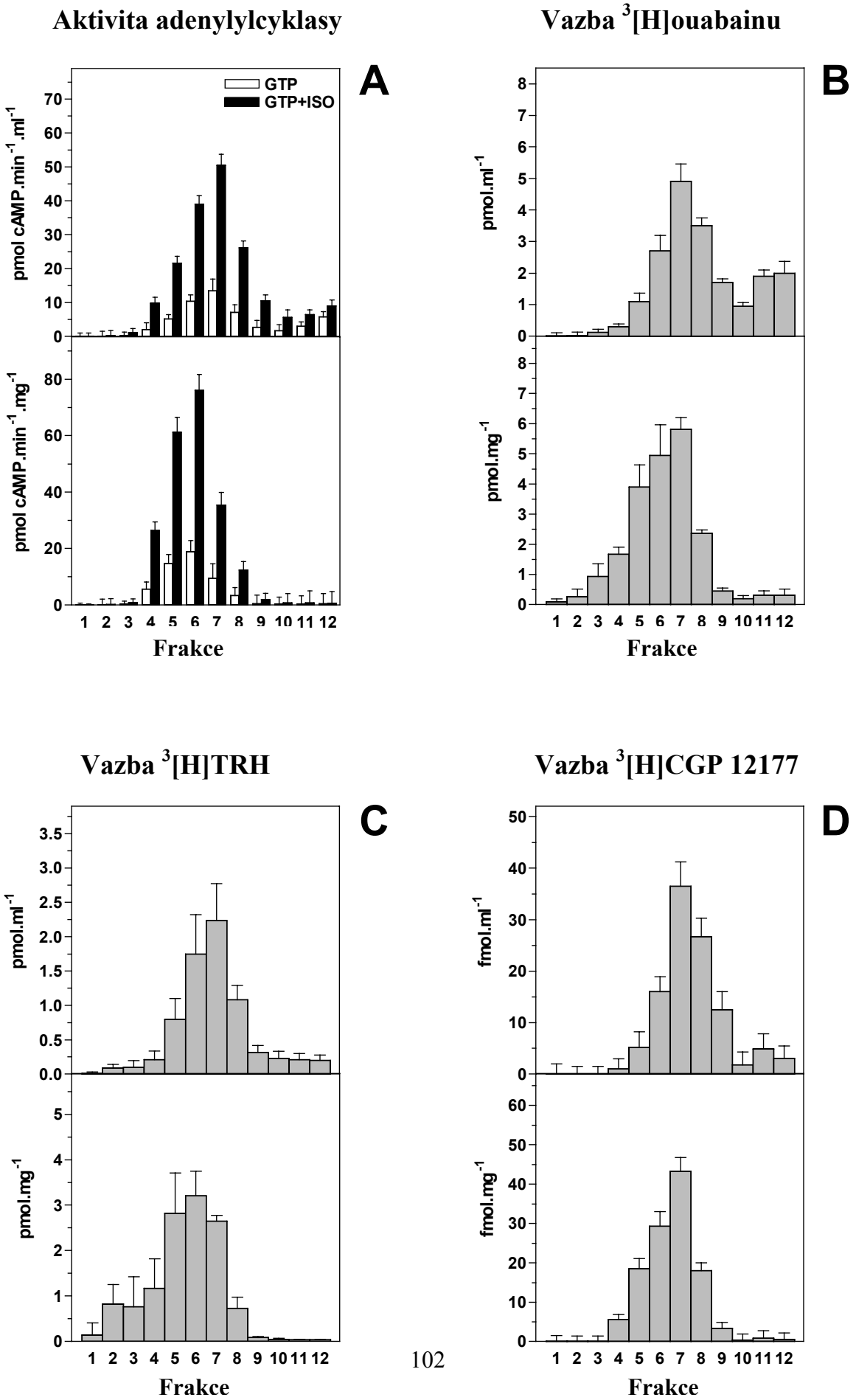


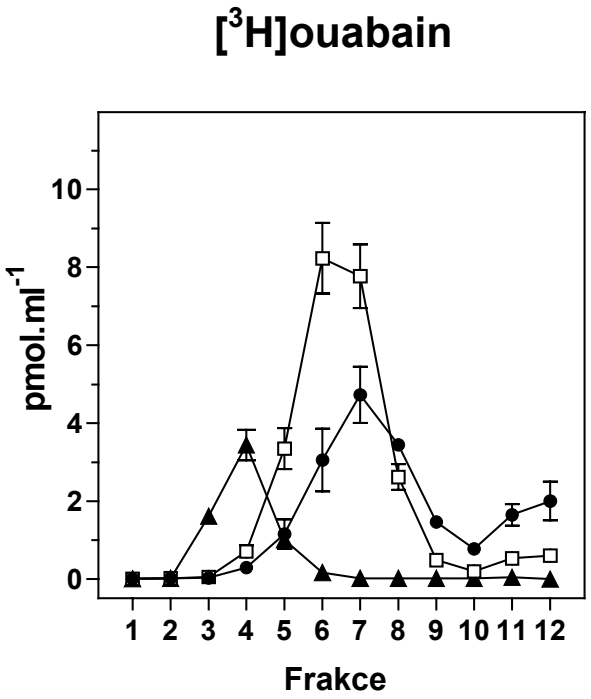
Obr. 14 Fotografie diskontinuitních sacharosových gradientů. Na dno kyvety nanesen vzorek ve 40% sacharose, převrstven 35-15% sacharosou. Gradienty byly od shora rozebírány do jednotlivých frakcí po 1 ml (fr. 1-11) a 0,5 ml (fr. 12). **0** – kyveta se vzorkem (22 mg proteinu) ve 40% sacharose před centrifugací. A, B, C – gradienty po centrifugaci (39000 rpm, 24 hod) homogenátu (**A**), TX-100 lysátu (**B**) a alkalického preparátu (**C**) VTGP buněk.



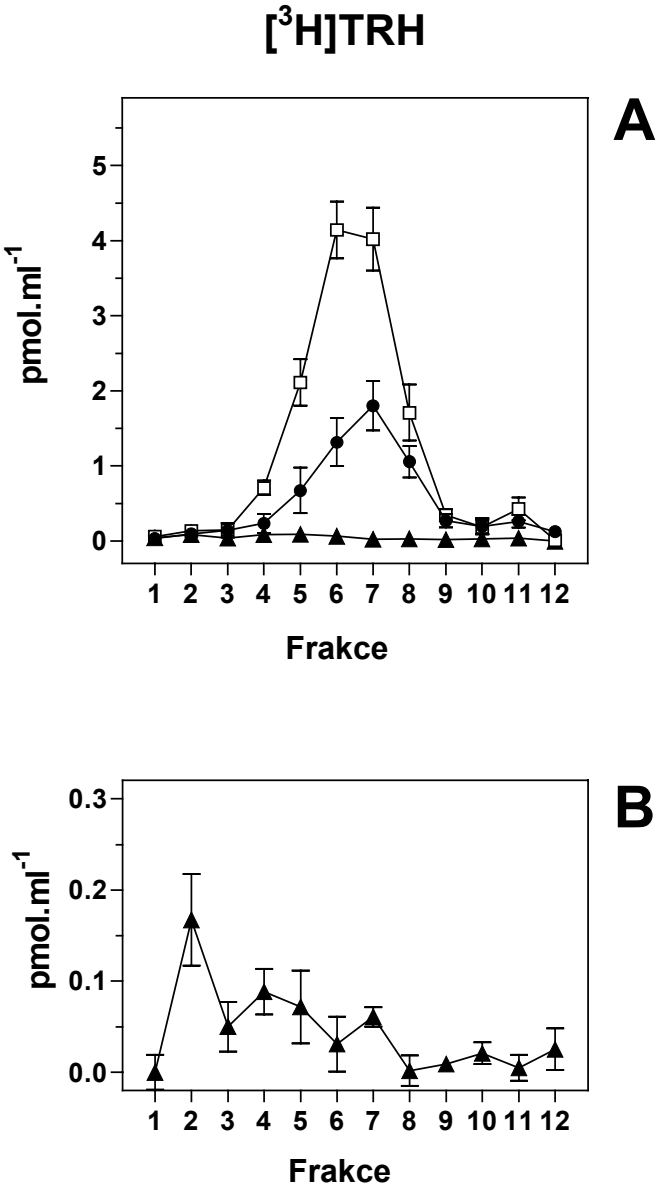
Obr. 15 Distribuce celkové bílkoviny ve frakcích flotačních sacharosových gradientů připravených z homogenátu (●), tritonového (▲) nebo alkalického (□) lysátu VTGP buněk.

Obr. 16 *(násl. strana)* Distribuce proteinů plasmatické membrány. Gradienty byly připravené z 22 mg homogenátu HEK293 buněk exprimujících VSV-TRH-R-GFP. Měřena byla aktivita adenylylcyklasy (**A**) a vazba ^{3}[H]ouabainu (distribuce Na/K-ATPasy – **B**), ^{3}[H]TRH (distribuce TRH receptoru – **C**) a ^{3}[H]CGP12177 (distribuce β-adrenergních receptorů – **D**). Enzymová aktivita adenylylcyklasy a specifická vazba byly vztaženy na frakci (ml) nebo na množství proteinu ve frakci (mg).

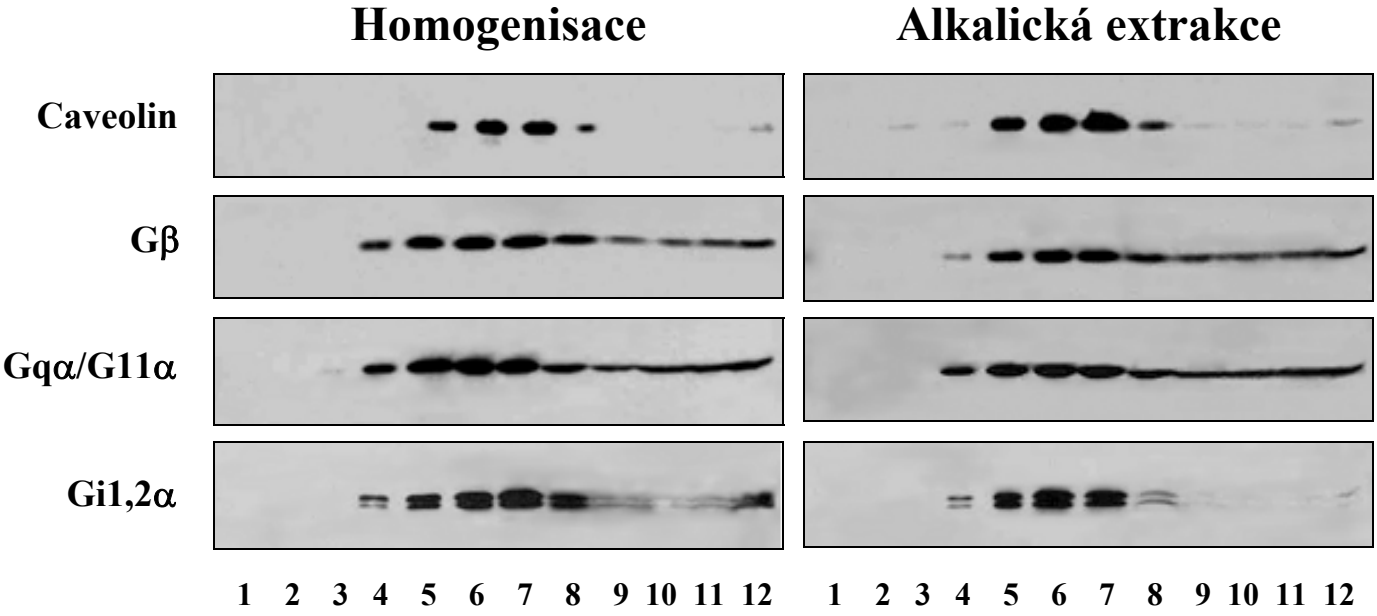

Aktivita adenylylcyklasy
A
GTP
GTP+ISO
pmol cAMP.min-1.ml-1
pmol cAMP.min-1.mg-1
Frakce
Vazba 3[H]ouabainu
B
pmol.ml-1
pmol.mg-1
Frakce
Vazba 3[H]TRH
C
pmol.ml-1
pmol.mg-1
Frakce
Vazba 3[H]CGP 12177
D
fmol.ml-1
fmol.mg-1
Frakce



Obr. 17 Vazba ^{3}[H]ouabainu ve frakcích flotačních sacharosových gradientů. Distribuce Na/K-ATPasy jakožto typické bílkoviny plasmatické membrány byla měřena vazbou ^{3}[H]ouabainu v homogenisačním (●), alkalickém (□) a tritonovém (▲) gradientu VTGP buněk.

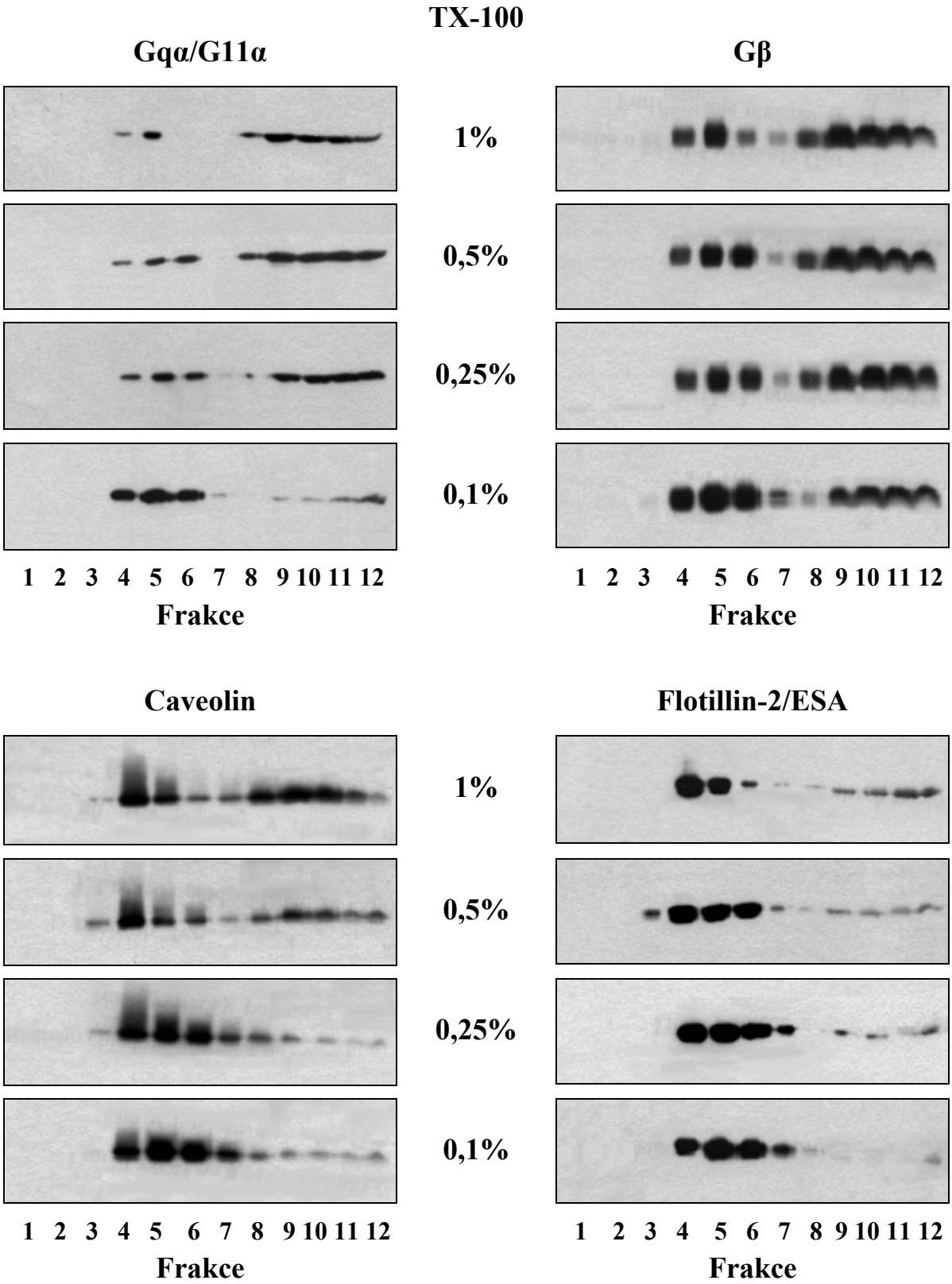


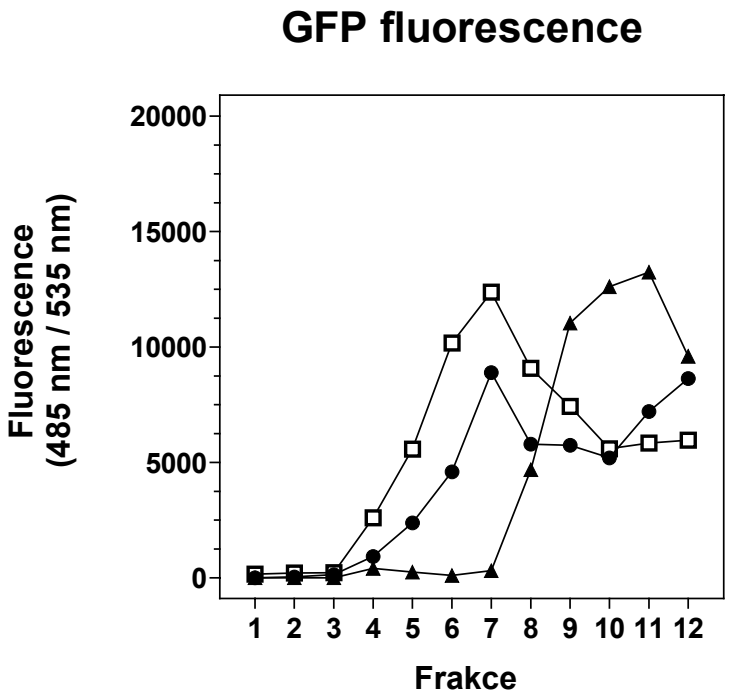
Obr. 18 Vazba ^{3}[H]TRH. Gradientové profily TRH receptoru byly měřeny v alikvotech každé frakce vazbou ^{3}[H]TRH (10 nM – **A**, 40 nM - **B**). ● – homogenisace, □ – alkalická extrakce/sonikace, ▲ – extrakce 1% Tritonem X-100.



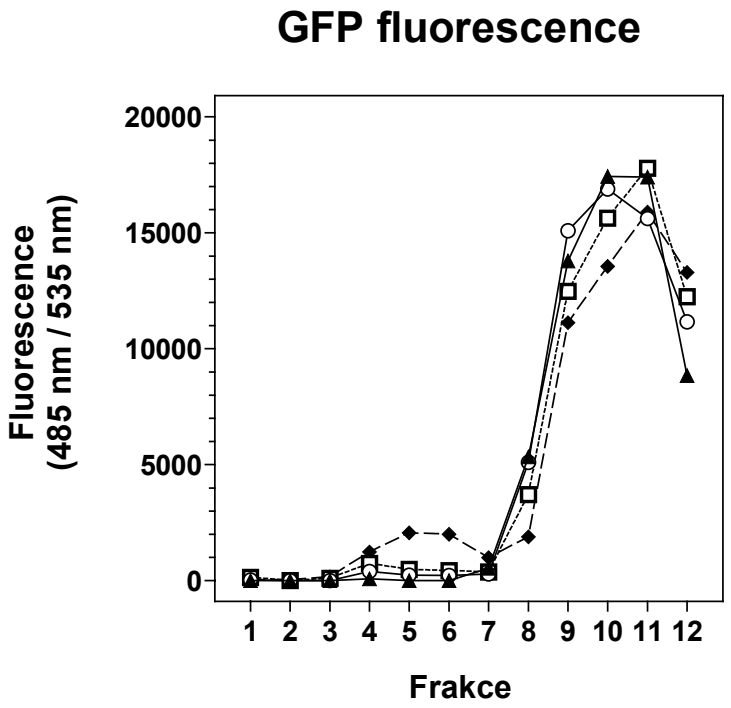
Obr. 19 Srovnání dvou způsobů frakcionace buněčných membrán – homogenisace (vlevo) a alkalické extrakce spojené se sonikací (vpravo). Sledována byla distribuce caveolinu, Gβ, Gqα/G11α a Gi1,2α v gradientech VTGP buněk (na SDS-PAGE nanášeno 20 μl gradientových frakcí).

Obr. 20 *(násl. strana)* Vliv koncentrace detergentu na distribuci bílkovin plasmatické membrány. Analysovány byly sacharosové gradienty připravené za užití Tritonu X-100 o různých koncentracích (1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%). Sledována byla gradientová distribuce Gqα/G11α, Gβ, caveolinu a flotillinu-2/ESA (na SDS-PAGE nanášeno 20 μl gradientových frakcí).

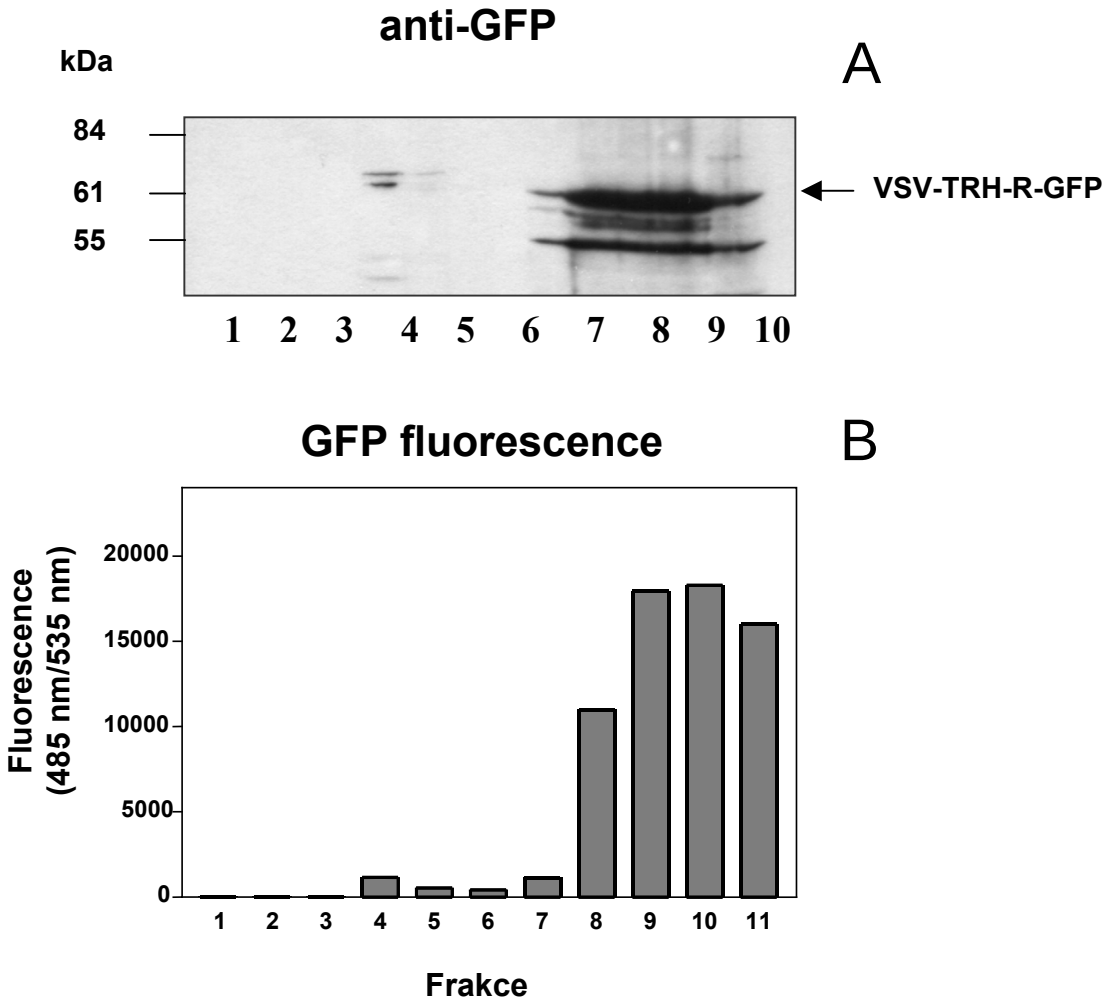

TX-100
Gqα/G11α
Gβ
1%
0,5%
0,25%
0,1%
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Frakce
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Frakce
Caveolin
Flotillin-2/ESA
1%
0,5%
0,25%
0,1%
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Frakce
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Frakce



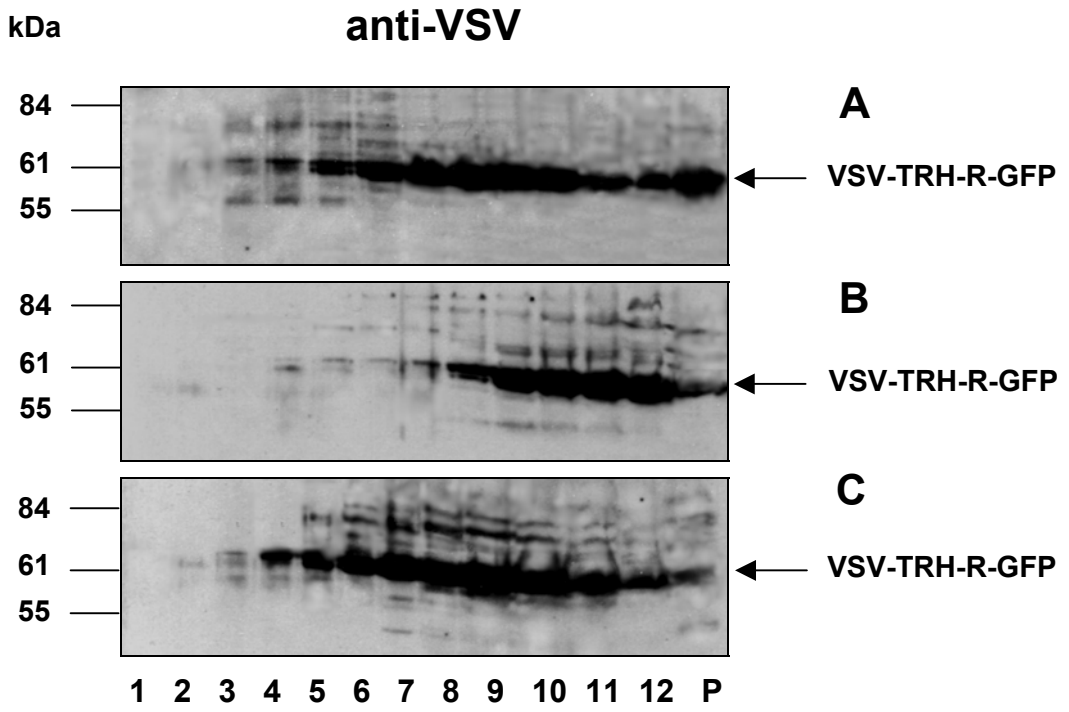
Obr. 21 Distribuce VSV-TRH-R-GFP získaná měřením fluorescence GFP. VTGP buňky byly frakcionovány homogenisací (●), alkalickou preparací (□) a tritonovou extrakcí (▲). GFP fluorescence (excitace 485 nm, emise 535 nm) byla měřena ve 100 µl alikvotech gradientových frakcí.



Obr. 22 Vliv snižující se koncentrace Tritonu X-100 na distribuci VSV-TRH-R-GFP ve frakcích hustotního sacharosového gradientu. VTGP buňky ze 24 kultivačních lahví byly rozděleny do čtyř stejných dílů, z nichž každý byl vystaven jiné TX-100 koncentraci: 1% (▲), 0,5% (○), 0,25% (□) a 0,1% (♦). GFP fluorescence (excitace 485 nm, emise 535 nm) měřena ve 100 µl alikvotech gradientových frakcí.



Obr. 23 Dvojí detekce VSV-TRH-R-GFP v hustotním sacharosovém gradientu po extrakci 1% Tritonem X-100. Receptor byl detekován za pomoci specifických protilátek proti GFP (**A**) nebo pomocí fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu (**B**).



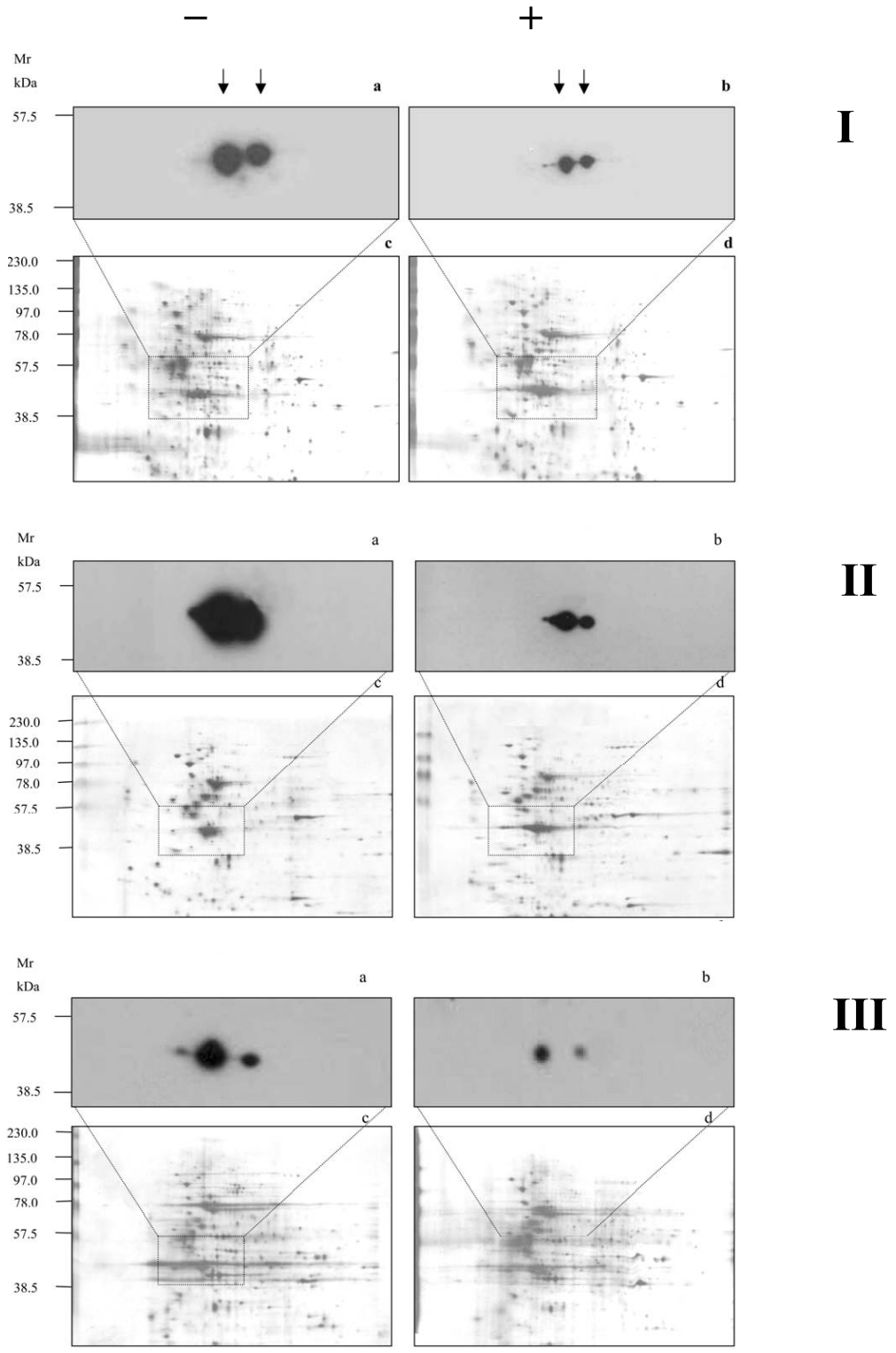
Obr. 24 Distribuce VSV-TRH-R-GFP ve frakcích 1-12 a peletu (P) flotačních sacharosových gradientů sledovaná anti-VSV protilátkami. Buňky byly frakcionovány na gradientech po desintegraci homogenisací (A), tritonovou (1% TX-100) extrakcí (B) a alkalickou/sonikační metodou (C). Na SDS-PAGE bylo nanášeno vždy 24 μl gradientových frakcí.

Obr. 25 *(1. násl. strana)* Dvourozměrná (2D) analysa proteinového složení nízkohustotních membránových fragmentů získaných pomocí silné homogenisace (**I**), alkalické/sonikační extrakce (**II**) a detergentové (1% TX-100) lyse (**III**) HEK293 buněk exprimujících TRH receptor a G11α protein (E2M11 buněk). Na imunoblotech (horní části obrázků I-III) byl sledován specifický pokles hladiny Gqα/G11α proteinu po působení hormonu (TRH +, 10 nM, vpravo) oproti buňkám kontrolním (TRH -, vlevo). Šipkami jsou označeny exogenní G11α a endogenní Gqα, vlevo jsou vyznačeny relativní molekulové hmotnosti (Mr).

Obr. 26 *(2. násl. strana)* Dvourozměrná (2D) analysa proteinového složení nízkohustotních membránových fragmentů získaných pomocí silné homogenisace (**I**), alkalické/sonikační extrakce (**II**) a detergentové (1% TX-100) lyse (**III**) S49 lymfomových buněk. Na imunoblotech (horní části obrázků I-III) byl sledován specifický pokles hladiny Gsα proteinu po působení hormonu (isoprenalin +, 10 nM, vpravo) oproti buňkám kontrolním (isoprenalin – , vlevo). Šipkami 1-4 jsou označeny čtyři isoformy Gsα: GsαL+Ser, GsαL-Ser, GsαS+Ser, GsαS-Ser. Vlevo jsou vyznačeny relativní molekulové hmotnosti (Mr).

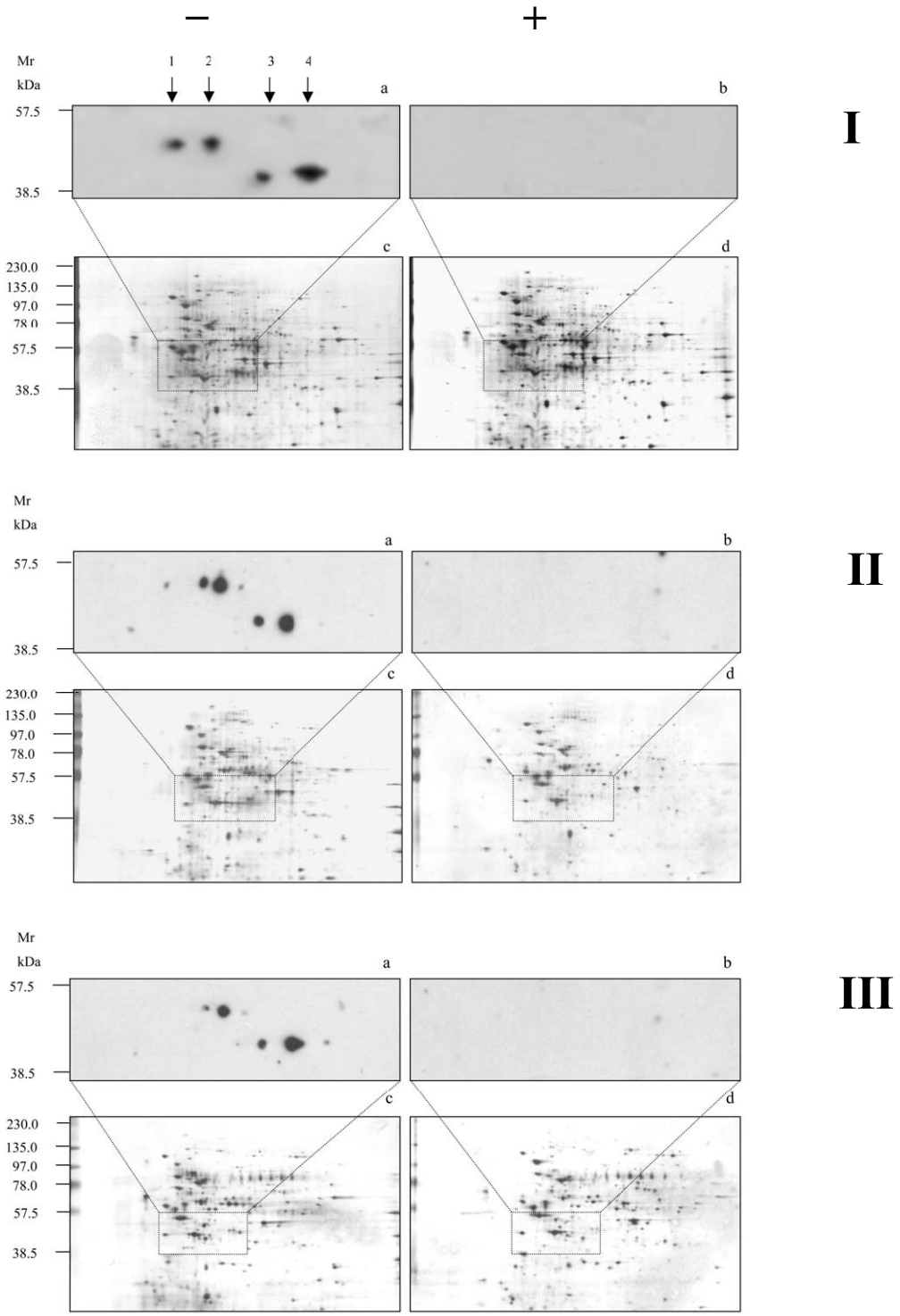
Gqα/G11α

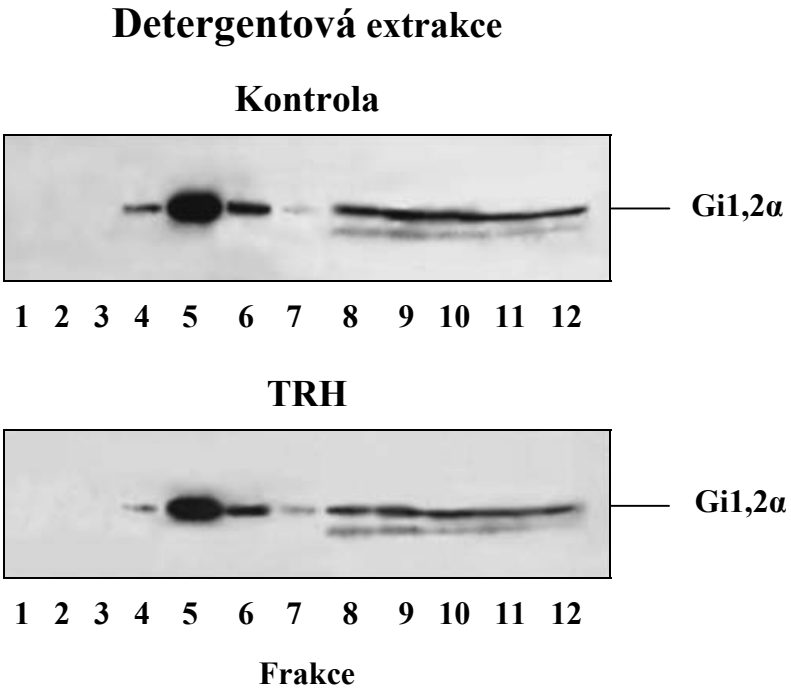
TRH



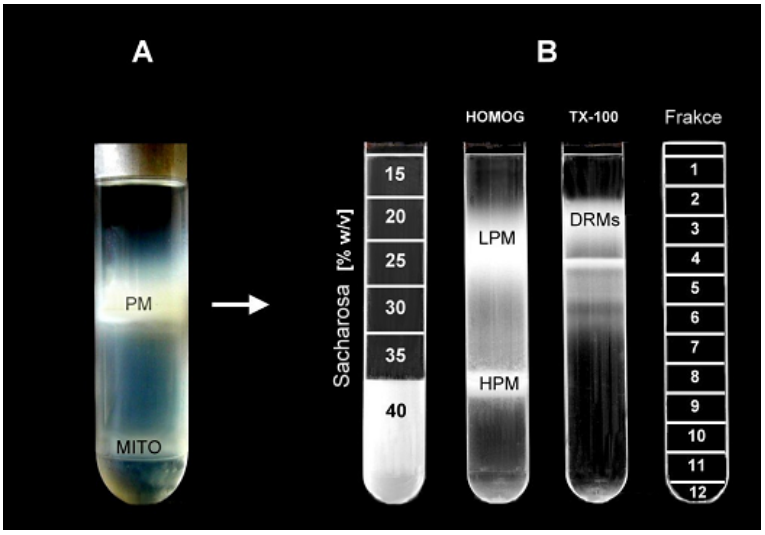
Gsα

isoprenalin





Obr. 27 Vliv dlouhodobé hormonální stimulace (10 nM TRH, 16 hod) na distribuci Gi1,2α proteinu v sacharosových gradientech E2M11 buněk získaných tritonovou extrakcí (1% TX-100).

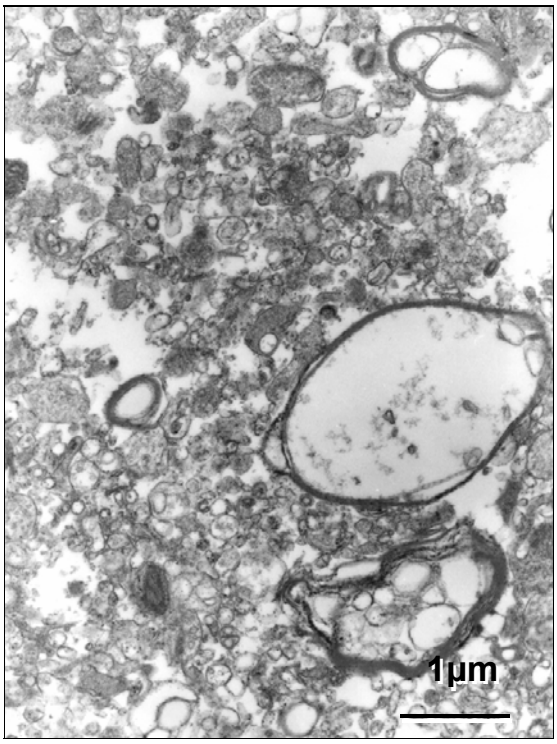


Obr. 28 Frakcionace plasmatických membrán mozkového kortexu potkana. **A** – isolace plasmatických membrán na Percollovém gradientu. **PM** – plasmatická membrána, **MITO** – mitochondrie. **B** – frakcionace plasmatických membrán na sacharosovém gradientu. Frakce plasmatických membrán isolovaná na Percollu byla rozdělena na dvě stejné části. Jedna část byla ve 40% sacharose dána na dno centrifugační kyvety (**Homog**) a stejné množství bylo lysováno 1% Tritonem X-100 a rovněž ve 40% sacharose dáno do kyvety. Po převrstvení sacharosami o snižující se koncentraci a 24 hod centrifugaci (39000 rpm) byly na homogenisačním gradientu získány nízkohustotní membránové fragmenty (**LPM** – 20/25% sacharosa, fr. 2-5) a vysokohustotní membrány (**HPM** – 35/40% sacharosa, fr. 7-8). TX-100 resistentní membránové domény byly separovány ve 20/25% sacharose (**DRMs**, fr. 2-5).

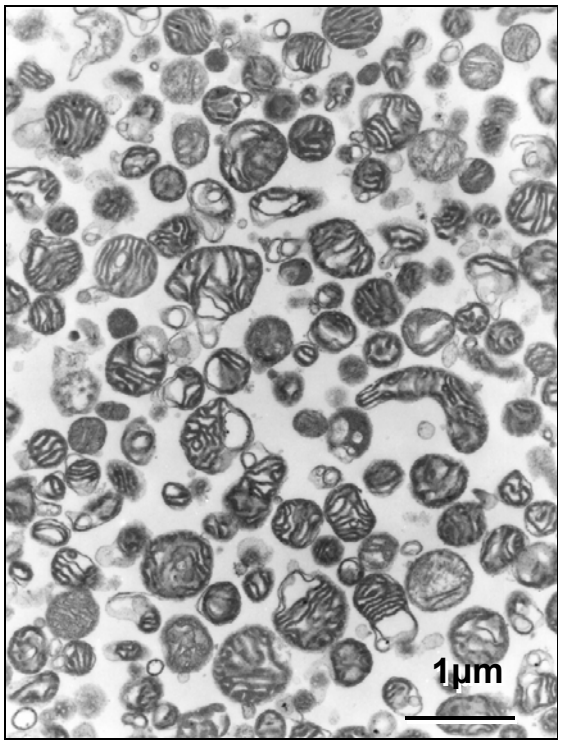
Obr. 29 *(násl. strana)* Elektronmikroskopické obrázky separovaných membránových struktur mozkového potkaního kortexu. Na Percollovém gradientu isolovaná frakce plasmatických membrán (**A**) obsahuje směs vesikulárních struktur různého tvaru a velikosti, včetně poměrně velikých myelinových listů. Čisté mitochondrie (**B**) byly separované na Percollovém gradientu v dolní vrstvě. Po centrifugaci na diskontinuitním sacharosovém gradientu byly získány nízkohustotní membránové fragmenty (LPM) obsahující velké membránové měchýřky a myelin (**C**) a vysokohustotní membránové fragmenty (HPM) zahrnující heterogenní směs váčků a membránových struktur malé velikosti (**D**).

Elektronová mikroskopie
(magn. x 26700)

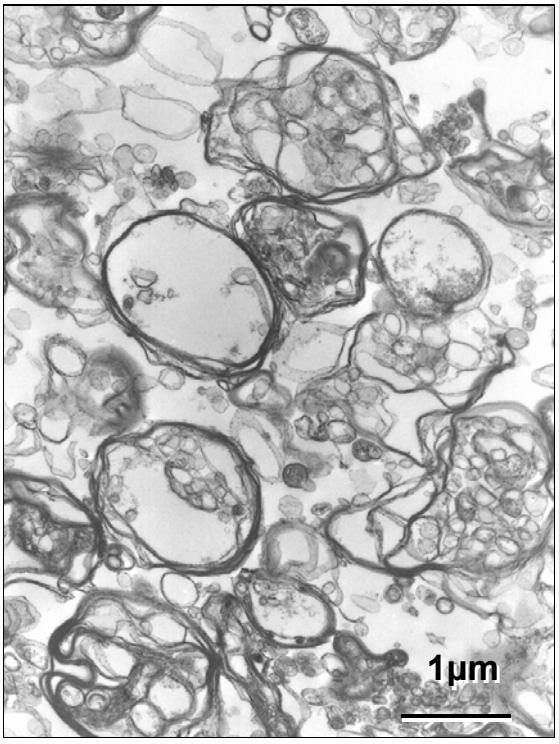
A



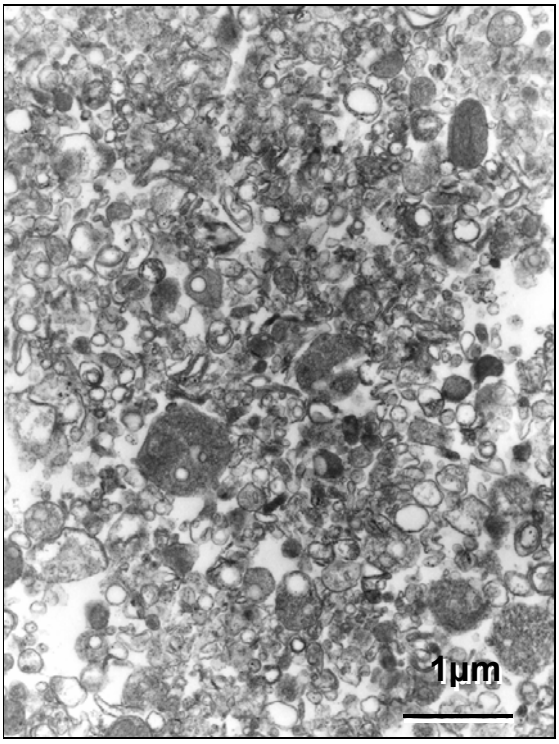
B

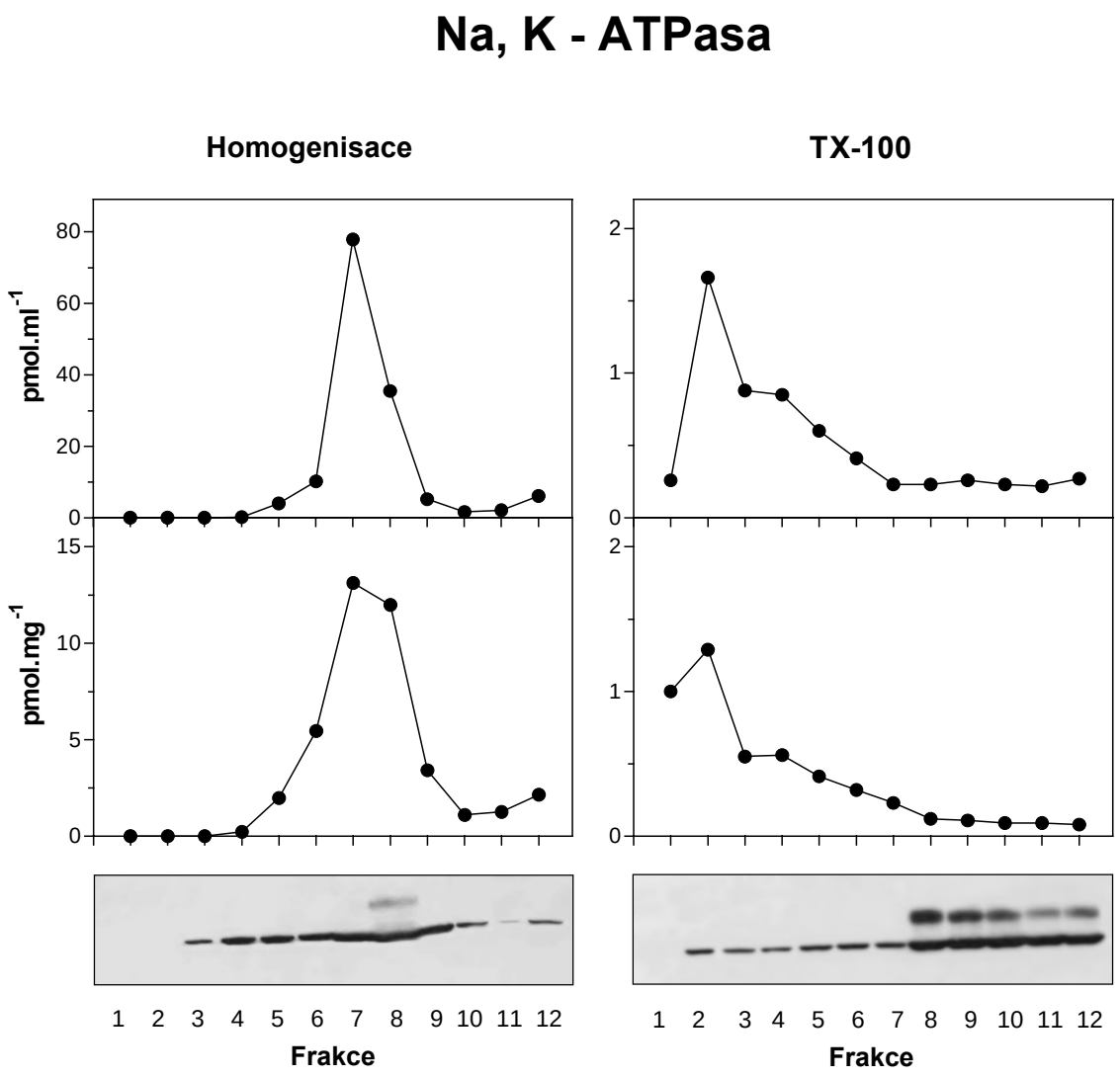


C

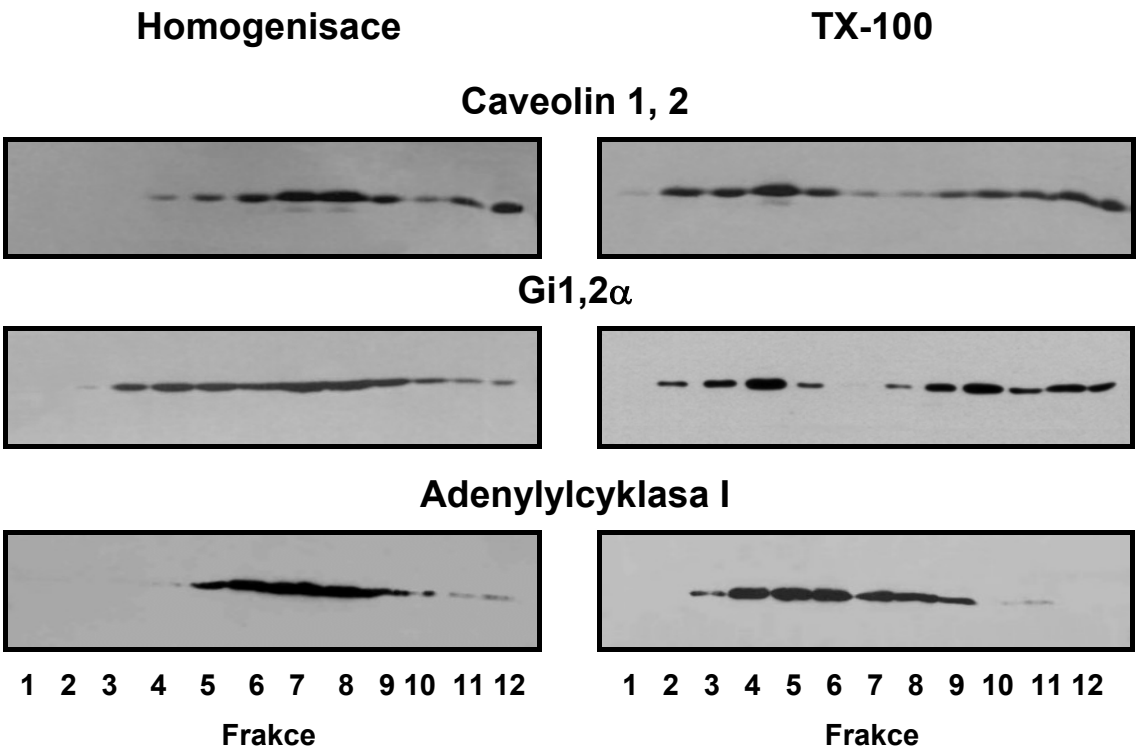


D





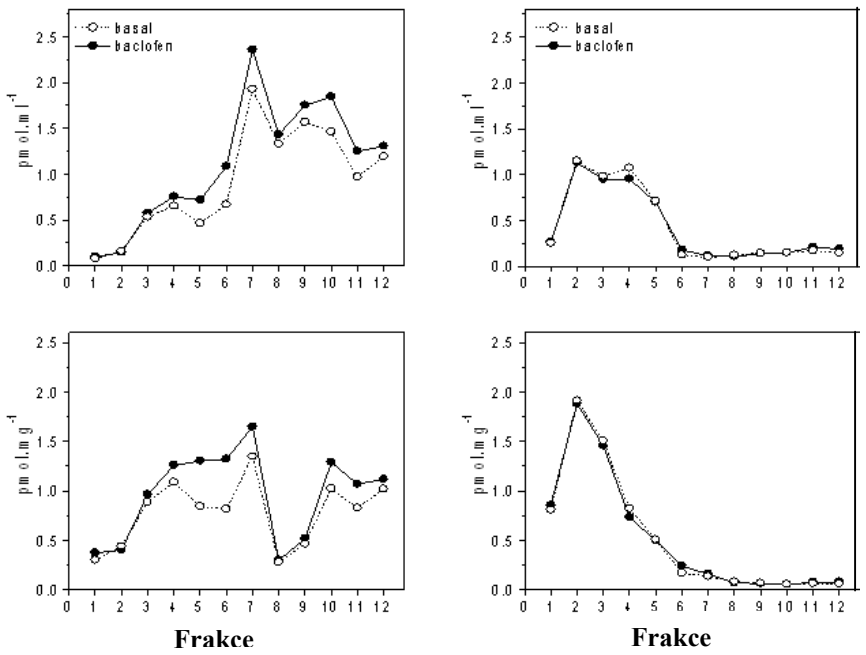
Obr. 30 Distribuce Na/K-ATPasy ve frakcích hustotních sacharosových gradientů. Vazba ^{3}[H]ouabainu vyjádřená na objem (pmol.ml^{-1}) nebo množství proteinu ve frakci (pmol.mg^{-1}). Vlevo – homogenisační gradient (na sacharosový gradient dán na Percollovém gradientu isolovaný materiál získaný jako frakce plasmatických membrán mozkového kortexu potkana), vpravo – 1% TX-100 gradient z plasmatických membrán. V dolní části ukázka imunoblotu gradientových frakcí vyvolaných protilátkami proti Na/K-ATPase.



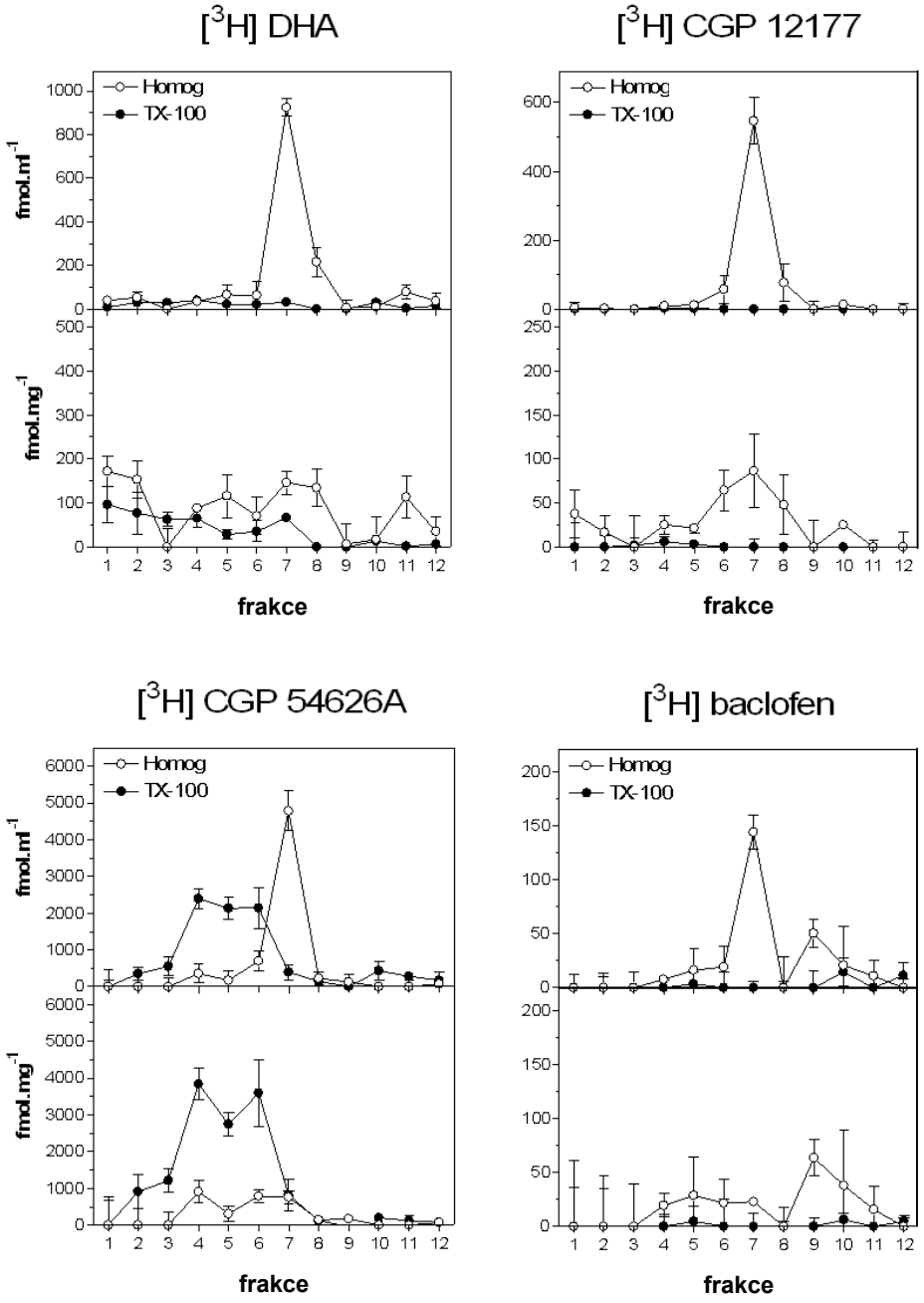
Obr. 31 Distribuce caveolinu, Gi1,2α proteinu a adenylylcyklasy I ve frakcích flotačních sacharosových gradientů mozkového kortexu potkana. Vlevo – gradienty homogenisační, vpravo – gradienty tritonové (1% TX-100). Ve frakcích 1-12 byla sledována distribuce caveolinu (nahoře), Gi1,2α proteinu (uprostřed) a adenylylcyklasy I (dole). Na SDS-PAGE nanášeno 24 μl každé frakce.

GTPγS

Homogenisace **TX-100**

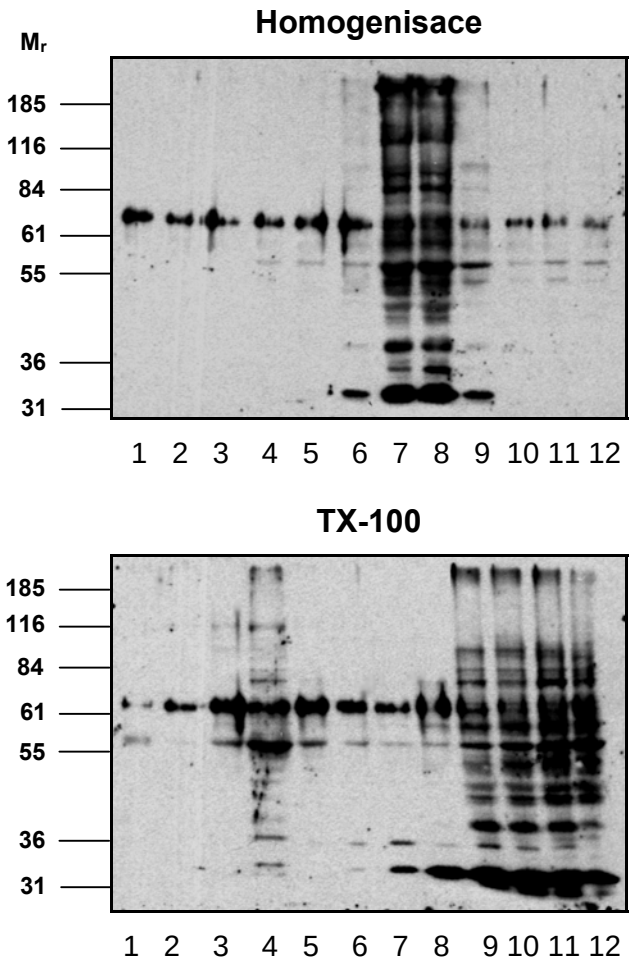


Obr. 32 Baclofenem stimulovaná vazba [^{35}S]GTPγS v gradientových frakcích získaných z kortexu mozku potkana. Ve frakcích z hustotních sacharosových gradientů byla měřena aktivita trimerních G proteinů jako míra vazby [^{35}S]GTPγS v gradientu homogenisačním (vlevo) a tritonovém (1% TX-100, vpravo). Basální (○) a baclofenem stimulovaná (●) [^{35}S]GTPγS vazba byla vyjádřena na objem frakce (pmol.ml^{-1}, nahoře) nebo protein ve frakci (pmol.mg^{-1}, dole).

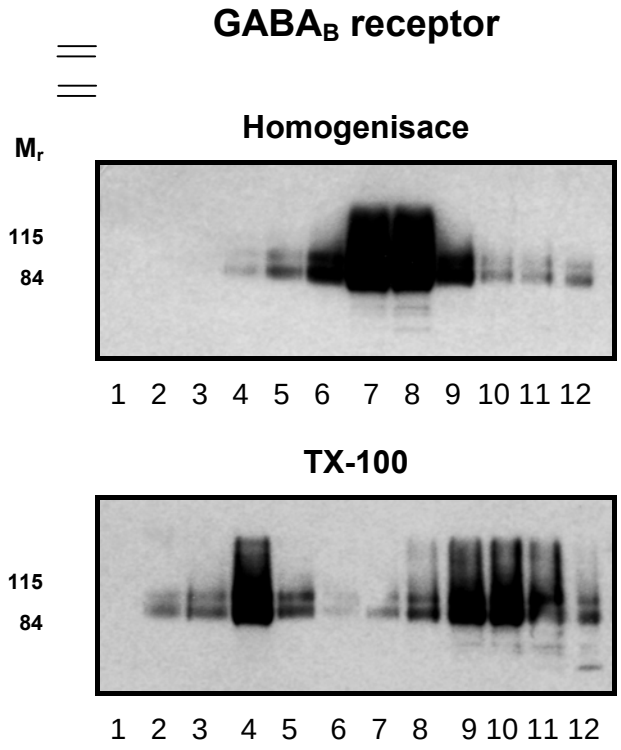


Obr. 33 Distribuce β-adrenergních a $GABA_B$ receptorů ve frakcích flotačních sacharosových gradientů z plasmatických membrán mozkového kortexu potkana. Distribuce β-adrenergních receptorů byla měřena jako vazba agonisty ^{3}[H]dihydroalprenololu (DHA, vlevo nahoře) a antagonisty ^{3}[H]CGP12177 (vpravo nahoře) a distribuce $GABA_B$ receptorů pomocí vazby ^{3}[H]baclofenu (vpravo dole) a ^{3}[H]CGP54626A (vlevo dole). Analysovány byly gradienty homogenisační (○) a tritonové (1% TX-100)(●).

β1-adrenergní receptor



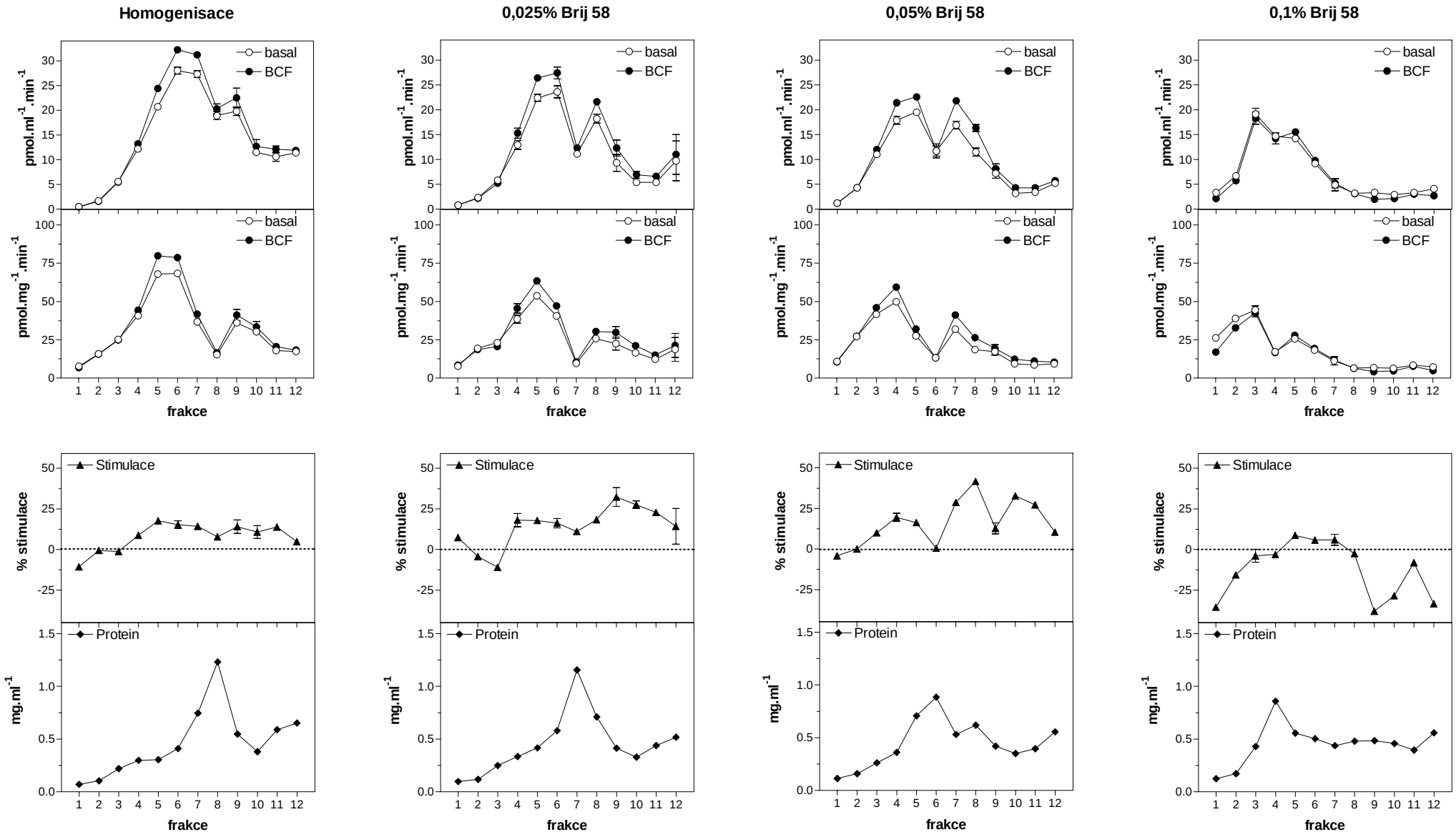
Obr. 34 Gradientový profil β1-adrenergního receptoru ve frakcích získaných po separaci plasmatických membrán mozkového kortexu potkana na sacharosovém gradientu. Distribuce v homogenisačním gradientu je znázorněna nahoře, v tritonovém (1% TX-100) dole. Popisky vlevo ukazují relativní molekulovou hmotnost (M_r). Na gradienty nanášeno 24 μl frakcí.

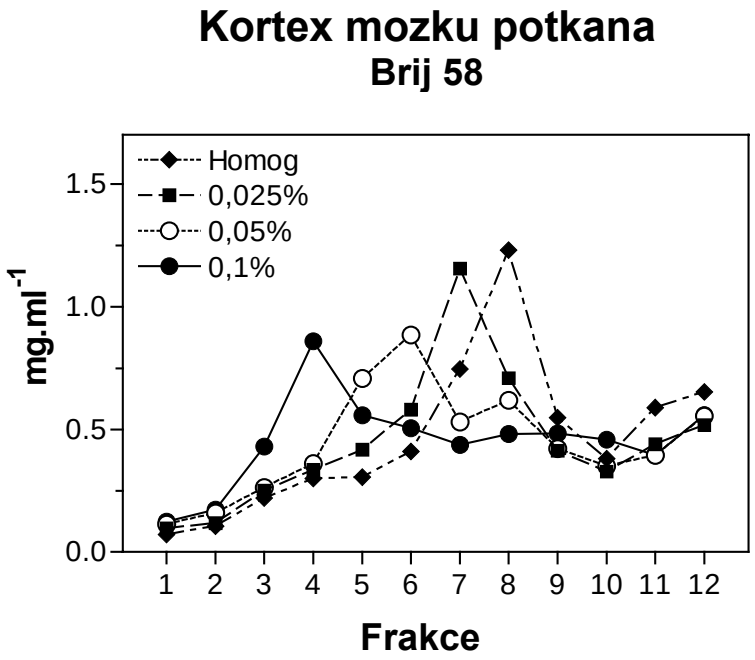


Obr. 35 Distribuce $GABA_B$ receptoru ve frakcích flotačního sacharosového gradientu plasmatických membrán mozkového kortexu. Nahoře – homogenisační gradient, dole – 1% TX-100 gradient. M_r – relativní molekulová hmotnost, na SDS-PAGE dáváno 24 μl frakcí.

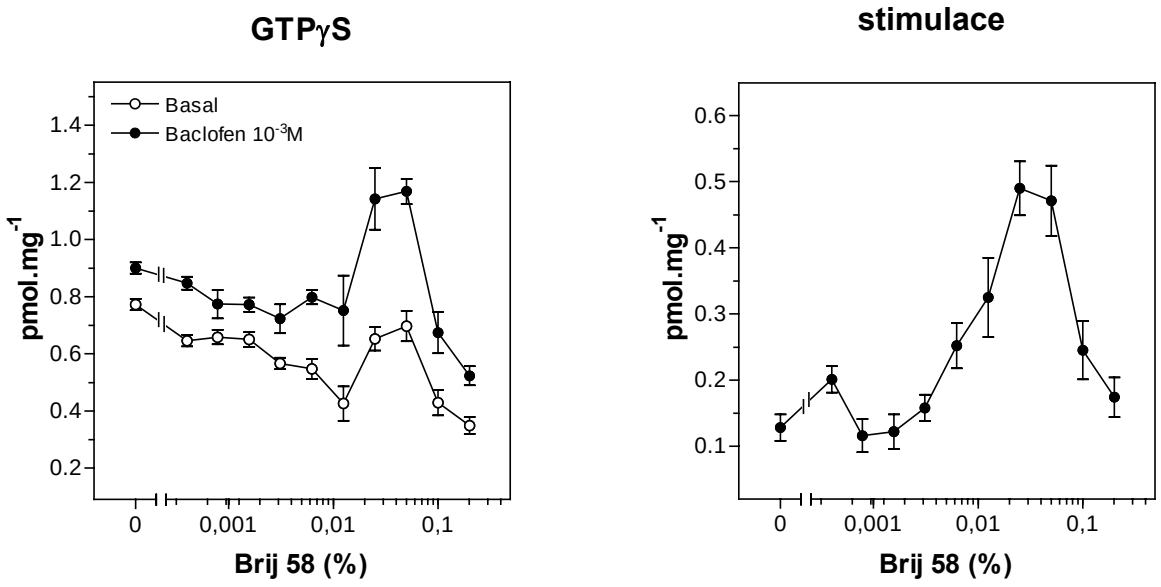
Obr. 36 *(násl. strana)* Funkční aktivita Giα/Goα proteinů ve fragmentech plasmatické membrány v hustotních sacharosových gradientech po působení Brije 58. Frakce plasmatických membrán mozkového kortexu potkana získaná na percollovém gradientu byla rozdělena na čtyři stejné části, které byly frakcionovány na sacharosovém gradientu bez použití detergentu (Homogenisace, vlevo) nebo po působení 0,025%, 0,05% a 0,1% Brije 58. V horní části obrázku je znázorněna GTPasová aktivita basální (○) a stimulovaná baclofenem (BCF)(●). Dolní část znázorňuje úroveň stimulace (▲) a gradientovou distribuci celkové bílkoviny (♦).

GTPasa


Homogenisace
0,025% Brij 58
0,05% Brij 58
0,1% Brij 58
basal
BCF
pmol.ml-1.min-1
pmol.mg-1.min-1
frakce
Stimulace
% stimulace
Protein
mg.ml-1



Obr. 37 Flotace fragmentů plasmatické membrány potkaního mozkového kortexu v hustotním sacharosovém gradientu po působení detergentu Brij 58. Znázorněn je profil koncentrace celkové bílkoviny v jednotlivých gradientových frakcích v gradientu homogenisačním (♦) a za užití Brije 58 (■ – 0,025%, ○ – 0,05%, ● – 0,1%).



Obr. 38 Vliv Brije 58 na aktivitu Giα/Goα proteinu. V plasmatických membránách získaných na percollovém gradientu z homogenátu mozkového kortexu potkana byla měřena funkční aktivita Giα/Goα proteinů pomocí baclofenem stimulované vazby [^{35}S]GTPγS. Vzorek plasmatických membrán byl smíchán 1:1 s vodným roztokem Brije 58 na výslednou koncentraci detergentu – 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125%, 0,0063%, 0,0031%, 0,0016% a 0,0008%. Vlevo – basální (○) a baclofenem (10^{-3}M)(●) stimulovaná vazba [^{35}S]GTPγS, vpravo – čistá stimulace v jednotlivých vzorcích representujících různé poměry detergent/bílkovina.

Příloha II – TABULKY

	% bílkoviny v gradientových peletech
1 % TX-100	**36**
0.75 % TX-100	**45**
0.5 % TX-100	**45**
0.25 % TX-100	**50**
0.1 % TX-100	**50**
Homogenisace	**56**

Tab. 1 Množství celkové bílkoviny přítomné v peletech sacharosových gradientů. Uvedeno je procento celkového množství proteinu obsaženého v gradientech připravených za použití 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% a 0,1% Tritonu X-100, a bezdetergentovou frakcionací – homogenisací.

	TX-100	TX-100 resistentní	TX-100 solubilní
VSV-TRH-R-GFP	1,0 %	<1 %	>99 %
	0,5 %	2 %	98 %
	0,25 %	3 %	97 %
	0,1 %	9 %	91 %
Gqα/G11α	1,0 %	18 %	82 %
	0,5 %	19 %	81 %
	0,25 %	44 %	56 %
	0,1 %	76 %	24 %
Caveolin	1,0 %	50 %	50 %
	0,5 %	61 %	39 %
	0,25 %	87 %	13 %
	0,1 %	90 %	10 %

Tab. 2 Přítomnost VSV-TRH-R-GFP, Gqα/G11α, a caveolinu v detergent resistentních membránových doménách při různých TX-100 koncentracích. Množství imunoblotového signálu sledovaných proteinů v gradientových frakcích 2-6 (TX-100 resistentní) a 8-12 (TX-100 solubilní) je vyjádřeno jako procento celkového signálu ze všech frakcí. Uvedené výsledky představují průměry ze tří pokusů.