

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

DOKTORANDSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

2007

Mgr. Dana Durchánková

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Úloha palmitoylace v signalizaci zprostředkované
G-proteiny třídy $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ a její vliv na lokalizaci
 $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ v buněčné membráně**

Mgr. Dana Durchánková

Doktorandská dizertační práce

2007

Vedoucí dizertační práce:

Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Fyziologický ústav AVČR, Praha
Oddělení membránových receptorů

Děkuji vedoucímu své dizertační práce Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení, veškerou podporu a zajištění podmínek pro mou práci. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Novotnému, DrSc., RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. a RNDr. Lence Bouřové, Ph.D. za ochotnou pomoc a cenné rady a náměty v průběhu celé práce. Můj dík patří také RNDr. Petru Matouškovi, Ph.D., RNDr. Václavu Lisému, CSc., RNDr. Vladimíru Rudajevovi, PharmDr. Jiřímu Stöhrovi, Mgr. Pavlu Ostašovi, RNDr. Denise Petráčkové, Mgr. Lence Šemberové a dalším kolegům nejen z naší laboratoře za mnohostrannou podporu a za přátelský přístup a spolupráci. V neposlední řadě děkuji Prof. Graeme Milliganovi za umožnění mého sedmiměsíčního studijního a pracovního pobytu v jeho laboratoři Biochemie a molekulární biologie na Univerzitě v Glasgow a dále Prof. Jasmince Godovac-Zimmermann za poskytnutí možnosti studovat a pracovat devět měsíců v její proteomické laboratoři na Univerzitě College London. Tyto mé studijní a pracovní pobyty v zahraničí byly mimo jiné částečně financovány nadací Marie Curie (5. rámcový program společnosti CORDIS), nadací ERASMUS/SOCRATES a Hlávkovou nadací, za což jim patří můj dík.

V neposlední řadě děkuji své rodině a nejbližším za všestrannou podporu, obrovskou trpělivost a veškerou pomoc při studiích a při sepisování této dizertační práce.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci ani její podstatnou část nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10.4. 2007

.....
Dana Durchánková

OBSAH

SEZNAM PUBLIKACÍ A JINÁ ČINNOST	1
Publikační podklad pro dizertační práci	1
Ostatní publikace	1
Abstrakta z konferencí	2
Přednášky a krátká sdělení	2
Pracovně-studijní pobyty	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
1. ÚVOD	8
2. CÍLE	10
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1. Receptory spřažené s trimerními G-proteiny	12
3.1.1. Základní charakteristika receptorů spřažených s trimerními G-proteiny	12
3.1.2. Lipidové modifikace receptorů spřažených s trimerními G-proteiny	15
3.1.3. Adrenergní receptory	17
3.1.4. Thyreoliberinové receptory	19
3.2. Trimerní G-proteiny	20
3.2.1. Základní charakteristika trimerních G-proteinů	20
3.2.2. Aktivace a deaktivace trimerních G-proteinů	21
3.2.3. Podjednotka $G\alpha$	22
3.2.4. Podjednotky $G\beta\gamma$	23
3.2.5. Lipidové modifikace trimerních G-proteinů	24
3.2.6. Klasifikace trimerních G-proteinů	27
3.2.6.1. Třída $G_s\alpha/G_{olf}\alpha$	28
3.2.6.2. Třída $G_i\alpha/G_o\alpha$	28
3.2.6.3. Třída $G_q\alpha/G_{11}\alpha$	29
3.2.6.4. Třída $G_{12}\alpha/G_{13}\alpha$	29

3.3.	Efektory trimerních G-proteinů	29
3.3.1.	Adenylcykláza	29
3.3.2.	Fosfolipáza C β	30
3.3.3.	Fosfolipáza A ₂	30
3.3.4.	cGMP fosfodiesteráza	31
3.3.5.	PI 3-kinázy	31
3.3.6.	Iontové kanály	31
3.4.	Membránové mikrodomény	32
3.5.	Desenzitizace hormonální akce	36
3.5.1.	Desenzitizace na úrovni receptorů spřažených s trimerními G-proteiny	36
3.5.2.	Desenzitizace na úrovni trimerních G-proteinů	38
4.	MATERIÁL A METODY	44
4.1.	Materiál	44
4.2.	Experimentální modely	44
4.3.	Příprava konstruktů	44
4.4.	Příprava kompetentních buněk	48
4.5.	Transformace bakterií a izolace cDNA	48
4.6.	Přechodná transfekce HEK-293 buněk a jejich kultivace	50
4.7.	Stabilní transfekce HEK-293 buněk (klon E2M11) a jejich kultivace	51
4.8.	Buněčná frakcionace	52
4.9.	Stanovení koncentrace proteinů	54
4.9.1.	Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny	54
4.9.2.	Stanovení koncentrace proteinů pomocí Lowryho metody	55
4.9.3.	Stanovení koncentrace proteinů pomocí upravené Bradfordovy metody	56
4.10.	Vazebné studie	57
4.10.1.	Vazebná studie s [³ H]prazosinem	59
4.10.2.	Vazebná studie s [³⁵ S]GTP γ S	60
4.11.	Inkubace s hydroxylaminem	60
4.12.	Jednodimenzionální SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza	61
4.13.	TCA diethylether/ethanol precipitace	62
4.14.	Izoelektrická fokusace (IEF)	63
4.15.	Dvoudimenzionální SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza	63

4.16.	Příprava antiséra	64
4.17.	Imunodetekce proteinů	65
4.18.	Vyhodnocení a prezentace výsledků	66
5.	VÝSLEDKY	67
5.1.	Význam palmitoylace a interakcí α podjednotky s $\beta\gamma$ dimerem pro funkční spřažení mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem	67
5.2.	Vliv extrakce cholesterolu na buněčnou lokalizaci $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2	79
5.3.	Časový průběh solubilizace G-proteinů třídy $G_q\alpha/G_{11\alpha}$	81
6.	DISKUZE	103
6.1.	Význam palmitoylace a interakcí α podjednotky s $\beta\gamma$ dimerem pro funkční spřažení mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem	103
6.2.	Vliv extrakce cholesterolu na buněčnou lokalizaci $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2	109
6.3.	Časový průběh solubilizace G-proteinů třídy $G_q\alpha/G_{11\alpha}$	110
7.	ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ	113
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	115
	PŘÍLOHA - PUBLIKACE	137

SEZNAM PUBLIKACÍ A JINÁ ČINNOST

Publikační podklad pro dizertační práci

Matousek, P., **Durchankova, D.**, Svandova, I., Novotny, J. and Svoboda, P. (2005) Agonist-induced tyrosine phosphorylation of G(q)/G(11)alpha requires the intact structure of membrane domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328(2):526-32.

IF = 2,904

Novotny, J., **Durchankova, D.**, Ward, R. J., Carillo, J. J., Svoboda, P. and Milligan, G. (2006) Functional interactions between the alpha(1b)-adrenoceptor and Galpha(11) are compromised by de-palmitoylation of the G protein but not of the receptor. *Cell. Signal.* 18(8):1244-51.

IF = 4,741

Durchankova, D. and Svoboda, P. (2007) The time-course of agonist induced solubilisation of trimeric G_q/G₁₁α proteins resolved by two-dimensional electrophoresis. Přijato do tisku ve *Phys. Res.*

IF = 1,800

Ostatní publikace

Svoboda, P., Teisinger, J., Novotny, J., Bourova, L., Drmota, T., Hejnova, L., Moravcova, Z., Lisy, V., Rudajev, V., Stohr, J., Vokurkova, A., Svandova, I. and **Durchankova, D.** (2004) Biochemistry of transmembrane signalling mediated by trimeric G proteins. *Physiol. Res.* 53 (Suppl. 1):S141-52.

IF = 1,140

Ostasov, P., Bourova, L., Hejnova, L., **Durchankova, D.**, Svoboda, P. and Novotny, J. (2007) Disruption of the plasma membrane structure by depletion of cholesterol impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via G_q/G₁₁α protein. Manuscript v přípravě pro *J. Membrane Biol.*

Abstrakta z konferencí

Svoboda, P., Matousek, P., **Durchankova, D.**, Svandova, I. Ostasov, P. and Novotny, J. Agonist-induced tyrosine-phosphorylation of $G_q/G_{11}\alpha$ requires intact structure of membrane domains. Gordon Research Conference in Molecular Pharmacology, Ciocco (Italy), 9. - 13. května 2005.

Novotny, J., **Durchankova, D.**, Ward, R. J., Carrillo, J. J., Svoboda, P. and Milligan, G. Functional interactions between the α_{1b} -adrenoceptor and $G_{\alpha 11}$ are compromised by de-palmitoylation of the G protein but not of the receptor. 5th Conference of the Czech Neuroscience Society, Prague (Czech Republic), 19. - 21. listopadu 2005.

Durchankova, D., Ostasov, P., Bourova, L., Hejnova, L., Svoboda, P. and Novotny, J. Disruption of the plasma membrane structure by depletion of cholesterol impairs effectiveness of TRH receptor-mediated signal transduction via $G_q/G_{11}\alpha$ protein. 17th ESN Meeting - 3rd Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders, Salamanca (Spain), 19. - 22. května 2007.

Přednášky a krátká sdělení

Přednáška: Agonist-induced tyrosine phosphorylation of $G_q/G_{11}\alpha$ in connection with proteomics method MPD. **Durchankova, D.**, Matousek, P., Svandova, I., Novotny, J. and Svoboda, P. Agonist-induced tyrosine phosphorylation of $G(q)/G(11)\alpha$ requires the intact structure of membrane domains. ISMB Retreat pořádaný Institucí strukturní a molekulární biologie na UCL a Birkbeck univerzitou v konferenčním centru Wellcome Trust v Cambridgi (UK). 27. - 28. června 2005.

Krátké sdělení: Difference Gel Analysis of NRK-49F cells. **Durchankova, D.** (2005). Tento text byl podkladem pro závěrečnou zprávu pro Prof. J. Godovac-Zimmermann Ph.D. ohledně jedné části mých výsledků získaných během mého pracovního-studijního pobytu v Londýně. Tato zpráva (v angličtině) je přiložena na konci dizertační práce.

Pracovně-studijní pobyty:

Glasgow University, Institute of Biomedical and Life Sciences, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratory of Molecular Pharmacology, Prof. G. Milligan, BSc., Ph.D. Březen - říjen 2004.

Název projektu: Functional interactions between α_{1b} -adrenoceptor and $G_{11\alpha}$.

University College London, Royal Free and University College Medical School, Department of Medicine, Centre for Molecular Medicine, Molecular Cell Dynamics, Prof. J. Godovac-Zimmermann, Ph.D. Leden - říjen, 2005.

Názvy projektů: 1. Functional proteomics of endothelin-1 signal transduction in NRK-49F cells performed by DIGE
2. 2D resolution of soluble (cytosol) cell fraction and identification of trimeric G-proteins $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α_{1b}AR	adrenergní receptor typu α_{1b}
AC	adenylcycláza
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADP	adenosindifosfát
AP-2	adaptorový protein klathrinu
APS	amoniumpersulfát
APT	acyl(protein)thioesteráza
ATP	adenosintrifosfát
a.u.	arbitrární jednotky (arbitrate units)
βARK	proteinkináza β -adrenergních receptorů
BCA	bicinchoninová kyselina
B_{max}	maximální vazebná kapacita
BRET	Bioluminiscenční rezonanční přenos energie (bioluminescence resonance energy transfer)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
cAMP	3', 5'-cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfát
CHO	buněčná linie odvozená od křeččích buněk vaječníků (Chinese hamster ovary cells)
COS	buněčná linie odvozená od ledvinných buněk kočkodana obecného
CT	cholera toxin
DAG	1,2-diacylglycerol
DIGs	detergent-nerozpustné glykosfingolipidové membránové domény (detergent-insoluble glycosingolipid-rich membrane microdomains)
DIMs	detergent-insenzitivní membránové domény (detergent-insensitive membrane domains)
DMEM	médium pro kultivaci buněk (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DPM	rozpad za minutu (disintegration per minute)
DRMs	detergent-rezistentní membránové domény (detergent-resistant

	membranes)
e1 - e3	extracelulární smyčky receptoru spřaženého s G-proteinem
E2M11	linie buněk odvozená od HEK-293
ECL	zesílená chemiluminiscence (enhanced chemiluminiscence)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EF88	linie myších embryonálních fibroblastů s knokautovanými geny kódujícími $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteiny
EF-G, EF-Tu	elongační faktory proteosyntézy G a Tu
ER	endoplazmatické retikulum
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)
Gα	podjednotka α trimerního G-proteinu
G$\alpha\beta\gamma$	neaktivní trimerní komplex G-proteinu
G$\beta\gamma$	dimer podjednotek β a γ trimerního G-proteinu
GABA_BR	metabotropní receptor typu B pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA)
GAP	GTPázu aktivující protein
GDP	guanosindifosfát
GEF	výměnný faktor guaninového nukleotidu (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GPCR(s)	receptor spřažený s G-proteinem (G-protein-coupled receptor)
GPI	glykozylfosfatidylinositol
GRK	proteinkináza receptorů spřažených s G-proteiny
G_sαL	dlouhá izoforma G _s α proteinu
G_sαS	krátká izoforma G _s α proteinu
GTP	guanosintrifosfát
GTPγS	guanosin-5'-O- γ -thiotrifosfát, nehydrolyzovatelný analog GTP
HEK-293	linie lidských embryonálních ledvinných buněk (human embryonic kidney cells)
HeLa	buněčná linie odvozená od cervikálního tumoru Henrietty Lacks
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonová kyselina
IEF	izoelektrické fokusace
i1 - i4	intracelulární smyčky receptoru spřaženého s G-proteinem

IgG	imunoglobulin G
IP₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
IPR	iloprostový receptor
K_d	rovnovážná disociační konstanta
K_i	zdánlivá rovnovážná disociační konstanta
KLH	hemocyanin získaný z přílipky (keyhole limpet hemocyanin)
MAPkináza	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MDCK	epiteliální ledvinné buňky psa (Madine-Darby canine kidney cells)
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NCS	novorozenecké telecí sérum (newborn calf serum)
ODU	jednotky optické denzity (optical density units)
PBS	fyzilogický fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PI	fosfatidylinositol
PIP₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	cAMP-dependentní proteinkináza (A-kináza)
PKC	proteinkináza C
PLA₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RGS	regulátory G-proteinové signalizace
rpm	otáčka za minutu (round per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
SLB	Laemmliho solubilizační pufr (solubilization lysis buffer)
STEM	homogenizační pufr
TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	<i>N N N' N'</i> -tetramethylethylendiamin
TE	membránový pufr
TM	transmembránový úsek receptoru spřaženého s G-proteinem
TRH	thyreoliberin (thyrotropin-releasing hormone)
TRHR	thyreoliberinový receptor (thyrotropin-releasing hormone receptor)
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	thyreotropní hormon

VSV	virus vezikulární stomatitidy
VSV-TRHR-1-GFP	fúzní protein thyreoliberinového receptoru, GFP a VSV
VTGP	linie buněk odvozená od HEK-293
TE	membránový pufr
TX-100	Triton X-100
Tween 20	polyoxyethylensorbitan monolaurát
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
WD	tandemové repetice s centrálním motivem Trp-Asp
[³⁵S]GTPγS	guanosin-5'-[γ - ³⁵ S]GTP γ S

1. ÚVOD

Pro buňky je nezbytné umět vnímat podněty z okolí a adekvátně na ně reagovat. Buňka přijímá signální molekuly specifickou strukturou. Touto strukturou je receptor, který se většinou nachází na povrchu buňky v plazmatické membráně. Díky receptoru a na něj navazující signální kaskádě dochází k přenosu signálu z extracelulárního prostředí do nitra buňky.

Existují dva hlavní typy signálních molekul:

- hydrofobní, dobře rozpustné v tucích, které snadno procházejí cytoplazmatickou membránou a vážou se na intracelulární receptory,
- hydrofilní, rozpustné ve vodě, které nemohou buněčnou membránou procházet, protože ve svém nitru obsahují hydrofobní vrstvu. Receptory pro druhý typ signálních molekul proto musí mít své receptory v membráně. Mezi lipofilní molekuly patří např. steroidní a thyreoidní hormony, k hydrofilním látkám řadíme proteiny, peptidy, aminokyseliny a další ve vodě rozpustné molekuly.

Rozeznáváme tři hlavní typy membránových receptorů:

- receptory spojené s G-proteiny,
- receptory s vnitřní protein-kinázovou aktivitou,
- receptory spřažené s iontovými kanály.

O první skupině receptorů a o molekulách s nimi spřažených pojednává tato dizertační práce. Receptory spřažené s G-proteiny jsou nejrozsáhlejší receptorovou skupinou v organismu vůbec. Dělí se podle shody v aminokyselinovém řetězci do tří rodin. Z hlediska struktury jde o proteinové (přesněji glykoproteinové řetězce), které procházejí sedmkrát membránou, přičemž vytvářejí strukturu ne nepodobnou kapse, do níž se v případě podskupiny receptorů většinou pro malé signální molekuly (první rodina receptorů) příslušný ligand zasouvá (a poté interaguje s aminokyselinovými zbytky v transmembránových oblastech). Pokud je transmitterem peptidová molekula, váže se na dlouhý extracelulární konec (N-konec) řetězce. Receptory pro tyto látky patří do druhé rodiny a i zde hrají transmembránové oblasti úlohu v interakci receptoru s ligandem. Naproti tomu třetí rodina (metabotropní glutamátové receptory mGluR, GABA_B receptory) má značně dlouhý N-konec, na který se váží přirozené transmitery. U této rodiny receptorů nemají transmembránové oblasti význam pro interakci s ligandem, mohou se však uplatnit při vazbě syntetických ligandů. Ve všech případech navázání ligandu mění konformaci

receptoru, což vede ke změně afinity k transduceru (tedy přepojovací molekule), tj. ke G-proteinu.

Přenos hormonálního signálu přes buněčnou membránu je zprostředkován velmi přesnou konformační interakcí mezi GPCR a příslušným trimerním G-proteinem. Experimentální pozornost předních světových laboratoří je v této souvislosti orientována na výzkum lipidových modifikací těchto proteinů, především palmitoylace. Kyselina palmitová se reverzibilně váže jednak do C-koncové části většiny GPCRs a vytváří tak čtvrtou nitrobuněčnou „pseudo“ smyčku a rovněž se váže na N-koncovou část α podjednotky G-proteinu, kde zprostředkuje vazbu této bílkoviny na membránu. Není známo, jaký význam mají tyto dva typy palmitoylace pro funkční spřažení mezi námi zkoumaným receptorem spřaženým s G-proteinem a G-proteinem.

Receptory spřažené s G-proteiny a G-proteiny samotné hrají velmi významnou roli v celé řadě fyziologických i patologických procesů, a proto pochopení jejich molekulární podstaty je klíčem k pochopení jejich farmakologických vlastností, desenzitizace, internalizace i buněčného transportu.

2. CÍLE

Jak již bylo řečeno výše, receptory spřažené s G-proteiny mohou být palmitoylovány na C-konci molekuly, jejíž hydrofobní části prochází sedmkrát buněčnou membránou. Alifatický řetězec kyseliny palmitové vytváří membránovou kotvu, která je zanořena do hydrofobní zóny membrány. Dochází k vytvoření čtvrté, nitrobuněčné „pseudo“ kličky. Také trimerní G-proteiny mohou být palmitoylovány, a to v řadě pozicí na N-konci své molekuly. Hydrofobní část kyseliny palmitové váže α podjednotku G-proteinů do membrány. Není známo jaký význam mají tyto dva typy palmitoylace pro funkční spřažení mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem. Byl připraven fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ a jeho různým stupněm depalmitoylované mutanty. Těmito mutanty jsme transfekovali buněčnou linii HEK-293. Při následné analýze jejich vlastností jsme zjišťovali, jestli má palmitoylace receptoru a G-proteinu vliv na interakce mezi těmito dvěma molekulami, případně do jaké míry se podílí na přenosu signálu od GPCR ke G-proteinu. Dále byly připraveny konstrukty $G_{11\alpha}$ proteinu s mutacemi vazebného místa pro vazbu $\beta\gamma$ komplexu. Pomocí nich jsme zkoumali vliv interakcí $G_{11\alpha}$ proteinu s $\beta\gamma$ komplexem na receptorem zprostředkovanou aktivaci G-proteinu.

Receptory spřažené s G-proteiny, G-proteiny a další signální molekuly jako jsou caveoliny, flotilliny, src kinázy, fyn kinázy a mnoho dalších transmembránových (integrálních) i periferních membránových bílkovin se v řadě buněčných typů shlukují do struktur s vyšší organizací než je prosté rozpuštění individuálních molekul v buněčné membráně tak, jak je popisuje model tekuté mozaiky Singer-Nicholsona (fluid mosaic model). Základní vlastností těchto domén, okrsků či „poolů“ membránových bílkovin je, že jsou obklopeny částí buněčné membrány se specifickým lipidovým složením. Přednostně se v těchto částech buněčné membrány vyskytují glykolipidy, sfingolipidy a především cholesterol. Z metodického hlediska je významnou vlastností těchto membránových domén jejich rezistence vůči účinku detergentů. Více než 95% buněčné membrány je rozpuštěno při extrakci v prostředí neiontových detergentů jako je Triton X-100. Zůstává jen malá část (většinou méně než 1%), která vykazuje podstatně nižší hustotu než původní buněčné membrány. Této vlastnosti se využívá při izolaci membránových domén (detergent-rezistentní membránové domény, DRMs, viz. Materiál a Metody). Dalším úkolem dizertační práce bylo přispět k objasnění úlohy cholesterolu v membránových doménách a prokázat, že rozpuštění cholesterolu pomocí β -cyklodextrinu

vede k degradaci membránových domén, které byly izolovány flotací na hustotním sacharózovém gradientu. Pro přípravu těchto struktur jsem volila klasický postup, který vychází z extrakce tkáně či buněk v 1% Tritonu X-100. Při řešení tohoto úkolu jsem, podobně jako v první části práce, studovala G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$. Pracovali jsme s buněčnou linií E2M11 odvozenou od mateřské linie HEK-293 buněk, která stabilně exprimuje velké množství receptorů pro thyreoliberin (TRHR) a myší izoformu $G_{11\alpha}$ proteinu. Vysoký obsah tohoto G-proteinu v buňkách klonu E2M11 usnadňuje jeho detekci pomocí techniky imunoblot. Kromě myší izoformy $G_{11\alpha}$ proteinu je v těchto buňkách rovněž přítomna jeho endogenní forma, tj. lidský $G_{11\alpha}$ a endogenní lidský $G_{q\alpha}$ protein. Pro detekci G-proteinů třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ jsme použili protilátky orientované proti C-terminálnímu dekaeptidu, jehož sekvence je identická s posledními deseti aminokyselinami na C-konci těchto G-proteinů. Tyto protilátky mají vysokou specifitu ve smyslu rozlišení G-proteinů třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ od $G_{s\alpha}$, $G_{i\alpha}$ a $G_{o\alpha}$, ale jejich reaktivita vůči $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ je identická.

Jak již bylo řečeno výše, vazba $G\alpha$ podjednotek do buněčné membrány se uskutečňuje pomocí membránových kotev kyseliny palmitové. Zároveň se na membránové ukotvení podílí i další typ posttranslační modifikace, myristoylace. Kromě těchto vazeb se v klidovém stavu, tedy v nepřítomnosti hormonální stimulace (tj. když jsou $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ podjednotky spojeny do jednoho trimerního celku), uplatňuje vazba $G\alpha$ na $G\beta\gamma$ podjednotky, které jsou velmi hydrofobní. Při hormonální stimulaci dochází k funkčnímu rozpáření $G\alpha$ od $G\beta\gamma$ podjednotek a neaktivní trimerní komplex $G\alpha\beta\gamma$ se rozpadá na volné $G\alpha$ a $G\beta\gamma$. Je proto přirozené předpokládat, že dlouhodobá hormonální stimulace labilizuje vazbu $G\alpha$ na membránu. Samotné $G\alpha$ lze považovat za periferní bílkoviny protože neobsahují žádný transmembránový segment. Dřívější práce z naší laboratoře prokázaly, že po 16 hodinách stimulace vysokou dávkou hormonálního agonisty TRH lze ve výše uvedené buněčné linii (klon E2M11) prokázat solubilizaci $G\alpha$ podjednotek třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$. Náplní této části dizertační práce bylo analyzovat solubilní frakci této buněčné linie pomocí 2D elektroforézy a stanovit časový průběh tohoto děje. Naším úkolem rovněž bylo zvýšit reprodukovatelnost a kvalitu dělení bílkovin pomocí této metody.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Receptory spřažené s trimerními G-proteiny

3.1.1. Základní charakteristika receptorů spřažených s trimerními G-proteiny

Receptory spřažené s trimerními G-proteiny (GPCRs, G-protein-coupled receptors) jsou nyní nejpočetnější a nejlépe prostudovanou skupinou membránových receptorů. Tvoří rodinu proteinů, které jsou v lidském genomu kódovány přibližně 865 geny (Milligan a Kostenis, 2006). V savčím genomu zaujímají přibližně 1% (Morris a Malbon, 1999). GPCRs hrají klíčovou roli v mnoha významných fyziologických a patofyziologických procesech a zprostředkují odpovědi na nesmírně rozmanité extracelulární signální molekuly: hormony, neurotransmitery, chemokiny, vápenaté ionty. V neposlední řadě existují i senzorické receptory pro odoranty a fotony (Moller a kol., 2001; Pierce a kol., 2002).

Navázáním extracelulárních signálních molekul na tyto receptory dochází k jejich aktivaci. Aktivace GPCRs vyvolává aktivaci trimerních GTP-vazebných proteinů neboli G-proteinů, které předávají signál na efektor. Mezi efekторы trimerních G-proteinů patří enzymy účastníci se syntézy a degradace molekul intracelulárních sekundárních posílů, iontové kanály a proteiny MAPkinázové dráhy (Morris a Malbon, 1999). Aktivace efektorů poté vyvolává změny v nitrobuněčných koncentracích sekundárních přenašečů (cyklického adenosinmonofosfátu, cyklického guanosinmonofosfátu, diacylglycerolu, inositol-1,4,5-trisfosfátu, vápenatých iontů) a následně pak mnoho biologických dějů, např. aktivaci enzymů, regulaci exprese genů, vzrůst hladiny Ca^{2+} uvnitř buňky, odbourávání glykogenu, zrychlení srdeční frekvence, atd. (Morris a Malbon, 1999).

Nehledě na rozmanitost signálních molekul, které se na ně vážou, mají všechny dosud analyzované receptory spojené s G-proteiny podobnou strukturu (**Obr. 1**). Je jí jediný polypeptidový řetězec, který sedmkrát prostupuje lipidovou dvouvrstvou (transmembránové α -helixy, TM I - VII). Tyto receptory také nazýváme serpentínové (serpentine receptors). Jednotlivé α -helixy tvoří v membráně nepravidelný prsteneč. Každou transmembránovou oblast pak tvoří přibližně 20 až 27 aminokyselinových zbytků. Glykozylovaný N-konec polypeptidového řetězce je umístěn extracelulárně a karboxylový konec intracelulárně. Transmembránové segmenty jsou spojeny třemi extracelulárními (e1, e2, e3) a třemi intracelulárními (i1, i2, i3) smyčkami (Baldwin, 1993; Ji a kol., 1998).

Většina receptorů obsahuje také čtvrtou nitrobuněčnou „pseudo“ smyčku i4, která je vytvořena palmitoylací C-koncové části GPCR, která zprostředkuje vazbu této bílkoviny na membránu. 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 mezi receptory bývá i v délce intracelulární smyčky i3 (Baldwin, 1993). C-konec a intracelulární smyčky i2 a i3 mohou být reverzibilně fosforylovány na serinových a threoninových aminokyselinových zbytcích (Morris a Malbon, 1999).

GPCRs mají nejméně dvě vazebná místa: vazebné místo pro ligand a místo interagující s G-proteinem. Vazby ligandu se účastní následující oblasti: N-koncová část receptoru, tři extracelulární smyčky a vně orientované části jednotlivých TM segmentů. Toto zjištění však platí pouze pro velké proteinové ligandy. Naproti tomu malé molekuly se váží na vazebné místo utvořené transmembránovými segmenty uvnitř lipidické dvouvrstvy a molekuly střední velikosti interagují s transmembránovými úseky i s extracelulárními smyčkami (Ji a kol., 1998; Gershengorn a Osman; 2001). Jakmile dojde k navázání ligandu na receptor, indukují se v receptoru četné konformační změny. Dochází k mírné rotaci a posunu transmembránových segmentů, následkem čehož se odkrývají oblasti s aminokyselinovými zbytky, které jsou v neaktivním stavu nepřístupné pro G-proteiny, a které poté interagují s G-proteiny (Conklin a Bourne, 1993; Hogger a kol., 1995). Každý receptor se pravděpodobně specificky váže k určité skupině G-proteinů. Tento mechanismus zkoumá věda více než 20 let. Biochemické studie, zabývající se hlavně tvorbou chimerických receptorů, jsou používány k určení receptorových sekvencí, které udávají specifitu daného receptoru vůči G-proteinu. Další metoda využívá syntetických peptidů, které jsou zkonstruovány tak, aby napodobovaly nebo inhibovaly normální G-proteinové interakce. Mnoho těchto studií nám prozradilo, že selektivita rozpoznávání G-proteinu receptorem spřaženým s G-proteinem je dána četnými intracelulárními receptorovými místy (Moller a kol., 2001). Za vazbu G-proteinu je zodpovědné několik receptorových částí, především smyčky i2 a i3 a též i1 a C-konec. Jednotlivé aminokyseliny smyčky i3 hrají důležitou roli i v aktivaci G-proteinu (Moro a kol., 1993; Moro a kol., 1994; König a kol., 1989). Teorie, že selektivita receptorů pro jednotlivé G-proteiny je dána pouze jejich primární aminokyselinovou sekvencí, se však zdá být v rozporu s malým počtem pokusů, kde byl tento jev pozorován. Z toho vyplývá, že preference receptorů pro různé G-proteiny závisí i na jiných buněčných mechanismech, například na lokalizaci receptoru i G-proteinu v rámci plazmatické membrány, na tkáňové

specifitě a nemalou měrou i na interakcích s $\beta\gamma$ podjednotkou (Wess, 1997, Oliveira a kol., 1999).

Dosud bylo objeveno několik stovek různých lidských receptorů a receptorových podtypů sedmkrát prostupujících plazmatickou membránu. Jak již bylo zmíněno výše, podle primární aminokyselinové sekvence jsou tyto receptory rozděleny do tří hlavních skupin. Každá skupina vykazuje 25% aminokyselinovou homologii v transmembránové střední části a řadu charakteristických aminokyselinových zbytků a motivů. Prvním receptorem spřaženým s G-proteinem, u kterého byla určena primární aminokyselinová sekvence, se stal fotoreceptor rhodopsin (Hargrave, a kol., 1983; Nathans a Hogness, 1984). O několik let později byl osekvenován křeččí β_2 -adrenoreceptor, druhý z této skupiny receptorů (Dixon a kol., 1986). Teprve zjištění, že tyto dva receptory sdílejí sekvenční homologii, položilo základy této početné rodiny receptorů.

První skupina GPCRs (A) je největší. Zahrnuje receptory pro světlo v sítnici (rhodopsin), pro odoranty v čichové sliznici, pro peptidové hormony (TRH, bradykinin) a pro malé neurotransmitery jako jsou opiody či adrenalin (adrenergní receptory).

Druhá skupina (B) má přibližně 25 členů: receptory pro gastrointestinální peptidové hormony (sekretin, gastrin, vazoaktivní intestinální peptid, somatoliberin), adrenokortikotropní hormon (ACTH), kalcitonin a parathormon. Většina receptorů této skupiny interaguje s G_s -proteiny.

Poslední skupina (C) obsahuje metabotropní glutamátové receptory (mGluR), metabotropní receptory pro γ -aminomáselnou kyselinu ($GABA_B$ R) a receptory pro vápenaté ionty a chuťové receptory. Všichni členové této rodiny mají velmi dlouhý N-konec, který se zdá být rozhodujícím pro vazbu ligandu a aktivaci (Pierce a kol., 2002).

Podle Graul a Sadee (2001) existují ještě další tři skupiny GPCRs. Dvě samostatné rodiny tvoří feromonové receptory kvasinek Ste2 a Ste3 receptory. Do šesté skupiny pak patří cAMP receptory nalezené v *Dictyostelium Discoideum*.

Poměrně nedávno bylo objeveno, že jednotlivé receptory spřažené s G-proteiny mohou tvořit dimery či dokonce oligomery. Tato schopnost je velmi důležitá pro jejich funkci a její význam v signalizaci je předmětem intenzivního vědeckého bádání. Nejvíce se uplatňují metody využívající různé rezonanční přenosy energie (fluorescenční rezonanční přenos energie FRET, fluorescence resonance energy transfer; bioluminiscenční rezonanční přenos energie BRET, bioluminiscence resonance energy transfer), koimunoprecipitační či funkční rekonstituční techniky s využitím různých inaktivujících mutací (Milligan a kol., 2004b). Jedním z příkladů ovlivnění signalizace dimerizací

receptorů jsou receptory pro γ -aminomáselnou kyselinu, kde GABA_BR-1 tvoří heterodimer s GABA_BR-2 (White a kol., 1998). U GPCRs se může vyskytovat nejen homodimerizace ale též heterodimerizace, a stejně tak homooligomerizace i heterooligomerizace. Přičemž heterodimerizace a heterooligomerizace mohou vysvětlovat odlišné fyziologické odpovědi na jeden a tentýž ligand (Hanyaloglu a kol., 2002). Do skupiny receptorů tvořících oligomery patří například α_{1b} -adrenoreceptor (Milligan a kol., 2006) nebo receptor pro thyreoliberin (TRHR), u kterého se dokonce hormonální stimulací zvyšuje stupeň oligomerizace (Kroeger a kol., 2001; Hanyaloglu a kol., 2002). Postupem času se ukazuje, že dimerizace či oligomerizace hraje roli nejen v signalizaci. Například Lopez-Gimenez a kol., (2007) a Milligan a kol. (2006) ukázali na α_{1b} -adrenoreceptoru, že narušení oligomerizace mutací jeho transmembránových úseků blokuje zrání (N-glykozylace) a umístění receptoru do membrány.

3.1.2. Lipidové modifikace receptorů spřažených s trimerními G-proteiny

Acylace a deacylace proteinů jsou důležité pro správnou funkci a membránovou lokalizaci řady signálních molekul. Acylace je chemická reakce, při které nahrazujeme v organických sloučeninách atom vodíku zbytkem mastných kyselin (např. kyselina palmitová), acylem. Deacylace je děj opačný. K připojení zbytku mastné kyseliny (lipidu) k proteinu dochází posttranslačně nebo kotranslačně. Mezi nejčastější lipidové modifikace patří prenylace, myristoylace a palmitoylace. Prenylace zahrnuje farnesylyaci nebo geranylgeranylaci cysteinových zbytků na C-konci cílového proteinu, vytváří se mezi nimi thioetherová vazba. Farnesyl je patnácti-uhlíkatý izoprenoid, jehož připojení k danému proteinu je katalyzováno enzymem proteinfarnesyltransferáza. Geranyl je izoprenoid obsahující dvacet uhlíků a enzym katalyzující připojení této molekuly k cílovému proteinu se nazývá geranylgeranyltransferáza. Oba enzymy specificky rozeznávají sekvenci CAAX (tzv. CAAX box), kde X je jakákoliv aminokyselina a na ní částečně záleží, jakou mastnou kyselinou bude daný protein modifikován. Myristoylace probíhá kotranslačně na glycinových zbytcích N-konce cílového proteinu za pomoci enzymu N-myristoyltransferázy. Dochází k připojení čtrnácti-uhlíkaté nasycené mastné kyseliny (kyselina myristová) k cílovému proteinu pevnou a nevratnou amidovou vazbou. Při palmitoylaci dochází k vytvoření thioesterové vazby mezi cysteinem cílového proteinu a kyselinou palmitovou (C16:0) (Kalman a kol., 1995; Wedegaertner, 1998; Morris a Malbon, 1999; Qanbar a Bouvier, 2003). Jestli však je tento jev spontánní (autokatalytický) či je katalyzován enzymem, není známo. Naproti tomu depalmitoylace je

děj s největší pravděpodobností enzymatický, účastní se jej palmitoylthioesteráza (APT), též nazývaná acyl(protein)thioesteráza. Jelikož je thioesterová vazba typická pouze pro palmitoylaci, používáme pro tuto modifikaci také název thioacylace. Jedinou vlastností, kterou mají palmitoylované proteiny společnou, se zdá být trvalá nebo přechodná asociace s membránou jakéhokoliv typu. Některé bílkoviny mají jen jednu modifikaci palmitátem (β 2-adrenergní receptory), jiné dvě (rhodopsin) a některé dokonce několik ($G_{13\alpha}$) (Ponimaskin a kol., 2000; Qanbar a Bouvier, 2003). Některé proteiny jsou pouze palmitoylovány (GPCRs), jiné mají více typů modifikace, např. myristoylace u $G\alpha$ (Linder a kol., 1993).

Většina GPCRs obsahuje v oblasti intracelulárního C-konce jeden nebo více cysteinových zbytků. Tyto aminokyseliny jsou modifikovány kovalentní vazbou kyseliny palmitové. V krystalové struktuře rhodopsinu tvoří sekvence mezi posledním VII. transmembránovým segmentem a dvojicí thioacylovaných cysteinů osmý amfifilní α -helix. Palmitáty pak ukotvují tuto část receptoru k membráně a vzniká tak čtvrtá intracelulární smyčka, tzv. „pseudo“ smyčka (Palczewski a kol., 2000). Je velice pravděpodobné, že podobnou vlastnost vykazují i ostatní GPCRs. Tato oblast se též účastní interakcí s N- i C-koncem $G\alpha$ (Gether, 2000). Funkční analýzy mutantů postrádajících C-terminální cysteiny neodhalily obecnou společnou funkci palmitoylace receptorů spřažených s G-proteiny. Nicméně v závislosti na pozorovaném receptoru bylo popsáno několik různých efektů vlivu thioacylace. Palmitoylace může ovlivňovat fosforylaci, sequestraci (shlukování) či desenzitizaci (snížení biologické odpovědi na vnější signál, viz. níže) receptoru. V mnoha případech se ukazuje, že palmitoylace hraje důležitou roli také v transportu receptoru od endoplazmatického retikula (ER) do plazmatické membrány a v expresi funkčního receptoru na povrchu buňky. Tímto typem acylace může být také ovlivněna celá signalizační kaskáda vedoucí od receptoru, počínajíc změněnou specifitou receptoru ke G-proteinům s nimi spřažených (Bouvier a kol., 1995; Ross, 1995). Posledně jmenovaný jev byl zaznamenán u receptoru pro endothelin ET_{AR} , který za normálních podmínek interaguje s G-proteiny třídy G_q/G_{11} a G_s . Depalmitoylovaný ET_{AR} vykazoval nezměněnou ligandem indukovanou signalizaci přes G_s -proteiny, zatímco signalizace přes G_q vymizela (Hortsmeyer a kol., 1996). Naopak u endothelinového receptoru typu B je palmitoylace nezbytná pro funkční interakci s G_q - i G_i -proteiny (Okamoto a kol., 1997). Dalším příkladem pozitivního vlivu palmitoylace na signalizační kaskádu je muskarinový acetylcholinový receptor $M2$, u kterého mutace palmitát vazebných míst vede ke snížené

schopnosti aktivovat G_{α} a $G_{i2\alpha}$ (Hayashi a Haga, 1997). Naproti tomu depalmitoylace rhodopsinu hydroxylaminem zvyšuje aktivaci transducinu (Morrison a kol., 1991). Vedle negativního a pozitivního vlivu palmitoylace na signalizační kaskádu existuje i nulový. Příkladem může být α_{2a} -adrenergní receptor, kde mutace receptoru vedoucí k jeho depalmitoylaci neovlivnila významným způsobem funkční spřažení receptoru s G-proteinem (Kennedy a Limbird, 1993). Palmitoylace GPCRs nemusí být omezena jen na C-konec receptoru, jak ukazují pokusy s vazopresinovými receptory V1aR a V2R. Mutace cysteinů na C-konci těchto receptorů sice zmenšila stupeň palmitoylace, ale nevedla k úplné depalmitoylaci receptoru (Hawtin a kol., 2001).

V mnoha případech byla v souvislosti s palmitoylačním stavem receptoru zaznamenána změněná schopnost interakce s β -arrestinem následovaná endocytózou tedy desenzitizací receptoru. Desenzitizace GPCRs je spojena s fosforylací receptoru proteinkinázami A a C nebo kinázami receptorů spřažených s G-proteiny (GRKs). Fosforylace pomocí GRKs umožňuje navázání molekuly β -arrestinu na receptor, což vede k interakci s klathrinem následované endocytózou receptoru (viz. níže). Příkladně palmitoylace vazopresinového receptoru V2R zvyšuje množství navázaného β -arrestinu na tento protein, čímž dochází k endocytóze V2R (Charest a Bouvier, 2003). Naopak u β_2 -adrenergních receptorů vede ke zvýšené fosforylaci proteinkinázami A a β ARK (β -adrenergic receptor kinase; patří mezi GRKs) a následné desenzitizaci receptoru i za nepřítomnosti agonisty právě depalmitoylace receptoru. Zvýšený stupeň fosforylace je doprovázen i odpřažením receptoru od $G_{s\alpha}$ a sníženou schopností receptoru stimulovat adenylcyklázu (Moffett a kol., 1993).

Palmitoylace je děj reverzibilní a tudíž regulovatelný. Agonistou indukovaná stimulace receptoru zvyšuje obrát palmitátu vázaného jak na receptor tak na G-protein. U β_2 -adrenergního receptoru dochází vlivem vazby ligandu k receptoru ke zvýšení obrátu receptorem vázaného palmitátu a tedy k depalmitoylaci receptoru (Loisel a kol., 1996). Kolikrát přímo opačný efekt hormonální stimulace na acylaci je pozorován u jiných proteinů. Třeba u muskarinového acetylcholinového M2 receptoru došlo vlivem agonisty ke zvýšení stupně palmitoylace receptoru (Hayashi a Haga, 1997).

3.1.3. Adrenergní receptory

Mezi GPCRs patří receptory pro katecholaminy - adrenergní receptory. Tato skupina receptorů se pojí především s G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ a $G_{i\alpha}/G_{o\alpha}$ a s $G_{s\alpha}$

proteiny. Adrenergní receptory odpovídají na adrenalin či noradrenalin; nejsilnějším agonistou těchto receptorů je však uměle připravený isoprenalin, který byl ve fyziologických studiích poprvé použit v roce 1948 Ahlquistem a jeho různá účinnost v různých tkáních posloužila jako podklad pro rozlišení adrenergních receptorů typu α a β . Metabolickým prekurzorem obou hormonů je dopamin. Pomocí enzymu dopamin β -hydroxylázy vzniká noradrenalin. V dalších stupních působí enzym fenylethanolamin-N-methyltransferáza, která tvoří z noradrenalinu adrenalin. Adrenalin může být syntetizován ještě druhým způsobem, a sice z dopaminu reakcí katalyzovanou enzymy N-methyltransferáza a fenylamin- β -hydroxyláza, které přes meziproduct epinin tvoří adrenalin.

Noradrenalin se účastní přenosu na synapsích autonomního nervového systému, konkrétně se vylučuje z postgangliových sympatických neuronů. Oba neuropřenašeče se vylučují také z dřene nadledvin, které byly původně sympatickým gangliem. Noradrenergní nervový systém se jako celek uvádí v činnost při krizových (stresových) situacích. Například noradrenergní podráždění tlumí akomodaci a rozšiřuje zornici, zvyšuje srdeční frekvenci, krevní tlak, hodnoty glykémie a mastných kyselin a v neposlední řadě způsobuje též vazokonstrikci kožních cév (Barnes, 1981).

Jak jsem již uvedla, v roce 1948 navrhl Ahlquist rozlišovat adrenergní receptory na α - (zprostředkující vazokonstrikci) a β -adrenergní (zprostředkující vazodilataci a srdeční stahy) (Black, 1976; Lefkowitz, 2004). Každá z těchto tříd byla poté na základě farmakologických a funkčních kritérií ještě rozdělena na podtřídy α_1 a α_2 (Langer, 1974; Lomasney a kol., 1986) a na β_1 a β_2 (Lands a kol., 1967; Lomasney a kol., 1986). Dnes rozlišujeme ještě pátou podtřidu β_3 (Wess, 1998). Mezi α_1 -adrenergní receptory řadíme α_{1a} -, α_{1b} - a α_{1d} -adrenoreceptory a tyto se pojí s heterotrimerními G-proteiny třídy G_q/G_{11} (viz. níže). Všechny tři receptory jsou produkty tří separátních genů na odlišných chromozomech (Michel a kol., 1995). Jejich místem výskytu jsou hladké svaly. Adrenoreceptory α_{2a} , α_{2b} , α_{2c} a α_{2d} se nacházejí v presynaptických adrenergních zakončeních a interagují s G_i/G_o -proteiny. α_{2d} -adrenoreceptor je myší a hovězí homolog lidského α_{2c} -adrenoreceptoru. β_1 -, β_2 - a β_3 -adrenoreceptory se přednostně vyskytují v srdečním svalu (β_1 -adrenoreceptory), hladké svalovině dýchacího traktu (β_2 -adrenoreceptory) a bílé a hnědé tukové tkáni (β_3 -adrenoreceptory). Jejich existence byla rovněž prokázána v mozku a ledvinách. β -adrenergní receptory stimulují G_s -protein, zvyšují aktivitu adenylcyklázy a nitrobuněčné hladiny cAMP. β_2 -adrenergní receptory v srdečním svalu a β_3 -adrenergní receptory v hnědé tukové tkáni však rovněž interagují

s Gi-proteiny (Wess, 1997). Adrenergní receptory mají řadu agonistů a antagonistů. Mezi antagonisty α -adrenoreceptorů patří fentolamin či prazosin (Willems a kol., 2003). β -adrenergní receptory zase blokuje propranolol. Naopak isoproterenol předešlý typ receptoru stimuluje (Ransnas a kol., 1989) a fenylefrin je pak agonistou α_1 -adrenergních receptorů (Willems a kol., 2003).

Část této práce pojednává o α_{1b} -adrenoreceptoru, jehož aktivace vede přes G-proteiny třídy G_q/G_{11} k aktivaci fosfolipázy $C\beta$ a produkci sekundárních posílů (viz. níže). Existují pouze velmi sporé informace ohledně funkce tohoto receptoru. Jak už bylo řečeno, nachází se v hladkých svalech a to především arterií, kde se podílí na jejich kontrakcích a přispívá tak k regulaci krevního tlaku (Cavalli a kol., 1997; Piascik a kol., 1997). Předpokládá se jeho role ve vazokonstrikci karotid arteriovenózních anastomóz (prekapilární komunikace mezi tepnami a žilami) (Willems a kol., 1999) a karotidálních arteriálních kroužků (Kawai a kol., 1988). Tyto poznatky by mohly v budoucnu předurčovat α_{1b} -adrenoreceptor jako možný cíl pro léky proti migréně (Willems a kol., 2003). Překvapivě byl α_{1b} -adrenoreceptor nalezen také v psí plicní arterii, kde zprostředkovává fenylefrinem indukovanou kontrakci hladkého svalstva (Sohn a kol., 2005). Spekuluje se i o tom, že by α_{1b} -adrenoreceptor mohl interagovat s $G_s\alpha$ proteinem, tím stimulovat adenylcyklázu a podílet se tak na produkci cAMP (viz. níže). To bylo pozorováno v CHO buňkách (Chinese hamster ovary cells), které byly tímto receptorem transfekovány (Horie a kol., 1995).

3.1.4. Thyreoliberinové receptory

Také thyreoliberinový receptor (TRHR, thyrotropin-releasing hormone receptor) patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. V důsledku navázání ligandu tyto receptory ovlivňují mnoho buněčných procesů. TRHR se hojně nachází v centrálním i periferním nervovém systému. Podílí se na kontrole syntézy a sekrece thyreoideu stimulujících hormonů (thyreotropní hormon TSH) a prolaktinu z předního laloku hypofýzy. Ligandem TRHR je thyreoliberin (TRH, thyrotropin releasing hormone), malý neuropeptid se sekvencí pyroGlu-His-Pro-NH₂. TRH působí jako neurotransmiter a neuromodulátor. V hypotalamo-hypofyzární ose u savců je tento hormon syntetizován v hypotalamu a odtud je uvolňován a transportován krevním řečištěm do adenohipofýzy (Matre a kol., 1999; Lackey, 1992; Gershengorn a Osman, 1996). V adenohipofýze působí na specifické buňky, které po vazbě TRH na TRH receptor začínají produkovat další hormony, thyreotropin a prolaktin. Konečným stupněm této kaskády je štítná žláza,

kteřá po stimulaci thyreotropinem začíná produkovat thyroidální hormony, thyroxin a trijodthyronin. Thyroxin a trijodthyronin odcházejí krevním řečištěm do celého těla a ovlivňují širokou škálu fyziologických procesů jako je růst, iontová rovnováha, vývoj organismu i citlivost hormonální odpovědi na jiné hormony, např. katecholaminy.

TRH receptor podobně jako adrenergní receptory interaguje s G-proteiny třídy G_q/G_{11} , které stimulují fosfolipázu $C\beta$ (viz. níže) (Hsieh a Martin, 1992; Drmota a kol., 1998a).

U myši a krys byly nalezeny dva podtypy TRH receptoru, tzv. TRHR-1 (dlouhá izoforma) a TRHR-2 (krátká izoforma) (Cao a kol., 1998). Oba dva receptory jsou produktem jediného genu a jsou proto výsledkem rozdílného sestřihu na úrovni mRNA. TRHR-1 a TRHR-2 jsou z 50% homologní, vykazují podobnou vazebnou afinitu k TRH a aktivují stejné signalizační dráhy. Oba typy TRH receptorů jsou exprimovány v rozdílných oblastech mozku a míchy. Přesto však nalezneme místa, kde se oba tyto receptory vyskytují společně (Bilek, 2000; Cao a kol., 1998; Itadani a kol., 1998; O'Dowd a kol., 2000). TRHR-1 je po navázání agonisty rychle internalizován klathrinovou cestou, tj. endocytózou zprostředkovanou váčky obsahujícími bílkovinu klathrin. Mechanismus internalizace TRHR-2 není znám (Heding a kol., 2000; Yu a Hinkle, 1999).

3.2. Trimerní G-proteiny

3.2.1. Základní charakteristika trimerních G-proteinů

Za objev trimerních G-proteinů a jejich roli v přenosu signálu přes buněčnou membránu obdrželi Alfred G. Gilman a Martin Rodbell v roce 1994 Nobelovu cenu (Svoboda, 1997). Ovšem již v roce 1971 formuloval Martin Rodbell hypotézu, že mezi receptorem pro glukagon a adenylcyklázou existuje guaninové nukleotidy vážící protein, který po aktivaci receptoru zprostředkovává přenos informace mezi nimi (Rodbell a kol., 1971).

G-proteiny jsou regulační buněčné bílkoviny, které jsou aktivovány vazbou guanosintrifosfátu (GTP). Podle struktury rozlišujeme trimerní a monomerní G-proteiny. Monomerní, tzv. malé G-proteiny se účastní mnoha dějů souvisejících s rozličnými regulačními procesy. Mezi monomerní G-proteiny patří elongační faktory EF-Tu a EF-G, dále Ras, Rab, Rap, Ran, Rac, Raf, ARF a mnoho dalších. Jejich molekulová váha se

nachází v oblasti 20 - 30 kDa. Zajišťují regulaci široké škály buněčných procesů od proteosyntézy, diferenciaci a proliferace až k vezikulárnímu membránovému transportu (membrane traffic) a sekreci bílkovin (Svoboda, 1997).

Přenos signálu z GPCRs na efekторы je zprostředkován heterotrimerními G-proteiny. Trimerní G-proteiny, stejně jako monomerní G-proteiny, patří mezi GTPázy. Trimerní G-proteiny jsou tvořeny třemi polypeptidy (α , β a γ), které jsou strukturálně a funkčně odlišné. Podjednotka α váže GTP a štěpí jej na guanosindifosfát (GDP) a pyrofosfát (anorganický fosfát). Podjednotky β a γ tvoří dimer, který disociuje pouze denaturací a je tedy funkčním monomerním (Hamm a Gilchrist, 1996; Neer, 1995). Vzhledem k zaměření práce pojmem G-proteiny jsou myšleny výlučně trimerní G-proteiny.

Dnes je známo šestnáct různých genů pro α podjednotky, pět genů pro β podjednotky a dvanáct genů pro γ podjednotky, což umožňuje úvahu nad množstvím existujících kombinací jednotlivých podjednotek v rámci trimerní molekuly. Takových kombinací pak existuje více než tisíc. Nicméně se zdá, že počet kombinací je omezen a existují preferované kombinace podjednotek, které spolu mohou interagovat a tvořit funkční trimer (Hildebrandt, 1997; Cabrera-Vera a kol., 2003).

3.2.2. Aktivace a deaktivace trimerních G-proteinů

V nestimulovaném stavu je na podjednotce α vázán GDP a G-protein není aktivní (**Obr. 2**). Receptor s navázaným ligandem interaguje s G-proteinem a působí na něj jako výměnný faktor guaninového nukleotidu (GEF, guanine nucleotide exchange factor), tedy stimuluje uvolnění GDP z guanin-nukleotidového vazebného místa α podjednotky, které je následováno navázáním GTP na α podjednotku. Obsazení nukleotidového vazebného místa na α podjednotce G-proteinu molekulou GTP znamená aktivaci této podjednotky. Následují konformační změny celého heterotrimeru. Afinity aktivované α podjednotky pro receptor i pro jednotky β a γ se snižuje a dochází k rozpadu heterotrimeru na α podjednotku a $\beta\gamma$ dimer. Tyto dvě samostatné molekuly mohou volně difundovat po membráně. Obě aktivované části G-proteinu: α podjednotka a komplex $\beta\gamma$ mohou přímo interagovat s efektory v plazmatické membráně. Efekторы pak předávají signál (druhý signalizační posel) k dalším místům v buňce. Aktivní stav α podjednotky trvá do té doby, než je GTP hydrolyzován vnitřní GTPázovou aktivitou podjednotky $G\alpha$. Tento děj je urychlen v důsledku aktivity GTPázu aktivujících proteinů (GAP, GTPase-activating protein). Nejpočetnější skupinou proteinů s touto funkcí jsou tzv. regulátory funkce

G-proteinové signalizace (RGS proteiny, regulators of G-protein signalling) (Hollinger a Hepler, 2002). Čím déle mají efekторы navázanou podjednotku α nebo $\beta\gamma$, tím silnější a delší bude předávaný signál. Hydrolyza navázaného GTP na GDP umožňuje znovunavázání α podjednotky na $\beta\gamma$ dimer. Tím je ukončen aktivační cyklus a G-protein je znovu připraven pro receptorem regulovanou aktivaci. Hydrolyza GTP obecně nastává během několika sekund po aktivaci G-proteinu (Bourne a kol., 1989; Neer, 1995).

Důležitou vlastností přenosu signálu prostřednictvím G-proteinů je zesílení, amplifikace signálu. Během výše popsaného cyklu k ní může dojít dvakrát. Je-li efektorová molekula enzymem produkujícím druhé posly, může za dobu interakce s jednou α podjednotkou vytvořit mnoho molekul druhých poslů. K amplifikaci signálu dochází také tím, že jediný komplex ligand - receptor může aktivovat několik G-proteinů za sebou (Morris a Malbon, 1999).

3.2.3. Podjednotka $G\alpha$

Podjednotky $G\alpha$ jsou regulační proteiny o velikosti 39 - 52 kDa. Vykazují 56 - 95% homologii aminokyselinové sekvence. Podjednotka $G\alpha$ obsahuje dvě důležité části: GTPázovou a helikální sekvenci aminokyselin (**Obr. 1**). GTPázový segment (G-doména) obsahuje místa pro navázání guaninového nukleotidu, receptoru, efektoru i $\beta\gamma$ dimeru a zajišťuje též hydrolyzu GTP. G-doména sestává z pěti α -helixů ($\alpha_1 - \alpha_5$) a šesti vláken β -skládaných listů ($\beta_1 - \beta_6$), z nichž pět je paralelních a jeden antiparalelní. Na povrchu této G-domény je umístěna hydrofobní kapsa, kam se váže guaninový nukleotid. Funkce helikální části $G\alpha$ není jasná. Helikální segment se možná účastní hydrolyzy GTP a zřejmě se rovněž může podílet na vazbě $G\alpha$ na efektor a receptor (Conklin a Bourne, 1993; Neer, 1995; Kjeldgaard a kol., 1996; Cabrera-Vera a kol., 2003).

Vazba $G\beta\gamma$ podjednotky na $G\alpha$ podjednotku G-proteinu pravděpodobně probíhá ve dvou oblastech: prvních 25 aminokyselin $G\alpha$ a část tvořící α_2 -helix. Za vazbu efektoru jsou zodpovědny α_2 -helix a část vazebného místa pro $\beta\gamma$ dimer. Tímto způsobem je zajištěno, že $G\alpha$ podjednotka nemůže současně vázat jak efektor tak $G\beta\gamma$ dimer. To je velice důležité z funkčního hlediska vzhledem k tomu, že pouze volné $G\alpha$ či $G\beta\gamma$ podjednotky jsou schopny aktivovat efekторы. Trimerní komplex G-proteinu je neaktivní. Vazba $G\beta\gamma$ na $G\alpha$ je z funkčního hlediska spojena s inaktivací (deaktivací) $G\alpha$ (Conklin a Bourne, 1993; Neer, 1995).

Za vazbu G-proteinu na receptor je zodpovědný především C-konec $G\alpha$ podjednotky, zvláště posledních pět aminokyselinových zbytků (Bourne, 1997; Wess,

1997). Dokladem toho je příkladně fosforylace $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu na Tyr⁴, která se ukázala jako velice potřebná pro spřažení proteinu ke glutamátovému receptoru a pro jeho aktivaci (Umemori a kol., 1997). Avšak C-konec není jediným místem zodpovědným za specifickou vazbu ke GPCRs. Také dva aminokyselinové zbytky v α_4 -helixu se zdají být určujícími faktory pro funkční spřažení s receptorem (Bae a kol., 1999). Klíčové aminokyselinové zbytky byly mimo jiné nalezeny též například v oblasti N-konce (Taylor a kol., 1994), α_2 , α_4 (Lee a kol., 1995) či α_5 -helixu (Conklin a Bourne, 1993; Neer, 1994). Úseky $G\beta$ i $G\gamma$ podjednotek se také mohou účastnit interakcí s receptorem (Taylor a kol., 1994; McIntire a kol., 2001).

3.2.4. Podjednotky $G\beta\gamma$

Také $G\beta\gamma$ dimer hraje důležitou roli v regulaci efektorů. $\beta\gamma$ komplex samostatně reaguje s některými efektorovými molekulami, může způsobit otevření určitých K^+ kanálů, aktivaci PI 3-kináz a fosfolipáz A_2 a $C\beta$ a aktivaci nebo inhibici určitých podtypů adenylcyklázy (Schwindinger a Robishaw, 2001). Jeho další velice důležitou funkcí je zakotvení trimeru $\alpha\beta\gamma$ do membrány, což je zprostředkováno pomocí prenylové skupiny na γ podjednotce (Neer, 1995).

Existuje pět různých typů $G\beta$ podjednotek (Watson a kol., 1994). Tyto varianty vykazují 50 - 83% podobnost v aminokyselinové sekvenci (Hamm a Gilchrist, 1996). Každá $G\beta$ podjednotka obsahuje přibližně 340 aminokyselinových zbytků a její molekulární hmotnost je 35 kDa. Lineární sekvence těchto proteinů se skládá ze sedmi až osmi opakujících se sekvenčních motivů přibližně o 43 aminokyselinách, kde se hojně vyskytuje Trp-Asp sekvence (tzv. WD-40 motiv) (Garcia-Higuera a kol., 1998). Tyto motivy tvoří β -vrtulovou strukturu, která interaguje s $G\alpha$. N-terminální oblast β podjednotky je tvořena amfipatickým α -helixem, který se obtáčí okolo N-terminálního helixu γ podjednotky a vytváří tak strukturu dvou paralelně se obtáčejících šroubovic (coiled coil) (**Obr. 1**) (Neer, 1995; Lambright a kol., 1996, Cabrera-Vera a kol., 2003).

$G\gamma$ podjednotky jsou mnohem různorodější než $G\beta$, existuje celkem dvanáct typů těchto podjednotek. Individuální izoformy se liší molekulovou hmotností, která leží v rozmezí 7,3 - 8,5 kDa. Struktura $G\gamma$ je tvořena dvěma α -helixy spojenými smyčkou (**Obr. 1**) (Cabrera-Vera a kol., 2003). Od $G\beta$ podjednotek se podstatně odlišují i v primární aminokyselinové sekvenci (Iniguez-Lluhi a kol., 1992; Clapham a Neer, 1993). C-konec všech $G\gamma$ obsahuje sekvenci CAAX, kde A je jakákoliv alifatická aminokyselina a X je jakákoliv aminokyselina. (Kalman a kol., 1995). Selektivita $G\gamma$ pro různé $G\beta$ je z velké

části určena 14 aminokyselinami ve střední části této podjednotky $G\gamma$ (Spring a Neer, 1994).

3.2.5. Lipidové modifikace trimerních G-proteinů

Trimerní G-proteiny jsou periferní membránové bílkoviny, které získávají připojení k membráně mnoha způsoby a také kombinacemi těchto způsobů. Mezi tyto způsoby patří právě lipidové modifikace ale také protein-fosfolipidové interakce (polybazické domény, specifické sekvenční motivy) či protein-proteinové interakce (s $\beta\gamma$ podjednotkou). Tyto různé mechanismy zajišťující ukotvení proteinu v membráně nejsou navíc nezbytně nezávislé, tedy následky odstranění či přidání jednoho typu „nástroje“ připojení k membráně mohou být velmi rozdílné, což způsobuje potíže při zevšeobecnění a utřídění této problematiky (Qanbar a Bouvier, 2003). Všeobecně, deacylovaná α podjednotka G-proteinu není asociována s plazmatickou membránou a vykazuje mnohem nižší afinitu k dimeru $\beta\gamma$.

$G\alpha$ podjednotky vykazují velkou diverzitu nejen ve struktuře ale také v lipidových modifikacích. S rhodopsinem spřažený G-protein transducin ($G_t\alpha$) je modifikován několika mastnými kyselinami, mezi něž patří i kyselina myristová. $G_t\alpha$ však není palmitoylován (Kokame a kol., 1992). $G_{\text{gust}}\alpha$ je myristoylován, ale stejně jako transducin není palmitoylován (Hoon a kol., 1995). Ostatní $G\alpha$ jsou vedle případných dalších lipidových modifikací vždy palmitoylovány, většinou na cysteinových zbytcích na N-konci molekuly. Pouze jedenkrát palmitoylovány jsou $G_{s\alpha}$ a $G_{12\alpha}$ (Wedegaertner, 1998; Ponimaskin a kol., 1998). Dvojitě palmitoylaci má $G_{q\alpha}$ a pravděpodobně i $G_{16\alpha}$ (Wedegaertner, 1998). $G_{11\alpha}$ je také dvakrát palmitoylován, a sice na Cys⁹ a Cys¹⁰ (McCallum a kol., 1995). $G_{13\alpha}$ nese dokonce tři palmitové kyseliny (Ponimaskin a kol., 2000). $G_{i\alpha}$, $G_{o\alpha}$ a $G_{z\alpha}$ jsou modifikovány jak kyselinou palmitovou tak myristovou (Wedegaertner, 1998).

Jak již bylo uvedeno výše, palmitoylace je možná děj autokatalytický. Co však považují za ještě zajímavější je, že tato spontánní reakce může být navíc umocněna či zrychlena přítomností dimeru $\beta\gamma$ (Duncan a Gilman, 1996). Palmitoylace $G\alpha$ je velmi důležitá pro ukotvení tohoto proteinu k vnitřní straně plazmatické membrány. Ačkoliv asociace $G\alpha$ s $\beta\gamma$ podjednotkami a myristoylace $G\alpha$ jsou možná dostačujícími faktory pro připojení $G\alpha$ k vnitřní straně plazmatické membrány, zdá se, že palmitoylace tento jev zesiluje (Yang a kol., 2001). Není proto velkým překvapením, když mutace palmitát vazebných míst vyústí navzdory přítomnosti výše zmíněných faktorů ve zvýšenou solubilizaci či nesprávné umístění proteinu v buňce. To bylo například pozorováno

u mutantů $G_{11\alpha}$ proteinu, kde mutanty $Cys^9SerG_{11\alpha}$ a $Cys^{10}SerG_{11\alpha}$ byly částečně solubilizovány a dvojitý mutant $Cys^{9,10}SerG_{11\alpha}$ byl přítomen v solubilní frakci v ještě větším množství. Navíc takto depalmitoylovaný mutant je-li koexprimován s GPCRs může zabraňovat aktivaci G-proteinu. Tedy množství membránově vázaného G-proteinu v buňkách s exprimovanými mutanty odpovídalo stupni stimulace kotransfekovaného TRH receptoru vlivem působení hormonu TRH v porovnání s nemodifikovaným $G_{11\alpha}$ proteinem (Wise a kol., 1997). Některé dvojitě mutované proteiny $Cys^{9,10}SerG_{11\alpha}$, které stále byly membránově vázané, vykazovaly rezistenci vůči solubilizaci cholátem sodným, což naznačuje, že palmitoylaci odolný mutant je spíše nefunkční, možná špatně složený protein (McCallum a kol., 1995).

Mutace míst vázících kyselinu palmitovou může záviset i na typu buňky. Depalmitoylovaný $G_s\alpha$ mutant je v HEK-293 buňkách lokalizován v cytosolu (Wedegaertner a kol. 1993), zatímco v COS buňkách (odvozené od ledvinných buněk kočkodana obecného) je připojen k membráně (Mumby a kol., 1994). Je zajímavé, že tyto protichůdné výsledky byly pozorovány i po stimulaci receptoru. Někteří autoři se domnívají, že v případě některých G-proteinů po stimulaci buněk agonistou dojde k uvolnění $G\alpha$ z membrány do cytosolu (Wedegaertner a Bourne, 1994; Wedegaertner a kol., 1995; Svoboda a kol., 1996; Drmota a kol., 1998b), což je provázeno odštěpením palmitátu z této podjednotky. Aktivací indukované uvolnění α podjednotky tak může desenzitizovat nebo tlumit signální transdukcii a to tím, že odstraní α podjednotku z dosahu efektorů v plazmatické membráně. Podle jiných autorů aktivovaná α podjednotka po depalmitoylaci neopouští membránu a dochází pouze k jejímu přesunu v rámci plazmatické membrány (Mumby, 1997; Huang a kol., 1999). V následujících studiích mutace palmitoylačních míst $G_q\alpha$ bránily proteinu v připojení k membráně, avšak receptorová stimulace neovlivnila membránovou asociaci $G_q\alpha$, přestože podpořila obrát palmitátu (Hughes a kol., 2001). Tyto výsledky je možné uzavřít tak, že palmitoylace $G\alpha$ je pravděpodobně zapotřebí pro jeho ukotvení v membráně, ale pravděpodobně již není nezbytná pro udržení proteinu v membráně po dobu stimulace receptoru. To může znamenat, že existují ještě další faktory určující membránovou asociaci $G\alpha$ (Hughes a kol., 2001).

Možná je však také důležité rozlišovat, zda efekt nepřítomnosti palmitátu v proteinu je důsledkem toho, že je daný protein depalmitoylován (ať už chemicky či enzymaticky) nebo že není substrátem pro palmitoylaci z důvodu postrádání cysteinů. Tento problém byl nastíněn v práci Hepler a kol (1996), kde se mutanti postrádající Cys^9 a Cys^{10} chovali

odlišně v porovnání s proteiny depalmitoylovanými enzymem acylproteinthioesterázou. Mutanti na rozdíl od deacylovaných proteinů jen velmi slabě aktivovali fosfolipázu C a navíc ještě vykazovali poškozenou interakci s muskarinovým cholinergním receptorem M1. Podobné výsledky jsem již zmínila výše (McCallum a kol., 1995).

Lipidové modifikace též určují, zda se budou dané proteiny vyskytovat v mikrodoménách (DRMs; viz. níže). Např. teprve palmitoylace již myristoylované $G_{11\alpha}$ je určující pro plnou asociaci tohoto proteinu k membránovým doménám typu caveol (viz. níže) (Galbiati a kol., 1999). Myristoylace je často podnětem a nezbytným předpokladem pro následující palmitoylaci (Galbiati a kol., 1994; Mumby a kol., 1994). Ovšem existuje celá řada palmitoylovaných bílkovin, které se v doménách nepodařilo prokázat (Resh, 1999). To znamená, že ani palmitoylace není někdy plně dostačující pro lokalizaci G-proteinů v doménách.

Jak jsem se již zmínila výše, $G\gamma$ podjednotky jsou předmětem pouze jediného typu lipidové modifikace, a sice prenylace (Lai a kol., 1990). Tento typ lipidové modifikace je ireverzibilní a nesouvisí s aktivací signálních kaskád, ale je nezbytný pro připojení $G\beta\gamma$ dimeru k membráně. O $G_{1\gamma}$, $G_{8\gamma}$ a $G_{11\gamma}$ je známo, že jsou farnesylované. Ostatní γ podjednotky jsou modifikovány geranylgeranylem. Po modifikaci cílového proteinu je tento ještě dodatečně methylován na C-konci. Karboxymethylace C-konce $G\gamma$ zřejmě moduluje afinitu jeho membránového připojení (Cabrera-Vera a kol., 2003). Acylace $\beta\gamma$ dimeru dále hraje důležitou roli v připojení tohoto komplexu ke $G\alpha$ podjednotce, efektoru i receptoru (Gao a kol., 1987; Graber a kol., 1992; Iniguez-Lluhi a kol., 1992; Ueda kol., 1994). Na tomto místě je také důležité si uvědomit, že přerušení interakcí $\beta\gamma$ podjednotek s α podjednotkou může negativně ovlivňovat na receptoru závislou signalizaci. Mutace míst v $G\alpha$ zprostředkujících vazbu $G\alpha$ s $\beta\gamma$ dimerem redukuje jejich vzájemnou interakci a dále inhibuje palmitoylaci $G\alpha$ a jeho ukotvení v membráně. Takový mutant se pak nachází spíše v solubilní než membránové frakci. To vše má za následek neúspěšnou transdukcí signálu z aktivovaného receptoru na efektor (Evanko a kol., 2005). Interakce $\beta\gamma$ podjednotek s $G\alpha$ tedy podněcuje palmitoylaci $G\alpha$. Tím je též zajištěna těsná asociace $G\alpha$ s membránou. Navíc palmitoylovaná $G\alpha$ váže $\beta\gamma$ s 5x větší afinitou. Tedy vazba $\beta\gamma$ podjednotek a palmitoylace $G\alpha$ se recipročně potencují (Iiri a kol., 1996). To ovšem neznamená, že by palmitoylace $G\alpha$ byla podmínkou pro interakci s $\beta\gamma$. I depalmitoylovaná α podjednotka může s dimerem $\beta\gamma$ interagovat (Stevens a kol., 2001). Navíc protein $G\alpha$ mající mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer, je-li modifikován kyselinou myristovou a palmitovou, zachovává membránovou lokalizaci G-proteinu a svou schopnost

palmitoylace. To znamená, že vazba komplexu $\beta\gamma$ je pro $G\alpha$ rozhodujícím prvkem v připojení k membráně a také nezbytným předpokladem pro jeho palmitoylaci. Zatímco myristoylace může obnovit membránovou lokalizaci a palmitoylaci $G_{q\alpha}$ mající mutaci ve vazebném místě pro vazbu $\beta\gamma$ dimeru (Evanko a kol., 2000). Dále je zajímavé, že i overexprese $\beta\gamma$ v HEK-293 buňkách obnovuje membránovou lokalizaci a palmitoylaci $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ podjednotek majících mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer. Tedy tyto mutované α podjednotky jsou zcela závislé na koexpresi exogenního $\beta\gamma$ dimeru pro svoji řádnou membránovou lokalizaci. Dochází k reciproční podpoře α a $\beta\gamma$ podjednotek ohledně jejich připojení k plazmatické membráně. Z toho všeho vyplývá, že pro membránovou lokalizaci α podjednotky je zapotřebí její palmitoylace i interakce s $\beta\gamma$ dimerem (Evanko a kol., 2001). Jiné lipidové modifikace $\beta\gamma$ podjednotky, než je prenylace, eukaryotní organizmy zdá se nemají nebo to aspoň doposud nebylo objeveno. Kyselinu palmitovou váže jen $G\gamma$ (Ste18p) u kvasinek (Hirschman a Jenness, 1999). Acylace a deacylace G-proteinů se tedy uplatňují v regulaci jejich buněčné lokalizace. Dále mají vliv na jejich vzájemné interakce a také interakce mezi nimi a efektory či receptory, čímž významně ovlivňují přenos signálu.

Pro odstranění thioacylace z daného proteinu se kromě cholátu sodného (McCallum a kol., 1995), acylproteinthioesterázy (Qanbar a Bouvier, 20003) a dithiothreitolu (Milligan a Kostenis, 2006) používá i hydroxylamin (Morrison a kol., 1991; Linder a kol., 1993; Wedegaertner a Bourne, 1994; Chamberlain a Burgoyne, 1998, Ugur a kol., 2003). Již výše jsem se zmínila o experimentech autorů Morrison a kol. (1991) s hydroxylaminem. V této práci ukázali, že hydroxylaminem způsobená depalmitoylace rhodopsinu kromě zvýšení na světle závislé aktivace transducinu také inhibuje regeneraci rhodopsinu (reinkorporace 11-*cis*-retinalu do molekuly opsinu), ale nemá žádný vliv na světlem závislou vazbu receptoru k transducinu. Také McCallum a kol. (1995) kromě výše uvedeného ukázali, že protein $G_{11\alpha}$ je cholátem sodným depalmitoylován a solubilizován, tedy se nachází v rozpustné cytosolární frakci.

3.2.6. Klasifikace trimerních G-proteinů

Všeobecně jsou G-proteiny tříděny podle struktury a funkčních vlastností α podjednotek. Na základě aminokyselinové sekvence je řadíme do čtyř tříd. Zatím bylo objeveno celkem 21 $G\alpha$ podjednotek. Následující přehled je zpracován podle literárních údajů Birnbaumer a kol., 1990; Simon a kol., 1991; Hamm a Gilchrist, 1996; Milligan a kol., 1996; Novotny a Svoboda, 1998.

3.2.6.1. Třída $G_s\alpha/G_{olf}\alpha$

G-proteiny této třídy jsou aktivovány receptory pro β -adrenergní aminy, glukagon, histamin, serotonin, odoranty a řadu dalších hormonů a nervových přenašečů. Tyto G-proteiny stimulují adenylcyklázu a jsou citlivé na cholera toxin (CT), jehož působením dochází k ADP-ribozylaci specifického argininu. Tím je inhibována GTPázová aktivita α podjednotky a ta zůstává stále aktivní. Cholera toxin je enterotoxin produkovaný bakterií *Vibrio cholerae*, která napadá střevní epitelální buňky a způsobuje cholera. Existují čtyři izoformy $G_s\alpha$ podjednotky: $G_{s1}\alpha$, $G_{s2}\alpha$, $G_{s3}\alpha$ a $G_{s4}\alpha$. $G_{s1}\alpha$ a $G_{s2}\alpha$ vykazují molekulovou hmotnost 52 kDa a nazývají se dlouhé izoformy $G_s\alpha L$ (z anglického long). Isoformy $G_{s3}\alpha$ a $G_{s4}\alpha$ s molekulovou hmotností 45 kDa se označují jako krátké, $G_s\alpha S$ (z anglického short). $G_s\alpha L$ a $G_s\alpha S$ se liší přítomností sekvence s 14 nebo 15 aminokyselinovými zbytky (Bray a kol., 1986; Robishaw a kol., 1986; Kozasa a kol., 1988; Novotny a Svoboda, 1998).

$G_{olf}\alpha$ je G-protein čichového epitelu velmi podobný $G_s\alpha$ podjednotce (88% identita aminokyselinové sekvence).

3.2.6.2. Třída $G_i\alpha/G_o\alpha$

Do této třídy patří G-proteiny, které interagují s receptory pro α_2 -adrenergní aminy, acetylcholin (muskarinové receptory), opioidy, serotonin a mnoho dalších. G-proteiny této třídy mohou inhibovat adenylcyklázu, stimulovat fosfolipázu $C\beta$ a ovlivňovat iontové kanály. Jsou citlivé na toxin *Bordetella pertussis*, který způsobuje černý kašel. Pertussis toxin katalyzuje připojení ADP-ribózy k cysteinovému zbytku na C-konci α podjednotky. Je důležité si uvědomit, že právě v této oblasti interaguje G-protein s receptorem. ADP-ribóza brání asociaci s receptorem a tudíž nemůže docházet k aktivaci G-proteinu.

Třída $G_i\alpha/G_o\alpha$ je složena z následujících individuálních členů:

- $G_{i1}\alpha$, $G_{i2}\alpha$ a $G_{i3}\alpha$ jsou produkty separátních genů, všechny inhibují adenylcyklázu.
- $G_{o1}\alpha$ a $G_{o2}\alpha$ jsou produkty jednoho genu vzniklé alternativním sestřihem, jsou obsaženy ve velkém množství v mozku. Inhibují adenylcyklázu, stimulují fosfolipázu $C\beta$ a aktivují též některé iontové kanály. Existuje ještě třetí izoforma $G_{o3}\alpha$, která vzniká deaminací izoformy $G_{o1}\alpha$. Představuje 30% z celkového obsahu $G_o\alpha$ v mozku (Exner a kol., 1999).
- $G_{t1}\alpha$ a $G_{t2}\alpha$ nazývané transduciny se nacházejí pouze ve světločivném epitelu oka. Přenášejí světelný signál z rhodopsinu (receptor) na cGMP fosfodiesterázu (efektor). Transduciny jsou citlivé jak k cholera toxinu tak i k pertussis toxinu.
- $G_{gust}\alpha$ nazývaný gustducin se nachází v chuťovém epitelu.

- $G_{z\alpha}$ má příbuznou sekvenci s ostatními členy třídy $G_{i\alpha}/G_{o\alpha}$, ale jeho funkce je málo známá.

3.2.6.3. Třída $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$

Jedná se o významnou třídu G-proteinů, jejíž členové reagují s receptory pro acetylcholin (např. M1-muskarinové), bombesin, serotonin a mnoho jiných. Jak již bylo zmíněno výše, G-proteiny této třídy interagují také s α_1 -adrenergními receptory a TRHR. Efektorem pro G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ je fosfolipáza $C\beta$. Tyto G-proteiny nejsou citlivé k pertussis toxinu a jsou přítomny ve většině z běžných tkání. Patří sem $G_{q\alpha}$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$, $G_{15\alpha}$ a $G_{16\alpha}$. Zvláštní vlastnost byla nalezena u G-proteinu $G_{16\alpha}$, který po exogenní expresi může působit jako univerzální přenašeč mezi širokou škálou membránových receptorů a fosfolipázou C.

3.2.6.4. Třída $G_{12\alpha}/G_{13\alpha}$

O těchto bílkovinách se toho dosud mnoho neví. Účastní se regulace procesu Na^+/H^+ výměny a také byla zaznamenána jejich interakce s MAPkinázovými drahami.

3.3. Efekty trimerních G-proteinů

$G\alpha$ a $G\beta\gamma$ podjednotky trimerních G-proteinů regulují aktivitu různých typů efektorových molekul. Mezi efekty aktivované G-proteiny patří adenylcykláza, fosfolipáza C a A_2 , cGMP fosfodiesteráza, PI 3-kinázy, proteiny MAPkinázové dráhy a řada iontových kanálů.

3.3.1. Adenylcykláza

Adenylcyklázová aktivita zvyšuje koncentraci sekundárního přenašeče (druhého posla) cyklického 3',5'-adenosinmonofosfátu (cAMP) v cílové buňce a to tak, že katalyzuje syntézu cAMP z ATP. Cyklický AMP potom aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu (A-kinázu neboli PKA), která katalyzuje fosforylaci aminokyselin serin a threonin v mnoha buněčných proteinech. Tím se mění aktivita řady významných regulačních molekul, které se podílejí na důležitých buněčných funkcích jako je růst, dělení, diferenciace, sekrece. cAMP je štěpen cAMP fosfodiesterázou na AMP (Simonds,

1999).

Existuje devět různých savčích izoform adenylcykláz (AC I - IX) (Hurley, 1999). Všechny savčí adenylcyklázy jsou aktivovány G-proteiny třídy $G_{s\alpha}/G_{ol\alpha}$, některé však také $\beta\gamma$ dimerem, proteinkinázou C či Ca^{2+} /kalmulinem. $G_{i\alpha}$ naopak selektivně inhibuje adenylcyklázu V a VI (Tesmer a kol., 1997; Yan a kol., 1997; Hurley, 1999), někteří autoři uvádějí i AC I a III (Taussig a kol., 1993). Díky schopnosti adenylcyklázy regulovat aktivitu proteinkináz a koncentraci Ca^{2+} je tento efektor spojen i s jinými signálními drahami než s jen těmi, které působí přes trimerní G-proteiny.

3.3.2. Fosfolipáza C β

V savčích organizmech byly identifikovány tři typy fosfolipáz C (PLC): PLC β , PLC γ a PLC δ (Rhee a Choi, 1992). Prostřednictvím G-proteinů se aktivuje pouze typ β . Fosfolipázu C β aktivují G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ (Sternweis a kol., 1992; Wu a kol., 1992). Rozeznáváme čtyři typy fosfolipáz β , a sice $\beta 1 - \beta 4$, které se liší svou citlivostí k α a $\beta\gamma$ podjednotkám (Morris a Malbon, 1999).

Fosfolipáza C β hydrolyzuje fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP $_2$) na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP $_3$) a diacylglycerol (DAG), který poté aktivuje proteinkinázu C (PKC) (Rebecchi a Pentyala, 2000). PKC fosforyluje řadu intracelulárních bílkovin. IP $_3$ opouští membránu, váže se na endoplazmatické retikulum a otvírá Ca^{2+} kanály v této membráně. Ionty Ca^{2+} putují z ER do cytosolu. Vysoká cytosolární koncentrace volných vápenatých iontů ovlivňuje řadu biologických procesů (Exton, 1994). Ca^{2+} ionty jsou vedle cAMP nejdůležitějším sekundárním (nitrobuněčným) poslem, který zprostředkuje přenos informace od velkého počtu hormonů - receptorů do nitra buňky.

3.3.3. Fosfolipáza A $_2$

Existují dvě třídy fosfolipáz A $_2$ (PLA $_2$): nízkomolekulární (sekreční) a vysokomolekulární forma. Obě fosfolipázy jsou lokalizovány v cytoplazmě. Retinální PLA $_2$ je aktivována volnou podjednotkou G $\beta\gamma$, která se uvolňuje z neaktivního komplexu G $\alpha\beta\gamma$ po stimulaci světlem. PLA $_2$ katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mezi C2 glycerolu a karboxylovou skupinou kyseliny arachidonové. Vzniká volná kyselina arachidonová a příslušný lysofosfolipid. V následujícím stupni dochází k uvolnění kyseliny arachidonové z membrány. Jedná se o klíčový stupeň v syntéze prostaglandinů (prostanoidů) (Morris a Malbon, 1999).

3.3.4. cGMP fosfodiesteráza

cGMP fosfodiesteráza je aktivována G_{11} - a G_{12} -proteiny, které se nacházejí ve světločivném epitelu oka. Absorpce fotonu fotopigmentem rhodopsinem vede k aktivaci cGMP fosfodiesterázy, která katalyzuje hydrolýzu cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP). Tím dochází k uzavření cGMP ovládaných sodných kanálů s následující hyperpolarizací buněčné membrány (Hamm, 1991).

3.3.5. PI 3-kinázy

PI 3-kinázy jsou ATP dependentní enzymy, které katalyzují 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. Kontrolují tak procesy jako např. receptory regulovanou signální transdukci, transport proteinů v buňce, mitogenezi, buněčné dělení a děje související s apoptózou. Jsou aktivovány především $G\beta\gamma$ dimerem (Vanhaesbroeck a kol., 1997; Toker, 1998).

3.3.6. Iontové kanály

G-proteiny regulují iontové kanály jak nepřímo s pomocí druhých posílů, jako je cAMP nebo Ca^{2+} ionty, tak přímo, tj. přímou interakcí s volnými $G\alpha$ či $G\beta\gamma$ podjednotkami v buněčné membráně. Příkladně G-proteiny hrají důležitou roli v regulaci iontových kanálů pro K^+ , Ca^{2+} , Na^+ a Cl^- ionty. Regulace iontových kanálů prostřednictvím G-proteinů může měnit excitabilitu cílových buněk, intracelulární koncentraci vápenatých iontů a tím dále ovlivňovat řadu buněčných jevů, včetně produkce dalších signálních molekul, hormonů a neuropřenašečů. Jako dobrý příklad mohu uvést situaci v srdečním svalu, kde se acetylcholin váže na M2-muskarinové cholinergní receptory spojené s G-proteiny třídy $G_q\alpha/G_{11}\alpha$, které se tím aktivují, uvolňují $G\beta\gamma$ dimer, který následně vyvolává otevření „dovnitř usměřujícího K^+ kanálu“ (inward rectifying potassium channel) v plazmatické membráně srdečního svalu. Tím dochází k hyperpolarizaci kardiomyocytů a zpomalení frekvence srdeční činnosti (Morris a Malbon, 1999).

3.4. Membránové mikrodomény

Singer-Nicolsonův model uspořádání plazmatické membrány, tzv. model tekuté mozaiky, předpokládá, že lipidové prostředí umožňuje mobilitu signálních molekul v buněčné membráně mající malý vliv na jejich funkci (Singer a Nicolson, 1972). Do nedávné doby převládal obecný názor, že proteiny se v tekutém prostředí membrány volně pohybují a jejich interakce jsou určovány náhodnými kolizemi (Cuatrecasas, 1974). Nový pohled na strukturu buněčné membrány ukazuje, že membránové bílkoviny obecně, a tedy i receptory a G-proteiny, jsou méně pohyblivé, a že jsou v prostoru i čase více organizovány, než se původně předpokládalo (Neubig, 1994). Podle současného modelu plazmatické membrány mohou mít membránové lipidy charakter uspořádané i neuspořádané tekutiny. Singer-Nicolsonův model popisuje pouze stav neuspořádané tekutiny. Lipidové dvouvrstvy s velkým obsahem nenasycených uhlovodíků jsou tekutější než dvouvrstvy s malým obsahem dvojných vazeb (v alifatických řetězcích mastných kyselin). Ve fázi uspořádané tekutiny existují především fosfolipidy s nasycenými mastnými kyselinami, které jsou úzce spojené s cholesterolem; přesto se však mohou tyto molekuly v rámci jedné vrstvy membrány laterálně pohybovat (Simons a Toomre, 2000).

Shluky lipidových molekul ve formě uspořádané tekutiny se nazývají lipidické rafty neboli membránové mikrodomény či domény. Exoplazmatický list membránové mikrodomény obsahuje sfingolipidy (glykosfingolipidy a sfingomyelin) a cholesterol. Nasycené uhlovodíkové řetězce sfingolipidů umožňují cholesterolu těsně se navázat mezi tyto molekuly. Vnitřní list domény je bohatý na cholesterol a na glycerolipidy fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol, s vysokým obsahem nasycených (saturovaných) mastných kyselin. Membránová část obklopující lipidické rafty je tekutější, a to díky vysokému obsahu fosfolipidů s nenasycenými mastnými kyselinami (Schroeder a kol., 1994; Brown a London, 1998; Simons a Toomre, 2000).

Na základě široké škály metodických přístupů je velikost raftů odhadována na 50 - 350 nm (Hooper, 1999). Toto rozmezí je velké a autoři se spíše přiklání k názoru, že za klidového stavu je doména menší (50 - 70 nm). Teprve při signalizaci dochází ke shlukování domén a velikost takového útvaru se pak pohybuje okolo 200 - 350 nm. Charakteristickým znakem raftů je jejich nízká vznášivá hustota a nerozpustnost v neiontových detergentech typu Triton X-100 při nízkých teplotách. Odtud jsou odvozeny též názvy detergent-insoluble glycosphingolipid-rich membrane microdomains, DIGs či

detergent-insensitive membrane domains, DIMs či detergent-resistant membranes, DRMs, rozuměj membránové okrsky, resp. části membrány nerozpustné v detergentech. Těchto vlastností se využívá k jejich izolaci pomocí biochemických metod (flotace v hustotních gradientech). Ve většině případů se za účelem flotace používají roztoky sacharózy s vysokou koncentrací. Ostatní, tzv. většinová část membrány, je v detergentech dobře rozpustná (Simons a Ikonen, 1997). Z pohledu biochemických metod to znamená, že komponenty z této části membrány neflotují na hustotních gradientech a zůstávají v dolní (neflotující) části hustotního gradientu.

Membránové domény obsahují mnoho proteinů signálních kaskád. Mezi bílkoviny vyskytující se v doménách řadíme především proteiny s glykozylofosfatidylinositolovou kotvou (GPI-vázané bílkoviny), které se váží z extracelulární strany membrány. Na vnitřní straně membrány v oblasti domény můžeme najít acylované proteiny jako jsou např. α podjednotky heterotrimerních G-proteinů, Src-kinázy, RGS (regulátory funkce G-proteinů), NO-syntáza, caveolin, flotillin (funkční homolog caveolinu) a další. Řada těchto molekul potřebuje ke svému ukotvení v mikrodoménách dvojnásobnou acylaci (viz. výše; Simons a Ikonen, 1997; Hooper, 1999; Resh, 1999; Galbiati a kol., 1999).

Kompartmentalizace membránových bílkovin do specifických oblastí/domén plazmatické membrány hraje důležitou roli v přenosu signálu. Dochází tím ke zvýšení koncentrace signálních proteinů v doménách, které může vést k větší efektivitě přenosu signálu (vysoká specifita a rychlost transdukce). Domény mohou urychlit a usnadnit interakce mezi individuálními proteiny signálních kaskád i umožnit vzájemné ovlivňování proteinů různých signálních kaskád. Zároveň tak dochází také k oddělení proteinů různých signálních kaskád (Simons a Ikonen, 1997). Nicméně není zcela jasné, v jakém množství se zde GPCRs či G-proteiny vyskytují. Další důležitou funkcí domén je jejich účast na transportu a třídění nově syntetizovaných lipidů a proteinů z *trans*-Golgiho aparátu do plazmatické membrány (Lisanti a kol., 1988). Rafty jsou také kontinuálně endocytovány z plazmatické membrány. Tvoří se časné endozomální váčky, které se při recyklaci vracejí do membrány přímo nebo cestou nepřímou přes recyklační endozomy. Recyklační endozomy dopravují rafty též do Golgiho váček (Simons a Toomre, 2000). Byla pozorována i degradace domén v lysozomech (Sharma a kol., 2002). Velmi málo se ví o exocytóze pomocí domén, kterou můžeme najít u sekretorických buněk (Chamberlain a kol. 2001).

Podskupinou lipidických raftů nacházejících se v buněčné membráně jsou kaveoly. Ze strukturálního hlediska lze kaveoly popsat jako baňkovité vchlípeniny buněčné

membrány, které jsou obaleny polymerní sítí caveolinu. Caveolin je integrální palmitoylovaný protein ve tvaru vlásenky, který má v monomerní podobě molekulovou hmotnost 21 - 24 kDa. (Simons a Toomre, 2000). Jak N-konec tak C-konec jsou orientovány do cytoplazmatického prostoru, tedy do nitra buňky. Zbývajících 33 aminokyselin v prostřední části polypeptidového řetězce tvoří hydrofobní zónu, která prochází membránou. N-konec je zodpovědný za vazbu bílkovin včetně G-proteinů. C-konec caveolinu je palmitoylován na cysteinových zbytcích. Součástí tohoto segmentu je i tzv. caveolin-scaffolding doména, která zprostředkovává vazbu caveolinu s různými signálními molekulami. Právě palmitoylace C-konce caveolinu je pro tuto vazbu důležitá (Galbiati a kol., 1999). Molekuly caveolinu jsou schopny oligomerizace, čímž vzniká charakteristický tvar kaveol. Na tvorbě oligomerů se podílí C-konec caveolinu. Existují nejméně čtyři savčí izoformy caveolinu: 1 α , 1 β , 2 a 3. Caveolin-1 a caveolin-2 jsou exprimovány ve všech tělních buňkách, zatímco caveolin-3 se primárně nachází ve svalových buňkách (Shaul a Anderson, 1998; Fielding a Fielding, 2000). Lymfocyty a neurony nemají caveolin a tedy ani membránové domény typu kaveol. V těchto buňkách existují membránové domény, které caveolin neobsahují (Simons a Toomre, 2000). Kaveoly podobně jako „nekaveolární“ domény můžeme také izolovat od většinové membránové fáze metodou flotace hustotního gradientu, protože vykazují nerozpustnost v neiontových detergentech typu TX-100 za nízkých teplot a nízkou vznášivou hustotu (Sargiacomo a kol., 1993).

V kaveolách se vyskytují receptory pro endothelin, cholecystokinin, acetylcholin a bradykinin (Chun a kol., 1994; Roettger a kol., 1995; Feron a kol., 1997; de Weerd a Leeb-Lundberg, 1997), Src-kinázy, některé efekторы jako např. adenylcykláza (Huang a kol., 1997), endotheliální NO-syntáza a proteiny MAPkinázové dráhy (Shaul a Anderson, 1998). Rovněž zde byla prokázána přítomnost G-proteinů G α , G $_{i1\alpha}$, G $_{i2\alpha}$, G $_{i3\alpha}$, G $_{o1\alpha}$ a G $_{q\alpha}$ /G $_{11\alpha}$ (Sargiacomo a kol., 1993; Galbiati a kol., 1999; Guzzi a kol., 2001). Odlišnou distribuci pro G α a G $_{i\alpha}$ popisují Oh a Schnitzer (2001), a sice v „nekaveolárních“ doménách či ve většinové membránové fázi. V kaveolách jsou obsaženy nejen G α podjednotky, ale i G $\beta\gamma$ dimer (Shaul a Anderson, 1998). Výskyt receptorů spřažených s G-proteiny je často spojen s jejich funkčním stavem. Do kaveol se příkladně následkem stimulace přesouvá M2-muskarinový acetylcholinový receptor (Feron a kol., 1997). Naopak působením agonisty se do „nekaveolární“ části membrány translokuje β_2 -adrenergní receptor (Rybin a kol., 2000).

Kaveoly se účastní přenosu signálu přes membránu, hrají důležitou roli v modulaci

aktivity G-proteinů a mimo jiné se též podílejí na regulaci vápníku v buňce (Fujimoto a kol., 1993; Anderson, 1998). Caveoly jsou schopny potocytózy (internalizace malých molekul z extracelulárního média) (Mineo a Anderson, 2001). Intracelulárního lipidového transportu se účastní přímo caveolin, markerový protein kaveol. Váže cholesterol a přenáší jej mezi kaveolami a vnitřními membránami, čímž je zajištěna správná koncentrace této molekuly v kaveolách, tak důležitá pro jejich zachování (Shaul a Anderson, 1998). Caveolin se podílí na funkční aktivitě vázaného proteinu. Murthy a Makhoul (2000) ve své práci popisují krátkodobou desenzitizaci G-proteinu. Caveolin se dočasně váže na aktivovanou α podjednotku G-proteinu a brání tak reasociaci $\beta\gamma$ komplexu s $G\alpha$ a dochází k desenzitizaci odpovědi zprostředkované jinými receptory spřaženými s tímtož proteinem (heterologní typ desenzitizace, viz. níže). Blokace reasociace s $\beta\gamma$ komplexem je způsobena caveolinem zprostředkovanou inhibicí výměny GDP za GTP u $G\alpha$ podjednotky (Li a kol., 1995). Caveolin tak negativně reguluje funkční aktivitu G-proteinu. Najdeme ovšem případy, kdy caveolin svojí vazbou na daný protein naopak zvyšuje jeho funkční aktivitu, viz. inzulinový receptor (Yamamoto a kol., 1998). Caveoly se rovněž podílí na internalizaci některých GPCR receptorů, která je pozorována při desenzitizaci hormonální akce (viz. níže) (Pierce a kol., 2002).

Přítomnost cholesterolu v buněčné membráně určuje fyzikální stav lipidické dvouvrstvy. V modelových membránových systémech lze prokázat, že zvyšující se množství cholesterolu má za následek vytvoření uspořádaného tekutého stavu. Membrána se za těchto podmínek stává nerozpustnou pro neiontové detergenty (Brown a London, 1998). Uspořádaný tekutý stav (liquid-ordered state) je s velkou pravděpodobností blízký přirozenému stavu buněčné membrány v podmínkách *in vivo*. Důležitým významem cholesterolu v raftech je tedy shlukování sfingolipidů a udržování domény ve smyslu kompaktního celku (Simons a Toomre, 2000). Cholesterol má vyšší afinitu ke sfingolipidům v doméně než k nenasyceným fosfolipidům ve většinové membránové fázi. Odstranění cholesterolu z raftů vede k disociaci většiny proteinů z mikrodomén. Mikrodomény se tak stávají nefunkčními, caveoly se rozpadají (Simons a Ehehalt, 2002). Tím je znemožněna receptorová signalizace i všechny následné děje vázané na tuto strukturu (Puri a kol., 2001). Na základě těchto i řady dalších výsledků lze říci, že přítomnost či nepřítomnost řady bílkovin v mikrodoménách/kaveolách závisí na přítomnosti cholesterolu (Stulnig a kol., 1997; Furuchi a Anderson, 1998; Orlandi a Fishman, 1998; Pike a Miller, 1998; Sheets a kol., 1999; Peyron a kol., 2000; Parpal a kol., 2001). Cholesterol tedy ovlivňuje aktivitu membránových bílkovin změnou

membránové tekutosti (fluidity) anebo přímou vazebnou interakcí (Gimpl a kol., 1997; Green a kol., 1999; Sooksawate a Simmonds, 2001). Cholesterol může být z domén odstraněn například β -cyklodextrinem, 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem, methyl- β -cyklodextrinem, filipinem či saponinem (Simons a Ehehalt, 2002; Wolf a kol., 2002). β -cyklodextrin je cyklický oligosacharid, který vyvolává degradaci struktury membránových domén (**Obr. 3**). Dochází především k rozpuštění cholesterolu (Kilsdonk a kol., 1995). Množství cholesterolu v buňce je kontrolováno relativně složitým způsobem v řadě stupňů: regulace biosyntézy, buněčné vychytávání, exocytóza a konečně ukládání esterifikované formy do tukových kapiček (Simons a Ikonen, 2000; Tabas, 2002; Tall a kol., 2002). Porušení těchto procesů vede k mnoha patofyziologickým stavům lipidového metabolismu (Simons a Ehehalt, 2002).

3.5. Desenzitizace hormonální akce

Pro buňky je stejně důležité signál přijímat a vyvolávat biologickou odpověď jako následně tento aktivovaný či stimulovaný stav opět potlačit. Ke snížení biologické odpovědi na hormonální stimulaci dochází, pakliže primární signál působí dlouhodobě či opakovaně. Tento děj nazýváme desenzitizace nebo desenzibilizace. Tento fenomén je klíčový pro pochopení dlouhodobého působení některých látek na organizmus, ať už se jedná o drogovou závislost či získání rezistence vůči různým léčivům či cizorodým látkám obecně. Desenzitizace je ochranný mechanismus zabraňující nadměrnému dráždění buňky, které by mohlo ve svém konečném důsledku vést až ke smrti (Svoboda a Novotny, 2002).

Buněčné mechanismy, které buňka vytváří za účelem snížení biologické odpovědi při opakovaném dráždění probíhají jednak na úrovni receptorů, jednak na úrovni G-proteinů (Pierce a kol., 2002).

3.5.1. Desenzitizace na úrovni receptorů spřažených s trimerními G-proteiny

Internalizace (nebo též endocytóza) receptoru může probíhat různými způsoby: klathrinovou cestou, s pomocí kaveol nebo s pomocí jiných neobalených váčků (uncoated pits). Dosud není známa přesná role kaveol v internalizaci (Nichols a Lippincott-Schwartz, 2001; Pierce a kol., 2002). V kaveolách je obsažena bílkovina dynamin, která vykazuje GTPázovou aktivitu. Dynamin a GTP se podílejí na odštěpení kaveol

z plazmatické membrány do volných transportních váček (Henley a kol., 1998; Oh a kol., 1998). Kaveolinová internalizace se od internalizace zprostředkované klathrinem opláštěnými váčky liší v rychlosti. Internalizace prostřednictvím kaveol je výrazně pomalejší, zhruba 2x - 4x, než klathrin dependentní internalizace (Smart a kol., 1999). Rozrušením kaveol se zabrání internalizaci např. endothelinových B receptorů a VIP receptorů (Clainig a kol., 2000).

Nejlépe prozkoumaný proces internalizace receptorů spřažených G-proteiny je klathrinová cesta. Při desenzitizaci GPCRs klathrinovou cestou dochází nejdříve k fosforylaci receptoru na serinu a threoninu. Fosforylace je zajišťována proteinkinázami A a C (heterologní desenzitizace) nebo kinázami receptorů spřažených s G-proteiny (GRKs, G-protein-coupled receptor kinases; homologní typ desenzitizace) (Pitcher a kol., 1998). Homologní desenzitizace vzniká obvykle při kontinuálním vystavení receptoru jeho mediátoru nebo látky specificky interagující s tímto receptorem. Fosforylace receptorů je v tomto případě spojena jak s jejich funkčním odpojením z přenosového systému, tak s jejich odstraněním z buněčného povrchu. Při heterologní desenzitizaci aktivace jednoho receptoru vede k desenzitizaci i druhého receptoru, který ani nemusí být obsazen agonistou. Funkce receptorů je při tomto typu desenzitizace regulována jejich fosforylací, ale nedochází k regulaci snížením počtu.

Fosforylace pomocí GRKs umožňuje navázání molekuly β -arrestinu na receptor. β -arrestin interaguje s klathrinem a s adaptorovým proteinem klathrinu AP-2 a způsobuje rychlý přesun navázaného receptoru (např. β_2 -adrenergní receptor) do klathrinem obalených vchlípenin membrány. Současně dochází k odpražení receptoru od G-proteinu (Goodman a kol., 1996; Laporte a kol., 1999; Scott a kol., 2002). Vchlípeniny membrány jsou později odděleny od membrány s pomocí GTPázy dynaminu a receptor je rychle internalizován (Pierce a kol., 2002) do intracelulárních váček (lehkých neboli malých vezikulů, endozomů) (Krupnick a Benovic, 1998; Pitcher a kol., 1998). V endozomech se nacházejí fosfatázy, které receptor defosforylují. Po defosforylaci může dojít k recyklaci molekuly receptoru na povrch membrány (Pitcher a kol., 1995; Krueger a kol., 1997) nebo endozomy s receptory splývají s lysozomy, kde jsou degradovány (tzv. downregulace) (Tsao a von Zastrow, 2000). Fosforylace a internalizace jsou procesy velmi rychlé (řádově vteřiny až minuty), zatímco degradace receptorů nastává až po několika hodinách působení agonisty na buňku. Některé receptory jsou recyklovány rychle (β_2 -adrenergní receptor) a některé pomalu (vazopresinový receptor V2 - 4 hod) (Pierce a kol., 2002). K ligandem indukované fosforylaci a internalizaci pomocí klathrinu dochází i u TRH receptoru

(Ashworth a kol., 1995; Drmota a kol., 1998a). Drmota a kol. (1998a) metodou fluorescenční mikroskopie zjistili, že internalizace TRH receptoru působením TRH (10 μ M) je pozorovatelná již po 3 až 5 minutách. K dramatické redukci receptoru v plazmatické membráně dochází po 10 až 15 minutách inkubace s TRH. Toto snížení je pozorovatelné i po 30 minutovém působení TRH. TRH receptor interaguje s G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$. Vlivem agonisty je internalizován TRHR i tyto G-proteiny. Internalizace G-proteinů je mnohem pomalejší než internalizace receptorů (Drmota a kol., 1998a; Drmota a kol., 1998b; Drmota a kol., 1999). Výše uvedeným způsobem je během několika minut internalizován i ligandem aktivovaný α_{1b} -adrenergní receptor. Při internalizaci tohoto receptoru dochází k jeho fosforylaci proteinkinázou C (Awaji a kol., 1998).

Nedávno bylo zjištěno, že u TRHR dochází též k proteazomální degradaci (Cook a kol., 2003). Proteazom je tvořen skupinou (komplexem) enzymů, které ničí poškozené nepotřebné a neporušené bílkoviny, které jsou příčinou defektní struktury buněk. Tento zvrát nebo „obměna“ bílkovin je významná pro udržování rovnováhy uvnitř buněk a pomáhá usměrňovat důležité funkce, včetně buněčného růstu. Nejdříve dochází k posttranslační modifikaci receptoru, k ubiquitylaci, tzn. k připojení ubiquitinu (protein o 76 aminokyselinách) kovalentní vazbou k lysinové ϵ -aminoskupině cílového proteinu. Tím je protein předurčen k proteazomální degradaci. Ubiquitinem zprostředkovaná degradace regulačních proteinů hraje důležitou roli v řadě buněčných procesů zahrnujících např. signální transdukcii, transkripční regulaci, downregulaci receptoru, endocytózu (Hershko a Ciechanover, 1998). Ubiquitylace receptorů spřažených s G-proteiny může mít dvě různé funkce: regulace degradace receptoru a regulace internalizace receptoru. Příkladem ubiquitinem regulované degradace mohou být δ -opiodní a β_2 -adrenergní receptory (Petaja-Repo a kol., 2001; Shenoy a kol., 2001). Druhý jmenovaný jev bych uvedla na příkladu mating faktoru, kvasinkového feromonového proteinu umožňujícího fúzi dvou haploidních buněk za vzniku jedné diploidní, který je po ubiquitylaci internalizován a degradován ve vakuole (kvasinkový ekvivalent lysozomu) (Roth a kol., 1998). V případě TRH receptoru jde o ubiquitinem zprostředkovanou degradaci špatně složených nově syntetizovaných receptorů v endoplazmatickém retikulu. Zároveň dochází ke kontrole regulace membránového přesunu proteinů na úrovni pozdního endoplazmatického retikula (post-ER) (Cook a kol., 2003).

3.5.1. Desenzitizace na úrovni trimerních G-proteinů

Dlouhodobá stimulace cílové buňky hormonem vede nejprve k poklesu hladiny

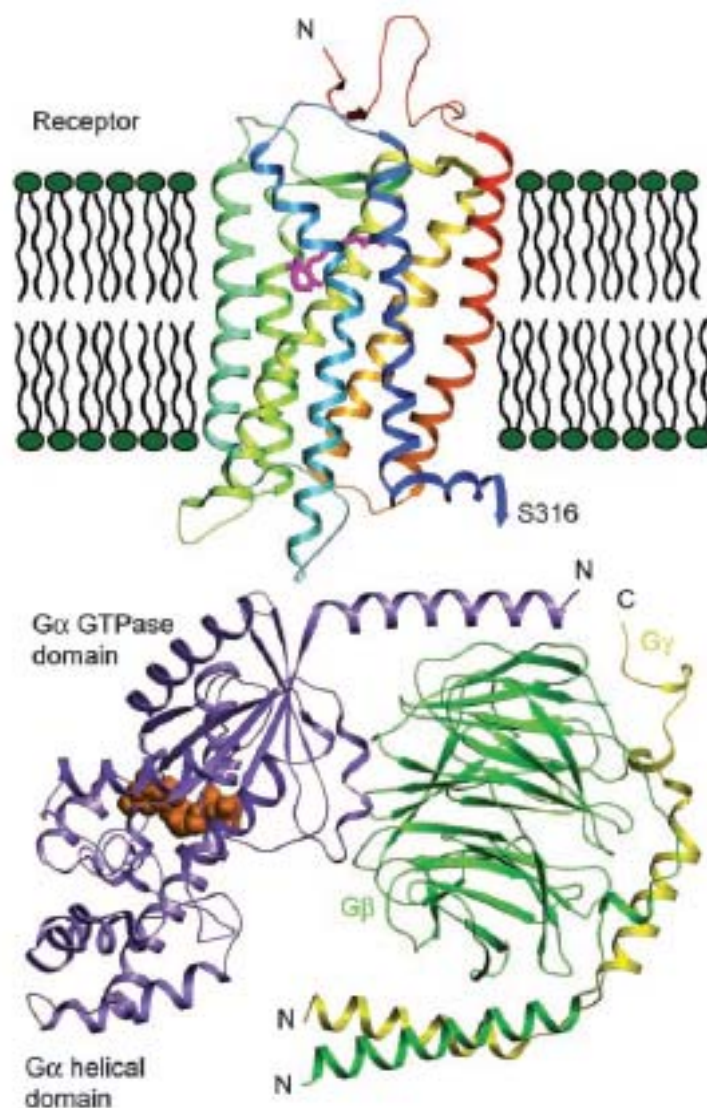
G-proteinů v plazmatické membráně (Haraguchi a Rodbell, 1990), později k poklesu celkového množství G-proteinů v buňce (downregulace) (Mullaney a kol., 1993; Svoboda a Novotny, 2002). Pokles hladiny G-proteinů v plazmatické membráně může probíhat jednak jako přesun $G\alpha$ do frakce lehkých vezikulů (nizkohustotních membránových frakcí odlišných od plazmatických membrán), bohatých na endozomy a Golgiho tělíska (Haraguchi a Rodbell, 1990; Svoboda a Milligan, 1994), a jednak jako přesun $G\alpha$ do cytosolární frakce (dochází k solubilizaci) (Lynch a kol., 1986).

První výsledek prokazující redistribuci trimerních G-proteinů přinesli v roce 1990 Haraguchi a Rodbell. Stimulace bílých tukových buněk isoproterenolem vede k translokaci $G_{s\alpha}$ a $G_{i\alpha}$ proteinů z plazmatické membrány do frakce lehkých vezikulů, endozomů (Haraguchi a Rodbell, 1990).

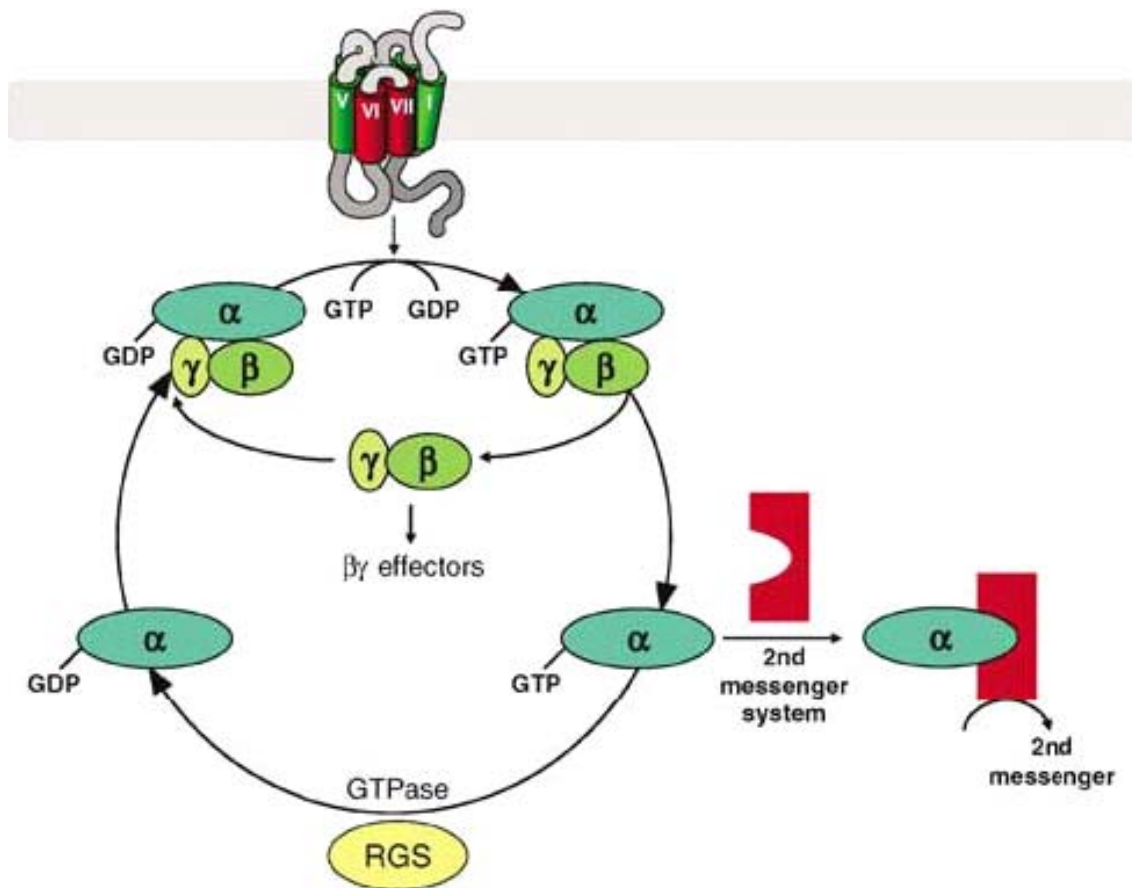
Solubilizace G-proteinů následkem hormonální stimulace byla ukázána poprvé v roce 1989 (Ransnas a kol., 1989). Stimulace β_2 -adrenergního receptoru isoprenalinem vedla k redistribuci zhruba poloviny množství $G_{s\alpha}$ přítomného v lymfatických buňkách S49 z membrány do supernatantu získaného točením postnukleárního supernatantu po dobu 2 hod při 250 000 x g (cytosolární frakce). V mastocystoma buňkách P-815 byla solubilizace proteinu $G_{s\alpha}$ indukována hormonem iloprost (stabilní analog prostacyklinu), který stimuloval prostanoidový/iloprostový receptor IPR (Negishi a kol., 1992). Ve stejném typu buněk byla pozorována také translokace $G_{i2\alpha}$ z membrán do solubilních frakcí zprostředkovaná thrombinem (Takahashi a kol., 1991). Dále Yajima a kol. (1993) zaznamenali, že vlivem inkubace membrán získaných z krysích hyfozárních buněk GH4C1 se somatostatinem dochází k uvolnění také proteinů $G_{i3\alpha}$ a $G_{o\alpha}$ z membrán a k jejich následnému přesunu do rozpustných (cytosolárních) frakcí. Vazoaktivní intestinální peptid VIP vyvolal ve stejném typu buněk uvolnění aktivované $G_{s\alpha}$ podjednotky z membrán do cytosolu spolu s downregulací, tedy poklesem celkového množství daného proteinu v buňce (Yajima a kol., 1998). Dlouhotrvající stimulace E2M11 buněk (odvozených od HEK-293 buněk) agonistou TRH vede k dramatickému přenosu exogenní (myší) i endogenní (lidské) formy $G_{11\alpha}$ z plazmatické membrány do membránových frakcí s nízkou hustotou, současně dochází ke zvýšení obsahu $G_{11\alpha}$ v cytosolu a následně k downregulaci. Klon E2M11 je dvakrát transfekován a produkuje tak velké množství myšího $G_{11\alpha}$ proteinu a TRH receptoru. V čase kratším než 1 hod není signifikantně detekovatelná subcelulární redistribuce $G_{11\alpha}$ proteinu. Po 2 až 4 hodinách můžeme pozorovat přesun významné části $G_{11\alpha}$ do nizkohustotních frakcí hustotního sacharóзовého gradientu (frakce lehkých vezikulů) a do cytosolární frakce. Při delším

hormonálním působení (4 až 16 hod) dochází ke snížení celkového množství $G_{11\alpha}$ v buňce (downregulace) (Svoboda a kol., 1996; Drmota a kol., 1998b). Práce Drmoty a kol. z roku 1998b také ukázala internalizaci $G_{11\alpha}$ proteinu metodou imunofluorescenční mikroskopie. Za kontrolních podmínek je fluorescenční signál $G_{11\alpha}$ lokalizován homogenně na povrchové buněčné membráně, po 30 - 60 minutách inkubace s TRH dochází ke shlukování $G_{11\alpha}$ proteinu do diskretních agregátů v rámci plazmatické membrány. Po 2 - 4 hodinách inkubace s hormonem TRH dochází ke zvýšení intracelulárního fluorescenčního signálu v podobě drobných granulí a paralelně ke snížení fluorescence na povrchu buňky. Delší inkubace (8 - 16 hod) vede k drastickému snížení fluorescenčního signálu $G_{11\alpha}$ na povrchu a též uvnitř buněk. Dochází k downregulaci. Výsledky z fluorescenční mikroskopie úzce korespondovaly s výsledky subcelulární frakcionace buněčného homogenátu na sacharózovém denzitním gradientu (viz. výše; Drmota a kol., 1998b). Agonistou indukovaná internalizace $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu byla též dokázána u MDCK (Madine-Darby canine kidney) buněk stimulací bradykininem (Arthur a kol., 1999). V jeho práci vedla k přemístění $G\alpha$ proteinů z plazmatické membrány do cytosolu dokonce kratší doba inkubace s hormonem.

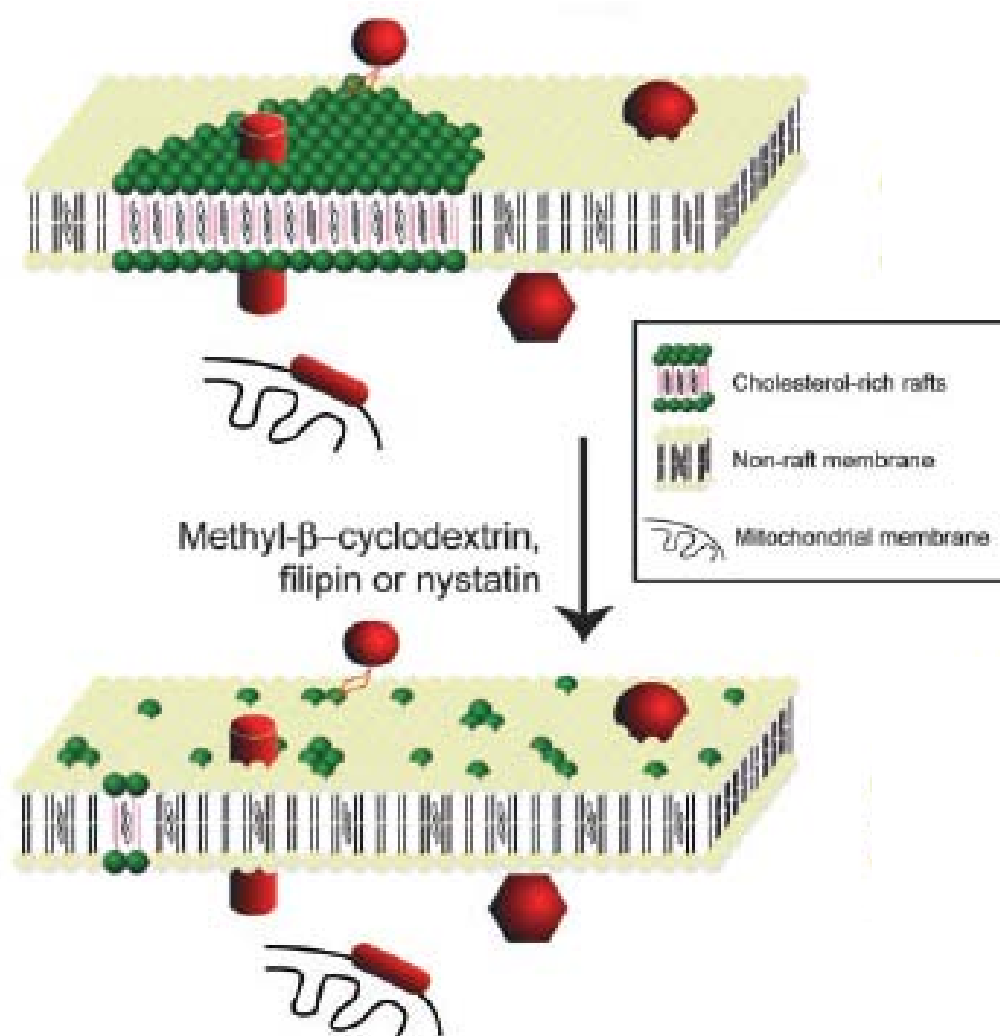
Rozdíl mezi internalizací TRHR a $G_{11\alpha}$ byl ověřen in vivo studií na buněčné linii VTGP (Drmota a kol., 1999). VTGP buňky obsahují fúzní bílkovinu VSV-TRHR-1-GFP. Jedná se o TRH receptor, který na N-konci obsahuje antigenní epitop VSV (virus vezikulární stomatitidy z anglického vesicular stomatitis virus) a na C-konci zelený fluorescenční protein GFP (green fluorescent protein). Hormonální stimulací se fluorescenční signál TRH receptoru rychle přesunuje dovnitř buňky, zatímco fluorescenční signál $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu, identifikovaného nepřímou fluorescencí, zůstává na povrchu buňky. Po době delší než 1 hod dochází rovněž k internalizaci $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu. Výsledky fluorescenční mikroskopie opět souhlasily s výsledky imunodetekce gradientových frakcí. Část VSV-TRHR-1-GFP proteinu se přesouvá z plazmatické membrány do frakce lehkých vezikulů během 30 min inkubace s TRH, ale distribuce $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ zůstává nezměněna. Po delších časových intervalech můžeme pozorovat též redistribuci $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu do frakce lehkých vezikulů a do cytosolární frakce (Drmota a kol., 1999).



Obr. 1. Nákres membránové orientace receptoru rhodopsin a heterotrimerního proteinu G_i . *Receptor*, rhodopsin [α -helixy v různé škále barev od červené (N-konec) po tmavě modrou (C-konec)]; retinální molekula uvnitř rhodopsinu (světle fialově); $G\alpha$ (tmavě fialově); GDP (červeně); $G\beta$ (zeleně); $G\gamma$ (žlutě). *G α GTPase domain*, GTPázová doména $G\alpha$ podjednotky (G-doména); *G α helical domain*, helikální doména $G\alpha$ podjednotky (Cabrera-Vera a kol., 2003).



Obr. 2. Aktivace a deaktivace trimerních G-proteinů. Přeměna G-proteinového heterotrimeru $\alpha\beta\gamma$ z inaktivního (s navázaným GDP) na aktivní GTP vázající stav je vyvolána interakcí s GPCRs (zobrazeny pouze α -helixy TM V, VI, VII a I spolu s intracelulárními a extracelulárními smyčkami), které fungují jako výměnné faktory guaninového nukleotidu (GEF). Následná konformační změna indukuje oddělení α podjednotky s navázaným GTP od $\beta\gamma$ dimeru, načež mohou oba tyto elementy regulovat aktivitu efektorů, mezi které patří enzymy účastníci se syntézy a degradace molekul intracelulárních sekundárních posílů (*2nd messenger system*), iontové kanály a proteiny MAPkinázové dráhy. Vnitřní GTPázová aktivita $G\alpha$ hydrolyzuje terminální fosfát vázaného GTP, čímž je ukončena efektorová regulace zprostředkovaná $G\alpha$ podjednotkou. Tato aktivita je urychlena GTPázou aktivujícími proteiny (GAP, *GTPase-activating protein*). Nejpočetnější skupinou s touto funkcí jsou tzv. regulátory funkce G-proteinové signalizace (*RGS* proteiny, *regulators of G-protein signalling*). Reasociace $G\alpha$ s navázaným GDP s $\beta\gamma$ dimerem ukončuje na $\beta\gamma$ dimeru závislou regulaci efektorů a uzavírá tak celý aktivačně-deaktivační cyklus. Ke spuštění nového cyklu je zapotřebí další interakce G-proteinu s GPCRs. *2nd messenger*, 2. posel; *$\beta\gamma$ effectors*, efekторы $\beta\gamma$ komplexu (Milligan a Kostenis, 2006).



Obr. 3: Schéma degradace membránové domény. HeLa buňky (buněčná linie odvozená od cervikálního tumoru Henrietty Lacks) byly ošetřeny látkou vyvolávající rozpuštění a odstranění cholesterolu z membrány (*methyl- β -cyklodextrin*, *filipin* či *nystatin*). Tato inkubace způsobila degradaci domény. Červeně znázorněny jsou nejrůznější proteiny a peptidy vyskytující se v doméně i mimo ni. *Cholesterol-rich rafts*, domény bohaté na cholesterol; *Non-raft membrane*, většinová „nedoménová“ membránová fáze; *Mitochondrial membrane*, mitochondriální membrána (Foster a kol., 2003).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

Materiál pro tkáňové kultury byl dodán firmou Sigma-Aldrich a Invitrogen/Gibco. [³⁵S]GTP γ S (1250 Ci/mmol) a [³H]prazosin (80 Ci/mmol) jsme získali od NEN/Perkin Elmer. Oligonukleotidy byly zakoupeny od společnosti ThermoHybaid, L-fenylefrin a fentolamin od firmy Sigma-Aldrich. Materiál na výrobu konstruktů byl dodán firmami Invitrogen/Gibco, Life Technologies, Applied Biosystems a Promega. Pro izolaci, purifikaci a namnožení cDNA jsme používali výrobky a chemikálie od společnosti Qiagen. Směs inhibitorů proteáz Complete byla od Roche. Immobilinové DryStripy, IPG pufr a sekundární anti-králičí a anti-myší protilátky spřažené s křenovou peroxidázou pocházely od Amersham Biosciences. Další chemikálie a materiály byly dodány firmami Sigma-Aldrich, Bio-Rad Laboratories a Calbiochem a byly v té nejlepší dostupné kvalitě. Výroba anti-G $_{q\alpha}$ /G $_{11\alpha}$ antiséra CQ byla popsána již dříve (Mitchell a kol., 1991; Drmota a kol., 1998b).

4.2. Experimentální modely

K pokusům jsme používali lidské embryonální buňky ledvinového epitelu HEK-293 (human embryonic kidney cells) a klon od této linie odvozený: E2M11. Původní HEK-293 buňky jsme přechodně transfekovali plazmidy nesoucími α_{1b} -adrenoreceptor, G $_{11\alpha}$, α_{1b} -adrenoreceptor-G $_{11\alpha}$ či jejich mutacemi modifikované formy. Buňky E2M11 již transfekovány byly. Tyto buňky stabilně exprimují ve vysokém množství dlouhou formu krysího receptoru pro TRH (TRHR-1) a myší G $_{11\alpha}$ (Svoboda a kol., 1996).

4.3. Příprava konstruktů

Pro přehled zde uvádím stručný metodický postup přípravy konstruktů použitých v pokusech zahrnutých v dizertační práci. Konstrukty byly vyrobeny v Glasgow

v laboratoři G. Milligana, není-li uvedeno jinak. Každý nový konstrukt byl vždy před expresí osekvenován a poté vnesen do kompetentních buněk *Escherichia coli* JM109 nebo XL1-Blue. Konstrukty byly tvořeny plazmidy pCMV nebo pcDNA3 kódujícími vždy jeden z následujících proteinů:

G_{11α}

Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α}

Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α}

Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α}

G_{11α} (HA)

Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} (HA)

Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α} (HA)

Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α} (HA)

α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α}

α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α}

α_{1b}-adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α}

α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α}

Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α}

Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α}

Příprava a charakterizace G_{11α} a jeho různých forem jako Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} (McCallum a kol., 1995) a Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG_{11α} (Liu a kol., 2002) byla popsána již dříve. Stručně, myší G_{11α} v savčím expresním vektoru pCMV byl dar od M. I. Simona (California Institute of Technology, Pasadena, CA, U.S.A.). cDNA kódující myší G_{11α} byla naklonována a zavedena do plazmidu pSV Sport 1 (Life Technologies) za účelem minimalizace velikosti celkového konstruktů. Deleční PCR mutagenese byla provedena v přítomnosti 250 ng mutanta pSV Sport 1-G_{11α}, 250 μM dNTP a 25 pmolů každého daného páru fosforylovaných oligonukleotidů, viz. **Tab. 1**. Reakční směs byla převrstvena kapkou minerálního oleje a zahřívána 10 min při 94°C. Poté bylo přidáno 2,5 jednotek Pfu DNA polymerázy. Celý plazmid obsahující myší G_{11α} cDNA byl namnožen metodou PCR probíhající následujícím způsobem: 30 cyklů opakující se denaturace při 94°C po dobu 42 s, chlazení při 57°C po dobu 60 s a elongace při 72°C 10 min. Reakční produkt byl následně elektroforeticky rozdělen na agarózovém gelu s nízkou teplotou tání a vyčištěn pomocí PCR Prep kolon (Promega). Purifikovaný fragment byl na koncích otupen 3 hodinovou inkubací s 5 jednotkami Klenow fragmentu při 37°C, znovu purifikován

pomocí PCR Prep kolon a spojen s T4 DNA ligázou. Takto upravený vzorek byl poté transformován do kmene *Escherichia coli* JM109. Plazmid DNA byl připraven z vybraných ampicilin rezistentních kolon. Integrita PCR mutageneze byla prověřena sekvenací této DNA na automatizovaném DNA sekvenátoru ABI 373A pomocí kitu Taq Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) podle instrukcí výrobce. Výsledný myší $G_{11\alpha}$ mutant byl před expresí naklonován zpátky do původního pCMV vektoru. Otevřený čtecí rámeček kódoval Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ (McCallum a kol., 1995). Tvorba Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ byla provedena obdobně (Liu a kol., 2002).

Tab. 1: Seznam fosforylovaných oligonukleotidů použitých v mutaci myšního $G_{11\alpha}$ k tvorbě Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$.

Konstrukt	Sense oligonukleotid	Antisense oligonukleotid
C ⁹ SG _{11α}	5' TGCCTGAGCGACGAGGTG 3'	5' <u>AG</u> ACGCCATCATGGACTCCAG 3'
C ¹⁰ SG _{11α}	5' TCCCTGAGCGACGAGGTG 3'	5' ACACGCCATCATGGACTCCAG 3'
C ^{9,10} SG _{11α}	5' TCCCTGAGCGACGAGGTG 3'	5' <u>AG</u> ACGCCATCATGGACTCCAG 3'

Mutagenní báze jsou podtrženy.

Příprava Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ konstruktů byla následující. Mutant byl zkonstruován místně cílenou mutagenezí zavedením Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser mutací do Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$. Celý úsek byl poté naklonován do pcDNA3 (Invitrogen). Tento plazmid byl použit jako forma pro PCR za využití primeru 5'-CTGGAGTCCATGATGGCGTCTTCCCTGAGCGACGAGGTGAAG-3' a komplementárního primeru 5'-CTTCACCTCGTCGCTCAGGGAAGACGCCATCATGGACTCCAG-3'. Po cyklických změnách teploty byl k produktu přidán DpnI za účelem digescce methylované mateřské DNA (Novotny a kol., 2006).

$G_{11\alpha}$ a jeho modifikované formy Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ a Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ byly inkorporovány do fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ nebo Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (Stevens a kol., 2001; Novotny a kol., 2006).

Tvorba divokého či palmitoylaci odolného fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ byla provedena ve dvou krocích (McCallum a kol., 1995). Stručně, nejdříve byla modifikována kódovací sekvence $G_{11\alpha}$ proteinu metodou PCR amplifikace za použití amino-terminálního primeru 5'-GAGGACGGTACCACTCTGGA GTCCATG-3'. Met byl z $G_{11\alpha}$ proteinu odstraněn a bylo zavedeno restrikční místo KpnI

(podtrženo) spolu s dvěma aminokyselinami Gly a Asn. Pomocí C-terminálního primeru 5'-TTGTGCGGCCGCCGGTCACACCAGGTT-3' bylo v genu $G_{11\alpha}$ proteinu směrem dopředu od stop kodonu zavedeno restrikční místo NotI (podtrženo). Namnožené fragmenty rozštěpené restrikázami KpnI a NotI byly inkorporovány do podobně rozštěpeného expresního vektoru pcDNA3. Aby byly získány různé α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ fúzní proteiny, kódovací sekvence nemutovaného a Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala křeččího α_{1b} -adrenoreceptoru byla namnožena metodou PCR. Pomocí amino-terminálního primeru 5'-GACGGTACCTCTAAAATGAATCCCGAT-3' bylo zavedeno restrikční místo KpnI (podtrženo) směrem zpět od iniciačního kodonu. Za použití karboxy-terminálního primeru 5'-GTCCCTGGTACCAAAGTGCCCGGGTG-3' bylo v oblasti před stop kodonem zavedeno druhé restrikční místo KpnI (podtrženo). Nakonec byly $G_{11\alpha}$ konstrukty v pcDNA3 rozštěpeny restrikázou KpnI a spojeny s namnoženým PCR produktem α_{1b} -adrenoreceptoru rozštěpeným také enzymem KpnI. Otevřené čtecí rámce pak reprezentovaly kódující sekvence α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ nebo Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ (Stevens a kol., 2001; Novotny a kol., 2006).

α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ byl připraven analogickým postupem jako Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ (Novotny a kol., 2006).

Vnitřní HA epitop byl zaveden do $G_{11\alpha}$ proteinu za vzniku následujících mutací Glu¹²⁵Asp, His¹²⁶Val, Gln¹²⁷Pro, Tyr¹²⁸Asp, Val¹²⁹Tyr a Asn¹³⁰Ala. Takto pozměněný $G_{11\alpha}$ protein je podobný variantě $G_q\alpha$ také nesoucí vnitřní HA epitop, jejíž výroba byla popsána již dříve (Evanko a kol., 2000; Evanko a kol., 2001). Tyto mutace byly vytvořeny pomocí PCR s použitím metody překrývajících se fragmentů, kde dva nově vzniklé PCR úseky obsahují mutace na překrývajících se 5' nebo 3' koncích. Tyto fragmenty byly poté využity jako primery spolu s dalšími příslušnými primery na nepřekrývajících se koncích k namnožení celých výše uvedených mutovaných úseků. Tyto části pak byly naklonovány do $G_{11\alpha}$ výměnou za C konec $G_{11\alpha}$ proteinu jako SacI-XhoI fragment (Novotny a kol., 2006).

4.4. Příprava kompetentních buněk

K transformaci jsme používali kmen *Escherichia coli* XL1-Blue, který je schopen přijmout a exprimovat vektor pcDNA3 případně pCMV obsahující danou cDNA. Bakterie vektor mnohonásobně namnoží a ten je následně z kultury purifikován. Aby byla *E. coli* schopna přijmout cDNA, musí být kompetentní, čehož jsme docílili následujícím způsobem. Kmen XL1-Blue jsme vyseli na agarovou plotnu bez antibiotik a ponechali růst přes noc při 37°C. Agarová plotna obsahovala 1,5% (w/v) agar v LB médiu (Luria Bertani broth) o následujícím složení: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasnicový extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,0. Jednotlivé vybrané kolonie bakterií jsme pěstovali v 5 ml LB média opět přes noc při 37°C v třepacím přístroji (300 rpm). Výslednou kulturu jsme dále namnožili do větších objemů, a to do 100 ml LB média, a takto inkubovali v třepacím přístroji (300 rpm) při 37°C do doby dosažení optické denzity bakteriální kultury 0,48 ODU (jednotky optické denzity z anglického optical density units) při 550 nm. Buňky jsme poté okamžitě zchladili 5 minutovou inkubací na ledu a stočili při 3 000 rpm a 4°C po dobu 10 min ve sterilních centrifugačních tubách. Pelet jsme jemně resuspendovali pipetou ve 20 ml roztoku 1 v deionizované H₂O [1 M CH₃COOK (octan draselný), 1 M RbCl₂, 1 M CaCl₂, 1 M MnCl₂, 80 (w/v) glycerol, upraveno na pH 5,8 pomocí kyseliny octové] přefiltrovaného přes sterilizační filtr s 0,22 µm póry. Buněčnou suspenzi jsme opět ponechali 5 min na ledu a následně stočili 10 min při 3 000 rpm a 4°C. Pelet jsme jemným pipetováním resuspendovali ve 2 ml roztoku 2 a směs chladili 15 min při 4°C. Roztok 2 byl následujícího složení: 0,1 M MOPS (pH 6,5), 1 M CaCl₂, 1 M RbCl₂, 80% (w/v) glycerol, upraveno kyselinou chlorovodíkovou na pH 6,5 a přefiltrováno přes sterilizační filtr. Buňky jsme poté rozpipetovali do jednotlivých alikvotů a zamrazili do -80°C.

4.5. Transformace bakterií a izolace cDNA

Jak již bylo napsáno výše, kompetentní buňky *Escherichia coli* XL1-Blue jsme transformovali vektory kódujícími příslušné proteiny. Stručně, 50 µl kompetentních buněk s 1 µl příslušné cDNA (přibližně 10 - 100 ng) jsme ponechali na ledu po dobu 15 min. Poté následovala 90 s inkubace ve vodní lázni o 42°C. Po 2 minutovém chlazení vzorku na ledu jsme přidali 450 µl sterilního LB média. Opět proběhla inkubace, tentokrát při 37°C

po dobu 45 až 60 min na třepacím přístroji. 100 µl roztoku s buňkami jsme poté vyseli na agarovou plotnu se selekčním antibiotikem ampicilin (v konečné koncentraci 50 µg/ml) v Petriho misce a nechali růst 12 hod v inkubátoru při 37°C. Posléze jsme vybrali transformované kolonie a jednotlivě je pěstovali přes noc v třepacím přístroji při 37°C v 5 ml LB média obsahujícím ampicilin o koncentraci 50 µg/ml, vždy tři kolonie od každého vzorku. Jako kontrolní vzorek jsme na agarovou plotnu nanесли pouze samotné kompetentní bakterie bez přidané cDNA. Výslednou kulturu jsme poté dále rozmnožili do větších objemů, a to do 100 ml LB média, opět s antibiotikem ampicilin (v konečné koncentraci 50 µg/ml), a takto inkubovali 12 až 16 hod v třepacím přístroji (300 rpm) při 37°C. Tuto buněčnou směs jsme stočili při 4 000 rpm a 4°C po dobu 30 min a uchovali v -20°C do dalšího použití. Z této kultury jsme následně izolovali a namnožili příslušnou plazmidovou DNA pomocí kitu QIAfilter Plasmid Maxi kit (Qiagen), tzv. souprava maxi-prep. V této fázi je možné výslednou kulturu použít k izolaci malého množství cDNA pomocí soupravy mini-prep (Qiagen), které může sloužit k osekvenování nového konstruktů metodou restriční analýzy DNA. Pomocí soupravy maxi-prep lze izolovat zhruba 300 až 500 µg konkrétní cDNA v příslušném plazmidu. Tímto plazmidem s cDNA jsou poté transfekovány různé buněčné linie. V izolaci cDNA pomocí soupravy maxi-prep jsme postupovali podle pokynů výrobce.

Stručně, buněčný pelet získaný 30 minutovým stočením 100 ml buněčné kultury transformovaných *E. coli* XL1-Blue buněk v LB médiu při 4 000 otáčkách a 4°C jsme lyzovali 10 ml vychlazeného (4°C) lyzátového pufru 1 obsahujícího 100 µg/ml RNázy a poté jej dobře resuspendovali pipetou a vortexováním. Po přidání 10 ml pufru 2 jsme lyzát jemně promíchali několikerým otočením centrifugační kyvety dnem vzhůru a inkubovali 5 min při laboratorní teplotě. Vzorek jsme precipitovali přidáním 10 ml vychlazeného (4°C) pufru 3, jemně zamíchali a přemístili všechnu tekutinu do zásobníku do QIA Filter. Během 10 minutové inkubace při laboratorní teplotě se v horní části zásobníku vytvořila sraženina obsahující proteiny, genomovou DNA a detergent. Mezitím jsme zekvilibrovali kolonu Qiagen-tip promytím 10 ml ekvilibračního pufru QBT. Kolona pracovala na principu gravitační síly. Poté jsme opatrně umístili píst do zásobníku Qiagen Filter a přefiltrovali buněčný lyzát do zekvilibrované kolony. Vzorek se uchytil na filtru kolony a veškerá zbývající tekutina protekla silou gravitace. Po přidání 2x 30 ml promývacího pufru QC do kolony jsme nechali všechnu tekutinu přefiltrovat, abychom ze vzorku odstranili RNA, proteiny, metabolity a další nízkomolekulární složky. Vzorek jsme získali zpět promytím filtru kolony 15 ml pufru QF. Eluát jsme precipitovali přidáním

10,5 ml izopropanolu a ihned stočili v alkoholu odolné polykarbonátové centrifugační kyvetě 30 min, 15 000 x g, při 4°C. Supernatant jsme slili a k peletu přidali 5 ml 70% ethanolu a opět zcentrifugovali, tentokrát 10 min při 15 000 x g a 4°C. Následovalo opatrné odlití supernatantu a sušení peletu 15 až 30 min při 37°C. 70% ethanol odstraňuje vysrážené soli a nahrazuje izopropanol více těkavým ethanolem za účelem snadnějšího rozpuštění DNA. 10 µl vzorku jsme resuspendovali v 1 ml sterilní H₂O (ředící faktor 100). Koncentraci DNA jsme zjistili měřením na UV spektrofotometru při 260 nm. K výpočtu koncentrace ze získané absorbance (ABS) jsme použili následující vzorec:

$$c = (\text{ABS} \times 50 \times \text{ředící faktor}) / 1000$$

4.6. Přechodná transfekce HEK-293 buněk a jejich kultivace

Buňky HEK-293 byly udržovány v DMEM médiu doplněném o L-glutamin (0,292 mg/ml) a telecí sérum NCS (newborn calf serum) v konečné koncentraci 10% (v/v) při 37°C ve vlhké atmosféře s 5% CO₂. Před transfekcí jsme buňky napěstovali tak, aby pokrývali 60 - 80% dna kultivačních 80 cm² Petriho misek. Transfekce byla provedena pomocí reagentie Lipofektamin (Gibco) podle instrukcí výrobce. Stručně, 8 µg příslušné cDNA (v pcDNA3) v 80 µl H₂O jsme smíchali s 520 µl bezsérového média Optimem (Gibco) a pomalu po kapkách přidali 600 µl roztoku Lipofektaminu a Optimemu v poměru 1:29. Vše jsme nechali 30 min inkubovat při laboratorní teplotě. Poté jsme tuto směs smíchali s 3,8 ml média Optimem, čímž jsme dostali celkový objem 5 ml, který jsme přidali k buňkám v kultivační misce již předem opláchnutých 5 ml média Optimem. Buňky s transfekčním mixem jsme nechali inkubovat 4 až 5 hod při 37°C ve vlhké atmosféře s 5% CO₂. Po uplynulé době jsme transfekční směs odstranili a k buňkám jsme přidali 10 ml růstového média DMEM s L-glutaminem a NCS a takto ponechali přes noc při 37°C ve vlhké atmosféře s 5% CO₂. U negativní kontroly jsme transfekovali buňky HEK-293 pouze prázdným plazmidem pcDNA3. Takové buňky jsme pak nazývali slepě transfekované neboli mock.

Celkem jsme sklízeli tři až pět kultivačních misek od každé cDNA při jejich 95% pokrytím dna. Transfekce byla ukončena mechanickým sklizením buněk a jejich

stočením při 4°C po dobu 5 min při 3 000 rpm. Buňky jsme poté dvakrát propláchli vychlazeným (4°C) PBS (0,138 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) a v každém promývacím kroku centrifugovali 5 min, při 3 000 rpm a 4°C. V tomto kroku je možné buněčný pelet před dalším použitím zamrazit do -80°C.

4.7. Stabilní transfekce HEK-293 buněk (klon E2M11) a jejich kultivace

Klon E2M11, odvozený od HEK-293 buněk, stabilně exprimující velké množství krysího receptoru TRHR a myšího G_{11α}, byl připraven již dříve v naší laboratoři (Svoboda a kol., 1996). Stručně, nezkrácená cDNA dlouhé formy krysího TRH receptoru (2,2 kb) (Sellar a kol., 1993) byla vložena do eukaryotického expresního vektoru pcDNA1 (Invitrogen), který byl řízen promotorem cytomegaloviru (CMV). HEK-293 buňky byly kotransfekovány linearizovaným plazmidem pcDNA1/TRHR (800 ng) a pSPneo (200 ng, Invitrogen) za použití činidla Lipofektamin (30 mg, Life Technologies) v bezsérovém DMEM médiu. Nejdříve byly vybrány klony s rezistencí proti geneticinu. Jako klony obsahující TRH receptor byly identifikovány takové, ve kterých TRH stimuloval zvýšení celkového inositol fosfátu. Exprese TRH receptoru v membránách z těchto klonů byla stanovena specifickou vazbou [³H]TRH. Klon E2, který expimoval 14 pmol receptoru/mg membránového proteinu (Kim a kol., 1994), byl vybrán pro další transfekci následujícími dvěma plazmidy. Plazmidem pCMV, do kterého byla vložena cDNA kódující myší G_{11α}, a plazmidem pBABE hygro, který kóduje rezistenci proti antibiotiku hygromycin B. Právě na základě této rezistence byly vybrány klony s výše uvedenými vlastnostmi a následně u nich byla studována exprese krysího TRH receptoru a myšího G_{11α} proteinu (Svoboda a kol., 1996).

E2M11 buňky jsme pěstovali v kultivačním DMEM médiu obohaceném o L-glutamin (0,55 mg/ml) a o teplem inaktivované telecí sérum NCS v konečné koncentraci 10% (v/v). E2M11 buňky jsme pěstovali ve 152 cm² kultivačních miskách či 80 cm² inkubačních lahvích při teplotě 37°C, v atmosféře s 5% CO₂ podle protokolu Svoboda a kol. (1996). Stabilní transfekci linií buněk jsme zajistili přidáváním selekčních antibiotik geneticin (0,8 mg/ml) a hygromycin B (0,2 mg/ml).

4.8. Buněčná frakcionace

Pelet ze sklizených přechodně transfekovaných HEK-293 buněk jsme lehce resuspendovali pipetmanem ve 2 ml membránového TE pufru (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA) a 2 min homogenizovali na ledu v těsném sklo-teflonovém homogenizátoru Brown. Homogenát jsme točili 5 min při 1 500 rpm a 4°C za účelem odstranění jader. Vzniklý postnukleární supernatant nazvaný buněčný lyzát jsme do dalšího použití zamrazili do -80°C nebo jej dále centrifugovali 30 min při 4°C a 90 000 x g na ultracentrifuze Beckman Optima TLX (rotor TLA 100.2). Ultracentrifugací jsme získali další dvě frakce; supernatant obsahující buněčný cytosol a pelet s hrubými plazmatickými membránami, který jsme resuspendovali ve vychlazeném (4°C) TE pufru pomocí pipetmana a injekční stříkačky s jehlou. Vše jsme opět do dalšího použití zamrazili do -80°C.

V případě klonu E2M11 odvozeného od HEK-293 buněk jsme v přípravě cytosolární frakce, která byla dále použita v experimentech s 2D elektroforézou, postupovali následujícím způsobem. Při 70 - 80% pokrytí dna kultivační misky buňkami E2M11 jsme den před experimentem staré médium nahradili čerstvým. V den pokusu jsme do média přidali hormon TRH v konečné koncentraci 10 μ M a ponechali buňky inkubovat po dobu 10 min, 30 min, 1 hod, 4 hod nebo 16 hod při 37°C. Kontrolní buňky jsme s hormonem neinkubovali. Celkem jsme výše uvedeným postupem sklízeli sedm velkých kultivačních misek (152 cm²) od každého inkubačního času. Stimulaci agonistou jsme ukončili umístěním misek s buňkami na led a rychlým odsátím média. Buňky jsme mechanicky sklízeli ve vychlazeném (4°C) PBS a poté ihned dvakrát promyli tímtéž pufrům. Promývací krok zahrnoval stočení vzorku při 3 000 otáčkách a 4°C po dobu 5 min. Pelet jsme zamrazili při -80°C nejméně na 1 hod.

Výsledný sediment jsme resuspendovali repipetováním v 3 500 μ l (500 μ l na 1 kultivační misku) v homogenizačním STEM pufru (250 mM sacharóza, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) obsahujícím čerstvě přidaný 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; rozpuštěný v izopropylalkoholu) a 1 tabletu koktejlu inhibitorů proteáz Complete. Vše jsme zhomogenizovali ručním celoskleněným homogenizátorem po dobu 7 min na ledu. Za účelem odstranění jader jsme vzorek centrifugovali při 1 000 rpm a 4°C po dobu 5 min. Vzniklý postnukleární supernatant jsme

poté stočili při 250 000 x g po dobu 2 hod při 4°C. Výsledný supernatant reprezentoval rozpustnou cytosolární frakci, která byla uchována do dalšího použití při -80°C.

V případě sledování vlivu β -cyklodextrinu jsme z E2M11 buněk izolovali membránové domény (DRMs) metodou flotačního sacharózového detergentového gradientu (Pesanova a kol., 1999). Tato metoda je založena na odolnosti membránových domén k působení 1% (v/v) Tritonu X-100. E2M11 buňky jsme při 70 - 80% pokrytí dna nejdříve inkubovali v bezsérovém médiu a po 2 hod jsme k nim na 40 min přidali β -cyklodextrin v konečné koncentraci 10 mM. Poté jsme buňky mechanicky sklízeli v PBS. Celkem jsme na jeden gradient sklízeli sedm kultivačních lahví (80 cm²) kontrolních a β -cyklodextrinem ovlivněných E2M11 buněk. Po 10 minutové centrifugaci při 1 800 rpm a 4°C jsme sklizené buňky naředili STEM pufrem obsahujícím navíc 1 mM orthovanadát, 1 mM v izopropylalkoholu rozpuštěný PMSF a směs inhibitorů proteáz Complete a homogenizovali 7 min na ledu při 1 700 rpm. Homogenát jsme stočili 5 min při 1 000 rpm a 4°C. Frakci hrubých plazmatických membrán jsme získali centrifugací výsledného postnukleárního supernatantu po dobu 2 hod při 250 000 x g a 4°C. Pelet byl pipetou jemně resuspendován v STEM pufru a zamražen do -80°C do dalšího použití. 1 ml membránové suspenze jsme smíchali s 1 ml 2% (v/v) Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl a 1 mM PMSF. Po 60 minutách na ledu jsme vzniklý detergentový lyzát (2 ml) přidali ke 2 ml vychlazené (4°C) 80% (w/v) sacharózy a vše přenesli do centrifugační kyvety Beckman SW41. Výsledná koncentrace sacharózy po smíchání byla 40%. V další fázi experimentálního postupu jsme tento 40% roztok sacharózy převrstvili 35%, 30%, 25%, 20%, 15% a 10% (w/v) sacharózou o objemu 1 ml od každé hustoty. Do horní části kyvety jsme pipetovali 1,5 ml sacharózy o hustotě 5% (w/v). Roztoky sacharózy byly připraveny ve 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA a 150 mM NaCl. Vrstvení gradientu jsme prováděli v chladové místnosti při 4°C. Takto připravený hustotní gradient jsme centrifugovali 24 hod při 200 000 x g a 4°C. Po centrifugaci jsme gradient při 4°C opatrně směrem od menisku ke dnu kyvety rozebrali, a to následujícím způsobem: frakce č. 1 0,5 ml, frakce č. 2 - 12 po 1 ml. Membránové domény jsou charakterizovány svojí nízkou vznášivou hustotou při flotaci na hustotním sacharózovém gradientu a vyplavávají do gradientových frakcí obsahujících 15 - 25% sacharózu (frakce 4 - 7), zatímco solubilní a detergentem rozpuštěné bílkoviny zůstávají v dolní 40% sacharóze (frakce 8 - 12).

Frakce jsme zamrazili v tekutém dusíku a uchovali do dalšího použití při -80°C .

4.9. Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů jsme používali tři metody. Pomocí bicinchoninové kyseliny jsme určovali koncentraci proteinů ve frakcích buněčného lyzátu, hrubých plazmatických membrán a cytosolu připravených z přechodně transfekovaných HEK-293 buněk. K měření koncentrace proteinů ve frakcích sacharózového gradientu a v cytosolárních frakcích připravených ze stabilně transfekovaných HEK-293 buněk (klon E2M11) jsme používali Lowryho metodu, která se s předešlou v mnohém shoduje. Příprava vzorků pro 2D elektroforézu zahrnuje také precipitační krok s trichloroctovou kyselinou (TCA). Koncentraci proteinů v TCA precipitátu jsme určovali upravenou Bradfordovou metodou.

4.9.1. Stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny

K určení koncentrace proteinů ve frakcích buněčného lyzátu, hrubých plazmatických membrán a cytosolu odvozených z přechodně transfekovaných HEK-293 buněk jsme používali metodu, jejíž princip je založen na bicinchoninové kyselině (BCA) redukcí za alkalických podmínek bivalentní měď na monovalentní iont. Zároveň vzniká purpurový produkt molybden/wolfram, která absorbuje světlo o vlnové délce 562 nm. Ke stanovení koncentrace proteinů jsme potřebovali následující činidla: roztok bicinchoninové kyseliny [1% (w/v) BCA, 2% (w/v) Na_2CO_3 (uhličitan sodný), 0,16% (w/v) $\text{KNa}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6) \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ (vínan sodno-draselný), 0,4% (w/v) NaOH, 0,95% (w/v) NaHCO_3 (hydrogenuhlíčan sodný), pH 11,25] a 4% (w/v) roztok pentahydrát sulfátu měďnatého $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$. Standardní křivka byla připravena s hovězím sérovým albuminem (BSA) v TE pufru o následujících koncentracích:

0 mg/ml

0,2 mg/ml

0,4 mg/ml

0,6 mg/ml

0,8 mg/ml

1,0 mg/ml
1,2 mg/ml
1,4 mg/ml
1,6 mg/ml
1,8 mg/ml
a 2,0 mg/ml.

Do 96 jamkové ELISA destičky jsme nanášeli 10 µl standardu či vzorku o neznámé koncentraci. Měření koncentrace všech vzorků jsme prováděli v triplicátech. U vzorku o neznámé proteinové koncentraci jsme vždy kromě nenaředené formy ještě proměřovali jeho roztok s TE pufrem v poměrech 1:1 a 1:2. Do ELISA destičky jsme poté ke všem vzorkům přidali 200 µl roztoku činidel bicinchoninové kyseliny a 4% roztoku pentahydrát sulfátu měďnatého $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ naředěných v poměru 49:1. Standardní křivku a vzorky v ELISA destičce jsme poté inkubovali 30 min při 37°C. Po inkubaci jsme změřili absorbanci roztoků při vlnové délce 492 nm. Absorbance je přímo úměrná koncentraci proteinů. Absorbanci kontroly (0 mg/ml BSA v TE pufru) jsme odečetli od absorbance vzorku. Do grafu jsme zanesli známé množství proteinu BSA (osa x) a absorbanci naměřenou při 492 nm (osa y). Získaná data jsme vyhodnotili programem Microsoft Excel 2000. Koncentrace vzorků jsme odečítali z kalibrační křivky, která byla generována lineární regresní analýzou podle rovnice:

$$y = ax + b$$

4.9.2. Stanovení koncentrace proteinů pomocí Lowryho metody

Koncentraci proteinů ve frakcích sacharózového gradientu a v cytosolárních frakcích získaných z E2M11 buněk jsme stanovili modifikovanou metodou podle Lowryho a kol., 1951. Jako standard pro stanovení kalibrační křivky jsme použili BSA. Nejdříve jsme proměřovali kalibrační křivku o objemech 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 a 200 µl BSA o koncentraci 1 mg/ml, poté samotné frakce sacharózového gradientu: pro 1. a 2. frakci 100 µl frakce, pro 3. - 7. frakci 50 µl, pro 8. frakci 30 µl, pro 9. - 12. frakci 100 µl a pro homogenát a lyzát buněk 5 µl frakce. Tyto objemy jsme doplnili vodou do 500 µl. Poté jsme přidali 1,5 ml roztoku A, promíchali a inkubovali 10 až 15 min při laboratorní teplotě. Roztok A byl následujícího složení: 2% (w/v) Na_2CO_3 + 0,1 N NaOH, 2% (w/v) vínan sodno-draselný a 1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ v poměru 50:1:1. Dále jsme

přidali 150 µl Folin-Ciocalteauovo fenolového činidla (čerstvě naředěného s H₂O v poměru 1:1), protřepali a inkubovali 30 min při laboratorní teplotě. Měření koncentrace vzorků jsme prováděli v triplikátech. Absorbanci jednotlivých vzorků jsme měřili při vlnové délce 720 nm na spektrofotometru Beckman. Naměřená data jsme vyhodnotili programem GraphPad Prism 4.00. Koncentrace vzorků jsme odečítali z kalibrační křivky, která byla generována nelineární regresní analýzou podle rovnice:

$$y = ax^2 + bx + c$$

4.9.3. Stanovení koncentrace proteinů pomocí upravené Bradfordovy metody

Koncentraci proteinů v experimentálních vzorcích v 2D vzorkovém pufru (TCA precipitáty) jsme určili upravenou metodou podle Bradforda (Ramagli, 1999; Ramagli a Rodriguez, 1985; Zor a Selinger, 1996), která je s tímto pufrům kompatibilní a tudíž neinterferuje s jeho složkami. Tato metoda je lineární v koncentracích 0,05 - 5 mg/ml. Kalibrační křivka s BSA byla připravena následovně:

- | | |
|---|--------------------|
| A) 2D vzorkový pufr v HCl v poměru 1:5 | |
| B) 50 µl BSA (1 mg/ml) v 2D vzorkovém pufru | c = 5,0 mg/ml |
| 1) 50 µl B) + 200 µl 0,02 N HCl | c = 1,0 mg/ml |
| 2) 100 µl 1) + 100 µl A) | c = 0,5 mg/ml |
| 3) 100 µl 2) + 100 µl A) | c = 0,25 mg/ml |
| 4) 100 µl 3) + 100 µl A) | c = 0,125 mg/ml |
| 5) 100 µl 4) + 100 µl A) | c = 0,0625 mg/ml |
| 6) 100 µl 5) + 100 µl A) | c = 0,03125 mg/ml |
| 7) 100 µl 6) + 100 µl A) | c = 0,015625 mg/ml |
| 8) 20 µl 2D vzorkový pufr + 80 µl A) | c = 0,0 mg/ml |

Vzorky byly též naředěny 0,02 N HCl, a to v poměru 1:4. Měření koncentrace vzorků jsme prováděli v triplikátech. 5 µl standardu s BSA a každého vzorku jsme napipetovali do 96 jamkové ELISA destičky a přidali 200 µl Coomassie roztoku naředěného 1:4 s vodou. Po 5 minutové inkubaci při laboratorní teplotě a za mírného třepání jsme na spektrofotometru změřili absorbanci kalibrační křivky a jednotlivých vzorků při vlnové délce 595 nm a 450 nm.

Koncentrace vzorků jsme odečítali z kalibrační křivky, která byla určena vynesím poměru (595 nm) / (450 nm) (osa y) a množství BSA v kalibrační křivce (osa x) do grafu. Množství BSA v kalibrační křivce bylo následující: 1) 5 µg, 2) 2,5 µg, 3) 1,25 µg,

4) 0,625 µg, 5) 0,3125 µg, 6) 0,15625 µg, 7) 0,078125 µg a 8) 0 µg. Naměřená data jsme vyhodnotili programem Microsoft Excel 2000. Kalibrační křivka byla generována lineární regresní analýzou podle rovnice:

$$y = ax + b$$

4.10. Vazebné studie

Vazebné studie jsou jednou ze základních studií interakcí mezi chemickými látkami a receptory i mezi proteiny navzájem. V naší studii jsme použili tři typy těchto pokusů, a to saturační a kompetiční vazebné studie a metodu využívající [³⁵S]GTPγS. Saturační uspořádání pokusu patří mezi přímé vazebné studie, kterými určujeme vazebné vlastnosti vybraného radioligandu ve vztahu k vazebným místům v preparátu. Konkrétně tímto typem vazebné studie sledujeme množství vázaného radioligandu po dosažení reakční rovnováhy v závislosti na jeho měnící se koncentraci a z toho určujeme afinitu radioligandu k receptoru a maximální vazebnou kapacitu preparátu. Nepřímé vazebné studie se používají k charakterizaci vazebných vlastností neznačených ligandů a určujeme jimi vztah ligandu k použitému radioligandu a zdánlivou afinitu ligandu k vazebným místům preparátu. Tyto parametry získáme analýzou stanovených dat v kompetičním uspořádání pokusu, kde sledujeme změny v množství vázaného radioligandu (fixní koncentrace) k vazebným místům v závislosti na měnící se koncentraci neznačeného ligandu. Metodu [³⁵S]GTPγS jsme používali k měření aktivity spojení mezi receptorem spřaženým s G-proteinem a G-proteinem samotným.

Pro vyhodnocení dat z vazebných saturačních a kompetičních pokusů jsme stanovili celkovou vazbu radioligandu (C), která odpovídá radioaktivitě zachycené na filtrech, a nescifickou vazbu radioligandu (Ns), která představuje množství radioligandu zachycené na filtrech po inkubaci vzorku s látkou pro stanovení nescifické vazby. Z těchto dvou údajů jsme vypočítali specifickou vazbu radioligandu (B) podle rovnice:

$$B = C - Ns$$

Naměřená data ze saturačních vazebných pokusů jsme vyhodnotili nelineární regresní analýzou podle rovnice:

$$B = ([F] \times B_{\max}) / ([F] + K_d)$$

Tím jsme získali hodnotu K_d a B_{\max} radioligandu. B_{\max} radioligandu vyjadřuje celkové množství vazebných míst v preparátu a je dána počtem receptorů s navázaným radioligandem v jeho saturující koncentraci. Koncentraci radioligandu na počátku inkubace jsme určili stanovením alikvotního množství radioligandu přidávaného ke vzorkům. Koncentraci volného radioligandu ($[F]$) jsme určili odečtením navázaného množství radioligandu (B) k vazebným místům od stanovené vložené aktivity na počátku inkubace. K_d je rovnovážná disociační konstanta radioligandu a vyjadřuje jeho afinitu k receptoru. Je stanovena koncentrací radioligandu, při které je obsazena polovina celkového množství specifických vazebných míst.

Hodnoty IC_{50} kompetitoru pro jednotlivá stanovení v kompetiční vazebné studii jsme určili nelineární regresní analýzou naměřených dat podle následující rovnice:

$$B = N_s + [(B_0 - N_s) / (1 + 10^{1 - \text{Log}IC_{50}})]$$

K_i radioligandu jsme následně vypočítali podle Cheng-Prusoffovy rovnice:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$$

K_i udává zdánlivou afinitu kompetitoru k receptoru. Veličina IC_{50} vyjadřuje koncentraci inhibitoru potřebnou k vytěsnění 50% specifické vazby radioligandu.

U pokusů s $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ jsme srovnávali vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v přítomnosti a nepřítomnosti stimulačního ligandu pro receptor v jeho maximálně účinné koncentraci, tzv. jednobodové stanovení. Tím jsme získali maximální hodnotu stimulace vazby $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Výsledky získané z měření s jednotlivými mutanty jsme porovnávali jako absolutní hodnoty zvýšení vazby $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ po stimulaci L-fenylefrinem, není-li uvedeno jinak. Také jsme v preparátu sledovali množství $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ vazby po dosažení rovnováhy v závislosti na měnící se koncentraci stimulačního ligandu pro receptor. Hodnotu maximální stimulace

vazby [³⁵S]GTPγS a hodnotu EC₅₀ jsme získali nelineární regresní analýzou dat podle rovnice:

$$B = N_s + [(B_0 - N_s) / (1 + 10^{\text{LogEC}_{50} - S})]$$

[³H]prazosin ... antagonist α_1 -adrenergických receptorů; radioligand

L-fenylefrin ... agonista α_1 -adrenergických receptorů

C ... celková vazba radioligandu

N_s ... nespecifická vazba radioligandu

B ... specifická vazba radioligandu

[F] ... koncentrace volného radioligandu (v saturačním uspořádání pokusu)

[L] ... koncentrace radioligandu (v kompetičním uspořádání pokusu)

K_d ... rovnovážná disociační konstanta radioligandu

K_i ... zdánlivá rovnovážná disociační konstanta kompetitoru

B_{max} ... maximální vazebná kapacita vzorku

B₀ ... vazba radioligandu v nepřítomnosti kompetitoru

IC₅₀ ... koncentrace kompetitoru, která inhibuje 50% vazby radioligandu B₀

EC₅₀ ... efektivní koncentrace agonisty, která stimuluje 50% [³⁵S]GTPγS vazby

I ... logaritmus koncentrace inhibitoru (v kompetičním uspořádání pokusu)

S ... logaritmus koncentrace stimulujícího ligandu (vazebná studie s [³⁵S]GTPγS)

4.10.1. Vazebná studie s [³H]prazosinem

Vazebné saturační a kompetiční studie byly zahájeny přidáním 3 μg hrubých plazmatických membrán k inhibičnímu pufru (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 7,4) obsahujícím danou koncentraci [³H]prazosinu (0,02 až 4,5 nM v saturačních pokusech a 0,8 nM v kompetičních) v přítomnosti či absenci zvyšující se koncentrace L-fenylefrinu (10⁻¹⁰ až 10⁻³ M v kompetiční analýze). Konečný objem byl 200 μl. [³H]prazosin je antagonist α_1 -adrenergických receptorů. L-fenylefrin je agonista α_1 -adrenergických receptorů. Nespecifická vazba byla určena přítomností 10 μM antagonisty α -adrenoreceptorů fentolaminu. Reakční směs byla inkubována 30 min při 30°C a vázaný ligand byl od volného oddělen vakuovou filtrací přes GF/B filtry. Tyto filtry byly třikrát promyty inhibičním pufrem a množství zachycené radioaktivity bylo zjištěno kapalnou scintilační spektrometrií na přístroji Packard Top Count NXT pro mikrotitrační destičky.

4.10.2. Vazebná studie s [³⁵S]GTPγS

Vazebné experimenty s [³⁵S]GTPγS jsme zahájili přidáním hrubých plazmatických membrán obsahujících 50 nebo 100 fmolů určitého konstruktu ke vzorkovému pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,2 mM L-kyselina askorbová, 1 μM guanosin 5'-difosfát, 50 nCi [³⁵S]GTPγS) spolu s ligandy receptorů. V případě jednobodového stanovení jsme používali L-fenylefrin v koncentraci 100 μM. Pro studium závislosti stimulace vazby [³⁵S]GTPγS na rostoucí koncentraci L-fenylefrinu jsme používali jeho koncentraci v rozmezí od 10⁻¹⁰ po 10⁻³. Konečný objem byl 100 μl. Nespecifickou vazbu jsme určili za stejných podmínek v přítomnosti 100 μM GTPγS. Reakční směs jsme inkubovali 15 min při 30°C. Probíhající reakce jsme ukončili přidáním 0,5 ml vychlazeného (4°C) pufru obsahujícího 20 mM HEPES (pH 7,4), 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl a směs inhibitorů proteáz (Complete, Roche). Vzorky jsme centrifugovali 15 min při 16 000 x g a 4°C a výsledný pelet jsme resuspendovali v solubilizačním pufru (100 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1,25% (v/v) Nonidet P-40) s 0,2% (w/v) dodecylsulfátem sodným (SDS). V tomto kroku jsme vzorek též purifikovali pomocí 60 μl 33% (v/v) Pansorbinu (Calbiochem) ve 2% (w/v) BSA a 0,1% (w/v) NaN₃ za pomalého míchání na otáčecí plošině při 4°C po dobu 1 hod. Po 5 minutové centrifugaci při 21 000 x g a 4°C následovala 12 hodinová imunoprecipitace peletu s CQ antisérem (v poměru 1:50) a protein G sefárovou (Sigma-Aldrich) v pufru obsahujícím 20 mM Tris, 130 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,25% (v/v) Nonidet P-40, 1,2% (w/v) BSA a 0,06% (w/v) NaN₃ při 4°C. Nakonec jsme imunokomplexy dvakrát promyli solubilizačním pufrem a vazba [³⁵S]GTPγS byla změřena kapalnou scintilační spektrometrií na přístroji Packard Tri-Carb 1900TR. Promývací krok zahrnoval dvouminutové stočení vzorku při 21 000 x g a 4°C.

4.11. Inkubace s hydroxylaminem

Hydroxylamin NH₂OH je redukční činidlo způsobující depalmitoylaci proteinů (Wedegaertner a Bourne, 1994; Chamberlain a Burgoyne, 1998, Ugur a kol., 2003). 50 nebo 100 fmolů hrubých plazmatických membrán jsme inkubovali 45 min při laboratorní teplotě v pufru obsahujícím 0,05 M Tris-HCl (pH 7,4) a 0,5% (w/v) KOH v přítomnosti či nepřítomnosti 0,5 M NH₂OH. Vzorky jsme poté 30 min centrifugovali při

90 000 x g a 4°C a před opětovným stočením jsme je jednou promyli membránovým TE pufrem. Pelet jsme resuspendovali membránovým TE pufrem v původním objemu. Kontrolní i hydroxylaminem ošetřené hrubé plazmatické membrány jsme poté podrobili vazebné studii s [³⁵S]GTPγS a radioaktivitu změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Tento krok opět zahrnoval imunoprecipitaci pomocí CQ antiséra.

4.12. Jednodimenzionální SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza

Pro rozdělení proteinů podle jejich relativní molekulové váhy jsme použili metodu standardní SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE) (Svoboda a Milligan, 1994). Při práci s konstrukty obsahujícími α_{1b}-adrenoreceptor a různé formy proteinů G_{11α} a α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} jsme použili již výrobcem připravené 4 - 12% Bis-Tris gely (Invitrogen). Pro rozdělení proteinů ve frakcích flotačního sacharózového gradientu jsme jako separační gel použili standardní 10% gel následujícího složení:

8 ml	H ₂ O
5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
6,7 ml	30% (w/v) akrylamid/0,8% (w/v) <i>NN'</i> -metylenbisakrylamid
200 μl	10% (w/v) SDS
90 μl	10% (w/v) APS
8 μl	TEMED

Tento gel jsme překryli asi 300 μl nasyceného roztoku n-butanolu ve H₂O a nechali 1 hod polymerovat. Po zpolymerování jsme gel opláchli vodou a navrstvili na něj zaostřovací gel, tzv. stacking gel:

6 ml	H ₂ O
2,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
1,3 ml	30% (w/v) akrylamid/0,8% (w/v) <i>NN'</i> -metylenbisakrylamid
200 μl	10% (w/v) SDS
90 μl	10% (w/v) APS
8 μl	TEMED

Uvedená množství odpovídají přípravě dvou gelů pro aparaturu Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories). Po nalití gelu jsme ihned zasunuli hřebínek pro vytvoření 15 jamek pro vzorky a opět nechali 1 hod polymerovat.

Všechny typy vzorků uvedených v dizertační práci byly před nanesením na jednorozměrný gel upraveny následujícím způsobem: ke vzorkům jsme přidali Laemmliho solubilizační pufr (SLB) o složení 50 mM Tris-HCl, 5% (w/v) SDS, 6% (v/v) dithiothreitol, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, pH 8,0. Vlastní solubilizace byla provedena při 95°C v tepelném bloku (Dri-block) po dobu 5 min. Jako pozitivní kontrolu pro stanovení G_qα/G₁₁α jsme použili homogenát potkaního mozku a pro detekci caveolinu homogenát potkaního srdce. Na gel jsme nanесли též směs molekulových hmotnostních standardů od firmy Bio-rad Laboratories. Elektroforéza s oběma typy gelů probíhala v aparatuře Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories) v elektroforetickém pufru (25 mM Tris, pH neupravováno, 188 mM glycin a 0,1% (w/v) SDS) při konstantním napětí 200 V po dobu 45 min. Elektroforézu jsme ukončili, když čelní zóna označená bromfenolovou modří dosáhla dolního okraje gelu.

4.13. TCA diethylether/ethanol precipitace

Cytosolární frakci odvozenou od E2M11 buněk jsme precipitovali vychlazenou (4°C) 7,5% (w/v) trichloroctovou kyselinou TCA (konečná koncentrace) na ledu po dobu 1 hod. Směs jsme centrifugovali při 16 000 x g po dobu 10 min při 4°C. Supernatant jsme vyhodili a pelet inkubovali s 1 000 µl vychlazené (4°C) 5% (w/v) TCA na ledu po dobu 10 min. Poté jsme vzorek 5 min centrifugovali při 16 000 x g při teplotě 4°C. Supernatant jsme odsáli a pelet dvakrát promyli vychlazenou (4°C) směsí diethyletheru s ethanolem v poměru 1:1 (v/v) za pomalého míchání na otáčecím kole po dobu 30 min za laboratorní teploty. Pelet jsme v každém promývacím kroku získali zpět 10 minutovou centrifugací při 16 000 x g a 4°C. Nakonec jsme pelet nechali schnout několik minut na vzduchu a poté rozpustili v denaturujícím 2D vzorkovém pufru obsahujícím 7 M ureu, 2 M thioureu, 4% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) IPG pufr, pH 4-7, 1% (w/v) DTT za neustálého třepání při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Vzorek jsme očistili od nerozpuštěných zbytků 10 minutovou centrifugací při 16 000 x g za laboratorní teploty. Supernatant z této centrifugace jsme nazvali frakce 1. Ke zbývajícímu peletu jsme přidali nový 2D vzorkový pufr a znovu nechali třepat 1 hod při laboratorní teplotě. Po opětovné centrifugaci jsme výsledný supernatant přidali k frakci 1.

4.14. Izoelektrická fokusace (IEF)

Pro izoelektrické rozdělení proteinů v cytosolární frakci E2M11 buněk jsme použili 18 centimetrů dlouhé immobilinové stripy s lineárním gradientem pH v rozmezí 4-7. Strip jsme před nanesením vzorku nechali 5 min inkubovat při laboratorní teplotě. Poté jsme na strip nanесли 400 µg proteinu solubilizovaného v 360 µl denaturujícího 2D vzorkového pufru obarveného trochou bromfenolové modři a nechali strip přes noc při laboratorní teplotě pasivně rehydratovat. Izoelektrickou fokusaci jsme provedli na přístroji IPGphor (Amersham Biosciences) za použití step-and-hold protokolu při zvyšujícím se napětí: 30 V po 15 Vhr, 150 V po 1 000 Vhr, 500 V po 500 Vhr, 1500 V po 1 500 Vhr, 3 000 V po 3 000 Vhr, 8 000 V po 85 000 Vhr a 2 000 V po dobu 24 - 48 hod. Fokusací upravené stripy se vzorkem jsme před použitím na dvoudimenzionální elektroforéze skladovali v -20°C.

4.15. Dvoudimenzionální SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza

Fokusované stripy jsme propláchli v destilované vodě, rychle osušili z plastické strany o filtrační papír a ekvilibrovali ve 4 ml ekvilibračního pufru [30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 6 M urea, 0,05 M Tris-HCl, pH 6,8] ve speciálním korýtku. Nejdříve jsme disulfidické vazby a další oxidované skupiny přítomné ve fokusovaných proteinech redukovali v ekvilibračním pufru obsahujícím navíc 2% (w/v) DTT po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Poté jsme stripy osušili z obou stran o filtrační papír a následně jsme proteiny alkylovali v ekvilibračním pufru se 4,5% (w/v) IAA, opět po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Ekvilibrované stripy jsme poté rychle osušili z plastické strany a ponechali 10 min v Laemmliho elektroforetickém pufru o následujícím složení: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% (w/v) SDS.

Gely o velikosti 14 cm x 16 cm x 1 mm obsahovaly 10% polyakrylamidovou směs s dvojitým množstvím SDS než obvykle [konečná koncentrace SDS 0,2% (w/v)]:

141,6 ml	H ₂ O
90 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
120 ml	30% (w/v) akrylamid/0,8% (w/v) <i>N N'</i> -metylenbisakrylamid
7,2 ml	10 % (w/v) SDS

1,8 ml	10% (w/v) APS
144 μ l	TEMED

Uvedená množství odpovídají přípravě čtrnácti gelů pro aparaturu Hoefer SE 600. Gely jsme ihned po nalití polyakrylamidové směsi převrstvili dostatečným množstvím vodou nasyceného n-butanolu. Po hodině jsme n-butanol vyměnili za Laemmliho elektroforetický pufř s dvojitým množstvím SDS než obvykle [konečná koncentrace SDS 0,2% (w/v)] a takto ponechali gely polymerovat několik hodin. Abychom jednotlivé gely od sebe rozeznali, je vhodné umístit malý kousek filtračního papíru (3 x 3 mm) s tužkou napsaným pořadovým číslem mezi skla k jejich dolnímu okraji ještě před nalitím gelu. Papírek pak necháme zapolymerovat do gelu.

Ekvilibrované stripy jsme v den pokusu zkrátili z levé strany o 3 cm a z pravé o 2 cm a umístili horizontálně na horní okraj gelů. Každý strip jsme zafixovali na místě roztokem 0,5% (w/v) agarózy v Laemmliho elektroforetickém pufřu s dvojitým množstvím SDS než obvykle [konečná koncentrace SDS 0,2% (w/v)], obsahujícím bromfenolovou modř, která poté vytvářela čelo gelu. Molekulové markery jsme nanесли na malý kousek filtračního papíru (4 x 4 mm), který jsme umístili před nanesením 0,5% agarózy v Laemmliho elektroforetickém pufřu na horní okraj gelu kousek od acidického konce stripu a zafixovali jej spolu se stripem. Připravené gely jsme vložili do elektroforetické jednotky Hoefer SE 600. Elektroforéza probíhala vertikálně v Laemmliho elektroforetickém pufřu chlazeném na 15°C nejdříve 30 min při konstantním napětí 30 V a poté přes noc při konstantním napětí 50 V. Elektroforézu jsme ukončili v okamžiku, kdy čelo gelu (bromfenolová modř) dosáhlo dolního okraje skel.

4.16. Příprava antiséra

Pro imunodetekci proteinů jsme používali králičí polyklonální protilátku CQ proti $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu, která však byla vyrobena ve dvou různých laboratořích. V první části výsledků jsme používali protilátku vyrobenou v laboratoři G. Milligana. Protilátka používaná k detekci proteinů v sacharózových frakcích a ve vzorcích pro 2D elektroforézu byla připravena v králicích získaných z VELAZu (Praha). Postup při výrobě obou protilátek byl stejný. Stručně, novozélandský bílý králik byl imunizován konjugátem syntetického peptidu QLNKEYNLV-COOH a glutaraldehydovým konjugátem

hemocyaninu z přílipky (KLH, keyhole limpet hemocyanin; Calbiochem). Dodatečně byla na N-terminální sekvenci peptidu připojena aminokyselina Cys za účelem připojení peptidu k proteinu. Ke spřažení peptidu a proteinu došlo po aktivaci KLH vyvolané inkubací s m-maleimidibenzoylsulfo-sucinimid esterem (Pierce). Tento syntetický peptid reprezentuje C-terminální deka-peptid, který je shodný pro $G_{q\alpha}$ i $G_{11\alpha}$. Toto antisérum identifikuje oba polypeptidy rovnocenně (Mitchell a kol., 1991).

4.17. Imunodetekce proteinů

Proteiny, rozdělené na jednodimenzionální elektroforéze podle jejich molekulové váhy, jsme přenesli na nitrocelulózu nebo poly-vinyliden-fluoridovou membránu metodou mokrého blotování. Přenos probíhal při konstantním napětí 30 V po dobu 60 min. Membrány jsme blokovali 1 hod při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4°C v 5% (w/v) nízkotučném mléku v promývacím pufru (PBS s 0,05% (v/v) či 0,1% (v/v) Tweenem 20). Následně jsme blot inkubovali v 1% (w/v) nízkotučném mléku v promývacím pufru s příslušnou primární protilátkou po dobu 2 hod při laboratorní teplotě. Králičí polyklonální protilátku CQ proti $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ i myší protilátku proti HA epitopu jsme naředili ve stejném poměru 1:10 000. Polyklonální králičí protilátku proti caveolinu-2 jsme ředili 3 000x. Po intenzivním promytí (3x 10 min) promývacím pufrům jsme membrány 1 hod inkubovali při laboratorní teplotě se sekundární IgG anti-králičí nebo anti-myší protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou vždy 20 000x v 1% (w/v) nízkotučném mléku v promývacím pufru. Po třech 10 minutových promytích v promývacím pufru jsme bloty vizualizovali metodou chemiluminiscence indukované křenovou peroxidázou pomocí ECL kitu (Amersham Biosciences). Membránu s přenesenými proteiny jsme exponovali na film Kodak.

Proteiny, rozdělené na dvoudimenzionální elektroforéze podle jejich izoelektrického bodu a molekulové váhy, jsme přenesli na nitrocelulózu metodou polosuchého Western blotu. Přenos probíhal při konstantním napětí 21 V po dobu 90 min. Membrány jsme 1 hod blokovali v 5% (w/v) nízkotučném mléku v promývacím pufru (PBS s 0,05% Tweenem 20) při laboratorní teplotě. Následně jsme blot inkubovali v 1% (w/v) nízkotučném mléku v promývacím pufru s příslušnou primární protilátkou po

dobu 2 hod při laboratorní teplotě. V tomto případě jsme použili CQ protilátku proti $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ naředěnou v poměru 1:5 000. Po intenzivním promytí (3x 10 min) promývacím pufrem jsme membrány 1 hod inkubovali při laboratorní teplotě se sekundární anti-králičí protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou 20 000x v 1% nízkotučném mléku v promývacím pufru. Po třech 10 minutových promytích v PBS s 0,05% Tweenem 20 jsme bloty vizualizovali metodou chemiluminiscence indukované křenovou peroxidázou pomocí ECL kitu (Amersham Biosciences). Membránu s přenesenými proteiny jsme exponovali na film Kodak.

4.18. Vyhodnocení a prezentace výsledků

Signály získané při imunodetekci na filmu Kodak jsme snímali stolním skenerem Hewlett Packard ScanJet 4200C. Kvantitativní stanovení dat z jednodimenzionální elektroforézy jsme provedli denzitometricky pomocí počítačového programu ImageQuant. K dalšímu grafickému zpracování obrázků z filmu jsme použili program Adobe Photoshop 6.0. Filmy s vizualizovanými bloty získanými v experimentech s dvourozměrnou elektroforézou jsme denzitometricky naskenovali. Analýza filmů se skvrnami byla provedena pomocí programu PDQuest.

Statistické zpracování výsledků jsme provedli v programech Microsoft Excel 2000 a GraphPad Prism 4.00. Vypočítali jsme aritmetické průměry hodnot získaných ze tří případně čtyř nezávislých pokusů a příslušné směrodatné odchylky průměru (SEM). Relativní změny u kontrolních a β -cyklodextrinem ovlivněných buněk jsme srovnávali pomocí nepárového Studentova t-testu. Signifikantnost stanovených rozdílů dat z ostatních pokusů jsme určili párovým Studentovým t-testem. Studentův t-test se používá k určení pravděpodobnosti (P), zda střední hodnoty dvou souborů dat jsou stejné. Pokud $P < 0,05$, pak je rozdíl středních hodnot obou testovaných souborů signifikantní *, pro $P < 0,01$ je změna velmi signifikantní **, $P < 0,001$ je vysoce signifikantní ***. V případě, že $P > 0,05$, změna není signifikantní, NS.

5. VÝSLEDKY

5.1. Význam palmitoylace a interakcí α podjednotky s $\beta\gamma$ dimerem pro funkční spřažení mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem

Pro studium interakcí α_{1b} -adrenoreceptoru s $G_{11\alpha}$ proteinem jsme zvolili modelovou linii HEK-293 buněk, ve které jsme exprimovali křeččí typ α_{1b} -adrenoreceptoru. Tyto buňky jsme sklídili, buněčný lyzát krátkým stočením očistili od jader a výsledný supernatant rozdělili na membránovou a cytosolární frakci vysokorychlostní centrifugací (90 000 x g, 30 min, 4°C). Membránová frakce obsahovala hrubé plazmatické membrány. Z těchto membrán jsme připravili imunoprecipitát za použití specifického CQ antiséra proti C-terminálnímu dekaeptidu proteinů $G_q\alpha/G_{11\alpha}$. V imunoprecipitátech s exprimovaným α_{1b} -adrenoreceptorem jsme zaznamenali vlivem α_1 -adrenergního agonisty L-fenylefrinu o koncentraci 100 μ M 5,4 násobné zvýšení vazby [35 S]GTP γ S oproti kontrole (**Tab. 2** a **Obr. 4**). Jako negativní kontrolu jsme v HEK-293 buňkách exprimovali prázdný, tzn. žádný protein nekódující vektor pcDNA3, a buňky transfekované tímto plazmidem, potažmo vzorky z nich připravené, jsme nazývali slepé neboli mock. Následně jsme koexprimovali α_{1b} -adrenoreceptor a α podjednotku G-proteinu $G_{11\alpha}$. Imunoprecipitáty z těchto vzorků vykazovaly vlivem L-fenylefrinu značné zvýšení vazby [35 S]GTP γ S (**Tab. 2** a **Obr. 4**). Tato stimulace vazby [35 S]GTP γ S byla 3,6x vyšší než v případě exprese samotného α_{1b} -adrenoreceptoru.

Dále jsme se zabývali studiem mutací $G_{11\alpha}$ proteinu, které ovlivňují jeho palmitoylaci, a jejich vlivu na funkční spřažení s α_{1b} -adrenoreceptorem. Již dříve byl v laboratoři G. Milligana vyroben mutant $G_{11\alpha}$ proteinu, Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$, který není substrátem pro posttranslační thioacylaci (McCallum a kol., 1995). Současná exprese α_{1b} -adrenoreceptoru a Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ proteinu snížila schopnost L-fenylefrinu stimulovat vazbu [35 S]GTP γ S k Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ v obdobně připravených imunoprecipitátech o více než 80% (**Tab. 2** a **Obr. 4**).

Tab. 2: Vliv mutace vazebného místa pro thioacylaci na množství navázaného [³⁵S]GTPγS k proteinu Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	- L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [%]
mock	69,3 ± 7,8	71,7 ± 3,8	3,3 ± 0,2
α _{1b} AR	111,5 ± 10,8	604,0 ± 23,5	27,8 ± 1,1
α _{1b} AR + G _{11α}	81,3 ± 4,3	2174,5 ± 24,1	100,0 ± 1,1
α _{1b} AR + C ^{9,10} SG _{11α}	79,5 ± 14,9	349,8 ± 14,0	16,1 ± 0,6

Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (± směrodatná odchylka průměru). Hodnotu 100% jsme přiřadili vzorku s koexprimovaným α_{1b}-adrenoreceptorem a G_{11α} proteinem po ovlivnění L-fenylefrinem.

Abychom zjistili, zda mutace vazebných míst zodpovědných za thioacylaci G-proteinu Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α}, má nějaký vliv na jeho lokalizaci v buňce, podrobili jsme frakce hrubých plazmatických membrán a cytosolu s odpovídajícími konstrukty elektroforéze a Western blotu. Na 4 - 12% gel standardní elektroforézy jsme nanášeli vždy stejné množství proteinů od každé frakce obsahující prázdný pcDNA3 vektor, α_{1b}-adrenoreceptor a nemutovaný G_{11α} protein nebo α_{1b}-adrenoreceptor spolu s Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} proteinem. Denzitometricky jsme zjistili přibližně stejné procentuální zastoupení celkového množství proteinů G_{11α} i Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} v obou těchto frakcích. Endogenně exprimované proteiny G_{11α} a G_{qα} byly použitým CQ antisérem také detekovány (**Obr. 5**).

Exprimovaná množství nemodifikovaného G_{11α} a Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} byla mezi jednotlivými transfekcemi podobná ale ne zcela totožná. Abychom se vyvarovali této variability a zároveň rozšířili výše uvedenou studii, exprimovali jsme v HEK-293 buňkách fúzní protein, kdy N-konec nemodifikovaného G_{11α} byl ve čtecím rámci spojen s C-koncem α_{1b}-adrenoreceptoru. To zaručovalo konstantní stechiometrii α_{1b}-adrenoreceptoru a G_{11α} v poměru 1:1. Buňky s exprimovaným α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} proteinem jsme sklídili, buněčný lyzát krátkým stočením očistili od jader a výsledný supernatant rozdělili na membránovou a cytosolární frakci vysokorychlostní centrifugací (90 000 x g, 30 min, 4°C). V imunoprecipitátech připravených z membránové frakce těchto buněk L-fenylefrin opět silně stimuloval vazbu [³⁵S]GTPγS - 27,6 násobné zvýšení vazby [³⁵S]GTPγS oproti kontrole (**Tab. 3 a Obr. 6**). Tento výsledek byl již publikován dříve v jiné souvislosti (Stevens a kol., 2001; Carrillo a kol., 2002). Stejně množství fúzního

proteinu ve sledovaných vzorcích jsme zajistili metodou vazebných pokusů s antagonistou α_{1b} -adrenoreceptorů [^3H]prazosinem (viz níže, **Tab. 4**). Imunoprecipitovali jsme takové množství membránové frakce, které obsahovalo 100 fmolů vazebných míst pro [^3H]prazosin. Následně jsme se zaměřili na vliv hydroxylaminu na přenos informací mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem. Inkubace vzorků s neutrálním hydroxylaminem odstraňuje z proteinů thioesterově vázané mastné kyseliny (Wedegaertner a Bourne, 1994; Chamberlain a Burgoyne, 1998). Hrubé plazmatické membrány izolované z HEK-293 buněk exprimujících fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ jsme inkubovali v přítomnosti či nepřítomnosti 0,5 M hydroxylaminu. Kontrolní i hydroxylaminem ošetřené membrány obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [^3H]prazosin daného konstruktů jsme podrobili vazebnému pokusu s [^{35}S]GTP γ S v přítomnosti či nepřítomnosti 100 μM L-fenylefrinu. Membrány inkubované s hydroxylaminem vykazovaly o více než 50% sníženou L-fenylefrinem stimulovanou vazbu [^{35}S]GTP γ S k fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (**Tab. 3 a Obr. 6**).

Tab. 3: Vliv depalmitoylace způsobené hydroxylaminem na množství navázaného [^{35}S]GTP γ S k fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	Kontrola [dpm]		Hydroxylamin [dpm]	
	- L-fenylefrin	+ L-fenylefrin	- L-fenylefrin	+ L-fenylefrin
$\alpha_{1b}\text{AR-}G_{11\alpha}$	60,2 \pm 5,3 (3,6 \pm 0,3 [%])	1660,8 \pm 140,7 (100,0 \pm 8,5 [%])	42,7 \pm 4,4 (2,6 \pm 0,3 [%])	697,0 \pm 14,0 (42,0 \pm 0,8 [%])

Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). V závorce je procentuální vyjádření čísla uvedeného nad závorkou. Hodnotu 100% jsme přiřadili nemodifikovanému hydroxylaminem neošetřenému fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ po stimulaci L-fenylefrinem.

Vliv hydroxylaminu na lokalizaci fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptoru- $G_{11\alpha}$ v buňce jsme opět určili podrobením jednotlivých frakcí, cytosolu a hrubých plazmatických membrán, elektroforéze a imunodetekci za použití CQ antiséra. Kontrolní či hydroxylaminem ošetřený buněčný lyzát jsme po oddělení jaderné frakce rozdělili vysokorychlostní centrifugací (90 000 x g, 30 min, 4°C) na rozpustnou a nerozpustnou část, tedy na cytosol a hrubé plazmatické membrány. Na gel jsme aplikovali stejné množství proteinů od každé frakce. Všechny fúzní protein zůstal v nerozpustné

membránové fázi nezávisle na tom, zda byly vzorky ošetřené hydroxylaminem či nikoliv (**Obr. 7A**). Endogenně exprimované proteiny $G_{11\alpha}$ i $G_{q\alpha}$ byly tímto sérem také detekovány. Malé množství těchto proteinů bylo přítomno ve frakci hydroxylaminem neošetřených hrubých plazmatických membrán. Pouze malá část G-proteinu byla detekována v cytosolární frakci, a to teprve až po aplikaci delší doby expozice solubilního vzorku na film. Tato nízká hladina $G_{11\alpha}$ proteinu v cytosolu byla zaznamenána pouze po působení hydroxylaminu (**Obr. 7B**). Fúzní protein migroval na elektroforéze jako dva rozdílné proužky s molekulovou vahou 105 a 120 kDa. Existence dvou různě velkých forem může být vysvětlena různou glykozyací tohoto proteinu.

Pro přímé stanovení relativního podílu thioacylace receptorů spřažených s G-proteiny a G-proteinů samých na informačním přenosu mezi těmito proteiny byl modifikován fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ za vytvoření forem, ve kterých buď α_{1b} -adrenoreceptor nebo $G_{11\alpha}$ nebo oba proteiny najednou byly rezistentní vůči thioacylaci (Stevens a kol., 2001; Novotny a kol., 2006). Pro přehled uvádím konstrukty použité v této části práce: α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$, Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$. Díky fúznímu spojení α_{1b} -adrenoreceptoru s $G_{11\alpha}$ proteinem byla opět zajištěna stechiometrie u všech mutací GPCR a G-proteinů v poměru 1:1. Saturacími pokusy s antagonistou α_1 -adrenergických receptorů [³H]prazosinem jsme určili K_d a B_{max} jednotlivých fúzních proteinů ve vzorcích hrubých plazmatických membrán (**Tab. 4**). Vazebná místa ve vzorcích hrubých plazmatických membrán s jednotlivými fúzními proteiny jsme satureovali [³H]prazosinem v rozpětí koncentrací od 0,02 do 4,5 nM. Fúzní proteiny obsahující nemodifikovaný α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ vázaly [³H]prazosin s velkou afinitou (K_d viz. **Tab. 4**). Fúzní proteiny, u kterých byla obě místa pro thioacylaci v α_{1b} -adrenoreceptoru, Cys³⁶⁵ a Cys³⁶⁷, změněna na alanin, nebo u kterých obě místa pro thioacylaci v $G_{11\alpha}$, Cys⁹ a Cys¹⁰, byla změněna na serin, nebo u kterých byly všechny čtyři změny přítomny, vázaly [³H]prazosin s podobně vysokou afinitou (K_d viz. **Tab. 4**). Schopnost L-fenylefrinu kompetovat s [³H]prazosinem o vazbu na receptor jsme určili v kompetičních vazebných studiích. Z tohoto typu experimentu jsme získali K_i , zdánlivou rovnovážnou disociační konstantu kompetitoru L-fenylefrinu (**Tab. 4**). Kompetitor jsme naředili na koncentraci v rozmezí 10^{-10} až 10^{-3} M. Koncentrace radioligandu [³H]prazosinu byla v případě kompetičního uspořádání pokusu 0,8 nM. Afinita agonisty α_1 -adrenergických receptorů L-fenylefrinu se v těchto vazebných studiích mezi jednotlivými čtyřmi výše

uvedenými mutanty také nelišila (**Tab. 4**). Mutace tedy nemají významný vliv na afinitu obou adrenergických ligandů. Jednotlivé fúzní proteiny byly do buněk vneseny s přibližně stejnou účinností, srovnatelné hodnoty B_{max} (**Tab. 4**). Maximální vazebná kapacita fúzních proteinů se v průměru nacházela v rozmezí 12,2 - 17,0 pmol/mg proteinu. Jak v saturačních tak kompetičních vazebných pokusech jsme používali 3 μ g hrubých plazmatických membrán v každém vzorku. Výsledky reprezentativních saturačních, resp. kompetičních vazebných studií s [3 H]prazosinem s příslušnými B_{max} a K_d , resp. K_i jsou zobrazeny na **Obr. 8**, resp. **9**.

Tab. 4: Vazebná afinita agonisty a antagonisty k fúzním proteinům obsahujícím α_{1b} -adrenoreceptor a $G_{11\alpha}$ a jejich maximální vazebná kapacita.

Konstrukt	K_d [3 H]prazosin [nM]	B_{max} [pmol/mg]	K_i L-fenylefrin [μ M]
α_{1b} AR- $G_{11\alpha}$	0,16 \pm 0,01	14,7 \pm 2,0	9,2 \pm 4,0
$C^{365,367}A\alpha_{1b}$ AR- $G_{11\alpha}$	0,13 \pm 0,01	12,2 \pm 0,7	7,1 \pm 4,4
α_{1b} AR- $C^{9,10}S$ $G_{11\alpha}$	0,14 \pm 0,02	15,0 \pm 2,7	9,2 \pm 3,6
$C^{365,367}A\alpha_{1b}$ AR- $C^{9,10}S$ $G_{11\alpha}$	0,15 \pm 0,02	17,0 \pm 1,9	10,3 \pm 5,0
α_{1b} AR- $I^{25}A, E^{26}A$ $G_{11\alpha}$	0,09 \pm 0,02	16,2 \pm 2,0	9,8 \pm 3,1
α_{1b} AR- $C^{9,10}S, I^{25}A, E^{26}A$ $G_{11\alpha}$	0,08 \pm 0,01	16,4 \pm 2,2	12,1 \pm 3,0

Uvedeny jsou průměry dat (\pm směrodatná odchylka průměru) získaných ze čtyř nezávislých pokusů s imunoprecipitáty hrubých plazmatických membrán obsahujících dané konstrukty.

Následující experiment nám pomohl určit nejvhodnější koncentraci agonisty α_1 -adrenergických receptorů L-fenylefrinu pro následující vazebné studie s [35 S]GTP γ S. Hlavním cílem však bylo zjistit vliv depalmitoylace $G_{11\alpha}$ a α_{1b} -adrenoreceptoru na afinitu [35 S]GTP γ S k jednotlivým mutantům a na funkční spřažení receptor - G-protein. Tyto informace jsme získali porovnáním účinnosti agonisty a hodnot maximální stimulace vazby [35 S]GTP γ S k jednotlivým fúzním proteinům získaných z tohoto pokusu. Následující fúzní proteiny adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, $Cys^{365}Ala, Cys^{367}Ala\alpha_{1b}$ -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, α_{1b} -adrenoreceptor- $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11\alpha}$, $Cys^{365}Ala, Cys^{367}Ala\alpha_{1b}$ -adrenoreceptor- $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11\alpha}$ jsme exprimovali v HEK-293 buňkách. Ze sklizených buněk jsme opět připravili frakce hrubých plazmatických membrán, ze kterých jsme za použití specifického CQ antiséra proti C-terminálnímu dekaeptidu proteinů $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ získali imunoprecipitát. Jednotlivé imunoprecipitáty se 100 fmoly příslušných konstruktů jsme použili ve vazebné studii s [35 S]GTP γ S při měnící se koncentraci L-fenylefrinu. Stimulace

vazby [³⁵S]GTPγS L-fenylefrinem k nemodifikovanému typu fúzního proteinu α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} byla koncentračně závislá (**Obr. 10**), hodnota EC₅₀ = 2 x 10⁻⁶ M. Účinnost L-fenylefrinu (EC₅₀) i hodnota maximální stimulace vazby [³⁵S]GTPγS byla u mutantu Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} shodná s α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} (**Obr. 10**). Naopak fúzní protein obsahující buď nemutovaný či mutovaný receptor Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor v kombinaci s Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} vázal v maximální stimulační koncentraci L-fenylefrinu pouze polovinu množství [³⁵S]GTPγS ve srovnání s předchozími dvěma konstrukty s nemodifikovaným G_{11α} (**Obr. 10**). Navzdory tomu se stanovené hodnoty EC₅₀ agonisty u posledních dvou jmenovaných konstruktů signifikantně nelišily od hodnot EC₅₀ agonisty v pokusech s konstrukty obsahujícími nemodifikovaný G-protein (**Obr. 10**). Maximální stimulační koncentrace L-fenylefrinu byla 100 μM. Bazální hodnotu vazby [³⁵S]GTPγS jsme měřili v absenci ligandu pro receptor.

Množství fúzních proteinů v hrubých plazmatických membránách použitých ve vazebných experimentech s [³⁵S]GTPγS popsaných v této části jsme určili metodou imunodetekce za pomoci antiséra CQ. Hrubé plazmatické membrány obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [³H]prazosin odpovídajících výše uvedeným konstruktům byly podrobeny metodě SDS-PAGE. V každém preparátu jsme zaznamenali obdobné množství konstruktů (**Obr. 11**). Fúzní protein migroval na elektroforéze jako dva rozdílné proužky s molekulovou váhou 105 a 120 kDa. Slepý vzorek pocházel z buněk HEK-293, které jsme transfekovali prázdným vektorem pcDNA3.

Stanovení relativního podílu thioacylace receptorů spřažených s G-proteiny a G-proteinů samých na funkční interakci mezi těmito proteiny jsme se pokusili určit pomocí následujícího pokusu s hydroxylaminem. Jak jsem se již zmínila výše, inkubace vzorků s neutrálním hydroxylaminem odstraňuje z proteinů thioesterově vázané mastné kyseliny. Pro tato pozorování jsme si opět zvolili metodu měření vazby [³⁵S]GTPγS k fúzním proteinům. Vzorky hrubých plazmatických membrán HEK-293 buněk exprimujících stejné množství vazebných míst pro [³H]prazosin (50 fmolů) odpovídajících proteinů α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α}, Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α}, α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} nebo Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} jsme inkubovali v přítomnosti či nepřítomnosti 0,5 M hydroxylaminu. Po promytí a následném stočení membrán (90 000 x g, 30 min, 4°C) jsme

preparáty imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a poté v nich změřili vazbu [³⁵S]GTPγS k jednotlivým konstruktům v přítomnosti či nepřítomnosti L-fenylefrinu v jeho maximálně efektivní koncentraci (100 μM). Jak již bylo řečeno výše (Tab. 3 a Obr. 6), imunoprecipitáty obsahující α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} vykazovaly vlivem L-fenylefrinu značné zvýšení vazby [³⁵S]GTPγS (Tab. 5 a Obr. 12). Expresse Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} proteinu vedla k obdobné stimulaci vazby [³⁵S]GTPγS ke konstruktu (Tab. 5 a Obr. 12). Naopak snížená schopnost L-fenylefrinu stimulovat vazbu [³⁵S]GTPγS byla pozorována v imunoprecipitátech obsahujících α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} nebo Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α}, a sice o více než 50% (Tab. 5 a Obr. 12). Hydroxylamin redukoval vliv L-fenylefrinu na nemodifikovaný fúzní protein opět o více než 50% (Tab. 5 a Obr. 12), obdobná data jsem uvedla již výše (Tab. 3 a Obr. 6). S hrubými plazmatickými membránami exprimujícími Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} jsme získali podobné výsledky (Tab. 5 a Obr. 12). Naopak u membrán obsahujících buď α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} nebo Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG_{11α} byla hydroxylaminová inkubace totálně bez efektu (Tab. 5 a Obr. 12).

Tab. 5: Vliv depalmitoylace způsobené hydroxylaminem či mutací příslušného proteinu na množství navázaného [³⁵S]GTPγS k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	Kontrola [dpm]		Hydroxylamin [dpm]	
	- L-fenylefrin	+ L-fenylefrin	- L-fenylefrin	+ L-fenylefrin
α _{1b} AR-G _{11α}	133,6 ± 3,6 (9,5 ± 0,3 [%])	1403,0 ± 166,2 (100,0 ± 11,8 [%])	79,3 ± 6,3 (5,7 ± 0,4 [%])	649,4 ± 74,1 (46,3 ± 5,3 [%])
Cys ^{365,367} Aα _{1b} AR-G _{11α}	85,5 ± 14,8 (6,1 ± 1,1 [%])	1643,0 ± 73,3 (117,1 ± 5,2 [%])	68,7 ± 1,1 (4,9 ± 0,1 [%])	704,4 ± 34,2 (50,2 ± 2,4 [%])
α _{1b} AR-C ^{9,10} SG _{11α}	75,7 ± 7,9 (5,4 ± 0,6 [%])	610,5 ± 29,4 (43,5 ± 2,1 [%])	50,8 ± 5,6 (3,6 ± 0,4 [%])	598,4 ± 32,4 (42,7 ± 2,3 [%])
C ^{365,367} Aα _{1b} AR-C ^{9,10} SG _{11α}	60,7 ± 18,6 (4,3 ± 1,3 [%])	662,1 ± 34,3 (47,2 ± 2,4 [%])	46,3 ± 5,1 (3,3 ± 0,4 [%])	732,3 ± 22,7 (52,2 ± 1,6 [%])

Uvedeny jsou průměry ze čtyř nezávislých pokusů (± směrodatná odchylka průměru). V závorce je procentuální vyjádření čísla uvedeného nad závorkou. Hodnotu 100% jsme přiřadili nemodifikovanému hydroxylaminem neošetřenému fúznímu proteinu α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} po stimulaci L-fenylefrinem.

Výše uvedené výsledky jsme rozšířili o studii zabývající se vlivem vzájemného vztahu mezi vazbou $\beta\gamma$ dimeru na $G_{11\alpha}$ podjednotku a palmitoylací $G\alpha$ na funkční interakce G-proteinu s receptorem. Již dříve byl v laboratoři G. Milligana vyroben mutant $G_{11\alpha}$ proteinu Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$. Změna aminokyselin Ile²⁵ a Glu²⁶ na alanin snižuje afinitu tohoto proteinu k $\beta\gamma$ komplexu (Liu a kol., 2002). Pro určení podílu vlivu thioacylace a $\beta\gamma$ interakcí na funkčním vztahu receptor - G-protein byl také již dříve připraven Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ mutant. V HEK-293 buňkách jsme koexprimovali α_{1b} -adrenoreceptor a vždy jednu z výše uvedených modifikovaných α podjednotek. V imunoprecipitátech hrubých plazmatických membrán obsahujících tyto konstrukty jsme zaznamenali v porovnání s koexpresí α_{1b} -adrenoreceptoru a nemodifikovaného $G_{11\alpha}$ proteinu sníženou schopnost L-fenylefrinu stimulovat vazbu [³⁵S]GTP γ S k modifikovaným proteinům o více než 80% (Tab. 6 a Obr. 13). Tento výsledek se shoduje s již výše uvedeným výsledkem získaným s Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ mutantem v jiném uspořádání pokusu (Tab. 2 a Obr. 4). V Tab. 6 a na Obr. 13 jsou pro přehlednost a snadnou porovnatelnost prezentována i data s nemodifikovaným $G_{11\alpha}$ proteinem a s Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$. Všechny vzorky hrubých plazmatických membrán s uvedenými konstrukty exprimovaly stejné množství vazebných míst pro [³H]prazosin.

Tab. 6: Vliv mutace vazebného místa pro $\beta\gamma$ podjednotku a pro thioacylaci na množství navázaného [³⁵S]GTP γ S k jednotlivým modifikovaným G-proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	- L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [%]
α_{1b} AR + $G_{11\alpha}$	81,3 ± 4,3	2174,5 ± 24,1	100,0 ± 1,1
α_{1b} AR + C ^{9,10} S $G_{11\alpha}$	79,5 ± 14,9	349,8 ± 14,0	16,1 ± 0,6
α_{1b} AR + I ²⁵ A,E ²⁶ A $G_{11\alpha}$	76,0 ± 15,3	418,4 ± 8,2	19,2 ± 0,4
α_{1b} AR + C ^{9,10} S,I ²⁵ A,E ²⁶ A $G_{11\alpha}$	99,4 ± 16,4	331,6 ± 9,6	15,2 ± 0,4

Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (± směrodatná odchylka průměru). Hodnotu 100% jsme přiřadili vzorku s kotransfekovaným α_{1b} -adrenoreceptorem a nemodifikovaným $G_{11\alpha}$ proteinem po stimulaci L-fenylefrinem.

Vzhledem k tomu, že $G_{11\alpha}$ byl při jednotlivých transfekcích exprimován v poněkud proměnlivém množství, byly za účelem zkoumání účinnosti jeho aktivace α_{1b} -adrenoreceptorem ještě připraveny fúzní konstrukty proteinů Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ a Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ s α_{1b} -adrenoreceptorem. Oba dva mutanti vážali

[³H]prazosin s vysokou afinitou (**Tab. 4**) a v kompetičních vazebných studiích s [³H]prazosinem vykazovali podobnou afinitu pro agonistu α_1 -adrenergických receptorů L-fenylefrin jako ostatní fúzní proteiny (**Tab. 4**). Stimulace vazby [³⁵S]GTP γ S L-fenylefrinem k fúznímu proteinu obsahujícímu modifikovaný typ G₁₁ α (α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁ α) byla znatelně nižší než k fúzním proteinům obsahujícím nemodifikovaný typ G₁₁ α nebo Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser G₁₁ α (**Tab. 7** a **Obr. 14**), a sice o více než 80% oproti kontrolnímu fúznímu proteinu (α_{1b} -adrenoreceptor-G₁₁ α). Nicméně mutace proteinu G₁₁ α zabraňujících thioacylaci a zároveň snižujících interakci s $\beta\gamma$ neovlivnily ještě více negativně L-fenylefrinem stimulovanou vazbu [³⁵S]GTP γ S k fúzním proteinům. Tedy vazba [³⁵S]GTP γ S k proteinu α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁ α nebyla nižší než k proteinu α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁ α (**Tab. 7** a **Obr. 14**).

Tab. 7: Vliv mutace vazebného místa pro $\beta\gamma$ podjednotku a pro thioacylaci na množství navázaného [³⁵S]GTP γ S k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	- L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [%]
α_{1b} AR-G ₁₁ α	82,5 ± 23,4	1716,9 ± 219,2	100,0 ± 12,8
α_{1b} AR-C ^{9,10} SG ₁₁ α	76,6 ± 17,2	759,2 ± 141,5	44,2 ± 8,2
α_{1b} AR-I ²⁵ A,E ²⁶ AG ₁₁ α	72,0 ± 17,0	334,6 ± 53,5	19,5 ± 3,1
α_{1b} AR-C ^{9,10} S,I ²⁵ A,E ²⁶ AG ₁₁ α	75,8 ± 22,4	294,3 ± 23,5	17,1 ± 1,4

Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Hodnotu 100% jsme přiřadili nemodifikovanému fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor-G₁₁ α po stimulaci L-fenylefrinem.

Abychom zjistili, zda bylo v hrubých plazmatických membránách stejné množství fúzních proteinů, nanесли jsme na gel vždy takové množství vzorku membrán, které odpovídalo 100 fmolům vazebných míst pro [³H]prazosin příslušných konstruktů (α_{1b} -adrenoreceptor-G₁₁ α , α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG₁₁ α , α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁ α a α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁ α). Provedli jsme elektroforézu a za pomoci CQ antiséra proti G_q α /G₁₁ α detekovali mutanty metodou Western blot. Zaznamenali jsme podobnou úroveň exprese konstruktů v každém preparátu (**Obr. 15**). Fúzní protein migroval na elektroforéze jako dva rozdílné proužky s molekulovou váhou 105 a 120 kDa. Slepý vzorek pocházel z buněk HEK-293, které jsme

transfekovali prázdným vektorem pcDNA3.

V následujícím pokusu jsme se zaměřili na zkoumání vlivu hydroxylaminu na přenos informace mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem v souvislosti s vazebným místem $G\alpha$ podjednotky pro $\beta\gamma$ komplex. Inkubovali jsme tedy v přítomnosti či nepřítomnosti 0,5 M hydroxylaminu hrubé plazmatické membrány obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [3 H]prazosin odpovídajících následujícím fúzním proteinům: α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$, α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ a α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$. Tyto preparáty jsme promyli a stočili na ultracentrifuze (90 000 x g, 30 min, 4°C), načež následovala imunoprecipitace pomocí CQ antiséra. Jednotlivé imunoprecipitáty s příslušnými konstrukty jsme podrobili vazebné studii s [35 S]GTP γ S v přítomnosti či nepřítomnosti L-fenylefrinu v jeho maximálně efektivní koncentraci (100 μ M). Jak již bylo řečeno výše (**Tab. 3 a Obr. 6, Tab. 5 a Obr. 12**), u imunoprecipitátů obsahujících α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ došlo vlivem inkubace s hydroxylaminem ke snížení schopnosti L-fenylefrinu stimulovat vazbu [35 S]GTP γ S o více než 50% (**Tab. 8 a Obr. 16**). Naopak působení hydroxylaminu na vzorek hrubých plazmatických membrán odvozených z buněk exprimujících α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ konstrukt nemělo žádný velký vliv (**Tab. 5 a Obr. 12, Tab. 8 a Obr. 16**). Nebylo překvapivé, že inkubace s hydroxylaminem způsobila pokles vazby [35 S]GTP γ S k fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$, a sice o 42%. G-protein v něm obsažený nemá mutaci v palmitoylačním místě a tudíž byl depalmitoylován působením hydroxylaminu. Přídavný efekt vykazoval hydroxylamin také u vzorku exprimujícího α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ protein a tedy jsme zaznamenali ještě další signifikantní pokles vazby [35 S]GTP γ S k tomuto konstrukt, téměř o 50% (**Tab. 8 a Obr. 16**).

Tab. 8: Vliv hydroxylaminu na množství navázaného [³⁵S]GTPγS k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	Kontrola [dpm]		Hydroxylamin [dpm]	
	- L-fenylefrin	+ L-fenylefrin	- L-fenylefrin	+ L-fenylefrin
α _{1b} AR-G _{11α}	60,2 ± 5,3 (3,6 ± 0,3 [%])	1660,8 ± 140,7 (100,0 ± 8,5 [%])	42,7 ± 4,4 (2,6 ± 0,3 [%])	697,0 ± 14,0 (42,0 ± 0,8 [%])
α _{1b} AR-C ^{9,10} SG _{11α}	64,6 ± 14,7 (3,9 ± 0,9 [%])	581,7 ± 3,9 (35,0 ± 0,2 [%])	32,5 ± 4,2 (2,0 ± 0,3 [%])	643,6 ± 57,6 (38,8 ± 3,5 [%])
α _{1b} AR- I ²⁵ A ₃ E ²⁶ AG _{11α}	54,2 ± 2,3 (3,3 ± 0,1 [%])	313,4 ± 9,6 (18,9 ± 0,6 [%])	44,3 ± 3,6 (2,7 ± 0,2 [%])	181,1 ± 17,9 (10,9 ± 1,1 [%])
α _{1b} AR-C ^{9,10} S, I ²⁵ A ₃ E ²⁶ AG _{11α}	61,9 ± 4,9 (3,7 ± 0,3 [%])	268,3 ± 4,9 (16,2 ± 0,3 [%])	42,8 ± 4,0 (2,6 ± 0,2 [%])	139,4 ± 5,9 (8,4 ± 0,4 [%])

Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (± směrodatná odchylka průměru). V závorce je procentuální vyjádření čísla uvedeného nad závorkou. Hodnotu 100% jsme přiřadili nemodifikovanému hydroxylaminem neošetřenému fúznímu proteinu α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} po stimulaci L-fenylefrinem.

Vliv nadbytku podjednotek βγ na funkční aktivitu fúzních proteinů jsme stanovili měřením specifické vazby [³⁵S]GTPγS k příslušnému G-proteinu. V tomto pokusu jsme použili fúzní protein α_{1b}-adrenoreceptoru s nemodifikovaným G_{11α}, s Ile²⁵Ala, Glu²⁶AlaG_{11α} a s Cys⁹Ser, Cys¹⁰Ser, Ile²⁵Ala, Glu²⁶AlaG_{11α}. V HEK-293 buňkách jsme exprimovali jak samotný fúzní protein α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} (ať už nemodifikovaný nebo s příslušnou změnou), tak současně s podjednotkami β₁ a γ₂. Ze vzorků membrán obsahujících stejné množství vazebných míst pro [³H]prazosin odpovídajících proteinů jsme připravili imunoprecipitát za použití CQ antiséra proti C-terminálnímu dekapeptidu proteinů G_{qα}/G_{11α}. V těchto imunoprecipitátech jsme zaznamenali vlivem α₁-adrenergního agonisty L-fenylefrinu výrazné zvýšení vazby [³⁵S]GTPγS u všech konstruktů koexprimovaných s βγ podjednotkami. Vazba [³⁵S]GTPγS k fúznímu proteinu α_{1b}-adrenoreceptor-G_{11α} se v přítomnosti β₁γ₂ zvýšila 3,6x oproti kontrole (stejný fúzní protein za nepřítomnosti β₁γ₂) (Tab. 9 a Obr. 17). Více než čtyřnásobně zvýšenou stimulaci vazby [³⁵S]GTPγS za současné exprimace β₁γ₂ podjednotek jsme naměřili v imunoprecipitátu s α_{1b}-adrenoreceptor-Ile²⁵Ala, Glu²⁶AlaG_{11α}. Podobný výsledek jsme zaznamenali u α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser, Cys¹⁰Ser, Ile²⁵Ala, Glu²⁶AlaG_{11α}, kde došlo k 2,5 násobnému nárůstu v přítomnosti β₁γ₂ oproti kontrole. Je zajímavé, že vazba [³⁵S]GTPγS v imunoprecipitátech

obsahujících fúzní protein s mutací ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer se svojí velikostí v přítomnosti $\beta_{1\gamma_2}$ dimeru vyrovnala vazbě $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúznímu proteinu s nemodifikovaným G-proteinem za nepřítomnosti $\beta_{1\gamma_2}$ dimeru. Zároveň vazba $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v imunoprecipitátech obsahujících fúzní protein s oběma typy mutace svojí velikostí v přítomnosti $\beta_{1\gamma_2}$ dimeru dosáhla 50% vazby $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúznímu proteinu s nemodifikovaným G-proteinem za nepřítomnosti $\beta_{1\gamma_2}$ dimeru.

Tab. 9: Vliv nadbytku podjednotek $\beta_{1\gamma_2}$ na vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúzním proteinům s mutací ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ podjednotku a pro thioacylaci v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem.

Konstrukt	- L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [dpm]	+ L-fenylefrin [%]
$\alpha_{1b}\text{AR-G}_{11\alpha}$	68,3 ± 1,1	1240,1 ± 39,7	27,8 ± 0,9
$\alpha_{1b}\text{AR-G}_{11\alpha} + \beta_1 + \gamma_2$	113,4 ± 24	4461,1 ± 100,8	100,0 ± 2,3
$\alpha_{1b}\text{AR-I}^{25}\text{A,E}^{26}\text{AG}_{11\alpha}$	56,6 ± 8,9	297,4 ± 6,7	6,7 ± 0,1
$\alpha_{1b}\text{AR-I}^{25}\text{A,E}^{26}\text{AG}_{11\alpha} + \beta_1 + \gamma_2$	105,1 ± 7,5	1229,7 ± 41,1	27,6 ± 0,9
$\alpha_{1b}\text{AR-C}^{9,10}\text{S,I}^{25}\text{A,E}^{26}\text{AG}_{11\alpha}$	56,2 ± 3,7	234,7 ± 16,4	5,3 ± 0,4
$\alpha_{1b}\text{AR-C}^{9,10}\text{S,I}^{25}\text{A,E}^{26}\text{AG}_{11\alpha} + \beta_1 + \gamma_2$	109,4 ± 29,9	581,2 ± 8,2	13,0 ± 0,2

Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (± směrodatná odchylka průměru). Hodnotu 100% jsme přiřadili nemodifikovanému fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ současně exprimovanému s $\beta_{1\gamma_2}$ podjednotkami po stimulaci L-fenylefrinem.

Dále nás zajímal význam palmitoylací $G_{11\alpha}$ a interakcí $\beta\gamma$ dimeru s $G_{11\alpha}$ podjednotkou v souvislosti s lokalizací této podjednotky v membráně. Abychom na imunoblotu odlišili overexprimovaný $G_{11\alpha}$ protein od endogenního $G_{11\alpha}$ či $G_q\alpha$, byl do konstruktů $G_{11\alpha}$, Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$, Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ a Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ zainkorporován modifikovaný HA epitop (Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) na pozici mezi aminokyselinami 125 až 130. Uvedené konstrukty jsme exprimovali v HEK-293 buňkách., které jsme následně sklídili a zhomogenizovali. Jader zbavený homogenát jsme označili jako buněčný lyzát, který jsme nadále stočili v ultracentrifuze (90 000 x g, 30 min, 4°C) za účelem přípravy membránové a cytosolární frakce. Stejně množství proteinů od každé ze tří frakcí jsme poté aplikovali na gel a provedli elektroforézu. Na imunoblotu jsme detekovali $G_{11\alpha}$ pomocí anti-HA protilátek. Každá forma $G_{11\alpha}$ proteinu s HA epitopem se v podstatném množství vyskytovala ve frakci hrubých plazmatických membrán stejně tak jako v buněčném lyzátu

a cytosolu (**Obr. 18**). Jako kontrolu jsme použili slepý vzorek, který pocházel z buněk HEK-293 transfekovaných prázdným vektorem pcDNA3.

5.2. Vliv extrakce cholesterolu na buněčnou lokalizaci $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2

Ve frakcích získaných z flotačního sacharózového detergentového gradientu (24 hod při 200 000 x g a 4°C), na který jsme nanášeli detergentový extrakt (1% Triton X-100) kontrolních a β -cyklodextrinem ovlivněných (10 mM, 40 min) hrubých plazmatických membrán odvozených od E2M11 buněk, jsme detekovali $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ a caveolin-2. Dvanáct frakcí flotačního sacharózového detergentového gradientu jsme nanášeli na 10% gel standardní elektroforézy. Pro detekci elektroforeticky rozdělených proteinů jsme používali metodu chemiluminiscence indukované křenovou peroxidázou.

Distribuce G-proteinů $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2 je na základě jejich chování při flotaci v hustotním sacharózovém gradientu odlišná. Velká část $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ proteinů za kontrolních podmínek flotuje do vysokodenzních oblastí gradientu. Poměr množství těchto G-proteinů ve frakcích s nízkou a vysokou hustotou sacharózy je 1:5,3. U caveolinu-2 je poměr obrácený, 3,5:1.

Účinek β -cyklodextrinu na distribuci $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2 podél sacharózového gradientu lze souhrnně popsat tak, že β -cyklodextrin snižuje obsah těchto signálních molekul v detergent-rezistentních membránových doménách (**Obr. 19 a 20**). Tento výsledek lze dokumentovat jako snížení hladin těchto bílkovin ve flotujících frakcích 4 - 7, které detergent-rezistentní domény obsahují.

Degradace detergent-rezistentních membránových domén vlivem β -cyklodextrinu a z ní vyplývající snížení v obsahu signálních molekul ve flotujících frakcích s nízkou hustotou (frakce č. 4 - 7) by se teoreticky měla projevit jako zvýšení obsahu těchto bílkovin v neflotující části gradientu (frakce č. 8 - 12). Tato část gradientu obsahuje solubilní bílkoviny, které neflotují do horních částí gradientu jako DRMs. V našem případě by se jednalo o β -cyklodextrinem solubilizované $G\alpha$ podjednotky a caveolin-2. V této souvislosti je však třeba říci, že solubilní, vysokodenzní frakce (č. 8 - 12) obsahují vysoký signál příslušných G-proteinů již za kontrolních podmínek. Relativně malou změnu (zvýšení), která je navozena podáním β -cyklodextrinu, je proto velmi obtížné detekovat.

Výše uvedené poznámky vysvětlují naše pozorování, resp. výsledky znázorněné v **Tab. 10** a na **Obr. 19**.

Vlivem inkubace s β -cyklodextrinem došlo ke snížení v obsahu proteinů $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ ve všech frakcích sacharózového gradientu s nízkou hustotou z 15,8% na 2,9% (součet frakcí 4 - 7). Naopak v neflotující části gradientu jsme po inkubaci s β -cyklodextrinem zaznamenali nárůst v obsahu tohoto G-proteinu, a sice z 84,2% na 107,0% (součet frakcí 8 - 12) (**Tab. 10** a **Obr. 19**).

Tab. 10: Změny v obsahu $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ (%) v jednotlivých frakcích flotačního sacharózového detergentového gradientu.

frakce	1	2	3	4	5	6	
kontrola [%]	0,0	0,0	0,0	2,0 ± 1,4	5,8 ± 1,6	6,4 ± 1,3	
β-CD [%]	0,0	0,0	0,0	0,1 ± 0,1	2,8 ± 1,0	0,0	
frakce	7	8	9	10	11	12	součet frakcí 1 - 12 [%]
kontrola [%]	1,6 ± 0,4	17,0 ± 1,4	21,5 ± 2,9	17,1 ± 1,5	15,1 ± 0,6	13,5 ± 2,2	100,0
β-CD [%]	0,0	20,4 ± 3,6	27,1 ± 2,8	26,3 ± 2,5	18,6 ± 1,4	14,7 ± 2,9	110,0

Obsah $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinu v jednotlivých frakcích sacharózového gradientu je vyjádřen jako % z celkového signálu detekovaného ve všech frakcích dohromady. Hodnotu 100% jsme přiřadili celkovému signálu ve všech frakcích hustotního gradientu v kontrolním vzorku. Celkové množství bílkovin aplikovaných na gradient bylo 14,5 mg/ml (15 x 80 cm² kultivačních lahví). Do jedné jamky u elektroforézy jsme aplikovali 20 μ l sacharózové frakce. Uvedeny jsou průměry dat získaných ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru).

Zvýšení v obsahu caveolinu-2 ve vysokohustotních frakcích v β -cyklodextrinem ošetřených vzorcích bylo zcela jednoznačné. Tento výsledek je logickým důsledkem zjištění, že DRMs obsahují za kontrolních podmínek vysoký obsah této markerové bílkoviny. Jednalo se o 77,6% (součet frakcí 4 - 7) (**Tab. 11** a **Obr. 20**). Obsah caveolinu-2 v DRMs klesnul po podání β -cyklodextrinu na 38,1%. Není proto překvapením, že vzestup β -cyklodextrinem solubilizované formy této bílkoviny, která byla detekována ve vysokodenzních frakcích, se podařilo celkem přesvědčivě prokázat. Konkrétně jsme zaznamenali nárůst z 22,4% na 36,4% (součet frakcí 8 - 12).

Tab. 11: Změny v obsahu caveolinu-2 (%) v jednotlivých frakcích flotačního sacharóзовého detergentového gradientu.

frakce	1	2	3	4	5	6	
kontrola [%]	0,0	0,0	0,0	23 ± 1,7	40,5 ± 6,5	13,1 ± 0,8	
β-CD [%]	0,0	0,0	0,0	1,8 ± 1,8	31,7 ± 3,6	3,8 ± 2,5	
frakce	7	8	9	10	11	12	součet frakcí 1 - 12 [%]
kontrola [%]	1,1 ± 1,1	8,1 ± 1,0	7,4 ± 0,6	5,7 ± 1,1	1,2 ± 0,3	0,0	100,0
β-CD [%]	0,7 ± 0,7	8,5 ± 2,7	12,2 ± 0,7	10,3 ± 1,1	3,8 ± 2,3	1,6 ± 1,6	74,4

Obsah caveolinu-2 v jednotlivých frakcích sacharóзовého gradientu je vyjádřen jako % z celkového signálu detekovaného ve všech frakcích dohromady. Hodnotu 100% jsme přiřadili celkovému signálu ve všech frakcích hustotního gradientu v kontrolním vzorku. Celkové množství bílkovin aplikovaných na gradient bylo 14,5 mg/ml (15 x 80 cm² kultivačních lahví). Do jedné jamky u elektroforézy jsme aplikovali 20 μl sacharóзовé frakce. Uvedeny jsou průměry dat získaných ze tří nezávislých pokusů (± směrodatná odchylka průměru).

Výsledky této části mé experimentální práce je možné jednoznačně uzavřít tak, že β-cyklohextrin ničí strukturu membránových domén. Tyto struktury pak nejsou schopny flotovat na sacharóзовém gradientu do oblastí s nízkou hustotou. Následně dochází v této oblasti hustotního gradientu i k poklesu v obsahu signálních molekul (G_qα/G₁₁α, caveolin-2), které jsou zde za normálních okolností, tedy za nepřítomnosti β-cyklohextrinu, lokalizovány.

5.3. Časový průběh solubilizace G-proteinů třídy G_qα/G₁₁α

HEK-293 buňky exogenně exprimující ve vysokém množství TRH receptor a myší G₁₁α (klon E2M11) jsme inkubovali s 10 μM TRH po různě dlouhou dobu, a sice 0 min, 10 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 4 hod a 16 hod. Kontrolní a ovlivněné buňky E2M11 jsme sklídili postupem uvedeným v části Materiál a metody. Buněčný pelet jsme důkladně zhomogenizovali a po jeho lehkém stočení jsem výsledný postnukleární supernatant podrobili vysokorychlostní ultracentrifugaci (250 000 x g, 2 h, 4°C). Získaný supernatant odpovídal cytosolární (rozpustné) buněčné fázi. Proteiny v něm obsažené byly vysráženy

a zakoncetrovány pomocí TCA kyseliny a následně rozděleny podle svého izoelektrického bodu (1. dimenze) a relativní molekulové váhy (2. dimenze 2D elektroforézy). Pro detekci elektroforeticky rozdělených proteinů $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ jsme použili metody western blot a chemiluminiscence indukované křenovou peroxidázou se specifickou anti- $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ protilátkou orientovanou proti C-terminálnímu dekaeptidu proteinů $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$. Signál proteinů na imunoblotech jednotlivých gelů (intenzita zčernání) jsme denzitometricky nasníмали a následně analyzovali a kvantifikovali softwarem PDQuest. Program PDQuest určil hodnoty intenzit jednotlivých skvrn analýzou všech blotů ze čtyř nezávislých pokusů. Nejdříve byly na blotu rozlišeny jednotlivé skvrny. Ty byly následně porovnány mezi pokusy a v rámci jednoho časového intervalu hormonální inkubace k sobě navzájem přiřazeny. Nakonec byly stanoveny konkrétní hodnoty intenzit signálu každé jednotlivé skvrny. Software hodnotí dané bloty podle jednoho námi zvoleného parametru, takže je zaručena porovnatelnost vzorků jak v rámci jednoho pokusu tak mezi jednotlivými pokusy.

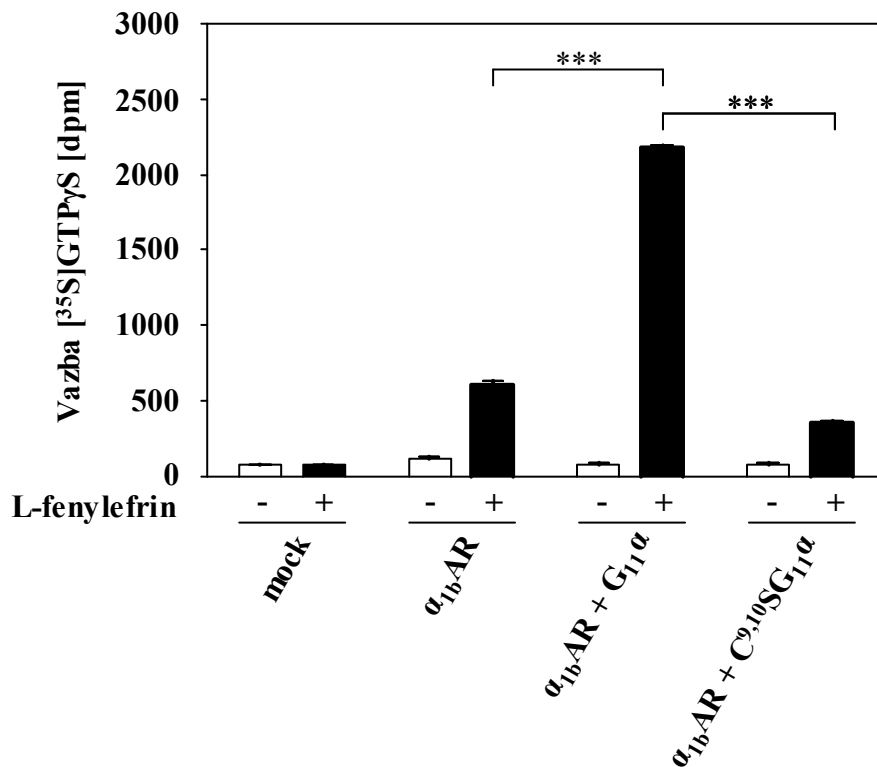
Malý signál dvou solubilních $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů jsme pozorovali již v kontrolních, hormonem neovlivněných buňkách (skvrny 7 a 8) (**Obr. 21A**). S postupně se prodlužující dobou hormonální inkubace jsme v rozpustné (cytosolární) frakci získané z E2M11 buněk byli schopni zaznamenat zvyšující se intenzitu jednotlivých imunoreaktivních skvrn spolu se zvyšujícím se počtem detekovaných proteinů (**Obr. 21**). Hormonální stimulace po dobu 10 a 30 min vedla ke zvýšení intenzit skvrn 7 a 8 a zároveň k výskytu nové, třetí skvrny (skvrna 3) (**Obr. 21B a 21C**). Po 2 hod jsme na imunoblotu identifikovali dvě velké (skvrny 7 a 8) a tři menší proteiny $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ (skvrny 3, 5 a 6) (**Obr. 21E**). Při delších časových intervalech s TRH (více než 2 hod) jsme zaznamenali výrazný nárůst imunoreaktivního signálu odpovídajícímu proteinům $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ (**Obr. 21E, 21F a 21G**). Porovnáním dat získaných z pokusů s různou délkou inkubace s TRH jsme zjistili, že k maximálnímu nárůstu množství $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ v solubilní frakci došlo po 16 hod hormonální stimulace (**Obr. 21G**). V tomto časovém bodě jsme mohli rozlišit osm zřetelných imunoreaktivních proteinů, 2 velké (skvrny 7 a 8) a 6 menších (skvrny 1 - 6), které odpovídaly exogenně i endogenně exprimovanému myšimu proteinu $G_{11\alpha}$ a endogennímu lidskému $G_{11\alpha}$ a $G_{q\alpha}$. Celková intenzita těchto skvrn byla 15x vyšší než intenzita celkového imunoreaktivního signálu u kontrolních buněk (**Tab. 12 a Obr. 22**).

Tab. 12: Kvantitativní analýza solubilizace proteinů $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ v závislosti na délce hormonální inkubace.

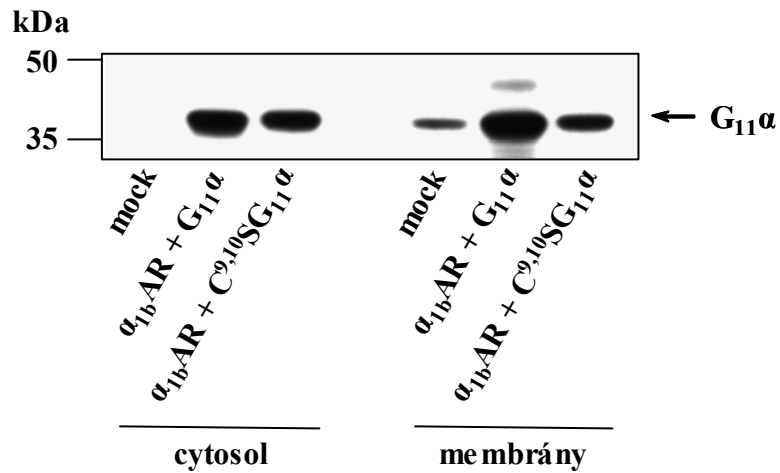
Čas [hod]	0	0,12	0,5	1	2	4	16
Skvrna 1 [a.u.]	ND	ND	ND	ND	ND	43349	25902
Skvrna 2 [a.u.]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10009
Skvrna 3 [a.u.]	ND	ND	8004	1284	4693	30034	37508
Skvrna 4 [a.u.]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35439
Skvrna 5 [a.u.]	ND	ND	ND	813	4920	40712	57748
Skvrna 6 [a.u.]	ND	ND	ND	ND	1797	951	51661
Skvrna 7 [a.u.]	1096	6489	76636	50915	64409	136745	215707
Skvrna 8 [a.u.]	2368	9884	27987	17678	28849	29987	79901
Suma [a.u.]	3463	16373	112626	70689	104668	281778	513876
Suma [%]	100	473	3252	2041	3022	8136	14837

Data ukazují průměrné hodnoty imunoreaktivních signálů až osmi detekovaných skvrn ze čtyř nezávislých pokusů v každém časovém bodě hormonální stimulace. Celkový signál v kontrolních, hormonem neovlivněných buňkách (100%) je srovnán s celkovým signálem všech skvrn detekovaných po 0,12 hod, 0,5 hod, 1 hod, 2 hod, 4 hod a 16 hod TRH. Intenzity skvrn 1 - 8 v **Tab. 12** odpovídají intenzitám skvrn 1 - 8 na **Obr. 22**. ND, nedetekovatelný, a.u., arbitrární jednotky.

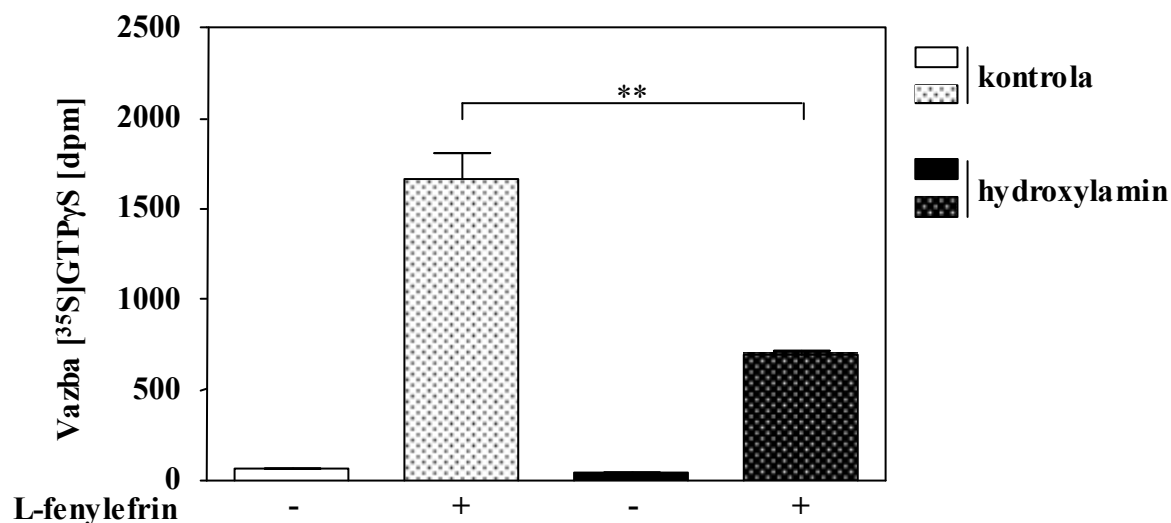
Naše dřívější studie naznačily, že přítomnost lidského $G_{11\alpha}$ v klonu E2M11 je velmi nízká (Kim a kol., 1994; Matousek a kol., 2004, 2005). Skvrny s nejsilnějším signálem (7 a 8) tedy s největší pravděpodobností odpovídají exogenně overexprimovanému myším $G_{11\alpha}$, případně lidskému endogennímu $G_{11\alpha}$ či $G_{q\alpha}$. Relativní molekulová váha všech námi detekovaných proteinů je stejná a pohybuje se okolo 40 kDa. Naopak jejich hodnota pI, kterou jsme určili z elektroforesních dat, se liší. pI dvou hlavních skvrn 7 a 8 se nachází v rozmezí 5,7 až 5,9. pI ostatních skvrn se přibližuje hodnotám 5,6 až 5,8. Proteiny tak vytvářejí na 2D gelu charakteristický vzorec řetězce (tzv. train pattern), kde jsou skvrny na gelu uspořádány v jedné vodorovné linii a tudíž mají shodnou relativní molekulovou váhu ale rozdílné pI. Tyto skvrny pak představují takové bílkoviny, u kterých je jejich primární struktura posttranslačně kovalentně modifikovaná různými funkčními skupinami. Můžeme tedy předpokládat, že skvrny na imunoblotu představují proteiny $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ a jejich izofomy, které jsou různým stupněm nebo na různých místech glykozylované, fosforylované a/nebo vybaveny mastnými kyselinami jako je např. kyselina palmitová.



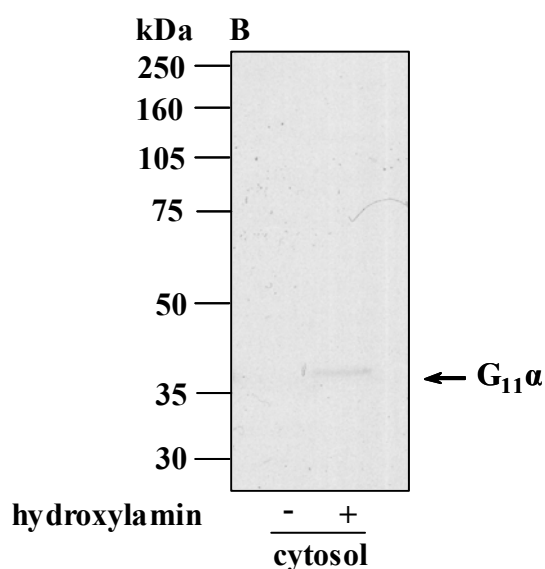
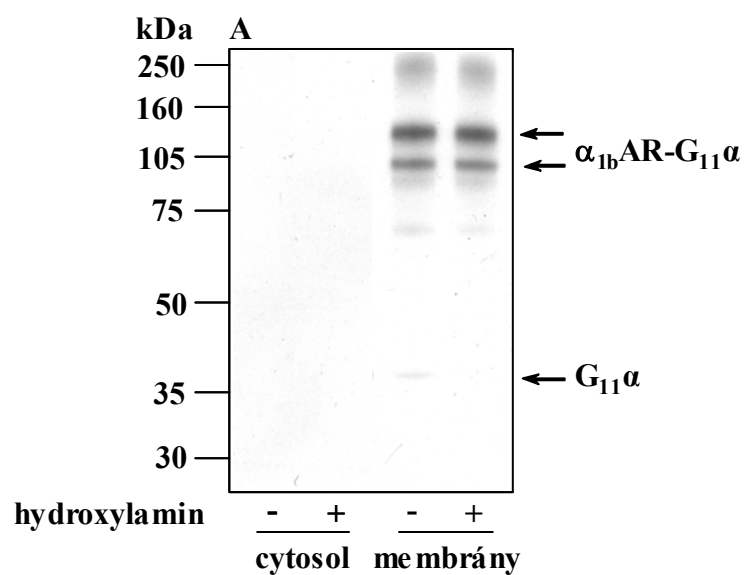
Obr. 4. Vliv mutace vazebného místa pro thioacylaci na množství $[^{35}S]GTP\gamma S$ navázaného k proteinu $Cys^9Ser,Cys^{10}SerG_{11\alpha}$ v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem. Buňky HEK-293 jsme transfekovali buď prázdným vektorem pcDNA3 (slepý vzorek neboli mock) nebo vektorem pcDNA3 kódujícím samotný α_{1b} -adrenoreceptor ($\alpha_{1b}AR$) nebo je kotransfekovali vektory pcDNA3 kódujícími α_{1b} -adrenoreceptor a $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR + G_{11\alpha}$) nebo $Cys^9Ser,Cys^{10}SerG_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR + C^{9,10}SG_{11\alpha}$). Membrány z těchto buněk jsme podrobili vazebnému pokusu s $[^{35}S]GTP\gamma S$ v absenci (bílý) či přítomnosti (černý sloupec) 100 μM L-fenylefrinu. Vzorky jsme poté imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu $[^{35}S]GTP\gamma S$ jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***.



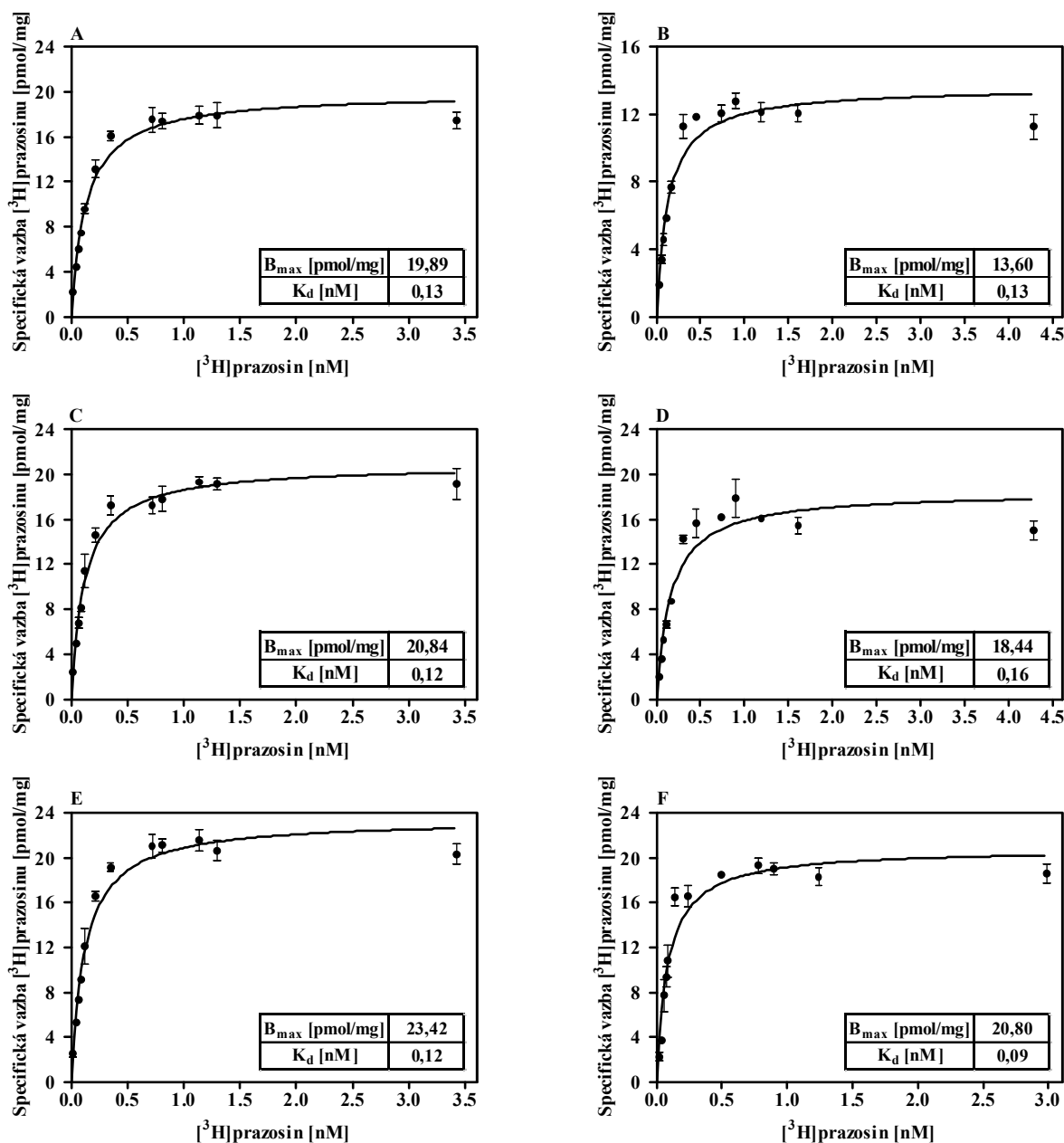
Obr. 5: Detekce Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG₁₁α proteinu na imunoblotu. Jader zbavený buněčný lyzát odpovídající vzorkům z **Obr. 4** [konkrétně mock, α_{1b}-adrenoreceptor + G₁₁α (α_{1b}AR + G₁₁α) a Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG₁₁α (α_{1b}AR + C^{9,10}SG₁₁α)] jsme rozdělili na cytosolární a membránovou frakci vysokorychlostní centrifugací. Stejné množství proteinů od každé frakce jsme podrobili elektroforéze a imunodetekci za použití antiséra CQ. Endogenně exprimované proteiny G₁₁α i G_qα byly tímto sérem také detekovány.



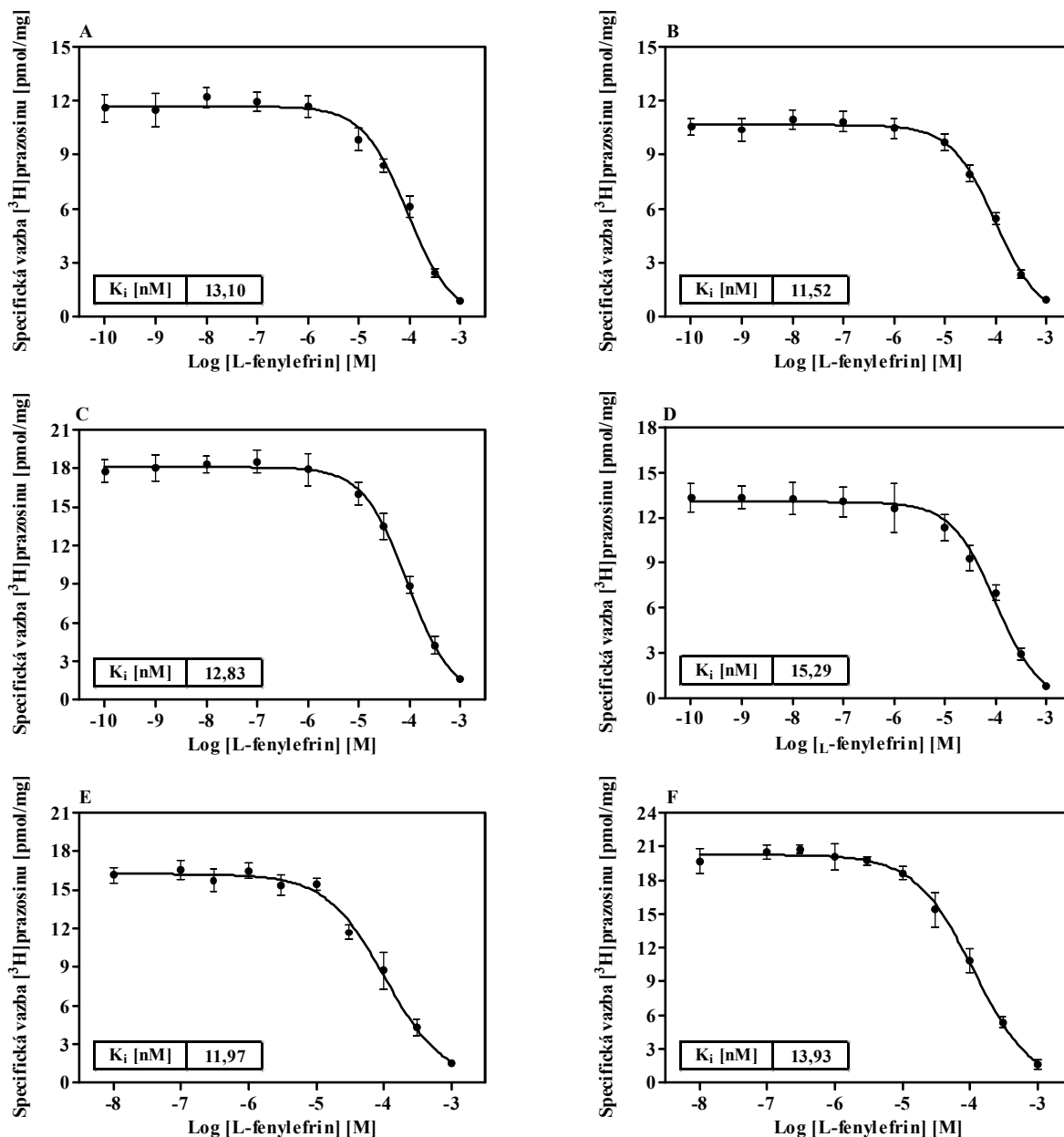
Obr. 6: Vliv depalmitoylace způsobené hydroxylaminem na množství navázaného $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $\text{G}_{11\alpha}$ v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem. Buňky HEK-293 byly transfekovány fúzním proteinem α_{1b} adrenoreceptor- $\text{G}_{11\alpha}$. Membrány z těchto buněk inkubované s hydroxylaminem (tmavé) a membrány kontrolní (světlé sloupce) jsme podrobili vazebnému pokusu s $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v absenci (hladké) či přítomnosti (tečkované sloupce) $100\ \mu\text{M}$ L-fenylefrinu. Vzorky membrán obsahovaly $100\ \text{fmolů}$ vazebných míst pro $[^3\text{H}]\text{prazosin}$ odpovídajícího proteinu. Preparáty jsme imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***.



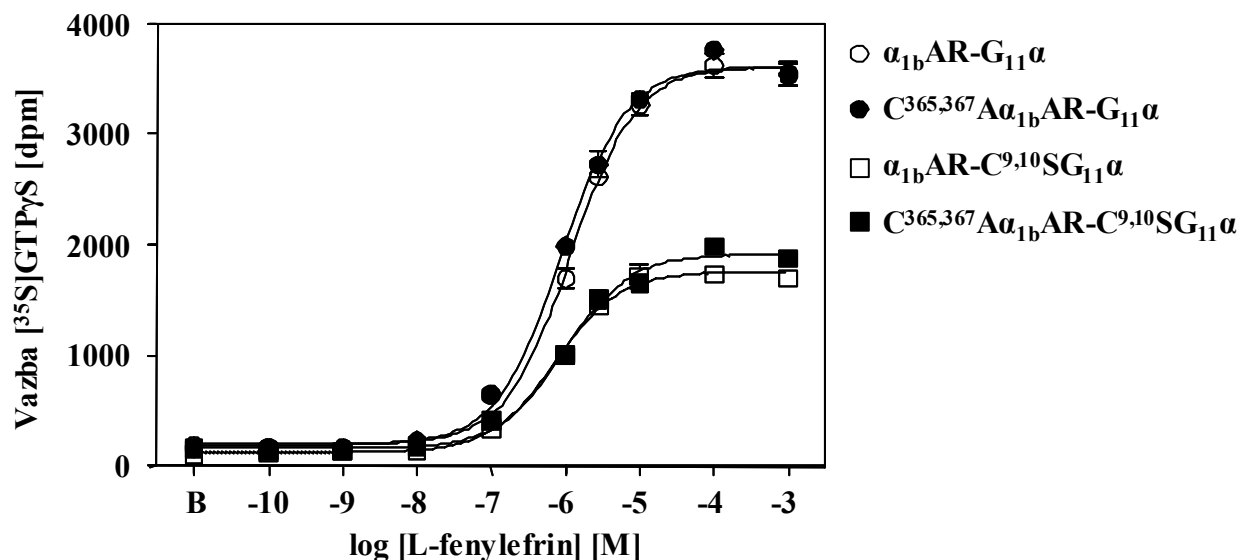
Obr. 7: Vliv inkubace s hydroxylaminem na lokalizaci fúzního proteinu α_{1b} adrenoreceptor- $G_{11}\alpha$ ($\alpha_{1b}AR-G_{11}\alpha$) v buňce. Jader zbavený buněčný lyzát odpovídající vzorku z **Obr. 6** jsme rozdělili na cytosolární a membránovou frakci vysokorychlostní centrifugací. Stejně množství proteinů od každé frakce jsem podrobili elektroforéze a imunodetekci za použití antiséra CQ. Endogenně exprimované proteiny $G_{11}\alpha$ i $G_q\alpha$ byly tímto sérem také detekovány. **(B)** Aplikace delší doby expozice solubilního vzorku na film.



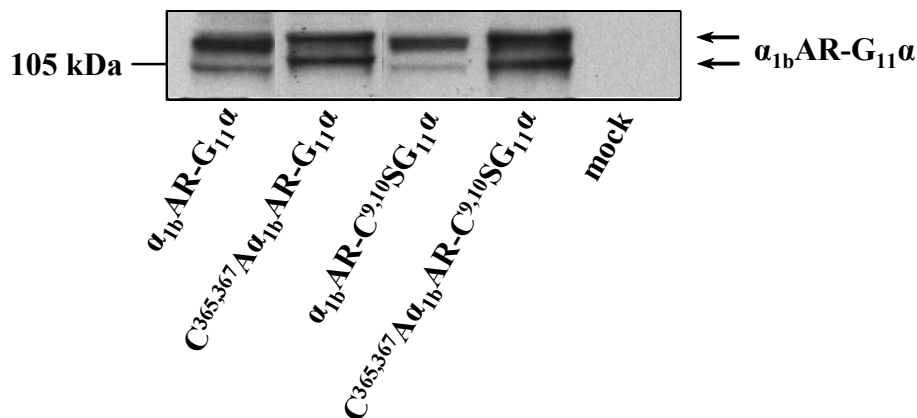
Obr. 8: Afinita antagonistů α_1 -adrenergických receptorů $[^3\text{H}]$ prazosinu k α_{1b} -adrenergickému receptoru v saturačních vazebných studiích. HEK-293 buňky jsme transfekovali za účelem exprese fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (A), $\text{Cys}^{365}\text{Ala}, \text{Cys}^{367}\text{Ala}$ α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (B), α_{1b} -adrenoreceptor- $\text{Cys}^9\text{Ser}, \text{Cys}^{10}\text{Ser}$ $G_{11\alpha}$ (C), $\text{Cys}^{365}\text{Ala}, \text{Cys}^{367}\text{Ala}$ α_{1b} -adrenoreceptor- $\text{Cys}^9\text{Ser}, \text{Cys}^{10}\text{Ser}$ $G_{11\alpha}$ (D), α_{1b} -adrenoreceptor- $\text{Ile}^{25}\text{Ala}, \text{Glu}^{26}\text{Ala}$ $G_{11\alpha}$ (E) nebo α_{1b} -adrenoreceptor- $\text{Cys}^9\text{Ser}, \text{Cys}^{10}\text{Ser}, \text{Ile}^{25}\text{Ala}, \text{Glu}^{26}\text{Ala}$ $G_{11\alpha}$ (F). Radioaktivitu jsme poté změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry triplikátů (\pm směrodatná odchylka průměru) z jednoho reprezentativního eseje s příslušnými B_{max} a K_d . Další tři nezávislé pokusy vykazovaly podobná data.



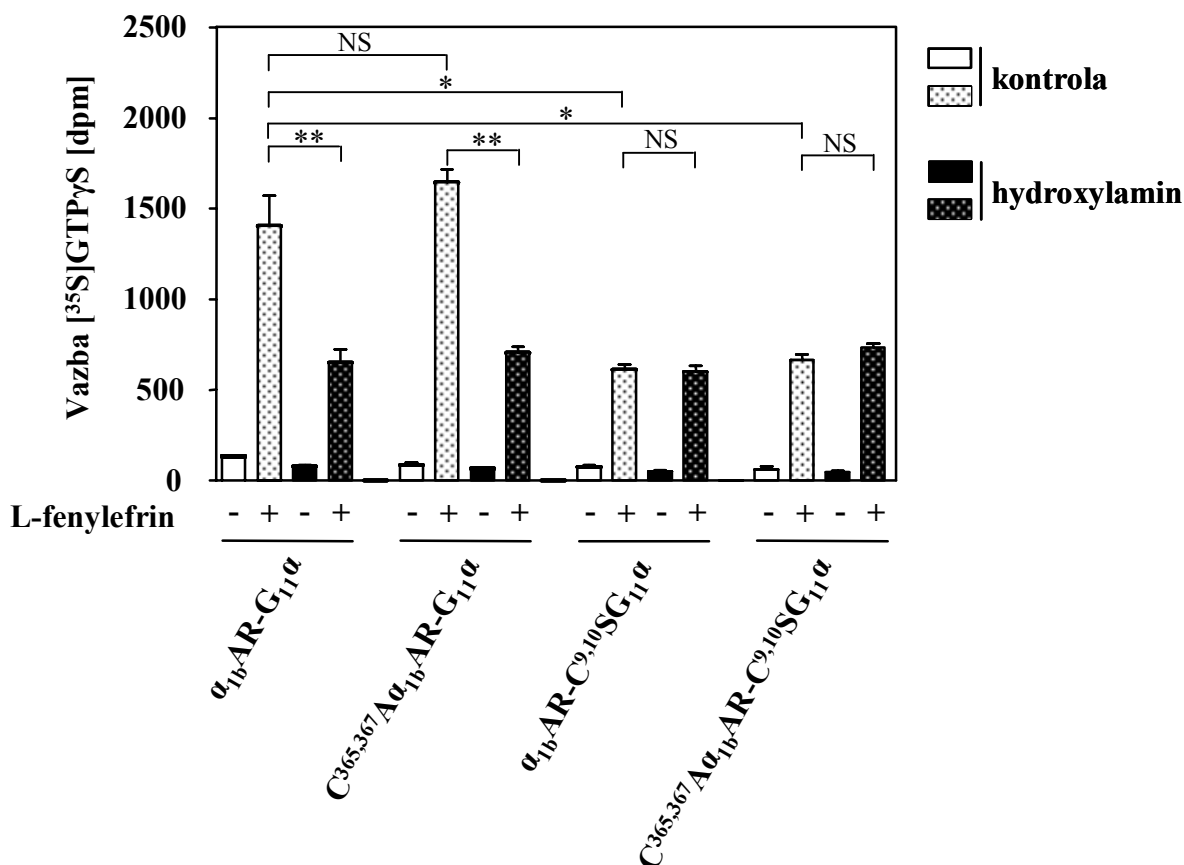
Obr. 9: Afinita agonisty α_1 -adrenergických receptorů L-fenylefrinu k α_{1b} -adrenergickému receptoru v kompetičních vazebných studiích s $[^3\text{H}]$ prazosinem. HEK-293 buňky jsme transfekovali za účelem exprese fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (A), Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (B), α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ (C), Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Ala α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ (D), α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ (E) nebo α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ (F). Radioaktivitu jsme poté změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry triplikátů (\pm směrodatná odchylka průměru) z jednoho reprezentativního eseje s příslušnou K_i . Další tři nezávislé pokusy vykazovaly podobná data.



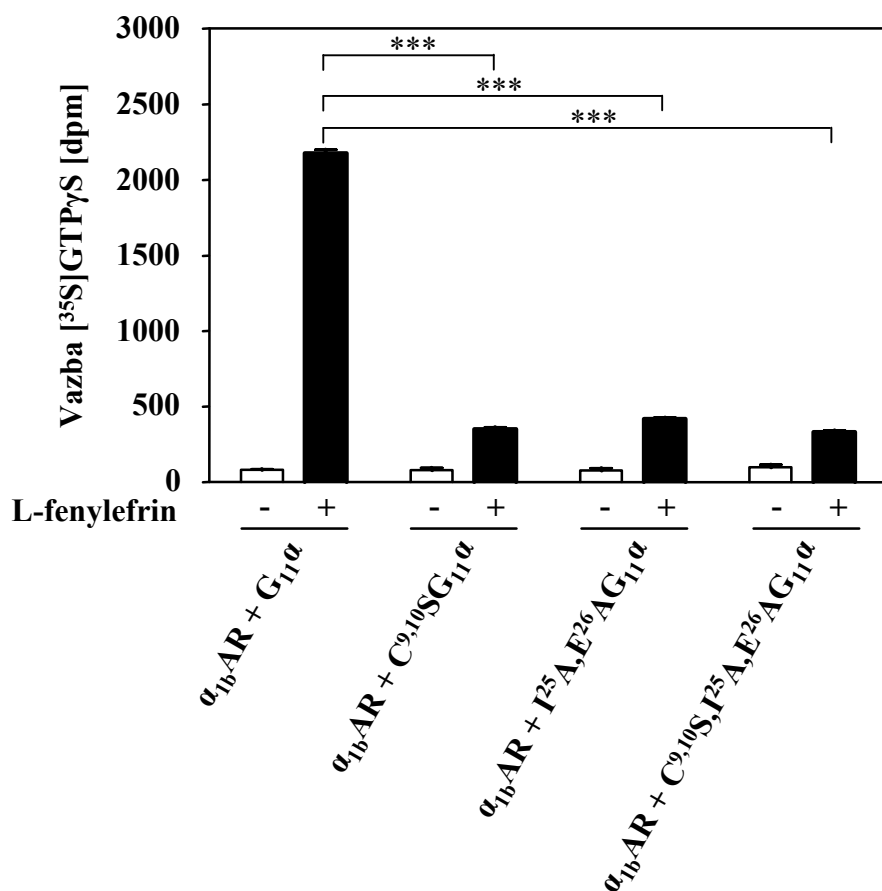
Obr. 10: Vliv mutací vazebných míst pro thioacylaci u $G_{11}\alpha$ a u α_{1b} -adrenoreceptoru na množství $[^{35}S]GTP\gamma S$ navázaného k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem o různé koncentraci. HEK-293 buňky jsme transfekovali za účelem exprese fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11}\alpha$ (prázdná kolečka) nebo $Cys^{365}Ala, Cys^{367}Ala\alpha_{1b}$ -adrenoreceptor- $G_{11}\alpha$ (plná kolečka) nebo α_{1b} -adrenoreceptor- $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11}\alpha$ (prázdné čtverce) nebo $Cys^{365}Ala, Cys^{367}Ala\alpha_{1b}$ -adrenoreceptor- $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11}\alpha$ (plné čtverce). 100 fmolů konstruktů jsme použili pro změření vazby $[^{35}S]GTP\gamma S$ v přítomnosti různé koncentrace L-fenylefrinu. Vzorky jsme poté imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu $[^{35}S]GTP\gamma S$ jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry triplikátů (\pm směrodatná odchylka průměru) z jednoho pokusu. Další tři nezávislé pokusy vykazovaly podobná data. B, bazální vazba v nepřítomnosti L-fenylefrinu.



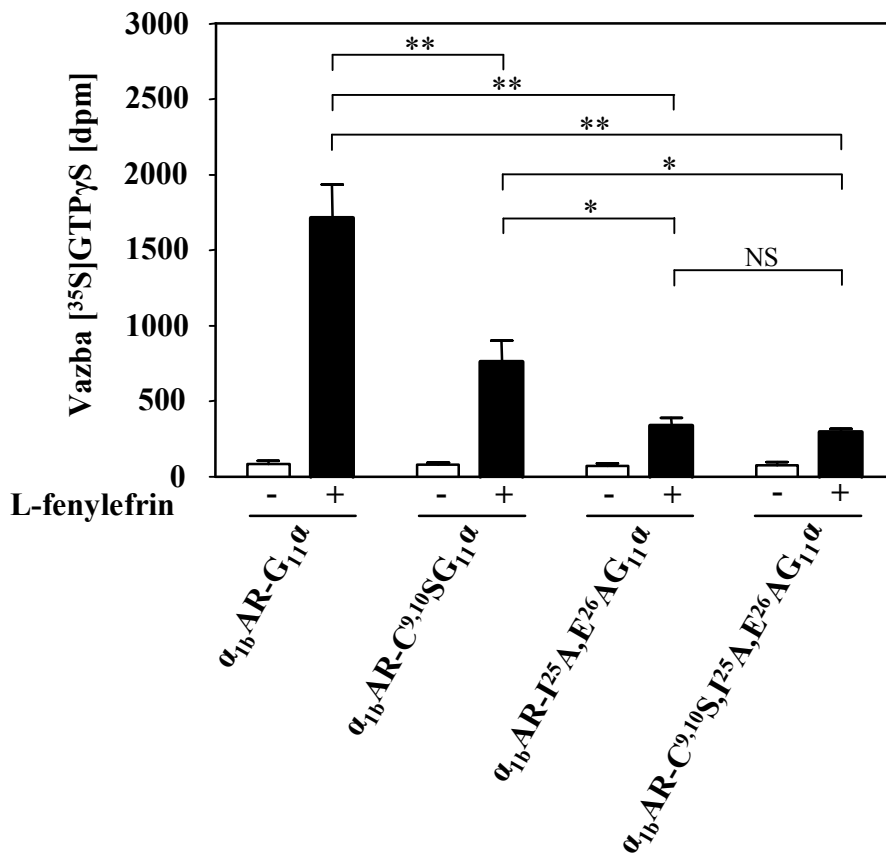
Obr. 11: Detekce proteinu G₁₁α v membránových frakcích na imunoblotu. Jader zbavený buněčný lyzát obsahující α_{1b}-adrenoreceptor-G₁₁α (α_{1b}AR-G₁₁α), Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-G₁₁α (C^{365,367}Aα_{1b}AR-G₁₁α), α_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG₁₁α (α_{1b}AR-C^{9,10}SG₁₁α) nebo Cys³⁶⁵Ala,Cys³⁶⁷Alaα_{1b}-adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG₁₁α (C^{365,367}Aα_{1b}AR-C^{9,10}SG₁₁α) jsme rozdělili na cytosolární a membránovou frakci vysokorychlostní centrifugací. Hrubé plazmatické membrány obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [³H]prazosin odpovídajících výše uvedeným konstruktům jsme podrobili elektroforéze a Western blotu za použití antiséra CQ. Slepý vzorek (mock) pocházel z buněk HEK-293, které jsme transfekovali prázdným vektorem pcDNA3.



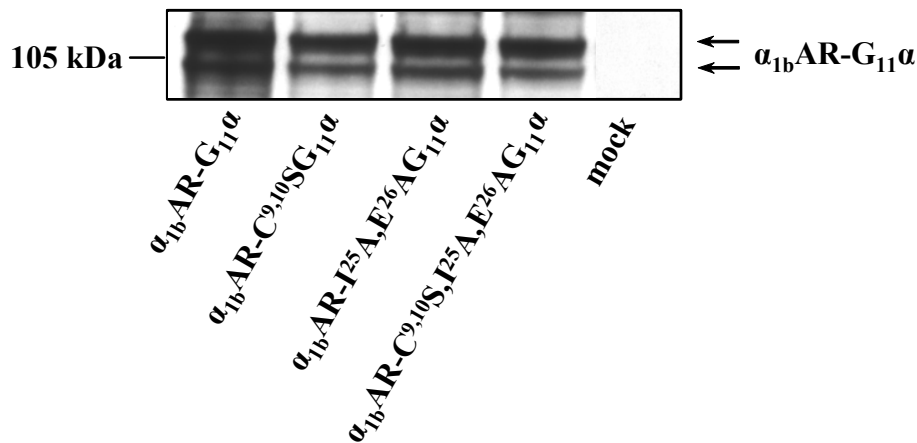
Obr. 12: Vliv depalmitoylace způsobené hydroxylaminem či mutací příslušného proteinu na množství navázaného $[^{35}S]GTP\gamma S$ k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem. HEK-293 buňky jsme transfekovali za účelem exprese fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11}\alpha$ ($\alpha_{1b}AR-G_{11}\alpha$) nebo $Cys^{365}Ala, Cys^{367}Ala\alpha_{1b}$ -adrenoreceptor- $G_{11}\alpha$ ($C^{365,367}A\alpha_{1b}AR-G_{11}\alpha$) nebo α_{1b} -adrenoreceptor- $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11}\alpha$ ($\alpha_{1b}AR-C^{9,10}SG_{11}\alpha$) nebo $Cys^{365}Ala, Cys^{367}Ala\alpha_{1b}$ -adrenoreceptor- $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11}\alpha$ ($C^{365,367}A\alpha_{1b}AR-C^{9,10}SG_{11}\alpha$). Plazmatické membrány z těchto buněk jsme inkubovali v přítomnosti (tmavé) či nepřítomnosti (světlé sloupce) hydroxylaminu. Membrány s výše uvedenými konstrukty obsahující 50 fmolů vazebných míst pro $[^3H]$ prazosin jsme podrobili vazebnému pokusu s $[^{35}S]GTP\gamma S$ v absenci (hladké) či přítomnosti (tečkované sloupce) 100 μM L-fenylefrinu. Vzorky jsme poté imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu $[^{35}S]GTP\gamma S$ jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry triplikátů (\pm směrodatná odchylka průměru) z jednoho eseje. Další tři nezávislé pokusy vykazovaly podobná data. Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***. NS, nesignifikantní.



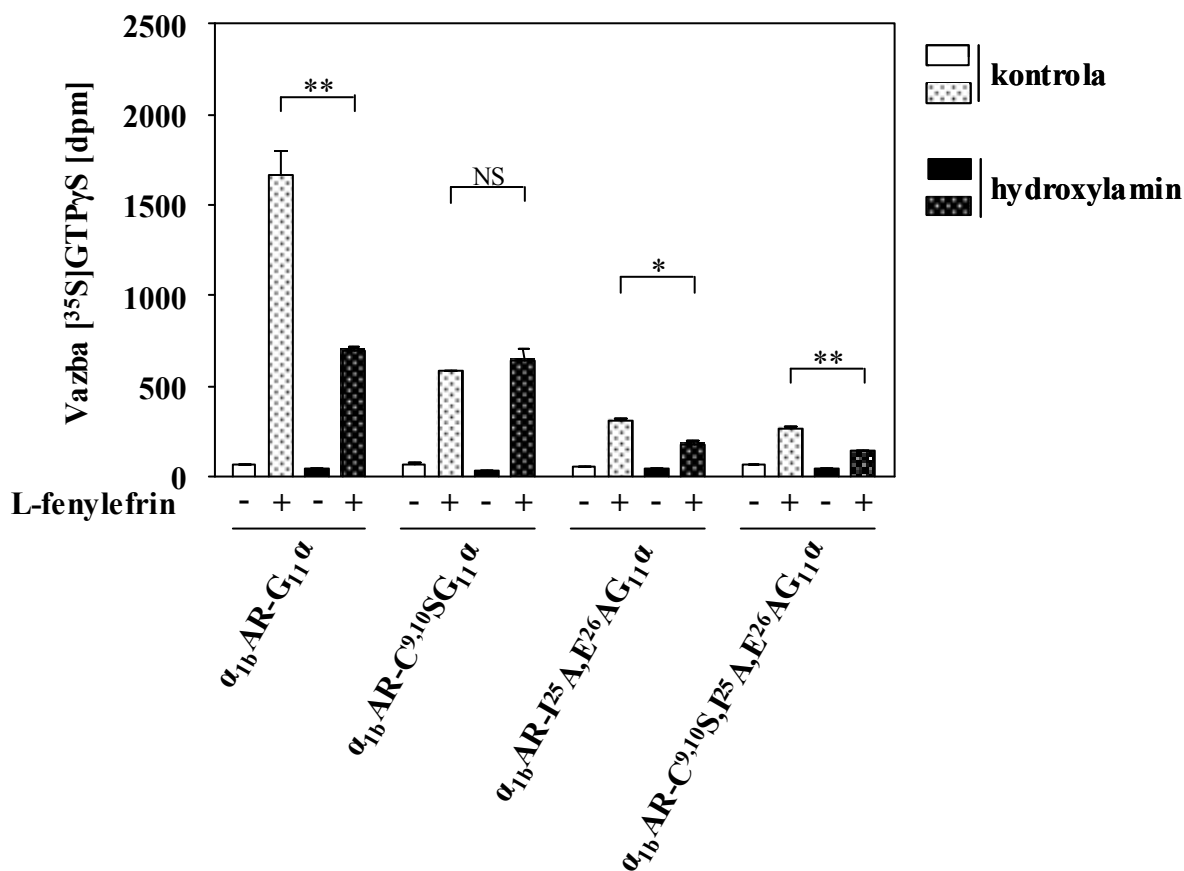
Obr. 13. Vliv mutace vazebného místa pro $\beta\gamma$ podjednotku a pro thioacylaci na množství navázaného $[^{35}S]GTP\gamma S$ k jednotlivým modifikovaným G-proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem. Buňky HEK-293 jsme kotransfekovali vektory pcDNA3 kódujícími α_{1b} -adrenoreceptor a $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR + G_{11\alpha}$) nebo $Cys^9Ser, Cys^{10}SerG_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR + C^{9,10}SG_{11\alpha}$) nebo $Ile^{25}Ala, Glu^{26}AlaG_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR + I^{25}A, E^{26}AG_{11\alpha}$) nebo $Cys^9Ser, Cys^{10}Ser, Ile^{25}Ala, Glu^{26}AlaG_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR + C^{9,10}S, I^{25}A, E^{26}AG_{11\alpha}$). Membrány z těchto buněk, exprimující stejné množství vazebných míst pro $[^3H]$ prazosin, jsme podrobili vazebnému pokusu s $[^{35}S]GTP\gamma S$ v absenci (bílý) či přítomnosti (černý sloupec) $100 \mu M$ L-fenylefrinu. Vzorky jsme poté imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu $[^{35}S]GTP\gamma S$ jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***.



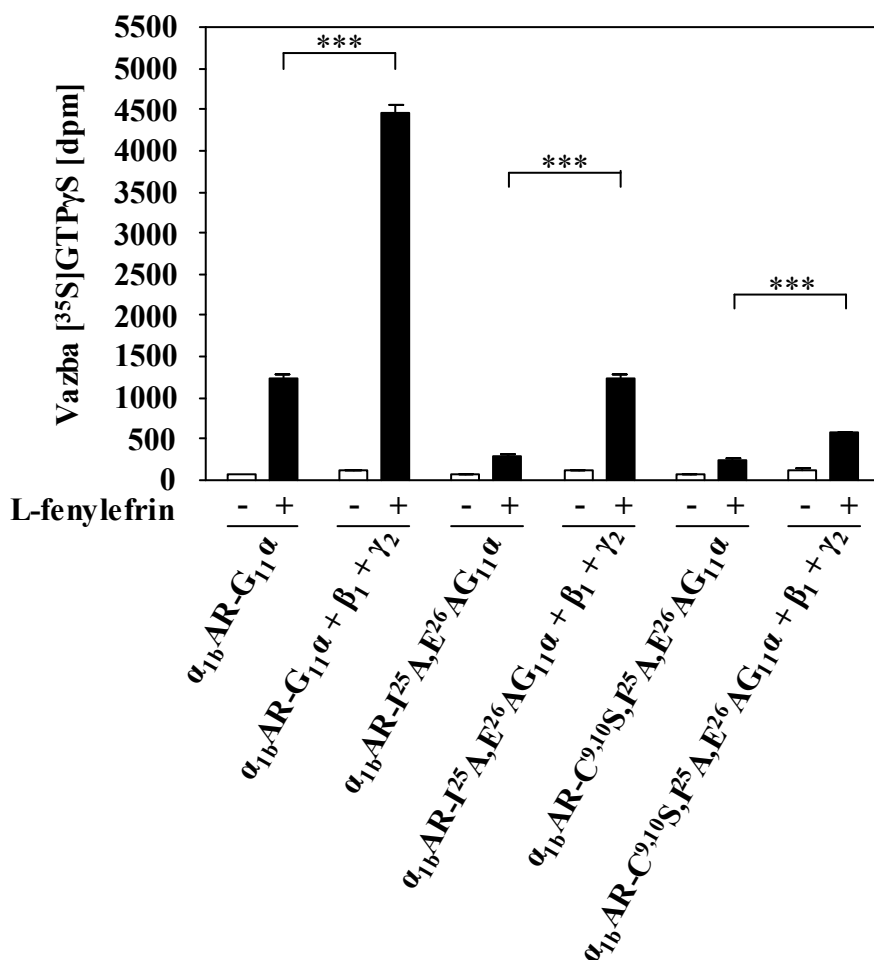
Obr. 14: Vliv mutace vazebného místa pro $\beta\gamma$ podjednotku a pro thioacylaci na množství navázaného [³⁵S]GTP γ S k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem (A) V HEK-293 buňkách jsme exprimovali fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptoru a vždy jednoho z následujících G-proteinů: nemodifikovaný $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-G_{11\alpha}$), Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-C^{9,10}S G_{11\alpha}$), Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-I^{25}A, E^{26}A G_{11\alpha}$) nebo Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-C^{9,10}S, I^{25}A, E^{26}A G_{11\alpha}$). Membrány s výše uvedenými konstrukty obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [³H]prazosin jsme použili k měření bazální (bílé) nebo 100 μ M L-fenylefrinem stimulované (černé sloupce) vazby [³⁵S]GTP γ S k fúznímu proteinu. Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***. NS, nesignifikantní.



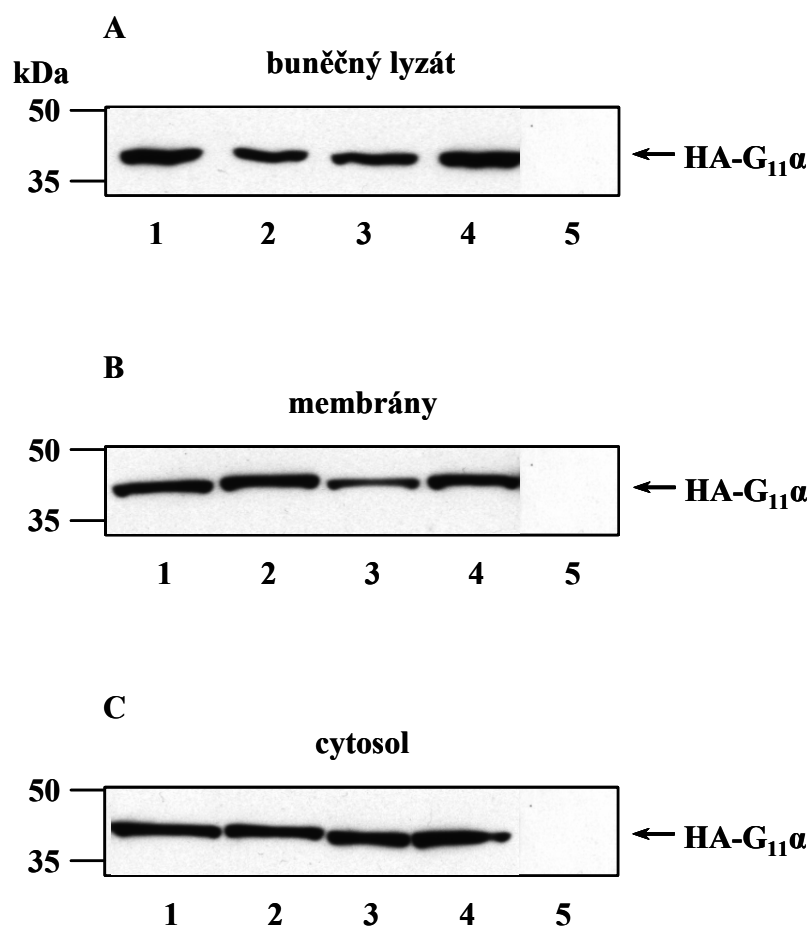
Obr. 15: Detekce proteinu $G_{11\alpha}$ v membránových frakcích na imunoblotu. Jader zbavený buněčný lyzát obsahující α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-G_{11\alpha}$), α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-C^{9,10}SG_{11\alpha}$), α_{1b} -adrenoreceptor-Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-I^{25}A,E^{26}AG_{11\alpha}$) nebo α_{1b} -adrenoreceptor-Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-C^{9,10}S,I^{25}A,E^{26}AG_{11\alpha}$) jsme rozdělili na cytosolární a membránovou frakci vysokorychlostní centrifugací. Hrubé plazmatické membrány obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [³H]prazosin odpovídajících výše uvedeným konstruktům jsme podrobili elektroforéze a Western blotu za použití antiséra CQ. Slepý vzorek (mock) pocházel z buněk HEK-293, které jsme transfekovali prázdným vektorem pcDNA3.



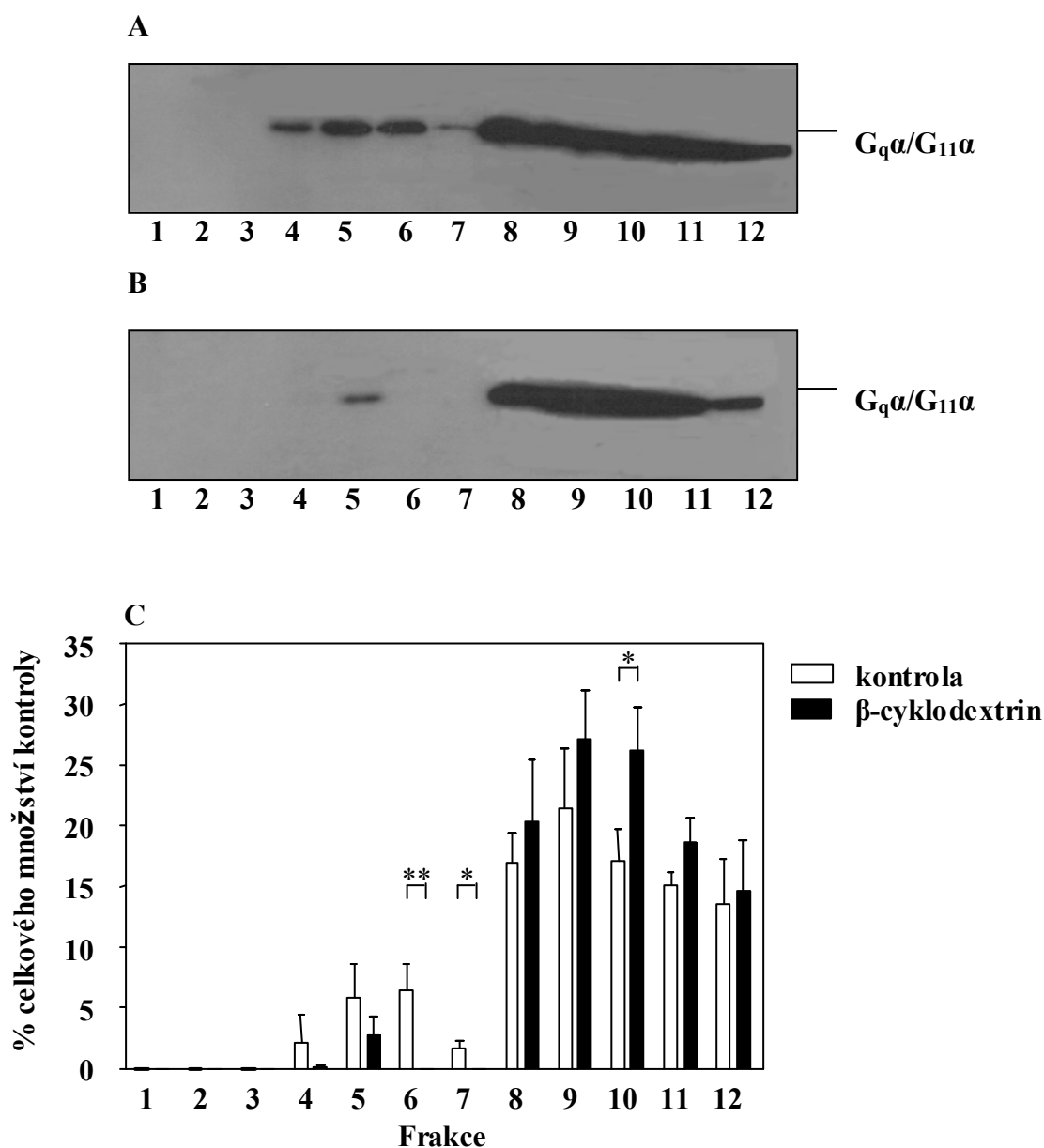
Obr. 16: Vliv hydroxylaminu na množství navázaného $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k jednotlivým fúzním proteinům v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem. HEK-293 buňky jsme transfekovali za účelem exprese fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $\text{G}_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}\text{AR-G}_{11\alpha}$), $\text{Cys}^9\text{Ser,Cys}^{10}\text{SerG}_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}\text{AR-C}^{9,10}\text{SG}_{11\alpha}$), $\text{Ile}^{25}\text{Ala,Glu}^{26}\text{AlaG}_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}\text{AR-I}^{25}\text{A,E}^{26}\text{AG}_{11\alpha}$) nebo $\text{Cys}^9\text{Ser,Cys}^{10}\text{Ser,Ile}^{25}\text{Ala,Glu}^{26}\text{AlaG}_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}\text{AR-C}^{9,10}\text{S,I}^{25}\text{A,E}^{26}\text{AG}_{11\alpha}$). Plazmatické membrány z těchto buněk jsme inkubovali v přítomnosti (tmavé) či nepřítomnosti (světlé sloupce) hydroxylaminu. Membrány s výše uvedenými konstrukty obsahující 100 fmolů vazebných míst pro $[^3\text{H}]\text{prazosin}$ jsme podrobili vazebnému pokusu s $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v absenci (hladké) či přítomnosti (tečkované sloupce) 100 μM L-fenylefrinu. Vzorky jsme poté imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***. NS, nesignifikantní.



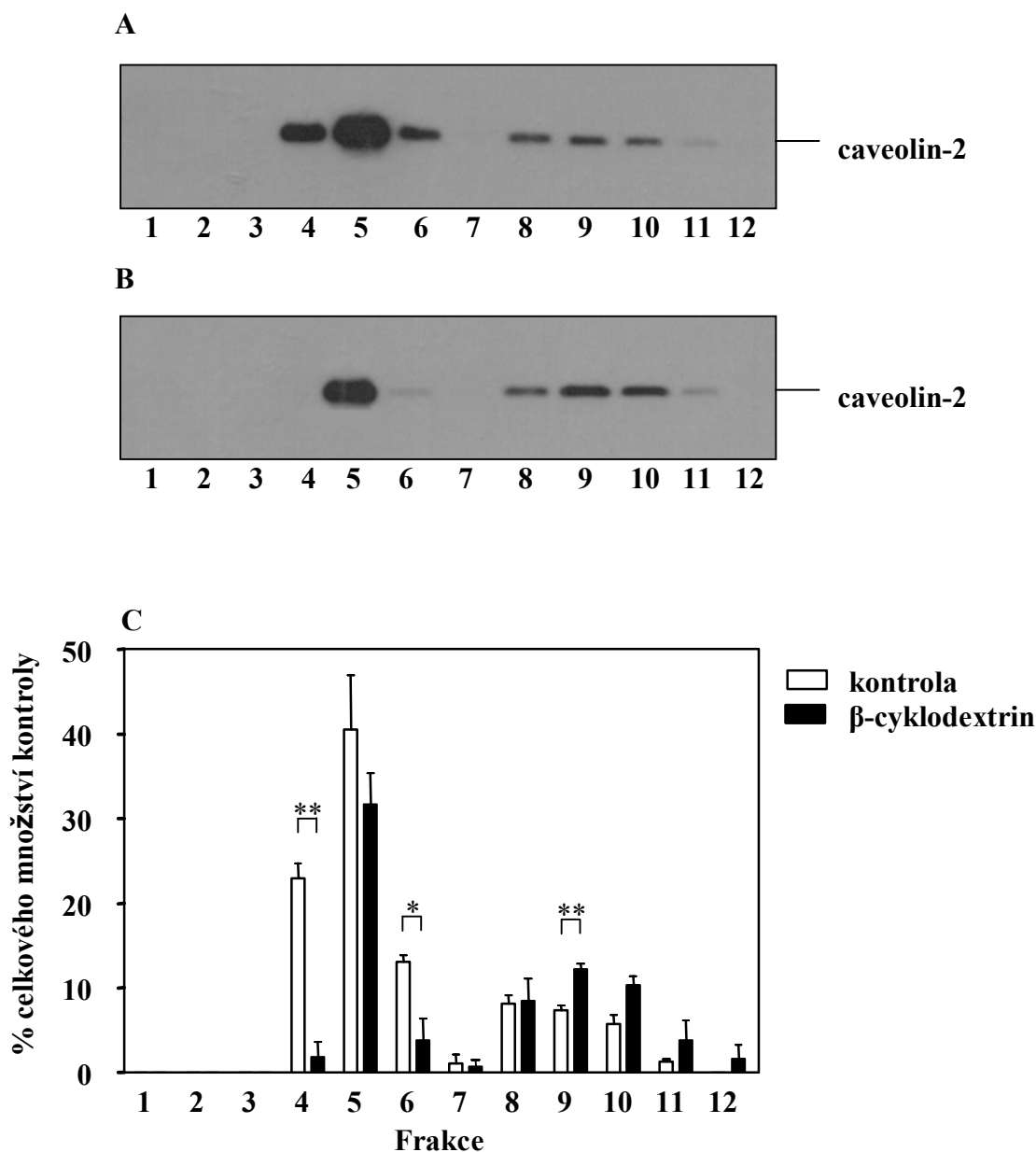
Obr. 17: Vliv nadbytku podjednotek $\beta_1\gamma_2$ na vazbu $[^{35}S]GTP\gamma S$ k fúzním proteinům s mutací ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ podjednotku a pro thioacylaci v závislosti na stimulaci L-fenylefrinem. V HEK-293 buňkách jsme expimovali fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptoru a vždy jednoho z následujících G-proteinů: nemodifikovaný $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-G_{11\alpha}$), Ile²⁵Ala, Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-I^{25}A, E^{26}AG_{11\alpha}$) nebo Cys⁹Ser, Cys¹⁰Ser, Ile²⁵Ala, Glu²⁶Ala $G_{11\alpha}$ ($\alpha_{1b}AR-C^{9,10}S, I^{25}A, E^{26}AG_{11\alpha}$). Tyto mutanty jsme expimovali jak samotné tak v kombinaci s podjednotkami β_1 a γ_2 . Hrubé plazmatické membrány s výše uvedenými konstrukty obsahující 100 fmolů vazebných míst pro [³H]prazosin byly použity k měření bazální (bílé) nebo 100 μ M L-fenylefrinem stimulované (černé sloupce) vazby [³⁵S]GTP γ S k fúznímu proteinu. Vzorky jsme poté imunoprecipitovali pomocí CQ antiséra a vazbu [³⁵S]GTP γ S jsme změřili kapalnou scintilační spektrometrií. Uvedeny jsou průměry ze tří nezávislých pokusů (\pm směrodatná odchylka průměru). Signifikantní rozdíl hodnot určený párovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***.



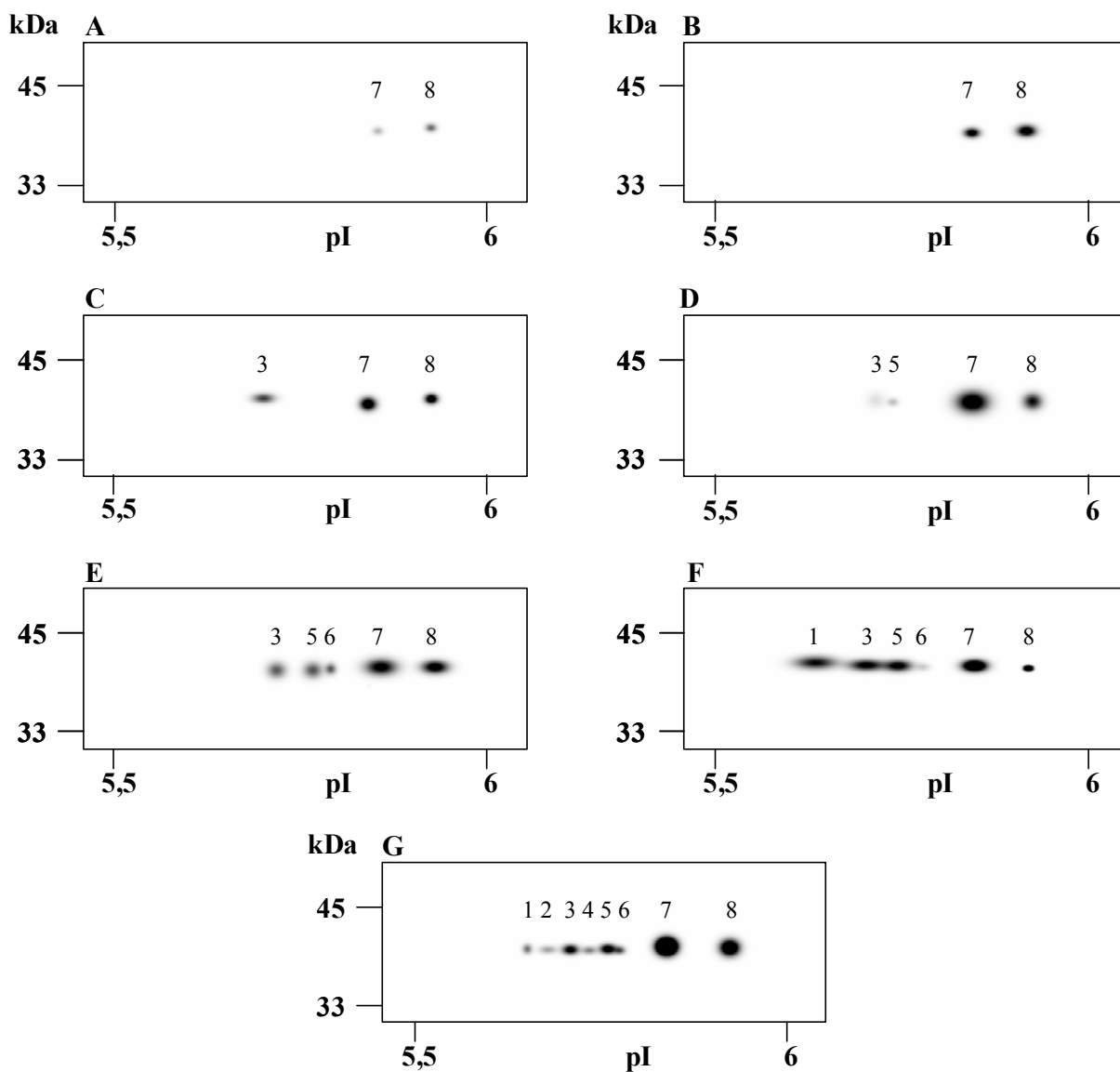
Obr. 18: Detekce fúzních konstruktů s inkorporovaným HA epitopem v jednotlivých buněčných frakcích na imunoblotu. Nemodifikovaný G₁₁α (1), Cys⁹Ser,Cys¹⁰SerG₁₁α (2), Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁α (3) a Cys⁹Ser,Cys¹⁰Ser,Ile²⁵Ala,Glu²⁶AlaG₁₁α (4) byly modifikovány zavedením HA epitopu. Modifikované konstrukty jsme exprimovali v HEK-293 buňkách. Frakce 5 představuje slepý vzorek (mock) pocházející z buněk HEK-293, které jsme transfekovali prázdným vektorem pcDNA3. Jader zbavený buněčný lyzát (A) z těchto buněk jsme centrifugací rozdělili na membránovou (B) a cytosolární frakci (C). Stejně množství proteinů od každé frakce jsem podrobili elektroforéze a imunodetekci za použití protilátky pro HA epitop.



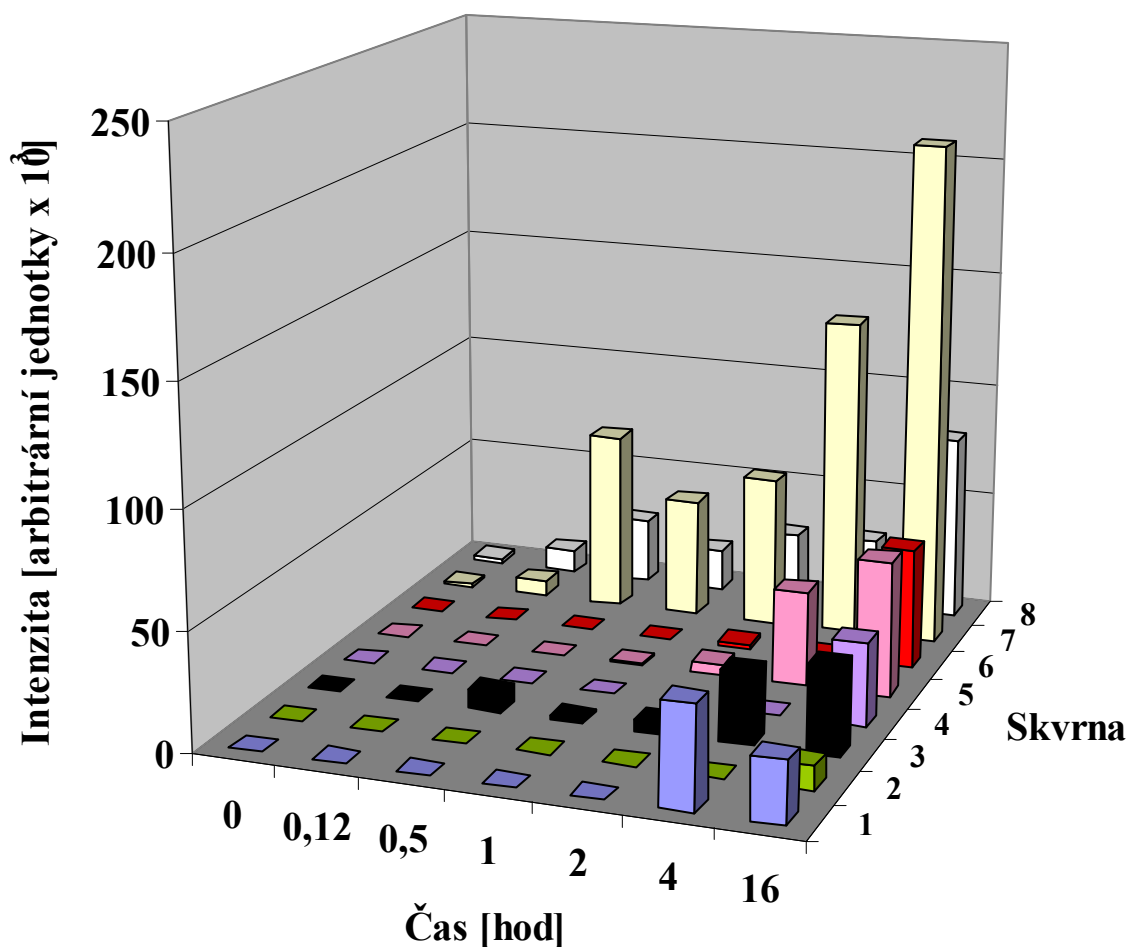
Obr. 19: Detekce $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ ve frakcích flotačního sacharóзовého detergentového gradientu u E2M11 buněk a jeho změny v distribuci po působení β -cyklodextrinu. Kontrola (A), β -cyklodextrin (10 mM, 40 min) (B), grafické znázornění dat z imunoblotu A a B (C). Uvedeny jsou průměry dat (\pm směrodatná odchylka průměru) získaných ze tří nezávislých pokusů. Signifikantní rozdíl hodnot určený nepárovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo *. 1 - 12, frakce flotačního sacharóзовého detergentového gradientu (20 μ l vzorku).**



Obr. 20: Detekce caveolinu-2 ve frakcích flotačního sacharózového detergentového gradientu u E2M11 buněk a jeho změny v distribuci po působení β -cyklodextrinu. Kontrola (A), β -cyklodextrin (10 mM, 40 min) (B), grafické znázornění dat z imunoblotu A a B (C). Uvedeny jsou průměry dat (\pm směrodatná odchylka průměru) získaných ze tří nezávislých pokusů. Signifikantní rozdíl hodnot určený nepárovým Studentovým t-testem je značen *, ** nebo ***. 1 - 12, frakce flotačního sacharózového detergentového gradientu (20 μ l vzorku).



Obr. 21: PDQuest obrázky znázorňující na 2D gelu rozlišené solubilní formy $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ proteinů v průběhu času inkubace s TRH. Kontrolní (A) a hormonem [10 μ M TRH; 0,12 hod (B), 0,5 hod (C), 1 hod (D), 2 hod (E), 4 hod (F) a 16 hod (G)] ovlivněné buňky HEK-293 buňky (klon E2M11) jsme sklídili a zhomogenizovali způsobem uvedeným v části Materiál a metody. Solubilní (cytosolární) buněčnou frakci jsme připravili centrifugací postnukleárního supernatantu po dobu 2 hod při 250 000 x g a 4°C. Rozpustné cytosolární proteiny jsme rozlišili na 2D elektroforéze a proteiny $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ jsme detekovali metodou imunoblot za použití CQ protilátky. Tyto obrázky byly uměle vytvořeny programem PDQuest podle naskenovaných reprezentativních imunoblotů se signály jednotlivých proteinů.



Obr. 22: Solubilizace proteinů $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ v závislosti na délce hormonální inkubace. Kontrolní a hormonem ($10 \mu\text{M}$ TRH; 0,12 hod, 0,5 hod, 1 hod, 2 hod, 4 hod a 16 hod) ovlivněné buňky HEK-293 buňky (klon E2M11) jsme sklídili a zhomogenizovali způsobem uvedeným v části Materiál a metody. Solubilní (cytosolární) buněčnou frakci jsme připravili centrifugací postnukleárního supernatantu po dobu 2 hod při $250\,000 \times g$ a 4°C . Rozpustné cytosolární proteiny jsme rozlišili na 2D elektroforéze a proteiny $G_q\alpha/G_{11\alpha}$ jsme detekovali metodou imunoblot za použití CQ protilátky. Výsledky znázorňují průměrnou intenzitu imunoreaktivních skvrn (vyjádřenou v arbitrárních jednotkách) získanou ze čtyř nezávislých experimentů v každém časovém intervalu inkubace s TRH.

6. DISKUZE

6.1. Význam palmitoylace a interakcí α podjednotky s $\beta\gamma$ dimerem pro funkční spřažení mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem

Palmitoylace neboli thioacylace je běžná posttranslační modifikace (Wedegaertner, 1998; Chen a Manning, 2001; Qanbar a Bouvier, 2003). Vzhledem k její dynamičnosti a regulovatelnosti poskytuje prostředky k modulaci protein-proteinových interakcí a k asociaci jinak v podstatě solubilních polypeptidů s membránou. α podjednotka všech heterotrimerních G-proteinů obsahuje nejméně jeden cysteinový zbytek blízko svého N-konce, který je místem pro posttranslační palmitoylaci. Zda je daný cystein acylován či ne, je často dynamicky regulováno aktivací (Svoboda a kol., 1996; Drmota a kol., 1998b; Wedegaertner, 1998; Chen a Manning, 2001). Navíc dvojitá palmitoylace, vyskytující se u příbuzných G-proteinů $G_q\alpha$ a $G_{11\alpha}$, je často spojována s ukotvením polypeptidů do oblastí membrány bohatých na sfingolipidy a cholesterol nazvaných lipidické rafty či detergent-rezistentní membránové domény (DRMs) (Wedegaertner, 1998; Chen a Manning, 2001). Převážná většina receptorů spřažených s G-proteiny ze skupiny A také obsahuje jedno nebo více míst pro thioacylaci. Obecně tyto místa můžeme najít v sekvenci 10 až 15 aminokyselin distálně od konce VII. transmembránové oblasti receptoru. Palmitoylaci těchto aminokyselinových zbytků dochází k připojení tohoto úseku k plazmatické membráně, čímž vzniká čtvrtá intracelulární smyčka (Palczewski a kol., 2000; Qanbar a Bouvier, 2003). Mutace aminokyselinových zbytků v rámci osmého helixu vede k narušení G-proteinem zprostředkované signalizace (Hayashi a Haga, 1997; Tetsuka a kol., 2004) a další polypeptidy, které interagují s touto oblastí, kompetují o vazbu s G-proteinem (Feng a kol., 2003). Proto možná není překvapující, že v důsledku mutací palmitoylačních míst v této oblasti GPCRs byl často zpozorován jejich vliv na modulaci funkce. Tento palmitoylovaný úsek receptoru se s největší pravděpodobností účastní přímé interakce s G-proteinem. Dále se pomocí mutací receptorových vazebných míst pro kyselinou palmitovou ukázalo, že tento typ lipidové modifikace může ovlivňovat fosforylaci receptoru spřaženého s G-proteinem a jeho interakce s arrestinem a dalšími proteiny, které se účastní internalizace/desenzitizace receptoru v závislosti na vazbě agonisty (Moffett a kol., 2001; Munshi a kol., 2001; Charest a Bouvier, 2003).

K objasnění úlohy palmitoylace a interakcí $G\alpha$ podjednotky s $G\beta\gamma$ dimerem v signalizaci trimerních G-proteinů a receptorů s nimi spřažených jsme použili linii lidských embryonálních ledvinných buněk HEK-293 (human embryonic kidney cells). Tyto buňky jsme transfekovali α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem a jeho různými mutovanými formami. Protože jednotlivé mutace G-proteinu měly za následek změněnou absolutní úroveň exprese, byl vytvořen fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$, jehož výhoda spočívala v zaručení vždy stejného stechiometrického poměru GPCR ku G-proteinu v každém experimentu bez ohledu na typu mutace. Fúzní proteiny, ve kterých je N-konec $G\alpha$ podjednotky spojen ve čtecím rámci s C-koncem GPCR, se staly velmi oblíbeným a rozšířeným nástrojem pro studium mnoha aspektů interakcí mezi těmito polypeptidy (Milligan, 2002; Milligan a kol., 2004a). Tato strategie umožňuje analyzovat vliv mutací jak receptoru tak G-proteinu na přenos informací mezi nimi, aniž by teoreticky byla změněna proximita obou proteinů či jejich relativní úroveň exprese. Můžeme namítnout, že expresí fúzního proteinu v buňkách vytváříme značně umělou situaci, která ovlivňuje celou signální transdukcí mezi GPCR a G-proteinem. Nicméně výsledky z práce Novotny a kol. (2006) získané z pozorování těchto fúzních proteinů nám dovolují považovat je za spolehlivé a bez případných artefaktů s tím spojených. Byly provedeny pokusy, ve kterých $G_{11\alpha}$ protein současně exprimovaný s α_{1b} -adrenoreceptorem vykazoval v důsledku aktivace agonistou α_1 -adrenergických receptorů L-fenylefrinem stejně zvýšenou stimulaci vazby [35 S]GTP γ S jako fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$. Řadou vazebných studií jsme určili maximální vazebnou kapacitu daného vzorku plazmatických membrán exprimujících požadovaný konstrukt. Tento faktor nám zaručil, že v každém experimentu s fúzními i jednotlivými proteiny bylo použito vždy stejné množství vazebných míst pro antagonistu α_1 -adrenergických receptorů [3 H]prazosin. Stejně množství vazebných míst pro [3 H]prazosin v každém pokusu bylo zpětně potvrzeno metodou Western blot. Vazebná afinita agonistických a antagonistických ligandů k fúzním proteinům obsahujícím α_{1b} -adrenoreceptor a $G_{11\alpha}$ protein byla vlivem mutací nezměněna.

Již dříve bylo zjištěno, že fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ je cílem pro thioacylaci (Stevens a kol., 2001), která modifikuje oba elementy fúzního proteinu, a že vazba agonisty na konstrukt vede ke koordinované regulaci palmitoylace obou členů. Je tedy zajímavé, že fúzní protein s mutací palmitoylačních míst v receptoru vykazoval míru schopnosti aktivovat nemodifikovaný $G_{11\alpha}$ jako fúzní protein obsahující nemodifikovaný tedy s největší pravděpodobností palmitoylovaný receptor. Míra schopnosti receptoru aktivovat G-protein byla sledována jako míra schopnosti daného G-proteinu potažmo

konstruktu vázat [³⁵S]GTPγS. Naopak fúze palmitoylované či depalmitoylované formy α_{1b}-adrenoreceptoru k depalmitoylovanému G_{11α} proteinu vyústila ve značnou a stejnou redukci aktivace G-proteinu, sledované také jako míra schopnosti daného G-proteinu potažmo konstruktu vázat [³⁵S]GTPγS. Ačkoliv mutace cysteinu v jinou aminokyselinu s malým postranním řetězcem je standardní přístup v zamezení thioacylace daného proteinu a také výborná možnost jak ji studovat, přinejmenším v případě G-proteinu G_{qα} byly pozorované efekty důsledkem mutace samé než důsledkem současně probíhající inhibice thioacylace (Hepler a kol., 1996). Z tohoto důvodu jsme v našich experimentech studovali depalmitoylované mutanty zároveň v kombinaci s chemicky navozenou depalmitoylací způsobenou ošetřením plazmatických membrán obsahujících příslušné konstrukty neutrálním hydroxylaminem. Hydroxylaminová inkubace plazmatických membrán exprimujících fúzní protein s nemodifikovaným G_{11α} v kombinaci s nemodifikovaným α_{1b}-adrenoreceptorem či s α_{1b}-adrenoreceptorem s mutací palmitoylačních míst také vedla k masivnímu poklesu agonistou zprostředkované vazby [³⁵S]GTPγS. Efekt hydroxylaminu zřetelně odrážel deacylaci G-proteinu ve fúzním proteinu, jelikož inkubace membrán obsahujících thioacylaci odolnou formu G_{11α} proteinu s hydroxylaminem neměla vůbec žádný efekt na agonistou zprostředkovanou vazbu [³⁵S]GTPγS. Ačkoliv tedy mohou být obě bílkoviny GPCR i G-protein palmitoylovány, pouze palmitoylovaný stav G-proteinu je důležitý pro přenos informací mezi nimi.

Nedávné práce studovaly vliv mutace jediného vazebného místa pro palmitoylaci v G_{sα} proteinu na přenos informací z receptoru na G-protein za použití fúzního proteinu β₂-adrenoreceptor-G_{sα} (Ugur a kol., 2003). Fúzní protein obsahující β₂-adrenoreceptor a nemodifikovaný G_{sα} vykazoval více míst s vysokou afinitou pro vazbu agonisty než varianta fúzního proteinu obsahující G_α s mutací v místě pro vazbu kyseliny palmitové a zároveň efektivněji stimuloval aktivitu adenylcyklázy (Ugur a kol., 2003). V této práci jsme nebyli schopni rozlišit vysoce afinní a nízko afinní vazebná místa pro agonistu, protože stejně jako u většiny receptorů spřažených s G-proteiny třídy G_{qα}/G_{11α} i u α_{1b}-adrenoreceptoru je vliv guaninových nukleotidů na afinitu agonisty velmi malý. Také v práci Ugur a kol., (2003) vedla přítomnost hydroxylaminové inkubace membrán exprimujících nemodifikovaný konstrukt k analogickým výsledkům jako nepřítomnost této inkubace u membrán obsahujících fúzní protein s modifikovaným G_{sα} proteinem. Zároveň neměla inkubace s hydroxylaminem žádný vliv na signál získaný z membrán exprimujících fúzní protein s G_{sα} mutantem v porovnání s kontrolními neinkubovanými membránami se stejným fúzním proteinem. Tedy fúzní protein s nemodifikovaným G_{sα} po inkubaci

s hydroxylaminem vykazoval sníženou schopnost aktivace adenylcyklázy. Fúzní protein s mutací palmitoylačního místa v $G_{s\alpha}$ vykazoval stejnou míru schopnosti spřažení receptoru s efektoem jako fúzní protein s nemutovaným ale hydroxylaminovou inkubací depalmitoylovaným $G_{s\alpha}$. A fúzní protein s $G_{s\alpha}$ mutantem vykazoval po hydroxylaminové inkubaci stejnou schopnost aktivace adenylcyklázy jako kontrolní (hydroxylaminem neošetřené) membrány exprimující stejný fúzní protein.

Současná literatura zabývající se G-proteiny oplývá množstvím údajů o vzájemném vztahu mezi thioacylací G-proteinových α podjednotek a vazbou $\beta\gamma$ komplexu (Iiri a kol., 1996; Evanko a kol., 2000; Evanko a kol., 2001; Evanko a kol., 2005). Již dříve bylo na HEK-293 buňkách ukázáno, že mutace vazebných míst pro $\beta\gamma$ dimer v podjednotkách $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ vede k redukci jejich vazby k $\beta\gamma$ dimeru, následkem čehož dochází k přerušení interakcí α podjednotky s plazmatickou membránou a podjednotka α již také není palmitoylována. Naopak overexprese $\beta\gamma$ podjednotek v HEK-293 buňkách obnovuje membránovou lokalizaci a palmitoylaci výše uvedených mutantů $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ (Evanko a kol., 2000; Evanko a kol., 2001). Skupina G. Milligana ukázala podobné výsledky s $G_{11\alpha}$ podjednotkou (Liu a kol., 2002). $G_{11\alpha}$ podjednotka s mutací ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ komplex v odpověď na agonistu fenylefrin jen velmi slabě vázala [35 S]GTP γ S. Současná exprese tohoto mutantu $G_{11\alpha}$ s dimerem $\beta_{1\gamma 2}$ vedla přinejmenším k částečnému obnovení agonistou stimulované vazby [35 S]GTP γ S k fúznímu proteinu. Tyto výsledky podporují takové modelové komplexy, ve kterých $\beta\gamma$ dimer stejně jako α podjednotka interagují s receptorem spřaženým s G-proteinem přímo (Liu a kol., 2002). V této práci jsme také použili fúzní protein s $G_{11\alpha}$ proteinem majícím mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ a zároveň ve vazebném místě pro kyselinu palmitovou, a ačkoliv jsou palmitoylace G_{α} a interakce s $\beta\gamma$ komplexem ve vzájemném vztahu (Evanko a kol., 2000; Evanko a kol., 2001; Iiri a kol., 1996), tak kombinací výše uvedených mutací nedochází k ještě většímu ovlivnění receptorem zprostředkované aktivace G-proteinu. Naproti tomu hydroxylaminová inkubace vzorku hrubých plazmatických membrán s fúzním proteinem s oběma typy mutací měla přídatný negativní vliv na receptorem zprostředkovanou signalizaci. Vysvětlení tohoto jevu však vyžaduje další studium.

Již jsem se zmínila, že overexprese $\beta\gamma$ v HEK-293 buňkách způsobuje obnovení membránové asociace a palmitoylace $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ podjednotek majících mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer (Evanko a kol., 2000; Evanko a kol., 2001). Podobné výsledky na EF88 buňkách s $G_{11\alpha}$ podjednotkou zaznamenal Liu a kol. (2002). Embryonální fibroblasty EF88 jsou odvozené od myši s knokautovanými geny kódujícími $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteiny.

V jeho práci současná exprese dimeru $\beta_{1\gamma 2}$ a α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ proteinu majícího mutaci také ve vazebném místě $G\alpha$ podjednotky pro $\beta\gamma$ komplex vedla přinejmenším k částečnému obnovení agonistou stimulované vazby $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, ale velikost této obnovené vazby nepřekročila vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k samotnému nemodifikovanému fúznímu proteinu. Koimunoprecipitací $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru s mutovaným fúzním proteinem bylo také zjištěno, že mutovaný fúzní protein vykazuje slabou afinitu k $\beta_{1\gamma 2}$. Podjednotky $\beta\gamma$ hrají klíčovou roli v agonistou zprostředkované výměně guaninových nukleotidů (Rondard a kol., 2001). Tento jev jsme kvantitativně zkoumali s použitím stejného fúzního proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ majícího v $G\alpha$ podjednotce mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ komplex. Kromě toho jsme studovali i fúzní protein, který obsahoval mimo výše uvedenou mutaci i mutaci palmitoylačních míst. Tyto modifikované fúzní proteiny vykazovaly vzhledem k fúznímu proteinu s nemutovaným $G_{11\alpha}$ proteinem sníženou L-fenylefrinem stimulovanou vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ke G-proteinu. Při koexprimaci daného fúzního proteinu a $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru jsme zaznamenali několikanásobné zvýšení agonistou stimulované vazby $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúznímu proteinu v porovnání s kontrolou (daný mutant bez současné exprimace $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru). Je zajímavé, vazba $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v imunoprecipitátech obsahujících $\beta_{1\gamma 2}$ dimer a fúzní protein s $G_{11\alpha}$ proteinem s mutací ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer se svojí velikostí vyrovnala vazbě $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúznímu proteinu s nemodifikovaným G-proteinem za nepřítomnosti $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru. Tedy při současné expresi $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru a daného modifikovaného fúzního proteinu nebyl signální přenos mezi receptorem a G-proteinem vůbec ovlivněn mutací G-proteinu. Zároveň vazba $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v imunoprecipitátech obsahujících $\beta_{1\gamma 2}$ dimer a fúzní protein s oběma typy mutace svojí velikostí dosáhla 50% vazby $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ k fúznímu proteinu s nemodifikovaným G-proteinem za nepřítomnosti $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru. Tedy fúzní protein s depalmitoylovaným G-proteinem vykazujícím i mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer se v přítomnosti nadměrného množství $\beta\gamma$ dimeru choval podobně jako fúzní konstrukt s $G_{11\alpha}$ proteinem vykazujícím mutaci pouze palmitoylačního místa v nepřítomnosti $\beta_{1\gamma 2}$ dimeru. I přes mutaci vazebného místa α podjednotky pro $\beta\gamma$ dimer, která snižuje afinitu $G\beta\gamma$ ke $G\alpha$, zřejmě mohlo díky přítomnosti velkého množství $\beta\gamma$ podjednotek dojít k jejich navázání na α podjednotku, tedy ke zvýšení afinity α podjednotky k $\beta\gamma$ dimeru. α podjednotka se tak mohla stát znovu aktivovatelnou, v důsledku čehož jsme naměřili zvýšenou a plně obnovenou vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Pokusy jsme navíc prováděli na buňkách, které obsahují na rozdíl od výše uvedené studie i endogenní $G_{11\alpha}$ a $G_q\alpha$ proteiny.

Další zajímavý a spíše překvapivý moment v této práci nastal, když $G_{11\alpha}$ protein postrádající vazebná místa pro palmitát se svojí buněčnou lokalizací nelišil od nemutovaného $G_{11\alpha}$. Mnoho autorů se domnívá, že v případě některých G-proteinů po stimulaci buněk agonistou dojde k uvolnění $G\alpha$ z membrány do cytosolu (Wedegaertner a Bourne, 1994; Wedegaertner a kol., 1995; Svoboda a kol., 1996; Drmota a kol., 1998b), což je provázeno odštěpením palmitátu z této podjednotky. Je proto překvapující, že v našem případě depalmitoylovaný $G_{11\alpha}$ se částečně nacházel také v membránové frakci. Podle jiných autorů aktivovaná α podjednotka po depalmitoylaci membránu neopouští a dochází pouze k jejímu přesunu v rámci plazmatické membrány (Mumby, 1997; Huang a kol., 1999). HEK-293 buňky, ve kterých jsme exprimovali všechny v této práci uvedené konstrukty, obsahují mimoto i endogenní $G_q\alpha$ a $G_{11\alpha}$ proteiny. Naše výsledky však mohly pouze znamenat to, že G-proteinový mutant byl slabě overexprimován a data tudíž mohla být ovlivněna přítomností endogenních G-proteinů $G_q\alpha$ a $G_{11\alpha}$. Abychom toto vyvrátili, byly skupinou G. Milligana připraveny obdobné mutanty se zainkorporovaným HA epitopem v $G_{11\alpha}$ proteinu v každém konstraktu, což umožnilo na imunoblotu odlišit overexprimovaný G-protein od endogenních $G_{11\alpha}$ či $G_q\alpha$ proteinů. Také pro určení vlivu vzájemného vztahu mezi $\beta\gamma$ vazbou s α podjednotkou a palmitoylací $G\alpha$ na lokalizaci této podjednotky v membráně byl HA epitop zaveden i do $G\alpha$ proteinu s mutací vazebného místa pro $\beta\gamma$ komplex i do $G\alpha$ proteinu vykazujícího kombinaci obou dvou typů mutací. Následným imunoblotingem jsme potvrdili podobný distribuční poměr $G_{11\alpha}$ proteinu v membránové i cytosolární frakci. Obdobné výsledky byly získány porovnáním nemodifikované a thioacylaci odolné variantě $G_s\alpha$ proteinu (Ugur a kol., 2003). Z toho je možné usuzovat, že mutovaný G-protein sice velmi slabě asociuje s plazmatickou membránou nicméně i nadále může být ve spojení s dalšími buněčnými membránami (Ugur a kol., 2003).

Výsledky této části dizertační práce naznačují, že spíše N-terminální palmitoylace $G_{11\alpha}$ proteinu hraje klíčovou roli v informačním přenosu z receptoru spřaženým s G-proteinem na G-protein než přímo aminokyselinové zbytky cysteinu, které jsou cílem pro modifikaci. Fakt, že deacylace těchto aminokyselinových zbytků se ukázala být v přímé souvislosti s odpovědí na vazbu agonisty k fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ (Stevens a kol., 2001), nám napovídá, že toto může být klíčový počáteční krok v určení rozsahu a délky trvání signální transdukce.

6.2. Vliv extrakce cholesterolu na buněčnou lokalizaci $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2

Dalším cílem mé práce bylo zjistit, jakou roli hrají v internalizaci receptoru a G-proteinů membránové domény. Membránové domény neboli membránové rafty jsou okrsky plazmatické membrány o specifickém lipidovém i bílkovinném složení (Schroeder a kol., 1994; Brown a London, 1998; Simons a Toomre, 2000). Vnější list lipidové dvouvrstvy obsahuje velké množství glykolipidů a sfingolipidů s téměř výlučným zastoupením nasycených mastných kyselin. Vnitřní list membrány v oblasti membránových domén obsahuje také fosfolipidy fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a fosfatidylinositol, které se však od svých „majoritních“ analogů ve většinové fázi buněčné membrány (nedoméňová část) odlišují tím, že obsahují především nasycené mastné kyseliny. Většina buněčné membrány je tvořena fosfatidylcholinem, fosfatidylserinem a fosfatidylethanolaminem, které v poloze 2 na glycerolu obsahují nenasyčené mastné kyseliny, napříkladně kyselinu arachidonovou. Řetězce mastných kyselin lipidů vnější i vnitřní lipidové vrstvy jsou v těsném spojení s cholesterolem, který má pro integritu membránových domén velký význam. Odstranění cholesterolu z plazmatické membrány β -cyklodextrinem či filipinem vede k rozrušení membránových domén a ke ztrátě jejich funkce (Wolf a kol., 2002; Dreja a kol., 2002; Matveev a Smart, 2002). Použití uvedených látek se tedy stalo důležitým nástrojem studia úlohy membránových domén ve sledovaném buněčném procesu.

My jsme nyní zaměřili na to, jak odstranění cholesterolu β -cyklodextrinem ovlivní membránovou distribuci G-proteinů $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2 (markerového proteinu domén typu caveol). Pro tento soubor experimentů jsme opět zvolili HEK-293 buňky, tentokrátě však exprimující ve vysokém množství dlouhou formu krysího receptoru pro TRH (TRHR-1) a myší $G_{11\alpha}$ (klon E2M11) (Svoboda a kol., 1996). Při určování vhodné koncentrace a délky působení β -cyklodextrinu jsme vycházeli z dostupných literárních údajů. Naším cílem bylo použít takovou koncentraci β -cyklodextrinu, která bude dostatečná k rozrušení membránových domén, současně však nebude pro buňky toxická. Na základě studií Ilangumarana a Hoessliho (1998) a Ohkubo a kol. (2002) jsme se rozhodli pro inkubaci buněk s 10 mM β -cyklodextrinem po dobu 40 min. Pro izolaci membránových domén jsme použili extrakci v neiontovém detergentu Triton X-100 (1%, 60 min, 0 až 4°C) s následnou izolací detergent-rezistentních membránových domén

s pomocí flotace na hustotním sacharózovém gradientu (Pesanova a kol., 1999). Při vložení kyvety se vzorkem do pole vysokého odstředivého zrychlení dochází k postupné flotaci (vznášení) DRMs až do takové zóny (oblasti gradientu), jejíž hustota je stejná jako DRMs. Touto metodou lze oddělit membránové domény/rafty, jež díky své nízké vznášivé hustotě flotují do oblastí gradientu s nízkou koncentrací sacharózy, od většinové membránové fáze.

Z našich výsledků vyplývá, že inkubace živých HEK-293 buněk pěstovaných ve tkáňové kultuře s β -cyklodextrinem vedla k podstatnému snížení signálu $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů detekovaných na imunoblotu v detergent-rezistentních membránových doménách. Podobný výsledek byly zjištěny pro markerovou bílkovinu domén typu caveol - caveolin. Inkubace buněk s β -cyklodextrinem tedy významně narušila integritu membránových domén. Značná část $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ a caveolinu-2 se přesunula do neflotující oblasti gradientu, kde jsou lokalizovány solubilní a detergentem rozpustné bílkoviny. Pro vysvětlení musím říci, že rozpustné látky nemají schopnost flotovat v hustotních sacharózových gradientech.

6.3. Časový průběh solubilizace G-proteinů třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$

Posttranslační modifikace $\beta\gamma$ podjednotek je pokládána za důležitou příčinu membránové lokalizace trimerního G-proteinového komplexu v hormonálně nestimulovaných buňkách. $G\gamma$ podjednotka je prenylována (Lai a kol., 1990; Mumby a kol., 1990a). Také lipidové modifikace $G\alpha$ podjednotek se podstatnou měrou podílí na jejich asociaci s membránou. Mezi nejčastější lipidové modifikace G-proteinové α -podjednotky patří palmitoylace a myristoylace. Mezi myristoylované $G\alpha$ patří například transducin, $G_{\text{gust}\alpha}$, $G_{i\alpha}$, $G_{o\alpha}$ (Mumby a kol., 1990b; Kokame a kol., 1992; Hoon a kol., 1995; Wedegaertner, 1998). Kromě $G_{t\alpha}$ a $G_{\text{gust}\alpha}$ jsou všechny ostatní α podjednotky palmitoylovány, a sice na cysteinových zbytcích na N-konci molekuly. $G\alpha$ podjednotky mohou být palmitoylovány jedenkrát, dvakrát i vícekrát. Proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ obsahují dvě modifikace kyselinou palmitovou (McCallum a kol., 1995; Wedegaertner, 1998). Interakce $G\beta\gamma$ je zapotřebí nejen pro připojení $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ podjednotek k membráně ale také pro palmitoylaci $G\alpha$ podjednotek (Evanko a kol., 2000). Overexprese $G\beta\gamma$ izoforem selektivně obnovuje membránovou lokalizaci a také palmitoylaci $G_{s\alpha}$ a $G_{q\alpha}$ podjednotek majících mutaci ve vazebném místě pro $\beta\gamma$ dimer (Evanko a kol., 2001). Ačkoliv je ve

všeobecném podvědomí, že aktivace G-proteinů má za následek zvýšený obrat kyseliny palmitové na α podjednotce, názor na topologický osud těchto proteinů ještě stále není ustálen. Wedegaertner a Bourne se domnívají, že aktivací a depalmitoylací $G\alpha$ podjednotky dochází k jejímu uvolnění z membrány (Wedegaertner a Bourne, 1994; Wedegaertner a kol., 1995; Drmota a kol., 1998b). Pro tento fakt svědčí i práce Wise a kol. (1997), kde byly připraveny konstrukty $G_{11\alpha}$ proteinu mající mutaci ve vazebných místech pro palmitát. Mutanty $Cys^9SerG_{11\alpha}$ a $Cys^{10}SerG_{11\alpha}$ byly na rozdíl od kontrolního palmitoylovaného $G_{11\alpha}$ proteinu částečně solubilizovány, zatímco dvojitý mutant $Cys^{9,10}SerG_{11\alpha}$ byl přítomen v solubilní frakci v ještě větším množství. Navíc $G\alpha$ proteiny mající mutaci v místě zodpovědném za vazbu $G\alpha$ s $\beta\gamma$ dimerem se také nachází spíše v solubilní než membránové frakci, což je v důsledku již výše zmíněné depalmitoylace (Evanko a kol., 2005). Na druhou stranu, data skupiny Huang a kol., (1997, 1999) podporují přesně opačnou teorii. Membránová asociace $G\alpha$ podjednotek přetrvává bez ohledu na to, zda je protein aktivován a/nebo depalmitoylován.

Hormonální či neurotransmitterová stimulace ústí v odpřažení $G\alpha$ podjednotky od $G\beta\gamma$ dimeru. Třebaže tato disociace byla dokázána hlavně z funkčního hlediska (Gilman, 1987), je rozumné předpokládat, že v hormonálně stimulovaných buňkách je membránové připojení $G\alpha$ podjednotky v porovnání s nestimulovanými buňkami oslabeno. Alifatické řetězce mastných kyselin jako je kyselina palmitová či myristová reprezentují jediná místa, která v přítomnosti hormonu spřahují $G\alpha$ podjednotku s membránou a chrání tak tento protein od oddělení od membrány a od následné solubilizace (Iiri a kol., 1996; Evanko a kol., 2000; Evanko a kol., 2001). Možnost odpřažení $G\alpha$ podjednotky od membrány a její solubilizace je dále zvýšena, je-li vystavena souvislé, případně dlouhodobé stimulaci agonistou a/nebo je-li exprimována současně s velkým množstvím příslušného receptoru. Můžeme se pak domnívat, že za takových podmínek je rovnováha mezi $G\alpha$ s navázaným GTP a $G\alpha$ s navázaným GDP posunuta směrem k volné podjednotce $G\alpha$ -GTP. Tato podjednotka pak snáze podléhá odpojení z membrány.

Úkolem této části práce bylo detailně zobrazit situaci ohledně agonistou zprostředkovaného uvolnění G-proteinu z membrány. V buňkách HEK-293 stabilně exprimujících krysí TRH receptor a myší $G_{11\alpha}$ (klon E2M11) jsme zkoumali solubilizaci proteinů z $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ rodiny v závislosti na délce stimulace hormonem TRH. Solubilní (cytosolické; 250 000 x g supernatant) formy proteinů $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ jsme rozlišili podle jejich izoelektrického bodu a relativní molekulové váhy pomocí dvoudimenzionální gelové elektroforézy a následně detekovali metodou imunoblotingu za použití specifických

protilátek proti C-terminálnímu dekaeptidu shodného u obou forem $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů. Endogenně exprimované proteiny $G_{11\alpha}$ i $G_{q\alpha}$ byly tímto sérem také detekovány. Přestože stálou přítomností hormonu bylo aktivováno velké množství receptoru TRHR, $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteiny byly v solubilní frakci do 10 min agonistické stimulace téměř nedetekovatelné. Signifikantní nárůst signálu na imunoblotu jsme zaznamenali mezi 0,5 hodinou a 2 hodinami stimulace. Prodloužená hormonální stimulace až na 16 hod vedla k dalšímu nárůstu $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ imunoreaktivity v solubilní frakci. Membránová asociace proteinů třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ tudíž přetrvává i za drastických podmínek stimulace hormonem. Není pravděpodobné, že by uvolnění těchto $G\alpha$ podjednotek z membrány bylo důsledkem spíše rychlé palmitoylace/depalmitoylace a/nebo interakcí s $\beta\gamma$ komplexem. Také Hughes a kol. (2001) předpokládají další faktory určující membránovou asociaci $G\alpha$ podjednotky. Ve svých studiích zjistili, že mutace palmitoylačních míst $G_{q\alpha}$ brání proteinu v připojení k membráně, avšak receptorová stimulace neovlivňuje membránovou asociaci $G_{q\alpha}$, přestože podporuje obrát palmitátu. Palmitoylace $G\alpha$ podjednotky je možná zapotřebí pro její ukotvení v membráně, ale pravděpodobně již není nezbytná pro udržení proteinu v membráně po dobu stimulace receptoru.

Již dříve jsme studovali rozlišení $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů 2D elektroforézou v membránových frakcích odvozených od E2M11 buněk (Matousek a kol., 2004). Bylo detekováno pět zřetelných imunoreaktivních signálů odpovídajících proteinům $G_{q\alpha}$ a $G_{11\alpha}$ nebo posttranslačně modifikovaným dominantním proteinům z rodiny $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$. Po dlouhodobé hormonální inkubaci s 10 μ M TRH (16 hod) došlo v membránové frakci k redukci dvou velkých skvrn odpovídajících exogenně exprimovanému $G_{11\alpha}$ a endogennímu $G_{q\alpha}$. Tři menší skvrny zmizely úplně. Obě linie pokusů se tedy navzájem doplňují a sbíhají a naznačují, že prodloužená stimulace TRHR v buňkách exprimujících tento protein ve velkém množství vede k dramatickému ale pomalému poklesu membránově vázaného souboru $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů. Tento pokles je současně doprovázen zvýšením množství těchto proteinů v solubilní, cytosolární frakci. Tento proces je opět velmi pomalý.

7. ZÁVĚREČNÉ SHRnutí

Tato práce se zabývala úlohou palmitoylací a vazebných interakcí G-proteinové α podjednotky s $\beta\gamma$ dimerem v signalizaci zprostředkované G-proteiny třídy $G_{11\alpha}/G_{q\alpha}$ a vlivem na jejich lokalizaci v membráně.

Pro objasnění významu palmitoylace v mechanismu hormonálního účinku zprostředkovaného trimerními G-proteiny a receptory s nimi spřaženými byl vytvořen fúzní protein α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ a jeho palmitoylací odolné varianty. Pomocí vazebných studií bylo zjištěno, že funkční interakce mezi α_{1b} -adrenoreceptorem a $G_{11\alpha}$ proteinem je ovlivněna pouze palmitoylací G-proteinu. Thioacylace receptoru spřaženého s G-proteinem na přenos informací mezi ním a G-proteinem vliv nemá. Zároveň mutacemi palmitoylačních míst receptoru či G-proteinu nebyla změněna afinita antagonisty α_1 -adrenergických receptorů [^3H]prazosinu ani agonisty α_1 -adrenergických receptorů L-fenylefrinu. Ačkoliv schopnost L-fenylefrinu stimulovat vazbu [^{35}S]GTP γ S k fúznímu proteinu α_{1b} -adrenoreceptor- $G_{11\alpha}$ byla nezměněna palmitoylačním potenciálem obou elementů, maximální vazba [^{35}S]GTP γ S byla redukována o 50% u G-proteinu s mutací vazebných míst pro palmitát. Obdobná situace nastala při vazebných pokusech s hydroxylaminem, kde vzorky s fúzními proteiny obsahujícími nemutovaný G-protein, které byly ošetřeny hydroxylaminem, vykazovaly 50% redukci agonistou stimulované vazby [^{35}S]GTP γ S, zatímco hydroxylaminová inkubace vzorků s fúzním proteinem s $G_{11\alpha}$ vykazujícím mutaci thioacylačních míst neměla žádný efekt na signální přenos mezi elementy daného konstruktů. Tyto data naznačují, že spíše N-terminální palmitoylace $G_{11\alpha}$ proteinu hraje klíčovou roli v informačním přenosu z receptoru spřaženým s G-proteinem na G-protein než přímo aminokyselinové zbytky cysteinu, které jsou cílem pro lipidovou modifikaci. Také mutace vazebných míst pro $G\beta\gamma$ dimer v G-proteinové α podjednotce výrazně snížila L-fenylefrinem stimulovanou vazbu [^{35}S]GTP γ S. Avšak kombinace obou typů mutace α podjednotky (mutace palmitoylačních a vazebných míst pro $\beta\gamma$ komplex) již vazbu [^{35}S]GTP γ S v porovnání s předchozím mutantem nezměnila.

Tyto výsledky ukazují, že palmitoylační stav α_{1b} -adrenoreceptoru nereguluje aktivaci G-proteinu, zatímco palmitoylace $G_{11\alpha}$ proteinu hraje kromě role ve své membránové asociaci i klíčovou roli při své aktivaci receptorem.

Výsledky druhé části mé experimentální práce je možné jednoznačně uzavřít tak, že β -cyklodextrin ničí strukturu membránových domén. β -cyklodextrin vychytává cholesterol, který je pro doménu zásadní. Domény se tak rozpadají a již nejsou schopny flotovat na sacharózovém gradientu do oblastí s nízkou hustotou. Následně dochází v této oblasti hustotního gradientu i k poklesu v obsahu signálních molekul (trimerní G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$, markerový protein kaveol - caveolin-2), které jsou zde za normálních okolností, tedy za nepřítomnosti β -cyklodextrinu, lokalizovány.

Cílem třetí části dizertační práce bylo pomocí 2D elektroforézy rozlišit solubilní frakci $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů a stanovit časový průběh jejich solubilizace. Malé množství $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů jsme detekovali již v kontrolních hormonem neovlivněných buňkách. Stimulace hormonem TRH vedla k pomalému ale kontinuálnímu zvýšení intenzity i počtu imunoreaktivních signálů/skvrn těchto G-proteinů. Při delší agonistické expozici (více než 2 hod) jsme v solubilní frakci zaznamenali výrazný nárůst $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteinů. Maximálního stupně solubilizace G-proteinů jsme dosáhli po 16 hodinách hormonální stimulace. Jelikož solubilizace této třídy G-proteinů proběhla až za dlouhodobé stimulace hormonem, při vysoké koncentraci hormonu a v buňkách exprimujících vysoké množství příslušného receptoru, je možné říct, že $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ proteiny vykazují spíš pevnou vazbu na membránu. Mým úkolem rovněž bylo zvýšit reprodukovatelnost a kvalitu dělení bílkovin pomocí metody 2D elektroforézy. Toho bylo docíleno kromě drobných modifikací metody hlavně použitím vysoce kvalitních a čistých chemikálií a speciálních již manufakturně připravených immobilinových stripů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anderson, R. G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:199-225.
- Arthur, J. M., Collinsworth, G. P., Gettys, T. W. and Raymond, J. R. (1999) Agonist-induced translocation of Gq/11alpha immunoreactivity directly from plasma membrane in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 276(4 Pt 2):F528-34.
- Ashworth, R., Yu, R., Nelson, E. J., Dermer, S., Gershengorn, M. C. and Hinkle, P. M. (1995) Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 17;92(2):512-6.
- Awaji, T., Hirasawa, A., Kataoka, M., Shinoura, H., Nakayama, Y., Sugawara, T., Izumi, S. and Tsujimoto, G. (1998) Real-time optical monitoring of ligand-mediated internalization of alpha1b-adrenoceptor with green fluorescent protein. *Mol. Endocrinol.* 12(8):1099-111.
- Bae, H., Cabrera-Vera, T. M., Depree, K. M., Graber, S. G. and Hamm, H. E. (1999) Two amino acids within the alpha4 helix of Galphai1 mediate coupling with 5-hydroxytryptamine1B receptors. *J. Biol. Chem.* 274(21):14963-71.
- Baldwin, J. M. (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12:1693-703.
- Barnes, P. J. (1981) Radioligand binding studies of adrenergic receptors and their clinical relevance. *Br. Med. J. (Clin Res Ed).* 282(6271):1207-10.
- Bilek, R. (2000) TRH-like peptides in prostate gland and other tissues. *Physiol. Res.* 49, Suppl. 1:19-26.
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A. M. (1990) Receptor – effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 103:163-224.
- Black, J. W. (1976) Ahlquist and the development of beta-adrenoceptor antagonists. *Postgrad. Med. J.* 52 Suppl 4:11-3.
- Bourne, H. R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9(2):134-42.
- Bourne, H. R., Landis, C. A. and Masters, S. B. (1989) Hydrolysis of GTP by the α -chain of Gs and other GTP binding proteins. *Proteins* 6:222-30.
- Bouvier, M., Chidiac, P., Hebert, T. E., Loisel, T. P., Moffett, S. and Mouillac, B. (1995) Dynamic palmitoylation of G-protein-coupled receptors in eukaryotic cells.

- Methods Enzymol. 250:300-14.
- Bray, P., Carter, A., Simons, C., Guo, V., Puckett, C., Kamholz, J., Spiegel, A. and Nirenberg, M. (1986) Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83(23):8893-7.
- Brown, D. A. and London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 14:111-36.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R. and Hamm, H. E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. Endocr. Rev. 24(6):765-81.
- Cao, J., O'Donnell, D., Vu, H., Payza, K., Pou, C., Godbout, C., Jakob, A., Pelletier, M., Lembo, P., Ahmad, S. and Walker, P. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. J. Biol. Chem. 273:32281-7.
- Carrillo, J. J., Stevens, P. A. and Milligan, G. (2002) Measurement of agonist-dependent and -independent signal initiation of alpha(1b)-adrenoceptor mutants by direct analysis of guanine nucleotide exchange on the G protein alpha(11). J. Pharmacol. Exp. Ther. 302(3):1080-8.
- Cavalli, A., Lattion, A. L., Hummler, E., Nenniger, M., Pedrazzini, T., Aubert, J. F., Michel, M. C., Yang, M., Lembo, G., Vecchione, C., Mostardini, M., Schmidt, A., Beermann, F. and Cotecchia, S. (1997) Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94(21):11589-94.
- Claing, A., Perry, S. J., Achiriloaie, M., Walker, J. K., Albanesi, J. P., Lefkowitz, R. J. and Premont, R. T. (2000) Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:1119-24.
- Clapham, D. E. and Neer E. J. (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. Nature. 365(6445):403-6.
- Conklin, B. R. and Bourne, H. R. (1993) Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$, receptors and effectors. Cell. 73:631-41.
- Cook, L. B, Zhu, C. C. and Hinkle, P. M. (2003) Thyrotropin-releasing hormone receptor processing: role of ubiquitination and proteasomal degradation. Mol. Endocrinol. 17(9):1777-91.
- Cuatrecasas, P. (1974) Membrane receptors. Annu. Rev. Biochem. 43(0):169-214.

- 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.* 272:17858-66.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Strader, C. D. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature.* 321(6065):75-9.
- Dreja, K., Voldstedlund, M., Vinten, J., Tranum-Jensen, J., Hellstrand, P. and Sward, K. (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22(8):1267-72.
- Drmotá, T., Gould, G. W. and Milligan G. (1998a) Real time visualization of agonist-mediated redistribution and internalization of a green fluorescent protein-tagged form of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273(37):24000-8.
- Drmotá, 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):21699-707.
- Drmotá, 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):529-38.
- Duncan, J. A. and Gilman, A. G. (1996) Autoacylation of G protein alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 271(38):23594-600.
- Evanko, D. S., Thiyagarajan, M. M., Takida, S. and Wedegaertner, P. B. (2005) Loss of association between activated Galpha q and Gbetagamma disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cell. Signal.* 17(10):1218-28.
- Evanko, D. S., Thiyagarajan, M. M. and Wedegaertner, P. B. (2000) Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q). *J. Biol. Chem.* 275(2):1327-36.
- Evanko, D. S., Thiyagarajan, D. P., Siderovski, P. B. and Wedegaertner, J. (2001) Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and

- palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J. Biol. Chem.* 276(26):23945-53.
- Exner, T., Jensen, O. N., Mann, M., Kleuss, C. and Nurnberg, B. (1999) Posttranslational modification of Galphao1 generates Galphao3, an abundant G protein in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1327-32.
- Exton, J. H. (1994) Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6:226-9.
- Feng, G. J., Kellett, E., Scorer, C. A., Wilde, J., White, J.H. and Milligan, G. (2003) Selective interactions between helix VIII of the human mu-opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation. *J. Biol. Chem.* 278(35):33400-7.
- 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.* 272:17744-8.
- Fielding, C. J. and Fielding, P. E. (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationship. *Biochim. Biophys. Acta.* 1529:210-22.
- 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):5813-8.
- Fujimoto T. (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell. Biol.* 120(5):1147-57.
- Furuchi, T. and Anderson, R. G. (1998) Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* 273:21099-104.
- Galbiati, F., Guzzi, F., Magee, A. I., Milligan, G. and Parenti, M. (1994) N-terminal fatty acylation of the alpha-subunit of the G-protein Gi1: only the myristoylated protein is a substrate for palmitoylation. *Biochem. J.* 303(Pt 3):697-700.
- 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.* 274:5843-50.
- Gao, B., Gilman, A. G. and Robishaw, J. D. (1987) A second form of the β subunit of signal-transducing G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:6122-5.

- Garcia-Higuera, I., Gaitatzes, C., Smith, T. F. and Neer, E. J. (1998) Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein β subunit and Sec 13. *J. Biol. Chem.* 273:9041-9.
- Gershengorn, M. C. and Osman, R. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol. Rev.* 76(1):175-91.
- Gershengorn, M. C. and Osman, R. (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology.* 142(1):2-10.
- Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 21(1):90-113.
- Gilman, A. G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56:615-49.
- Gimpl, G., Burger, K. and Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochem.* 36:10959-74.
- Graber, S. G., Figler, R. A., Kalman-Maltese, V. K., Robishaw, J. D. and Garrison, J. C. (1992) Expression of functional G protein $\beta\gamma$ dimers of defined subunit composition using a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* 267:13123-6.
- Graul, R.C. and Sadee, W. (2001) Evolutionary relationships among G protein-coupled receptors using a clustered database approach. *AAPS PharmSci.* 3(2):E12.
- Green, J. M., Zhelesnyak, A., Chung, J., Lindberg, F. P., Sarfati, M., Frazier, W. A. and Brown, E. J. (1999) Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving $\alpha_v\beta_3$, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J. Cell. Biol.* 146:673-82.
- Goodman, O. B. Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature.* 383:447-50.
- Guzzi, F., Zanchetta, D., Chini, B. and Parenti, M. (2001) Thioacylation is required for targeting G-protein subunit G α_1 to detergent-insoluble caveolin-containing membrane domains. *Biochem. J.* 355(Pt 2):323-31.
- Hamm, H. E. (1991) Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11:563-78.
- Hamm, H. E. and Gilchrist, A. (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:189-96.
- Hanyaloglu, A. C., Seeber, R. M., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J. and Eidne, K. A. (2002) Homo- and hetero-oligomerization of thyrotropin-releasing hormone (TRH)

- receptor subtypes. Differential regulation of beta-arrestins 1 and 2. *J. Biol.* 277(52):50422-30.
- Haraguchi, K. and Rodbell, M. (1990) Isoproterenol stimulates shift of G proteins from plasma membrane to pinocytic vesicles in rat adipocytes: a possible means of signal dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1208-12.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E., Fong, S. L., Rao, J. K. and Argos, P. (1983) The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.* 9(4):235-44.
- Hawtin, S. R., Tobin, A. B., Patel, S. and Wheatley, M. (2001) Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J. Biol. Chem.* 276(41):38139-46.
- Hayashi, M. K. and Haga, T. (1997) Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. *Arch. Biochem. Biophys.* 340(2):376-82.
- Heding, A., Vrecl, M., Hanyaloglu, A. C., Sellar, R., Taylor, P. L. and Eidne, K. A. (2000) The rat gonadotropin-releasing hormone receptor internalizes via a beta-arrestin-independent, but dynamin-dependent, pathway: addition of a carboxyl-terminal tail confers beta-arrestin dependency. *Endocrinology.* 141:299-306.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J. and McNiven, M. A. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol.* 141:85-99.
- Hepler, J. R., Biddlecome, G. H., Kleuss, C., Camp, L. A., Hofmann, S. L., Ross, E. M, and Gilman, A. G. (1996) Functional importance of the amino terminus of Gq alpha. *J. Biol Chem.* 271(1):496-504.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-79.
- Hildebrandt, J. D. (1997) Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem. Pharmacol.* 54(3):325-39.
- Hirschman, J. E. and Jenness, D. D. (1999) Dual lipid modification of the yeast ggamma subunit Ste18p determines membrane localization of Gbetagamma. *Mol. Cell. Biol.* 19(11):7705-11.
- 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):7405-10.
- Hollinger, S. and Hepler, J. R. (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* 54(3):527-59.
- Hoon, M. A., Northup, J. K., Margolskee, R. F. and Ryba, N. J. (1995) Functional expression of the taste specific G-protein, alpha-gustducin. *Biochem. J.* 309(Pt 2):629-36.
- Hooper, N. M (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* 16(2):145-56.
- Horie, K., Itoh, H. and Tsujimoto, G. (1995) Hamster alpha 1B-adrenergic receptor directly activates Gs in the transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* 48(3):392-400.
- Horstmeyer, A., Cramer, H., Sauer, T., Muller-Esterl, W. and Schroeder, C. (1996) Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J. Biol. Chem.* 271(34):20811-9.
- Hsieh, K. P. and Martin T. F. (1992) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol. Endocrinol.* 6:1673-81.
- Huang, C., Duncan, J. A., Gilman, A. G. and Mumby, S. M. (1999) Persistent membrane association and depalmitoylated G protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14592-7.
- Huang, C., Hepler, J. R., Chen, L. T., Gilman, A. F., Anderson, R. G. and Mumby, S. M. (1997) Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* 8:2365-78.
- Hughes, T. E., Zhang, H., Logothetis, D. E. and Berlot, C. H. (2001) Visualization of a functional Galpha q-green fluorescent protein fusion in living cells. Association with the plasma membrane is disrupted by mutational activation and by elimination of palmitoylation sites, but not by activation mediated by receptors or AIF4-. *J. Biol. Chem.* 276(6):4227-35.
- Hurley, J. H. (1999) Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274:7599-602.
- Chamberlain, L. H. and Burgoyne, R. D. (1998) The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting.

- Biochem. J. 335 (Pt 2):205-9.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Gould, G. W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(10):5619-24.
- Charest, P. G. and Bouvier, M. (2003) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 278(42):41541-51.
- Chen, C. A. and Manning, D. R. (2001) Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene.* 20(13):1643-52.
- 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.* 91:11728-32.
- 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.* 93:14592-7.
- Ilangumaran, S. and Hoessli, D. C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335(Pt 2):433-40.
- Iniguez-Lluhi, J. A., Simon, M. I., Robishaw, J. D. and Gilman, A. G. (1992) G protein $\beta\gamma$ subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of γ . *J. Biol. Chem.* 267:23409-17.
- Itadani, H., Nakamura, T., Itoh, J., Iwaasa, H., Kanatani, A., Borkowski, J., Ihara M. and Ohta M. (1998) Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250(1):68-71.
- Ji, T. H., Grossmann, M. and Ji, I. (1998) G Protein-coupled Receptors. I. Diversity of Receptor-Ligand Interactions. *J. Biol. Chem.* 273:17299-302.
- Kalman, V. K., Erdman, R. A., Maltese, W. A. and Robishaw, J. D. (1995) Regions outside of the CAAX motif influence the specificity of prenylation of G protein γ subunits. *J. Biol. Chem.* 270:14835-41.
- Kawai, Y., Kobayashi, S. and Ohhashi, T. (1988) Existence of two types of postjunctional alpha-adrenoceptors in the isolated canine internal carotid artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66(5):655-9.
- Kennedy, M. E. and Limbird, L. E. (1993) Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein

- coupling. *J. Biol. Chem.* 268(11):8003-11.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270(29):17250-6.
- Kim, G. D., Carr, I. C., Anderson, L. A., Zabavnik, J., Eidne, K. A. and Milligan, G. (1994) The long isoform of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor down-regulates Gq proteins. *J. Biol. Chem.* 269(31):19933-40.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B. F. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.* 10(12):1347-68.
- Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T. and Shimonishi, Y. (1992) Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit. *Nature.* 359(6397):749-52.
- Konig, B., Arendt, A. McDowell, J. H., Kahlert, M., Hargrave, P. A. and Hofmann, K. P. (1989) Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6878-82.
- Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T. and Kaziro, Y. (1988) Isolation and characterization of the human Gs alpha gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(7):2081-5.
- 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):12736-43.
- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. and Lefkowitz (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* 272:5-8.
- Krupnick, J. G. and Benovic, J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:289-319.
- Lackey, D. B. (1992) Isolation and structural determination of a novel TRH-like tripeptide, pyroGly-Tyr-Pro amide, from alfalfa. *J. Biol. Chem.* 267:17508-11.
- Lai, R. K., Perez-Sala, D., Canada, F. J. and Rando, R. R. (1990) The gamma subunit of transducin is farnesylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(19):7673-7.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 379(6563):311-9.
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P. and Brown, T. G. Jr. (1967)

- Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*. 214(5088):597-8.
- Langer, S. Z. (1974) Selective metabolic pathways for noradrenaline in the peripheral and in the central nervous system. *Med Biol*. 52(6):372-83.
- Laporte S. A., Oakley R. H., Zhang J., Holt J. A., Ferguson S. S., Caron M. G. and Barak L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:3712-7.
- Lee, C. H., Katz, A. and Simon, M. I. (1995) Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor. *Mol. Pharmacol.* 47(2):218-23.
- Lefkowitz, R. J. (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25(8):413-22.
- 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.* 270:15693-701.
- Linder, M. E., Middleton, P., Hepler, J. R., Taussig, R., Gilman, A. G. and Mumby, S. M. (1993) Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(8):3675-9.
- Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R. and Rodriguez-Boulan, E. (1988) Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:9557-61.
- Liu, S., Carrillo, J. J., Padiani, J. D. and Milligan, G. (2002) Effective information transfer from the alpha 1b-adrenoceptor to Galpha 11 requires both beta/gamma interactions and an aromatic group four amino acids from the C terminus of the G protein. *J. Biol. Chem.* 277(28):25707-14.
- Loisel, T. P., Adam, L., Hebert, T. E. and Bouvier, M. (1996) Agonist stimulation increases the turnover rate of beta 2AR-bound palmitate and promotes receptor depalmitoylation. *Biochemistry*. 35(49):15923-32.
- Lomasney, J. W., Leeb-Lundberg, L. M., Cotecchia, S., Regan, J. W., DeBernardis, J. F., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1986) Mammalian alpha 1-adrenergic receptor. Purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J. Biol. Chem.* 261(17):7710-6.
- Lopez-Gimenez, J. F., Canals, M., Padiani, J. D. and Milligan, G. (2007) The alpha 1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is

- required for receptor maturation, surface delivery and function. *Mol. Pharmacol.* 71(4):1015-29.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-75.
- Lynch, C. J., Morbach, L., Blackmore, P. F. and Exton, J. H. (1986) Alpha-subunits of Ns are released from the plasma membrane following cholera toxin activation. *FEBS Lett.* 200:333-6.
- 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.
- Matre, V., Høvring, P. I., Ørstavik, S., Frengen, E., Rian, E., Velickovic, Z., Murra-McIntosh, R. P. and Gautvik, K. M. (1999) Structural and Functional Organization of the Gene Encoding the Human Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor. *J. Neurochem.* 72(1):40-50.
- Matveev, S. V. and Smart, E. J. (2002) Heterologous desensitization of EGF receptors and PDGF receptors by sequestration in caveolae. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282(4):935-46.
- McCallum, J. F., Wise, A., Grassie, M. A., Magee, A. I., Guzzi, F., Parenti, M. and Milligan, G. (1995) The role of palmitoylation of the guanine nucleotide binding protein G_{11α} in defining interaction with the plasma membrane. *Biochem. J.* 310:1021-7.
- McIntire, W. E., MacCleery, G. and Garrison, J. C. (2001) The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 276(19):15801-9.
- Michel, M. C., Kenny, B. and Schwinn, D. A. (1995) Classification of alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 352(1):1-10.
- Milligan, G. (2002) The use of receptor G-protein fusion proteins for the study of ligand activity. *Receptors Channels.* 8(5-6):309-17.
- Milligan, G., Feng, G. J., Ward, R. J., Sartania, N., Ramsay, D., McLean, A. J. and

- Carrillo, J. J. (2004a) G protein-coupled receptor fusion proteins in drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* 10(17):1989-2001.
- Milligan, G. and Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1:46-55.
- Milligan, G., Marshall, F. and Rees, S. (1996) G16 as universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies, *Trends Pharmacol. Sci.* 17:235-7 .
- Milligan, G., Padiani, J. D., Canals, M. and Lopez-Gimenez, J. F. (2006) Oligomeric structure of the alpha1b-adrenoceptor: comparisons with rhodopsin. *Vision Res.* 46(27):4434-41.
- Milligan, G., Padiani, J., Fidock, M. and Lopez-Gimenez, J. F. (2004b) Dimerization of alpha1-adrenoceptors. *Biochem. Soc. Trans.* 32(Pt 5):847-50.
- Mineo, C. and Anderson, R. G. (2001) Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. *Histochem. Cell. Biol.* 116(2):109-18.
- Mitchell, F. M., Mullaney, I., Godfrey, P. P., Arkinstall, S. J., Wakelam, M. J. O. and Milligan, G. (1991) Widespread distribution of Gq alpha/G11 alpha detected immunologically by an antipeptide antiserum directed against the predicted C-terminal decapeptide. *FEBS Lett.* 287(1-2):171-4.
- 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):349-56.
- Moffett, S., Rousseau, G., Lagace, M. and Bouvier, M. (2001) The palmitoylation state of the beta(2)-adrenergic receptor regulates the synergistic action of cyclic AMP-dependent protein kinase and beta-adrenergic receptor kinase involved in its phosphorylation and desensitization. *J. Neurochem.* 76(1):269-79.
- Moller, S., Vilo, J. and Croning, D. R. (2001) Prediction of the coupling specificity of G protein coupled receptors to their G proteins. *Bioinformatics.* Vol. 17 Suppl. 1:174-81.
- Moro, O., Lamah, J., Hogger, P. and Sadee, W. (1993) Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *J. Biol. Chem.* 268:22273-6.
- Moro, O., Shockley, M. S., Lamah, M. S. and Sadee, W. (1994) Overlapping multi-site domains of the muscarinic cholinergic Hm1 receptor involved in signal transduction and sequestration. *J. Biol. Chem.* 269:6651-5.
- Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999) Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiol. Rev.* Vol. 79:1373-430.

- Morrison, D. F., O'Brien, P. J. and Pepperberg, D. R. (1991) Depalmitoylation with hydroxylamine alters the functional properties of rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 266(30):20118-23.
- Mullaney I., Mitchell F. M., McCallum J. F., Buckley N. J. and Milligan G. (1993) The human muscarinic M1 acetylcholine receptor, when expressed in CHO cells, activates and downregulates both Gq alpha and G11 alpha equally and non-selectively. *FEBS Lett.* 324(2):241-5.
- Mumby, S.M. (1997) Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:148-54.
- Mumby, S. M., Casey, P. J., Gilman, A. G., Gutowski, S. and Sternweis, P. C. (1990a) G protein gamma subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(15):5873-7.
- Mumby, S. M., Heukeroth, R. O., Gordon, J. I. and Gilman, A. G. (1990b) G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(2):728-32.
- Mumby, S. M., Kleuss, C. and Gilman, A. G. (1994) Receptor regulation of G-protein palmitoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(7):2800-4.
- Munshi, U. M., Peegel, H. and Menon, K. M. (2001) Palmitoylation of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor regulates receptor interaction with the arrestin-mediated internalization pathway. *Eur. J. Biochem.* 268(6):1631-9.
- Murthy, K. S. and Makhlof, G. M. (2000) Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. *J. Biol. Chem.* 275(39):30211-9.
- Nathans, J. and Hogness, D. S. (1984) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81(15):4851-5.
- Neer, E. J. (1994) G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* 3(1):3-14.
- Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell.* 80:249-57.
- 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):2364-9.
- Neubig, R. R. (1994) Membrane organization in G protein mechanisms. *FASEB J.* 8:939-46.

- Nichols B. J. and Lippincott-Schwartz, J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell. Biol.* 11(10):406-12.
- Novotny, J. and Svoboda P. (1998) The long (Gs(alpha)-L) and short (Gs(alpha)-S) variants of the stimulatory guanine nucleotide-binding protein. Do they behave in an identical way? *J. Mol. Endocrinol.* 20:163-73.
- Novotny, J., Durchankova D., Ward, R. J., Carillo, J. J., Svoboda P and Milligan G. (2006) Functional interactions between the alpha1b-adrenoceptor and Galpha11 are compromised by de-palmitoylation of the G protein but not of the receptor. *Cell. Signal.* 18(8):1244-51.
- O'Dowd, B. F., Lee, D. K., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., Wang, B., Gershengorn, M. C. and George, S. R. (2000) TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *J. Mol. Endocrinol.* 14:183-93.
- Oh, P., McIntosh, D. P. and Schnitzer, J. E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell. Biol.* 141:101-14.
- 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):685-98.
- Ohkubo S., Kotani, A. and Nakahata, N. Lipid raft domains in NG108-15 cells; the role in P2Y₂ receptor-mediated intracellular Ca²⁺ mobilization. XIVth World Congress of Pharmacology. San Francisco (USA). July 7-12, 2002.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P. and Slotte, J. P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid. Res.* 41:66-97.
- Okamoto, Y., Ninomiya, H., Tanioka, M., Sakamoto, A., Miwa, S. and Masaki T. (1997) Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J. Biol. Chem.* 272(34):21589-96.
- Oliveira, L., Paiva, A. C. and Vriend, G. (1999) A low resolution model for the interaction of G proteins with G protein-coupled receptors. *Protein. Eng.* 12(12):1087-95.
- Orlandi, P. A. and Fishman, P. H. (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell. Biol.* 141:905-15.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le

- Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 289(5480):739-45.
- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H. and Stralfors, P. (2001) Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol Chem*. 276(13):9670-8.
- Pesanova, Y., 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*. 24;464(1-2):35-40.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. and Bouvier M. (2001) Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J. Biol. Chem*. 276(6):4416-23.
- Peyron, P., Bordier, C., N'Diaye, E. N. and Maridonneau-Parini, I. (2000) Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Immunol*. 165:5186-91.
- Piasecik, M. T., Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., Guarino, R. D., Hadley, R. W. and Brown, R. D. (1997) Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 283(2):854-68.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 3:639-50.
- Pike, L. J. and Miller, J. M. (1998) Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem*. 273(35):22298-304.
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem*. 67:653-92.
- Pitcher, J. A., Payne, E. S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A. A. and Lefkowitz R. J. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 92:8343-7.

- Ponimaskin, E., Behn, H., Adarichev, V., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Offermanns, S. and Schmidt, M. F. (2000) Acylation of G α 13 is important for its interaction with thrombin receptor, transforming activity and actin stress fiber formation. *FEBS Lett.* 478(1-2):173-7.
- Ponimaskin, E., Harteneck, C., Schultz, G. and Schmidt, M. F. (1998) A cysteine-11 to serine mutant of G α 12 impairs activation through the thrombin receptor. *FEBS Lett.* 429(3):370-4.
- Puri, V., Watanabe, R., Singh, R. D., Dominguez, M., Brown, J. C., Wheatley, C. L., Marks, D. L. and Pagano, R. E. (2001) Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J. Cell. Biol.* 154:535-47.
- Qanbar, R. and Bouvier, M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* 97(1):1-33.
- Ramagli, L.S. (1999) Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. *Methods Mol. Biol.* 112:99-103.
- Ramagli, L. S., and Rodriguez, L. V. (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6:559-563.
- 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):7900-3.
- Rebecchi, M. J. and Pentylala, S. N. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80(4):1291-335.
- Resh, M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1451:1-16.
- Rhee, S. G. and Choi, K. D. (1992) Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 26:36-61.
- Robishaw, J. D., Smigel, M. D. and Gilman, A. G. (1986) Molecular basis for two forms of the G protein that stimulates adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 261(21):9587-90.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. and Krans, H. M. (1971) The glucagon-sensitive adeny cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* 246:1877-82.
- Roettger, B. F., Rentsch, R. U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J. M. and Miller,

- L. J. (1995) Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* 128:1029-41.
- Rondard, P., Iiri, T., Srinivasan, S., Meng, E., Fujita, T. and Bourne, H. R. (2001) Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma: a model for receptor activation? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(11):6150-5.
- Ross, E.M. (1995) Protein modification. Palmitoylation in G-protein signaling pathways. *Curr. Biol.* 5(2):107-9.
- Roth, A. F., Sullivan, D. M. and Davis, N.G. (1998) A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *J. Cell. Biol.* 142(4):949-61.
- 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.* 275:41447-57.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti M. P. (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 122(4):789-807.
- Scott, M. G., Benmerah, A., Muntaner, O. and Marullo, S. (2002) Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J. Biol. Chem.*, 277:3552-9.
- Sellar, R. E., Taylor, P. L., Lamb, R. F., Zabavnik, J., Anderson, L. and Eidne, K. A. (1993) Functional expression and molecular characterization of the thyrotrophin-releasing hormone receptor from the rat anterior pituitary gland. *J. Mol. Endocrinol.* 10(2):199-206.
- Sharma, P., Sabharanjak, S. and Mayor, S. (2002) Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 13(3):205-14.
- Shaul, P. W. and Anderson, R. G. (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* 275:843-51.
- Sheets, E. D., Holowka, D. and Baird, B. (1999) Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcepsilonRI and their association with detergent-resistant membranes. *J. Cell. Biol.* 145:877-87.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 294(5545):1307-13.

- Schroeder, R., London, E and Brown, D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:12130-4.
- Schwindinger, W. F. and Robishaw, J. D. (2001) Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene*. 20(13):1653-60.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. and Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. 252:802-808.
- Simonds, W. F. (1999) G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Biochem. Sci.* 20:66-73.
- Simons, K. and Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110:597-603.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569-72.
- Simons, K. and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science*. 290(5497):1721-6.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts as signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 1:31-9.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-31.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T. and Lisanti, M. P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19:7289-304.
- Sohn, J. T., Ding, X., McCune, D. F., Perez, D. M. and Murray, P. A. (2005) Fentanyl attenuates alpha1B-adrenoceptor-mediated pulmonary artery contraction. *Anesthesiology*. 103(2):327-34.
- Sooksawate, T. and Simmonds, M. A. (2001) Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Neuropharmacol.* 40:178-84.
- Spring, D. J. and Neer, E. J. (1994) A 14-amino acid region of the G protein γ subunit is sufficient to confer selectivity of γ binding to the β subunit. *J. Biol. Chem.* 269:22882-6.
- Sternweis, P. C., Smrcka, A. V. and Gutowski, S. (1992) Hormone signalling via G-protein: regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by Gq. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 336:35-41; discussion 41-2.

- Stevens, P. A., Pediani, J., Carrillo, J. J. and Milligan, G. (2001) Coordinated agonist regulation of receptor and G protein palmitoylation and functional rescue of palmitoylation-deficient mutants of the G protein G11alpha following fusion to the alpha1b-adrenoreceptor: palmitoylation of G11alpha is not required for interaction with beta*gamma complex. *J. Biol. Chem.* 276(38):35883-90.
- Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Stockinger, H., Horejsi, V. and Waldhausl, W. (1997) Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* 272(31):19242-7.
- Svoboda, P. (1997) Membránové receptory a trimerní GTP vazebné proteiny. *Fyziologický ústav AVČR.* 40-42.
- 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.* 224:455-62.
- 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):646-55.
- Svoboda, P. and Novotny, J. (2002) Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59(3):501-12.
- Takahashi, S., Negishi, M. and Ichikawa, A. (1991) Cytosol promotes the guanine nucleotide-induced release of the alpha subunit of Gi2 from the membrane of mouse mastocytoma P-815 cells. *J. Biol. Chem.* 266(9):5367-70.
- Tabas, I. (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* 110:905-11.
- Tall, A. R., Costet, P. and Wang, N. (2002) Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J. Clin. Invest.* 110:899-904.
- Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J. A. and Gilman, A.G. (1993) Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science*, 261:218-21.
- Taylor, J. M., Jacob-Mosier, G. G., Lawton, R. G., Remmers, A. E. and Neubig, R. R. (1994) Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. *J. Biol. Chem.* 269(44):27618-24.
- Tesmer, J. J. G., Sunahara, R. K., Gilman, A. G. and Sprang, S. R. (1997) Crystal structure

- of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science*. 278(5345):1907-16.
- Tetsuka, M., Saito, Y., Imai, K., Doi, H. and Maruyama, K. (2004) The basic residues in the membrane-proximal C-terminal tail of the rat melanin-concentrating hormone receptor 1 are required for receptor function. *Endocrinology*. 145(8):3712-23.
- Toker A. (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10(2):254-61.
- Tsao, P. and von Zastrow, M. (2000) Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10(3):365-9.
- Ueda, N., Iniguez-Lluhi, J. A., Lee, E., Smrcka, A. V., Robishaw, J. D. and Gilman, A. G. (1994) G protein $\beta\gamma$ subunits. Simplified purification and properties of novel isoforms. *J. Biol. Chem.* 269:4388-95.
- Ugur, O., Onaran, H. O. and Jones, T. L. (2003) Partial rescue of functional interactions of a nonpalmitoylated mutant of the G-protein G α s by fusion to the beta-adrenergic receptor. *Biochemistry*. 42(9):2607-15.
- Umemori, H., Inoue, T., Kume, S., Sekiyama, N., Nagao, M., Itoh, H., Nakanishi, S., Mikoshiba, K. and Yamamoto, T. (1997) Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the alpha subunit. *Science*. 276(5320):1878-81.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. and Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3 – kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Cell. Biol.* 22:267-72.
- Watson, A. J., Katz, A. and Simon, M. I. (1994) A fifth member of the mammalian G-protein β -subunit family. Expression in brain and activation of the β_2 isotype of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 269:22150-6.
- Wedegaertner, P. B. (1998) Lipid modifications and membrane targeting of G α . *Biol. Signals Recept.* 7(2):125-35.
- Wedegaertner, P. B. and Bourne, H. R. (1994) Activation and depalmitoylation of G α . *Cell*. 77(7):1063-70.
- Wedegaertner, P. B., Chu, D. H., Wilson, P. T., Levis, M. J. and Bourne, H. R. (1993) Palmitoylation is required for signaling functions and membrane attachment of Gq α and Gs α . *J. Biol. Chem.* 268(33):25001-8.
- Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T. and Bourne, H. R. (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270(2):503-6.

- Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11(5):346-54.
- Wess, J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* 80(3):231-64.
- White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. and Marshall, F. H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature.* 396(6712):679-82.
- Willems, E. W., Trion, M., De Vries, P., Heiligers, J. P., Villalon, C. M. and Saxena, P. R. (1999) Pharmacological evidence that alpha1-and alpha2-adrenoceptors mediate vasoconstriction of carotid arteriovenous anastomoses in anaesthetized pigs. *Br. J. Pharmacol.* 127(5):1263-71.
- Willems, E. W., Valdivia, L. F., Villalon, C. M. and Saxena, P. R. (2003) Possible role of alpha-adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy. *Cephalalgia.* 23(4):245-57.
- 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):257-60.
- Wolf, A. A., Fujinaga, Y. and Lencer, W. I. (2002) Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and down-stream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* 277:16249-56.
- Wu, D. Q., Lee, C. H., Rhee, S. G. and Simon, M. I. (1992) Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J. Biol. Chem.* 267(3):1811-7.
- Yajima, Y., Akita, Y., Katada, T. and Saito, T. (1993) Somatostatin induces release of the alpha subunits of pertussis toxin-sensitive G proteins in native membranes and in intact GH4C1 rat pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 92(2):143-52.
- Yajima, Y., Akita, Y., Saito, T. and Kawashima, S. (1998) VIP induces the translocation and degradation of the alpha subunit of Gs protein in rat pituitary GH4C1 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 123(6):1024-30.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., Jr. and Ishikawa, Y. (1998) Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273:26962-8.

- Yan, S. Z., Huang, Z.-H., Rao, V. D., Hurley, J. H. and Tang, W. J. (1997) Three discrete regions of mammalian adenylyl cyclase form a site for G α activation. *J. Biol. Chem.* 272(30):18849-54.
- Yang, S., Zhang, L. and Huang, Y. (2001) Membrane association and conformational change of palmitoylated G(o) α . *FEBS Lett.* 498(1):76-81.
- Yu, R. and Hinkle, P. M. (1999) Signal transduction and hormone-dependent internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor in cells lacking G α_q and G α_{11} . *J. Biol. Chem.* 274:15745-50.
- Zor, T. and Selinger, Z. (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 236:302-8.

PŘÍLOHA - PUBLIKACE

Souhlasím se zapůjčením této práce pro studijní účely a prosím o řádnou evidenci vypůjčovateli.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Datum navrácení

