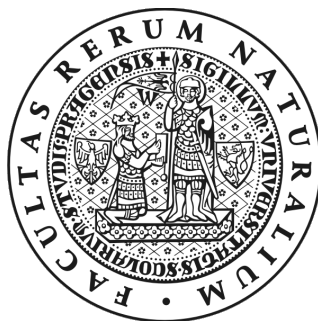


**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



Michaela Dvořáková

**Vliv heterodimerizace sestřihových variant metabotropního glutamátového  
receptoru 1a a 1b na nitrobuněčnou distribuci receptorových komplexů**

*The influence of heterodimerization of splicing variants of metabotropic glutamate receptor  
1a and 1b on the intracellular distribution of receptor complexes*

Bakalářská práce

Školitel: Doc. MUDr. Jaroslav Blahoš, Ph.D.

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. MUDr. Jaroslava Blahoše, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, 28. května 2012

.....

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli, MUDr. Jaroslavu Blahošovi, Ph. D., že mi umožnil podílet se na velmi zajímavém projektu, děkuji také vedoucímu své bakalářské práce, Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., za cenné rady. Děkuji Mgr. Aleně Hájkové za její trpělivost, a také celému kolektivu laboratoře za příjemné pracovní prostředí. Poděkování patří v neposlední řadě i mé rodině, za neustálou podporu.

Tato práce vznikla na oddělení Molekulární farmakologie Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky v Praze. Byla finančně podpořena granty GAČR 303/08/1591 a GAČR P303/12/2408.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt	8
Abstract	9
1 Úvod	10
1.1 Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs)	10
1.2 Heterotrimerní G-proteiny	10
1.3 Struktura a mechanismus aktivace receptorů spřažených s G-proteiny	11
1.3.1 C-koncová doména receptorů spřažených s G-proteiny	12
1.4 Rozdělení receptorů spřažených s G-proteiny	13
1.5 Metabotropní glutamátové receptory	13
1.5.1 Struktura metabotropních glutamátových receptorů	14
1.5.2 Skupina I mGlu receptorů	16
1.5.3 Skupiny II a III mGlu receptorů	17
1.5.4 Dimerizace metabotropních glutamátových receptorů	17
1.5.5 Metabotropní glutamátový receptor 1	18
1.5.5.1 Intracelulární distribuce mGlu1 receptoru	20
2 Cíl práce	22
3 Materiál	23
3.1 Chemikálie	23
3.2 Pufry, média a roztoky	24
3.3 Gely pro SDS-PAGE	25
3.4 Buněčné linie	25
3.5 DNA	25
3.6 Protilátky	26
3.7 Biologický materiál	26
3.8 Přístroje	26
3.9 Ostatní materiál a vybavení	27
4 Metody	28
4.1 Udržování buněčných linií a manipulace s nimi	28
4.1.1 Pasáž buněk HEK293	28
4.1.2 Transfekce buněk HEK293 chloridem vápenatým	28

4.2	Sedimentační frakcionace buněčných částí potkaního mozku .....	29
4.3	Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant blue R250 .....	31
4.4	Přenos a imunochemická detekce proteinů po SDS-PAGE (Western blot) .....	31
4.4.1	Příprava proteinových vzorků pro Western blot .....	31
4.4.2	SDS-PAGE.....	31
4.4.3	Imunoblot .....	32
5	Výsledky.....	33
5.1	Charakterizace protilátek .....	33
5.2	Distribuce heterodimerních a homodimerních receptorů v jednotlivých buněčných segmentech mozku .....	34
6	Diskuze .....	38
7	Závěr.....	40
8	Seznam použité literatury .....	41

## Seznam použitých zkratek

% obj.	objemová procenta
7TM (=HD)	transmembránová doména složená ze sedmi $\alpha$ -helixů
AMK	aminokyselina
APS	peroxodisíran amonný
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CaSR	receptor pro vápník (z anglického „Calcium sensing receptor“)
C-konec/C-koncová doména	část polypeptidového řetězce zakončená karboxylovou skupinou
CNS	centrální nervová soustava
COPI	proteinový komplex endoplazmatického retikula (z anglického „coat protein complex I“)
CRD	doména bohatá na cystein (z anglického „cysteine-rich domain“)
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMEM	médium pro kultivaci buněk „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
FBS	fetální hovězí sérum
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná (z anglického „ $\gamma$ -aminobutyric acid“)
GDP	guanosindifosfát
GFP	zelený fluorescenční protein (z anglického „green fluorescent protein“)
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny (z anglického „G-protein coupled receptors“)
G-protein	protein vázající guanosin di(tri)fosfát
GTP	guanosintrifosfát
HA	hemaglutinin
HD (=7TM)	heptahelikální doména
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk (z anglického „human embryonic kidney cells“)
HRP	křenová peroxidasa (z anglického „horseradish peroxidase“)

IgG	imunoglobulin G
IP	inhibitory proteas
IP <sub>3</sub>	inositoltrifosfát
LTD	snížení účinnosti synaptického přenosu, prvek synaptické plasticity (z anglického „long-term depression“)
M	molární (mol/l)
MAPK	proteinkinasa aktivovaná mitogeny (z anglického „mitogen-activated protein kinase“)
mGlu	metabotropní glutamátový
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
mRNA	mediátorová RNA
N-konec/ N-koncová doména	část polypeptidového řetězce zakončená aminoskupinou
PBP	bakteriální periplazmatický protein
PBS	fosfátový pufr (z anglického „phosphate buffered saline“)
PBST	PBS-Tween
PDZ	doména rozpoznávající specifickou sekvenci (z anglického „PSD95-disc large-zona occludens“)
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (z anglického „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“)
TB	vzorkový pufr (z anglického „treatment buffer“)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin
tkH <sub>2</sub> O	voda pro tkáňové kultury
TM I-VII	transmembránový segment I-VII
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VFD	„Venus Flytrap“ doména (extracelulární N-koncová doména)

## Abstrakt

L-glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem v centrální nervové soustavě (CNS) obratlovců, který může zprostředkovat synaptický přenos skrze ionotropní receptory nebo jej ovlivňovat prostřednictvím aktivace metabotropních glutamátových receptorů (mGlu receptory). Glutamátové receptory jsou jako přenašeče signálů v mozku nepostradatelné.

Hlavní úlohou metabotropních glutamátových receptorů je zprostředkování pomalých excitačních a inhibičních odpovědí prostřednictvím aktivace druhých posílů a regulace vápníkových a draslíkových kanálů. Glutamatergní nervový přenos má vliv na synaptickou plasticitu, různé typy paměti, učení, motorickou koordinaci<sup>1</sup> a neuronální vývoj<sup>2</sup>. Na druhou stranu je však glutamát spojen s excitotoxicitou, která je jednou z příčin patogenity některých chronických neurodegenerativních chorob jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova nemoc. Metabotropní glutamátové receptory mohou být terapeutickými cíli pro léčbu psychiatrických a neurologických onemocnění<sup>3-4</sup>.

Cílený transport membránových receptorů do různých částí neuronů podmiňuje neuronální polaritu a má tudíž nezanedbatelný vliv na přijímání a přenos extracelulárních signálů.

Tato práce se zabývá skladbou metabotropního glutamátového receptoru 1, konkrétně potvrzuje heterodimerizaci sestřihových variant mGluR1a a mGluR1b ve funkční komplexu (mGluR1a+mGluR1b), které jsou v potkaním mozku transportovány do synapsí podobně jako homodimerní mGlu receptory složené ze dvou identických variant (mGluR1a+mGluR1a).

**Klíčová slova:** C-koncová doména, dimerizace, imunoblot, receptorový komplex, receptory spřažené s G-proteinem, sedimentační frakcionace, synaptosomy.



## **Abstract**

L-glutamate is a major excitatory neurotransmitter in vertebrate central nervous system. L-glutamate enables synaptic transmission through ionotropic and metabotropic glutamate receptors. These receptors are indispensable in the brain.

The main role of metabotropic glutamate receptors is to mediate slow excitatory and inhibitory responses by activation of intracellular messengers and to regulate cationic channels.

Metabotropic glutamate receptors are involved in synaptic plasticity, different types of memory, learning, motoric coordination<sup>1</sup> and neural development<sup>2</sup>. On the other hand excitotoxicity of glutamate is often associated with neurodegenerative processes such as Alzheimer, Huntington and Parkinson disease.

Metabotropic glutamate receptors are promising therapeutic targets for a treatment of psychiatric and neurological diseases<sup>3-4</sup>.

Targeted trafficking of metabotropic glutamate receptors to distinct parts of neurons is influenced by neuronal polarity and thus regulates sensing and transmission of extracellular signals. Newly detected heterodimeric receptors might be trafficked in a different way than homodimers and therefore our knowledge of molecular pathways of these complexes could help us with subsequent drug targeting.

This work confirms heterodimerization of metabotropic glutamate receptor 1 into functional complexes (mGluR1a+mGluR1b). Furthermore it sheds more light on how both heterodimeric and homodimeric receptors (mGluR1a+mGluR1a) are trafficked to synapses.

**Key words:** C-terminal domain, dimerization, G-protein coupled receptors, gradient centrifugation, receptor complex, synaptosomes, Western blot.

# 1 Úvod

## 1.1 Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs)

Receptory spřažené s G-proteiny se v literatuře většinou označují jako GPCRs (z anglického „G-protein coupled receptors“). Jsou zapojeny do rozpoznávání a přenosu rozličných signálů od neuropřenašečů odvozených od aminokyselin (mGlu receptory, GABA<sub>B</sub> receptory) přes ionty (receptor pro vápník), chuťové vjemy (receptory pro sladkou a umami chuť), feromony, odoranty a fotony<sup>5</sup>. Podílejí se tak na vnímání okolí, intermediárním metabolismu, buněčném růstu, proliferaci a diferenciaci různých typů buněk. Mají vliv také na reprodukci a neuroendokrinní kontrolu fyziologické homeostázy.

Reprezentují největší skupinu membránových proteinů v lidském genomu, jsou kódovány geny, které představují více než 1 % celkového genomu<sup>6</sup>.

Fungují jako ligandem aktivované výměnné faktory pro heterotrimerní G-proteiny vázající guaninový nukleotid. G-proteiny poté přenáší signál dále do buňky modulací aktivity enzymů a iontových kanálů.

Přestože jde o skupinu receptorů skládající se z několika genových rodin, signalizace pomocí receptorů spřažených s G-proteiny má několik obecných prvků:

1. Receptor složený ze sedmi domén procházejících membránou;
2. Spojení s trimerním G-proteinem, který slouží jako výše popsany mediátor aktivace receptoru na nitrobuněčné signální kaskády;
3. Efektorový protein lokalizovaný nitrobuněčně, nebo ukotvený v buněčné membráně;
4. Zpětnovazebnou regulaci a desenzitizaci signální kaskády.

Signalizace receptorů spřažených s G-proteiny zahrnují také na G-proteinu nezávislé způsoby přenosu signálu<sup>5</sup>.

## 1.2 Heterotrimerní G-proteiny

Heterotrimerní G-proteiny jsou skupinou GTPas se společnou podjednotkovou strukturou. Skládají se z  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek. Podjednotka  $\alpha$  má vnitřní GTPasovou aktivitu a je v neaktivním stavu nekovalentně spojena s heterodimerní podjednotkou  $\beta\gamma$ .

Pokud je G-protein neaktivní, je na jeho  $\alpha$  podjednotku vázán GDP. Aktivace způsobí výměnu GDP za GTP. Vazba GTP na  $\alpha$ -podjednotku umožňuje její disociaci od  $\beta\gamma$ -dimeru. Hydrolyza GTP zpět na GDP způsobí inaktivaci G-proteinu.

$\alpha$ -podjednotky G-proteinů lze rozdělit dle sekvenční homologie do čtyř rodin.

$G\alpha_s$  rodina obsahuje  $\alpha$ -podjednotku stimulující adenylátcyklastu.

$G\alpha_i$  rodina zahrnuje  $\alpha$ -podjednotku inhibující adenylátcyklasu, chuťovou  $\alpha$ -podjednotku a další.

Do rodiny  $G\alpha_q$  patří dvě  $\alpha$ -podjednotky regulující aktivitu fosfolipasy C (PLC) a další (viz obr. 2 na straně 16).

Poslední rodina,  $G\alpha_{12}$ , ovlivňuje regulaci skládání cytoskeletu.

Dále je známo 5 různých  $G\beta$  podjednotek a 12 podjednotek  $G\gamma^7$ .

### **1.3 Struktura a mechanismus aktivace receptorů spřažených s G-proteiny**

Receptory spřažené s G-proteiny se skládají z extracelulární N-koncové domény následované heptahelikální doménou (HD, viz obr. 1 na straně 14) sestávající se ze sedmi transmembránových  $\alpha$ -helixů (TMI-VII) spojených třemi extracelulárními a třemi cytosolárními kličkami, a intracelulární C-koncové domény. V interakci s trimerním G-proteinem jsou zapojeny intracelulární kličky a C-koncový segment (C4)<sup>8</sup>.

Transmembránovou doménu těchto receptorů tvoří převážně hydrofobní aminokyseliny, jež zauímají  $\alpha$ -helikální konformace, které umožňují ukotvení proteinu v hydrofobním jádru plazmatické membrány<sup>8</sup>.

Aktivace receptorů spřažených s G-proteiny je způsobena navázáním ligandu (agonisty) do vazebného místa receptoru. Tato vazba vyvolává konformační změnu v HD receptoru<sup>9</sup>, například v rhodopsinu se mění prostorová orientace TM-III a TM-VI. Tato změna odkrývá vazebné místo pro G-protein, který je následně aktivován<sup>10</sup>. Místa pro vazbu agonisty se u různých receptorů liší. Retinal, chromofor rhodopsinu, se například váže do mezery mezi helixy receptoru v úrovni membrány. Tuto strategii využívají i biogenní aminy.

Jiní agonisté, např. některé peptidy, se váží na extracelulární kličky receptoru. Některé receptory, mezi které patří také metabotropní glutamátové receptory studované v této práci, mají pro vazbu agonisty vytvořené speciální vazebné místo v N-koncové doméně.

Pro regulaci transportu receptorů v buňkách a pro interakce s asociovanými proteiny je velmi důležitá zejména C-koncová doména GPCRs, která je podrobněji popsána v následující kapitole.

### 1.3.1 C-koncová doména receptorů spřažených s G-proteiny

C-koncová sekvence GPCRs obsahuje domény významné nejen pro signalizaci, ale také pro interakce s cytoskeletárními a jinými intracelulárními proteiny.

Receptory *in vivo* fungují v rámci sítě bílkovin, jež se nově nazývá signalozom. Tyto proteiny se podílejí na cíleném transportu receptorů do specifických buněčných segmentů, na shlukování receptorů s různými efektorovými proteiny, jejich regulaci (desensitizace, internalizace), a také ovlivňují funkce GPCRs ve smyslu allosterické modulace<sup>11</sup>.

Mnoho receptorů spřažených s G-proteiny má ve svém C-konci sekvenci, která je rozpoznávána PDZ doménou interagujících proteinů. Mezi proteiny s PDZ doménou patří například protein Shank, který organizuje prostorové uspořádání metabotropních a ionotropních glutamátových receptorů na postsynaptické membráně neuronů a zprostředkovává spojení mezi receptory vázanými v membráně a cytoskeletem<sup>12</sup>.

S C-koncovou doménou receptorů spřažených s G-proteiny interagují ale i další proteiny, které PDZ doménu nemají. Tyto proteiny taktéž kontrolují lokalizaci a pozměňují funkce GPCRs. Metabotropní glutamátový receptor 7<sup>13</sup> a receptor pro vápník (CaSR)<sup>14</sup> například interagují s cytoskeletárním proteinem filaminem A.

Interakce C-konci se může uskutečnit i mezi dvěma transmembránovými proteiny, jako je tomu například u heterodimerizujících receptorů GABA<sub>B1</sub> a GABA<sub>B2</sub><sup>15</sup>.

Význam C-koncové domény pro komplexní signalizaci GPCRs je značný, tudíž musí být tato doména regulována. Jedním z dalších mechanismů regulace prostřednictvím C-konce je alternativní sestřih, jehož výsledkem jsou modifikované formy sekvenčně jinak velmi homologních variant receptorů.

Rozdílné sestřihové varianty receptorů spřažených s G-proteiny mohou interagovat s různými proteiny, čímž je regulována jejich specifita signalizace<sup>11</sup>. Proteiny, které specificky interagují s C-koncovou doménou GPCRs, jsou jediným prostředkem, jak je možné specificky regulovat rozdílné sestřihové varianty GPCRs lišící se pouze a právě svými C-konci.

Předmětem této práce je variabilita C-konce mGlu1 receptoru jako důsledek alternativního sestřihu.

## 1.4 Rozdělení receptorů spřažených s G-proteiny

Na základě svých ligandů a podobnosti v sekvenci domény HD jsou tyto receptory děleny do 6 rodin označovaných A-F<sup>16</sup>.

Do rodiny A GPCRs patří první identifikovaný receptor spřažený s G-proteinem – rhodopsin (odtud často používané označení „rhodopsin-like GPCRs“), receptory pro biogenní aminy (katecholamin), různé peptidové receptory (receptory pro chemokiny, opioidy), glykoproteinové a čichové receptory.

Druhá rodina GPCRs (rodina B), nazývaná také rodina sekretinových receptorů, se sestává z receptorů aktivovaných velkými peptidy, jako je například kalcitonin, sekretin, glukagon či  $\alpha$ -latrotoxin.

Třetí, rodina C (rodina glutamátových receptorů), byla poprvé vyčleněna, když byl klonován metabotropní glutamátový receptor<sup>17</sup>. Dále do této rodiny patří receptor pro  $\text{Ca}^{2+}$ , GABA<sub>B</sub> receptor a některé feromonové a chuťové receptory (receptor pro disacharidy, tedy receptor pro sladké a receptor pro chuť umami). Od ostatních rodin se liší velkou extracelulární N-koncovou doménou.

Receptory rodiny D (adhezní receptory) jsou typické svou dlouhou N-koncovou doménou, která obsahuje motivy účastnící se buněčné adheze.

Rodina E obsahuje receptory nazývané také „Frizzled/Taste2“. Tyto receptory jsou zapojeny v embryonálním vývoji. Přestože receptory „Frizzled“ nesignalizují asociací s G-proteiny, jsou na základě fylogenetických studií stále řazeny do superrodiny GPCRs<sup>16</sup>.

Poslední rodinu receptorů spřažených s G-proteiny tvoří receptory pro cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Doposud byly nalezeny jen u druhu hlenky *Dictyostelium discoideum*.

## 1.5 Metabotropní glutamátové receptory

Metabotropní glutamátové receptory (mGlu receptory) jsou aktivovány hlavním excitačním neuropřenašečem – glutamátem. Jsou asociovány s G-proteiny a jsou zodpovědné za pomalý přenos signálu prostřednictvím druhých posílů a regulace aktivity iontových kanálů pro  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ .

Přestože mají některé společné znaky GPCRs, jako je sedm transmembránových domén, nesdílí sekvenční homologii s receptory z ostatních rodin<sup>18</sup>.

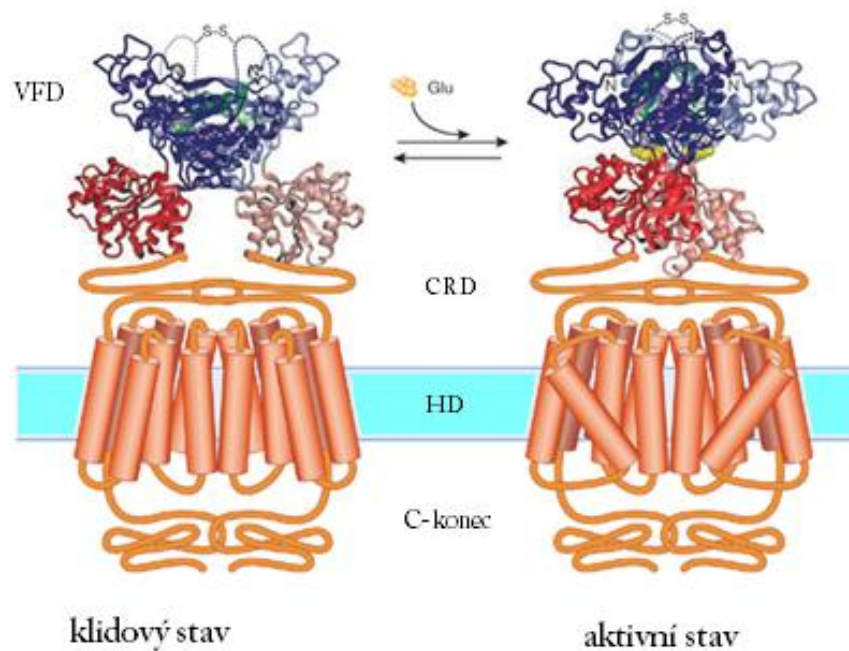
Vyskytují se především v mozku. Signalizace mGlu receptorů je jednou z klíčových komponent modulace neuronální excitability, synaptické plasticity a zpětnovazebné

kontroly vyvolávané neuropřenašečem<sup>2</sup>. Pro jejich správnou funkci je důležitá dimerizace (viz kapitola 1.5.4.).

Funkce jednotlivých mGlu receptorů se liší podle toho, do jaké skupiny receptorů spadá a jak je umístěn na synapsi. Nepostradatelnou roli mají mGlu receptory i mimo CNS. Metabotropní glutamátový receptor 5 kontroluje například proliferaci melanocytů<sup>19</sup>. Metabotropní glutamátové receptory byly dále také nalezeny v potkaním srdci<sup>20</sup> a hepatocytech<sup>21</sup>.

### 1.5.1 Struktura metabotropních glutamátových receptorů

Metabotropní glutamátové receptory se sestávají z extracelulární N-koncové „Venus Flytrap“ domény (VFD), domény bohaté na cystein (CRD), která tvoří spojení mezi VFD a následující heptahelikální doménou (HD), a intracelulární C-koncové domény (viz obr. 1).



**Obr. 1: Struktura dimerního metabotropního glutamátového receptoru.** V klidovém (vlevo) a aktivním (vpravo) stavu. Zobrazeny jsou jednotlivé domény: „Venus Flytrap“ doména (VFD) s vazebným místem pro glutamát (Glu), doména bohatá na cystein (CRD, „cysteine rich domain“), heptahelikální doména (HD) a C-konec. Obrázek znázorňuje změnu konformace receptoru z klidové do aktivní při navázání glutamátu. Obr. upraven dle<sup>22</sup>.

„Venus Flytrap“ doména je extracelulární N-koncová doména, která získala svůj název díky nápadné podobnosti s pastí na lapení hmyzu u mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*, anglicky Venus Flytrap). Obsahuje 19 cysteinů, které jsou konzervované mezi

všemi mGlu receptory a také CaSR<sup>23</sup>. Sdílí sekvenční homologii s bakteriálním periplazmatickým proteinem (PBP), který váže ionty a cukry a umožňuje jim vstup do cytoplazmy<sup>24</sup>.

Každá VFD se skládá ze dvou globulárních domén – laloků, které mezi sebou tvoří štěrbinu pro vazbu agonisty<sup>25</sup>. V klidovém stavu je doména v otevřené konformaci, která je též stabilizována vazbou antagonisty. Vazba agonisty naopak stabilizuje uzavřenou (aktivní) konformaci. Krystalografické studie mGlu1 receptoru odhalily, že dvě VFD tvoří spontánně dimery. Spojení dvou mGlu receptorů kovalentní vazbou mezi N-koncovými doménami bylo prokázáno již dříve u mGlu5 receptoru<sup>26</sup>.

Součástí extracelulární domény je CRD, která spojuje VFD s prvním transmembránovým helixem heptahelikální domény. Konzervovaný disulfidický můstek spojující VFD s CRD je nezbytný pro intramolekulární přenos signálu<sup>27</sup>. Doména bohatá na cystein čítá cca 70 AMK, obsahuje devět konzervovaných cysteinů, přičemž osm z nich je spojeno disulfidickými můstky<sup>28</sup>. Tato konzervace je patrná u celé skupiny C receptorů spřažených s G-proteiny s výjimkou GABA<sub>B</sub> receptorů, které CRD vůbec nemají.

Heptahelikální doména, jak už název vypovídá, je složena ze sedmi transmembránových šroubovic, které procházejí cytoplazmatickou membránou a jsou navzájem propojeny třemi extracelulárními a třemi cytoplazmatickými klíčkami. Tato doména je společným znakem všech receptorů spřažených s G-proteiny. Za interakci s G-proteiny specifickými pro aktivaci fosfolipasy C (PLC) je zřejmě zodpovědná C2 klíčka mGlu receptorů, která je nejdelší a nejvíce variabilní, a intracelulární C-konec<sup>29</sup>. Přeuspořádání podjednotek heptahelikální domény je klíčovým jevem při aktivaci mGlu receptorů<sup>30</sup>.

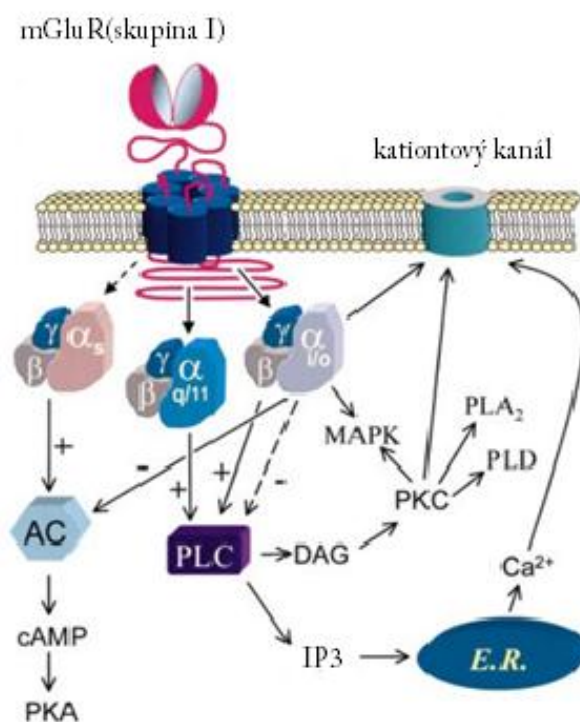
Heptahelikální doména přechází do intracelulární C-koncové domény. Tato část glutamátového receptoru se účastní reakce s G-proteinem. Pro některé z mGlu receptorů je tato oblast pro alternativní sestřih („alternative splicing“), který dále zvyšuje rozmanitost jednotlivých skupin.

Osm různých genů kóduje mGlu receptory (mGluR1-8), které jsou děleny do tří skupin dle sekvenční homologie, G-proteinu se kterým asociují, a ligandové selektivity<sup>31</sup>.

### 1.5.2 Skupina I mGlu receptorů

Do této skupiny patří metabotropní glutamátové receptory 1 a 5 a jejich sestříhové varianty<sup>32</sup>. Tyto receptory se typicky nacházejí postsynapticky a jejich aktivace obvykle vede k buněčné depolarizaci a zvýšení neuronální vzrušivosti.

Interagují přednostně s proteiny  $G_{q/11}$ . Tak jsou pozitivně spjaty s fosfolipasou C<sup>32-33</sup>, která po aktivaci štěpí fosfatidylinositoly na inositol-1,4,5-trifosfát a 1,2-diacylglycerol (viz obr. 2). Inositol-1,4,5-trifosfát následně indukuje uvolnění vápníku z intracelulárních zásob<sup>34</sup>. V heterologních systémech byl prokázán také stimulační vliv receptorů skupiny I na adenylátcyklasu prostřednictvím  $G_s$  proteinů<sup>35</sup>.



**Obr. 2: Přenos signálu do buňky prostřednictvím mGlu receptoru skupiny I.** Metabotropní glutamátové receptory skupiny I se spojují přednostně s proteiny  $G_{q/11}$ . Toto spojení vede k aktivaci fosfolipasy C (PLC) a následující mobilizaci  $Ca^{2+}$  iontů přes inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a aktivaci proteinkinasy C (PKC) přes diacylglycerol (DAG). PKC je zapojena v aktivaci fosfolipasy D (PLD), fosfolipasy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), zřejmě i mitogeny-aktivované proteinkinasy (MAPK) a v modulaci množství iontových kanálů. Sestříhová varianta mGlu receptoru 1a se váže na  $G_{i/o}$ -proteiny s následnou inhibicí adenylátcyklasy (AC), modulací MAPK a iontových kanálů, a také možnou negativní regulací aktivity PLC. Ovlivněna může být i proteinkinasa A (PAK). Také bylo zaznamenáno možné spojení s  $G_s$ -proteiny. (E.R. = endoplazmatické retikulum). Obr. upraven dle<sup>36</sup>.

Orthosterickými ligandy této skupiny jsou kromě hlavního agonisty L-glutamátu také kyselina kviskalová<sup>37</sup>, kyselina ibotenová<sup>38</sup> a 3,5-dihydroxyfenylglycin<sup>39</sup>.



Ovlivnění těchto receptorů se uplatňuje ve vývoji cílených farmakoterapií. Prokázána byla účinnost kompetitivních antagonistů skupiny I mGlu receptorů v případě záchvatů v modelech epilepsie<sup>3</sup>. Na poli farmakologie neustále roste význam allosterických modulátorů mGlu receptorů. Tyto látky se váží mimo orthosterické vazebné místo v N-koncové části receptoru – do tzv. allosterického místa v HD. Působí tak, že ovlivňují afinitu a účinnost orthosterických ligandů jako pozitivní či negativní allosterické modulátory (PAMs, NAMs). Některé jsou oproti orthosterickým modulátorům méně polární a lépe pronikají hematoencefalickou bariérou, což je významné z farmakokinetického hlediska<sup>40</sup>.

### 1.5.3 Skupiny II a III mGlu receptorů

Skupina II zahrnuje receptory mGlu2 a mGlu3, členy třetí rodiny jsou receptory mGlu4, mGlu6, mGlu7 a mGlu8. Receptory těchto skupin se vyskytují jak presynapticky, tak postsynapticky a jsou spojeny s inhibicí adenylátcykasy<sup>32</sup> prostřednictvím  $G\alpha_i$ -proteinů. Inhibice adenylátcykasy způsobuje snížení produkce cAMP<sup>2</sup>.

Receptory II. a III. skupiny se často účastní inhibice presynaptického uvolňování neuropřenašečů<sup>41</sup>. Obě skupiny mají klíčovou roli v indukci LTD<sup>42</sup>.

Skupina II je selektivně aktivována 2R,4R-aminopiperidindikarboxylovou kyselinou, skupina III 2-amino-4-fosfonobutyratem<sup>43</sup>.

Agonisté mGlu receptorů skupiny II mohou být potenciálními léky na úzkostné poruchy a schizofrenii<sup>41</sup>. Agonisté skupiny III jsou účinní při testování na modelech Parkinsonovy choroby na hlodavcích.

### 1.5.4 Dimerizace metabotropních glutamátových receptorů

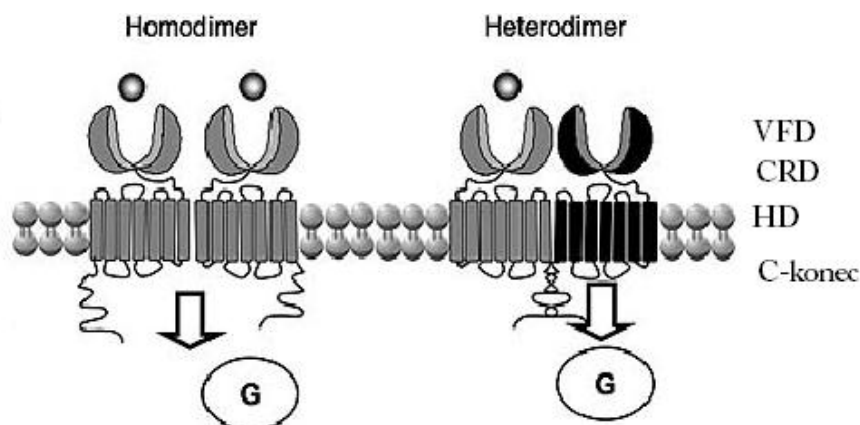
Metabotropní glutamátové receptory tvoří konstitutivní dimery (viz obr. 3 na straně 18)<sup>23</sup>.

Prokázáno bylo spojení intermolekulárním disulfidovým můstkem mezi cysteinem v pozici 140 (Cys<sup>140</sup>) v oblasti VFD<sup>26</sup>. Toto kovalentní spojení však není jediným faktorem při tvorbě dimeru<sup>23</sup>. Metabotropní glutamátový receptor 1 s bodovou mutací, při které je Cys<sup>140</sup> zaměněn za alanin, si zachová dimerizační schopnost a uchová si svou vazebnou kapacitu k ligandům<sup>23</sup>.

Skutečnost, že mGlu receptory tvoří homodimery je obecně přijímaným faktem, u některých receptorů byla prokázána také heterodimerizace<sup>44</sup>.

Proces dimerizace receptorů se odehrává v endoplazmatickém retikulu a nevyžaduje glykosylaci proteinu<sup>45</sup>.

Význam heterodimerizace spočívá v umožnění transportu některých sestříhových variant na povrch buněk, což se bezprostředně týká této práce, a o tomto jevu je více pojednáno dále.



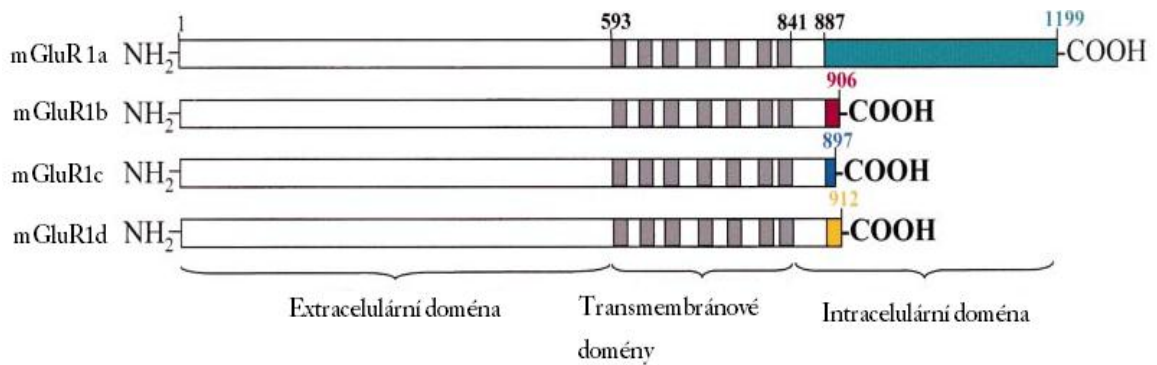
**Obr. 3: Dimerní GPCRs rodiny C.** Vlevo homodimerní receptor složený ze dvou stejných protomer (např. receptor pro vápník - CaSR), vpravo heterodimerní receptor složený ze dvou různých protomer (GABA<sub>B</sub> receptor, mGlu receptor). Schematicky jsou vyznačeny „Venus Flytrap“ doména (VFD), doména bohatá na cystein (CRD), heptahelikální doména (HD) a C-koncová doména. Obr. upraven dle<sup>46</sup>.

### 1.5.5 Metabotropní glutamátový receptor 1

Je prvním identifikovaným receptorem z rodiny mGlu receptorů. V lidském mozku je nejvíce mRNA kódující mGlu1 receptor zastoupeno v mozečku, mozkové kůře, thalamu, subthalamických jádrech a amygdale<sup>47</sup>.

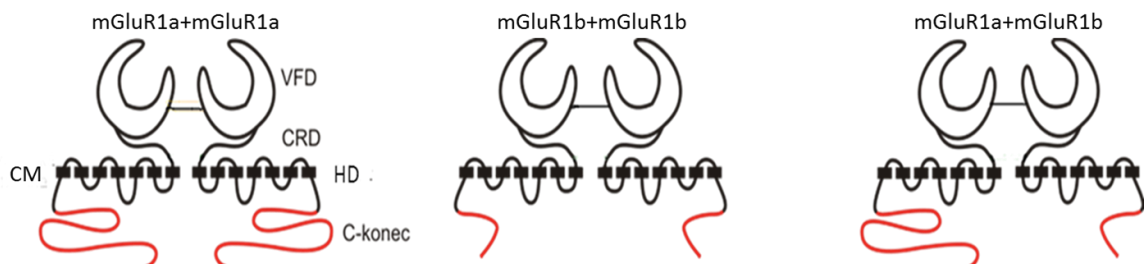
Mezi jeho allosterické modulátory patří antagonisté ethyl-(7E)-7-hydroxyimino-1,7a-dihydrocyklopropa[b]chromen-1a-karboxylát (CPCCOEt) a N-Fenyl-7-(hydroxyimino)cyklopropa[b]chromen-1a-karboxamid (PHCCC)<sup>3</sup> a pozitivní modulátory (PAMs) jako například (S)-2-(4-fluorfenyl)-1-(toluen-4-sulfonyl)-pyrrolidin<sup>48</sup>.

Jsou známy nejméně čtyři sestříhové varianty mGlu1 receptoru lišící se svými C-konci<sup>18</sup> (viz obr. 4 na straně 19). Tyto izoformy se liší svými signálními vlastnostmi<sup>32</sup> a nitrobuněčnou lokalizací<sup>49</sup>, což naznačuje, že hrají rozdílné role v regulaci nervového přenosu. Isoformy se označují a-d, přičemž varianta a, sestávající z 1199 AMK u potkana a 1194 AMK u člověka, je ze všech nejdelší<sup>43</sup>. V této práci budou detailněji studovány pouze delší varianta 1a a kratší 1b.



**Obr. 4: Sestřihové varianty metabotropního glutamátového receptoru 1.** Sestřihové varianty metabotropního glutamátového receptoru (mGluR1a-d) se v sekvenci neliší až do pozice 886 včetně. V izoformě 1a je tato aminokyselina následována 313 dalšími aminokyselinami, v 1b 20, v 1c jednou a 26 v 1d. Obr. upraven dle<sup>36</sup>.

Metabotropní glutamátové receptory 1 tvoří homodimery (mGluR1a+mGluR1a, mGluR1b+mGluR1b) a heterodimery (mGluR1a+mGluR1b) složené z dlouhých (mGluR1a) a krátkých (mGluR1b) sestřihových variant (viz obr. 5).



**Obr. 5: Dimerizace sestřihových variant mGlu1 receptoru.** Vlevo je homodimer tvořen dvěma mGlu1a receptory (mGluR1a+mGluR1a) s vyznačenou „Venus Flytrap“ doménou (VFD), doménou bohatou na cystein (CRD), heptahelikální doménou (HD) procházející cytoplazmatickou membránou (CM) a C-koncem. Uprostřed je homodimer mGluR1b+mGluR1b s červeně vyznačenými C-konci upravenými alternativním sestřihem. Vpravo je heterodimer mGlu receptoru složen z jedné protomery mGluR1a a druhé mGluR1b (mGluR1a+mGluR1b).

Studie na potkaním mozku ukázaly, že sestřihová varianta mGluR1a je nejvíce zastoupena v mozečku, zejména v Purkyněho buňkách<sup>50</sup>. Sestřihová varianta mGluR1b je převládající v hipokampu<sup>33,49</sup>.

Rozdílná exprese sestřihových variant může být spojena s interakcemi s odlišnými intracelulárními proteiny.

Identifikovány byly proteiny interagující s C-koncovou doménou sestřihové varianty mGlu1a receptoru<sup>51</sup>. Tyto proteiny se podílejí například na cíleném transportu (viz kapitola 1.5.5.1) a shlukování receptorů<sup>52</sup>. Nově byly také objeveny proteiny interagující s kratší sestřihovou variantou 1b, které pravděpodobně napomáhají endocytóze a recyklaci těchto receptorů<sup>52</sup>.

### 1.5.5.1 Intracelulární distribuce mGlu1 receptoru

Sestříhové varianty mGlu1 receptoru se svou nitrobuněčnou distribucí liší<sup>33</sup>.

V C-koncové doméně mGlu1 receptoru byl nalezen motiv RRKK<sup>877-880</sup>, tzv. endoplazmatický retenční signál<sup>53</sup>, který je zodpovědný za inhibici transportu receptoru na cytoplazmatickou membránu<sup>54</sup>. Pro uvolnění z endoplazmatického retikula a následný transport na membránu musí být tato sekvence neutralizována interakcí s dalšími proteiny či se sekvencí na vlastním C-konci. Maskování RRKK<sup>877-880</sup> vlastním polypeptidovým řetězcem bylo objeveno u mGlu1a receptoru.

Teorii o regulační funkci RRKK<sup>877-880</sup> sekvence potvrzuje výskyt mGlu1b receptoru především v endoplazmatickém retikulu a lokalizace mGlu1a receptoru na povrchu buněk HEK293<sup>53</sup>.

Dlouhá C-koncová doména mGlu1a receptoru neutralizuje zatím neznámým mechanismem vliv bazického motivu RRKK<sup>877-880</sup> sekvenci nejen v rámci svého vlastního monomeru, ale je zřejmě schopna maskovat tento signál i u asociovaného mGlu1b receptoru<sup>55</sup>. Heterodimer mGluR1a+mGluR1b je poté transportován na povrch buněk HEK293 stejně jako homodimer mGluR1a+mGluR1a.

Motiv kladně nabitých aminokyselin je zodpovědný i za transport receptorů v rámci neuronů. Peptid RRK<sup>877-879</sup> v C-koncové doméně mGlu1b receptoru zabraňuje vstupu homodimeru mGluR1b+mGluR1b do dendritů<sup>56</sup>. Tento signál je konzervován mezi rozličnými sestříhovými variantami mGlu1 receptoru, ale u varianty mGlu1a receptoru se neprojevuje, je maskován dominantním somatodendritickým signálem C-konce a příslušná sestříhová varianta je transportována do somatodendritické části neuronů a do axonů transportována není<sup>56-57</sup>.

Delece C-koncového signálu mGlu1a receptoru maskujícího sekvenci RRK<sup>877-879</sup> tento motiv odkrývá a umožňuje transport axonální, nikoliv dendritický, který by se projevil u nepozměněného receptoru<sup>56</sup>.

Za lokalizaci receptorů v neuronech je zřejmě zodpovědná i interakce s dalšími proteiny jako jsou proteiny rodiny Homer, u kterých byl prokázán vliv na distribuci mGlu5 receptoru<sup>58</sup> a mGlu1a receptoru<sup>51</sup>.

Proteiny rodiny Homer interagují pouze s dlouhou sestříhovou variantou mGlu1a receptoru, v jejíž C-koncové doméně se nachází aminokyselinový motiv potřebný pro tuto interakci<sup>51,59</sup>. Váží se specificky na sekvenci bohatou na prolin, kterou mimo mGlu receptorů skupiny I obsahují i ryanodinové receptory, IP<sub>3</sub> receptory a protein Shank<sup>43</sup>.

Protein Homer-1a zvyšuje množství mGlu1a receptoru na povrchu buněk HEK293 transfekovaných mGlu1a a Homer-1a společně<sup>60</sup>. Interakce s proteiny rodiny Homer se ale může lišit i podle místa výskytu v mozku. Podle imunohistochemických studií na potkaních mozcích jsou mGlu1a receptor a Homer-1c silně kolokalizovány na synapsích v mozečku, v hipokampu jsou však lokalizovány odděleně<sup>61</sup>. V neuronech potkaní mozkové kůry je Homer-1c zodpovědný za zvýšený výskyt mGlu1a receptoru v dendritech<sup>62</sup>.

Z výše uvedených poznatků je jasné, že C-konce sestřihových variant mGlu1 receptoru hrají roli při transportu receptorových komplexů na synaptické membrány a při interakcích s dalšími proteiny, a tak ovlivňují signalizaci.

Detekce heterodimerních receptorů *in vivo* otevírá další možné cesty k ovlivnění signalizace metabotropních glutamátových receptorů.

## **2 Cíl práce**

Tato práce je součástí projektu zabývajícího se podjednotkovým složením dimerního metabotropního glutamátového receptoru 1 (mGluR1) z hlediska vztahu sestřihových variant. Cílem této práce je porovnání nitrobuněčné distribuce homodimerních (mGluR1a+mGluR1a) a heterodimerních (mGluR1a+mGluR1b) receptorových komplexů v mozku potkana pomocí sedimentační frakcionace.

## 3 Materiál

### 3.1 Chemikálie

Akrylamid 99%	Sigma, USA
Azid sodný 99,5%	Sigma, USA
Bradfordovo činidlo	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Blue R)	Serva, Německo
Dithiothreitol (DTT) 99%	Sigma, USA
DMEM	Sigma, USA
DMEM GlutaMAX™	Gibco, USA
Dodecylsírán sodný (SDS) 99,0%	Sigma, USA
FBS	Gibco, USA
Glycerol (bezvodý) 98%	Duchefa Biochemie, Nizozemí
Glycin 98%	Sigma, USA
Chlorid vápenatý 99%	Sigma, USA
Inhibitory proteas (IP) Complete Mini	Roche, Švýcarsko
Kyselina chlorovodíková 35%	Penta, ČR
Kyselina octová 99%	Lachner, ČR
Methanol	Penta, ČR
N,N'-methylenbiskarylamid 98%	Sigma, USA
N-butanol	Penta, ČR
Peroxodisírán amonný (APS) 98%	Serva, Německo
Poly-L-ornitin (0,01%, 10x koncentrovaný)	Sigma, USA
Sacharosa 99,5%	Sigma, USA
Standard Spectra Multicolor High Range Ladder	ThermoScientific, USA
Sušené odtučněné mléko Laktino (tuk 1,3 %)	ProMil, ČR
TEMED	Sigma, USA
Trizma® base (Tris)	Sigma, USA

Trypsin (2,5%, 10x koncentrovaný)

Gibco, USA

Tween<sup>®</sup> 20

Sigma, USA

### 3.2 Pufry, média a roztoky

Akrylamidový roztok (akrylamid 2,1 mol/l, N,N'-methylenbiskarylamid 52 mmol/l)

Barvicí roztok (0,025% Coomassie Brilliant blue R250, 40%obj. methanol, 7%obj. octová kyselina)

Elektroforetický pufr (Tris 25 mmol/l, glycin 192 mmol/l, 0,1% SDS, pH 8,3)

Médium DMEM +/+ (DMEM + 1% penicilin a streptomycin, 10%obj. FBS)

Médium DMEM +/- (DMEM GlutaMAX<sup>™</sup> + 10%obj. FBS)

Odbarvovací roztok (40%obj. methanol, 7%obj. octová kyselina)

PBS (NaCl 136,9 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mmol/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mmol/l)

PBST (PBS + 0,1% Tween<sup>®</sup>20)

Přenosový pufr (Tris 25 mmol/l, glycin 192 mmol/l, 0,1% SDS, 20%obj. methanol)

Pufr pro separační gel (Tris-Cl 1,5 mol/l, pH 8,8)

Pufr pro transfekce (NaCl 273,8 mmol/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,5 mmol/l, HEPES 54,6 mmol/l, pH 7)

Pufr pro zaostřovací gel (Tris-Cl 0,5 mol/l, pH 6,8)

Pufr Tris 50 mmol/l, pH 7,5

Pufr Tris-NaCl (Tris 100 mmol/l, NaCl 100 mmol/l)

Sacharosa (0,32 mol/l, 0,8 mol/l, 1 mol/l, 1,3 mol/l, 2 mol/l; ředěno v Tris 50 mmol/l)  
10% SDS

Vzorkový pufr (TB) (Tris-Cl 250 mmol/l, 8% SDS, 20%obj. glycerol,

0,02% bromfenolová modř pH 6,8, DTT 40 mmol/l)



### 3.3 Gely pro SDS-PAGE

**Tab. 1: Složení separačních gradientových gelů a zaostřovacího gelu.** Gradientové gely byly připravovány 4-10% nebo 4-20%. Více koncentrovaný gel (10% nebo 20%) obsahoval vždy ještě 4 g sacharosu.

	Složení 4% gelu [ml]	Složení 10% gelu [ml]	Složení 20% gelu [ml]	Složení zaostřovacího gelu [ml]
Akrylamidový roztok	3,33	8,34	16,67	2,53
Pufr pro separační gel	6,25	6,25	6,25	-
Pufr pro zaostřovací gel	-	-	-	1,88
10% SDS	0,25	0,25	0,25	0,15
dH <sub>2</sub> O	15,17	10,07	0	10,2
10% APS	0,085	0,085	0,085	0,15
TEMED	0,0085	0,0085	0,0085	0,015

### 3.4 Buněčné linie

Buněčná linie HEK293T/17 (dále uváděny jen jako HEK293, buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinových buněk s insertovaným SV40 T-antigenem, klon 17; ATTC, Rockefeller University)

### 3.5 DNA

pRK5 HA-mGluR1a

pRK5 Myc-mGluR1b

pRK5 GFP

Prázdný vektor pRK6

Použitá DNA byla poskytnuta členy naší laboratoře<sup>55</sup>.

### 3.6 Protilátky

*Tab. 2: Primární a sekundární protilátky použité při Western blotu. Uveden je název, původ a ředění použitých protilátek. Primární protilátka proti mGluR1a+mGluR1b byla získána od členů naší laboratoře.*

Protilátka	Původ	Ředění
Primární		
Purifikovaná myšičí <b>proti mGluR1a</b> (Purified Mouse Anti-mGluR1)	BD Transduction Laboratories <sup>TM</sup>	1:10 000 v PBST + 0,01% NaN <sub>3</sub>
Purifikovaná myšičí <b>proti mGluR1a+mGluR1b</b> (PAN-19)	vyprodukovaná v naší laboratoři	1 µg/ml v PBST + 0,01% NaN <sub>3</sub>
Sekundární		
Kozi <b>proti myšičím IgG</b> (Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005)	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:5000 v 0,5% mléku v PBST

### 3.7 Biologický materiál

Potkaní mozky (WISTAR), dospělé samice

### 3.8 Přístroje

Centrifuga L-70 Ultracentrifuge, rotor SW40	Beckman, USA
Centrifuga Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Německo
Centrifuga Z 383 K	Hermle, Německo
Elektroforetická aparatura Hoefer Mighty small II for 8x9cm gels	Amersham Biosciences, USA
Fluorescenční mikroskop DMI 4000B	Leica, Německo
Gradientový mixer Hoefer Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster	Amersham Biosciences, USA
Inkubátor 4000 series	Contherm Scientific, Nový Zéland
Laminární box Bio-II-A	Telstar, Španělsko
Magnetická míchačka Big Squid	IKA Labortechnik, Německo
Míchačka OS <sup>10</sup> basic	Schoeller Instruments, ČR
Peristaltická pumpa PCD 32.2	Ilabo, ČR

Předvážky	Boeco, Německo
Přenosová aparatura Hoefler Mighty small transphor TE22	Amersham Biosciences, USA
Přístroj na vyvolávání X-OMAT 1000	Kodak, USA
Sonikátor Ikasonic U 50 control	IKA Labortechnik, Německo
Spektrofotometr Biowave II	Biochrom, Velká Británie
Vodní lázeň TW12	Julabo, USA
Zdroj napětí E143	Consort, Belgie

### **3.9 Ostatní materiál a vybavení**

Filmy Medical X-ray Film 13x18 cm (General Purpose Blue)	Kodak, USA
Homogenizátor Dounce, 1 ml	Wheaton, USA
Homogenizátor Potter-Elvehjem, 17 ml	P-Lab, ČR
Kultivační nádobí pro buněčné linie	TPP, Švýcarsko
Nitroceluloseová membrána BioTrace™ NT	Pall, USA

## 4 Metody

Pokud není uvedeno jinak, vycházejí použité metody z protokolů uvedených v příručce „Current Protocols in Molecular Biology“<sup>63</sup>. Dále jsou proto uvedeny jen stručné postupy a případné změny v nich.

### 4.1 Udržování buněčných linií a manipulace s nimi

#### 4.1.1 Pasáž buněk HEK293

Z misky s buňkami o přibližně 90% konfluenci (tzn.  $25 \cdot 10^6$  buněk na kultivační misce o průměru 15 cm) bylo odsáno medium. Buňky byly 1x promyty PBS a vystaveny působení 0,25% roztoku trypsinu v PBS po dobu 2 minut. Po uvolnění buněk do suspenze bylo k trypsinu přidáno medium DMEM +/+ (vytemperováno na 37°C) v objemovém poměru 1:1., buňky byly resuspendovány pipetou a následně centrifugovány 5 minut při 1000 x g.

Supernatant byl odsán a buněčná peleta resuspendována v mediu DMEM +/+. Buňky byly standardně pasážovány 2x týdně v ředění 1:5. Pro experimenty byly využívány do pasáže č. 20. Udržovány byly v inkubátoru s atmosférou 5% CO<sub>2</sub> a přesnou termoregulací (37°C).

#### 4.1.2 Transfekce buněk HEK293 chloridem vápenatým

Buňky tažené v médiu DMEM +/+ v kultivační misce o průměru 15 cm byly pasážovány (viz kapitola 4.1.1), vysety v poměru 1:5 do média DMEM +/- na kultivační misky o průměru 10 cm, minimálně 24 hodin před transfekcí. Kultivační nádoby pro experimenty bylo ošetřeno inkubací s roztokem poly-L-ornithinu (0,001% v PBS) po dobu 30 minut v 37°C. Poté co byl roztok poly-L-ornithinu odsán, se misky 3x opláchly tkH<sub>2</sub>O a nechaly uschnout.

Směs plazmidové DNA (celkem 10 µg/ml, viz tab. 3 na straně 29) a CaCl<sub>2</sub> (0,26 mol/l) doplněná do 1ml tkH<sub>2</sub>O byla přepipetována do 1 ml pufru pro transfekci (celková koncentrace DNA 5 µg/ml) a ihned nakapána na misku s buňkami.

Transfekované buňky se inkubovaly 24 hodin v 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

**Tab. 3: DNA použitá pro transfekci buněk.** Na jednu misku bylo použito vždy celkem 10 µg DNA. V případě transfekce jedním typem DNA byla použito 5 µg daného vektoru a 5 µg prázdného vektoru. DNA pro GFP slouží jako kontrola úspěšnosti transfekce.

Produkovaný protein	použitá DNA		
mGluR1a	pRK5 HA-mGluR1a	+	prázdný vektor pRK6
mGluR1b	pRK5 Myc-mGluR1b	+	prázdný vektor pRK6
mGluR1a+mGluR1b	pRK5 HA-mGluR1a	+	pRK5 myc-mGluR1b
GFP	pRK5 GFP	+	prázdný vektor pRK6

## 4.2 Sedimentační frakcionace buněčných částí potkaního mozku

Použitá metoda je upravena podle Gurdova postupu<sup>64</sup>.

Po celou dobu experimentu byly vzorky udržovány při 4°C (na ledu) a všechny použité roztoky byly na tuto teplotu předem vychlazeny. Během celého postupu byl vždy z každé frakce odebrán vzorek, který byl zamražen a uchováván v -80°C.

Hluboce zmrazené potkaní mozky (-80°C) byly ponechány na ledu v 10 ml sacharosy (0,32 mol/l v Tris (50 mmol/l)+inhibitory proteas (IP), pH 7,5), aby roztály. Dva rozmražené mozky byly homogenizovány ve vychlazeném skleněném homogenizátoru (4°C) s roztoky, ve kterých rozmrzaly.

Homogenát byl centrifugován v předchlazené centrifuze 15 minut při 1000 x g a 4°C (peleta P1, supernatant S1).

Supernatant (S1) byl dále centrifugován 20 minut při 10000 x g a 4°C. Vzniklý supernatant (S2) byl převeden do kyvety, peleta (P2) byla 3x promyta 0,5 ml roztoku sacharosy (0,32 mol/l) a vždy centrifugována 20 minut při 10000 x g a 4°C.

Promytá peleta (P2) byla rozpuštěna v 1 ml Tris (50 mmol/l)+IP (hypotonický pufr) ve kterém byla během 30 minut průběžně homogenizována.

Homogenát pelety (P2) byl naředěn sacharózou o koncentraci 2 mol/l tak, aby výsledná koncentrace sacharosy v roztoku byla 1,3 mol/l.

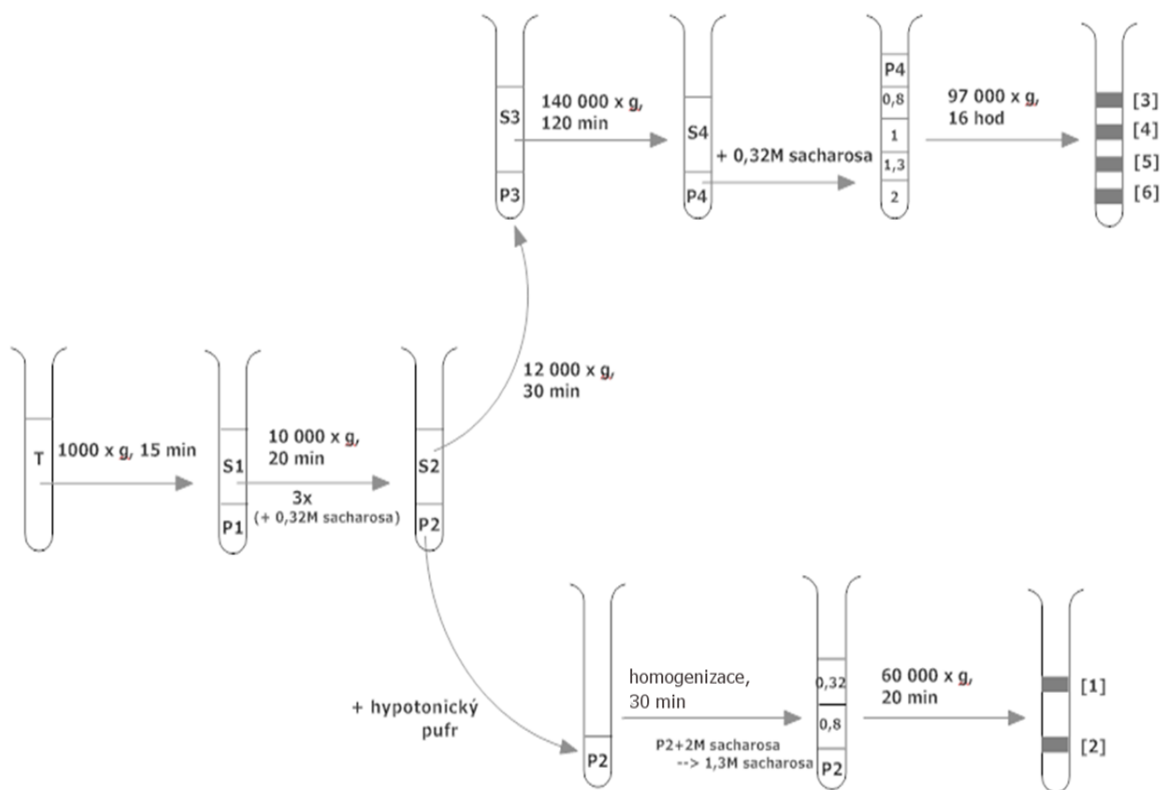
V centrifugační kyvetě byl navrstven gradient sacharosy. Nejprve byl do kyvety převeden roztok sacharózy o koncentraci 0,32 mol/l a v následujícím kroku byl podvrstven postupně roztokem sacharosy o koncentraci 0,8 mol/l a roztokem pelety (P2), v němž byla koncentrace sacharosy 1,3 mol/l. Vzniklý gradient byl centrifugován 20 minut při 60000 x g a 4°C. Pomocí plastového kapátka byly z jednotlivých rozhraní odebrány frakce [1], [2].

Sesbírané supernatanty (S2) se centrifugovaly 30 minut při 12000 x g a 4°C – peleta P3, supernatant S3. Supernatant byl dále centrifugován 120 minut při 140000 x g a 4°C – peleta P4, supernatant S4.

Peleta P4 byla resuspendována v sacharose (0,32 mol/l) a postupně podvrstvena roztoky sacharosy o koncentracích 0,8 mol/l, 1 mol/l, 1,3 mol/l a 2 mol/l. Vzniklý gradient byl centrifugován 16 hod při 97000 x g a 4°C. Z jednotlivých rozhraní byly plastovým kapátkem sesbírány mikrozomální frakce ([3], [4], [5], [6]).

Schéma postupu je vyznačeno na obr. 6.

Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byla určena metodou dle Bradfordové<sup>65</sup>.



**Obr. 6:** Schéma sedimentační frakcionace homogenátu potkaního mozku. Vyznačeny jsou podmínky, za jakých centrifugace probíhaly a jednotlivé frakce, ze kterých se odebíraly vzorky. Při všech centrifugačních krocích byla dodržována teplota 4°C, mezi nimi byly vzorky drženy na ledu. (T - homogenát mozku, P - peleta, S - supernatant).

### **4.3 Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant blue R250**

Po ukončení elektroforetického dělení proteinů byly akrylamidové gely barveny v barvicím roztoku po dobu 30 minut na míchačce. Po obarvení byly gely promývány v odbarvovacím roztoku až do úplného odmytí nenavázaného barviva a vyniknutí proužků obarvených proteinů.

Takto odbarvené gely byly uchovávány zalité do celofánu ve směsi glycerolu a vody (1:1)<sup>66</sup>.

### **4.4 Přenos a imunochemická detekce proteinů po SDS-PAGE (Western blot)**

#### **4.4.1 Příprava proteinových vzorků pro Western blot**

Pro přípravu proteinových vzorků pro charakterizaci protilátek byly použity transfekované buňky HEK293 (viz kapitola 4.1.2). 24h po transfekci byly buňky uloženy na ledu 2x opláchnuty vychlazeným PBS (4°C) a poté staženy pomocí špachtle do PBS+IP (asi  $8 \cdot 10^6$  buněk/ml) a převedeny do Eppendorfových zkumavek.

Suspenze byla centrifugována 10 min při 4°C a 12100 x g, supernatant byl odsán a peleta resuspendována v Tris-NaCl+IP. Roztok byl sonikován 15 x (0,5 s interval, amplituda 80%) a poté smíchán v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem (TB) s čerstvě přidaným DTT.

Proteinové vzorky z mozku byly připraveny ředěním frakcí ze sedimentační frakcionace TB pufrem tak, aby výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích byla 1 mg/ml (Pokud byla koncentrace proteinu nižší, bylo použito ředění 1:1 s 2x koncentrovaným TB pufrem).

Vzorky byly 5 minut zahřáty ve vodní lázni (60°C). Následně byly vzorky centrifugovány 10 minut při 18 600 x g. Uchovávány byly v -20°C.

#### **4.4.2 SDS-PAGE**

Metody SDS-PAGE a imunoblot byly upraveny dle laboratorního manuálu firmy Hoefer<sup>66</sup>.

Elektroforetická aparatura s gradientovými gely byla naplněna elektroforetickým pufrem. Do jamek zaostřovacích gelů byly nanесeny připravené proteinové vzorky (2,5 μg proteinu pro protilátku PAN-19, 1,25 μg pro protilátku proti-mGluR1a), které byly po rozmražení zahřáty ve vodní lázni (60°C) a centrifugovány při 18600 x g 10 minut. Pro

možnost určení přibližné velikosti dělených proteinů byl na každý gel nanesen také komerční proteinový standard.

Rozdělení proteinů probíhalo za konstantního napětí 90 mV po dobu 6 hodin (v případě 4-20% gelů) nebo 5 hodin při 80 mV (v případě 4-10% gelů). Po ukončení elektroforetického dělení byly gely ihned dále zpracovávány buď barvením proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue R250, anebo jejich přenosem na nitroceluloseovou membránu (viz kapitoly 4.3 a 4.4.3 )

#### **4.4.3 Imunoblot**

Přenos proteinů rozdělených na SDS-PAGE na nitroceluloseovou membránu probíhal v přenosové aparatuře v prostředí přenosového pufru při proudu 400 mA po dobu 2 hodin.

Membrána byla poté přes noc blokována v 5% roztoku sušeného mléka v PBST ve 4°C. Po inkubaci byla membrána 3x oplachována v 10 minutových intervalech v PBST.

Dále byla membrána inkubována v primární myší protilátce (dle potřeby, viz tab. 2 na straně 26) po dobu 2 hodin při 4°C, následně byla 3x oplachována v 10 minutových intervalech v PBST, nakonec byla inkubována v sekundární kozí protilátce proti myším IgG konjugované s křenovou peroxidasou 2 hodiny ve 4°C.

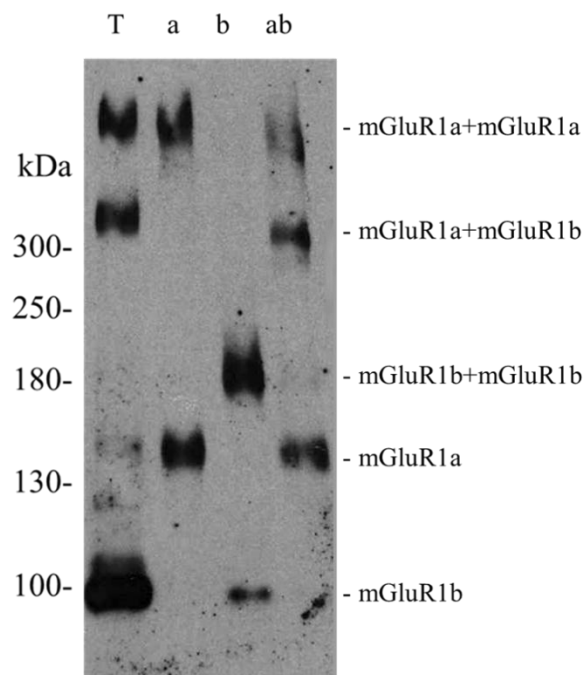
Membrána byla od sekundární protilátky opláchnuta 1x 10 minut PBST a 2x 15 minut PBST. Následně byla převrstvena vyvolávacím roztokem SuperSignal West Femto, inkubována 5 minut při pokojové teplotě a vizualizována na film pomocí vyvolávacího stroje.



## 5 Výsledky

### 5.1 Charakterizace protilátek

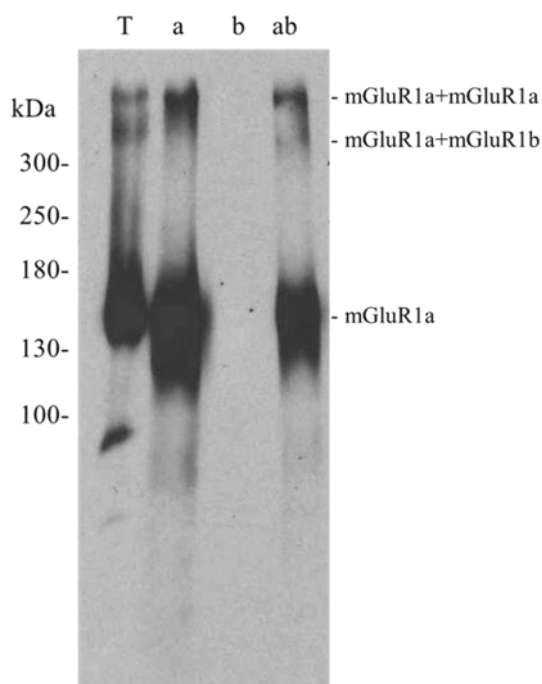
Použité protilátky rozpoznávají specificky monomery i dimery obou sestříhových variant (a, b) mGlu1 receptoru (obr. 7). Porovnání bylo provedeno na vzorku celkového proteinu z potkaního mozku (T). Jako kontroly byly použity proteiny produkované buňkami HEK293 a to pro každou sestříhovou variantu zvlášť (a, b) a také pro obě varianty produkované společně (ab).



**Obr. 7: Charakterizace protilátky PAN-19.** Vzorek homogenátu mozku (T), a vzorky z buněk produkujících mGluR1a (a), mGluR1b (b) a obě mGluR1a+mGluR1b (ab). Ve vzorku a jsou zřetelné proužky odpovídající monomeru mGluR1a (asi 150 kDa) a jeho homodimerní formě (nejpomaleji putující), podobně je tomu i ve vzorku b (asi 100 kDa a 200 kDa). Ve vzorku ab a T jsou zastoupeny monomery, homodimery a heterodimer (nad 300 kDa) těchto sestříhových variant. 4-10% gel.

Na obrázcích je zřetelná i heterodimerní forma mGlu1 receptoru (nad 300 kDa).

Ačkoliv byly proteinové vzorky ošetřeny redukčním činidlem DTT, dimerní receptory nebyly rozrušeny, což potvrzuje dimerizaci na základě nejen kovalentních interakcí.



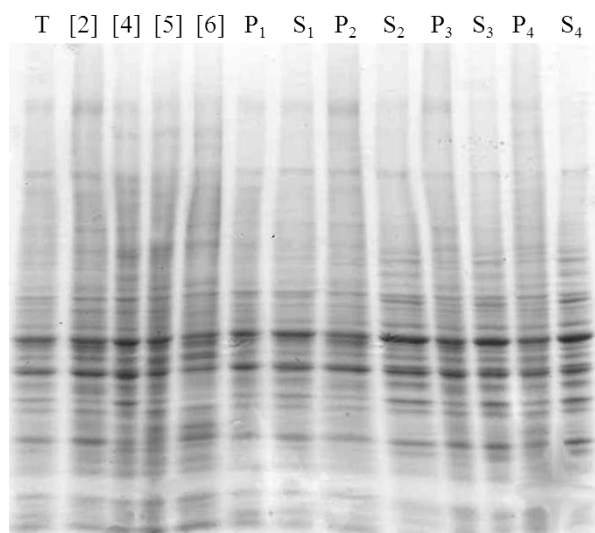
**Obr. 8: Charakterizace protilátky proti mGluR1a.** Analyzován byl vzorek homogenátu mozku (T), a vzorky z buněk produkujících mGluR1a (a), mGluR1b (b) a obě varianty společně (mGluR1a+mGluR1b, vzorek ab). Ve vzorku a jsou zřetelné proužky odpovídající monomeru mGluR1a (asi 150 kDa) a homodimerní formě (nejpomaleji putující). Ve vzorku ab a T jsou zastoupeny monomery mGluR1a, homodimery mGluR1a+mGluR1a a heterodimery mGluR1a+mGluR1b (nad 300 kDa). Ve vzorku b protilátka neznačí nic. 4-20% gel.

## 5.2 Distribuce heterodimerních a homodimerních receptorů v jednotlivých buněčných segmentech mozku

Na obrázcích z imunoblotu v této práci značí protilátky proteiny odpovídající heterodimerní formě mGlu receptoru (mGluR1a+mGluR1b). Při vysoké specifitě protilátek je nepravděpodobné, že jde o jiné agregáty.

Izolací buněčných segmentů pomocí sedimentační frakcionace byly získány různé proteinové frakce, ve kterých bylo stanoveno množství celkového proteinu metodou dle Bradfordové<sup>65</sup>, aby bylo možné na gel nanést porovnatelná množství proteinů.

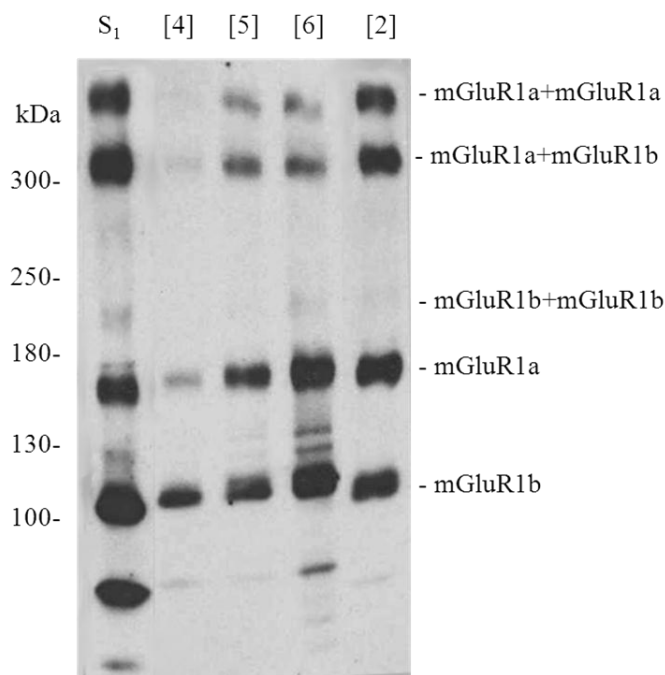
Po předběžné analýze pomocí SDS-PAGE a barvení Coomassie Brilliant Blue R250 (obr. 9 na straně 35), byly jednotlivé frakce buněčných částí potkaního mozku analyzovány metodou imunoblotu.



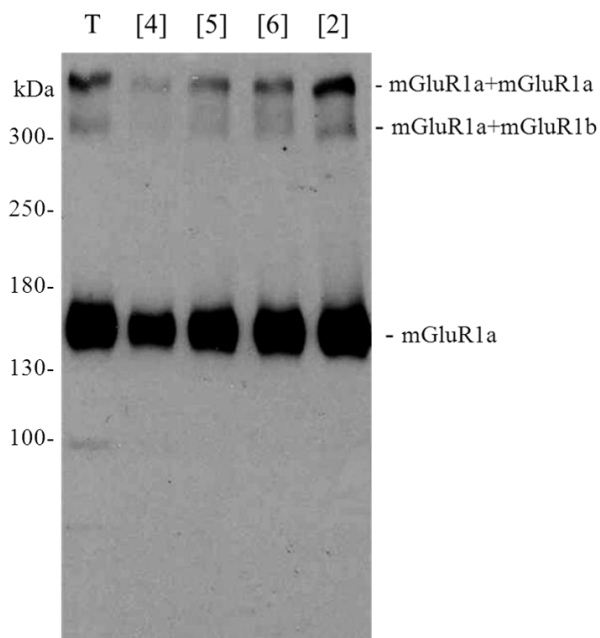
**Obr. 9: Proteiny obarvené Coomassie Brilliant Blue R250.** Množství celkového proteinu z různých frakcí sedimentační frakcionace je přibližně stejné – asi 10 $\mu$ g na jamku. (T – homogenát mozku, [2] – synaptozomy, [4], [5], [6] – mikrozomální frakce, P – peleta, S – supernatant)

Důležitým výsledkem je potvrzení heterodimerizace mGlu receptorů. Na obrázcích proteinů z mozku rozdělených pomocí SDS-PAGE (obr. 10, 11 na straně 36) značí protilátky proteiny odpovídající homodimerním formám (nejpomaleji putující mGluR1a+mGluR1a a mGluR1b+mGluR1b putující kolem 200 kDa), ale taktéž i proužky odpovídající heterodimernímu komplexu receptorů mGluR1a+mGluR1b (nad 300 kDa). Na obrázku značeném protilátkou proti-mGluR1a jsou patrné monomery mGlu1a receptoru, homodimery mGlu1a receptoru (mGluR1a+mGluR1a) a o něco rychleji putující heterodimery mGluR1a+mGluR1b.

Vybrané frakce proteinů ze sedimentační frakcionace (obr. 10, 11 na straně 36) reprezentují zastoupení proteinů v mozku (T – homogenát nebo S1 – homogenát zbavený buněčných jader.), mikrozomální frakce [4], [5], [6], které vznikají z částí endoplazmatického retikula, a synaptozomy (frakce [2]).



**Obr. 10:** Vybrané frakce z mozku potkana značené protilátkou PAN-19. Frakce  $S_1$  je homogenát zbavený buněčných jader. Vidět jsou zde monomery mGlu receptoru (mGluR1b asi 100 kDa, mGluR1a 150 kDa), homodimery (mGluR1a+mGluR1a nejpomaleji putující, mGluR1b+mGluR1b asi 200 kDa) a heterodimer (mGluR1a+mGluR1b nad 300 kDa). U mikrozomálních frakcí [4], [5] a [6] je patrný nárůst výskytu proteinů se zvyšující se hustotou frakce. V synaptosomální frakci [2] již není pozorovatelný dimer mGluR1b+mGluR1b, pomalu putující dimerní receptory jsou zde však relativně zakoncentrovány. 4-20% gel.



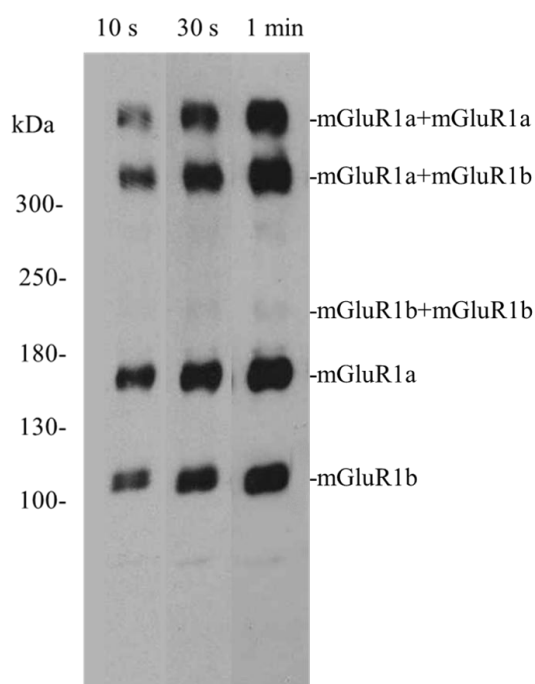
**Obr. 11:** Vybrané frakce z mozku potkana značené protilátkou a-1a. Ve frakci T (homogenát mozku) je zřetelný proužek odpovídající monodimernímu mGluR1a receptoru (asi 150 kDa), a dále jsou zde proužky odpovídající homodimerní formě mGluR1a+mGluR1a, která putuje nejpomaleji a o něco rychleji putující heterodimerní receptor mGluR1a+mGluR1b. V mikrozomálních frakcích ([4], [5], [6]) je vidět postupný nárůst množství proteinu. V synaptosomální frakci [2] dochází k relativnímu zakoncentrování dimerních receptorů. 4-20% gel.

Na obr. 10 (strana 36), na kterém jsou proteiny značeny protilátkou PAN-19 specifickou pro obě sestřihové varianty mGlu receptoru, se zdá, že v potkaním mozku by mohla být celkově více zastoupena heterodimerní varianta mGlu1 receptoru. Tato skutečnost musí být ale ještě důkladněji prostudována.

Při porovnání mikrozomální frakce [6] a synaptosomální [2] je vidět, že homodimerní receptor mGluR1b+mGluR1b do synapsí téměř neputuje, zůstává spíše v endoplazmatickém retikulu.

Ve frakci synaptosomů dochází k relativnímu zakoncentrování dimerních receptorů mGluR1a+mGluR1a a mGluR1a+mGluR1b (obr. 10, 11 na straně 36).

Posouzení rozdílného zastoupení homodimerní a heterodimerní formy receptoru je při použití této metody subjektivní. Na obr. 12 jsou porovnané různě dlouhé expozice z vyvolávání stejné membrány. Porovnávána byla frakce synaptosomů [2]. Při krátké expozici (10 s) nejsou vůbec patrné homodimery mGluR1b+mGluR1b (asi 200 kDa), při delší expozici (60 s) již ale vidět jsou.



**Obr. 12: Porovnání různě dlouhých expozic u synaptosomální frakce [2].** Při vyšší intenzitě proužků je složitější rozeznat vzájemné poměry mezi homodimerem mGluR1a+mGluR1a (nejpomaleji putující) a heterodimerním mGluR1a+mGluR1b (nad 300 kDa). Při nižší expozici je vidět malý rozdíl v zastoupení heterodimerního receptoru a dimerního mGluR1a+mGluR1a. Dále pak je při nejdelší expozici vidět proužek odpovídající dimeru mGluR1b+mGluR1b (asi 200 kDa), který při nižších expozicích patrný není. Značeno protilátkou PAN-19. 4-20% gel.

## 6 Diskuze

V této práci jsem pomocí biochemických metod ověřovala přítomnost dimerů sestříhových variant metabotropního glutamátového receptoru 1 (mGluR1a a mGluR1b) v různých sedimentačních frakcích homogenátu mozku potkana. Tato problematika nás zajímala především proto, že v předchozích pokusech byla jednak identifikována tvorba heterodimerů složených z mGluR1a a mGluR1b variant v heterologním expresním systému savčích buněk HEK293<sup>55</sup>, jednak proto, že homodimery složené pouze z podjednotky mGluR1b nejsou dopravovány na buněčný povrch<sup>45</sup>, ani do dendritů neuronů<sup>56</sup> a dále proto, že heterodimer mGluR1a+mGluR1b vykazoval vlastnosti podobné jako homodimer mGluR1a+mGluR1a.

V souladu s naší teorií jsme detekovali v nitrobuněčné synaptozomální frakci dimery receptorových komplexů odpovídajících jak homodimeru mGluR1a+mGluR1a, tak i heterodimeru mGluR1a+mGluR1b. To odpovídá správnému dopravování obou forem dimerů mGlu1 receptoru do místa určení, jelikož právě synapse je místo, kde tyto komplexy působí. Shodná distribuce populací mGlu1 receptorů v rámci synapse bude předmětem dalšího zkoumání.

V této práci je heterodimerizace potvrzena metodou Western blotu na proteinech izolovaných z potkaního mozku. Naše výsledky jasně negují některá předchozí pozorování. Například skupina Robbinsová heterodimerizaci nedetekovala, avšak tato laboratoř používala jiné metodiky, a také protilátky, které nyní potvrzují heterodimerizaci sestříhových variant mGlu1 receptoru jsou nové a unikátní.

Doposud není přesně známo, jakým mechanismem funguje motiv RRKK<sup>877-880</sup>, je však zřejmé, že je zodpovědný za retenci mGlu1b receptoru v endoplazmatickém retikulu<sup>53</sup>. Spojení dimerních receptorů kovalentně disulfidovou vazbou bylo prokázáno na úrovni domény VFD<sup>26</sup>. Toto spojení však není nezbytné pro tvorbu dimeru<sup>23</sup>, svou roli hraje zřejmě hydrofobní interakce, která by mohla být situována do HD, jelikož zde se nachází mnoho hydrofobních aminokyselin. Interakce mezi C-konci, která by tomuto spojení bránila se zdá být nepravděpodobná.

Z výsledků je také patrné, že homodimery mGlu1b receptoru zůstávají spíše v endoplazmatickém retikulu a nepokračují do synapsí. Odpovídá to předešlému výzkumu endoplazmatického retenčního signálu<sup>53</sup>. Tento signál by měl být dále zodpovědný za internalizaci homodimeru mGluR1b+mGluR1b z distálních neuronů<sup>56</sup>.

Izoforma mGlu1b receptoru se na membrány tedy dostává zřejmě asociací s delší izoformou 1a, zde tvoří funkční heterodimerní receptory vedle homodimerních receptorů (mGluR1a+mGluR1a).

Princip cíleného transportu receptorových komplexů ještě není zcela objasněn, pravděpodobně je zde zapojena interakce s dalšími proteiny například z rodiny Homer<sup>51,54,61-62</sup>. Interakce mGlu1b receptoru exprimovaného bez varianty 1a s COPI (obdobně jako interakce GABA<sub>B</sub> receptoru s COPI<sup>67</sup>) se zřejmě podílí na tom, že receptor zůstává v endoplazmatickém retikulu. Této interakci by mohla zabránit tvorba heterodimeru mGluR1a+mGluR1b.

Vzhledem k tomu, že několik vývojových farmaceutických programů je zaměřeno na vývoj léků, které by modulovaly funkčnost mGlu1 receptorů, je každý relevantní poznatek o těchto receptorech důležitý jak pro předvídání účinků takových léků, tak i pro maximální možné vyloučení jejich nežádoucích účinků. Metabotropní glutamátové receptory ovlivňují velké množství funkcí v CNS a nejen tam. Pro vývoj léčiv, využívajících mGlu receptory jako cíle zásahu, je tedy nezbytné prostudovat detailně veškeré interakce těchto receptorů s různými proteiny, ale i mezi sebou. Pro návrh léčiv je podstatná také různorodá distribuce sestříhových variant mGlu receptorů. Izoforma mGlu1a receptoru je spíše zastoupena v mozečku<sup>50</sup> a měla by mít vliv spíše na motorické funkce, varianta 1b dominuje v hipokampu<sup>33,49</sup> a její fyziologické funkce jsou zřejmě mnohem komplikovanější.

Do budoucna by bylo vhodné zaměřit se na funkční rozdíly mezi jednotlivými sestříhovými variantami mGlu1 receptoru například pomocí „knock-out“ organizmů.

## 7 Závěr

Výsledkem této práce je potvrzení heterodimerizace sestříhových variant mGlu receptoru (mGluR1a a mGluR1b) v potkaním mozku.

Dále bylo zjištěno, že ze všech nitrobuněčných segmentů jsou dimerní mGlu receptorové komplexy mGluR1a+mGluR1a a mGluR1a+mGluR1b relativně více zastoupeny v synaptozomální frakci oproti homodimeru mGluR1b+mGluR1b, jenž byl detekován ve frakci obsahující membrány endoplazmatického retikula a v synaptické frakci byl detekován jen minimálně. Tento poznatek koresponduje s naší výchozí teorií, že homodimer mGluR1b+mGluR1b je zadržován v endoplazmatickém retikulu a není dopravován do synapsí, většinou zůstává v buněčném těle neuronů.



## 8 Seznam použité literatury

- (1) Conquet, F.; Bashir, Z. I.; Davies, C. H.; Daniel, H.; Ferraguti, F.; Bordi, F.; Franzbacon, K.; Reggiani, A.; Matarese, V.; Conde, F.; Collingridge, G. L.; Crepel, F. *Nature* **1994**, *372*, 237.
- (2) Conn, P. J.; Pin, J. P. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 205.
- (3) Ritzén, A.; Mathiesen, J. M.; Thomsen, C. *Basic Clin. Pharmacol.* **2005**, *97*, 202.
- (4) Suzuki, G.; Satow, A.; Ohta, H. *Neuroscience* **2010**, *168*, 787.
- (5) Pin, J. P.; Galvez, T.; Prezeau, L. *Pharmacol. Therapeut.* **2003**, *98*, 325.
- (6) Kniazeff, J.; Prezeau, L.; Rondard, P.; Pin, J. P.; Goudet, C. *Pharmacol. Therapeut.* **2011**, *130*, 9.
- (7) Downes, G. B.; Gautam, N. *Genomics* **1999**, *62*, 544.
- (8) Voet, D.; Voet, J. G. Heterotrimeric G-proteins In *Biochemistry*; 4 ed.; John Wiley & Sons: USA, **2011**, p. 688-699.
- (9) Gether, U.; Kobilka, B. K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17979.
- (10) Farrens, D. L.; Altenbach, C.; Yang, K.; Hubbell, W. L.; Khorana, H. G. *Science* **1996**, *274*, 768.
- (11) Bockaert, J.; Marin, P.; Dumuis, A.; Fagni, L. *FEBS Lett.* **2003**, *546*, 65.
- (12) Sheng, M.; Kim, E. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1851.
- (13) Enz, R. *FEBS Lett.* **2002**, *514*, 184.
- (14) Hjalm, G.; MacLeod, R. J.; Kifor, O.; Chattopadhyay, N.; Brown, E. M. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34880.
- (15) Milligan, G.; White, J. H. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 513.
- (16) Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L. G.; Schioth, H. B. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256.
- (17) Houamed, K. M.; Kuijper, J. L.; Gilbert, T. L.; Haldeman, B. A.; O'Hara, P. J.; Mulvihill, E. R.; Almers, W.; Hagen, F. S. *Science* **1991**, *252*, 1318.
- (18) Tanabe, Y.; Masu, M.; Ishii, T.; Shigemoto, R.; Nakanishi, S. *Neuron* **1992**, *8*, 169.
- (19) Frati, C.; Marchese, C.; Fisichella, G.; Copani, A.; Nasca, M. R.; Storto, M.; Nicoletti, F. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *183*, 364.
- (20) Gill, S. S.; Pulido, O. M.; Mueller, R. W.; McGuire, P. F. *Brain Res. Bull.* **1999**, *48*, 143.
- (21) Storto, M.; de Grazia, U.; Knopfel, T.; Canonico, P. L.; Copani, A.; Richelmi, P.; Nicoletti, F.; Vairetti, M. *Hepatology* **2000**, *31*, 649.
- (22) Moepps, B.; Fagni, L. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 237.
- (23) Tsuji, Y.; Shimada, Y.; Takeshita, T.; Kajimura, N.; Nomura, S.; Sekiyama, N.; Otomo, J.; Usukura, J.; Nakanishi, S.; Jingami, H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28144.
- (24) O'Hara, P. J.; Sheppard, P. O.; Thøgersen, H.; Venezia, D.; Haldeman, B. A.; Mcgrane, V.; Houamed, K. M.; Thomsen, C.; Gilbert, T. L.; Mulvihill, E. R. *Neuron* **1993**, *11*, 41.
- (25) Kunishima, N.; Shimada, Y.; Tsuji, Y.; Sato, T.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Nakanishi, S.; Jingami, H.; Morikawa, K. *Nature* **2000**, *407*, 971.
- (26) Romano, C.; Yang, W. L.; O'Malley, K. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28612.
- (27) Rondard, P.; Liu, J. F.; Huang, S. L.; Malhaire, F.; Vol, C.; Pinault, A.; Labesse, G.; Pin, J. P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24653.
- (28) Muto, T.; Tsuchiya, D.; Morikawa, K.; Jingami, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2007**, *104*, 3759.
- (29) Pin, J. P.; Joly, C.; Heinemann, S. F.; Bockaert, J. *EMBO J.* **1994**, *13*, 342.
- (30) Brock, C.; Oueslati, N.; Soler, S.; Boudier, L.; Rondard, P.; Pin, J. P. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 33000.
- (31) Nakanishi, S. *Science* **1992**, *258*, 597.
- (32) Pin, J. P.; Duvoisin, R. *Neuropharmacology* **1995**, *34*, 1.
- (33) Pickering, D. S.; Thomsen, C.; Suzdak, P. D.; Fletcher, E. J.; Robitaille, R.; Salter, M. W.; Macdonald, J. F.; Huang, X. P.; Hampson, D. R. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 85.

- (34) Yuzaki, M.; Mikoshiba, K. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4253.
- (35) Francesconi, A.; Duvoisin, R. M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5615.
- (36) Hermans, E.; Challiss, R. A. J. *Biochem. J.* **2001**, *359*, 465.
- (37) Sladeczek, F.; Pin, J. P.; Recasens, M.; Bockaert, J.; Weiss, S. *Nature* **1985**, *317*, 717.
- (38) Nicoletti, F.; Meek, J. L.; Iadarola, M. J.; Chuang, D. M.; Roth, B. L.; Costa, E. *J. Neurochem.* **1986**, *46*, 40.
- (39) Schoepp, D. D.; Goldsworthy, J.; Johnson, B. G.; Salhoff, C. R.; Baker, S. R. *J. Neurochem.* **1994**, *63*, 769.
- (40) Lesage, A.; Steckler, T. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *639*, 2.
- (41) Niswender, C. M.; Conn, P. J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 295.
- (42) Bellone, C.; Luscher, C.; Mameli, M. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2913.
- (43) Ferraguti, F.; Crepaldi, L.; Nicoletti, F. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60*, 536.
- (44) Doumazane, E.; Scholler, P.; Zwier, J. M.; Eric, T.; Rondard, P.; Pin, J. P. *The FASEB J.* **2011**, *25*, 66.
- (45) Robbins, M. J.; Ciruela, F.; Rhodes, A.; McIlhinney, R. A. J. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2539.
- (46) Prezeau, L.; Rondard, P.; Goudet, C.; Kniazeff, J.; Pin, J. P. *Flavour Frag. J.* **2011**, *26*, 218.
- (47) Stephan, D.; Bon, C.; Holzwarth, J. A.; Galvan, M.; Pruss, R. M. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 1649.
- (48) Knoflach, F.; Mutel, V.; Jolidon, S.; Kew, J. N. C.; Malherbe, P.; Vieira, E.; Wichmann, J.; Kemp, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 15393.
- (49) Ferraguti, F.; Conquet, F.; Corti, C.; Grandes, P.; Kuhn, R.; Knopfel, T. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *400*, 391.
- (50) Petralia, R. S.; Wang, Y. X.; Singh, S.; Wu, C.; Shi, L. R.; Wei, J.; Wenthold, R. J. *J. Chem. Neuroanat.* **1997**, *13*, 77.
- (51) Tu, J. C.; Xiao, B.; Yuan, J. P.; Lanahan, A. A.; Leoffert, K.; Li, M.; Linden, D. J.; Worley, P. F. *Neuron* **1998**, *21*, 717.
- (52) Francesconi, A.; Kumari, R.; Suzanne Zukin, R. *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 1515.
- (53) Chan, W. Y.; Soloviev, M. M.; Ciruela, F.; McIlhinney, R. A. J. *Mol. Cell Neurosci.* **2001**, *17*, 577.
- (54) Ciruela, F.; Soloviev, M. M.; McIlhinney, R. A. J. *FEBS Lett.* **1999**, *448*, 91.
- (55) Kumpošt, J.; Syrová, Z.; Franková, D.; Kulihová, L.; Bologna, J.; Prezeau, L.; Pin, J. P.; Blahoš, J. *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 605.
- (56) Francesconi, A.; Duvoisin, R. M. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 2196.
- (57) Stowell, J. N.; Craig, A. M. *Neuron* **1999**, *22*, 525.
- (58) Ango, F.; Pin, J. P.; Tu, J. C.; Xiao, B.; Worley, P. F.; Bockaert, J.; Fagni, L. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 8710.
- (59) Beneken, J.; Tu, J. C.; Xiao, B.; Nuriya, M.; Yuan, J. P.; Worley, P. F.; Leahy, D. J. *Neuron* **2000**, *26*, 143.
- (60) Ciruela, F.; Soloviev, M. M.; McIlhinney, R. A. J. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 795.
- (61) Tadokoro, S.; Tachibana, T.; Imanaka, T.; Nishida, W.; Sobue, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 13801.
- (62) Ciruela, F.; Soloviev, M. M.; Chan, W. Y.; McIlhinney, R. A. J. *Mol. Cell Neurosci.* **2000**, *15*, 36.
- (63) Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons: USA, **2001**.
- (64) Gurd, J. W.; Jones, L. R.; Mahler, H. R.; Moore, W. J. *J. Neurochem.* **1974**, *22*, 281.
- (65) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- (66) Hoefer *Protein electrophoresis applications guide*; Hoefer Scientific Instruments: USA, **1994**.
- (67) Brock, C.; Boudier, L.; Maurel, D.; Blahoš, J.; Pin, J. P. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 5572.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka