

ABSTRAKT

Studium buněk linie HEK293 stabilně exprimujících fúzní protein mezi opioidním receptorem typu delta (δ -OR) a mutantou $G_i1\alpha$ proteinu necitlivou vůči působení pertussis toxinu, δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), poskytlo následující výsledky. Snížení obsahu (deplece) cholesterolu v plazmatické membráně s pomocí cyklického oligosacharidu β -cyklodextrinu nezměnila vazbu specifického agonisty δ -OR, [³H]DADLE. Ovlivněn nebyl ani celkový počet vazebných míst, ani afinita vazby [³H]DADLE na receptor. Deplece cholesterolu však narušila schopnost δ -OR aktivovat trimerní G proteiny. Hodnota EC_{50} agonistou stimulované vazby [³⁵S]GTP γ S se zvýšila o jeden řád. Tento účinek byl pozorován jak v případě kontrolních buněk, tak v případě buněk vystavených účinku pertussis toxinu. To znamená, že deplece cholesterolu významně snížila účinnost funkčního spřažení nejen mezi δ -OR a endogenními G proteiny třídy G_i/G_o , které jsou citlivé k působení pertussis toxinu, ale rovněž mezi δ -OR a kovalentně připojeným $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) proteinem. Nezměněný obsah cholesterolu v plazmatické membráně je tedy důležitou podmínkou správné funkce δ -OR.

Stanovení vlivu deplece cholesterolu na funkční aktivitu δ -OR bylo podpořeno analýzou změn biofyzikálních vlastností plazmatické membrány s pomocí fluorescenčních membránových sond, hydrofobní sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) a polární sondy Laurdan. Deplece cholesterolu vyvolala zvýšení celkové fluidity plazmatické membrány, které bylo způsobeno zvýšením míry neuspořádanosti a mobility komponent hydrofobní zóny membrány. V hydrofilní oblasti membránové dvojvrstvy způsobila deplece cholesterolu zvýšení polarity, které lze připsat zvýšení počtu molekul vody - hydrataci.

Studie buněk linie HEK293T přechodně exprimujících δ -OR nesoucí na N-konci antigenní epitop FLAG (FLAG- δ -OR) ukázaly, že deplece cholesterolu snižuje účinnost endocytózy δ -OR (internalizace), která nastává vlivem stimulace receptoru vazbou agonisty. Tato forma internalizace receptoru probíhá prostřednictvím klatrinových váčků. Deplece cholesterolu dále způsobila internalizaci FLAG- δ -OR bez navázaného agonisty. Množství tímto způsobem internalizovaných receptorů odpovídalo ~40 % receptorů internalizovaných působením agonisty. Analýza kolokalizace endocytovaných forem receptoru s Rab proteiny (Rab4, Rab5, Rab7 a Rab11), které posloužily jako „markery“ různých typů intracelulárních váčků, ukázala, že internalizace FLAG- δ -OR vlivem deplece cholesterolu probíhá odlišným způsobem než internalizace vyvolaná vazbou agonisty.