

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Lenka Eichlerová

**Studium adenosinových receptorů a jejich signalizace v myokardu
potkana**

A study of adenosine receptors and their signaling in the rat myocardium

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 04.08.2015

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc za jeho čas, trpělivost a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Mé velké poděkování patří také RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. za její ochotu a pomoc v laboratoři. Současně chci poděkovat celému kolektivu z laboratoře za veškerou pomoc a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

ABSTRAKT

Adenosin hraje kritickou roli v srdeční signalizaci, kde ovlivňuje srdeční tep, kontraktilitu nebo krevní oběh. Doposud jsou známy 4 podtypy adenosinových receptorů, které se vyskytují téměř ve všech tkáních a buňkách lidského těla: A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃. Jedná se o receptory spřažené s G proteiny, které po aktivaci primárně ovlivňují aktivitu adenylylcyklázy a tvorbu druhého posla cAMP. Cílem této diplomové práce byla charakterizace adenosinových receptorů v myokardu potkana, studium jejich distribuce, vazebných vlastností a signalizace. Pomocí metod elektroforézy a Western blottingu byl studován možný rozdíl v expresi jednotlivých receptorových podtypů v levé a pravé komoře. Použitím těchto metod bylo měřeno množství adenosinových receptorů ve frakci lipidových raftů versus solubilní frakci izolované pomocí Tritonu X-100. Výsledky nepotvrdily odlišnou distribuci receptorů v pravé a levé komoře a stejně tak nebyl pozorován přednostní výskyt adenosinových receptorů v lipidových raftech. Vazebné vlastnosti receptorů byly měřeny v saturačních studiích za použití radioaktivně značeného selektivního antagonisty A₁ receptoru [³H]DPCPX. Koncentrace A₁ receptoru se mezi oběma frakcemi významně nelišila, obecně byla nízká, a toto pozorování se shoduje s výsledky Western blottingu. Nakonec byla stanovena aktivita adenylylcyklázy s použitím radioaktivně značeného [³²P]ATP. Adenylylcykláza byla stimulována forskolinem, isoprenalinem a CGS-21680 (agonista A_{2A} receptoru) a inhibována pomocí CPA (agonista A₁ receptoru). Výrazná stimulace byla pozorována u forskolinu, avšak u isoprenalinu a CGS byla stimulace prakticky zanedbatelná. Stejně tak inhibice CPA nevykazovala významné snížení tvorby cAMP. Studium adenosinových receptorů na srdci může být problematické kvůli jejich nízké koncentraci, avšak vzhledem k rozšířenému výskytu adenosinu a jeho funkcím ve fyziologických i patologických stavech buněk je znalost jejich exprese a signalizace základem pro vývoj nových účinných léčiv.

Klíčová slova: adenosin, G protein, receptor, adenylylcykláza, srdce

ABSTRACT

Adenosine plays a critical role in the heart signalling while affecting heart rate, contractility or coronary flow. Nowadays, four adenosine receptor subtypes are distinguished which are present in most of tissues and cells: A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 . All these receptors belong to the family of G protein-coupled receptors. Upon activation, their main target is an enzyme adenylyl cyclase which produces an important second messenger cAMP. The main goal of this thesis was characterization of adenosine receptors in the rat myocardium, assessment of their distribution, binding properties and signalling. We examined a possible disparity in receptors distribution between the left and right ventricles using SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting. The same methods have been used in studies of adenosine receptor distribution in lipid rafts. Samples of lipid rafts and soluble fraction were prepared using a nonionic detergent Triton X-100. We did not find any evidence of different distribution between the left and right ventricles and our results did not confirm compartmentation of the receptors either. For determination of binding properties of the receptors we used radioligand binding assays with the A_1 selective radioligand [H^3]DPCPX. We did not observe any significant difference between the receptor number in the ventricles. We observed that the amount of adenosine receptors in the heart is very low, which was a consistent result in all of our experiments. Our last experiment aimed to determine the activity of adenylyl cyclase by using radioactively labeled [α - ^{32}P]. Adenylyl cyclase was stimulated by forskolin, isoprenaline and CGS-21680 (A_{2A} receptor agonist) and inhibited by CPA (A_1 receptor agonist). A significant stimulation was observed in forskolin stimulated enzyme, but there was only negligible stimulation induced by isoprenalin and CGS. The activity of adenylyl cyclase was not decreased by CPA as well. Because of the low number of adenosine receptors in the heart, these studies are rather challenging. However, due to widespread distribution and function of adenosine in physiological as well as pathological states of the cells, the understanding of expression of adenosine receptors and their signalling is important for the development of new drugs.

Key words: adenosine, G protein, receptor, adenylyl cyclase, heart

OBSAH

Abstrakt	4
Obsah	6
Seznam zkratk	8
Úvod	10
Literární přehled	12
Produkce adenosinu	12
Transportéry	13
Struktura GPCRs.....	13
G proteiny	15
Výskyt a funkce receptorů	17
CNS.....	17
Kardiovaskulární systém	18
Adenylylcykláza.....	20
Regulace.....	21
Signalizace.....	21
Membránové mikrodomény.....	23
Adenosinové receptory.....	24
Desenzitizace	26
A ₁ receptor	27
A _{2A} receptor	28
A _{2B} receptor	28
A ₃ receptor	28
Cíle diplomové práce	29
Materiál a metody	30
Laboratorní zvířata.....	30
Homogenizace a frakcionace	30
Stanovení proteinů	33
SDS-PAGE elektroforéza.....	35
Western blotting a imunodetekce	38
Vazebné pokusy	40
Saturační pokusy.....	40
Stanovení aktivity adenylylcyklázy.....	43

Statistické zpracování výsledků	45
Výsledky	46
Charakterizace adenosinových receptorů pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blottingu.....	46
Exprese A ₁ receptoru	46
Exprese A _{2A} receptoru.....	48
Exprese A _{2B} receptoru.....	49
Exprese A ₃ receptoru	50
Vazebné pokusy	54
Aktivita adenylycyklázy	57
Diskuze	58
Závěr	65
Seznam použité literatury	66

SEZNAM ZKRATEK

5'-AMP	5'-adenosinmonofosfát
[H ³]DPCPX	[H ³]dipropylcyklopentylxantin
AC	adenylylcykláza
ADP	adenosindifosfát
AKAP	A-kináza vazebné proteiny
Akt	proteinkináza B
AMP	adenosinmonofosfát
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bicinchoninová
B _{max}	maximální vazebná kapacita
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD71	transferinový receptor
CD73	ekto-5'-nukleotidáza
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CGS	2-[p-(2-carboxyethyl)-phenethylamino]-5'-N-ethylkarboxamidoadenosin
CNTs	koncentrační nukleosidové transportéry
CPA	2'-deoxycitidin-2'-deoxyadenosin-3',5'-monofosfát
CREB	cAMP response element-binding protein
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ENTs	rovnovážné nukleosidové transportéry
EPAC	výměnný protein aktivovaný cAMP
ERK	kinázy regulované extracelulárními signály

GABA	kyselina gama-aminomáselná
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny
GPI kotva	glykosylfosfatidylinositolová kotva
GRKs	kinázy receptorů spřažených s G proteiny
IMP	inosinmonofosfát
IUPHAR	Mezinárodní sdružení pro základní a aplikovanou farmakologii
K_d	disociační konstanta
kDa	kilodalton
LV	levá komora
MAP kináza	mitogenem aktivované proteinkinázy
NECAB	neuronální kalcium-vazebný protein
NF- κ B	jaderný faktor κ B
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PKA	cAMP dependentní proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
rpm	otáčky za minutu
RV	pravá komora
SDS	dodecylsíran sodný
S.E.M.	střední chyba průměru
TBS	trisový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminomethan
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	polyoxyethylen sorbitan monolaurát
USP4	ubiquitin specifická proteáza 4

ÚVOD

Adenosin je purinový nukleosid, který je prekurzorem a zároveň metabolitem adeninových nukleotidů. Protože všechny buňky využívají volnou energii uvolněnou při katabolismu ATP, jsou tak potenciálním zdrojem adenosinu. Mnoho buněk, které vytváří adenosin, mají na svých membránách adenosinové receptory. Častým důsledkem aktivace adenosinových receptorů je snížení celkové buněčné práce a spotřeby kyslíku. Produkce adenosinu tak signalizuje nerovnováhu mezi potřebou kyslíku a jeho dodávkou a iniciuje odpovědi, které rovnováhu obnovují (vazodilatace, potlačení procesů spotřebovávajících ATP). Podstatou studia adenosinové biologie je právě regulace buněčného energetického metabolismu na principu negativního feedbacku adenosinu (Shryock & Belardinelli, 1997).

Adenosin zprostředkovává své fyziologické funkce interakcí se čtyřmi podtypy adenosinových receptorů: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Všechny se řadí mezi GPCRs, receptory spřažené s G proteiny. Díky svému rozšíření prakticky ve všech tkáních těla ovlivňují tyto receptory řadu fyziologických procesů a patologií zahrnující neurologická, kardiovaskulární a zánětlivá onemocnění a také zhoubné bujení. Adenosinové receptory se mohou rozdělovat na stimulační a inhibiční, podle druhu G proteinu, se kterým interagují. A₁ a A₃ receptor jsou spřaženy s G_i proteiny, jejichž aktivovaná α-podjednotka inhibuje aktivitu adenylcyklázy a tvorbu cAMP. A_{2A} a A_{2B} receptor jsou vázány s G_s proteiny a aktivitu adenylcyklázy stimulují (Trincavelli *et al.*, 2010).

Kompartmentalizace buněčných membrán je jedním z mechanismů regulace buněčné signalizace. Membránové mikrodomény (lipidové rafty) jsou rigidnější části membrány, které se vyznačují vyšším obsahem cholesterolu, GPI-kotvených proteinů a sfingolipidů. Specializované typy raftů se označují jako kaveoly, protože obsahují strukturální protein kaveolin, který na membráně tvoří 50 – 100 nm velké invaginace. Membránové mikrodomény zřejmě hrají také důležitou roli v adenosinové signalizaci. Všechny podtypy adenosinových receptorů obsahují kaveolin-vazebný motiv a navíc byla prokázána přednostní lokalizace enzymů a dalších částí adenosinové signální dráhy právě v raftech (Lasley, 2011).

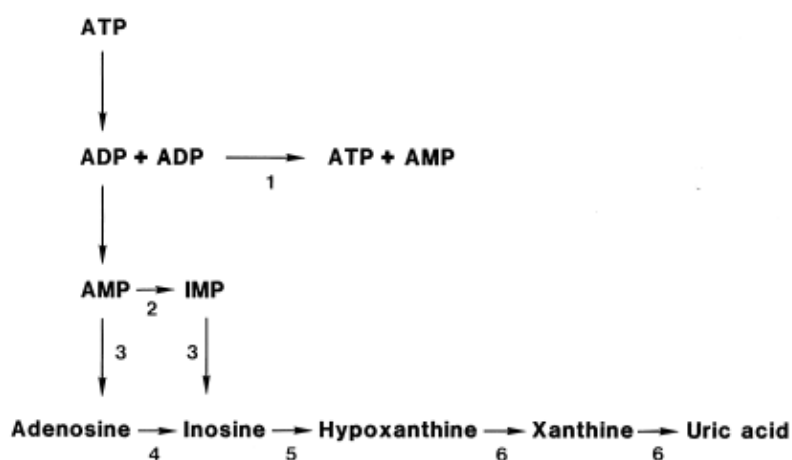
Cílem této diplomové práce je charakterizovat rozložení, vazebné vlastnosti adenosinových receptorů a jejich vliv na signalizaci adenylycyklázy v myokardu potkana. Vzhledem ke vlivu adenosinu na množství buněčných procesů, je srdeční adenosinová signalizace v popředí zájmu při studiu terapeutických možností mnoha kardiovaskulárních chorob.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Produkce adenosinu

Adenosin je tvořen intra i extracelulárně. Intracelulárně je produkován ze svého přímého prekursoru 5'-adenosinmonofosfátu (5'-AMP) enzymem 5'-nukleotidázou. Takto vytvořený adenosin může podstoupit několik odlišných metabolických či syntetických drah. Jednou z možností je přeměna na inosin a hypoxanthin prostřednictvím enzymu adenosin deaminázy a na kyselinu močovou xanthin oxidázou (obr. 1). Adenosin může být také přeměněn zpět na 5'-AMP v reakci katalyzované adenosin kinázou a následně vytvořit ADP a ATP.

Extracelulární 5'-AMP je tvořeno degradací ATP enzymem ekto-nukleotidázou nebo degradací cAMP enzymem ekto-cAMP-fosfodiesterázou (Sheth *et al.*, 2014).



Obr. 1: Metabolismus adenosinu. [1] adenylylkináza; [2] AMP deamináza; [3] 5'-nukleotidáza; [4] adenosin deamináza; [5] nukleosid fosforyláza; [6] xanthin oxidoreduktáza (Shryock & Belardinelli, 1997).

Adenosinová signalizace je významná během oxidačního stresu. Zvýšená signalizace přes adenosinové receptory je způsobena především kumulací adenosinu v extracelulárním prostředí. Za normálních podmínek je katabolismus i anabolismus ATP v rovnováze. Buňka si udržuje cytosolickou koncentraci ATP v rozmezí 5 – 10 mM a

koncentraci ADP v rozmezí 40 – 60 μM . Nejnižší je koncentrace AMP a samotného adenosinu (0,01 – 0,1 μM). Během hypoxie nedochází dostatečně k oxidativní fosforylaci ADP a obnově ATP zásob. Intracelulárně se zvyšuje koncentrace ADP, což vede k aktivaci adenylylkinázy. Tento enzym katalyzuje přeměnu dvou molekul ADP na ATP a AMP. AMP je ihned hydrolyzováno na adenosin a zvyšující se intracelulární koncentrace umožní přechod adenosinu do extracelulárního prostoru přes nukleosidové transportéry.

Transportéry

Uvolňování adenosinu do extracelulárního prostředí je regulováno specifickými transportéry. Jsou známy 2 rodiny adenosinových transportérů: CNTs (koncentrační nukleosidové transportéry), které zprostředkovávají aktivní transport dovnitř buněk a ENTs (rovnovážné nukleosidové transportéry) přenášející adenosin obousměrně na principu usnadněné difúze (Kong *et al.*, 2004).

Inhibitory těchto transportérů způsobují zvýšené extracelulární hladiny adenosinu a zkoumá se proto jejich terapeutické využití v léčbě některých kardiovaskulárních poruch.

Struktura GPCRs

Adenosinové receptory, zástupci rodiny receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs), se obecně dělí na 4 podtypy – A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . Všechny podtypy mají podobnou strukturu, typickou pro GPCRs, tedy 7 transmembránových helixů spojených třemi extracelulárními a 3 intracelulárními smyčkami. Intracelulární domény obsahují místa pro posttranslační modifikace. Receptory mezi sebou vykazují poměrně vysokou sekvenční homologii (A_1 a A_3 receptory jsou homologní z 49%, A_{2A} a A_{2B} z 59%), významněji se od sebe liší svým C-koncem. A_{2A} receptor se vyznačuje neobvykle

dlouhým C-koncem tvořeným 122 aminokyselinami, zbylé tři receptorové podtypy mají na C-konci četná palmitoylační místa, která mohou potenciálně sloužit k jejich regulaci (Headrick *et al.*, 2013).

Nejpodrobněji byla struktura prozkoumána na A_{2A} receptoru po vytvoření jeho krystalografického modelu. GPCRs se vyskytují v různých termodynamických konformacích, což je důvodem jejich strukturální flexibility. Při extrakci detergentem z lipidických membrán jsou termálně nestabilní a to je problém při snaze o jejich krystalizaci. Aby se tato nestabilita eliminovala, bylo při tvorbě krystalografického modelu A_{2A} receptoru využito T4L fúzní strategie. Principem je náhrada části třetí intracelulární smyčky lysozymem z T4 bakteriofága a odstranění karboxylového konce. Zvýší se tak pravděpodobnost stabilnější krystalizace, ze zřejmého hlediska je však v tomto modelu nemožné prozkoumat kompletní strukturu receptoru včetně jeho C-konce (Jaakola *et al.*, 2008).

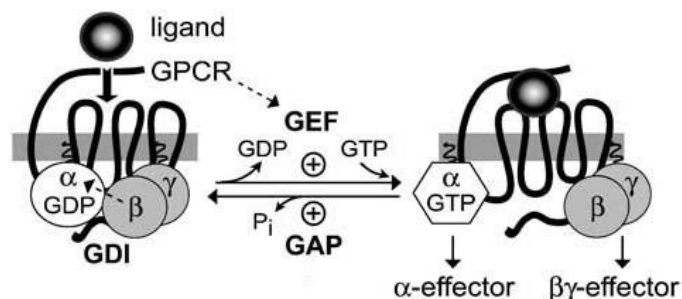
GPCRs se podle směrnice IUPHAR (Mezinárodní sdružení pro základní a aplikovanou farmakologii) řadí do 4 hlavních rodin: třída A rhodopsin-like, třída B secretin-like, třída C metabotropní glutamátové/feromony, frizzled receptory. Adenosinové receptory spadají do třídy A rhodopsin-like. Struktura GPCRs se dá jednoduše rozdělit do tří částí – extracelulární oblast zahrnující N-konec a 3 extracelulární smyčky, transmembránová oblast tvořena sedmi α -helixy (TM1 – TM7) a intracelulární oblast tvořená 3 intracelulárními smyčkami, amfipatickým helixem (H8) a C-koncem. Extracelulární část moduluje přístup ligandu, transmembránový úsek tvoří strukturální core, zprostředkovává vazbu ligandu a zajišťuje transdukcí signálu intracelulárními doménám pomocí konformačních změn. Intracelulární oblast pak tvoří kontakt s cytosolickými signálními proteiny (Venkatakrishnan *et al.*, 2013).

Podle sekvenční analýzy jsou velké rozdíly v délce a struktuře N-konce a extracelulárních smyček jednotlivých GPCRs. Receptory třídy A vykazují dva odlišné typy extracelulárních oblastí. Jedny pohlcují ligand-vazebné místo, ty druhé nechávají místo přístupné molekulám vody. Rhodopsin se řadí mezi první skupinu receptorů, A_{2A} receptor spadá do druhé. Předpokladem přístupu nebo naopak bránění vazebného místa je typ ligandů, které receptory váží. Hydrofóbní ligandy mohou vstoupit do receptoru z lipidické dvojvrstvy, N-konec a druhá extracelulární smyčka receptoru

proto svou sekundární strukturou uzavírají vazebné místo. Receptory vázající ve vodě solubilní ligandy, mezi které se řadí i receptory adenosinové, vazebné místo vystavují do prostředí. Sekundární struktura druhé extracelulární smyčky tvořená α -helixy (adenosinové receptory) nebo β -listy i u těchto receptorů částečně překrývá vazebnou oblast a mohlo by se tak jednat o jeden z prvních kroků rozpoznávání ligandu a selektivity receptoru (Venkatakrisnan et al., 2013).

G proteiny

Heterotrimerické G proteiny se skládají z $G\alpha$ podjednotky vázající guaninové nukleotidy a $G\beta\gamma$ podjednotky. Tyto regulační proteiny zajišťují transdukcí signálu z GPCRs na intracelulární efektorové proteiny. Savčí buňky kódují 16 odlišných $G\alpha$ podjednotek, které jsou rozřazeny do 4 rodin podle sekvenční a funkční podobnosti ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$). $G\beta\gamma$ podjednotka se skládá z $G\beta$ a $G\gamma$, ale funkční je pouze ve formě dimeru. Signalizace a aktivace G proteinů pomocí GPCRs začíná konformační změnou receptoru po navázání ligandu. Konaformační změna katalyzuje uvolnění GDP a zároveň vazbu GTP na $G\alpha$ podjednotce. Vazba GTP indukuje konformační změnu $G\alpha$, sníží se její afinita k $G\beta\gamma$ podjednotce a dojde k jejich disociaci. Obě podjednotky G proteinů regulují různé efektorové proteiny, dokud neproběhne hydrolýza GTP na GDP (obr. 2). Podjednotky poté reasociují vzájemně i s příslušnými GPCRs (Zhang et al., 2015).



Obr. 2: Přenos informace prostřednictvím G proteinů. (McCudden et al., 2005)

Adenosinové receptory jsou spřaženy s různými typy G proteinů (tab. 1). A₁ a A₃ receptor interaguje s G_{i/o} rodinou. Označují se jako inhibiční, protože signální dráha G_i proteinů inhibuje aktivitu adenylcyklázy a tvorbu cAMP. A_{2A} a A_{2B} receptor signalizují přes G_s proteiny, které aktivitu adenylcyklázy naopak stimuluje. A_{2B} receptory mohou být spřaženy i s G_q proteiny, které aktivují signální dráhu fosfolipázy C (Klinger *et al.*, 2002).

Vazba receptorů s G proteiny je zajištěna třetí intracelulární smyčkou. Tato smyčka má také fosforylační místa a podílí se na desenzitizaci a internalizaci receptorů.

Tab. 1: Spřažení adenosinových receptorů s G proteiny (upraveno podle Trincavelli *et al.*, 2010).

	G proteiny	Efektory	Intracelulární signalizace
A₁	G _i	↓ cAMP	
	G _s	↑ cAMP	ERKs
	G _{q/11}	↑ IP ₃	PI ₃ kináza
A_{2A}	G _s	↑ cAMP	PKA, CREB
	G _{olf}	↑ cAMP	PKC
A_{2B}	G _s	↑ cAMP	ERKs
	G _{q/11}	↑ IP ₃ /DAG	P38, JNK
A₃	G _i	↓ cAMP	ERKs
	G _{q/11}	↑ IP ₃	PI ₃ kináza/Akt

Výskyt a funkce receptorů

Adenosin je tvořen převážně v metabolických drahách ATP. Je přítomný prakticky ve všech tkáních a vykazuje pleiotropní účinky v rámci celého těla. Transdukcí signálu zajišťují adenosinové receptory, které mají specifický výskyt, dráhy a regulaci po aktivaci svými agonisty. Pro každý podtyp je specifická vlastní signalizační dráha a její regulace. Klíčová je především schopnost sloužit jako ukazatelé buněčného oxidačního stresu, což je regulováno na transkripční úrovni například faktorem NF- κ B (Sheth et al., 2014). Jednotlivé podtypy adenosinových receptorů se mohou účastnit různých patofyziologických procesů (tab. 2).

CNS

V centrální nervové soustavě je nejvíce zastoupen A_1 receptor. Byl objeven v neuronech kortexu, hippocampu a mozečku. Dále má zastoupení v astrocytech, oligodendrocytech a mikroglíích. V neuronech je koncentrován na synapsích, kde ovlivňuje uvolňování neurotransmiterů (glutamát, acetylcholin, serotonin, GABA) (Sheth et al., 2014).

A_{2A} receptor je specificky exprimován ve striatu a čichovém laloku. Je lokalizován na neuronech, mikroglíích, oligodendrocytech a pravděpodobně také na astrocytech (Fredholm *et al.*, 2011). Podobně jako A_1 je receptor je výskyt především v synaptické oblasti, kde reguluje výlev neurotransmiterů.

A_{2B} a A_3 receptory jsou v centrální soustavě exprimovány v nízkých koncentracích a nemají prokázané neuroprotektivní účinky. Vyskytují se na neuronech i gliových buňkách (Sheth et al., 2014).

Adenosinové receptory jsou v centrální nervové soustavě zkoumány především pro své neuroprotektivní a neuromodulační účinky. Neurální funkce jsou modulovány především A_1 a A_{2A} receptory a to na úrovni výlevu neuropřenašečů. A_1 receptor lze nalézt v presynaptických, postsynaptických membránách i na membránách mimo synapse. Takto ovlivňuje excitační schopnosti neuronů regulací otvírání draselných kanálů. A_{2A} receptory jsou umístěny specificky na synapsích a jejich hlavní role spočívá

v regulaci synaptické plasticity. Schopnost adenosinového systému ovlivňovat neuronální excitační transmise dává adenosinové receptory do popředí zájmu v oblasti výzkumu terapeutických možností v léčbě mozkových poruch. Možnost terapeutického využití se zkoumá například u ischemie, epilepsie, Huntingtonovy, Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby (Gomes *et al.*, 2011).

Kardiovaskulární systém

Adenosinové receptory jsou významně zastoupeny také v kardiovaskulární soustavě. A_1 receptor vykazuje inhibiční účinky téměř ve všech tkáních. V srdci jeho aktivace působí negativní chronotropní a dromotropní efekt. A_1 receptor zprostředkovává inhibici vedení v atrioventrikulárním uzlu a tím způsobuje prodloužení refrakterní periody. Tento jev je důsledkem inhibice vápníkových kanálů závislých na cAMP a zvýšením aktivity draselných kanálů (Sato *et al.*, 2005).

Aktivace A_{2A} a A_{2B} receptorů způsobuje vazodilataci v rámci celého krevního řečiště včetně koronární cirkulace, což ústí ve zvýšení srdečního krevního průtoku. Naopak v aferentních arteriolách ledvin a sleziny a v hepatických cévách tyto dva receptorové podtypy vyvolávají vazokonstrikci. A_{2A} receptor dále vykazuje protizánětlivé účinky a zprostředkovává fyziologické odpovědi kofeinu. A_{2B} receptor byl objeven na žírných buňkách, kde ovlivňuje jejich degranulaci.

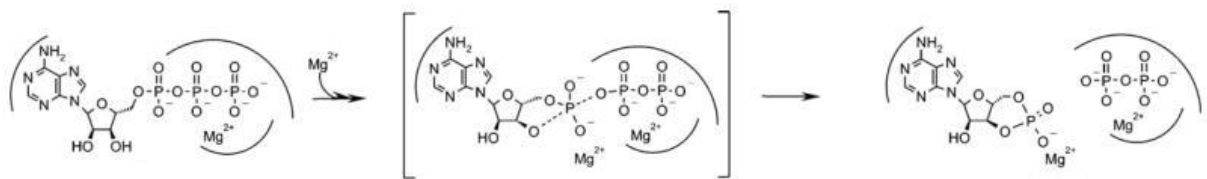
A_3 receptor je exprimován spíše periferně, ale zkoumá se jeho význam v pre-conditioningu (Layland *et al.*, 2014).

Tab. 2: Role adenosinových receptorů v patofyziologii (upraveno podle Trincavelli et al., 2010).

		A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
Neurologická onemocnění	Epilepsie	X			
	Bolest	X	X		
	Regulace spánku	X			
	Vědomí a paměť	X			
	Mozková ischemie	X	X		X
	Parkinsonova choroba		X		
Psychiatrická onemocnění	Úzkost	X			
	Poruchy nálady		X		
	Drogová závislost		X		
Kardiovaskulární onemocnění	X		X	X	
Zánětlivá onemocnění			X	X	X
Rakovina				X	X

Adenylylcykláza

Enzym adenylylcykláza (AC) katalyzuje intramolekulární cyklizaci ATP na cAMP za uvolnění pyrofosfátu. Při reakci dochází k ataku α -fosfátu 3'-hydroxylovou skupinou ribózy a současně uvolnění β,γ -fosfátu (obr. 3). Podobnou reakcí je tvořen druhý posel cGMP guanylylcyklázou. Tyto enzymy se společně řadí do nukleotidylcyklázové rodiny, která se dělí do šesti evolučně odlišných tříd definovaných na základě sekvenčních homologií jejich katalytických domén. Třída I. zahrnuje AC *E. Coli* a dalších gram-negativních prokaryot. Do třídy II. spadají ACs patogenů jako například *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Bordetella pertusis*, které translokují do hostitelské buňky a narušují intracelulární signalizaci. Všechny známé eukaryotní nukleotidylcyklázy patří do třídy III., do které jsou zařazeny také některé prokaryotní adenylylcyklázy a všechny známé guanylylcyklázy. Třídy IV. - VI. nejsou doposud detailně prozkoumány a řadí se zde pouze několik prokaryotických organismů (Kamenetsky *et al.*, 2006).



Obr. 3: Katalytický mechanismus AC enzymů třídy III. (Kamenetsky *et al.*, 2006).

Katalytické domény adenylylcykláz třídy III. jsou v různých tkáních a organismech obklopeny odlišnými regulačními doménami, které mohou být regulovány širokou škálou signálů. I přes odlišnou senzitivitu k rozličným regulátorům krystalografická struktura adenylylcykláz vykazuje konzervovanou strukturu katalytických center. Aktivace vyžaduje dimerizaci domén, přičemž se jedná o homodimerizaci u cykláz, které obsahují pouze jednu katalytickou doménu. Savčí adenylylcyklázy (transmembránové i solubilní) tvoří aktivní protein heterodimerizací strukturálně podobných katalytických domén (Kamenetsky *et al.*, 2006).

U savců je exprimováno 10 isoformů adenylylcyklázy (AC1 – AC10). AC1 – AC9 kódují transmembránové formy, které jsou regulovány heterotrimerickými G proteiny

spřaženými s GPCRs (v srdci je dominantní AC5 a AC6 isoforma). AC10 se označuje jako solubilní. Tato isoforma je citlivá na fyziologické hladiny ATP a je aktivována vápenatými ionty nebo bikarbonátem (Steebhorn, 2014). Některé z isoform adenylcyklázy jsou široce rozšířené (jako například AC2, AC4 a AC6), jiné jsou exprimovány více specificky (AC1 v nervových tkáních, AC5 v srdci a striatu) (Defer *et al.*, 2000).

Regulace

Hlavními regulátory transmembránových adenylcykláz jsou heterotrimerické G proteiny. α -podjednotka G_s proteinů stimuluje aktivitu všech isoform adenylcyklázy. Oproti tomu α -podjednotka G_i proteinů selektivně inhibuje transmembránové adenylcyklázy třídy I, V a VI (Defer *et al.*, 2000).

Úloha $\beta\gamma$ podjednotky se původně uvažovala pouze v souvislosti chelatace a deaktivace stimulační $G_s\alpha$ podjednotky. Poznání, že jednotlivé AC isoformy jsou exprimovány specificky, upravilo náhled na funkci $\beta\gamma$ -podjednotky. Zjistilo se, že nemá žádný přímý efekt na aktivitu některých AC isoform (AC3, AC8, AC9) a naopak přímo aktivuje AC2, AC4 a zřejmě také AC7. Tato aktivace však probíhá pouze v přítomnosti aktivované $G_s\alpha$ podjednotky (Tang & Gilman, 1991).

Dalším významným regulátorem je kalmodulin. Po navázání vápenatých iontů přímo stimuluje transmembránové AC1, AC8 a pravděpodobně také AC3. Regulace cykláz probíhá také pomocí jiných proteinkináz (PAK, PKC). Neméně významné jsou posttranslační modulace (S-nitrosylace, N-glykosylace) (Cooper, 2003).

Na rozdíl od bohatých regulačních mechanismů transmembránových enzymů, u solubilních adenylcykláz doposud nebyly identifikovány žádné regulační proteiny ani posttranslační modifikace. U některých isoform funguje intramolekulární proteinová modulace (Kamenetsky *et al.*, 2006).

Signalizace

Na základě vazby ligandu s receptory spřaženými s G proteiny se spouští signalizační dráha aktivující adenylcyklázu, která vytváří cAMP. Jedná se o malou

molekulu, která je významným druhým poslem v buňce. cAMP aktivuje řadu proteinů, například proteinkinázu A, EPAC (exchange protein aktivovaný cAMP) nebo iontové kanály závislé na cyklických nukleotidech. Ovlivňuje rozsáhlou škálu buněčných funkcí od buněčného růstu a diferenciaci až po buněčný pohyb a migraci, učení a tvorbu paměti, ale také hormonální sekreci, metabolismus nebo genovou transkripci (Francis & Corbin, 1994).

V srdečních myocytech je cAMP produkováno zejména jako odpověď na katecholaminovou stimulaci β -adrenergických receptorů. Dojde přitom k aktivaci proteinkinázy A, fosforylaci vápníkových kanálů L-typu a ryanodinových receptorů. Jejich otevřením se zvýší hladina vápenatých iontů, které jsou dostupné pro kontrakci (pozitivní inotropní efekt). β -adrenergní stimulace proteinkinázy A vede také k fosforylaci troponinu I, zrychlí se jeho uvolnění z komplexu troponin C- Ca^{2+} , což umožňuje vyvinutí větší síly a zkrácení vláken během systoly a rychlejší relaxaci a prodloužení vláken během diastoly (Zaccolo, 2009).

Stimulaci funkce adenylylcyklázy a tvorby cAMP zajišťují adenosinové receptory přímo přes aktivaci příslušných G proteinů. V srdci je však nejvýznamnější anti- β -adrenergní efekt A_1 receptoru, jehož aktivace potlačuje účinky a následnou signalizaci agonistů β -adrenergických receptorů (El-Awady *et al.*, 2011).

Specifita cAMP signalizace je zajištěna kompartmentalizací jeho hlavního efektoru proteinkinázy A. Kotvení je zajištěno AKAP proteiny, což je velká rodina strukturálně odlišných proteinů, které mají společnou schopnost vázat a kotvit proteinkinázu A. AKAP proteiny mají unikátní protein-lipid nebo protein-protein cílové domény, které komplex AKAP-PKA kotví k daným subcelulárním oblastem. Proteinkináza A je tak ve výsledku ukotvena do blízkosti jejich cílových proteinů, což umožňuje přednostní fosforylaci určitých substrátů (Zhang *et al.*, 2001).

Membránové mikrodomény

Jedním z mechanismů regulace buněčné signalizace je kompartmentalizace na úrovni buněčných membrán. Uplatňuje se v regulaci homeostázy cholesterolu, intracelulárním třídění proteinů a lipidů, buněčné polaritě nebo procesech vezikulárního transportu. Membránové mikrodomény (běžně nazývané jako lipidové rafty) jsou domény buněčných membrán obohacené o specifické lipidy a proteiny. Jsou charakterizovány vysokou koncentrací glykosfingolipidů a cholesterolu ve vnějším listě membránové dvojvrstvy, což jim dodává gelovitou (gel-like) konzistenci oproti okolním neuspořádaným membránám s přemírou fosfolipidů (Chini & Parenti, 2004).

Díky nižší fluiditě a specifickým biochemickým vlastnostem jsou rezistentní vůči neiontovým detergentům jako je například Triton X-100 a to umožňuje jejich separaci na principu diferenciální flotace po centrifugaci v hustotním gradientu. Po navrstvení buněčného lyzátu na hustotní gradient a následné centrifugaci, se nerozpustné membránové ostrůvky obsahující lipidové rafty vznášejí k lehčím povrchovým frakcím a jsou tak separovány od rozpuštěných buněčných lipidů a proteinů, které zůstávají na dně nanášecí zóny (Chini & Parenti, 2004).

Speciální typem lipidových raftů jsou kaveoly. Jsou charakterizovány strukturálním proteinem kaveolinem, který vytváří specifické zakřivení (invaginaci) membrány o velikosti 50 – 100 nm. Existují 3 isoformy kaveolinu, které mají odlišnou expresi v rámci buněčných typů. Například kaveolin-1 je vysoce exprimován v endotelových buňkách a téměř se nevyskytuje v srdečních komorách, opačný vzorec exprese vykazuje kaveolin-3 (Song *et al.*, 1996). Kromě toho, že kaveolin přímo váže cholesterol, ovlivňuje signální transdukcí tím, že slouží jako lešení pro řadu proteinů s kaveolin-vazebným motivem. Bylo dokázáno, že v kaveolách jsou lokalizovány mnohé proteiny sloužící jako druzí poslové (například heterotrimerické G proteiny, eNOS, ERK, PKC, AC). Mnohé studie také poukazují na výskyt GPCRs v raftech. Tato kolokalizace receptorů s druhými posly přispívá k rychlosti a specifitě intracelulární signalizace (Lasley, 2011).

Adenosinové receptory

Regulace signální transdukce prostřednictvím membránových mikrodomén se zkoumá i v souvislosti s adenosinovou signalizací. Primárním podnětem pro studium kompartmentalizace adenosinové signální dráhy byl objev ekto-5'-nukleotidázy (CD73) v kaveolách. Jedná se o GPI-kotvený protein, který defosforyluje AMP na adenosin a protože adenosin je rychle katabolizován na inosin, blízká lokalizace extracelulárního adenosinu jeho receptorům by optimalizovala jejich aktivaci (Anderson, 1993). V lipidových raftech byly také objeveny koncentrační nukleotidové transportéry 1 a 3. Nejvýznamnějším poznatkem ve studiu lokalizace adenosinových receptorů v mikrodoménách bylo zjištění, že všechny čtyři receptorové podtypy mají ve své struktuře kaveolin-vazebný motiv (Mundell & Kelly, 2011).

A₁ receptor byl jako první z adenosinových receptorů objeven v lipidových raftech (Lasley *et al.*, 2000). I přes vícero studií dokazujících výskyt A₁ receptoru v kaveolách, význam tohoto specifického umístění zůstává nejasný. Za normálních podmínek aktivace receptoru v kardiomyocytech nemá žádný přímý efekt na kontraktilitu, intracelulární vápník ani cAMP. Pouze jedna studie vykazuje výskyt A₁ receptoru v kaveolách po expozici ligandu. Zjistilo se, že receptor po vystavení ligandu translokuje z kaveol do plazmatických membrán, ale nepodléhá rychlé internalizaci. Opět doposud není jasné, jakou roli v signalizaci tento fakt může hrát (Lasley *et al.*, 2000).

A_{2A} receptor je spřažen s G_s proteiny, které stimulují aktivitu adenylylcyklázy a tvorbu cAMP. V lipidových raftech byly objeveny jak G_sα proteiny, tak adenylylcykláza (Huang *et al.*, 1997). O výskytu A_{2A} receptoru v raftech však pojednává pouze jediná studie a jedná se o práci provedenou na míšních neuronech potkana. Při rozrušení lipidových raftů, případně snížením koncentrace cholesterolu, byla A_{2A} receptorová signalizace ovlivněna. Následně se zjistilo, že pro ovlivnění adenosinové signalizace je klíčová přítomnost cholesterolu, nikoliv raftů, což zvyšuje nejistotu ohledně specifické lokalizace A_{2A} receptoru v kaveolách (Lasley, 2011).

A_{2B} a A₃ receptory v kontextu výskytu v membránových mikrodoménách doposud nejsou detailně prozkoumány. Byla prováděna studie A_{2B} receptoru

v epitelových buňkách a případná translokace po expozici ligandu. Nepotvrdil se přednostní výskyt v kaveolách (Sitaraman *et al.*, 2002). Pro výskyt A_3 receptoru v raftech doposud není žádná evidence.

Desenzitizace

Všechny čtyři podtypy adenosinových receptorů desenzitizují po stimulaci agonistou. Procesy se liší v časovém měřítku i možných mechanismech. Jelikož desenzitizace může ovlivnit citlivost receptorů během terapeutického využití, případně modifikovat odpovědi na endogenní adenosin, jehož koncentrace se liší ve fyziologickém a patologickém stavu, je důležité tyto procesy identifikovat a charakterizovat (Mundell & Kelly, 2011).

Obecně je funkce GPCRs silně regulována. Při delším nebo opakovaném vystavení agonistovi receptory mohou desenzitizovat, což vede ke ztrátě citlivosti na danou látku. Desenzitizace může být homologní nebo heterologní. Během homologní desenzitizace se ztráta citlivosti týká pouze receptoru, který byl agonistou přímo aktivován. Heterologní desenzitizace zahrnuje obecnější ztrátu buněčné senzitivity k ligandu a postihuje více receptorů včetně těch, které aktivovány nebyly. Další rozdíl spočívá v samotném místě regulačních změn. U homologních procesů změny vedoucí k desenzitizaci probíhají přímo v aktivovaném receptoru. Při heterologní dochází ke změnám až v dalších krocích signální dráhy, to zahrnuje G proteiny, efektorové enzymy nebo fosforylaci receptoru proteinkinázami závislými na druhých poslech (Mundell & Kelly, 2011).

Mechanismus homologní desenzitizace spočívá ve fosforylaci GPCRs obsazených agonistou pomocí GRKs (kináz spřažených s GPCRs). Tyto kinázy fosforylují serinové nebo threoninové zbytky na třetí intracelulární smyčce nebo C konci receptoru. Tato modifikace vede k vazbě arrestinů, které rozruší vazbu receptoru s G proteiny. Navíc jsou arrestiny schopny indukovat alternativní signalizační dráhu interakcí s proteiny, které například aktivují MAP kinázy (Premont & Gainetdinov, 2007).

V buňce může nastat také opačný případ, kdy jsou GPCRs senzitivované, to znamená například jejich větší množství na buněčném povrchu, zvýšení vazby s efektorovými enzymy nebo zvýšení aktivity případně počtu efektorových enzymů. Tento jev umožňují buněčné faktory nebo látky se schopností zvýšit počet receptorů na

membránách, například antagonisté fungující jako „farmakochaperony“, které způsobují akumulaci receptoru na buněčném povrchu (Malaga-Diequez *et al.*, 2010).

Nejběžnějším mechanismem internalizace GPCRs je arrestin-dependenční zacílení receptorů do klatrinových oblastí, kde se formují váčky. Následně váčky maturují v endozomy, kde probíhá třídění, recyklace nebo degradace proteinů. V endosomech může docházet k defosforylaci GPCRs a odvázení arrestinů, a receptory mohou být recyklovány zpět na buněčný povrch (Mundell & Kelly, 2011).

A₁ receptor

Desenzitizace A₁ receptorů spřažených s G_i proteiny byla zkoumána v adipocytech, mozku, buňkách hladké svaloviny a thyroideálních buňkách. V některých případech docházelo k desenzitizaci velmi pomalu v řádu hodin od vystavení agonistům bez výrazné fosforylace receptoru (i za přítomnosti exogenní GRK) a s pouze limitním počtem translokací arrestinu. V jiných studiích byla pozorována rychlá desenzitizace (minuty) A₁ receptorů spojených s fosfatidylinositolovou drahou, stejně jako rychlá fosforylace na serinových a tyrosinových aminokyselinových zbytcích receptoru (Mundell & Kelly, 2011).

Citlivost ligandů na A₁ receptor je ovlivněna také změnou exprese G proteinů. Při analýze C-konce receptoru byl objeven pouze jediný threoninový a zároveň žádné serinové nebo tyrosinové zbytky, nicméně shluk serinů se vyskytuje v třetí intracelulární smyčce. Fosforylace prostřednictvím GRK nebyla dostatečně prokázána, ale působí zde regulace fosforylací proteinkinázami A nebo C (Ciruela *et al.*, 1997).

Kinetika, s jakou probíhá desenzitizace A₁ receptoru, je doposud diskutabilní. Rozdílnost výsledků více studií může být způsobena buněčným kontextem, případně receptorovou zásobou pro různé buněčné procesy. Vždy je náročnější vypočítat desenzitizaci receptorové odpovědi při malém množství aktivovatelných receptorů. Nicméně zdá se, že celkově je desenzitizace A₁ receptoru pomalejší než u ostatních receptorových podtypů (Mundell & Kelly, 2011).

A_{2A} receptor

Desenzitizace A_{2A} receptoru byla zkoumána jak na buněčných liniích, tak v intaktních tkáních. Měřena byla jako spřažení receptoru s aktivací adenylcyklázy. Regulace probíhá přes GRK a arrestiny (Mundell & Kelly, 2011).

A_{2A} receptor se od všech ostatních adenosinových receptorů liší dlouhým C-koncem. Umožňuje to interakci s mnoha proteiny, které mohou regulovat signalizaci a internalizaci (např. α -aktinin, USP4, NECAB). Navíc bylo zjištěno, že spřažení A_{2A} receptoru s G proteiny je odlišné od zbylých podtypů. Receptor s G proteiny tvoří velmi úzkou vazbu, která se označuje jako „precoupling“ (komplex receptoru s G proteiny, který je formován již před interakcí receptoru s agonistou). Tato interakce omezuje pohyb receptoru po membráně, protože se přednostně vyskytuje v rigidnějších částech membrány (lipidových raftech) (Charalambous *et al.*, 2008).

A_{2B} receptor

Desenzitizace A_{2B} receptoru byla stejně jako u A_{2A} typu zkoumána na buněčných liniích i v intaktních tkáních. Probíhá relativně rychle (méně než hodinu). Ve většině případů se desenzitizace jeví jako homologní, ale receptor by sám o sobě mohl být cílem regulace heterologní (Peters *et al.*, 1998).

Internalizace probíhá s účastí proteinů arrestinu, dynaminu a klatrinu. Pro internalizaci je důležitá distální část C-konce, avšak její delece nezpůsobuje úplnou inhibici procesu. Spíše dojde ke zpomalení desenzitizace i internalizace a oba procesy přestávají být závislé na arrestinu a klatrinu, zůstává pouze závislost na dynaminu (Matharu *et al.*, 2001).

A₃ receptor

A₃ receptor spřažen s G_i proteiny podléhá rychlé desenzitizaci a internalizaci. Regulace je zajištěna fosforylací pomocí GRKs. Existují důkazy, že vliv by mohla mít i aktivace MAP kinázy, pravděpodobně regulací asociace GRKs s receptorem (Palmer & Stiles, 2000).

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Charakterizace adenosinových receptorů v hrubých membránách izolovaných z pravé a levé komory myokardu potkana za použití SDS-PAGE elektroforézy, Western blottingu a imunodetekce.
2. Porovnání distribuce adenosinových receptorů v rámci plazmatické membrány, zkoumání jejich výskytu v lipidových raftech za použití SDS-PAGE elektroforézy, Western blottingu a imunodetekce.
3. Charakterizace vazebných vlastností A_1 receptoru na plazmatických membránách izolovaných z levých komor myokardu potkana pomocí saturačních pokusů za použití radioligandu $[H^3]DPCPX$.
4. Stanovení aktivity adenylylcyklázy a vlivu A_1 a A_{2A} receptoru na tvorbu cAMP v plazmatických membránách izolovaných z levých komor myokardu potkana za použití substrátu $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$.

MATERIÁL A METODY

Laboratorní zvířata

K pokusům byli použiti dospělí samci laboratorních potkanů kmene Wistar (váha asi 300g). Po usmrcení byla potkanům vyjmuta srdce a rozdělena na pravou komoru, levou komoru a septum. Jednotlivé části byly zamraženy v tekutém dusíku a před dalším zpracováním uchovávány v mrazicím boxu při -80°C.

Homogenizace a frakcionace

Tab. 3: Roztoky pro homogenizaci tkáně

pufr TME	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA
homogenizační pufr TMES	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 250 mM sacharóza

1. Postnukleární supernatant a hrubé membrány

Zpracovávány byly levé i pravé komory. Po vyjmutí z mrazicího boxu byly jednotlivé komory zváženy a přeneseny do lahvíček s odpovídajícím množstvím vychlazeného homogenizačního pufru TMES (4 ml pufru na 1 g tkáně). Složení použitých pufrů je uvedeno v tab. 3. Aby se zabránilo degradaci proteinů v průběhu homogenizace, byl přidán inhibitor proteáz Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Tkáň byla nastříhána na malé kousky a dvakrát homogenizována přístrojem

Ultra-Turrax po dobu 15 s (24000 rpm). Poté byla směs homogenizována pomocí Potter-Elvehjemova sklo-teflonového homogenizátoru Eurostar per-b (1200 rpm) po dobu přibližně 1 min, což odpovídá posunu pístu 10x nahoru a dolů. Vzniklý homogenát byl centrifugován na vychlazené centrifuze (Hettich Universal R30) při 4°C po dobu 10 min při rychlosti 2100 rpm (600 g). Byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován ve stejném objemu pufru TMES s inhibítorem proteáz, jako na začátku procesu. Směs byla rehomogenizována na přístroji Ultra-Turrax a sklo-teflonovém homogenizátoru. Homogenát byl opět stočen při 4°C, rychlostí 2100 rpm (600 g), po dobu 10 min. Byl odebrán supernatant, spojen s předchozím supernatantem, který byl odebrán po první centrifugaci a rozpíjetován. Spojená frakce obou supernatantů odpovídala postnukleárnímu supernatantu. Část byla odebrána na stanovení obsahu proteinů. Část postnukleárního supernatantu byla znovu centrifugována na centrifuze (Beckman-Coulter, rotor Ti50.2) po dobu 30 min, 27000 rpm. Pelet představující hrubé membrány byl resuspendován v pufru TME a rozpíjetován do mikrozkušavek. Část byla odebrána na stanovení proteinů. Alikvoty postnukleárního supernatantu i hrubých membrán byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v mrazicím boxu při -80°C.

2. Plazmatické membrány

Některé levé komory byly zpracovány pro přípravu plazmatických membrán pomocí centrifugace na Percollovém gradientu. Postup homogenizace probíhal v prvních krocích stejně, až po získání postnukleárního supernatantu. V centrifugačních zkumavkách bylo připraveno 20 ml 18% (v/v) Percollu, který byl naředěn ze 100% Percollu pomocí homogenizačního pufru TMES. Na roztok Percollu byly navrstveny 3 ml postnukleárního supernatantu. Gradientová centrifugace probíhala na centrifuze (Beckman-Coulter, rotor Ti50.2) při 4°C, 23500 rpm (50000 g) po dobu 30 min. Byly odebrány separované vrstvy plazmatických membrán a mitochondrií. Obě frakce byly přeneseny do centrifugačních zkumavek. Plazmatické membrány byly naředěny pufrům TME a centrifugovány na centrifuze (Beckman-Coulter, rotor Ti50.2) při 4°C, 40000 rpm (150000 g) po dobu 60 min. Frakce obsahující mitochondrie byla naředěna homogenizačním pufrům TMES a centrifugována stejným způsobem jako plazmatické membrány. Následně byl odsát supernatant a pelet byl resuspendován v pufru TME u

plazmatických membrán a TMES u mitochondrií. Část vzorků byla odebrána na stanovení proteinů. Homogenáty byly rozpipetovány a alikvoty byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v mrazicím boxu při -80°C.

3. Membránové mikrodomény

K solubilizaci lipidových raftů byl použit neiontový detergent Triton X-100 s výslednými koncentracemi 2%, 1%, 0,5% a 0,2%. Připravený postnukleární supernatant (postup stejný jako u předchozích frakcionací) byl smíchán se solubilizačním roztokem Tritonu X-100 daných koncentrací v poměru 1:1 a tato směs byla inkubována na ledu po dobu 1 hodiny. Následný postup frakcionace pomocí ultracentrifugace byl převzat z práce (Rubin & Ismail-Beigi, 2003). Vzorky byly centrifugovány na centrifuze Optima MAX-XP (rotor MLA-80) při 4°C, 128000 g, po dobu 1 hodiny. Byl odebrán supernatant, který odpovídal neraftové frakci, rozpipetován, zamrazen v tekutém dusíku a uchováván v mrazicím boxu při -80°C. Pelet byl resuspendován v 1 ml TME a homogenizován pomocí sklo-teflonového homogenizátoru Eurostar per-b (1200 rpm) posunem pístu 10x nahoru a dolů. Vzniklý homogenát obsahující lipidové rafty byl rozpipetován a alikvoty byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v mrazicím boxu při -80°C.

Stanovení proteinů

Množství proteinů ve všech vzorcích připravených homogenizací a frakcionací srdeční tkáně bylo stanoveno metodou BCA (Bicinchoninic acid protein assay). Jedná se o spektrofotometrické stanovení proteinů. Principem je alkalická redukce měďnatého iontu na iont měďný pomocí proteinu a chelatace tohoto iontu kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku fialového zbarvení. Složení roztoků použitých pro stanovení proteinů je uvedeno v tab. 4.

Tab. 4: Roztoky pro kvantifikaci proteinů

čínidlo A (pH 11,25)	8 g monohydrátu uhličitanu sodného 1,6 g vínanu sodného doplnit H ₂ O do 100 ml
čínidlo B	4 g BCA doplnit H ₂ O do 100 ml
čínidlo C	0,4 g pentahydrátu síranu měďnatého doplnit H ₂ O do 10 ml

Postup práce

Vzorky byly po rozmražení naředěny destilovanou vodou v poměru 1:100 (10 μ l vzorku + 990 μ l vody). Dále byl připraven pracovní roztok, který se skládá z činidel A, B, C v poměru 26 : 25 : 1. Ke stanovení kalibrační křivky je zapotřebí standart BSA (hovězí sérový albumin). Na mikrotitrační destičku byly napipetovány standardy s obsahem proteinů od 0,2 μ g do 50 μ g (tab. 5). Do dalších jamek na destičce byly nanесeny vzorky v triplikátech po 100 μ l a do každé jamky byl přidán smíchaný pracovní roztok (100 μ l). Destička byla přelepena izolepou a inkubována 30 min při 60°C. Vzorky byly následně spektrofotometricky změřeny pomocí přístroje Synergy HT při vlnové délce 562 nm a vyhodnoceny v programu Gen 5.

Tab. 5: Řada standardů pro stanovení kalibrační křivky

číslo standartu	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μg BSA	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 μg · μl ⁻¹) [μl]	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 μg · μl ⁻¹) [μl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H₂O [μl]	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) je metoda využívaná k separaci proteinů na základě odlišné molekulové hmotnosti, při které se uplatňuje elektrické pole. Podstatou je přítomnost aniontového detergentu SDS, který proteiny denaturuje a váže se na ně v poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu. Výsledný komplex získá záporný náboj a je tak umožněn pohyb proteinů v elektrickém poli. Pokud prochází gelem o vhodné porozitě, je pohyblivost dána výhradně velikostí molekuly. Molekulové hmotnosti proteinů se určují na základě srovnání s pohyblivostí standardů o známé molekulové hmotnosti.

Postup práce

Vzorky hrubých membrán byly naředěny Laemmliho puřem na výslednou koncentraci $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Poté byly povařeny při 100°C po dobu 2 minut. Pro elektroforetické pokusy byla použita aparatura Mini-Protean II (Bio-Rad). Separace proteinů probíhala na 10% SDS-polyakrylamidových dělicích gelech namíchaných dle tab. 6 a 7. Na gely bylo navrstveno přibližně 500 μl butanolu nasyceného vodou. Po zpolymerování (cca 40 minut) byl slit butanol, a zbývající prostor skel (cca 1 cm od okraje) byl vyplněn zaostřovacím gelem (složení dle tab. 7). Do zaostřovacího gelu byly vloženy 10-ti jamkové hřebínky a gel byl ponechán polymerizaci přibližně 15 minut. Poté byla skla se zatuhlými gely přendány do elektroforetické vany naplněné running puřem. Do první jamky každého gelu byly nanесeny 2 μl standardu. Do zbývajících jamek byly napipetovány naředěné vzorky hrubých membrán po 7,5 μl na jamku (15 μg proteinu). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 1 hodiny.

Tab. 6: Roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu

30% akrylamid methylenbisakrylamid	– 0,8% N,N'-	30 g akrylamidu 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu doplnit H ₂ O do 100 ml
Pufr 1 (pH 8,8)		18,17 g Tris-HCl doplnit H ₂ O do 100 ml
Pufr 2 (pH 6,8)		6,05 g Tris-HCl doplnit H ₂ O do 100 ml
10% SDS		10 g SDS doplnit H ₂ O do 100 ml
APS		0,1 g APS 1 ml H ₂ O
TEMED		-
Running pufr (10x koncentrovaný)		30,3 g Tris-HCl (pH 6,8) 141,1 g glycinu 10 g SDS doplnit H ₂ O do 100 ml
Laemmliho pufr (4x koncentrovaný) (sample loading buffer)		2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml glycerolu 0,8 g SDS 0,8 g DTT 1 mg bromfenolové modři doplnit H ₂ O do 10 ml

Tab. 7: Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

10% dělicí SDS- polyakrylamidový gel	8 ml H ₂ O
	5 ml pufru 1
	6,7 ml 30% akrylamidu s 0,8% N,N'-methylen bisakrylamidem
	200 µl 10% SDS
	8 µl TEMED
	90 µl 10% APS

4% zaostřovací gel	6 ml H ₂ O
	2,5 ml pufru 2
	1,3 ml 30% akrylamidu s 0,8% N,N'-methylen bisakrylamidem
	100 µl 10% SDS
	8 µl TEMED
	90 µl 10% APS

Western blotting a imunodetekce

Termín „blotování“ označuje přenos biologických vzorků z gelu na membránu a jejich detekci na povrchu membrány. Western blotting se využívá k analýze proteinů, kde k detekci dochází na principu specifity interakce protilátky s antigenem.

Tab. 8: Roztoky pro Western blotting a imunodetekci

TBS pufr (10x koncentrovaný) (pH 8)	21,03 g NaCl 2,9 g Tris doplnit H ₂ O do 240 ml
TGM pufr (blotovací)	15 g Tris 72 g glycinu 1000 ml methanolu doplnit H ₂ O do 5000 ml
Blokovací pufr	1,5 g mléka 50 ml TBS 50 µl Tween 20
Ředící pufr	0,5 g mléka 50 ml TBS 50 µl Tween 20
Promývací pufr	100 ml TBS 900 ml H ₂ O 3 ml Tween 20

Postup práce

Po provedené elektroforetické separaci proteinů byl gel přiložen na nitrocelulózovou membránu a v blotovací aparatuře působením elektrického proudu byly proteiny na tuto membránu přeneseny. Western blotting probíhal za konstantního napětí 100 V po dobu 1 hodiny. Poté byly membrány přeneseny do blokovacího pufru (10 ml na 1 membránu) a při laboratorní teplotě inkubovány 30 minut na kývačce.

Mezitím byl připraven zředěný roztok primárních protilátek v ředícím pufru (ředění podle tab. 9). Membrány byly vloženy do tohoto roztoku a do druhého dne inkubovány při 4°C na kývačce. Následující den byly membrány opláchnuty destilovanou vodou a 3 x 10 minut promývány v promývacím pufru. Poté byly membrány vloženy do připraveného roztoku naředěných sekundárních protilátek (tab. 9) značených křenovou peroxidázou a inkubovány na kývačce při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Membrány byly opět promyty 3 x 10 minut v promývacím pufru, opláchnuty destilovanou vodou, vysušeny filtračním papírem a inkubovány 1 minutu se substrátovým roztokem křenové peroxidázy (Pierce Super Signal). Membrány byly za tmy přiloženy na film a exponovány obvykle po dobu 5 - 30 minut, v závislosti na použité primární protilátce. K vyvolání filmu byl použit přístroj Optimax (Fomei) a výsledky byly vyhodnoceny v programu ImageJ.

Tab. 9: Seznam primárních a sekundárních protilátek s použitým ředěním

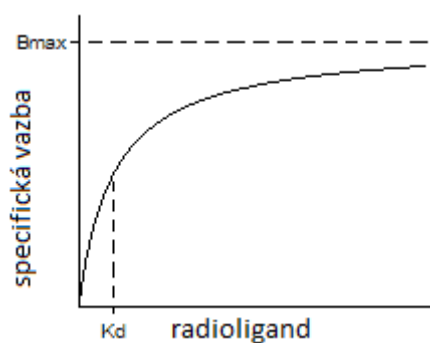
primární protilátka	dodavatel	ředění	sekundární protilátka	ředění
A1-R	Santa Cruz	1000x	anti-goat	40 000x
A1-R	Santa Cruz	1000x	anti-rabbit	40 000x
A2A-R	Santa Cruz	1000x	anti-rabbit	40 000x
A2B-R	Santa Cruz	1000x	anti-rabbit	40 000x
A3-R	Santa Cruz	1000x	anti-rabbit	40 000x
CD71	Santa Cruz	1000x	anti-mouse	20 000x
kaveolin-1	Santa Cruz	10 000x	anti-rabbit	40 000x

Vazebné pokusy

Jedním z nejběžnějších metod pro detekci receptorů na membránách je použití radioaktivně značené látky s vysokou afinitou a selektivitou k danému receptoru. Množství vytvořeného komplexu radioligand-receptor je poté možno díky radioaktivitě měřit. Mezi základní typy vazebných pokusů patří saturační pokusy (určují afinitu radioligandu k receptoru a maximální vazebnou kapacitu), kompetiční pokusy (určují afinitu neznačeného ligandu, jeho kompetici s radioligandem) a kinetické pokusy (rychlost asociace a disociace radioligandu).

Saturační pokusy

V mých pokusech byly použity saturační studie. Slouží k určení maximální vazebné kapacity tkáně (pokud jeden receptor váže pouze jeden ligand, jedná se také o počet receptorů ve vzorku; B_{max}). Pomocí těchto pokusů se určuje také rovnovážná disociační konstanta (K_d), která odpovídá koncentraci radioligandu, při které je obsazena právě polovina vazebných míst. Principem je měření množství specificky navázaného radioligandu v závislosti na jeho rostoucí koncentraci (obr. 4). Postupně se zvyšuje množství vázaného ligandu, dokud nejsou obsazeny všechny receptory. V pokusech bylo použito 6 koncentrací radioligandu vytvořených polovičním ředěním předchozí koncentrace (4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM a 0,125 nM). Jako radioligand byl použit vysoce selektivní antagonist A₁ receptoru [³H]DPCPX (specifická aktivita 266400 dpm).



Obr. 4: Vazebná křivka radioligandu.

Tab. 10: Roztoky pro vazebné pokusy

promývací pufr (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂
	doplnit H ₂ O do 1000 ml
inkubační pufr (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM kyselina askorbová
	doplnit H ₂ O do 5000 ml

Postup práce

Vzorky hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor myokardu potkana byly po rozmrazení naředěny inkubačním pufrém tak, aby množství ve 100 μ l bylo 200 μ g proteinu. Složení pufrů použitých pro vazebné studie je uvedeno v tab. 10. Takto naředěná tkáň byla preinkubována 30 minut s enzymem adenosindeaminázou, aby došlo k degradaci veškerého intracelulárního adenosinu a byl tak eliminován jeho vliv na vazebné vlastnosti receptorů. V 6-ti zkumavkách byla vytvořena ředící řada radioaktivního ligandu [³H]DPCPX, kdy z nejvyšší koncentrace 4 nM bylo následujících 5 vytvořeno vždy polovičním ředěním v inkubačním pufru. Pokusy byly prováděny v triplikátech. Nеспецифická vazba byla zajištěna neznačeným ligandem DPCPX v 1 μ M koncentraci. Do zkumavek byl napipetován inkubační pufr, tkáň, radioaktivní a nспецифický ligand dle následující tabulky (tab. 11). Zkumavky byly inkubovány při 25°C po dobu 2 hodin. Reakce byla ukončena promýváním 4 x 4 ml promývacího pufru přes filtry Whatman GF/B předem namočené v 0,3% roztoku polyethyleniminu (PEI). Filtry byly přeneseny do scintilačních lahvíček a zality 4 ml scintilačního roztoku RotiZcint. Měření vzorků bylo provedeno metodou kapalně scintilační spektrometrie pomocí scintilačního počítače Ray-Test.

Tab. 11: Dávkovací schéma

	[H ³]DPCPX	tkáň	DPCPX	pufr
celková vazba (μl)	100	100	-	50
nespecifická vazba (μl)	100	100	50	-

Vyhodnocení dat:

K vyhodnocení naměřené radioaktivity byl použit program Microsoft Excel a GraphPad Prism 6. Při vyhodnocování byla určena koncentrace radioligandu před inkubací (T), celková vazba radioligandu (C) a nespecifická vazba (N_s). Koncentrace radioligandu byla naměřena odebráním a změřením 100 μl z ředící řady radioligandu (stejně množství, jako bylo pipetováno do zkumavek). Celková vazba odpovídala radioaktivitě zachycené na filtrech. Nespecifická vazba byla naměřena na vzorcích inkubovaných s neznačeným radioligandem DPCPX. Množství specificky vázaného ligandu (B) bylo vypočítáno jako rozdíl celkové a nespecifické vazby (C – N_s). Množství volného radioligandu odpovídalo rozdílu původní koncentrace radioligandu a celkové vazby (T – C).

Získané hodnoty byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 6 pomocí nelineární regrese. Hodnoty K_d a B_{max} byly získány nelineární regresní analýzou dat z rovnice:

$$B = \frac{B_{\max} \cdot [F]}{K_d + [F]}$$

kde B je množství specificky vázaného ligandu, [F] je koncentrace volného radioligandu, B_{max} je maximální vazebná kapacita tkáně a K_d je rovnovážná disociační konstanta.

Stanovení aktivity adenylycyklázy

Adenylycykláza je enzym katalyzující přeměnu ATP na cAMP. Aktivita je ovlivňována stimulačními nebo inhibičními G proteiny, na základě interakce aktivované α -podjednotky G proteinu s enzymem. V pokusech byla aktivita adenylycyklázy stanovena pomocí radioaktivně značeného substrátu [α - ^{32}P]ATP. K oddělení vytvořeného [α - ^{32}P]cAMP byla využita metoda sloupcové chromatografie se stacionární pevnou fází v podobě neutrálního oxidu hlinitého. Principem je vychytávání multivalentních nukleotidů (značený substrát [α - ^{32}P]ATP neprojde) a propouštění malých monovalentních nukleotidů ([α - ^{32}P]cAMP). Účinnost kolon byla zjišťována měřením [^3H]cAMP, který byl přítomen v reakční směsi.

Tab. 12: Roztoky pro stanovení aktivity adenylycyklázy

reakční směs	48 mM Tris-HCl (pH = 8) 0,5 mM MgCl ₂ 20 μM GTP 0,8 mg/ml BSA 100 μM rolipram 5 mM KPEP 3,2 U pyruvátkináza 100 mM NaCl 0,1 mM cAMP 15000 cpm [^3H]cAMP
substrátová směs	0,1 M ATP 1 000 000 cpm/10 μl [α - ^{32}P]ATP doplnit H ₂ O na výsledný objem

Použité stimulanty:

1 mM forskolin, 1 mM isoprenalin, 1 mM CGS-21680, 1 mM CPA

Postup práce:

Vzorky plazmatických membrán izolovaných z levé komory myokardu potkana byly po rozmražení naředěny na koncentraci 3 mg/ml pomocí pufru TME. Na ledu byly naředěny stimulanty a připravena reakční směs (složení podle tab. 12). Pokusy byly prováděny v triplicátech. Do mikrozkušavek byla napipetována voda, stimulanty, reakční směs a tkáň dle následujícího schématu (tab. 13). Byla naředěna substrátová směs. Před přidáním substrátu byla každá mikrozkušavka s reakční směsí inkubována ve vodní lázni při 32°C po dobu 1 minuty. Po přidání směsi byly mikrozkušavky inkubovány opět ve vodní lázni při 32°C po dobu 30 minut. Reakce byla zastavena přidáním 200 µl 0,5 M HCl. Následovala inkubace směsi při 100°C po dobu 5 minut. Obsah mikrozkušavek byl neutralizován přidáním 200 µl 1,5 M imidazolu a přenesen na kolony obsahující 1 g oxidu hlinitého. Na směs bylo navrstveno 3 ml 10 mM imidazolu (pH 7,6) a při laboratorní teplotě byly kolony ponechány přibližně 30 minut, zatímco směs prokapávala do scintilačních lahvíček. Do lahvíček bylo přidáno 7 ml scintilačního roztoku RotiZcint. Vzorky byly proměřeny duálním programem na radioaktivitu ^{32}P a ^3H pomocí scintilačního počítače Ray-Test. Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 6.

Tab. 13: Dávkovací schéma

	H ₂ O	stimulant	reakční směs	tkáň	substrátová směs
blank (µl)	50	-	40	-	10
bazální aktivita (µl)	30	-	40	20	10
stimulovaná aktivita (µl)	20	10	40	20	10

Vyhodnocení dat:

Výsledné množství vytvořeného cAMP bylo vypočítáno ze zjištěných hodnot radioaktivity ^3H a ^{32}P vyjádřených v počtu impulzů za minutu (cpm – counts per minute). Účinnost kolon byla stanovena měřením $[^3\text{H}]\text{cAMP}$, který byl přítomen v reakční směsi. Naměřená data radioaktivity ^{32}P byla korigována na kolonu a blank a zprůměrována pro každý triplikát (výpočet v jednotkách cpm). Předpokládá se, že adenylcykláza vytvoří přibližně stejné množství cAMP z ATP jako $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ z $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Poměr $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}/[^{32}\text{P}]\text{ATP} = \text{cAMP}/\text{ATP}$ je tedy zachován:

$$\text{cAMP} = \frac{[^{32}\text{P}]\text{cAMP} \cdot \text{ATP}}{[^{32}\text{P}]\text{ATP}}$$

Vydělením množství $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ vloženým množstvím $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (oboje v jednotkách cpm) a vynásobením množstvím vloženého neradioaktivního ATP (nmol), získáme množství vytvořeného cAMP (nmol). Aktivitu adenylcyklázy pak přepočítáme na jednotky pmol/min (vydělením množství vytvořeného cAMP v pmol dobou inkubace se substrátem). Výsledná aktivita enzymu se standardně vztahuje na mg proteinu (pmol cAMP · min⁻¹ · mg⁻¹ proteinu).

Statistické zpracování výsledků

Naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Excel 2010. Výsledky jsou udávány jako aritmetický průměr se střední chybou průměru (S.E.M.). Statisticky byly výsledky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 6 za použití jednovýběrového t-testu. Signifikance byla hodnocena podle rozdílu na hladině významnosti $p < 0,05$.

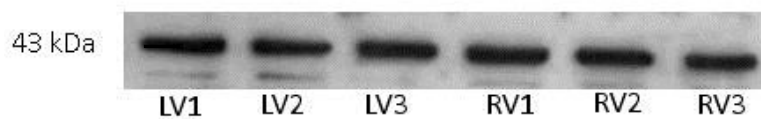
VÝSLEDKY

Charakterizace adenosinových receptorů pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blottingu

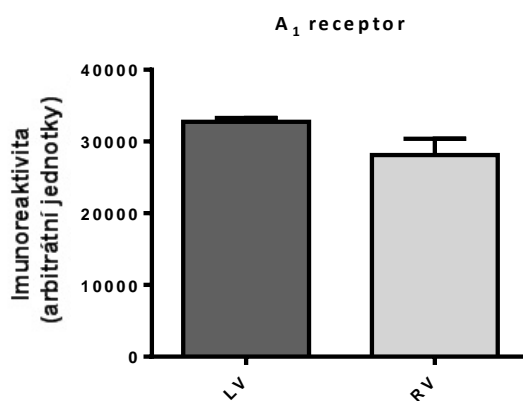
SDS-PAGE elektroforéza, Western blotting a imunodetekce byly metody použité k charakterizaci množství adenosinových receptorů v hrubých membránách myokardu potkana. Byly použity vzorky izolované z pravých a levých komor myokardu potkana a také vzorky izolovaných lipidových raftů z levých komor potkana. Pomocí protilátek pro A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 receptory byla kvantifikována jejich distribuce v myokardu potkana. Zároveň bylo zjišťováno jejich zastoupení v rámci levé a pravé komory. U vzorků lipidových membrán izolovaných pomocí detergentu Tritonu X-100 bylo porovnáváno zastoupení adenosinových receptorů v lipidové a solubilní frakci. Pro kvantifikaci jednotlivých frakcí byly na vzorcích detekovány markerové proteiny. Byly zvoleny protilátky proti kaveolinu-3 pro určení lipidové frakce a CD71 pro solubilní část.

Exprese A_1 receptoru

A_1 receptor byl pomocí specifických protilátek imunochemicky identifikován na vzorcích pravých i levých komor myokardu potkana v oblasti molekulární hmotnosti 43 kDa (obr. 5). Po porovnání imunochemického signálu vzorků pravých a levých komor nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v jejich distribuci (graf č. 1).



Obr. 5: Immunoblot ukazující distribuci A_1 receptoru.



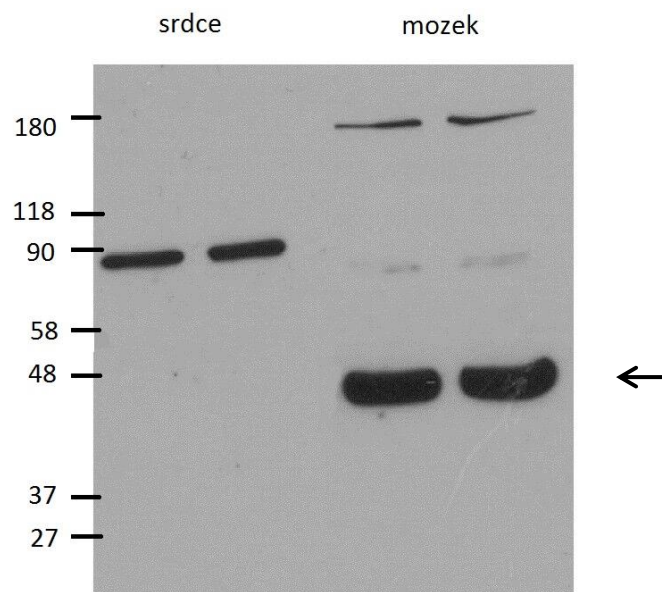
Graf č. 1: Grafické znázornění relativní exprese A_1 receptoru v levých a pravých komorách myokardu potkana.

Graf znázorňuje porovnání relativní exprese proteinů (\pm S.E.M.) ve vzorcích hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor myokardu potkana. Imunoreaktivita A_1 receptoru je na ose y vyjádřena jako optická denzita imunochemického signálu vyjádřena v arbitrárních jednotkách.

LV – levá komora, RV – pravá komora.

Expresi A_{2A} receptoru

Pomocí metod elektroforézy a Western blottingu se nepodařilo detekovat monomer A_{2A} receptoru na vzorcích hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor potkana. Na obr. 6 lze vidět expresi A_{2A} receptoru na vzorcích mozkové tkáně v oblasti kolem 45 kDa. Na srdeční tkáni byl detekován imunochemický signál v oblasti kolem 90 kDa, což by měl být receptorový dimer.

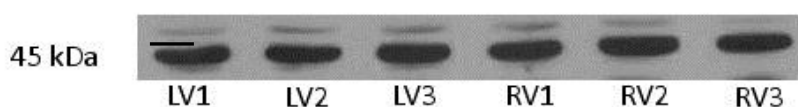


Obr. 6: Immunoblot ukazující relativní distribuci A_{2A} receptoru ve vzorcích srdce a mozku potkana.

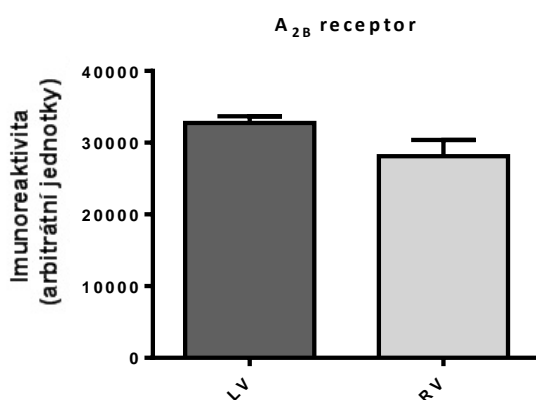
Čísla na levé straně blotu znázorňují molekulové hmotnosti standardu v kDa. Šipka značí oblast předpokládaného výskytu A_{2A} receptoru. Porovnáním vzorků srdce a mozku lze vidět silný signál receptoru v mozku, naopak žádný u srdce. V srdeční tkáni je viditelný signál v oblasti kolem 90 kDa a zřejmě by se mohlo jednat o dimer A_{2A} receptoru.

Expresa A_{2B} receptoru

A_{2B} receptor byl pomocí specifických protilátek imunochemicky identifikován na vzorcích pravých i levých komor myokardu potkana v oblasti molekulární hmotnosti 45 kDa (obr. 7). Po porovnání imunochemického signálu vzorků pravých a levých komor nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v jejich distribuci (graf č. 2).



Obr. 7: Imunoblot ukazující distribuci A_{2B} receptoru.



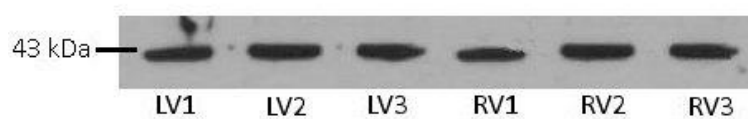
Graf č. 2: Grafické znázornění relativní exprese A_{2B} receptoru v levých a pravých komorách myokardu potkana.

Graf znázorňuje porovnání relativní exprese proteinů (\pm S.E.M.) ve vzorcích hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor myokardu potkana. Imunoreaktivita A_{2B} receptoru je na ose y vyjádřena jako optická denzita imunochemického signálu vyjádřena v arbitrárních jednotkách.

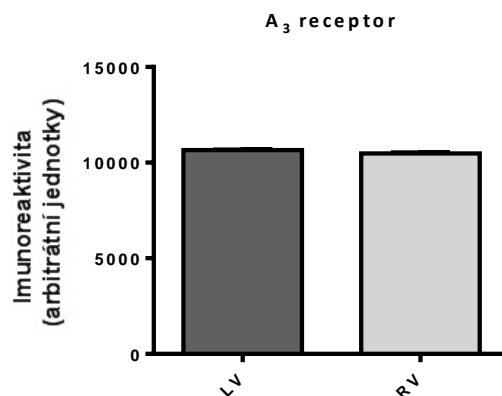
LV – levá komora, RV – pravá komora.

Expres A₃ receptoru

A₃ receptor byl pomocí specifických protilátek imunochemicky identifikován na vzorcích pravých i levých komor myokardu potkana v oblasti molekulární hmotnosti 43 kDa (obr. 8). Po porovnání imunochemického signálu vzorků pravých a levých komor nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v jejich distribuci (graf č. 3).



Obr. 8: Imunoblot ukazující distribuci A₃ receptoru.



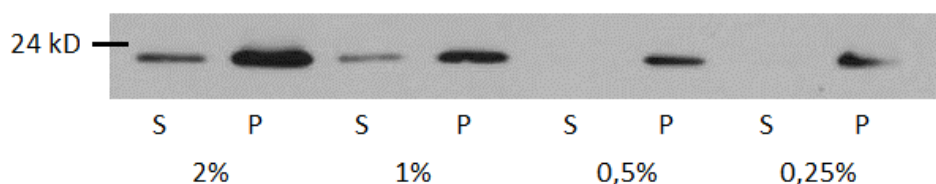
Graf č. 3: Grafické znázornění relativní exprese A₃ receptoru v levých a pravých komorách myokardu potkana.

Graf znázorňuje porovnání relativní exprese proteinů (\pm S.E.M.) ve vzorcích hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor myokardu potkana. Imunoaktivita A₃ receptoru je na ose y vyjádřena jako optická denzita imunochemického signálu vyjádřena v arbitrárních jednotkách.

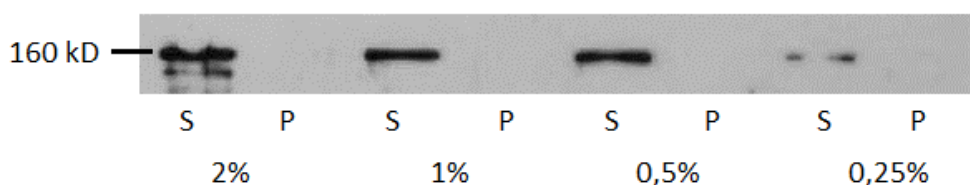
LV – levá komora, RV – pravá komora.

Membránové mikrodomény

Studium distribuce adenosinových receptorů bylo prováděno na vzorcích lipidových membrán a solubilní frakce separované Tritonem X-100. Pro znázornění jednotlivých frakcí byly použity markery – pro frakci lipidových raftů kaveolin (obr. 9), pro solubilní frakci transferinový receptor CD71 (obr. 10). A_1 a A_{2B} receptory byly spolehlivě detekovány pouze v solubilní frakci (graf č. 4 a 5). A_{2A} a A_3 receptory vykazovaly signál jak v solubilní, tak lipidické frakci, ale bez významných rozdílů mezi frakcemi (graf č. 6). U A_{2A} receptoru se nepodařilo získat hodnotitelné výsledky, signál v obou frakcích byl však zřetelný (obr. 11).



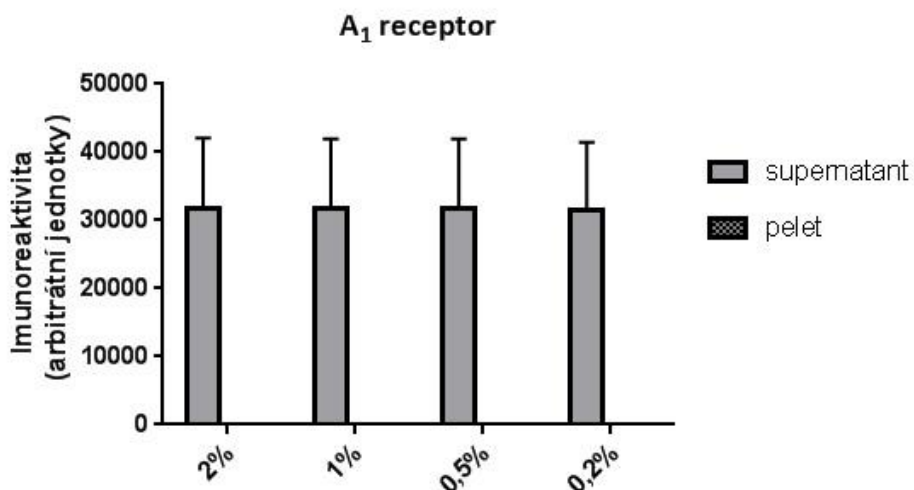
Obr. 9: Imunoblot ukazující distribuci kaveolinu.



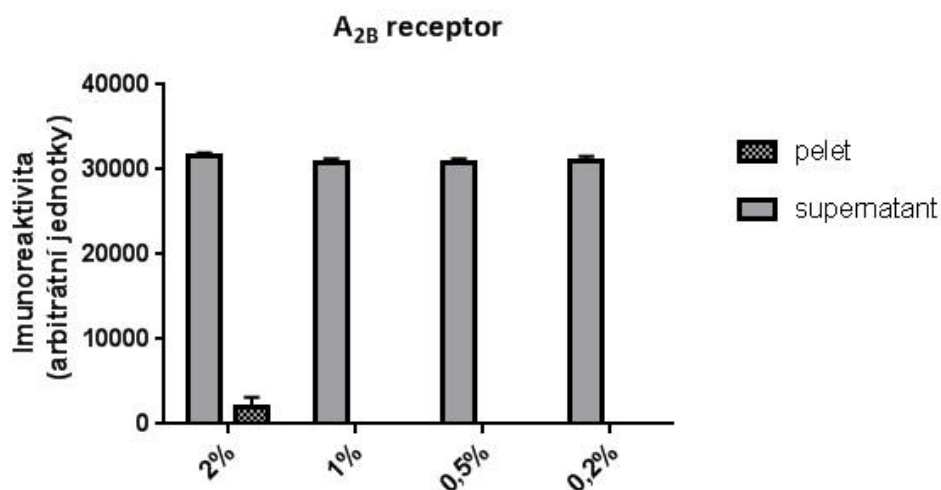
Obr. 10: Imunoblot ukazující distribuci transferinového receptoru CD71.

Čísla na levé straně blotů znázorňují molekulové hmotnosti standardu v kDa. Procenta vyjadřují použitou koncentraci Tritonu X-100.

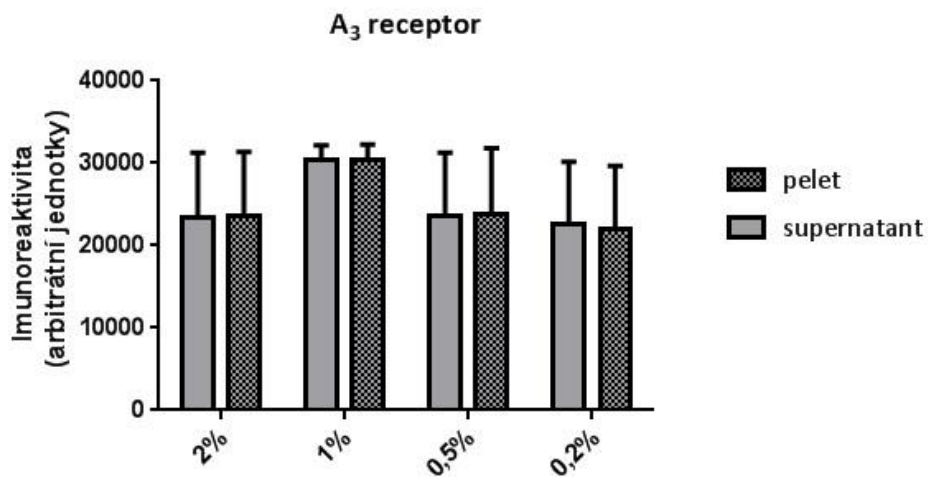
S – supernatant (solubilní frakce), P – pelet (lipidová frakce).



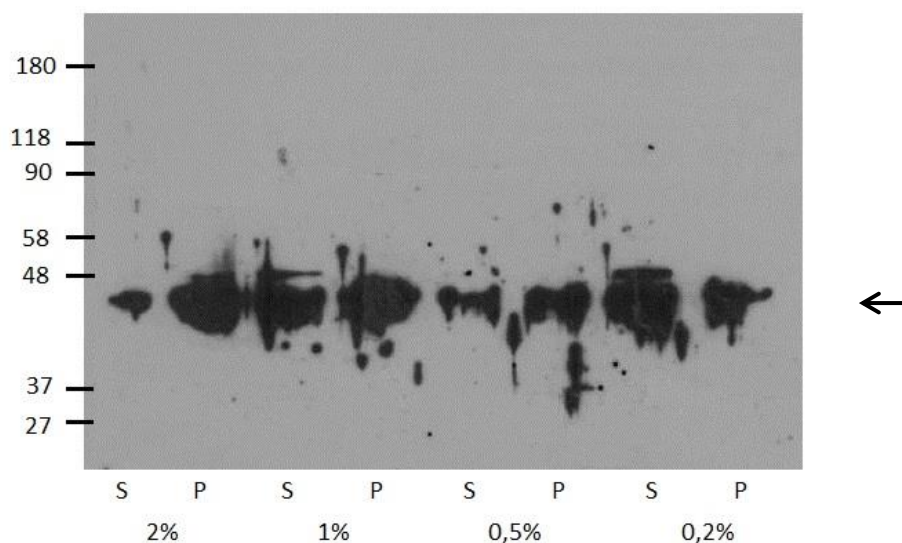
Graf č. 4: Grafické znázornění relativní exprese A₁ adenosinových receptorů v membránových mikrodoménách izolovaných Tritonem X-100. K izolaci byly použity 4 koncentrace Tritonu. Je zde vyjádřena úroveň relativní exprese receptorů jako optická densita imunochemického signálu lipidových domén (pelet) a solubilních proteinů (supernatant). Imunochemický signál byl detekován pouze v solubilní frakci.



Graf č. 5: Grafické znázornění relativní exprese A_{2B} adenosinových receptorů v membránových mikrodoménách izolovaných Tritonem X-100. K izolaci byly použity 4 koncentrace Tritonu. Je zde vyjádřena úroveň relativní exprese receptorů jako optická densita imunochemického signálu lipidových domén (pelet) a solubilních proteinů (supernatant). Imunochemický signál byl detekován pouze v solubilní frakci a nesignifikantní množství v lipidové frakci 2% Tritonu.



Graf č. 6: Grafické znázornění relativní exprese A₃ adenosinových receptorů v membránových mikrodoménách izolovaných Tritonem X-100. K izolaci byly použity 4 koncentrace Tritonu. Je zde vyjádřena úroveň relativní exprese receptorů jako optická denzita imunochemického signálu lipidových domén (pelet) a solubilních proteinů (supernatant). Po porovnání exprese v supernatantu a peletu nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.



Obr. 11: Imunoblot ukazující distribuci A_{2A} receptoru v membránových mikrodoménách izolovaných Tritonem X-100.

Čísla na levé straně blotu znázorňují molekulové hmotnosti standardu v kDa. Šipka značí oblast předpokládaného výskytu A_{2A} receptoru.

S – supernatant, P – pelet.

Vazebné pokusy

Vazebné vlastnosti A_1 receptoru byly stanoveny pomocí saturačních studií měřením specifické vazby antagonisty $[H^3]DPCPX$. Pokusy byly prováděny na vzorcích hrubých membrán izolovaných z levých komor myokardu potkana. Byla stanovena maximální vazebná kapacita (B_{max}) a rovnovážná disociační konstanta (K_d). Měření probíhalo na principu specifické vazby $[H^3]DPCPX$, v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. K pokusům bylo použito celkem 6 koncentrací radioligandu (4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM, 0,125 nM). Nespecifická vazba byla určena na základě vazby neznačeného ligandu DPCPX. Pokusy byly prováděny zvlášť pro levou a pravou komoru. Pro obě komory byly pokusy opakovány 4x a každý pokus byl navržen v triplikátech. Graficky je znázorněn jeden pokus pro pravou i levou komoru.

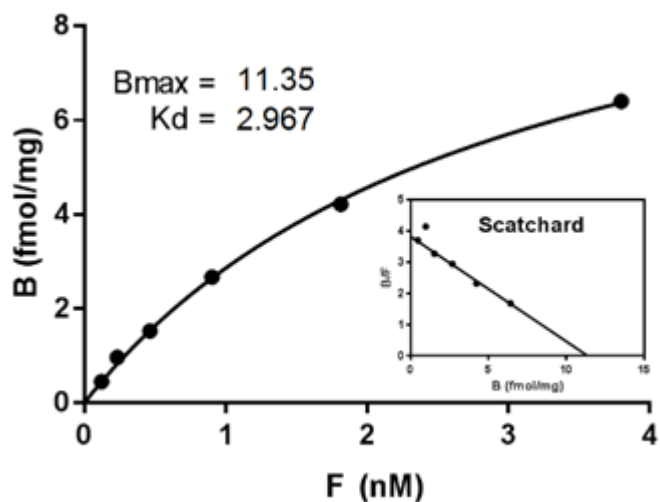
U vzorků pravých komor byla naměřena hodnota B_{max} $12,61 \pm 2,03 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ a K_d $1,53 \pm 0,22 \text{ nM}$, u vzorků levých komor B_{max} $10,96 \pm 2,08 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ a K_d $2,08 \pm 0,42 \text{ nM}$ (tab. 14). Pro pravou i levou komoru byla vytvořena saturační křivka vazby radioligandu (graf č. 7 a 9) a vazebná křivka ukazující celkovou, nespecifickou a specifickou vazbu radioligandu (graf č. 8 a 10).

Tab. 14: Hodnoty B_{max} a K_d u vzorků hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor myokardu potkana.

	B_{max} (fmol · mg ⁻¹)	K_d (nM)
LV	$10,96 \pm 2,08$	$2,08 \pm 0,42$
RV	$12,61 \pm 2,03$	$1,53 \pm 0,22$

Parametry jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ze 4 pokusů (\pm S.E.M.) provedených v triplikátech.

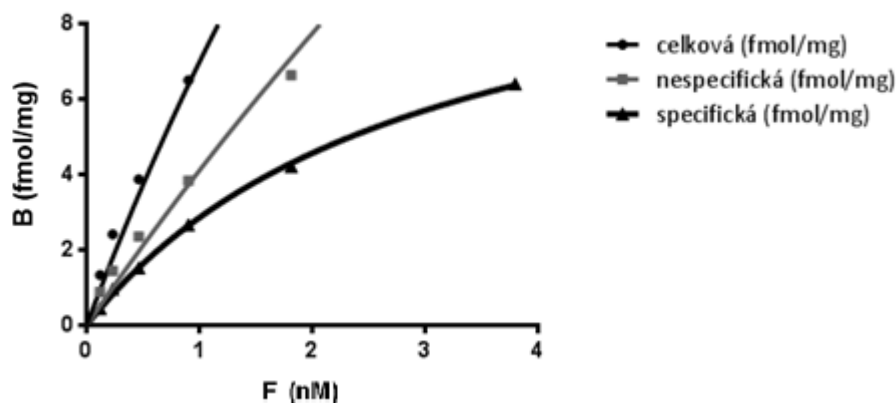
LV – levé komory, RV – pravé komory, B_{max} – maximální vazebná kapacita, K_d – rovnovážná disociační konstanta.



Graf č. 7: Saturační křivka $[H^3]DPCPX$ u vzorků levé komory.

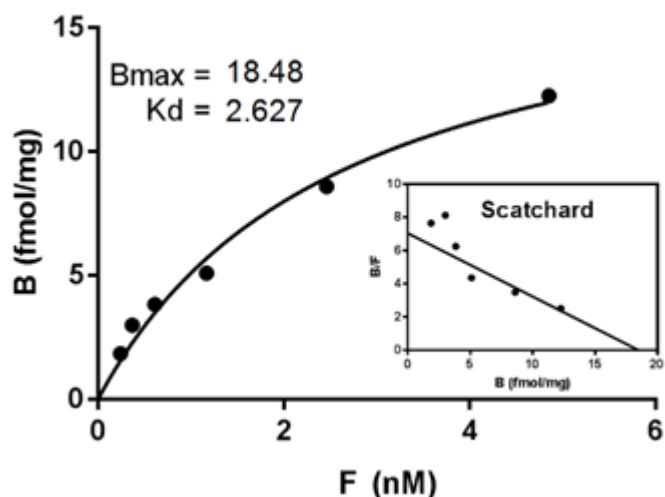
Saturační vazebná křivka získaná nelineární regresní analýzou dat vyjadřujících specifickou vazbu $[H^3]DPCPX$ k A_1 receptorům na hrubých membránách izolovaných z levé komory myokardu potkana. Graf znázorňuje závislost specifické vazby na rostoucí koncentraci radioligandu (0,125 – 4 nM).

B – množství specificky vázaného $[H^3]DPCPX$ k A_1 receptorům, F – koncentrace volného $[H^3]DPCPX$, B_{max} – maximální vazebná kapacita, K_d – rovnovážná disociační konstanta.



Graf č. 8: Vazebná křivka $[H^3]DPCPX$ ve vzorcích hrubých membrán levých komor potkanů znázorňující celkovou, specifickou a nescifickou vazbu.

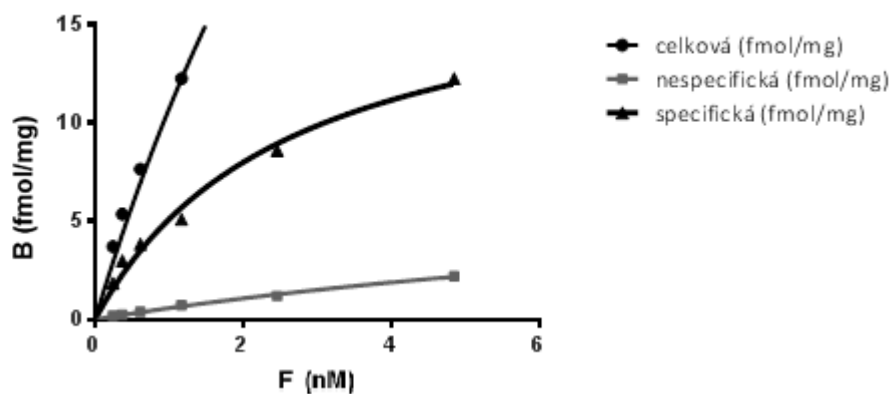
Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl hodnot celkové a nescifické vazby. Graf znázorňuje závislost vázaného $[H^3]DPCPX$ (v počtech přeměn za minutu – dpm) na rostoucí koncentraci radioligandu (0,125 – 4 nM).



Graf č. 9: Saturační křivka $[H^3]DPCPX$ u vzorků pravé komory.

Saturační vazebná křivka získaná nelineární regresní analýzou dat vyjadřujících specifickou vazbu $[H^3]DPCPX$ k A_1 receptorům na hrubých membránách izolovaných z pravé komory myokardu potkana. Graf znázorňuje závislost specifické vazby na rostoucí koncentraci radioligandu (0,125 – 4 nM).

B – množství specificky vázaného $[H^3]DPCPX$ k A_1 receptorům, F – koncentrace volného $[H^3]DPCPX$, B_{max} – maximální vazebná kapacita, K_d – rovnovážná disociační konstanta.

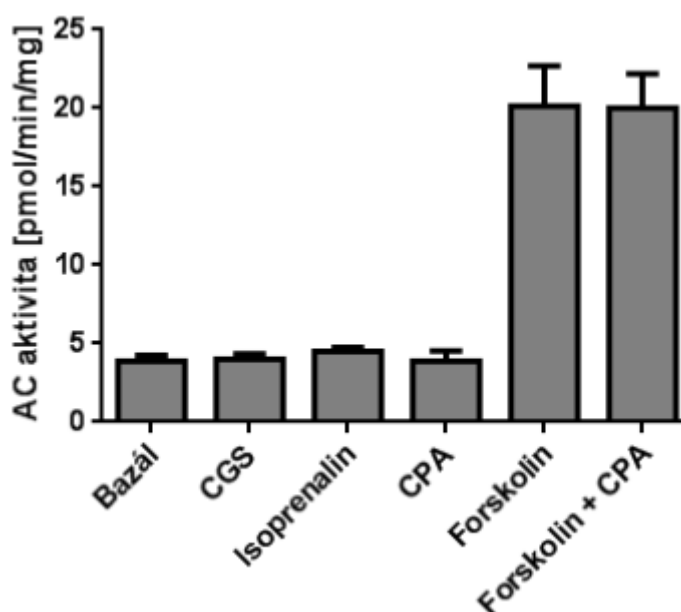


Graf č. 10: Vazebná křivka $[H^3]DPCPX$ ve vzorcích hrubých membrán pravých komor potkanů znázorňující celkovou, specifickou a nespecifickou vazbu.

Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl hodnot celkové a nespecifické vazby. Graf znázorňuje závislost vázaného $[H^3]DPCPX$ (v počtech přeměn za minutu – dpm) na rostoucí koncentraci radioligandu (0,125 – 4 nM).

Aktivita adenylylcyklázy

Aktivita adenylylcyklázy byla měřena na vzorcích plazmatických membrán izolovaných z levých komor myokardu potkana. Jako substrát bylo použito radioaktivně značené $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Oddělení vytvořeného $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ proběhlo pomocí sloupcové chromatografie na stacionárním nosiči oxidu hlinitém. V pokusech byla měřena bazální aktivita adenylylcyklázy a její stimulace přidáním forskolinu, isoprenalinu nebo CGS-21680 a inhibice pomocí CPA. Aktivitu adenylylcyklázy se podařilo stimulovat forskolinem, avšak u isoprenalinu a CGS byla stimulace zanedbatelná. Podobně ligand CPA aktivitu inhiboval pouze asi o 5% v porovnání s bazální aktivitou. Inhibice forskolinem stimulovaného enzymu byla také zcela nesignifikantní (graf č. 11).



Graf č. 11: Porovnání bazální a stimulované aktivity adenylylcyklázy na vzorcích plazmatických membrán izolovaných z levých komor myokardu potkana.

Zpracované vzorky byly měřeny na množství radioaktivity ^3H a ^{32}P v jednotkách počtu rozpadů za minutu (dpm). Naměřené hodnoty byly přepočítány a byl vytvořen graf, který znázorňuje porovnání aktivity stimulované adenylylcyklázy vyjádřené jako koncentrace vytvořeného $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ v pmol za minutu vztahované na mg proteinu. Byla zkoumána přímá inhibice a stimulace enzymu, ale také předpokládaná inhibice forskolinem stimulované aktivity pomocí ligandu adenosinových A_1 receptorů CPA.

DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat distribuci a signalizaci adenosinových receptorů v myokardu potkana. Adenosin je téměř všudypřítomný nukleosid, jehož hlavním zdrojem je ATP. Produkce adenosinu je spjatá s metabolismem ATP, molekulou, který představuje hlavní zdroj energie v buňce. Adenosin je proto významnou signalizační molekulou při metabolickém či oxidačním stresu buňky. V kardiovaskulární tkáni je intenzivně studována ochrana při ischemickém a reperfučním poškození. Adenosinový systém vykazuje protekční účinky při pre- i postconditioningu srdce a je proto jednou z velmi studovaných kardioprotektivních signálních systémů (Andreadou *et al.*, 2008). Jednotlivé adenosinové receptory mají unikátní strukturu, vlastnosti a spouští specifické signalizační dráhy. Proto jsme se v rámci této diplomové práce zaměřili také na porovnání exprese adenosinových receptorů na srdci, možný rozdíl v distribuci mezi pravou a levou komorou a celkové srovnání výskytu jednotlivých receptorových podtypů. Hlavní signalizační dráha spouštěná aktivací adenosinových receptorů vede přes aktivaci nebo inhibici adenyllycyklázy a tvorby cAMP. V srdečních komorách je nejvýznamnější anti- β -adrenergní efekt A_1 receptoru, který inhibicí adenyllycyklázy potlačuje účinky β -adrenergních agonistů (Mustafa *et al.*, 2009). V této diplomové práci jsme pozorovali vliv agonistů A_1 a A_2 adenosinových receptorů na aktivitu adenyllycyklázy, stejně jako případnou inhibici již stimulované adenyllycyklázy A_1 receptorem.

Výchozím materiálem pro měření pomocí Western blottingu byly hrubé membrány pravých a levých komor potkana. Během optimalizace pokusů byly testovány různé primární protilátky (králičí, kozí, myší) od různých firem, ze kterých byly vybrány jedny pro každý receptorový podtyp (viz tabulka č. 9) a všechny pokusy dále probíhaly za stejných podmínek. Vzhledem k charakteru metody bylo provedeno mnoho opakování každého pokusu (za stejných podmínek, zvolených dle předchozích optimalizačních pokusů), pro získání minimálně tří konzistentních výsledků k vyhodnocení. V případě A_1 , A_{2B} ani A_3 receptoru nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi pravou a levou komorou. U A_1 a A_{2B} receptoru byla patrná tendence ke snížené

expresi v pravých komorách, ale vzhledem k poměrně vysokým odchylkám mezi jednotlivými pokusy nebyly rozdíly statisticky významné. Pro A_{2A} receptor se nepodařilo získat konzistentní hodnotitelné výsledky. Pro vyloučení vlivu protilátek nebo špatného nastavení pokusu (ředění, doba inkubací) byl pro porovnání detekce receptoru testován také vzorek mozkové tkáně (kortex) potkana. Relativně velké odchylky při replikaci pokusů mohly být způsobeny charakterem metod gelové elektroforézy a imunoblotingu. Hlavním problémem je poměrně nízká exprese adenosinových receptorů v srdci (viz dále výsledky vazebných studií) a při použití vzorků hrubých membrán je zřejmé, že detekce pomocí imunoblotingu není spolehlivou metodou. Vhodnějším materiálem by mohly být plazmatické membrány, ale vzhledem k potřebě relativně velkého množství tkáně pro optimalizace a více opakování samotných pokusů byly zvoleny vzorky hrubých membrán kvůli většímu výtěžku při jejich separaci. Plazmatické membrány byly použity pro pokusy se stanovením aktivity adenylylcyklázy.

Další měření pomocí imunoblotů bylo provedeno na vzorcích lipidových raftů a solubilní frakce separované detergentem Tritonem X-100 ve 4 různých koncentracích (2%, 1%, 0,5% a 0,2%). Jako marker lipidové frakce byl použit caveolin-1 a pro solubilní frakci transferinový receptor CD71. Adenosinové receptory patří mezi receptory spřažené s G proteiny. Mnoho studií popisuje výskyt G proteinů v membránových mikrodoménách a protože z hlediska účinnosti a selektivity signalizačních drah je významná jejich kolokalizace, předpokládá se membránová kompartmentalizace i u adenosinových receptorů (Lasley, 2011). Tuto teorii podporuje výskyt ekto-5'-nukleotidázy CD73 v caveolách, což je GPI-kotvený protein, který defosforyluje extracelulární AMP na adenosin (Forsman & Gustafsson, 1985). Adenosin je poměrně labilní molekula, která rychle podléhá degradaci na inosin. Společný výskyt enzymu tvořícího adenosin a receptoru, který zprostředkovává jeho buněčnou signalizaci, je proto nezbytné pro efektivní přenos signálu. Jeden z prvních adenosinových receptorů studovaný v souvislosti membránových mikrodomén byl A_1 receptor. Adenosin a acetylcholin vykazují podobné efekty v srdečních komorách. Prvotní hypotéza tedy předpokládala translokaci stimulovaného A_1 receptoru do caveol. Výsledek studie však ukázal opačný jev. V nestimulovaných vzorcích srdečních komor bylo detekováno cca

67% A₁ receptorů v kaveolách, zatímco po aktivaci agonistou došlo k translokaci receptoru z kaveol (Lasley et al., 2000).

K potvrzení správné izolace frakce obsahující lipidové rafty byl v našich pokusech použit marker kaveol, kaveolin-3. Na obr. 9, který znázorňuje výřez imunoblotu znázorňujícího detekci kaveolinu-3 na vzorcích lipidové a solubilní frakce lze vidět, že u všech koncentrací Tritonu je kaveolin detekován v raftech. Ve vzorku izolovaném 2% Tritonem je slabý signál i v solubilní frakci, což znamená, že se jedná o příliš vysokou koncentraci detergentu a při izolaci jsou částečně rozpouštěny i lipidové rafty. Nejpoužívanější koncentrace Tritonu pro izolaci lipidových mikrodomén bývá 1%, která se potvrdila jako nejvhodnější i v našich pokusech. Výsledky detekce A₁ receptoru nepotvrdily jeho výskyt v raftech. Všechny provedené imunoblotty ukazovaly silný signál v solubilní frakci, zatímco ve vzorcích frakce obohacené lipidovými rafty žádný (pouze jeden imunoblot znázorňoval slabý signál u frakcí lipidových raftů izolovaných 2% Tritonem). Toto je odlišný výsledek než publikovali Lasley *et al.*, 2000. Důvodem této nesrovnalosti může být jiný postup použitý pro přípravu raftů (detergentová izolace versus použití alkalického uhličitanu). Možnou příčinou námi zjištěného výskytu veškerých A₁ receptorů v solubilní části mohou být specifické vlastnosti těchto receptorů, které jim zabraňují v asociaci s rafty připravenými pomocí Tritonu X-100, tedy charakter membrán izolovaných detergentem. Principem izolace raftů pomocí detergentu je nerozpustnost tuhých částí membrány (tvořených převážně sfingolipidy a cholesterolem). Stupeň nerozpustnosti závisí na stabilitě interakcí mezi lipidy vzhledem ke stabilitě interakcí lipid-detergent. Izolované membrány tak nejsou fyziologicky přímo lipidové rafty, protože rozpustnost je silně závislá na lipidovém složení i síle detergentu (London & Brown, 2000). Triton X-100 je poměrně silný detergent, který může rozpouštět i část raftů a receptory poškodit nebo vyřadit z nesolubilní frakce. Některé studie také naznačují opačný problém při použití detergentů, a sice vznik artefaktů (výskyt nerigidních částí plazmatické membrány) (Lichtenberg *et al.*, 2005). Tyto problémy by mohly být eliminovány použitím metod izolace membránových mikrodomén bez detergentu. Srovnáním výsledků těchto dvou přístupů by mohlo pomoci odhalit vliv detergentu na receptory a přesněji stanovit jejich zastoupení v lipidových raftech.

Výskyt A_{2B} receptoru v raftech popisuje jediná studie prováděná na intestinálních buňkách epiteliální buněčné linie T84 (Sitaraman et al., 2002). V našich pokusech byl A_{2B} receptor spolehlivě detekován pouze v solubilní frakci. V několika pokusech byla viditelná exprese i v lipidové části u vzorků izolovaných 2% Tritonem. Z výsledků nelze potvrdit výskyt receptoru v raftech, protože se raftový signál nepodařilo získat konzistentně a navíc hodnotitelná byla pouze přibližně polovina z provedených pokusů. Většinou receptor vykazoval celkově velmi malý nebo žádný signál ve frakci lipidových raftů i v solubilní většinou membránové fázi, ale silný signál se objevil v oblasti molekulové hmotnosti, která by mohla náležet dimeru receptoru. S podobným problémem jsme se setkali i u blotů hrubých membrán při porovnávání vzorků pravých a levých komor. Při optimalizaci pokusů jsme prováděli elektroforézu na ureových gelech s předpokladem, že močovina jako chaotropní činidlo (látko, která efektivně ruší nekovalentní vazby v molekule proteinu) rozvolní dimerické struktury a budeme pozorovat zvýšení signálu v oblasti receptorového monomeru. Výsledkem však byly bloty se signálem v mnoha oblastech různých molekulových hmotností (došlo tedy k rozbití struktur) a bylo tak obtížné specificky detekovat námi hledaný specifický imunochemický signál receptoru.

Zbylé dva podtypy adenosinových receptorů byly detekovány jak v lipidovými rafty obohacené tak v solubilní frakci. Jak bylo dříve zmíněno, detekce A_{2A} receptoru na srdci pomocí imunoblottingu je poměrně problematická. Na rozdíl od vzorků hrubých membrán se při pokusech s lipidovými rafty podařilo na výsledných imunoblotech detekovat protein dané velikosti. Bohužel ani po snaze o optimalizaci, zmenšení šumu a zvýraznění signálu se nepodařilo získat dobře hodnotitelné výsledky. Z imunoblotů je zřejmé, že receptor byl detekován jak v solubilní, tak lipidové frakci, avšak jak je vidět na přiloženém obrázku (obr. 11), nelze stanovit relativní poměr výskytu receptoru mezi frakcemi. Doposud byla publikována pouze jedna studie dokazující výskyt A_{2A} receptoru v membránových mikrodoménách, a to studie prováděná na míšních neuronech potkana (Mojsilovic-Petrovic et al., 2006). Přednostní výskyt A_3 receptoru v raftech není doposud prokázán. Výsledky našich pokusů ukazují prakticky totožnou expresi jak v solubilní většinou membránové frakci tak ve frakci lipidových raftů.

Dále jsme prováděli vazebné studie A_1 receptoru za použití radioaktivně značeného vysoce selektivního antagonisty DPCPX. Byla sledována saturace receptorů selektivním antagonistou při jeho zvyšující se koncentraci. K pokusům byly použity vzorky hrubých membrán izolovaných z pravých a levých komor potkana. Jelikož adenosin je prakticky všudypřítomný nukleosid, preinkubovali jsme tkáň s enzymem adenosindeaminázou, aby došlo k degradaci veškerého adenosinu a byl tak eliminován vliv intracelulárního adenosinu na vazebnou kapacitu receptorů. Ošetření tkáně adenosindeaminázou se provádí prakticky téměř při všech pokusech s adenosinovými receptory, protože v každé buňce je přítomné ATP a vliv intracelulárního adenosinu by mohl ovlivňovat výsledky měření. K charakterizaci receptorů byly zvoleny saturační studie, při kterých je zjišťována maximální vazebná kapacita B_{max} a rovnovážná disociační konstanta K_d . U adenosinových receptorů platí, že jeden receptor váže jeden ligand. Naměřené hodnoty maximální vazebné kapacity tedy kvantitativně odráží i množství receptorů v tkáni.

Specifická vazba byla stanovena jako rozdíl celkové vazby a vazby nespecifické. Nespecifická vazba byla měřena pomocí neznačeného ligandu DPCPX. Opakování pokusů bylo provedeno 4x pro pravé i levé komory, přičemž každý pokus probíhal v triplikátech. U pravých komor byly naměřeny hodnoty B_{max} $12,61 \pm 2,03 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ a K_d $1,53 \pm 0,22 \text{ nM}$, u levých komor B_{max} $10,96 \pm 2,08 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ a K_d $2,08 \pm 0,42 \text{ nM}$ (hodnoty jsou vypočítané jako aritmetický průměr ze 4 pokusů \pm S.E.M.). Rovnovážná disociační konstanta popisuje stav, kdy je obsazena právě polovina receptorů v tkáni. Jak bylo zmíněno výše, jeden receptor váže právě jeden ligand, můžeme tedy přímo kvantifikovat koncentraci receptorů ve tkáni. Nanomolární koncentrace A_1 receptorů na srdci potkana je poměrně nízká a naše výsledky se shodují s pozorováním mnoha jiných studií (Kapicka *et al.*, 2003). Nízká koncentrace adenosinových receptorů na srdci vysvětluje problémy s jejich charakterizací a kvantifikací pomocí metod elektroforézy a Western blottingu. Mezi pravou a levou komorou se neukázaly žádné signifikantní rozdíly v množství receptorů ani v maximální vazebné kapacitě.

Poslední metodou této diplomové práce bylo stanovení aktivity stimulované nebo inhibované aktivity adenylylcyklázy. Adenosinové receptory jsou spřaženy s G proteiny a jejich hlavním signalizačním efektoem je adenylylcykláza. Podle typu G

proteinu je po aktivaci receptorů adenylylcykláza stimulována nebo inhibována. Jak bylo uvedeno dříve, v srdci je nejvýznamnější anti- β -adrenergní efekt A_1 receptoru. Stimulací A_1 receptoru je přes aktivaci α podjednotky G_i proteinu inhibován stimulační účinek agonistů adrenergních receptorů. V našich pokusech byly použity 4 ligandy: isoprenalin, forskolin, CGS a CPA. Isoprenalin je neselektivní agonista β -adrenergních receptorů, které přes G_s proteiny stimulují aktivitu adenylylcyklázy. Forskolin je labdanový diterpen, který přímo interaguje s adenylylcyklázou a způsobuje její rychlou a reverzibilní stimulaci. Aktivuje všechny typy adenylylcykláz, kromě adenylylcyklázy 9, a je proto používán pro studium tvorby cAMP v mnoha buněčných procesech a tkáních (Alasbahi & Melzig, 2012). Zbylé dva stimulanty ovlivňují adenosinové receptory. CGS-21680 působí stimulačně přes aktivaci A_{2A} receptoru, který je spřažen s G_s proteiny. Využívá se převážně ke studiu respiračních poruch předčasně narozených dětí. Častým problémem nedonošených novorozenců bývá přerušované dýchání z důvodu nedostatečně vyvinutých synapsí respiračních neuronů (idiopatická apnoe) a xanthiny (nespecifičtí antagonisté adenosinových receptorů) se často využívají k léčbě těchto poruch (Mayer *et al.*, 2006). CPA je selektivní agonista A_1 receptoru, který se používá převážně při studiích kardiovaskulárních tkání. Je snaha o vývoj selektivnějších agonistů s vyšší afinitou, nepoužívanějším je například CCPA (2-chloro- N^6 -cyklopentyladenosin).

Pokusy byly opakovány 2x s nízkou hladinou hořčnatých iontů a 3x se zvýšeným obsahem hořčnatých iontů, které jsou potřeba pro optimální funkci adenylylcyklázy. Každý pokus byl vždy prováděn v triplikátech. Byla zkoumána stimulace adenylylcyklázy isoprenalinem, forskolinem a CGS a inhibice pomocí CPA. Dále byla sledována inhibice CPA forskolinem-stimulovaného enzymu. Naměřené hodnoty byly přepočítány na jednotky pmol vytvořeného cAMP za minutu na mg proteinu (postup viz Metody). Ve všech pokusech byla pozorována silná stimulace forskolinem a slabá stimulace isoprenalinem. Stimulace agonistou adenosinových receptorů CGS byla pozorovatelná, avšak téměř zanedbatelná. V literatuře je v rámci studia srdeční tkáně popisována především inhibice aktivity adenylylcyklázy (Kapicka *et al.*, 2003). V našich pokusech jsme zkoumali přímou inhibici enzymu aktivací A_1 receptoru pomocí CPA ligandu, naměřené hodnoty však inhibiční účinky nepotvrzují.

Během hodnocení bylo možné pozorovat tendenci ke snížené tvorbě cAMP, inhibice ale byla oproti bazálu pouze kolem 4%. V dalších pokusech byla také sledována možná inhibice již stimulované adenylylcyklázy. V reakční směsi byly použity dva ligandy – forskolin ke stimulaci a CPA k inhibici. Naměřené hodnoty opět vykazaly stejný fenomén jako u inhibice nestimulovaného enzymu.

ZÁVĚR

Adenosinové receptory jsou široce rozprostřeny napříč kardiovaskulární tkání a zprostředkovávají mnoho fyziologických odpovědí adenosinu. Během metabolického a především oxidačního buněčného stresu extracelulární hladina adenosinu stoupá. Adenosin v srdeční tkáni zpomaluje srdeční tep, snižuje síňovou kontraktilitu, zpomaluje AV vedení a především inhibuje vliv katecholaminů na srdeční funkce (Belardinelli *et al.*, 1995). Adenosin také aktivuje mnoho cytoprotektivních odpovědí. Adenosinové receptory mají roli v akutních protektivních i adaptivních odpovědích. Ochranu srdeční tkáně zajišťuje preischemická aktivace receptorů (preconditioning), stejně tak má kardioprotektivní efekt jejich signalizace v reperfuční fázi (Headrick *et al.*, 2011).

Cílem této diplomové práce byla charakterizace adenosinových receptorů na myokardu potkana. Zabývali jsme se porovnáním distribuce jednotlivých receptorových podtypů v pravé a levé komoře a možný výskyt receptorů v lipidových raftech. Dále jsme zkoumali vazebné vlastnosti A_1 receptoru na vzorcích hrubých membrán pravých a levých komor. Poslední částí této práce je studium aktivity adenylcyklázy a vlivu adenosinových receptorů na tvorbu cAMP. V našich pokusech jsme nepozorovali rozdíly mezi pravou a levou komorou potkana ať už v distribuci jednotlivých receptorových podtypů nebo v jejich vazebných vlastnostech. I přes mnoho studií zabývajících se adenosinovou signalizací jsou adenosinové receptory na srdci dosud málo prozkoumaným tématem a lepší poznání jejich vlastností a především vývoj selektivních ligandů by mohly přispět k účinnější léčbě některých kardiovaskulárních chorob.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alasbahi, R. H. and Melzig, M. F. (2012) Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Pharmazie*, 67, 5-13.
- Anderson, R. G. W. (1993) Caveolae - Where incoming and outgoing messengers meet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 10909-10913.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Koufaki, M. and Kremastinos, D. T. (2008) Pharmacological pre- and post-conditioning agents: Reperfusion-Injury of the heart revisited. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 952-959.
- Belardinelli, L., Shryock, J. C., Song, Y., Wang, D. and Srinivas, M. (1995) Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine cardiomyocytes. *Faseb Journal*, 9, 359-365.
- Charalambous, C., Gsandtner, I., Keuerleber, S., Milan-Lobo, L., Kudlacek, O., Freissmuth, M., *et al.* (2008) Restricted collision coupling of the A(2A) receptor revisited - Evidence for physical separation of two signaling cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 9276-9288.
- Chini, B. and Parenti, M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *Journal of Molecular Endocrinology*, 32, 325-338.
- Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1997) Ligand-induced phosphorylation, clustering, and desensitization of A(1) adenosine receptors. *Molecular Pharmacology*, 52, 788-797.
- Cooper, D. M. F. (2003) Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochemical Journal*, 375, 517-529.
- Defer, N., Best-Belpomme, M. and Hanoune, J. (2000) Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279, F400-F416.
- El-Awady, M. S., Sanjani, M. S. and Mustafa, S. J. (2011) Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow. *Coronary Artery Disease: 2011 Update: from Prevention to Intervention*, 9-15.

- Forsman, C. A. and Gustafsson, L. E. (1985) Cytochemical-localization of 5'-nucleotidase in the enteric ganglia and in smooth-muscle cells of the guinea-pig. *Journal of Neurocytology*, 14, 551-562.
- Francis, S. H. and Corbin, J. D. (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein-kinases. *Annual Review of Physiology*, 56, 237-272.
- Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J. and Muller, C. E. (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors-An Update. *Pharmacological Reviews*, 63, 1-34.
- Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tomé, A. R., Agostinho, P. M. and Cunha, R. A. (2011) Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808, 1380-1399.
- Headrick, J. P., Ashton, K. J., Rose'Meyer, R. B. and Peart, J. N. (2013) Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions. *Pharmacology & Therapeutics*, 140, 92-111.
- Headrick, J. P., Peart, J. N., Reichelt, M. E. and Haseler, L. J. (2011) Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808, 1413-1428.
- Huang, C. F., Hepler, J. R., Chen, L. T., Gilman, A. G., Anderson, R. G. W. and Mumby, S. M. (1997) Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 2365-2378.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., *et al.* (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. In: *Science*. United States, pp. 1211-1217.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J. and Steegborn, C. (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: A tale of two systems. *Journal of Molecular Biology*, 362, 623-639.
- Kapicka, C. L., Montamat, S. C., Olson, R. D., Musser, B., Mudumbi, R. V. and Vestal, R. E. (2003) Species comparison of adenosine A(1) receptors in isolated mammalian atrial and ventricular myocardium. *Life Sciences*, 72, 2825-2838.

- Klinger, M., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cellular Signalling*, 14, 99-108.
- Kong, W., Engel, K. and Wang, J. (2004) Mammalian nucleoside transporters. *Current Drug Metabolism*, 5, 63-84.
- Lasley, R. D. (2011) Adenosine receptors and membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808, 1284-1289.
- Lasley, R. D., Narayan, P., Uittenbogaard, A. and Smart, E. J. (2000) Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 4417-4421.
- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K. and Berry, C. (2014) Adenosine Physiology, Pharmacology, and Clinical Applications. *Jacc-Cardiovascular Interventions*, 7, 581-591.
- Lichtenberg, D., Goni, F. M. and Heerklotz, H. (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci*, 30, 430-436.
- London, E. and Brown, D. A. (2000) Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1508, 182-195.
- Malaga-Dieguez, L., Yang, Q. O., Bauer, J., Pankevych, H., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2010) Pharmacochaperoning of the A(1) Adenosine Receptor Is Contingent on the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Pharmacology*, 77, 940-952.
- Matharu, A. L., Mundell, S. J., Benovic, J. L. and Kelly, E. (2001) Rapid agonist-induced desensitization and internalization of the A(2B) adenosine receptor is mediated by a serine residue close to the COOH terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 30199-30207.
- Mayer, C. A., Haxhiu, M. A., Martin, R. J. and Wilson, C. G. (2006) Adenosine A(2A) receptors mediate GABAergic inhibition of respiration in immature rats. *Journal of Applied Physiology*, 100, 91-97.
- McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P. and Willard, F. S. (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 551-577.

- Mojsilovic-Petrovic, J., Jeong, G. B., Crocker, A., Arneja, A., David, S., Russell, D., *et al.* (2006) Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A2a and Trk receptors. *Journal of Neuroscience*, 26, 9250-9263.
- Mundell, S. and Kelly, E. (2011) Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808, 1319-1328.
- Mustafa, S. J., Morrison, R. R., Teng, B. and Pelleg, A. (2009) Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol*, 161-188.
- Palmer, T. M. and Stiles, G. L. (2000) Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A(3) adenosine receptor. *Molecular Pharmacology*, 57, 539-545.
- Peters, D. M., Gies, E. K., Gelb, C. R. and Peterfreund, R. A. (1998) Agonist-induced desensitization of A(2B) adenosine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 55, 873-882.
- Premont, R. T. and Gainetdinov, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. In: *Annual Review of Physiology*. Palo Alto: Annual Reviews, pp. 511-534.
- Rubin, D. and Ismail-Beigi, F. (2003) Distribution of Glut1 in detergent-resistant membranes (DRMs) and non-DRM domains: effect of treatment with azide. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285, C377-C383.
- Sato, A., Terata, K., Miura, H., Toyama, K., Loberiza, F. R., Hatoum, O. A., *et al.* (2005) Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288, H1633-H1640.
- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P. and Ramkumar, V. (2014) Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 2024-2052.
- Shryock, J. C. and Belardinelli, L. (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *American Journal of Cardiology*, 79, 2-10.
- Sitaraman, S. V., Wang, L. X., Wong, M., Bruewer, M., Hobert, M., Yun, C. H., *et al.* (2002) The adenosine 2b receptor is recruited to the plasma membrane and

- associates with E3KARP and ezrin upon agonist stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33188-33195.
- Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z. L., Okamoto, T., Li, S. W., Chafel, M., *et al.* (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells - Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15160-15165.
- Steegborn, C. (2014) Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1842, 2535-2547.
- Tang, W. J. and Gilman, A. G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G-protein beta-gamma-subunits. *Science*, 254, 1500-1503.
- Trincavelli, M. L., Daniele, S. and Martini, C. (2010) Adenosine Receptors: What We Know and What We are Learning. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10, 860-877.
- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F. and Babu, M. M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494, 185-194.
- Zaccolo, M. (2009) cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology*, 158, 50-60.
- Zhang, J., Ma, Y. L., Taylor, S. S. and Tsien, R. Y. (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14997-15002.
- Zhang, P., Kofron, C. M. and Mende, U. (2015) Heterotrimeric G protein-mediated signaling and its non-canonical regulation in the heart. *Life Sciences*, 129, 35-41.