

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

ALENKA HROVAT

VLOGA AKTINSKIH FILAMENTOV V DELOVANJU MEMBRANSKIH
RECEPTORJEV, SKLOPLJENIH Z G-PROTEINI

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 577.2:57.088:576.314:577.12:577.35(043.3)

ALENKA HROVAT, dr. vet. med.

VLOGA AKTINSKIH FILAMENTOV V DELOVANJU MEMBRANSKIH
RECEPTORJEV, SKLOPLJENIH Z G-PROTEINI

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2009

Alenka Hrovat, dr. vet. med.

VLOGA AKTINSKIH FILAMENTOV V DELOVANJU MEMBRANSKIH RECEPTORJEV, SKLOPLJENIH Z G-PROTEINI

Delo je bilo opravljeno:

1. na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani
 - predstojnica Inštituta prof. dr. Azra Pogačnik
2. na EPR centru, Laboratoriju za biofiziko Instituta Jožef Stefan v Ljubljani
 - vodja centra: doc. dr. Janez Štrancar
3. na Kemijskem inštitutu Ljubljana, Laboratorij za biosintezo in biotransformacijo
 - vodja laboratorija: prof. dr. Radovan Komel

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: izr. prof. dr. Milka Vrecl

Člani strokovne komisije za oceno naloge in zagovora so:

Predsednik: prof. dr. Gregor Majdič

Članica: prof. dr. Azra Pogačnik

Član: prof. dr. Robert Zorec

IZJAVA O DELU

Izjavljam, da je doktorska disertacija plod mojega lastnega raziskovalnega dela. Delo kolegov, opravljeno v drugih laboratorijih, je omenjeno v metodah oziroma v zahvali.

Alenka Hrovat

V Ljubljani, 16.11.2009

KAZALO

KAZALO	I
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
IZVLEČEK.....	1
ABSTRACT.....	3
1 UVOD.....	5
2 PODATKI IZ LITERATURE	6
2.1 AKTINSKI CITOSENKELET	6
2.1.1 Nastanek aktinskih filamentov.....	8
2.2 RECEPTORJI, SKLOPLJENI Z G-PROTEINOM	9
2.2.1 Strukturne lastnosti GPCR-jev	10
2.2.2 Nevrokininski receptor tip 1 (NK1-R).....	14
2.2.3 Beta 2 adrenergični receptor (β_2 -AR).....	15
2.3 AKTIVACIJA GPCR-jev	16
2.3.1 Aktivacija drugotne sporočilne poti in prenos sporočila prek heterotrimernih G-proteinov	17
2.3.2 Aktivacija drugotne sporočilne poti in prenos sporočila brez posredovanja heterotrimernih G-proteinov	20
2.3.3 Receptorsko pogojena endocitoza.....	22
2.3.4 Vloga heterotrimernih G-proteinov in proteinov Rho v prerazporeditvi aktinskih filamentov	25
2.3.5 Vloga kinaz Src pri aktivaciji RhoA in prerazporeditvi aktinskih filamentov	28
2.3.6 Receptorsko pogojena endocitoza in prerazporeditev aktinskih filamentov	29
2.3.7 Vloga arrestinov v prerazporeditvi aktinskih filamentov.....	32
2.4 VLOGA MEMBRANSKIH MIKRODOMEN V PRERAZPOREDITVI IN DELOVANJU GPCR-jev	33
2.4.1 Lipidni rafti in kaveole	33
2.4.2 Lipidni rafti/kaveole in aktinski citoskelet.....	34
2.4.3 Razporeditev GPCR-jev in sporočilnih molekul na področju lipidnih raftov/ kaveol	35
2.5 METODOLOŠKI VIDIK NALOGE.....	37

2.5.1 Metodološki vidik proučevanja citoskeleta	37
2.5.1.1 Proučevanje citoskeleta z uporabo avtofluorescenčnega označevalca GFP	38
2.5.1.2 Proučevanje citoskeleta z uporabo farmakoloških sredstev.....	39
2.5.2 Metodološki vidik proučevanja lipidnih raftov in kaveol	39
2.5.2.1 Proučevanje lipidnih raftov z elektronsko paramagnetno resonančno spektroskopijo (EPR).....	40
2.6 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	43
3 MATERIAL IN METODE.....	45
3.1 CELIČNE LINIJE.....	45
3.2 GOJENJE CELIC IN VITRO	45
3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE HOLESTEROLA V CELICAH CHO K ₁ in CHO 215	46
3.4 STANDARDNE METODE MOLEKULARNE BIOLOGIJE	47
3.4.1 Rekombinantni plazmidni vektorji.....	47
3.4.2 Pomnoževanje rekombinantnih plazmidov.....	48
3.4.3 Izolacija plazmidne DNA	48
3.4.3.1 Določanje koncentracije DNA	49
3.4.4 Restriktivska analiza plazmidne DNA.....	49
3.4.5 Elektroforeza na agaroznem gelu	49
3.4.6 Sekvencioniranje plazmidne DNA.....	50
3.5 PRIPRAVA PREHODNO IN TRAJNO TRANSFECIRANIH CELIČNIH LINIJ.....	51
3.5.1 Priprava prehodno transfeciranih celičnih linij	51
3.5.1.1 Transfekcija celic z Lipofecatminom	51
3.5.1.2 Transfekcija celic s SuperFectom™.....	52
3.5.2 Priprava trajno transfeciranih celičnih linij	53
3.5.2.1 Priprava celic za selekcijo s pretočnim citometrom.....	54
3.6 METODE ZA SPREMLJANJE POVRŠINSKE IZRAŽENOSTI IN INTERNALIZACIJE RECEPTORJEV	56
3.6.1 Encimskoimunski test (ELISA)	56
3.6.2 Testi vezave radioaktivno označenega liganda.....	57

3.6.2.1	Test samoizpodrivanja	57
3.6.2.2	Test internalizacije receptorja	57
3.7	METODE ZA UGOTAVLJANJE AKTIVACIJE DRUGOTNEGA SPOROČILNEGA SISTEMA.....	58
3.7.1	Merjenje skupnega inozitol fosfata (IP)	58
3.7.2	Merjenje inozitol 1-fosfata (IP ₁)	59
3.7.3	Merjenje cikličnega adenozin monofosfata (cAMP)	60
3.7.4	Merjenje koncentracije znotrajceličnega Ca ²⁺	60
3.8	OBRATNA TRANSKRIPCIJA IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (RT-PCR) TER VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (Q-PCR)	61
3.9	ANALIZA CELIC S KONFOKALNIM MIKROSKOPOM.....	63
3.9.1	Prikaz autofluorescenčno označenih aktinskih filamentov	64
3.9.2	Prikaz aktinskih filamentov, označenih z rodamin faloidinom	65
3.9.3	Imunocitokemični prikaz receptorja.....	66
3.10	MERJENJE AKTIVACIJE PROTEINA RhoA	66
3.11	UGOTAVLJANJE PROTEINSKO-PROTEINSKIH INTERAKCIJ	67
3.11.1	Metoda prenosa energije z resonanco bioluminiscence (BRET)	67
3.12	SPINSKO OZNAČEVANJE IN MERITVE Z ELEKTRONSKO PARAMAGNETNO RESONANCO (EPR).....	69
3.13	STATISTIČNE ANALIZE	70
4	REZULTATI	71
4.1	SELEKCIJA TRAJNIH CELIČNIH LINIJ.....	71
4.1.1	Potek selekcije trajne celične linije	71
4.1.2	Lastnosti trajne celične linije	73
4.1.3	Raven izražanja mRNA za skupni in pEYFP-aktin v celicah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin in HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%	74
4.1.4	Funkcionalne lastnosti pEYFP-aktina	75
4.1.5	Stabilnost trajne celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%	77
4.2	PRERAZPOREDITEV AKTINSKIH FILAMENTOV V CELICAH	79
4.2.1	Farmakološke lastnosti NK1-R, β ₂ -AR in konstitutivno aktivnih oblik heterotrimernih G-proteinov	79

4.2.2	Razporeditev aktinskega citoskeleta po aktivaciji NK1-R in β_2 -AR.....	81
4.2.3	Vpliv spodbuditve NK1-R in β_2 -AR na aktivacijo proteina RhoA	83
4.2.4	Razporeditev aktinskega citoskeleta v celicah transfeciranih z različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α G-proteinov	84
4.2.5	Vpliv izražanja različnih konstitutivno aktivnih mutant podenot α G-proteinov na aktivacijo proteina RhoA	85
4.3	VPLIV FUNKCIONALNO SPECIFIČNEGA AGONISTA β_2 -AR NA RAZPOREDITEV AKTINSKIH FILAMENTOV	87
4.3.1	Razporeditev aktinskih filamentov po aktivaciji β_2 -AR s funkcionalno specifičnim agonistom	87
4.3.2	Vpliv aktivacije β_2 -AR s karvedilolom na aktivacijo proteina RhoA.....	89
4.3.3	Interakcija β_2 -AR z β -arestinom 2 po aktivaciji receptorja s karvedilolom	90
4.3.4	Konformacijske spremembe β -arestina 2 po aktivaciji receptorja s karvedilolom	92
4.4	VLOGA AKTINSKEGA CITOSKELETA V RAZPOREDITVI, INTERNALIZACIJI IN RECIKLIRANJU NK1-R	94
4.4.1	Razporeditev NK1-R, β -arestina 1 in β -arestina 2 v celicah HEK 293 .	94
4.4.2	Razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali β -arestina 2 v celicah HEK 293.....	97
4.4.3	Razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali β -arestina 2 v celicah HEK 293, pretretiranih s citohalazinom D	100
4.4.4	Internalizacija NK1-R v celicah HEK 293, pretretiranih s citohalazinom D	103
4.4.5	Internalizacija NK1-R v celicah MEF z izbitima genoma za β -arestin 1 in 2.....	104
4.4.6	Vpliv aktinskih filamentov na interakcijo med NK1-R in β -arestinom 1 in 2	106
4.5	KARAKTERIZACIJA CELIČNIH LINIJ CHO K ₁ IN CHO 215	108
4.5.1	Raven izražanja mRNA za kaveolin 1 v celicah CHO K ₁ in CHO 215	108
4.5.2	Razporeditev kaveolina 1 v celicah CHO K ₁ in CHO 215.....	109
4.5.3	Razporeditev aktinskega citoskeleta v celicah CHO K ₁ in CHO 215..	110

4.5.4	Lastnosti membranskih domen pri celicah CHO K ₁ in CHO 215.....	111
4.6	SELEKCIJA TRAJNIH CELIČNIH LINIJ CHO K ₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R	114
4.6.1	Potek selekcije trajne celične linije.....	114
4.6.2	Lastnosti trajnih celičnih linij.....	115
4.6.3	Lastnosti membranskih domen pri trajnih celičnih linijah	115
4.7	VLOGA LIPIDNIH RAFTOV/KAVEOL V INTERNALIZACIJI RECEPTORJA, AKTIVACIJI DRUGOTNE SPOROČILNE POTI IN INTERAKCIJI RECEPTORJA Z β-ARESTINI	120
4.7.1	Vpliv lipidnih raftov/kaveol na internalizacijo receptorja pri celicah CHO K ₁ in CHO 215.....	120
4.7.2	Vpliv lipidnih raftov/kaveol na aktivacijo drugotne sporočilne poti pri celicah CHO K1 in CHO 215	121
4.7.3	Vpliv lipidnih raftov/ kaveol na interakcijo med NK1-R in β-arestini....	123
5	RAZPRAVA	125
5.1	PRIPRAVA IN FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA CELIČNE LINIJE HEK 293, TRAJNO TRANSFECIRANE Z AVTOFLUORESCENČNO OZNAČENIM AKTINOM β (pEYFP-AKTIN) IN NEVROKININSKIM RECEPTORJEM 1 (NK1-R).....	125
5.2	PRERAZPOREDITEV AKTINSKIH FILAMENTOV V CELICAH PO AKTIVACIJI GPCR-jev.....	129
5.3	VLOGA AKTINSKEGA CITOSKELETA V RAZPOREDITVI, INTERNALIZACIJI IN FUNKCIONALNEM POVEZOVALJUI MED NK1-R IN β-ARESTINOM 1 IN 2	135
5.4	VLOGA LIPIDNIH RAFTOV/KAVEOL V PRERAZPOREDITVI IN DELOVANJU GPCR-jev	139
6	POVZETEK.....	144
7	SUMMARY.....	146
8	SKLEPI	148
9	ZAHVALA	149
10	LITERATURA	151

SEZNAM SLIK

Slika 1: Shematični prikaz višje organiziranih tvorb aktina F.....	7
Slika 2: Shematični prikaz aktina G in aktina F.....	8
Slika 3: Shematični prikaz receptorja razreda A.....	13
Slika 4: Shematični prikaz dogajanj po aktivaciji GPCR-jev z agonistom.....	17
Slika 5: Sorodnost podenot alfa heterotrimernih G-proteinov.....	18
Slika 6: Shematični prikaz prenosa sporočila prek nekaterih podenot α heterotrimernih G-proteinov.....	19
Slika 7: Aktivacija MAP-kinazne poti brez posredovanja G-proteinov.....	21
Slika 8: Vpliv proteinov družine Rho na aktin.....	26
Slika 9: Vloga heterotrimernih G-proteinov v aktivaciji proteina RhoA in prerazporeditvi aktinskih filamentov.....	27
Slika 10: Aktivacija proteina RhoA prek c-Src in Csk.....	28
Slika 11: Vloga aktina pri endocitozi posredovani s klatrinskimi mešički	30
Slika 12: Proteini, ki povezujejo strukturne komponente klatrinskega mešička in hkrati uravnavajo polimerizacijo aktina.....	31
Slika 13: Vloga β -arestinov v nekaterih celičnih funkcijah.....	32
Slika 14: Vloga kaveolina v reorganizaciji aktina.....	35
Slika 15: Potek eksperimentalnega dela.....	44
Slika 16: Celična prerazporeditev in kolokalizacija med pEYFP-aktinom in aktinskimi filamenti, označenimi z rodamin faloidinom, pri trajni celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%.....	76
Slika 17: Razporeditev aktinskih filamentov v celicah HEK 293 po aktivaciji receptorja.....	82
Slika 18: Razporeditev aktinskih filamentov v celicah HEK 293, transfeciranih z različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α G-proteinov.....	84
Slika 19: Razporeditev aktinskih filamentov v celicah HEK 293 po aktivaciji β_2 -AR s karvedilolom.....	88
Slika 20: Vpliv agonista (SP) in citohalazina D na razporeditev NK1-R in β -arestina 1 in 2 v celicah HEK 293.....	96
Slika 21: Razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali 2 v celicah HEK 293.	99

Slika 22: Vpliv citohalazina D na razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali 2 v celicah HEK 293.....	102
Slika 23: Razporeditev kaveolina-1 in aktina.....	109
Slika 24: Razporeditev aktinskega citoskeleta v celicah CHO K ₁ in CHO 215.	110

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Preglednica družin GPCR-jev.....	12
Tabela 2: Opis rekombinantnih plazmidnih vektorjev.	47
Tabela 3: Raven izražanja mRNA za skupni aktin β in aktin pEYFP.....	74
Tabela 4: Raven izražanja mRNA za skupni aktin β in pEYFP aktin pri različnih pasažah.....	78
Tabela 5: Vrednosti EC ₅₀ (nM) za aktivacijo PLC.	80
Tabela 6: Raven izražanja mRNA za WT Cav 1.....	108
Tabela 7: Parametri posameznih domen plazmamembrane, dobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST.....	113
Tabela 8: Parametri posameznih domen plazmamembrane, dobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST.....	118

SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Raven izražanja NK1-R in pEYFP-aktina v trajnih celičnih linijah.....	72
Graf 2: Izmerjena koncentracija nastalega inozitol 1-fosfata (IP ₁).	73
Graf 3: Površinsko izražanje NK1-R in izmerjena raven fluorescence pEYFP-aktina.	78
Graf 4: Vpliv aktivacije NK1-R in konstitutivno aktivnih oblik heterotrimernega G-proteina na koncentracijo skupnega inositol fosfata (IP) v celicah.	80
Graf 5: Vpliv stimulacije NK1 in β_2 -AR z agonistom na aktivacijo proteina RhoA v celicah HEK 293.	83
Graf 6: Vpliv konstitutivno aktivnih mutant podenot α G-proteinov na aktivacijo proteina RhoA v celicah HEK 293.	86

Graf 7: Vpliv aktivacije β_2 -AR s karvedilolom na aktivacijo proteina RhoA v celicah HEK 293.....	89
Graf 8: Signal BRET ² med β_2 -AR in β -arestinom 2 ter β_2 -AR in mutantu β -arestina 2 R393E, R395E.....	91
Graf 9: Intramolekularni količnik BRET ² po aktivaciji β_2 -AR.....	93
Graf 10: Časovni potek internalizacije NK1-R v celicah HEK 293.....	103
Graf 11: Internalizacija NK1-R po pretretiranju celic s citohalazinom D v celicah MEF DKO β -arr 1/2	105
Graf 12: Interakcija β -arestina 1 in 2 z NK1-R po aktivaciji receptorja z agonistom v celicah HEK 293.....	107
Graf 13: Eksperimentalni spektri EPR plazmamembrane celic CHO K ₁ in CHO 215.....	112
Graf 14: Eksperimentalni spektri EPR plazmamembrane trajnih celičnih linij CHO K ₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R pred spodbuditvijo z agonistom in po njej.....	116
Graf 15: Diagrami GHOST različnih gibanj spinskega označevalca v membrani....	119
Graf 16: Internalizacija NK1-R v celicah CHO K ₁ in CHO 215.....	121
Graf 17: Koncentracija znotrajceličnega Ca ²⁺	122
Graf 18: Interakcija NK1-R z β -arestinom 1 ali 2 po aktivaciji receptorja z agonistom.	124

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABP	vezalni protein za aktin (okrajšano iz angl. actin-binding protein)
AC	adenilat-ciklaza
ADP	adenozin difosfat (okrajšano iz angl. adenosine diphosphate)
AP2	adaptorni protein 2
ARF	ADP-ribozilirajoči faktor (okrajšano iz angl. ADP-ribosylation factor)
Arg	arginin
Arp 2/3	aktinu soroden protein 2/3 (okrajšano iz angl. actin related protein 2/3)
Asn	asparaginska kislina
Asp	aspartat
AT-1	angiotenzin-1
AT1AR	receptor za angiotenzin podtipa 1 (okrajšano iz angl. angiotensin receptor subtype 1a)
ATP	adenozin trifosfat (okrajšano iz angl. adenosine triphosphate)
B _{max}	maksimalna gostota površinskih receptorjev
bp	bazni pari (okrajšano iz angl. base pairs)
BRET	prenos energije z resonanco bioluminiscence (okrajšano iz angl. bioluminescence resonance energy transfer)
BSA	bovini serumski albumin (okrajšano iz angl. bovine serum albumin)
cAMP	ciklični adenozin monofosfat (okrajšano iz angl. cyclic adenosine monophosphate)
CCK	holecistokinin (okrajšano iz angl. cholecystokinin)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (okrajšano iz angl. complementary deoxyribonucleic acid)
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat (okrajšano iz angl. cyclic guanosine monophosphate)
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (okrajšano iz angl. chamster ovary cells)
CMV	citomegalovirus (okrajšano iz angl. cytomegalovirus)
Csk	C-terminalna kinaza Src (okrajšano iz angl. C-terminal Src-kinase)

c-Src	kinaza Src (okrajšano iz angl. Src-kinase)
Ct	pražni cikel (okrajšano iz angl. threshold cycle)
CŽS	centralni živčni sistem
DAG	diacil glicerol
DEAE	dietilaminoetyl (okrajšano iz angl. diethylaminoethyl)
DMEM	Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu (okrajšano iz angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetilsulfoksid (okrajšano iz angl. dimethyl sulfoxide)
DN	dominantno negativen
DNA	deoksiribonukleinska kislina (okrajšano iz angl. deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (okrajšano iz angl. Dulbecco's phosphate buffered saline)
DRM	proti detergentu odporna membrana (okrajšano iz angl. detergent resistant membrane)
DRY	visoko ohranjeni motiv aminokislinskega zaporedja Asp-Arg-Tyr
EC ₅₀	srednja učinkovita koncentracija
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (okrajšano iz angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFR	receptor za epidermalni rastni dejavnik (okrajšano iz angl. epidermal growth factor receptor)
ELISA	enzimskoimunski test (okrajšano iz angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
eNOS	endotelijska sintaza dušikovega oksida (okrajšano iz angl. endothelial nitric oxid synthase)
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
ER	endoplazemski retikulum
ESR	elektronska spinska resonanca
ET _B	endotelin tipa B
EYFP	ojačani protein rumene fluorescence (okrajšano iz angl. enhanced yellow fluorescent protein)
FCS	fetusni (plodov) serum goveda (okrajšano iz angl. foetal calf serum)

FCS	fluorescenčna korelacijska spektroskopija (okrajšano iz angl. fluorescent correlation spectroscopy)
FRAP	okrajšano iz angl. fluorescence recovery after bleaching
FRET	prenos energije z resonanco fluorescence (okrajšano iz angl. fluorescent resonance energy transfer)
FSH	folikle stimulirajoči hormon (okrajšano iz angl. follicle-stimulating hormone)
G418	geneticin
GA	golgijev aparat
GABA	γ -aminobutirična kislina (okrajšano iz angl. γ-aminobutyric acid)
GABA _B	receptor tipa B za GABA (okrajšano iz angl. GABA type B receptor)
GAP	aktivirajoči protein GTP-aze (okrajšano iz angl. GTPase activating protein)
GDI	inhibitor disociacije gvanina (okrajšano iz angl. guanine dissociation inhibitor)
GDP	gvanozin difosfat (okrajšano iz angl. guanosin-di-phosphate)
GEF	izmenjalni faktor gvanin nukleotidov (okrajšano iz angl. guanine nucleotide exchange factors)
GFP	zeleno fluorescirajoči protein (okrajšano iz angl. green fluorescent protein)
ghR	receptor za grelin (okrajšano iz angl. ghrelin receptor)
Gln	glutamin
GLUT4	transporter za glukozo 4 (okrajšano iz angl. glucose-transporter 4)
Gly	glicin
GnRH	gonadoliberin (okrajšano iz angl. gonadotropin-releasing hormone)
GPCR	receptorji, sklopljeni z G-proteinom (okrajšano iz angl. G-protein coupled receptors)
GPI	glikozilfosfatidilinozitol (okrajšano iz angl. glycosylphosphatidylinositol)
GRK	GPCR-receptorska kinaza (okrajšano iz angl. G-protein coupled receptor kinases)
GTP	gvanozin trifosfat (okrajšano iz angl. guanosine – triphosphate)
h	ura (okrajšano iz angl. hour)

HA	hemaglutinin
HBSS	okrajšano iz angl. Hank's balanced salt solution
HEK 293	humane embrionalne ledvične celice (okrajšano iz angl. human embrional kidney cells)
IBD	vnetna bolezen črevesja (okrajšano iz angl. inflammatory bowel disease)
IMAC	afinitetna kromatografija kovinskih kelatov, imobiliziranih na trdnih nosilcih (okrajšano iz angl. immobilized metal ion affinity chromatography)
IP ₁	inozitol 1-fosfat (okrajšano iz angl. inositol 1-phosphate)
IP ₃	inozitol 1, 4, 5-trifosfat (okrajšano iz angl. inositol 1, 4, 5-triphosphate)
kDa	kilodalton
KO	organizem z izbitim genom (okrajšano iz angl. knock-out)
LARG	okrajšano iz angl. leukemia-associated Rho-GEF
LB agar	agar Luria Bertani
LDL	lipoproteini z nizko gostoto (okrajšano iz angl. low density lipoprotein)
Leu	levcin
LH	luteinizirajoči hormon (okrajšano iz angl. luteinizing hormone)
LLS	serum z nizko vsebnostjo lipoproteinov (okrajšano iz angl. low lipoprotein serum)
Lys	lizin
M	mol
MADK	celice pasjih ledvic Madin-Darby (okrajšano iz angl. Madin-Darby kidney cells)
MAP	z mitogenom aktivirani protein (okrajšano iz angl. mitogen-activated protein)
MAPK	MAP-kinaza (okrajšano iz angl. MAP kinase)
MEF	mišji embrionalni fibroblasti
Met	metionin
MGB	vezalec malega žleba (okrajšano iz angl. minor groove binder)
min	minuta
ml	mililiter

mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina (okrajšano iz angl. messenger ribonucleic acid)
NA	nevrokinin A
NB	nevrokinin B
NK1-R	nevrokininski receptor tip 1
NK2-R	nevrokininski receptor tip 2
NK3-R	nevrokininski receptor tip 3
nm	nanometer
NMR	jedrska magnetna resonanca (okrajšano iz angl. nuclear magnetic resonance)
OD	optična gostota (okrajšano iz angl. optical density)
PACSIN	protein-kinaza C in substrat kazeinske kinaze v nevronih (okrajšano iz angl. Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons)
PBS	fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (okrajšano iz angl. phosphate buffer saline)
PCR	polimerazna verižna reakcija (okrajšano iz angl. polymerase chain reaction)
domena PDZ	okrajšano iz angl. PSD-95/DlgA/ZO-1 domain
Phe	fenilalanin
PI-3 kinaza	fosfatidilinozitol-3-kinaza (okrajšano iz angl. phosphoinositide 3-kinase)
PKC	protein-kinaza C (okrajšano iz angl. protein kinase C)
PLC	fosfolipaza C (okrajšano iz angl. phospholipase C)
PLC β 2	fosfolipaza C - β 2 (okrajšano iz angl. phospholipase C - β2)
Pro	prolin
PTH	paratiroidni hormon
Q-PCR	kvantitativna polimerazna verižna reakcija v realnem času (okrajšano iz angl. quantitative real time PCR)
RBD	področje za vezavo Rho-GTP (okrajšano iz angl. Rho-GTP binding domain)
RGS	regulator signalizacije G-proteinov (okrajšano iz angl. regulator of G-protein signaling)
RLuc	Renilla luciferaza

RNA	ribonukleinska kislina (okrajšano iz angl. ribonucleic acid)
R-PE	R-fikoeritrin (okrajšano iz angl. R-phycoerithrin)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (okrajšano iz angl. reverse transcription — polymerase chain reaction)
SCAR / WASP	supresor receptorja za cAMP/proteini sindroma Wiskott-Aldrich (okrajšano iz angl. suppressor of the cAMP receptor/Wiskott-Aldrich syndrome proteins)
SDS	natrijev dodecilsulfat (okrajšano iz angl. sodium dodecyl sulphate)
SOC	hranilni medij SOC (okrajšano iz angl. super optimal broth with catabolite repression)
SP	substanca P
SPA	okrajšano iz angl. scintillation proximity assay
STED	stimulirano bledenje (okrajšano iz angl. stimulated emission depletion)
TBE	trisboratni pufer (okrajšano iz angl. tris-borate EDTA)
TM	transmembransko območje
TP β	izoforma β receptorja za tromboksan A2 (okrajšano iz angl. β isoform of the thromboxan A2 receptor)
TRH	tiroliberin (okrajšano iz angl. thyrotropin-releasing hormone)
TRITC	tetrametil rodamin izotiocianat
Tyr	tirozin
UV	ultravijolični svetlobni spekter
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid
VIS	vidna spektrofotometrija
WASP	proteini sindroma Wiskott-Aldrich (okrajšano iz angl. Wiskott-Aldrich syndrome proteins)
WAVE	družina verprolinu sorodnih proteinov (okrajšano iz angl. WASP family verproline-homologous proteins)
WT	divja oblika (okrajšano iz angl. wild type)
β_2 -AR	β_2 -adrenergični receptor
β -arr	β -arestin

VLOGA AKTINSKIH FILAMENTOV V DELOVANJU MEMBRANSKIH RECEPTORJEV, SKLOPLJENIH Z G-PROTEINI

Ključne besede: Molekularna biologija; celična membrana; citoskelet; aktini; receptor, sklopljen z G-proteinom; signal, prevajanje; endocitoza; citohalazin D; karvedilol; biološki transport; luminiscenčno merjenje – metoda; elektronska spinska resonanca, spektroskopija – metoda; konfokalna mikroskopija – metoda

IZVLEČEK

Doktorska naloga obravnava vlogo aktinskega citoskeleta v različnih načinu delovanja GPCR-jev. Osredotočili smo se na proučevanje vloge aktina pri dveh sklopih dogodkov po aktivaciji GPCR-jev, tj. aktivaciji znotrajcelične sporočilne poti in razjasnitvi posredovalne vloge $G_{\alpha q/11}$ v tem procesu. Proučili smo tudi vpliv aktivacije receptorja s funkcionalno specifičnim agonistom, ki aktivira od proteina G neodvisno sporočilno pot v celici, na razporeditev aktina. Nadalje smo proučili vlogo aktina v drugem sklopu dogodkov, ki sledijo aktivaciji GPCR-jev, tj. vlogo aktina pri endocitozi receptorja ter oblikovanju proteinsko-proteinskih interakcij med receptorjem in adaptornimi proteini β -arestini. Za osvetlitev pomena membranskih mikrodomen v organizaciji aktinskega citoskeleta in za oblikovanje proteinskih povezav receptorja z β -arestini ter njihovo delovanje smo uporabili mutirano celično linijo CHO 215 brez lipidnih raftov in tako prvi proučili te procese v celicah brez uporabe farmakoloških sredstev.

Pri delu smo uporabili metode, s katerimi smo spremljali pomen aktina za funkcionalno neokrnjenost receptorjev, tj. farmakološki pristop za manipulacijo delovanja aktinskega citoskeleta, teste vezave radioaktivnega liganda in teste za ugotavljanje aktivacije drugotne sporočilne v celici. Pripravili smo trajno celično linijo, ki izraža avtofluorescenčno označeni aktin in predstavnika GPCR-jev (NK1-R) in omogoča proučevanje funkcije aktina v živih celicah. Dinamiko aktinskega citoskeleta in lokalizacijo proučevanih receptorjev v različnih procesih smo spremljali na ravni konfokalne mikroskopije in proučevane proteine vizualizirali z imunohistokemičnimi metodami in avtofluorescenčnimi označevalci. Proteinsko-proteinske interakcije med receptorjem in adaptornimi proteini ter spremembe v konformaciji adaptornih

proteinov smo spremljali z metodo BRET². Za ugotavljanje lateralne domenske zgradbe plazmamembrane in mikrolokalizacije receptorjev smo uporabili metodo EPR, saj omogoča proučevanje opisanih procesov pri živih celicah.

S pridobljenimi rezultati smo potrdili, da stimulacija GPCR-jev, ki se prednostno vežejo z $G_{\alpha q/11}$, vodi do preoblikovanja mreže aktinskih filamentov, ki se ujema z aktivacijo RhoA, in da $G_{\alpha q/11}$ deluje kot posredovalni protein pri receptorsko vzpodbujeni prerazporeditvi aktinskih filamentov. Nasprotno pa stimulacija GPCR-jev z agonistom, ki se prednostno vežejo z $G_{\alpha s}$ (npr. β_2 -AR), ne vodi do preoblikovanja aktinskega citoskeleta. Vendar pa vspodbuditev β_2 -AR, s funkcionalno specifičnim agonistom karvedilolom, vodi do reorganizacije aktina, ki je posredovana z β -arestinom, je neodvisna od aktivacije RhoA in tudi ne vključuje nastanka stresnih filamentov. Izražanje konstitutivno aktivne mutante $G_{\alpha s}$ zavre s karvedilolom vspodbujene spremembe v reorganizaciji aktina, kar potrjuje inhibitorno vlogo aktivne $G_{\alpha s}$ v tem procesu. V nadaljevanju smo potrdili vlogo aktina v začetnih fazah endocitoze NK1-R ter z metodo BRET² prvi opisali vlogo aktina v funkcionalni interakciji NK1-R z β -arestinom 1. V zadnjem delu naloge smo z uporabo celične linije CHO 215 potrdili pomen lipidnih raftov/kaveol v: i) urejenosti plazmamembrane in razporejanju receptorja NK1-R v membrani, ii) delovanju receptorja po stimulaciji z agonistom in iii) funkcionalni interakciji med NK1-R in β -arestini, predvsem β -arestinom 2, kar vse bistveno prispeva k razumevanju vloge membranskih mikrodomen v regulaciji delovanja GPCR-jev.

THE ROLE OF ACTIN FILAMENTS IN THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR FUNCTION

Key words: Molecular biology; cell membrane; cytoskeleton; actins; receptors, G-protein coupled; signal transduction; endocytosis; cytochalasine D; carvedilol; biological transport; luminiscent measurement – methods; electron spin resonance spectroscopy – methods; confocal microscopy – methods

ABSTRACT

The aim of the doctoral thesis was to study the role of actin filaments in several aspects of GPCR function. We focused on the role of actin cytoskeleton in two sets of events following the activation of the receptor, i.e. the role of actin in the activation of the intracellular signalling pathway in particular the role of $G\alpha_{q/11}$ in this process. In addition, we also examined the role of biased agonist of β_2 -AR, which antagonizes the G-protein signalling, in the actin cytoskeleton reorganization. Next, we studied the role of actin in the second set of events after the activation of GPCRs, i.e. the role of actin in receptor endocytosis and the formation of protein-protein complexes between the receptor and the adaptor proteins, namely β -arrestins. To examine the role of the membrane microdomains in the reorganization of actin cytoskeleton, the formation of protein complexes between the receptor and β -arrestins, as well as in GPCR function, we used a mutant CHO 215 cell line lacking lipid rafts and studied these processes in cells without the use of pharmacological means to manipulate their natural environment.

We employed several methods, which enabled us to monitor the role of actin in the functional integrity of the receptor, i.e. various pharmacological agents to manipulate the actin cytoskeleton function, radioactive ligand binding assays and tests for measuring the activation of the signalling pathway after the stimulation of the receptor. In addition, we established a cell line stably expressing autofluorescently tagged actin (pEYFP-actin) and the member of GPCRs (NK1-R) as it enabled us to study the function of actin in living cells. Dynamics of the actin cytoskeleton and the cellular localization of studied receptors were monitored by means of confocal

microscopy and the studied proteins were visualized using immunohistochemical methods and autofluorescent tags. Protein-protein interactions between the receptor and adaptor proteins, as well as the conformational changes of the studied proteins in the natural environment of living cells, were studied using the BRET² method. To establish the membrane domain structure and microlocalization of the receptors in the plasma membrane we used the EPR method, which enabled us to study these processes in the living cell.

Our results demonstrated the RhoA dependent actin cytoskeleton rearrangement and stress fiber formation to be a $G\alpha_{q/11}$ mediated event. In addition, the $G\alpha_{q/11}$ was shown to play an intermediate role in the receptor induced actin cytoskeleton reorganization. In contrast, the stimulation of the $G_{\alpha s}$ coupled GPCRs (i.e. β_2 -AR) with the agonist did not result in any changes in the actin cytoskeleton reorganization. Furthermore, the activation of β_2 -AR with biased agonist carvedilol lead to actin cytoskeleton rearrangement that we demonstrated to be a β -arrestin dependent and RhoA independent event; however no stress fibers were seen. Next, we showed the actin cytoskeleton playing a role in the initial state of the NK1-R endocytosis as well as in the functional interaction between NK1-R and β -arrestin 1, which we were the first to demonstrate with the BRET² method. Finally, using the CHO 215 cell line we revealed the role of lipid rafts in: i) the receptor plasma membrane microlocalization, ii) agonist induced receptor function and iii) functional interaction with β -arrestins, in particular with β -arrestin 2. Altogether our findings substantially contribute to a better understanding of membrane microdomains in the regulation of GPCRs.

1 UVOD

Membranski receptorji, sklopljeni z G-proteini (GPCR-ji), sestavljajo največjo družino membranskih receptorjev, kodiranih v genomu sesalcev, in sodelujejo pri oblikovanju celičnega odziva na številne endogene ligande in terapevtske preparate. Klasični tri-komponentni model za prenos sporočila s posredovanjem GPCR-jev vključuje receptor, G-protein in efektor. Temeljni procesi, ki urejajo delovanje teh receptorjev, vključujejo fosforilacijo/desenzibilizacijo, internalizacijo in deregulacijo membranskih receptorjev. Pogosto pa se z aktivacijo GPCR-jev ujema tudi prerazporeditev aktinskih filamentov, ki je eden pomembnih odzivov celice na zunajcelični signal. Vprašanja, ki se zastavljajo pri proučevanju vloge aktinskega citoskeleta v delovanju GPCR-jev, so: i) kakšen je mehanizem, ki privede do polimerizacije in preoblikovanja mreže aktinskih filamentov po spodbuditvi receptorja, ii) kakšna je vloga posameznih oblik G-proteinov pri preoblikovanju mreže aktinskih filamentov ($G_{\alpha q/11}$ vs. $G_{\alpha s}$), iii) kakšen je funkcionalni pomen preoblikovanja aktinskega citoskeleta pri uravnavanju delovanja GPCR-jev, predvsem z vidika oblikovanja relevantnih proteinsko-proteinskih povezav med receptorji in proteinskimi partnerji, iv) kakšni sta vloga in povezava med aktinskim citoskeletom in procesom endocitoze receptorjev in v) kakšna je vloga aktinskega citoskeleta pri vzdrževanju mikroarhitekture membranskih mikrodomen ter prerazporejanju GPCR-jev znotraj teh območij.

Pri iskanju odgovorov na zastavljena vprašanja smo postavili naslednje hipoteze:

- 1. hipoteza:** Spodbuditev GPCR-jev, ki se prednostno vežejo z $G_{\alpha q/11}$, vodi do preoblikovanja mreže aktinskih filamentov in sprememb v celični morfologiji.
- 2. hipoteza:** $G_{\alpha q/11}$ deluje kot posredovalni protein pri receptorsko vspodbujeni prerazporeditvi aktinskih filamentov.
- 3. hipoteza:** Izražanje β -arestina 1 je pomembno za receptorskovo vspodbujeno prerazporeditev aktinskih filamentov.
- 4. hipoteza:** Spodbuditev z agonistom privede do oblikovanja multiproteinskih kompleksov med receptorji, adaptornimi proteini in aktinom.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 AKTINSKI CITOSKELET

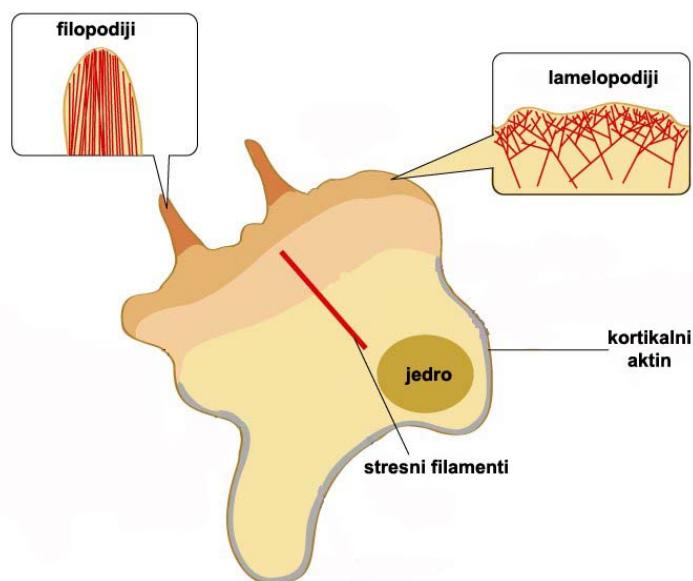
Aktin so prvič opisali kot enega izmed proteinov, ki sodeluje pri mišičnem krčenju skupaj z miozinom. Je v vseh evkariontskih celicah in je najbolj razširjena proteinska sestavina celice. V nemišičnih celicah lahko predstavlja tudi do pet odstotkov vseh celičnih proteinov in ga običajno najdemo tik pod celično membrano. V mišičnih celicah pa delež aktina lahko doseže tudi do 20 odstotkov vseh celičnih proteinov. Aktinski filamenti s svojo prisotnostjo v nemišičnih in mišičnih celicah nakazujejo, da nimajo vloge le pri gibanju celic, temveč sodelujejo tudi pri številnih drugih celičnih procesih, kot so: citokineza, prenos sporočila v celici, vzdrževanje celične oblike in endocitoza (Janmey in sod., 2001; Rivero in Cvrckova, 2007).

V večini večceličnih organizmov najdemo več oblik aktina, tako v mišičnih kot tudi v nemišičnih celicah. V sesalskih tkivih je vsaj šest različnih tipov aktina, ki se delijo v tri razrede na temelju izoelektrične točke. To so aktin alfa (α), beta (β) in gama (γ). Aktin α v večini najdemo v različnih vrstah mišičnih celic, aktin β in γ pa sta največkrat sestavini nemišičnih celic. Aminokislinska zaporedja različnih oblik aktina so podobna znotraj vrste in tudi med vrstami (Janmey in sod., 2001). V splošnem ločimo dve obliki aktina: aktin G in aktin F. Aktin G je monomerna oblika z molekulsko težo približno 42 kDa. Pod ustreznimi pogoji polimerizira v filamentozni (nitasti) aktin F. Ta oblika aktina tvori nitaste strukture do premera 10 μm . S povezovanjem F-aktinskih nitk s številnimi vezalnimi proteini aktina (angl. actin binding proteins - ABP) nastanejo bolj kompleksne organizirane tvorbe, kot so stresni filamenti, kortikalne aktinske nitke, filopodiji in psevdopodiji (glej sliko 1) (dos Remedios in Thomas, 2001; Rivero in Cvrckova, 2007).

Stresni filamenti se oblikujejo v celicah vzdolž površine, na katero so celice pritrjene. Gre za snope krčljivih aktinsko-miozinskih filamentov, ki se raztezajo v citoplazmi celic in se pritrjujejo na notranjo površino celične membrane na posebnih pričvrstitvenih območjih, t. i. fokalnih adhezijskih plakih (angl. focal adhesion plaques). Na teh mestih nastane stik med celično membrano in podlago s

posredovanjem transmembranskih adhezijskih proteinov (integrinov). Stresni filamenti, sestavljeni iz snopov vzporedno potekajočih F-aktinskih nitk, so orientirani vzporedno s smerjo celičnega gibanja. F-aktinski filamenti v stresnih nitkah so bolj obstojni od tistih v kortikalnem območju (Janmey in sod., 2001).

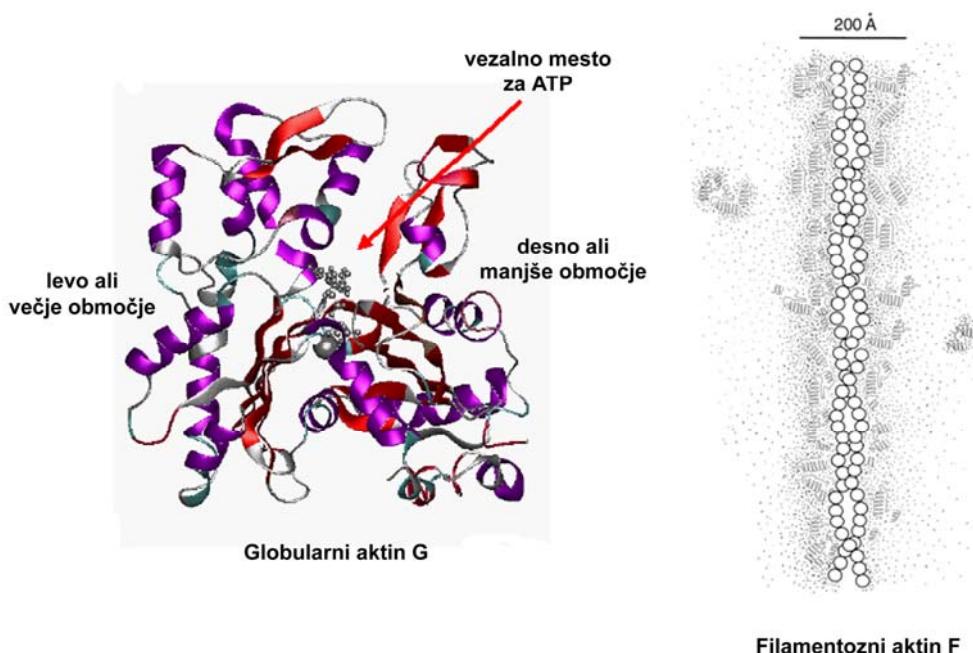
Aktin F v citoplazmi fibroblastov oblikuje prepleteno mrežo tankih nitk, ki je pretežno tik pod celično membrano. To so t. i. kortikalne aktinske nitke. Kortikalni filamenti predstavljajo dinamično strukturo, ki neprehnomo polimerizira in depolimerizira, se povezuje in razpada (lomi), vsa ta dogajanja pa nadzorujejo specifični ABP. Znano je, da kortikalni aktin sodeluje v procesih pinocitoze, endocitoze, eksocitoze, citokineze, pri nastanku mikrovilov, lamelopodijev in filopodijev ter pri celičnem gibanju. Lamelopodiji so na apikalni površini celic in sodelujejo pri premikanju in pritrjevanju celic na površino. Njihovo telo je sestavljeno iz prepletenih aktinskih filamentov, ki so s svojim hitro rastočim koncem usmerjeni proti celični membrani v smeri gibanja celic in v smeri mest, na katerih se celice pritrjujejo na površino. Filopodiji so nitasti in zelo dinamični podaljški lamelopodijev. Telo filopodijev podobno kot telo lamelopodijev sestavljajo prepleteni aktinski filamenti. Sodelujejo pri celičnem gibanju in pritrjevanju celic na podlogo. Lamelopodije in filopodije srečamo pri keratinocitih, fibroblastih in pri živčnih celicah (dos Remedios in Thomas, 2001).



Slika 1: Shematični prikaz višje organiziranih tvorb aktina F.

2.1.1 Nastanek aktinskih filamentov

Že od odkritja aktina kot ključne sestavine krčljivega mehanizma mišičnih celic je opisana sposobnost prečiščenega aktina za zviševanje viskoznosti njegove vodne raztopine. Biokemične in biofizikalne raziskave so pokazale, da kemični dražljaj, kot je npr. dodatek monovalentne ali divalentne soli v raztopino, kjer je prečiščeni aktin, zvišuje njeno viskozno posredno s spodbuditvijo polimerizacije globularnega aktina G v filamentozni aktin F (Janmey in sod., 2001). Shematični prikaz strukture aktina G in aktina F prikazuje slika 2.



Slika 2: Shematični prikaz aktina G in aktina F.

Globularni aktin G tvori polipeptidna veriga, sestavljena iz približno 375 aminokislin, ki ima amino- (N-) in karboksi- (C-)terminalni konec. Na njej razlikujemo dve približno enako veliki območji, ki sta bili skozi zgodovino razdeljeni in poimenovani na levo ali večje in desno ali manjše območje (glej sliko 2). Vsako od navedenih območij sestavlja še dve podenoti. V manjšem območju sta N- in C-terminalni konec, med obema območjem pa sta vezalno mesto za ATP (glej sliko 2) ter še visoko afinitetno mesto za vezavo dvovalentnih ionov, kot sta kalcij (Ca^{2+}) in magnezij (Mg^{2+}), ki

tekmujeta za isto vezalno mesto. Dva konca aktinskega filimenta, označena kot plus in minus oz. hitro in počasi rastoči konec, se razlikujeta v geometriji, stabilnosti in hitrosti rasti.

Prva stopnja pri nastanku aktinskega filimenta je nukleacija. Gre za dogodek majhne verjetnosti, ko naj bi s sočasnim kombiniranjem treh aktinskih monomerov nastalo trimerno jedro (nucleus). To jedro (triplet) največkrat razpade nazaj v monomerne enote aktina G, občasno pa je obstojno dovolj časa, da omogoči nadaljnjo vezavo aktinskih molekul. Sledi proces podaljševanja z dodajanjem aktinskih monomerov na oba konca jedra. Dodajanje je približno 10-krat hitrejše na koncu plus kot na koncu minus. Po vgraditvi monomera pride do hidrolize ATP in nastane adenozin difosfat (ADP) aktin. Ko aktinski filament doseže svojo dolžino, pride do odpuščanja ADP-aktina s konca minus filimenta z enako hitrostjo, kot se dodaja ATP-aktin na koncu plus filimenta (Kekic in sod., 2001). Snovi, ki vplivajo na proces polimerizacije/depolimerizacije aktinskih filamentov, se lahko uspešno uporabijo za njihovo proučevanje. Najpogosteje se v ta namen uporabljajo citohalazini in derivati falotoksinov. Citohalazini z vezavo na konec plus aktinskega filimenta preprečijo polimerizacijo. Falotoksi pa se vežejo vzdolž F-aktinskih filamentov in preprečujejo njihovo depolimerizacijo (Wakatsuki in sod., 2001).

2.2 RECEPTORJI, SKLOPLJENI Z G-PROTEINOM

Receptorji, sklopljeni z G-proteinom (G Protein Coupled Receptors — GPCR), ali receptorji s sedmimi transmembranskimi področji (angl. seven transmembrane receptors — 7TM), sestavljajo največjo družino proteinov, kodiranih v človeškem genomu (Gether, 2000). GPCR-je in njihove sporočilne poti so odkrili tudi v evolucijsko zelo oddaljenih organizmih, kot so: proto- in metazoji, kvasovke, opisali pa so jih tudi pri rastlinah (Schoneberg in sod., 2004). Približno 3—4 % genov v človeškem genomu nosi zapis za GPCR-je in znotraj družine GPCR-jev je opisanih približno 1000 različnih receptorjev. Okoli 50 % predpisanih zdravil (Horn in sod., 2003), med katera trenutno spadajo tudi številna najbolje prodajana zdravila (npr. Claritine® (alergije), Zantac® (želodčni refluks), Prozac® (depresija)), deluje prek GPCR-jev. GPCR-ji so izraženi v skoraj vseh organih in posredno ali neposredno

sodelujejo v skoraj vseh fizioloških procesih v organizmu. Okvare v njihovem delovanju so osnova za približno 30 pirojenih in pridobljenih obolenj, med katera spadajo: retinitis pigmentosa, hiper- in hipotireoidizem, nefrogeni diabetes insipidus, motnje v plodnosti, srčne okvare itd. (Schoneberg in sod., 2004).

GPCR-ji posredujejo učinke številnih ligandov, med katere štejemo različne biogene amine, peptide, glikoproteine, lipide, nukleotide in ione. Posredujejo tudi učinke ekstracelularnih sporočil, kot so: svetloba, vonj in okus (Gether, 2000). Poleg GPCR-jev z znano funkcijo in poznanimi ligandi, je opisanih približno 160 receptorjev sirot, tj. GPCR-jev brez poznanih endogenih ligandov (Takeda in sod., 2002).

2.2.1 Strukturne lastnosti GPCR-jev

GPCR-ji so transmembranski proteini, ki skozi membrano prehajajo s sedmimi hidrofobnimi verigami in segajo v zunajcelično območje z N- in v znotrajcelično območje s C-terminalnim koncem (Ji in sod., 1998). Transmembranska območja med seboj povezujejo tri izmenične zunajcelične in znotrajcelične zanke. Na receptorju tako ločimo tri območja: zunajcelično območje receptorja, območje receptorja znotraj membrane (transmembransko območje) in znotrajcelično območje receptorja (Schwartz, 2003). Vezavna mesta za ligande z nizko molekularno težo so na transmembranskih območjih receptorja, medtem ko so vezavna mesta za peptidne in proteinske ligande nahajajo na zunajceličnih zankah receptorja in N- terminalnem koncu.

Model receptorja s sedmimi transmembranskimi področji so prvič z veliko natančnostjo rekonstruirali s krioelektronsko mikroskopijo in z metodo difrakcije X-žarkov (Schwartz in sod., 2006). Do danes sta rodopsin in beta 2 adrenergični receptor (β_2 -AR) edina receptorja iz družine GPCR-jev z znano kristalno strukturo, na podlagi katerih sklepamo tudi o strukturi drugih GPCR-jev (Cherezov in sod., 2007; Palczewski in sod., 2000; Rasmussen in sod., 2007; Rosenbaum in sod., 2007).

Družino GPCR-jev lahko na podlagi podobnosti nukleotidnega zaporedja razdelimo v tri poddružine: A, B in C. Največja poddružina GPCR-jev je družina A ali družina receptorjev, podobnih receptorju za rodopsin, ki jo glede na strukturne razlike med posameznimi receptorji, ki spadajo v to družino, nadalje lahko razdelimo še v šest

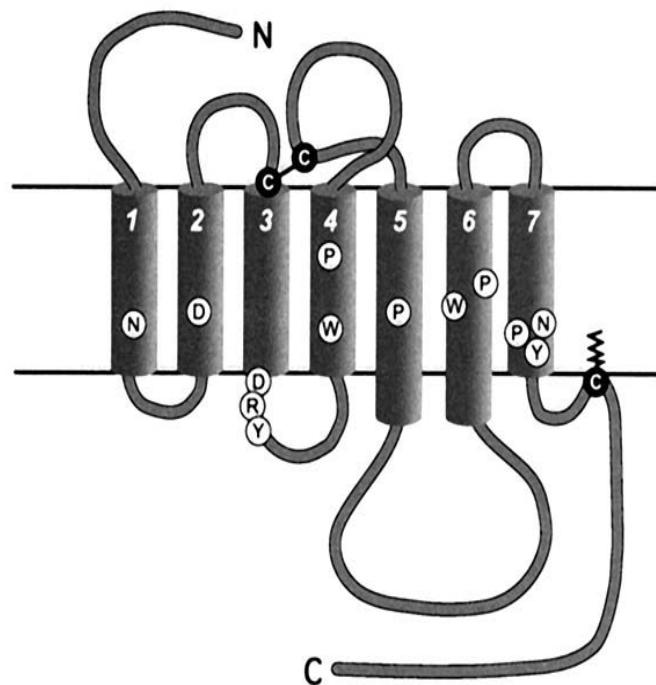
večjih skupin (glej tabelo 1). Skupna lastnost receptorjev, ki spadajo v to družino je aminokislina arginin (Arg), ki skupaj z asparaginsko kislino (Asp) in tirozinom (Tyr) tvori t. i. motiv DRY (Asp-Arg-Tyr) na citoplazemskem koncu tretjega transmembranskega območja (Gether, 2000). V družino B spada približno 20 različnih receptorjev na katere se vežejo različni peptidni hormoni in neuropeptidi, v družino C pa spadajo metabotropni glutamatni receptorji, metabotropni receptorji za γ -aminobutirično kislino (GABA) (receptor tipa B za GABA — GABA_B), receptorji za kalcij (receptor za zaznavanje kalcija), vomeronazalni in pred kratkim odkriti receptorji za zaznavo okusa (Gether, 2000; Anon, 2004) (glej tabelo 1).

Tabela 1: Preglednica družin GPCR-jev.

Povzeto po (Gether, 2000).

Družina A: Družina receptorjev, podobnih receptorju za rodopsin
1. receptorji za biogene amine (β_2 -AR npr.)
2. receptorji za holecistokinin, endotelin, tahikinin (nevrokininski receptor tip 1 (NK1-R)), receptor za tiroliberin (angl. tireotropin releasing hormone; TRH)
3. receptorji za opsin in bradikinin
4. receptorji za adenosin, kanabinoidni receptor, olfaktorni receptorji
5. receptorji za kemokine, receptor za gonadoliberin (gonadotropin releasing hormone; GnRH), luteinizirajoči hormon (LH), folikle stimulirajoči hormon (FSH), receptor za vazopresin
6. receptorji za melatonin
Družina B
receptor za kalcitonin
receptor za paratireoidni hormon (PTH)
receptor za glukagon, receptor za sekretin, receptor za vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)
receptor za latrotoksin
Družina C
metabotropni glutamatni receptorji
metabotropni receptorji za γ -aminobutirično kislino (GABA)
receptorji kalcij
vomeronazalni feromonski receptorji
receptorji za zaznavo okusa

Zunajcelično območje receptorja je sestavljeno iz N-terminalnega konca in treh hidrofilnih zank, ki segajo na zunajcelično površino celične membrane. Večina, vendar ne vsi GPCR-ji imajo na N-terminalnem koncu na asparagin pripetega enega ali več oligosaharidov. Zunajcelične zanke so lahko različno dolge in različno razmeščene (Palczewski in sod., 2000). Posamezne družine GPCR-jev se med seboj razlikujejo predvsem v zunajceličnem območju receptorja. Pri receptorjih družine A je med prvo in drugo zunajcelično zanko vzpostavljena disulfidna vez. Na C-terminalni konec receptorja je vezana tudi palmitinska kislina (16 C-atomov dolga maščobna kislina) (palmitoilacija), ki sidra začetni del znotrajceličnega terminalnega konca v lipidni dvoslojnik (glej sliko 3).



Slika 3: Shematični prikaz receptorja razreda A.

Povzeto po (Gether, 2000).

Območje GPCR-jev, ki je znotraj celične membrane, je sestavljeno iz sedmih vijačnic α in kot pri večini transmembranskih proteinov so območja znotraj membrane sestavljena iz zaporedja hidrofobnih aminokislin. Transmembranska območja (angl. transmembrane — TM) označujemo s številkami od 1-7. Na zunajceličnem in znotrajceličnem območju so transmembranska območja povezana s tremi zunaj- in tremi znotrajceličnimi zankami (Baldwin, 1993). Poleg teh jih med seboj trdno povezujejo tudi vodikove in ionske vezi (Ji in sod., 1998). Pri bakteriorodopsinu in živalskem rodopsinu so transmembranska območja v membrani prostorsko urejena v obliki zaprte zanke, kjer so posamezna območja razvrščena v obratni smeri urinega kazalca od TM 1 proti TM 7. TM 1, 4 in 7 so zaradi večje vsebnosti hidrofobnih aminokislin bolj hidrofobna od območij 2, 3, 5 in 6, na katerih je večje število ioniziranih ali nevtralnih zaporedij aminokislin (Ji in sod., 1998).

Citoplazemske območje receptorjev predstavljajo tri znotrajcelične zanke in C-terminalni konec. Prvi dve zanki sta glede na velikost in aminokislinsko zaporedje med receptorji precej homologni. Večja spremenljivost se kaže v velikosti in

zaporedu aminokislin v tretji znotrajcelični zanki, ki sodeluje pri aktivaciji G-proteinov in spontani aktivaciji receptorja. Za specifičnost vezave G-proteina na aktivirani receptor je poleg druge in tretje znotrajcelične zanke pomemben tudi C-terminalni konec receptorja (Chakir in sod., 2003). Citoplazemska področje receptorja, predvsem druga in tretja znotrajcelična zanka ter C-terminalni konec, je pomembno tudi za vezavo β -arestinov in posledično desenzibilizacijo receptorja (Lefkowitz, 1998; Marion in sod., 2006).

2.2.2 Nevrokininski receptor tip 1 (NK1-R)

Nevrokininski receptor tip 1 (NK1-R) je receptor za tahikinine in spada v 2. skupino receptorjev družine A. Sesalski tahikinini so družina peptidov, med katerimi so najbolje opisani: substanca P (SP), nevrokinin A (NA) in nevrokinin B (NB). NB delujejo predvsem na področju centralnega živčnega sistema in hrbtenjače, NA in SP pa v centralnem in perifernem živčnem sistemu, kjer se sproščata iz živčnih končičev in delujeta kot ekscitatorna nevrotransmiterja. Do nedavnega je veljalo prepričanje, da so tahikinini družina peptidov, ki se veže predvsem na receptorje, ki so na različnih delih živčnega sistema. Novejše študije pa so receptorje za vezavo tahikininov opisale tudi v kostnem tkivu, endotelijskih celicah, Leydigovih celicah in različnih celicah imunskega sistema (Maggi, 1995).

Tahikinini v organizmu delujejo kot nevrotransmiterji, nevroimunomodulatorji in imajo pomembno vlogo v nocicepciji (zaznavanje bolečinskih dražljajev). Opisani so bili tudi pri različnih obolenjih, kot so: astma, vnetna bolezen črevesja (angl. inflammatory bowel disease — IBD) in različna psihična obolenja, pripisujejo pa jim tudi vlogo v številnih malignih procesih (Khawaja in Rogers, 1996).

Leta 1986 so bili oklasificirani trije nevrokininski receptorji: nevrokininski receptor tipa 1 (NK1-R), nevrokininski receptor tipa 2 (NK2-R) in nevrokininski receptor tipa 3 (NK3-R). Receptorji so si strukturno zelo podobni. Podobnost v zaporedu aminokislin med posameznimi receptorji je približno 40-odstotna; na citoplazemskem področju je 75-odstotna, na transmembranskem pa 70-odstotna (Khawaja in Rogers, 1996).

NK1-R je predvsem na področju centralnega in perifernega živčnega sistema. Z veliko afiniteto veže peptid SP in nekompetitivno s SP tudi t. i. septide in septidom

podobne agoniste. Nekompetitivna vezava dveh različnih agonistov kaže na potencialni obstoj dveh različnih veznih mest na receptorju (Maggi in Schwartz, 1997).

SP je bila iz možganov in črevesja konja prvič izolirana in opisana leta 1931, prečiščena pa je bila prvič šele trideset let kasneje. SP je droben peptid sestavljen iz 11 aminokislin z zaporedjem: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met in se sintetizira v nevronih centralnega živčnega sistema (CŽS). Na živčnih končičih se izloča skupaj s serotoninom, TRH in glutamatom (Hokfelt in Kuteeva, 2006; Khawaja in Rogers, 1996) ter sodeluje v procesih nastanka in zaznavanja bolečine, vnetnih procesih živčevja, kontrakciji gladke mišičnine in je tudi ključni nevrotransmiter, udeležen pri bruhanju. Poleg naštetega sodeluje tudi pri rasti epitelijskih celic in celjenju ran (Severini in sod., 2002). SP se veže na ekstracelularno območje NK1-R, lahko pa se veže tudi na mesta vzdolž TM II (Rosenkilde in sod., 1994).

2.2.3 Beta 2 adrenergični receptor (β_2 -AR)

β_2 -AR je bil kloniran leta 1982 in ga zaradi podobnosti z rodopsinom uvrščamo v družino A GPCR-jev. Večinoma je izražen v gladki mišičnini srčno-žilnega sistema in dihal ter v sečnem mehurju, maternici, maščobnem tkivu, ledvicah in gastrointestinalnem traktu (Daaka in sod., 1997).

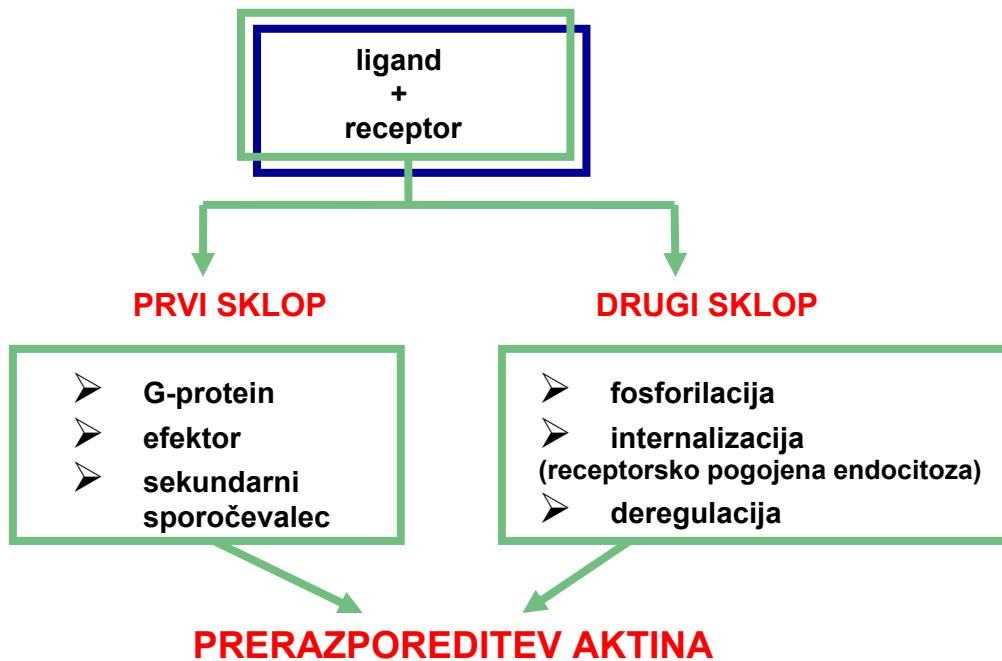
β_2 -AR je v monomerni ali v dimerni obliki, pri čemer tvori homo- in heterodimere (Anderson, 2006; Johnson, 2006). Vezni mesti za G-proteine in GPCR-receptorske kinaze (angl. G-protein coupled receptor kinases — GRK) sta na β_2 -AR na N- in C-terminalnem koncu tretje znotrajcelične zanke, na kateri so tudi številna nestrukturirana področja, ki sodelujejo pri oblikovanju številnih proteinsko-proteinskih interakcij (Rasmussen in sod., 2007). Vezavno mesto za ligande (cateholamine) je pri β_2 -AR oblikovano kot žep in ga sestavlja na TM 3 amonikislina aspartat (Asp 113), na TM 5 trije serini (Ser 203, 204 in 207) in asparagin 293 (Asn 293) ter fenilalanin 290 (Phe 290) na TM 6. Aspartat v TM 3 z aminoskupino cateholaminov oblikuje ionsko vez, serini na TM 5 s hidroksilno skupino na fenilnem obroču cateholaminov

oblikujejo vodikovo vez, asparagin se poveže z β -hidroksilno skupino, fenilalanin pa z aromatskim obročem kateholaminov (Swaminath in sod., 2004).

Ligande, ki se vežejo na β_2 -AR, delimo na kratko in dolgo delujoče agoniste. Kratko delujoči agonisti, kamor spada albuterol, so največkrat hidrofilni in iz zunajceličnega prostora preidejo direktno do aktivnega mesta na receptorju, kamor se vežejo. Dolgo delujoči agonisti, sem npr. spada formoterol, so najpogosteje lipofilni in se ne vežejo direktno na aktivno mesto na receptorju, temveč se naložijo v celični membrani v obliki depoja, od koder se počasi sproščajo in nato vežejo na receptor (Johnson, 2006).

2.3 AKTIVACIJA GPCR-jev

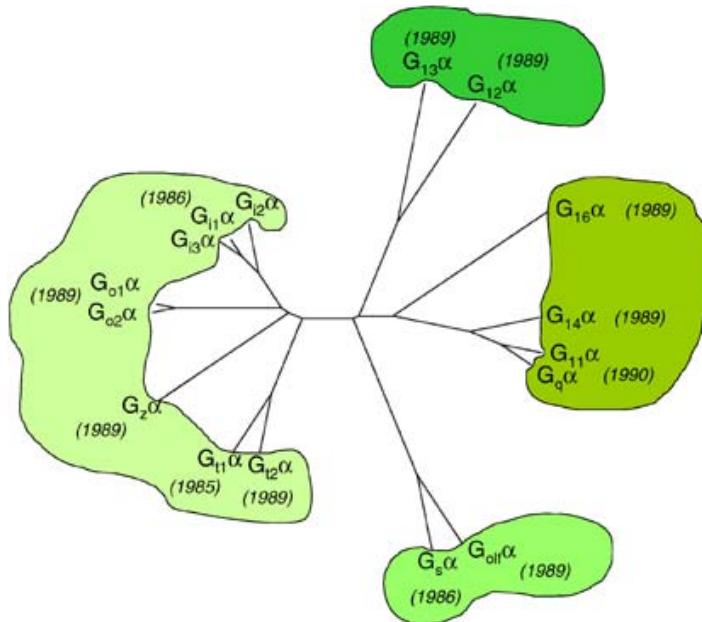
Spodbuditev GPCR-jev z agonistom vodi do dveh sklopov medsebojno povezanih dogodkov. Prvi sklop tvorijo procesi, ki privedejo do aktivacije drugotne sporočilne poti v celici (G-protein \rightarrow efektor \rightarrow sekundarni sporočevalec), v drug sklop pa sodijo mehanizmi, ki regulirajo raven signalizacije v celici oz. dogodke v prvem sklopu (Ferguson, 2001). To so procesi fosforilacije/desenzibilizacije, internalizacije (receptorsko pogojena endocitoza) in deregulacije membranskih receptorjev. Predvideva se, da lahko do prerazporeditve aktinskih filamentov privedeta oba sklopa dogodkov (glej sliko 4).



Slika 4: Shematični prikaz dogajanj po aktivaciji GPCR-jev z agonistom.

2.3.1 Aktivacija drugotne sporočilne poti in prenos sporočila prek heterotrimernih G-proteinov

Spodbuditev GPCR-jev z agonistom privede do vezave aktiviranega receptorja s heterotrimernim G-proteinom. G-proteini so sestavljeni iz treh podenot α , β in γ in so v dveh stanjih: neaktivnem, ko je na podenoto α vezan gvanozin difosfat (GDP) in so vse tri podenote povezane, in v aktivnem stanju, ko je na podenoto α vezan gvanozin trifosfat (GTP) in se le-ta loči od podenote $\beta\gamma$. Prvotno je veljalo prepričanje, da se večina sporočil prenaša samo prek podenote α , danes vemo, da se skoraj enako število sporočil prenese tudi preko podenot $\beta\gamma$ (Milligan in Kostenis, 2006). Z molekularnim kloniranjem je bilo odkritih najmanj 35 različnih genov, ki kodirajo različne podenote heterotrimernih G-proteinov, od tega jih podenoto α kodira 16 ($G\alpha_s$, $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{t1}$, $G\alpha_{t2}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{olf}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{16}$), podenoto β 5 in podenoto γ 14 (glej sliko 5).



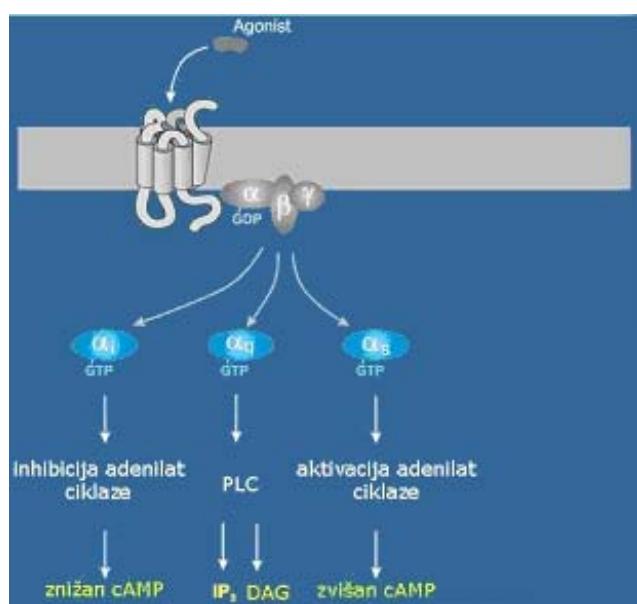
Slika 5: Sorodnost podenot alfa heterotrimernih G-proteinov.

Povzeto po (Milligan in Kostenis, 2006).

G-proteini se vežejo na različne znotrajcelične zanke GPCR-jev. Z uporabo točkastih mutacij je bilo ugotovljeno, da sta za selektivnost vezave G-proteinov na različne znotrajcelične zanke receptorja pomembna predvsem končni N-del tretje znotrajcelične zanke v bližini TM 5 in končni C-del tretje znotrajcelične zanke v bližini TM 6 GPCR-ja (Gether, 2000).

Prenos sporočila prek G-proteina poteka v treh korakih. Prvi korak je aktivacija receptorja in prenos sporočila od aktiviranega receptorja do G-proteina. Vezava G-proteina na aktivirani receptor povzroči spremembo v konformaciji področja na G-proteinu in sproščanje GDP-ja iz podenote α . Po sprostitvi GDP-ja, tik preden se veže na G-protein GTP, se povezava med receptorjem in G-proteinom še dodatno okrepi, kar imenujemo »empty pocket« konformacijska sprememba. Po vezavi GTP-ja se na α -podeni G-proteina ustvari novo vezavno mesto, s katerim se za 20—100 krat ojača tudi afiniteta G-proteina za vezavo z efektorjem (Hamm, 1998). Različne aktivirane podenote α se specifično vežejo z različnimi efektorji, kot so: adenilatciklaza (AC), fosfolipaza C- β 2 (angl. phospholipase C- β 2 — PLC β 2), različne fosfatidil inozitol 3 kinaze (PI-3 kinaza) (glej sliko 6), uravnavajo Ca^{2+} , K^+ in Na^+ ionske kanalčke, ter različne drobne GTP-aze, kot so Rho, Cdc 42 in Rac (Hamm,

1998). En sam receptor lahko aktivira več molekul G-proteina in ena sama aktivna podenota α lahko sproži več katalitičnih ciklusov efektorja (Bourne in Stryer, 1992).



Slika 6: Shematični prikaz prenosa sporočila prek nekaterih podenot α heterotrimernih G-proteinov.

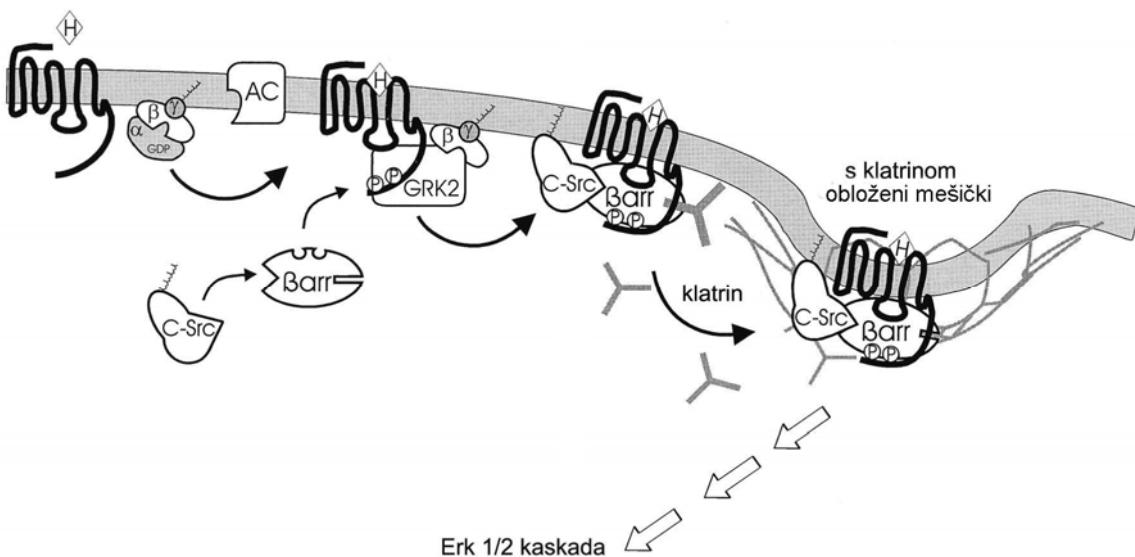
Podenote $\beta\gamma$ zatem, ko se odcepijo od aktivne oblike podenote α , lahko delujejo na podobne efektorje kot podenote α (Hamm, 1998). Različni efektorji v celicah uravnavajo nastajanje sekundarnih sporočevalcev, med katere spadajo ciklični adenozin monofosfat (cAMP), ciklični gvanozin monofosfat (cGMP) in oba produkta hidrolize fosfatidil inozitol fosfata: inozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP₃) in diacil glicerol (DAG), (glej sliko 6), kar nato povzroči mobilizacijo znotrajceličnega Ca²⁺ in aktivacijo protein-kinaze C (PKC).

NK1-R, uporabljen v naši raziskavi, aktivira sporočilno pot prek heterotrimernega proteina $G\alpha_{q/11}$ in privede do aktivacije fosfolipaze C (PLC), kar vodi do nastanka IP₃ in DAG in posledičnega sproščanja znotrajceličnega Ca²⁺ ter aktivacije PKC. Novejše raziskave pa so pokazale, da NK1-R lahko aktivira tudi sporočilno pot prek heterotrimernega proteina $G\alpha_s$ in tako aktivira AC in nastanek cAMP (Holst in sod., 2001). Drugi receptor, uporabljen v naši študiji, pa je β_2 -AR, ki aktivira sporočilno pot po vezavi liganda prek heterotrimernega proteina $G\alpha_s$, kar vodi do aktivacije AC in nastanka cAMP. Poleg aktivacije sporočilne poti prek $G\alpha_s$, β_2 -AR lahko aktivira tudi sporočilno pot, ki deluje prek $G\alpha_i$ (Daaka in sod., 1997).

Poleg opisanega trikomponentnega prenosa sporočila pa novejše študije kažejo na obstoj preformiranih kompleksov: receptor in G-protein ali receptor, G-protein in efektor na plazmamembrani, ki se oblikujejo že med sintezo v endoplazemskem retikulumu (ER) ali med transportom od ER-a do cis (nezrele) strani Golgijskega aparata (GA). Opisani obstoj preformiranih kompleksov na membrani pomaga pojasniti dileme o kinetiki (razpon milisekunde) in specifičnosti vezave molekul v sporočilni verigi po aktivaciji GPCR-jev. Tako naj bi vezava liganda na receptor v preformiranem kompleksu izzvala le konformacijske spremembe sporočilnih molekul znotraj kompleksa (G-protein, efektor) in posledično aktivacijo drugotne sporočilne poti (Pineyro, 2009).

2.3.2 Aktivacija drugotne sporočilne poti in prenos sporočila brez posredovanja heterotrimernih G-proteinov

Poleg klasičnega prenosa sporočila s posredovanjem heterotrimernih G-proteinov aktivacija GPCR-jev lahko vodi do nastanka sekundarnih sporočevalcev tudi brez posredovanja G-proteinov. Pri številnih GPCR-jih je bila tako opisana aktivacija kinaz z mitogenom aktiviranega proteina (angl. mitogen activated protein — MAP) Erk 1 in Erk 2, brez posredovanja G-proteinov in efektorjev ter sekundarnih sporočevalcev, kot so AC, IP ali PKC (Luttrell in sod., 1999). Za aktivacijo MAP-kinazne sporočilne poti je po aktivaciji receptorja potreben nastanek kompleksa med fosforiliranim receptorjem, β -arestinom in kinazo Src (angl. Src-kinase; c-Src) (Luttrell in sod., 1999). c-Src spada v družino Src-tirozin kinaz, ki v celici sodelujejo v številnih procesih kot so celična proliferacija, preživetje celic, adhezija celic na podlago in celično gibanje. Nastali kompleks se nato poveže s komponentami klatrinskega mešička in poleg tega, da usmeri receptor v proces endocitoze, posredovane s klatrinskimi mešički, povzroči tudi aktivacijo MAP-kinazne poti (Luttrell in sod., 1999) (glej sliko 7).



Slika 7: Aktivacija MAP-kinazne poti brez posredovanja G-proteinov.

Povzeto (Luttrell in sod., 1999).

Poleg aktivacije MAP-kinazne poti z agonisti GPCR-jev pa je bila v pred kratkim objavljenih študijah opisana tudi aktivacija MAP-kinazne poti po vezavi posameznih antagonistov na receptor. Te antagoniste so poimenovali funkcionalno specifični agonisti (Wisler in sod., 2007). Njihova značilnost je, da blokirajo prenos sporočila prek G-proteinov, hkrati pa aktivirajo prenos sporočila prek β-arestina (Drake in sod., 2008; Violin in Lefkowitz, 2007). Za aktivacijo MAP-kinazne poti pa je potrebna fosforilacija receptorja na katerega se nato vežeta β-arestin in kinaza Src (Kim in sod., 2008). Z uporabo metode intramolekularni BRET je bilo ugotovljeno, da β-arestini ob vezavi na receptor, na katerega je vezan funkcionalno specifični agonist, zavzamejo drugačno konformacijo kot pri vezavi na receptor, na katerega je vezan klasični agonist (Shukla in sod., 2008). Receptorji, za katere so poznani funkcionalno specifični agonisti, so npr. β_2 -AR, β_1 -AR, receptor za angiotenzin podtipa 1 (AT1aR), PTH-R itd. (Kim in sod., 2008; Shukla in sod., 2008).

2.3.3 Receptorsko pogojena endocitoza

Mehanizmi, ki uravnavajo raven sporočanja v celici, kot so proces fosforilacije/desenzibilizacije, internalizacije (zmanjšanje števila površinskih receptorjev, brez sprememb v skupnem številu receptorjev) in deregulacije (zmanjšanje skupnega števila receptorjev kot posledica razgradnje receptorjev v lisosomih) membranskih receptorjev, se sprožijo, ko je v celici dosežen želen učinek in mora sporočilo, ki je bilo v celici sproženo, usahnilti, da lahko celica sprejme nova sporočila in nanje tudi reagira (Ferguson, 2001). Izraz receptorsko pogojena endocitoza je bil uveden leta 1974 v povezavi z receptorji za lipoproteine z nizko gostoto (LDL) (angl. low density lipoprotein). Z njim so opisali uravnavanje presnove holesterola v organizmu z vezavo LDL na specifične receptorje na površini celice, posledično internalizacijo in razgradnjo LDL v notranjosti celic (Mukherjee in sod., 1997).

Po aktivaciji receptorja z agonistom je tako za utišanje sporočila, ki ga je sprožila aktivacija, najprej potrebna ločitev G-proteina od receptorja (desenzibilizacija receptorja), za kar pa je potrebna predhodna fosforilacija receptorja z različnimi kinazami. Kinaze v grobem delimo na kinaze, katerih delovanje uravnavajo sekundarni sporočevalci, kot sta od cAMP odvisna kinaza (cAMP-dependent protein kinase — PKA) ter PKC in GPCR-receptorska kinaza (GRK). Do danes je bilo opisanih sedem GRK (GRK 1—7), med njimi najbolje GRK 1 ali rodopsinska kinaza ter GRK 2 ali beta adrenergična kinaza 1 (Ferguson, 2001; Lefkowitz, 1998). Aktivnost kinaz in njihovo vezavo na receptor uravnavajo alosterični in drugi dejavniki, kot so: aktivacija receptorja z agonistom, podenoti $\beta\gamma$ heterotrimernega G-proteina, fosfolipidni kofaktorji, kalmodulin in rekoverin, ter različni posttranslacijski mehanizmi, kot so izoprenilacija, palmitoilacija in autofosforilacija (Pitcher in sod., 1998). Vezava liganda na receptor povzroči aktivacijo G-proteina in odcepitev podenote α od $\beta\gamma$ kompleksa, ki ostane vezan na membrano in prenilaran na C-terminalnem koncu. Fosfatidil inozitol bifosfat in kompleks $\beta\gamma$, vezan na membrano, nato vežeta GRK 2 na C-terminalnem koncu in jo premakneta na membrano v bližino aktiviranega receptorja (Lefkowitz, 1998). Na aktiviranem receptorju kinaze

fosforilirajo serine in treonine na tretji znotrajcelični zanki in C-terminalnem koncu receptorja (Ferguson, 2001).

V nadaljevanju se na fosforilirani receptor vežejo β -arestini, ki še dodatno sterično preprečijo vezavo receptorja z G-proteini (Lefkowitz, 1998). Adaptorni protein arrestin v procesu endocitoze receptorja deluje kot neke vrste »arresting agent«, kar pomeni, da fizično prepreči interakcijo med receptorjem in G-proteinom in s tem nadaljnjo signalizacijo. Do danes so bile opisane štiri družine arrestinov, v grobem pa arrestine delimo na: 1. vizualne arrestine in 2. nevizualne ali β -arestine. Vizualni arrestini so del vidnega spektra in so lokalizirani v očesni mrežnici, β -arestini, ki jih nadalje delimo na β -arrestin 1 in β -arrestin 2, pa so skorajda ubikvitarno izraženi (Ferguson, 2001). Za β -arrestin 1 je bilo pokazano, da je v celicah enakomerno razporejen med frakcijami, ki so v Tritonu topne, in med tistimi, ki so v Tritonu netopne (Santini in sod., 2000). Med frakcije, ki so v Tritonu topne spadajo predvsem citosolni proteini, med frakcije, ki so v Tritonu netopne, pa pomožni proteini citoskeleta in membranske mikrodomene, bogate z glikozilfosfatidilinozitolom (Santini in sod., 2000). Predvideva se tudi, da je v neaktivni obliki približno 2 % β -arrestinov v citoplazmi vezanih na mikrotubule (Hanson in sod., 2007). Po aktivaciji receptorja z agonistom se konformacija β -arrestina spremeni tako, da se fosforilirani del receptorja lahko veže s polarnim jedrom arrestina. Raziskava internalizacije receptorja za tiroliberin (TRH), opravljena s pomočjo fibroblastov z izbitim genom za $G\alpha_{q/11}$, je pokazala, da vezava β -arrestina na receptor lahko poteka normalno tudi v odsotnosti G-proteina (Yu in Hinkle, 1999), poleg tega pa lahko internalizacija receptorja poteka tudi brez predhodne fosforilacije in vezave β -arrestina na receptor (Heding in sod., 1998; Perroy in sod., 2003; Vrecl in sod., 1998). Poleg tega, da β -arestini z vezavo na fosforilirani receptor preprečijo nadaljnjo interakcijo med receptorjem in G-proteinom, se z visoko afiniteto vežejo nato na $\beta 2$ -adaptinsko podenoto na adaptornem proteinu 2 (AP2) in nato s klatrinom, pri čemer se β -arrestin 1 veže na klatrin s šestkrat višjo afiniteto kot β -arrestin 2. AP2 nato nastali kompleks arrestin-receptor usmeri v mešičke obložene s klatrinom (Ferguson, 2001).

Glede na afiniteto vezave receptorja z β -arestini delimo GPCR-je v dva razreda: razred A, kamor spadajo β_2 -AR, dopaminski receptor tip 1, μ - opioidni receptor, ki

vežejo β -arestin 2 z višjo afiniteto kot β -arestin 1. V drugi razred, razred B, spadajo NK1-R, TRH receptor tipa 1, receptor za vazopresin tip 2, receptor za angiotenzin tip 1, ki z enako afiniteto vežejo β -arestin 1 in 2 (Claing in sod., 2002). Poleg različne afinitete, s katero vežejo receptorji različnih razredov β -arestine, je razlika posledično tudi v stabilnosti kompleksa, ki ga oblikujejo z β -arestinom, s tem pa se delno spremeni tudi usoda receptorja po internalizaciji. Receptorji razreda A formirajo z arestinom šibkejšo povezavo, β -arestin tako tik pod membrano disociira z receptorja, receptor pa se v nekaj minutah defosforilira in reciklira na membrano. Receptorji razreda B z β -arestini oblikujejo bolj stabilno povezavo in zato skupaj z β -arestinom preidejo v proces počasnega recikliranja (Oakley in sod., 2001).

Za oblikovanje klatrinskih mešičkov ter njihovo odcepitev od membrane pa so poleg arestina pomembni še: dinamin – ki pomaga pri odcepitvi mešička od membrane; drobne GTP-aze – ARF-proteini, ki sodelujejo pri modifikaciji membranskih lipidov, prerazporeditvi aktinskih filamentov in uravnavajo potovanje mešičkov; tirozinske kinaze – c-Src; membranski lipidi itd. (Ferguson, 2001).

Po oblikovanju in odcepitvi mešičkov od membrane lahko receptor preide v proces recikliranja ali proces razgradnje v lizosomih. Številne nedavne raziskave so pokazale, da je usoda receptorja v procesu endocitoze odvisna od specifičnih zaporedij na citoplazemskem delu receptorja in biokemičnih mehanizmov, ki spremljajo proces endocitoze receptorja (Ferguson, 2001).

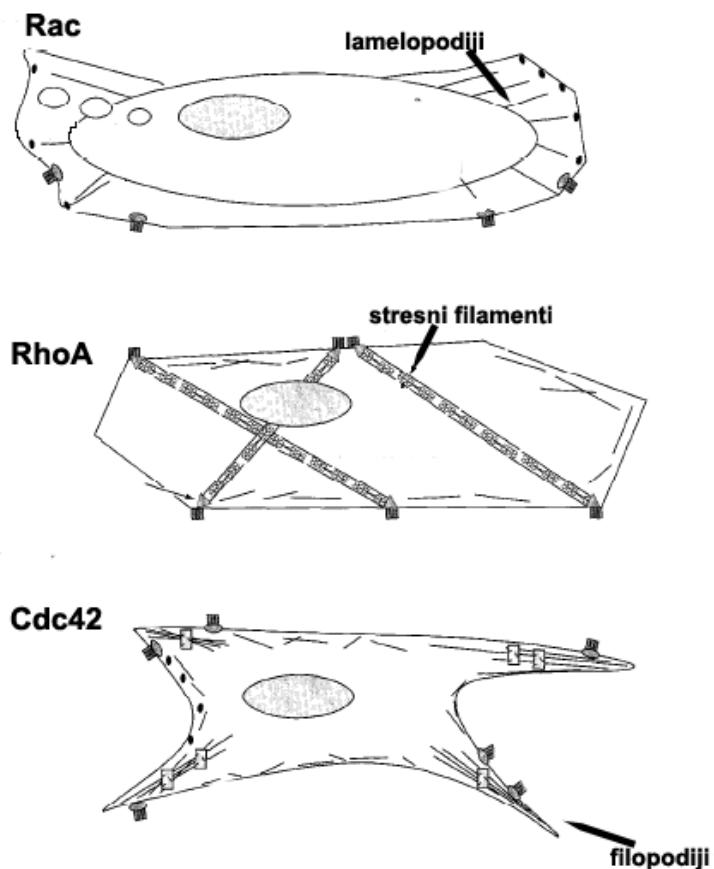
Poleg od β -arestina odvisne internalizacije je bilo za številne receptorje ugotovljeno, da internalizirajo s pomočjo mehanizma, ki je neodvisen od β -arestina. Izražanje dominantno negativnih mutant β -arestina tako ni zavrnlo internalizacije receptorja za intestinalni vazoaktivni peptid tipa 1 (VIP1) in receptorja za endotelin tipa B (ET_B). Za receptor ET_B je bilo kasneje tudi pokazano, da pretežno internalizira prek kaveol (Claing in sod., 2002). Podobno kot pri klatrinsko posredovani endocitozi je za odcepitev kaveolarnih mešičkov od membrane tudi potreben dinamin. V celicah, ki so izražale dominantno negativno obliko dinamina, je bila endocitoza, posredovana s kaveolami, ustavljena (Parton in Simons, 2007). Tretja oblika endocitoze, ki je neodvisna od β -arestina in dinamina, je endocitoza prek lipidnih raftov. Na tak način v celico prehajajo receptor za sekretin, muskarinski receptor M2, receptor za bradikinin tipa 2 in N-formyl peptidni receptor (Claing in sod., 2002).

2.3.4 Vloga heterotrimernih G-proteinov in proteinov Rho v prerazporeditvi aktinskih filamentov

Aktivacija GPCR-jev lahko vodi tudi do prerazporeditve aktinskih filamentov, pri čemer pomembno vlogo kot posredniki med receptorjem in aktinskimi filamenti igrajo predstavniki družine proteinov Rho.

Družina proteinov Rho spada v Ras superdružino majhnih GTP-az. Družino Rho delimo v tri poddružine: Rho, Rac in Cdc 42. Rho GTP-aze so ubikvitarni proteini in jih lahko najdemo tako rekoč v vseh tkivih v organizmu sesalcev. Sodelujejo v številnih procesih, pri katerih se reorganizira citoskelet: citokineza, gubanje membrane, nastanek stresnih filamentov, citotoksičnost, kontrakcija gladke mišičnine, agregacija celic in retrakcija nevritov. Proteini Rho so v dveh oblikah: aktivni, ko imajo nase vezan GTP (Rho-GTP), ter neaktivni oblici, ko imajo nase vezan GDP (Rho-GDP). Prehajanje iz neaktivne oblike Rho-GDP v aktivno obliko Rho-GTP in obratno uravnavajo izmenjalni faktorji gvanin nukleotidov (guanine nucleotide exchange factors — GEF) in aktivirajoči proteini GTP-aze (GTP-ase activating proteins — GAP). GEF uravnava prehod iz GDP v GTP, GAP pa iz GTP v obliko GDP. V neaktivni obliki je na Rho-GDP vezan Rho-GDI (Rho guanine dissociation inhibitors), ki še dodatno stabilizira kompleks Rho-GDP in nekaterim Rho-GTP-azam preprečuje vezavo na membrano kakor tudi interakcijo z molekulami drugotnega sporočilnega sistema. Za prehod proteina Rho iz neaktivne v aktivno obliko sta opisana dva mehanizma: i) za vezavo GEF na Rho-GDP je potrebna disociacija Rho-GDI in šele nato se lahko na Rho-GDP veže GEF ter vspodbudi menjavo GDP-ja z GTP-jem; ii) za prehod iz Rho-GDP v Rho-GTP ni potrebna predhodna disociacija Rho-GDI, ker se GEF veže na kompleks Rho-GDP - Rho-GDI (Takai in sod., 1995).

RhoA, Cdc 42 in Rac 1 so do danes najbolje opisani proteini iz družine Rho. Sodelujejo v polimerizaciji aktina G in pri oblikovanju struktur aktina F. Vloga Rac 1 in Cdc 42 je bila opisana pri tvorbi lamelo- in filopodijev, vloga RhoA pa pri oblikovanju stresnih filamentov (glej sliko 8).



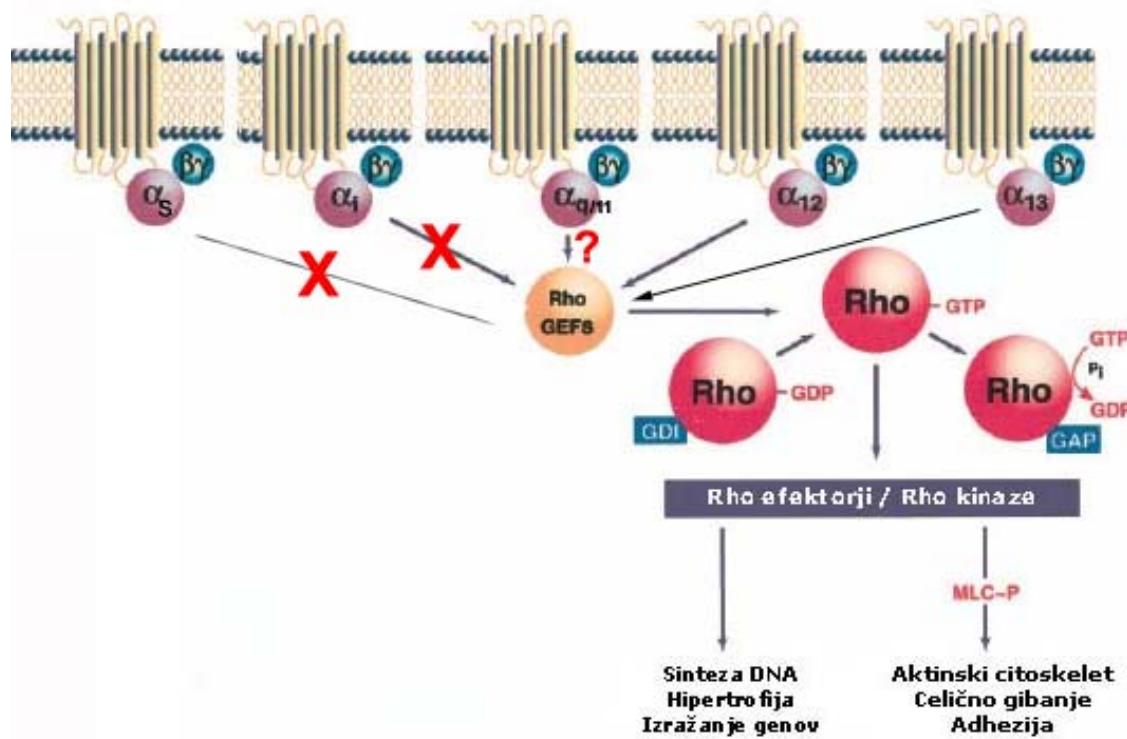
Slika 8: Vpliv proteinov družine Rho na aktin.

Povzeto po (Machesky in Hall, 1996).

Po aktivaciji GPCR-jev je za prehod proteinov Rho iz oblike GDP v GTP potrebna aktivacija različnih RhoGEF. Številne študije so pokazale povezovanje med heterotrimernimi G-proteini in RhoGEF. Glede vloge GPCR-jev pri aktivaciji Rho so si podatki iz literature nejasni oz. nasprotujoči. Največ študij poudarja pomembno vlogo heterotrimernih proteinov $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$ pri aktivaciji RhoA (Buhl in sod., 1995; Gohla in sod., 1998; Gohla in sod., 1999; Le Page in sod., 2003), prikazana je bila tudi koimunoprecipitacija teh dveh proteinov z RhoGEF, in sicer s p115 RhoGEF (glej sliko 9), PDZ-RhoGEF in LARG (Leukemia-associated RhoGEF) (Chikumi in sod., 2002; Fukuhara in sod., 1999; Hart in sod., 1998). Vloga preostalih G-proteinov, predvsem $G_{\alpha q/11}$, pa ostaja nejasna oz. so si podatki iz literature nasprotujoči (Barnes in sod., 2005; Dutt in sod., 2002; Vogt in sod., 2003) (glej sliko 9). Interakcija med $G_{\alpha q}$ in RhoGEF Lbc je bila pokazana (Sagi in sod., 2001), pokazano pa je bilo tudi, da

je spodbuditev proteinov Rho z $G_{\alpha q}$ neodvisna od PLC in PKC in da proteini $G_{\alpha q}$ lahko aktivirajo enake RhoGEF kot proteina $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$, toda manj potentno (glej sliko 9). Pokazano je bilo tudi, da odstranitev področja za uravnavanje signalizacije G-proteinov (angl. regulator of G-protein signaling domain — RGS domain) na RhoGEF, na katero se vežejo heterotrimerni G-proteini, prepreči aktivacijo RhoGEF z $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$, nasprotno pa izzove močnejšo interakcijo med $G_{\alpha q}$ in RhoGEF (Chikumi in sod., 2002).

Posredovalna vloga heterotrimernih G-proteinov $G_{\alpha s}$ in $G_{\alpha i}$ pri aktivaciji proteinov Rho do danes še ni bila opisana (Dutt in sod., 2002; Sah in sod., 2000; Vogt in sod., 2003) (glej sliko 9).

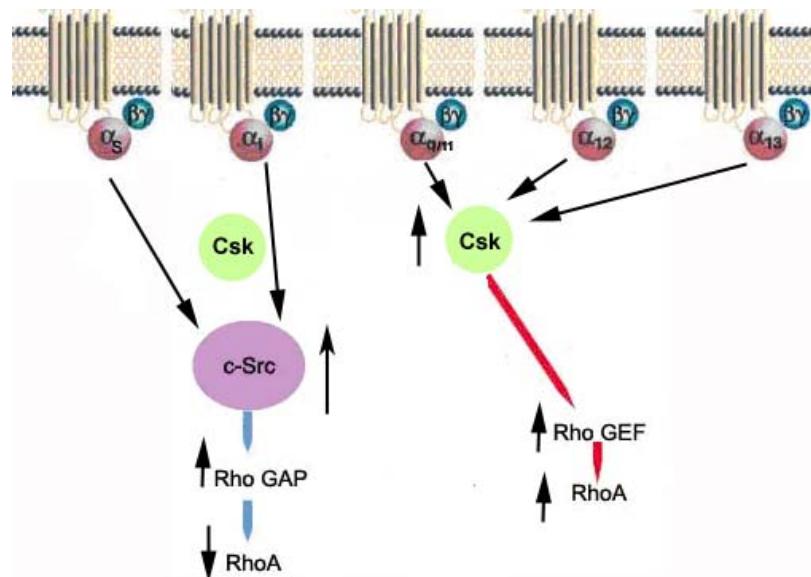


Slika 9: Vloga heterotrimernih G-proteinov v aktivaciji proteina RhoA in prerazporeditvi aktinskih filamentov.

Povzeto po (Seasholtz in sod., 1999).

2.3.5 Vloga kinaz Src pri aktivaciji RhoA in prerazporeditvi aktinskih filamentov

Po aktivaciji GPCR-jev lahko nastane vpliv na RhoA tudi prek družine kinaz Src, in sicer prek Csk in c-Src. Posredniško vlogo pri aktivaciji Csk po vezavi liganda na receptor igrajo predvsem podenote $G_{\alpha 12/13/q}$ in $G_{\beta\gamma}$ (Luttrell, 2002), nasprotno pa velja za aktivacijo c-Src, kjer posredniško vlogo igrata predvsem $G_{\alpha i}$ in $G_{\alpha s}$, in ne $G_{\alpha 12/13/q}$ ter $G_{\beta\gamma}$ (glej sliko 10). Interakcija med podenotami $G_{\alpha i}$ in $G_{\alpha s}$ in c-Src pa je pri tem direktna (Ma in sod., 2000) (glej sliko 10). V naslednjem koraku aktivirana c-Src deluje na Rho GAP, ki zaviralno deluje na RhoA (Luttrell, 2002) (glej sliko 10).



Slika 10: Aktivacija proteina RhoA prek c-Src in Csk.

Aktivirana Csk deluje predvsem na RhoGEF, kar vodi do aktivacije proteinov RhoA in polimerizacije aktina (Luttrell, 2002). Poleg aktivacije proteinov RhoA z delovanjem na RhoGEF pa Csk lahko vodi do aktivacije proteinov RhoA tudi s svojim zaviralnim delovanjem na c-Src, ki v svoji aktivni obliki deluje na RhoGAP in s tem preprečuje aktivacijo proteinov Rho (Luttrell, 2002).

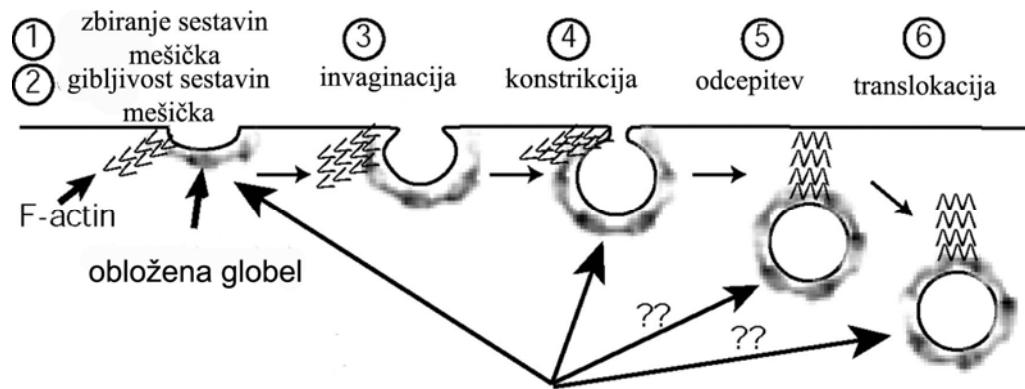
Pred kratkim je bilo pokazano, da lahko funkcionalno specifični agonist adrenergičnih receptorjev β_1 , karvedilol, aktivira MAP-kinazno pot prek c-Src in β -arestina 1 in hkrati prepreči prenos sporočila prek $G_{\alpha s}$. Z vezavo karvedilola na β_1 -AR povzroči

transaktivacijo receptorja za epidermalni rastni dejavnik (angl. epidermal growth factor receptor — EGFR) (Kim in sod., 2008), ki v celicah med drugim ureja delovanje različnih Rho GTP-az (Tang in Gross, 2003). Poleg tega je bilo pokazano, da se EGFR lahko veže tudi direktno na F-aktin (den Hartigh in sod., 1992). Poleg posrednega vpliva na proteine Rho c-Src lahko vodi do polimerizacije aktina tudi z delovanjem na kortaktin, ki je eden od treh proteinov, ki se vežejo na kompleks Arp 2/3, ki je osrednji regulator polimerizacije aktinskih filamentov *in vivo* (Tehrani in sod., 2007).

2.3.6 Receptorsko pogojena endocitoza in prerazporeditev aktinskih filamentov

Polimerizacija aktina in spremembe v prerazporeditvi aktina F so bile opisane v procesu endocitoze s pomočjo klatrinskih mešičkov, kaveol, lipidnih raftov ter pri makropinocitozi in fagocitozi. Prvotne študije so temeljile na genetskih preiskavah, s katerimi so bili odkriti številni proteini pri kvasovkah in sesalcih, ki sodelujejo pri polimerizaciji aktina v procesu endocitoze. Podobnost med proteini pri kvasovkah in sesalcih kaže tudi na to, da je mehanizem preoblikovanja aktinskega citoskeleta v procesu endocitoze evolucijsko zelo ohranjen proces. Polimerizacija aktina na mestih, kjer poteka endocitoza, kakor tudi polimerizacija aktina pri potovanju mešičkov v citoplazmi sta bili kasneje potrjeni tudi z uporabo izboljšanih mikroskopskih tehnik in z uporabo označevalcev GFP, s katerimi je bilo omogočeno opazovanje citoskeleta pri živih celicah (Engqvist-Goldstein in Drubin, 2003).

Pri endocitozi posredovani s klatrinskimi mešički, aktinske strukture sodelujejo v tako rekoč vseh fazah nastajanja klatrinskega mešička: od razporeditve in zbiranja strukturnih komponent mešička na mestu endocitoze, invaginaciji membrane, konstrikciji do odcepitve mešička od celične membrane in potovanja mešička v citoplazmi (Yarar in sod., 2005)(glej sliko 11).



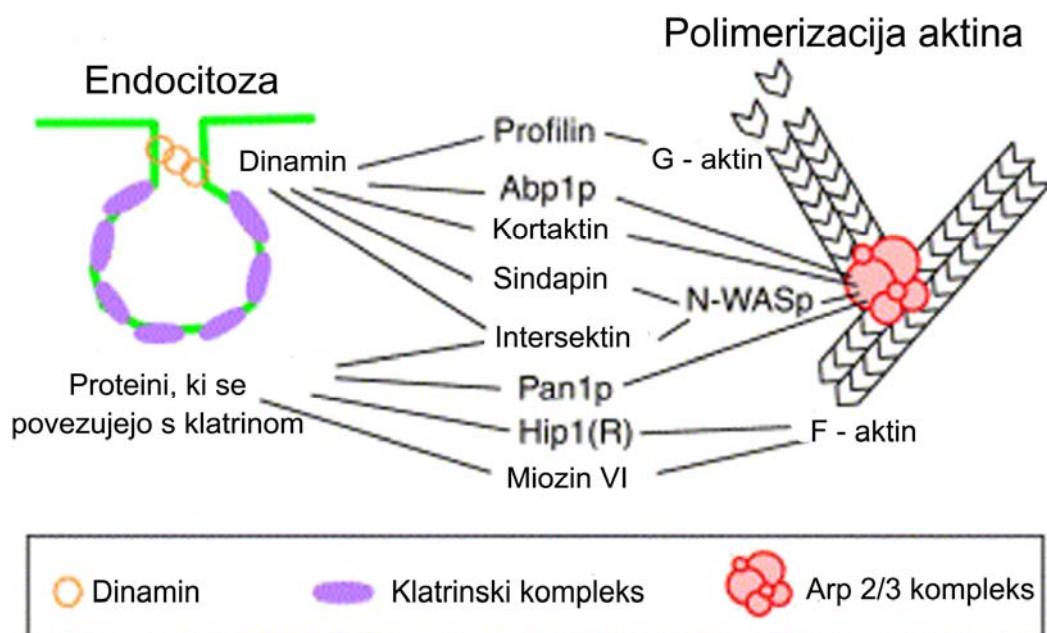
Slika 11: Vloga aktina pri endocitozi posredovani s klatrinskimi mešički.

Povzeto po Yarar, 2005 (Yarar in sod., 2005).

Vloga aktinskih struktur v endocitozi je bila potrjena tudi z uporabo različnih toksinov, ki povzročajo depolimerizacijo aktina. Pri celicah hepatoma miši je tako pretretiranje celic s citohalazinom D vodilo do povečanega zaostajanja ligandov (transferin in α 2-makroglobulin) na površini celic (Durrbach in sod., 1996).

Ker je vsaka faza endocitoze specifična z vidika mehanizmov in interakcij med različnimi proteini, ki sodelujejo pri prerazporeditvi aktinskega citoskeleta med endocitozo, se novejše študije osredotočajo predvsem na proučevanje vloge posameznih proteinov v tem procesu.

Nedavne objave tako poudarjajo predvsem vlogo proteinov, ki med seboj povezujejo strukturne komponente mešičkov (klatrinskih, kaveol) in hkrati uravnavajo polimerizacijo aktina (glej sliko 12). Tako se proteini Eps 15, Hip 1/Hip 1R podobno kot AP-2 vežejo na membranske fosfolipide in klatrin in hkrati aktivirajo kompleks Arp 2/3 (Engqvist-Goldstein in Drubin, 2003). V procesu endocitoze kompleks Arp 2/3 aktivirajo tudi proteini SCAR (supresor receptorja za cAMP)/WASP, Abp1p, kortaktin in Pan1p (Jeng in Welch, 2001; Schafer, 2002) ter pomožni proteini kot so: PACSIN (protein-kinaza C in substrat kazeinske kinaze v nevronih; angl. protein kinase C and casein kinase substrate in neurons); sindapin, F-BAR-družina proteinov, Hip 1R (angl. Huntington interacting proteins), intersektin, profilin, miozini in dinamin (Engqvist-Goldstein in Drubin, 2003; Schafer, 2002) (glej sliko 12).



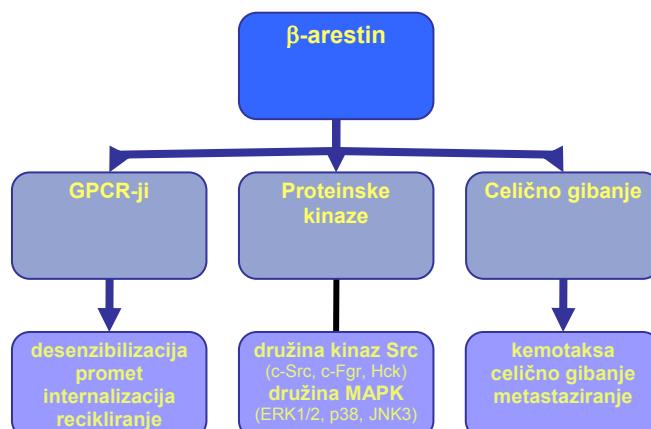
Slika 12: Proteini, ki povezujejo strukturne komponente klatrinskega mešička in hkrati uravnavajo polimerizacijo aktina.

Povzeto po Schafer, 2002 (Schafer, 2002).

2.3.7 Vloga arrestinov v prerazporeditvi aktinskih filamentov

β -arrestini so bili prvotno opisani predvsem v procesu desenzibilizacije receptorja in vezavi receptorja na komponente klatrinskega mešička (glej poglavje 2.3.3), novejše raziskave pa so pokazale, da pomembno sodelujejo tudi v številnih celičnih funkcijah, v katerih pride do polimerizacije in prerazporeditve aktinskega citoskeleta (Buchanan in DuBois, 2006) (glej sliko 13). β -arrestini uravnavajo tudi delovanje proteinov, ki sodelujejo v prerazporeditvi aktinskih filamentov, kot so: fosfatidil inozitol 3-kinaza (PI3K), RhoA in kofilin (Barnes in sod., 2005; DeFea, 2007). Vloga β -arrestinov pri nastanku stresnih filamentov in gubanju membrane je opisana pri aktivaciji receptorja za angiotenzin podtipa 1 (angl. angiotensin receptor subtype 1a — AT_{1A}R) (DeFea, 2007).

Čezmerno izražanje β -arestina 2 v celicah HEK 293, pretretiranih z latrunkulinom B, je v celicah lahko ohranilo normalno endocitozo izoforme β receptorja za tromboksan A2 (angl. β isoform of the thromboxan A2 receptor — TP β) v primerjavi s kontrolo tudi v odsotnosti β -arestina 1. Nasprotno pa čezmerno izražanje β -arestina 1, po poškodbi aktina, v odsotnosti β -arestina 2 ni ohranilo endocitoze TP β , ki je bila v primerjavi s kontrolo zmanjšana (Laroche in sod., 2005). Te ugotovitve napeljujejo na možnost, da v celicah najverjetneje obstajata dva tipa endocitoze, in sicer od β -arestina in aktina odvisna endocitoza in od β -arestina in aktina neodvisna endocitoza. Zakaj se β -arestin 2 in β -arestin 1 obnašata drugače in zakaj integriteta aktina ni enako pomembna za oba, je še vedno nejasno.



Slika 13: Vloga β -arrestinov v nekaterih celičnih funkcijah.

2.4 VLOGA MEMBRANSKIH MIKRODOMEN V PRERAZPOREDITVI IN DELOVANJU GPCR-jev

V zadnjem desetletju je vse več dokazov o obstoju membranskih mikrodomen, ki urejajo kinetiko številnih biokemijskih reakcij, ki potekajo na membrani. Vse več je tudi dokazov o prerazporeditvi GPCR-jev in številnih sporočilnih molekul znotraj membranskih mikrodomen, pri čemer receptorji niso zgolj statično omejeni na posamezno mikrodomeno celične membrane, temveč se lahko prerazporejajo iz teh območij in vanje. Med tovrstna specializirana področja membrane, pomembna v prerazporeditvi in dinamiki delovanja GPCR-jev, štejemo lipidne rafte in njihovo specializirano poddomeno kaveole.

2.4.1 Lipidni rafti in kaveole

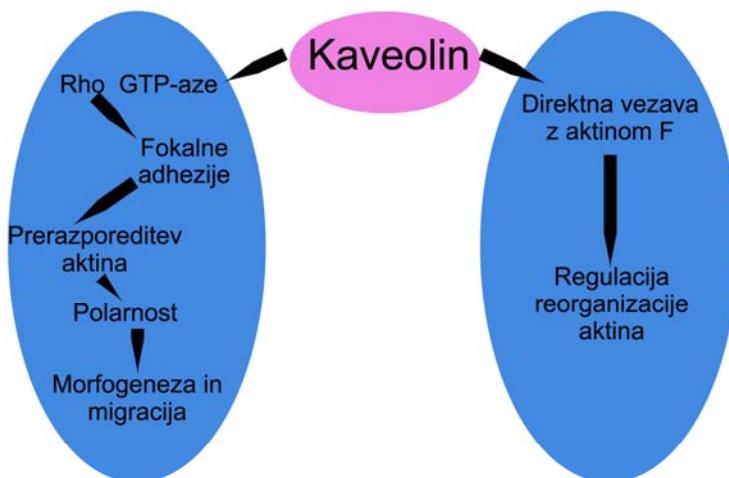
Lipidni rafti so heterogene, s holesterolom in sfingolipidi (sfingomielin, glikosfingolipidi) bogate, visokodinamične mikrodomene v celični membrani. Za lipidne rafte se domneva, da zajemajo 30-odstotni delež celotne površine membrane (Pike, 2009). Zaradi odpornosti proti raztavljanju z mrzlim detergentom Triton X-100 imenujemo lipidne rafte tudi proti detergentu odporne membrane (angl. detergent resistant membranes — DRM). Ker so lipidni rafti dinamične združbe lipidov in proteinov, so v celičnih membranah v treh fazah: gel stanje, tekoče urejeno (I_0 faza) in tekoče neurejeno stanje (I_d faza). Lipidni rafti združujejo tudi različne vrste proteinov, kot so: glikozilfosfatidilinozitol-GPI zasidrani proteini, acilirani periferni membranski proteini, holesterol-vezni proteini in transmembranski proteini. V zgradbi lipidnih raftov je še vedno precej nejasnosti, ker jih zaradi njihove nestabilnosti in nanomilimetrsko velikosti ni mogoče opazovati z uporabo klasičnih mikroskopskih tehnik (optična, konfokalna in elektronska mikroskopija), poleg tega v številnih študijah raziskovalci lipidne rafte izolirajo z različnimi metodami, kar vnaša na področje razumevanja vloge lipidnih raftov, njihovih lastnosti in izražanja v celični membrani precej nejasnosti (Insel in sod., 2005b; Pike, 2009).

Iz lipidnih raftov lahko z imunocitokemičnimi metodami izoliramo kaveole. Kaveole so mikrodomene na celični membrane, bogate s holesterolom, sfingolipidi in proteinom kaveolinom. Do danes so bili opisani trije kaveolini: kaveolin 1, 2 in 3, ki so si med seboj strukturno zelo podobni; geni za kaveolin se razlikujejo v nukleotidnem zaporedju DNA in različni razporeditvi v tkivih. Raziskovalci so prepričani, da so kaveole zaradi strukturnih podobnosti z lipidnimi rafti sestavni del ali poddomena lipidnih raftov (Insel in sod., 2005b). Razlike med obema strukturama opisujejo predvsem z vidika signalnih molekul, ki jih lahko izoliramo iz kaveol in iz lipidnih raftov (Ostrom in Insel, 2004), ter prisotnosti kaveolina 1. Kaveole v večjem številu najdemo v fibroblastih, adipocitih, gladkih mišičnih celicah in endotelijskih celicah. Kaveolin 1 in kaveolin 2 sta bila izolirana predvsem iz nemišičnih celic, kaveolin 3 pa iz celic skeletne in gladke mišičnine. Kaveolin 1, kot pomembni sestavni del kaveol, je integralni membranski protein z molekulske maso 21 kDa in se kot zanka v obliki lasnice, ki z N- in C-terminalnim koncem sega v citoplazmo, sidra v celično membrano. Na mestu, kjer kaveolin sega v membrano, je membrana v smeri citoplazme lijakasto ukrivljena. Premer takšne krivine je od 50 do 80 nm (Parton in Simons, 2007).

2.4.2 Lipidni rafti/kaveole in aktinski citoskelet

Pri sidranju lipidnih raftov/kaveol na celično membrano pomembno sodeluje tudi aktinski citoskelet. Domneva se, da so lipidni rafti povezani z aktinom prek transmembranskih proteinov, kot npr. CD 44 (Maxfield, 2002), kaveolin pa se lahko na aktin veže direktno (Anderson, 2006) ali pa je povezan z njim s proteinom filamin (Popowicz in sod., 2006). Citoskeletalni proteini pa ne igrajo vlogo samo pri sidranju raftov na membrano, temveč sodelujejo tudi pri uravnavanju delovanja nekaterih sporočilnih poti, kar je bilo opisano pri GPCR-jih (β_2 -AR), ki delujejo na AC in izzovejo nastanek cAMP (Head in sod., 2006). Iz kaveol je bilo izoliranih tudi večje število Rho GTP-az, kot npr. RhoA in Cdc 42, poleg tega je bila prikazana direktna interakcija med kaveolinom 1 in proteinom RhoA. Predvideva se, da kaveolin 1 igra vlogo pri uravnavanju Rho GTP-az in nastanku lamelo-, filopodijev, fokalnih adhezij in stresnih filamentov (Anderson, 2006) (glej sliko 14). V adipocitih je bila pokazana tudi

posredovalna vloga kaveolina 1 pri translokaciji znotrajceličnega transporterja za glukozo 4 (angl. glucose-transporter 4 — GLUT 4) na membrano, za kar je bila potrebna direktna vezava kaveolina 1 z aktinom F (Anderson, 2006).



Slika 14: Vloga kaveolina v reorganizaciji aktina.

2.4.3 Razporeditev GPCR-jev in sporočilnih molekul na področju lipidnih raftov/ kaveol

Prerazporeditev v področje lipidnih raftov je pri uravnavanju delovanja receptorjev pomembna predvsem z vidika kinetike in učinkovitosti prenosa sporočila, po spodbuditvi receptorja z agonistom. Za prenos sporočila je potrebna fizična interakcija med molekulami in čeprav je vezavna afiniteta aktiviranih molekul v sporočilnih poteh velika, je za učinkovitost in hitrost reakcije potrebna visoka koncentracija sporočilnih molekul na posameznem delu membrane. Povprečna gostota receptorjev je ~10.000 receptorjev/celico, podobna je tudi gostota številnih učinkovalcev in sporočilnih molekul. Kljub tako veliki zastopanosti pa je težko verjetno, da bi bila hitrost reakcije lahko dosežena v nekaj milisekundah, če receptorji in komponente sporočilne poti ne bi bili skoncentrirani na določenih omejenih delih

membrane t. i. mikrodomenah, kamor spadajo tudi lipidni rafti in njihova poddomena kaveole (Ostrom in Insel, 2004; Pike, 2009). Poleg pomena lipidnih raftov in kaveol za prerazporeditev receptorjev in sporočilnih molekul je njihova vloga pomembna tudi pri samem uravnavanju prenosa sporočila. Številne študije kažejo na regulatorno vlogo kaveolina in kaveol in/ali lipidnih raftov pri receptorski signalizaciji in spajjanju z β -arestini (Head in sod., 2006; Kubale in sod., 2007; Monastyrskaya in sod., 2005);(Pontier in sod., 2008).

Za številne GPCR-je je bilo ugotovljeno, da se konstitutivno razporejajo znotraj lipidnih raftov (receptor za endotelin A in B (ETA in ETB), NK1-R, receptor za serotonin, receptor za GnRH), za številne druge pa, da preidejo v področje lipidnih raftov šele po vezavi z agonistom (receptor za angiotenzin II (AT-1), receptor za holecistokinin (CCK)) (Insel in sod., 2005b). Od komponent sporočilnega sistema je bilo ugotovljeno, da so znotraj lipidnih raftov: različne podenote heterotrimernega proteina G ($G\alpha_s$ in $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ predvsem na področju kaveol, kjer se veže s kaveolinom 1), nekatere izoforme AC (pri celicah HEK 293 so bile iz lipidnih raftov izolirane naslednje izoforme AC: AC3, AC5 in AC6), PKA (srčne mišične celice), cAMP, eNOS (angl. endothelial nitric oxid synthase — NOS) (Ostrom in Insel, 2004).

Do danes so bili opisani trije mehanizmi, ki uravnavajo lokalizacijo proteinov v področje lipidnih raftov: 1. proteini imajo ohranjena vezna mesta za kaveolin in se vežejo na ogrodnji del N-terminalnega konca kaveolina 1 ali kaveolina 3 (mesta za vezavo kaveolina so ohranjena pri nekaterih GPCR-jih kot so β_2 -AR, endotelinski, muskarinski in neuropeptidni Y4 receptorji); 2. postranslacijske modifikacije proteinov (miristilacija na N-terminalnem koncu ali tioacilacija s palmitatom) omogočajo prehod proteinov v področje lipidnih raftov in povezovanje s komponentami lipidnih raftov; 3. nekatere strukturne komponente transmembranskih področij proteinov, predvsem njihovi hidrofobni deli, naj bi povečali težnjo proteina po prerazporejanju znotraj »zadebeljenih« delov membrane (Ostrom in Insel, 2004). Vendar pa ohranjeno zaporedje za vezavo kaveolina še ne pomeni nedvoumne proteinske interakcije, prav tako je značilno, da prehod proteina v področje lipidnih raftov/kaveol ni odvisen od samo enega izmed zgoraj opisanih mehanizmov, temveč gre pri posameznih proteinih lahko tudi za kombinacijo več različnih mehanizmov. Zanimivo je tudi opažanje, da se pri različnih tipih celic prerazporejanje proteinov v področje lipidnih

raftov razlikuje, tako je recimo β_2 -AR pri srčnih mišičnih celicah razporejen v lipidnih raftih/kaveolah, pri gladkih mišičnih celicah aorte pa je razporejen zunaj raftov/kaveol (Ostrom in Insel, 2004).

2.5 METODOLOŠKI VIDIK NALOGE

2.5.1 Metodološki vidik proučevanja citoskeleta

Pri proučevanju citoskeleta metodologijo lahko delimo na podlagi tega, ali preučujemo citoskelet v živih ali fiksiranih celicah. Metodologijo za proučevanje citoskeleta lahko delimo tudi na: 1. metode za identifikacijo citoskeletalnih proteinov (PCR, sekvencioniranje), 2. metode za proučevanje strukture in funkcije citoskeletalnih proteinov (uporaba specifičnih protiteles, označevanje s kromatofori, mikroskopske metode), 3. metode za proučevanje dinamike citoskeletalnih proteinov in citoskeleta (označevanje citoskeletalnih proteinov z autofluorescenčnimi označevalci, kot sta npr. zeleno fluorescirajoči protein (GFP) in uporaba različnih mikroskopskih tehnik), 4. genetske metode, 5. proučevanje vloge citoskeleta v delovanju celic z uporabo različnih farmakoloških sredstev (uporaba jasplakinolida, citohalazina D, latrunkulina).

Pri proučevanju citoskeleta so v preteklosti največkrat uporabljali elektronsko mikroskopijo in fluorescenčne reagente za njegovo označevanje (De Priester, 1991). Pomanjkljivost teh metod je predvsem ta, da z njimi ni mogoče spremljati dinamike citoskeleta, ki je njegova ključna komponenta. V zadnjih letih se zato vse bolj uveljavlja raba autofluorescenčnih označevalcev, s katerimi lahko proučujemo dinamiko citoskeleta ter njegovo vlogo v številnih celičnih funkcijah pri živih celicah (Ludin in Matus, 1998; Prasher, 1995). S tem namenom smo zato za proučevanje vloge aktina v delovanju GPCR-jev pri živih celicah za označevanje uporabili autofluorescenčni označevalci ojačani protein rumene fluorescence (angl. enhanced yellow fluorescent protein — pEYFP), ki je mutanta oblika GFP-ja. Pri fiksiranih celicah pa smo aktinske filamente označili s falotoksinom faloidinom, ki se veže na nastale F-aktinske strukture in jih stabilizira ter je označen s fluorescenčno oznako

rodamin. Polimerizacijo ali depolimerizacijo aktina v živih celicah pa smo izzvali z jasplakinolidom (polimerizacija) ali citohalazinom D (depolimerizacija). Spremembe v razporeditvi označenega aktina smo nato opazovali s konfokalnim mikroskopom.

2.5.1.1 Proučevanje citoskeleta z uporabo autofluorescenčnega označevalca GFP

Leta 1995 so prvič poročali o uspešni uporabi GFP za označitev citoskeletnega proteina. Število označenih citoskeletnih proteinov se od takrat nenehno veča (Ludin in sod., 1996). GFP je autofluorescenčni protein, kar pomeni, da vsebuje endogene fluorofore. Izoliran je bil iz meduze *Aequorea victoria* (Chalfie in sod., 1994; Heim in sod., 1995; Shimomura in sod., 1962) in je sestavljen iz 238 aminokislin z molekularno težo 27–30 kDa. GFP je zelo stabilna molekula in to zaradi izredno kompaktne terciarne strukture (Ludin in Matus, 1998; Prasher, 1995).

Delovanje citoskeleta je omejeno predvsem na spremembe v njegovi prostorski razporeditvi. Z uporabo GFP-ja in njegovih mutant z različnimi ekscitacijskimi in emisijskimi spektri lahko neposredno spremljamo citoskeletno aktivnost, kot so znotrajcelični promet, celično gibanje in morfološka plastičnost samega citoskeleta, hkrati pa z autofluorescenčnimi označevalci, če v celici ohranimo pravo razmerje med autofluorescenčno označenimi in endogenimi citoskeletnimi proteini, največkrat ne prizadenemo njihove fiziološke funkcije (Ludin in Matus, 1998). Poleg možnosti proučevanja dinamike prerazporeditve označenih komponent citoskeleta z videomikroskopijo pa je možna tudi njihova uporaba pri metodah prenosa energije z resonanco fluorescence in bioluminiscence, s katerima ugotavljamo proteinsko-proteinske interakcije v živih celicah (Lippincott-Schwartz in Patterson, 2003).

Kljud številnim prednostim uporabe autofluorescenčnih označevalcev pa moramo biti pri uporabi te metode in interpretaciji rezultatov previdni, saj dodatek GFP lahko odpravi ali spremeni funkcijo označenega proteina. Poleg tega eksitacija GFP-ja lahko privede tudi do pojava fototoksičnosti, ki je posledica fotokemične reakcije med prostimi radikali, ki se sproščajo pod vplivom fluorofora, in celičnimi proteini, kar vodi do poškodb v strukturi in funkcionalnosti celičnih proteinov (Ludin in sod., 1996).

2.5.1.2 Proučevanje citoskeleta z uporabo farmakoloških sredstev

Farmakološka sredstva, ki se uporabljajo za proučevanje citoskeleta v celicah, s svojim delovanjem vplivajo predvsem na proces polimerizacije/depolimerizacije aktinskih filamentov. Citohalazini, ki se najpogosteje uporabljajo za proučevanje aktina, preprečijo nadaljnjo polimerizacijo z vezavo na konec plus aktinskega filamenta (Wakatsuki in sod., 2001). Falotoksini (jasplakinolide, rodamin, faloidin) se vežejo vzdolž F-aktinskih filamentov in preprečujejo njihovo depolimerizacijo, v pogojih *in vitro* pa pospešujejo polimerizacijo aktina, znižujejo kritično koncentracijo monomernega aktina za polimerizacijo ter stabilizirajo nastale F-aktinske strukture (Bubb in sod., 1994; Visegrady in sod., 2004). Pri uporabi farmakoloških sredstev za proučevanje aktinskega citoskeleta in interpretaciji dobljenih rezultatov je treba upoštevati, da različna farmakološka sredstva nimajo vedno enakega vpliva na aktinske strukture pri različnih celicah, kar velja tudi za njihov vpliv na različne više organizirane tvorbe aktina, kot so npr. stresni filamenti ali kortikalne aktinske nitke, poleg tega je vpliv farmakološkega sredstva na aktin pogosto odvisen tudi od njegove delovne koncentracije in dolžine tretiranja celic (Bubb in sod., 1994; Engqvist-Goldstein in Drubin, 2003; Lamaze in sod., 1997).

2.5.2 Metodološki vidik proučevanja lipidnih raftov in kaveol

Zaradi nestabilnosti lipidnih raftov in njihove velikosti (10—200 nm) univerzalna metoda, s katero bi lahko proučevali njihovo natančno zgradbo in spremljali razporejanje GPCR-jev znotraj teh območij, do danes še ni bila opisana (Pike, 2009). Biokemijske metode za proučevanje lipidnih raftov, ki jih delimo v grobem na metode *in vitro*, kjer lipidne rafte izoliramo z detergenti ali brez detergentov (Ostrom in Liu, 2007), in metode *in vivo*, ki temeljijo na uporabi snovi (metil-β-ciklodekstrin in filipin), ki v celicah vežejo holesterol in posledično vodijo do razgradnje lipidnih raftov/kaveol, zaradi svojih pomanjkljivosti vodijo do številnih nejasnosti pri interpretaciji rezultatov. Slaba stran izolacije lipidnih raftov/kaveol z različnimi detergenti je predvsem ta, da je zastopanost holestereola in sfingolipidov v izoliranih mikrodomenah pri uporabi različnih detergentov različna (Pike, 2009), ugotovljeno pa je bilo tudi, da je površina

izoliranih lipidnih raftov večja od površine posameznega lipidnega rafta, kar nakazuje, da raba detergentov lahko povzroča združevanje posameznih lipidnih raftov (Macdonald in Pike, 2005). Poleg tega je slaba stran izolacije z detergenti ali brez njih tudi ta, da v izoliranih frakcijah zaradi podobne zgradbe ne moremo razločevati kaveol od lipidnih raftov (Ostrom in Insel, 2004). Za tovrstno ločevanje se je zato začelo uporabljati označevanje/izolacija kaveol z uporabo monoklonalnih protiteles, ki se vežejo na kaveolin (Aspenstrom, 1999). Pomanjkljivosti metod *in vivo* in rabe snovi, ki v celicah vežejo holesterol, pa so predvsem motnje v normalnem delovanju celic kot posledica pomanjkanja holesterola (Ostrom in Insel, 2004). Med metode *in vivo* za proučevanje kaveol spada tudi uporaba dominantno negativnih mutant kaveolina, ki ima številne prednosti predvsem z vidika enostavnosti te metode ter minimalne invazivnosti. Pri interpretaciji rezultatov pa je kljub temu treba upoštevati dejstvo, da tako prehodno kot trajno izražanje dominantno negativnih mutant v celicah nikoli ne vodita do popolne inhibicije izražanja endogenih proteinov (Bear in sod., 2001; Sheppard, 1994).

V luči pomanjkljivosti opisanih metod smo zato pri delu uporabljali celično linijo CHO 215 z okvarjeno dekarboksilacijo 4-karboksisterola (Plemenitas in sod., 1990) in posledično nezmožnostjo tvorbe lipidnih raftov (Zheng in sod., 2001), ki nam je omogočila hitrejše proučevanje kinetike in dinamike proučevanih proteinov v njihovem naravnem okolju ter večjo in bolj zanesljivo ponovljivost poskusov, saj smo poskuse opravili na celicah, pri katerih nismo modificirali njihovega okolja in s tem vplivali na njihovo funkcionalnost z rabo farmakoloških sredstev.

2.5.2.1 Proučevanje lipidnih raftov z elektronsko paramagnetno resonančno spektroskopijo (EPR)

Zaradi nestabilnosti (njihov življenjski čas je krajši od 1 ms) in njihove nanomilimetrsko velikosti, lipidnih raftov s klasičnimi mikroskopskimi tehnikami (svetlobni mikroskop, fluorescenčna mikroskopija) ne moremo proučevati (Pike, 2009). Uporaba elektronskih mikroskopov, predvsem presevnega elektronskega mikroskopa, za proučevanje mikrodomen je primerna zaradi njihove visoke ločljivosti, pomanjkljivosti pa se kažejo predvsem z vidika specifičnosti protiteles, ki jih

uporabljamo za označevanje mikrodomen, ter proteinov, ki so lokalizirani znotraj mikrodomen (Ostrom in Insel, 2004).

Klasična konfokalna mikroskopija z uporabo fluorescenčnih označevalcev je sicer izboljšala ločljivost in omogočila vizualizacijo posameznih mikrodomen v membrani, toda šele izboljšane mikroskopske tehnike, kot so: metoda FRAP (angl. fluorescence recovery after bleaching), mikroskop na atomsko silo (angl. atomic force microscopy — AFM), multifotonska vrstična laserska mikroskopija; mikroskopija s subuklonsko ločljivostjo, kot je npr. mikroskopija z uporabo stimuliranega bledenja (angl. stimulated emission depletion — STED), so omogočile ločevanje posameznih delov mikrodomen med seboj, proučevanje njihove zgradbe, spremljanje lateralne dinamike mikrodomen v membrani in opazovanje lokalizacije proteinov znotraj mikrodomen (Jacobson in sod., 2007) (Eggeling in sod., 2009).

Poleg izboljšanih mikroskopskih tehnik pa strukturo in dinamiko mikrodomen, ter vpliv in dinamiko različnih molekul, ki se razporejajo znotraj mikrodomen, lahko spremljamo tudi z različnimi biofizikalnimi metodami. Med njih spadajo: fluorescenčna korelacijska spektroskopija (angl. fluorescent correlation spectroscopy — FCS), metoda sledenja posameznih delcev, detekcija lipidnih raftov z metodo jedrske magnetne rezonance (angl. nuclear magnetic resonance — NMR) in metoda elektronske paramagnetne rezonance (EPR). Večina biofizikalnih metod temelji na proučevanju lateralne difuzije molekul, ki jih označimo z različnimi označevalci; s fluorofori pri FCS, atomskimi jedri pri NMR in s spinškim označevalcem pri EPR, in nato spremljamo njihovo gibanje v membrani (Arsov, 2004; Kenworthy, 2005).

Z elektronsko paramagnetno resonančno spektroskopijo (EPR), imenovano tudi elektronska spinska resonančna spektroskopija (ESR), ki smo jo uporabljali pri naši raziskavi, odkrivamo vsebnost neparnih elektronov v nekem vzorcu ali molekuli. Neparne elektrone imajo npr. prosti radikali, nekateri ioni prehodnih elementov in nekatere molekule, kot je npr. O₂. Take snovi imenujemo paramagneti. Neparni elektroni imajo spinski magnetni moment. Ta se v močnem magnetnem polju postavi v smeri polja ali pa v nasprotno smer. Ti dve smeri pa imata različni energiji. Ena največjih prednosti metode EPR za uporabo v bioloških sistemih je njena neinvazivnost za celice (Arsov, 2004). Radikali, ki so v naravnih bioloških sistemih prisotni, zaradi kratke razpolovne dobe in nizkih koncentracij niso primerni za

proučevanje lastnosti takšnih sistemov. S tem namenom v sisteme vgrajujemo t. i. spinske označevalce, ki so bolj stabilni in jih pripnemo na nosilno molekulo, o kateri pravimo, da je spinsko označena (Marsh, 1981). Metoda EPR je primerna za raziskovanje lateralne domenske strukture membrane. Lateralna difuzija spinskih označevalcev je namreč dovolj počasna v primerjavi s časovno skalo EPR za gibalno povprečje 10^{-8} s, da se spektri posameznih tipov domen ne izpovprečijo. Rezultat meritve na heterogeni membrani je spekter EPR, ki je sestavljen iz večjega števila spektralnih komponent, od katerih načeloma vsaka predstavlja prispevek spinskih označevalcev iz posameznega domenskega tipa. V sliki EPR različne tipe domen karakteriziramo z različnimi množicami spektralnih parametrov, kjer vsaka množica določa eno spektralno komponento (Arsov, 2004). Informacijo o spektralnih parametrih lahko iz spektra izluščimo z optimizacijo. Iz dobljenih spektralnih parametrov pa lahko sklepamo na fizikalne lastnosti posameznih domenskih tipov (Hubbell in McConnell, 1971). Zaradi prisotnosti proteinov znotraj celične membrane, npr. receptorja, se lahko spremenijo membranska struktura in njene lastnosti. Prisotnost rigidnih proteinov znotraj membrane namreč vpliva na hitrost fluktuacije alkilnih verig maščobnih kislin, kar vodi do sprememb v domenski strukturi membrane (Lee, 2005). Metodo EPR smo pri delu uporabljali predvsem zaradi neinvazivnosti za celice in ker nam je omogočila enostavno proučevati vpliv lipidnih raftov na lateralno domensko zgradbo plazmamembrane pri celicah ter spremljanje razporejanja receptorjev znotraj lipidnih raftov in kaveol.

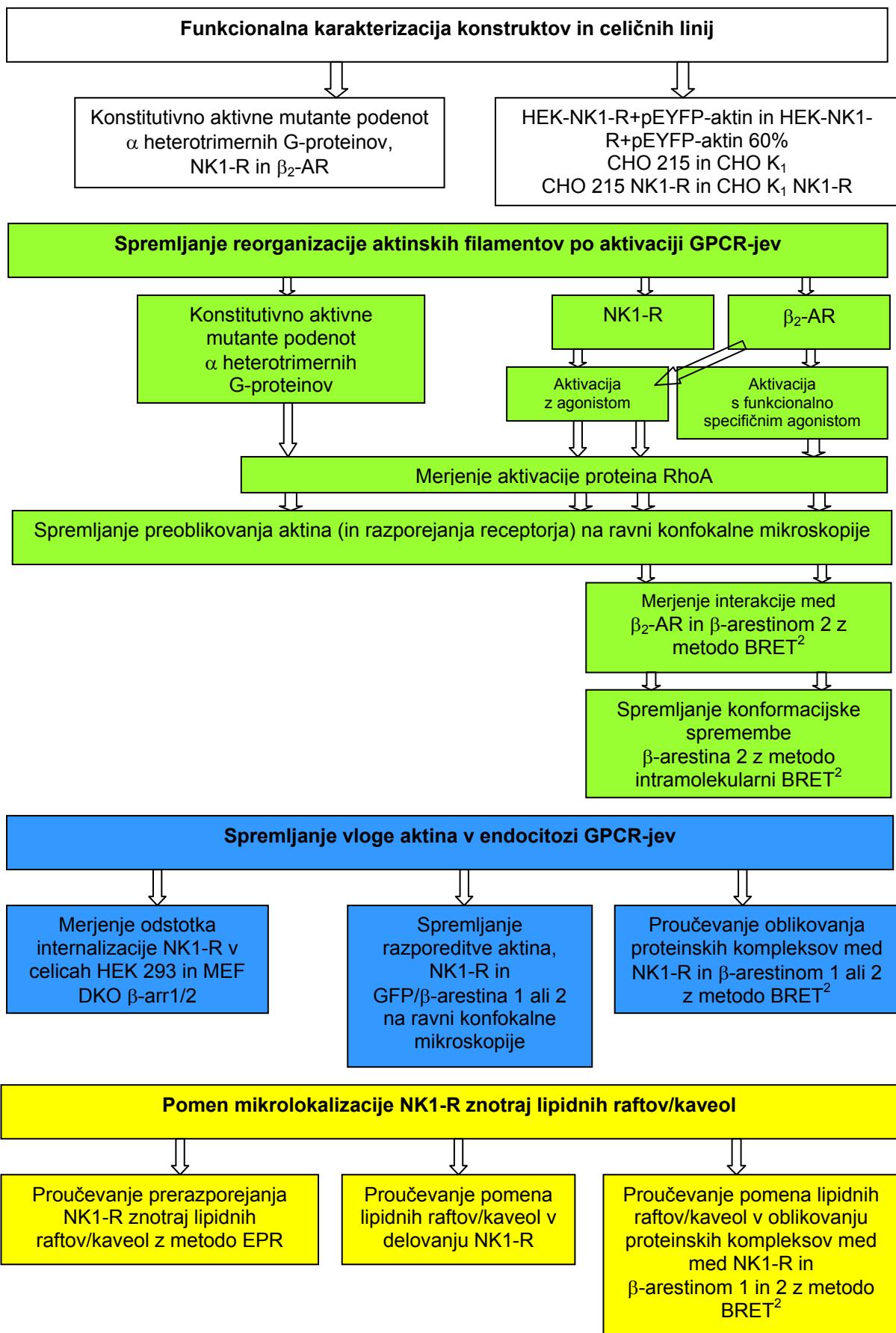
2.6 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen doktorske naloge je proučiti vlogo aktinskega citoskeleta v različnih vidikih biologije receptorjev, sklopljenih z G-proteini (GPCR-jev).

Postavili smo naslednje hipoteze:

- 1. hipoteza:** Spodbuditev GPCR-jev, ki se prednostno vežejo z $G_{\alpha q/11}$, vodi do preoblikovanja mreže aktinskih filamentov in sprememb v celični morfologiji.
- 2. hipoteza:** $G_{\alpha q/11}$ deluje kot posredovalni protein pri receptorsko vspodbujeni prerazporeditvi aktinskih filamentov.
- 3. hipoteza:** Izražanje β -arestina 1 je pomembno za receptorsko vspodbujeno prerazporeditev aktinskih flamentov.
- 4. hipoteza:** Spodbuditev z agonistom privede do oblikovanja multiproteinskih kompleksov med receptorji, adaptornimi proteini in aktinom.

Eksperimentalni potek naloge prikazuje slika 15.



Slika 15: Potek eksperimentalnega dela.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 CELIČNE LINIJE

Pri delu smo uporabljali humane embrionalne ledvične celice (HEK 293), ki predstavljajo linijo primarnih humanih ledvičnih celic, transformiranih z DNA humanega adenovirusa tipa 5 (Graham in sod., 1977). Celice HEK 293 smo pridobili iz Evropske kolekcije živalskih celičnih kultur (European Collection of Animal Cell Cultures). Primerne so za pripravo prehodno in trajno transfeciranih celičnih linij. Ovarijske celice kitajskega hrčka K₁ (CHO K₁) in mutirano obliko celic kitajskega hrčka CHO 215 z okvarjeno dekarboksilacijo 4-karboksisterola (Plemenitaš in sod., 1990) smo pridobili iz laboratorija prof. dr. Ane Plemenitaš (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Mišje embrionalne fibroblaste (MEF) z izbitima genoma za β-arestin 1 in 2 smo dobili iz laboratorija prof. Robert J. Lefkowitz (Duke University Medical Center, ZDA).

3.2 GOJENJE CELIC IN VITRO

Celice HEK 293 smo rutinsko vzdrževali v Eaglovem mediju, modificiranem po Dulbeccu z Glutamaxom-I (DMEM z Glutamax-I), ki smo mu dodali 10 % fetusnega (plodovega) seruma goveda (FCS), 100 IU/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina, pri nadzorovani temperaturi 37 °C in navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5 % CO₂. Celice MEF smo gojili pri enakih pogojih kot celice HEK 293. Pri gojenju celic CHO K₁ in CHO 215 smo uporabljali hranilni medij McCoy z dodatkom 5 % FCS ali 5 % seruma z nizko vsebnostjo lipoproteinov (LLS), 100 IU/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina. Celice smo gojili pri nadzorovani temperaturi 37 °C in navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5 % CO₂.

Hranilni medij smo menjavali v 3- do 4-dnevnih presledkih oz. takrat, ko so celice dosegle od 90- do 100-odstotno gostoto. Celice smo subkultivirali tako, da smo jih najprej odstranili s podlage z 0,25-odstotno raztopino tripsina, ki je vsebovala še 0,3 % EDTA. Tripsin je proteolitski encim, s katerim odlepljamo celice od podlage.

Celicam v suspenziji (odlepljenim s podlage) smo nato dodali kompletni medij (FCS prepreči delovanje tripsina), jih razbili s pipetiranjem in ustreznou količino (približno 1/5) vrnili v steklenico. Preostanek celic smo uporabili za poskuse ali pa zamrznili v kompletnem mediju z dodatkom 8-odstotnega dimetilsulfoksida (DMSO) pri -80 °C ter jih po 24 urah prenesli v tekoči N₂. Vsi mediji in reagenti za gojenje celic so bili od proizvajalcev Sigma ali GibcoBRL (Invitrogen). Plastični potrošni material za gojenje in manipulacijo celic je od proizvajalca TPP (Švica).

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE HOLESTEROLA V CELICAH CHO K₁ IN CHO 215

Koncentracijo holesterola v celicah CHO K₁ in CHO 215 so določili na Medicinski fakulteti v Ljubljani na Inštitutu za biokemijo s komercialno dosegljivim kompletom Cholesterol reagent kit (Thermo Electron Oy, Clinical Chemistry & Automation Systems, VB). Uporabljena metoda temelji na encimskem ločevanju holesterola od drugih komponent vzorca; koncentracijo dobljenega holesterola nato določimo kolorimetrično. Koncentracija holesterola je bila odčitana iz umeritvene krivulje pri vrednosti absorbance 560 nm. Za izračun vrednosti smo uporabljali računalniški program Graph Pad Prism.

3.4 STANDARDNE METODE MOLEKULARNE BIOLOGIJE

3.4.1 Rekombinanti plazmidni vektorji

Pri delu smo uporabljali rekombinante plazmidne vektorje, ki so prikazani v tabeli 1.

Tabela 2: Opis rekombinantnih plazmidnih vektorjev.

KONSTRUKT	VEKTOR	OPIS	OPOMBA/ REFERENCA
caG α_q	pcDNA3.1+	mutacija: Q209L Kpn I/Xho I	UMR cDNA [®] www.cdna.org
caG α_{11}	pcDNA3.1+	mutacija: Q209L Kpn I/Xho I	UMR cDNA [®] www.cdna.org
caG α_{12}	pcDNA3.1+	mutacija: Q231L Kpn I/Xho I	UMR cDNA [®] www.cdna.org
caG α_{13}	pcDNA3.1+	mutacija: Q226L Kpn I/Xba I	UMR cDNA [®] www.cdna.org
caG α_s	pcDNA3.1+	mutacija: Q227L Kpn I/Xho I	UMR cDNA [®] www.cdna.org
pEYFP-actin		Nhe I/Xho I	BD Biosciences Clontech www.clontech.com
WT HANK1-R	pcDNA3.1+		Martini, 2002
FLAG-NK1-R	pNSIneo	Hind III/Xba I	7TM Pharma A/S
WT HA- β_2 -AR	pcDNA3.1+	Kpn I/Xho I	UMR cDNA [®] www.cdna.org
NK1-R/RLuc	pcDNA3.1+		Vrecl, 2004
β_2 -AR/RLuc	pcDNA3.1+		Vrecl, 2004
Cav1-GFP ²	pcDNA3.1+	Hind III/Eco R V/Xho I	
GFP ² / β -arr1	pcDNA3.1+	Hind III/Xho I	Jorgensen, 2007
GFP ² / β -arr2	pcDNA3.1+	Nhe I/Xba I	Vrecl, 2004
GFP ² / β -arr2 R393E,R395E	pcDNA3.1+	mutacija: R393E; R395E Hind III/Xba I	Vrecl, 2004
RLuc/ β -arr2 R393E,R395E/GFP ²	pcDNA3.1+	Nhe I/Hind III/Eco RV/Xho I	
RLuc/ β -arr2/GFP ²	pcDNA3.1+	Nhe I/Hind III/Eco RV/Xho I	
β -arr1	pcDNA3.1+	Apa I/Hind III	Pridobljeno iz laboratorija prof.V.V. Gurevich.
β -arr2	pcDNA3.1+		Pridobljeno iz laboratorija prof. R. J. Lefkowitz.

3.4.2 Pomnoževanje rekombinantnih plazmidov

Rekombinantne plazmidne vektorje smo pomnožili v kemično kompetentnih bakterijskih celicah *E. coli* sev TOP10F' (Invitrogen).

50 µl TOP10F' celicam v 1,5-ml epruveti smo dodali 1 µl cDNA posameznega rekombinantnega vektorja in mešanico inkubirali 30 min na ledu. Celice smo nato izpostavili topotnemu šoku (42 °C, 30 sek) ter jih spet prenesli na led za 2 minuti. Nato smo jim dodali 250 µl hraničnega medija SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) (Sigma) in jih inkubirali 1 uro v inkubatorju pri 37 °C in 220 vrt./min. Po končani inkubaciji smo 50 µl celic nacepili na Luria-Bertani (LB) agarsko ploščo z dodatkom 50 µg/ml kanamicina (Sigma) (v primeru pEYFP-aktina) ali 100 µg/ml ampicilina (Sigma) (v primeru drugih rekombinantnih konstruktov) in inkubirali čez noč pri 37 °C. Eno bakterijsko kolonijo, transformirano z rekombinantnim plazmidom, smo nato vcepili v 50-ml epruveto (Falcon) z 10 ml avtoklaviranega gojišča LB (Sigma) in s 50 µg/ml kanamicina (Sigma) ali 100 µg/ml ampicilina (Sigma) in tekočo kulturo inkubirali čez noč s stresanjem (220 vrt./min) pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo bakterijsko kulturo v tekočem gojišču centrifugirali 10 min pri 3000 vrt./min, odstranili supernatant in celično peleto uporabili za izolacijo plazmidne DNA.

3.4.3 Izolacija plazmidne DNA

Za izolacijo plazmidne DNA smo uporabili komercialno dosegljivi komplet QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) ali QIAprep® Spin Maxiprep (Qiagen) in pri delu upoštevali protokol proizvajalca. Iz bakterijskih kultur plazmidno DNA izoliramo z liziranjem celične usedline bakterij z dodatkom alkalnih pufrov, s pomočjo nevtralizacijskega pufra, ki vsebuje acetat, nato precipitiramo proteine in bakterijsko genomsko DNA, medtem ko plazmidna DNA ostane v raztopini in jo preko kolon z dodatkom pufrov z različno vsebnostjo soli in isopropanolom prečistimo. Prešičeno plazmidno DNA nato iz membrane speremo v epruveto z destilirano H₂O, segreto na 65 °C. Postopek izolacije plazmidne DNA je pri obeh kompletih podoben, razlika je le v količini

izolirane DNA, ki je pri kompletu Miniprep med 200 in 300 ng/ μ l, pri kompletu Maxiprep pa ~1000 ng/ μ l.

3.4.3.1 Določanje koncentracije DNA

Koncentracijo in čistost pridobljene DNA smo določili spektrofotometrično z merjenjem optične gostote (angl. optical density — OD) razredčenega vzorca plazmidne DNA v destilirani H₂O pri 260 in 280 nm s pomočjo ultravijoličnega/vidnega (UV/VIS) spektrofotometra Lambda 12 (Perkin Elmer). Koncentracijo plazmidne DNA smo izračunali tako, da smo odčitano vrednost OD pri 260 nm pomnožili s faktorjem razredčitve in vrednostjo 50 (50 μ g plazmidne DNA/ml ima OD₂₆₀ = 1). Razmerje med OD pri 260 in 280 nm je indikator čistosti DNA in znaša približno 1,8 (Sambrook J, 1989).

3.4.4 Restriktijska analiza plazmidne DNA

Istovetnost pridobljenih plazmidnih DNA s komercialnimi vektorji smo preverili z restriktijsko analizo. Restriktijske encime (Promega) za posamezne plazmide smo izbrali skladno z informacijami dobavitelja rekombinantnih plazmidov (UMR cDNA). V 1,5-ml epruveti smo pripravili naslednjo reakcijsko zmes: 1 μ g DNA, 2 μ l 10-kratne osnovne raztopine digestijskega pufra (Promega), dva izbrana restriktijska encima (1 μ l) in do skupnega volumna (20 μ l) destilirane H₂O. Premešano raztopino smo kratko centrifugirali in jo 3 ure inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C. Po restriktijskem striženju smo vzorce analizirali na agaroznem gelu.

3.4.5 Elektroforeza na agaroznem gelu

Metodo elektroforeze smo uporabljali za ločevanje, določanje in čiščenje fragmentov DNA. Pri molekulah DNA iste konformacije obstaja linearna povezava med logaritmom njihove molekularne teže, izražene v baznih parih, in njihovo elektroforetsko mobilnostjo. Za analizo vzorcev DNA smo rutinsko uporabljali 0,8-

odstotni agarozni gel, z namenom najvišje resolucije pri velikosti fragmentov DNA med 500 bp in 7 kilo bp.

0,8-odstotni gel za elektroforezo smo pripravili tako, da smo odtehtali 0,2 g agaroze (Sigma) in dolili do 25 g trisboratnega (angl. tris-borate EDTA — TBE) pufra (54 g tris baze, Sigma; 27,5 g borove kisline, Sigma; 20 ml 0,5 M EDTA, Sigma; do 1000 ml H₂O). Vsebino smo nato prevreli v mikrovalovni pečici, da se je agarosa raztopila. Preden smo gel vlili v model z glavnikom, smo mu dodali še 0,1 µl/ml etidijevega bromida (Sigma). Ta se veže na molekulo DNA in povzroči, da po osvetlitvi z UV-svetlobo fluorescira v oranžnem delu spektra. Gel smo nato položili v elektroforetsko posodico, napolnjeno z 0,5-kratnim pufrom TBE, odstranili glavnik in v nastale žepke odpipetirali vzorce (10 µl), ki smo jim dodali po 2 µl raztopine za nanos vzorcev (akridinoranžna). Za ugotavljanje velikosti dobljenih fragmentov smo na gel sočasno z vzorci nanesli še standardni označevalec za določanje velikosti DNA, t. i. marker III (Boehringer, Mannheim). Elektroforeza je potekala 30 min pri stalni napetosti 110 volтов. Po elektoforezi smo dobljene rezultate opazovali nad UV-presvetljevalnikom, dobljene slike s kamero prenesli na računalnik ter jih analizirali s programom za analizo slike (Biorad).

3.4.6 Sekvencioniranje plazmidne DNA

Z metodo sekvencioniranja DNA smo ugotavljali pravilnost nukleotidnih zaporedij rekombinantnih vektorjev, ki smo jih uporabljali pri delu. Za določitev zaporedja smo uporabili komercialno dostopne začetne oligonukleotide (T7 in SP6; Omega). Sekvenčno reakcijo smo izvedli s polimerazo Taq DNA in dideoksi nukleotidi, označenimi s fluorescenčnimi barvili (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Biosystems, ZDA). Določitev zaporedja smo opravili po navodilih proizvajalca s pomočjo sekvenatorja ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Biosystems, ZDA). Dobljene sekvene smo pregledali in obdelali s programom Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd.). Izpise sekvenčnih reakcij smo obdelali z računalniškim programom DNA STAR (Lasergen, ZDA).

3.5 PRIPRAVA PREHODNO IN TRAJNO TRANSFECIRANIH CELIČNIH LINIJ

3.5.1 Priprava prehodno transfeciranih celičnih linij

3.5.1.1 Transfekcija celic z Lipofecatminom

S transfekcijskimi metodami vnesemo tujo molekulo DNA v evkariotsko gostiteljsko celico. Pri prehodni transfekciji se molekula DNA vnese v celično jedro, vendar se ne vključi v kromosom gostiteljske celice. To pomeni, da so v celici številne kopije proučevanega gena, kar vodi do visoke ravni izraženega proteina v transfeciranih celicah. Prehodno transfecirane celice je treba analizirati po 24 do 96 urah po transfekciji. Pri našem delu smo DNA vnesli v celice z uporabo t.i. sintetičnih kationskih lipidov. Splošni princip uporabe kationskih lipidov za vnos DNA temelji na nastanku kompleksa med negativno nabito DNA in pozitivno nabitim kationskim lipidom. Nastali kompleks kationski lipid-DNA nato preide v celico z endocitozo. Trenutno najbolj rabljen kationski lipid za vnos DNA je Lipofectamin (Invitrogen). Transfekcijo celic HEK 293, CHO K₁, CHO 215 in MEF z Lipofectaminom smo izvedli po navodilih proizvajalca. Dan pred transfekcijo smo približno 1×10^6 celic prenesli v petrijevke premera 60 mm, jim dodali kompletni hrnilni medij DMEM ter inkubirali pri standardnih pogojih. Naslednji dan ali kasneje, ko celice dosežejo od 60- do 80-odstotno gostoto, smo jih pripravili za transfekcijo; odstranili smo hrnilni medij in jih sprali z Dulbeccovo fiziološko raztopino v fosfatnem pufru (DPBS). 2—6 µg DNA za transfekcijo smo prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf), v katero smo predhodno dodali 500 µl medija Optimem (Gibco) brez FCS in antibiotikov, v drugo 1,5 ml epruveto smo dodali 500 µl medija Optimem in nato dodali še Lipofectamin (20 µl/10 µg DNA), premešali z vorteksom in inkubirali 5 min. V naslednjem koraku smo združili raztopini iz obeh epruvet in nastalo mešanico inkubirali pri sobni temperaturi 20 min (s tem se omogoči vezava reagenta in DNA). Po končani inkubaciji smo mešanico prenesli na celice s katerih smo odstranili kompletni medij, jih dvakrat sprali z DPBS in jim dodali 1,5 ml Optimema. Celice smo inkubirali 3—6 ur v standardnih pogojih, nato odstranili transfekcijsko mešanico, celice sprali z DPBS in prelili s 5 ml kompletnega medija.

3.5.1.2 Transfekcija celic s SuperFectom™

Molekule DNA smo v celice vnašali tudi z aktiviranimi dendrimeri, ki so zelo razvejene sferične molekule, pri katerih veje izhajajo iz osrednjega dela molekule in se končujejo s pozitivno nabito aminoskupino. Aktivirani dendrimer vgradi DNA v svojo kompaktno strukturo tako, da nastane interakcija negativno nabitih fosfatnih skupin DNA s pozitivno nabitimi aminoskupinami dendrimera. Skupni naboj nastalega kompleksa DNA-aktivirani dendrimer je pozitiven, kar mu omogoča vezavo na negativno nabite molekule na celični membrani, čemur sledi vnos v celico z nespecifično endocitozo. V celici dendrimer po združitvi poznih endosomov z lizosomi s svojim puferskim delovanjem prepreči aktivnost lizosomalnih nukleaz. To omogoči stabilnost kompleksa DNA-dendrimer znotraj celice in učinkovit prenos nepoškodovane DNA do celičnega jedra. Pri delu smo uporabljali reagent z aktiviranimi dendrimeri Superfect™.

Transfekcijo celic HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 s Superfectom™ smo izvedli po navodilih proizvajalca. Dan pred transfekcijo smo približno 1×10^6 celic prenesli v petrijevke premera 60 mm, jim dodali kompletni hrnilni medij DMEM ter jih inkubirali v standardnih pogojih. Naslednji dan ali kasneje, ko celice dosežejo od 60- do 80- odstotno gostoto, smo jih pripravili za transfekcijo; odstranili smo hrnilni medij in jih sprali z DPBS. 2—6 µg DNA (odvisno od poskusa) za transfekcijo smo prenesli v 1,5-ml epruveto (Eppendorf), v katero smo predhodno dodali 150 µl medija DMEM brez FCS in antibiotikov in nato dodali še SuperFect™ v razmerju 1 : 5 z DNA, premešali z vorteksom in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi (s tem se omogoči vezava reagenta in DNA). Po končani inkubaciji smo mešanici dodali 1 ml kompletnega medija DMEM in jo prenesli na celice, s katerih smo odstranili DPBS. Celice smo inkubirali 3—6 ur v standardnih pogojih, nato odstranili transfekcijsko mešanico, celice sprali z DPBS in prelili s 5 ml kompletnega medija.

3.5.2 Priprava trajno transfeciranih celičnih linij

Pri trajni transfekciji celičnih linij se vnesena molekula DNA bodisi vgradi v kromosom bodisi ostane znotraj celice kot episom. Celice, ki so uspešno vgradile DNA v kromosom ali jo ohranile v obliki episoma, lahko ločimo od preostalih (netransfeciranih) celic z uporabo selektivnih markerjev. Najpogosteje se uporablja evkariontski geni za rezistenco na antibiotike (npr. neomicin (G418), hygromycin B), ki jih v celico vnesemo skupaj z genom, ki ga proučujemo. Verjetnost integracije tuge DNA v kromosom je približno $1 : 10^4$ in je odvisna od vrste celic (Sambrook J, 1989). Celice HEK 293 smo trajno transfecirali z NK1-R in pEYFP-aktinom in jih selekcionirali v prvem koraku s pomočjo diskov za kloniranje (Sigma), v drugem koraku pa smo s pretočnim citometrom še dodatno odsortirali celice z najvišjo ravnjo izražanja avtofluorescenčno označenega aktina; celice CHO K₁ in CHO 215 smo trajno transfecirali z NK1-R in selekcionirali s pretočnim citometrom. Rekombinantna vektorja NK1-R in pEYFP-aktin oba vsebujeta gen za aminoglikozidno fosfotransferazo (gen *neoR*), ki jima daje odpornost proti neomicinu, kar omogoči selekcijo transfeciranih evkariontskih celic z geneticinom (G418) (GibcoBRL). Pred začetkom selekcije je treba določiti učinkovito letalno koncentracijo G418 za netransfecirane celice. Celice HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 smo po tripsinizaciji prenesli v plošče s 24 jamicami (2×10^5 celic/jamico) in celicam dodali kompletni medij DMEM z naraščajočimi koncentracijami antibiotika (0, 100, 250, 500, 750 ali 1000 µg/ml) ter jih gojili v standardnih pogojih. Za posamezno koncentracijo antibiotika smo uporabili štiri jamice. Na ravni svetlobne mikroskopije smo vsak dan opazovali preživetveno sposobnost celic pri različnih koncentracijah uporabljenega antibiotika. G418 v koncentraciji 750 in 1000 µg/ml je povzročil smrt večine celic v 24 urah. Zato smo kot učinkovito letalno koncentracijo G418 za selekcijo celic HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 izbrali 1000 µg/ml.

Dan pred transfekcijo smo približno 1×10^6 celic HEK 293, CHO K₁ ali CHO 215 prenesli v petrijevke premera 60 mm, jim dodali kompletni hranilni medij DMEM ter inkubirali v standardnih pogojih. Naslednji dan ali kasneje, ko celice dosežejo od 60- do 80-odstotno gostoto, smo jih pripravili za transfekcijo z Lipofectaminom, kot je opisano v poglavju 3.5.1.1. Za trajno celično linijo smo celice CHO K₁ in CHO 215

transfecirali z 1 µg cDNA za HANK1-R, celice HEK 293 pa z 1 µg cDNA za HANK1-R in 1 µg cDNA za pEYFP-aktin.

Celice HEK 293 smo 72—96 ur po transfekciji s pEYFP-aktinom in HANK1-R tripsinizirali in prenesli v steklenice s t. i. »peel off« pokrovom (TPP) (steklenice s t. i. »peel off« pokrovom so primerne za kasnejše delo v fazi osamitve kolonij z diskimi za kloniranje, ker nam po odstranitvi plastične folije (»peel off« pokrova), ki prekriva zgornjo površino steklenice, omogočajo lažji dostop do oblikovanih kolonij na dnu steklenice) in kompletному mediju DMEM dodali 1000 µg/ml G418. Medij z antibiotikom smo menjavali v 3- do 4-dnevnih presledkih. V dveh do treh tednih, ko so se iz posameznih preživelih celic oblikovale kolonije, smo posamezne kolonije osamili z diskimi za kloniranje (Sigma). Celice smo sprali z DPBS, odstranili pokrov steklenice in na posamezne kolonije položili disk za kloniranje, pomočen v raztopino tripsin/EDTA. Celice smo tako odstranili z dna steklenice in prenesli na disk. Disk s celicami smo nato položili v jamico na plošči s 24 jamicami in dodali 1 ml kompletnega medija DMEM z antibiotikom. Ko so celice v jamici prerasle dno, smo jih ponovno tripsinizirali in preneseli v petrijevko premera 60 mm. Ko so dosegle gostoto v tej posodici (približno 1×10^6 celic), smo jih prenesli v 25 cm^2 in nato v 75 cm^2 steklenice (TPP). Ko so celice v 75 mm steklenicah dosegle 60—80-odstotno gostoto, smo jih pripravili za sortiranje s pretočnim citometrom.

Od 72 do 96 ur po transfekciji s HANK1-R smo celice CHO K₁ in CHO 215 tripsinizirali in prenesli v 100 mm petrijevke ter kompletnemu mediju DMEM dodali 1000 µg/ml G418. Medij z antibiotikom smo menjavali v 3- do 4- dnevnih presledkih. V dveh do treh tednih, ko so celice dosegle 60—80-odstotno gostoto, smo jih pripravili za sortiranje s pretočnim citometrom.

3.5.2.1 Priprava celic za selekcijo s pretočnim citometrom

Pretočna citometrija je metoda, pri kateri z veliko hitrostjo in visoko statistično natančnostjo merimo fizikalne, biokemične in funkcionalne lastnosti celic, ki v obliki majhnih kapljic suspenzije, ki vsebujejo le eno celico, potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. Skozi merilno komoro celice prehajajo s hitrostjo tudi do 1000 celic

na sekundo. Fluorescenčni detektorji nam omogočajo merjenje svetlobe, ki jo oddajajo različni fluorokromi, s katerimi označimo molekule, v našem primeru receptor, ki jih želimo analizirati. Fotodetektor izmerjeno svetlobo pretvori v električne signale, ki jih izmerimo in nato z ustreznimi računalniškimi programi obdelamo ter prikažemo v obliki frekvenčnega histograma. Prednost te metode je, da se z veliko hitrostjo in visoko statistično natančnostjo beležijo lastnosti posamezne celice, kar nam omogoča v naslednjem koraku, po opravljeni analizi, tudi odsortiranje celic z izbranimi lastnostmi (Rieseberg in sod., 2001; Steinkamp, 1984). Pri našem delu smo pretočno citometrijo uporabljali za pripravo trajnih celičnih linij. Pri celičnih linijah HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 smo tako s pretočnim citometrom v prvem koraku izmerili raven fluorescenčno označenih proteinov v celicah (pEYFP-aktin ali NK1-R, označen s protitelesi, konjugiranimi z R-fikoeritrinom) in nato odsortirali tiste celice, pri katerih je bila ta raven nad bazalno.

Trajno transfecirane celice smo sprali z DPBS, tripsinizirali in 1×10^6 celic prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf). V naslednjem koraku smo pripravili raztopino primarnih podganjih protiteles proti hemaglutininu (HA) v razmerju 1 : 100 v pufru za barvanje (1-odstotni bovini serumski albumin (BSA) v 0,01 PBS z dodanim 0,1-odstotnim natrijevim azidom (NaN₃)). V opisani raztopini smo celice CHO K₁ in CHO 215 na stresalniku inkubirali na ledu eno uro. Po končani inkubaciji smo epruvetke s celicami centrifugirali na 1000 vrt./3 min, odstranili raztopino s primarnimi protitelesi in celice sprali s 100 µl pufra za barvanje brez dodatka protiteles. Postopek smo ponovili še trikrat. Po spiranju smo pripravili raztopino s kozjimi protipodganjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z R-fikoeritrinom (R-phycoerithrin; R-PE) v razmerju 1 : 20 v pufru za barvanje. Celice smo na stresalniku inkubirali 30 minut na ledu. Po končanem tretiranju s sekundarnimi protitelesi smo celice ponovno trikrat sprali, jih razredčili v 1 ml pufra za barvanje in jih na ledu prenesli na Kemijski inštitut v Ljubljani. Celice HEK 293, transfecirane s HANK1-R in pEYFP-aktinom, smo za sortiranje s pretočnim citometrom po spiranju z DPBS in tripsinizaciji prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf), jih trikrat sprali s 100 µl pufra za barvanje in jih za namen sortiranja nato razredčili v 1 ml pufra za barvanje. Podobno kot celice CHO K₁ in CHO 215 smo jih na ledu prenesli na Kemijski inštitut v Ljubljani. Meritve in sortiranje celic na pretočnem citometru EPICS Altra cell sorter (Beckman Coulter) je opravila

dr. Polona Bedina (Laboratorij za biosintezo in biotransformacijo, Kemijski inštitut, Ljubljana). Pridobljene celične linije smo poimenovali HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%, CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R.

3.6 METODE ZA SPREMLJANJE POVRŠINSKE IZRAŽENOSTI IN INTERNALIZACIJE RECEPTORJEV

3.6.1 Encimskoimunski test (ELISA)

Površinsko izražanje NK1-R smo izmerili po opravljenem sortiraju trajno transfeciranih celic HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 z encimskoimunskim testom (angl. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay — ELISA). Dan pred začetkom poskusa smo celice tripsinizirali in prenesli v plošče s 24 jamicami, prevlečene z 0,01-odstotnim poly-L-lizinom v gostoti 1×10^5 in jim dodali kompletni medij. Po 24 urah smo celice sprali z DPBS in jih fiksirali 20 min v 4-odstotni raztopini paraformaldehida v 0,01 M PBS (pH 7,2—7,4) pri 4 °C. Po fiksaciji smo celice ponovno sprali z DPBS in blokirali nespecifično barvanje ozadja z 20—30-minutno inkubacijo v 1-odstotni raztopini BSA v 0,01 M PBS. Celice smo nato 2 uri inkubirali v raztopini s primarnimi podganjimi protitelesi proti HA (Roche) v razmerju 1:100. Po končani inkubaciji smo celice trikrat temeljito sprali z DPBS in jim za 1 uro dodali sekundarna kozja protipodganja protitelesa, označena s hrenovo peroksidazo (Sigma Aldrich) v razredčitvi 1 : 1000. Reakcijo smo po trikratnem temeljitem izpiranju razvili z dodatkom 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina ((TMB) Liquid Substrate System (Sigma Aldrich)) 200 µl/jamico. Celice z dodanim TMB smo inkubirali v zatemnjenem prostoru 30 min pri 37 °C in razvijanje barve ustavili z dodatkom 0,5 M H₂S₀4 (100 µl/jamico). Absorbanco smo izmerili z MTP-čitalcem Rosys Anthos Reader 2010 (Anthos Labtec Instruments) pri 450 nm. Netransfecirane celice HEK 293, CHO K₁ ali CHO 215 smo uporabili za določanje ozadja. Poskus je bil izveden v treh ponovitvah. Dobljene vrednosti smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism.

3.6.2 Testi vezave radioaktivno označenega liganda

Pri delu smo uporabljali test samoizpodrivanja z radioaktivno označenim ligandom (angl. self-competition binding assay) in internalizacijski test.

3.6.2.1 Test samoizpodrivanja

Za test samoizpodrivanja smo celice HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 dan pred začetkom poskusa tripsinizirali in prenesli v plošče s 24 jamicami, prevlečene z 0,01-odstotnim poly-L-lizinom v gostoti 1×10^5 , in jim dodali kompletni medij. Na dan poskusa smo celice sprali z DPBS in kompletni medij zamenjali s puferiranim DMEM (Hepes-DMEM) z 0,1% BSA. Po eni uri smo medij odstranili in na celice dodali 500 µl medija (puferirani DMEM z 0,1% BSA) z dodatkom [¹²⁵I]-SP (Amersham Bioscience) (30.000 cpm/jamico) v prisotnosti naraščajoče koncentracije neoznačene SP (od 10^{-12} do 10^{-6} M) in celice inkubirali 3 ure pri 4 °C. Po končani inkubaciji in spiranju z ledeno hladnim PBS smo celice solubilizirali z uporabo solubilizacijske raztopine (0,2 M NaOH, 1 % natrijev dodecilsulfat (SDS)) in izmerili radioaktivnost s števcem žarkov γ (LKB Wallac). Dobljene rezultate smo analizirali v programu GraphPad Prism 4.0 in izračunali molarno koncentracijo neoznačenega liganda, ki povzroči 50-odstotno izpodrivanje specifično vezanega radioliganda (IC_{50}). Dobljene vrednosti smo uporabili tudi za izračun gostote površinskih receptorjev (B_{max}), ki smo jo izrazili kot fmol/100.000 celic (Ramsay in sod., 2002).

3.6.2.2 Test internalizacije receptorja

Test internalizacije smo opravili z metodo kislega spiranja (Vrecl in sod., 2004). Celice CHO K₁ in CHO 215 trajno transfecirane z NK1-R, smo 48 ur pred poskusom prenesli v plošče z 12 jamicami, prevlečene z 0,01-odstotnim poly-L-lizinom v gostoti 2×10^5 , in jim dodali kompletni hrnilni medij McCoy. Naslednji dan smo celice sprali v mediju McCoy brez dodatka seruma in celice CHO 215 NK1-R prenesli na medij McCoy, ki smo mu dodali 5 % LLS. Na dan poskusa smo celice sprali z DPBS in

kompletni medij zamenjali s puferiranim (Hepes-DMEM). Po eni uri smo celice inkubirali s [¹²⁵I]-SP (Amersham Bioscience) (30.000 cpm/jamico) 10 minut pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo plošče s celicami prenesli na led in reakcijo ustavili s spiranjem z ledeno hladnim PBS. Na jamice smo nato dodali 1 ml kisle raztopine (50 mM ocetne kisline in 150 mM NaCl, pH 2,8). Po 12 minutah smo kislo raztopino iz posameznih jamic zbrali v plastične epruvetke (5 ml) in s števcem žarkov γ (LKB Wallac) izmerili količino liganda vezanega na površinske receptorje. Celice smo nato solubilizirali z 1 ml solubilizacijske raztopine (0,2 M NaOH, 1 % SDS) in plošče za kratek čas prenesli na stresalnik. Solubilizacijsko raztopino smo nato zbrali v plastičnih epruvetkah in s števcem žarkov γ izmerili količino internaliziranega liganda. Količino nespecifično vezanega liganda smo določili v jamicah, kamor smo poleg radioaktivno označene SP dodali še neoznačeno SP v končni koncentraciji 1 μ M. Dobljene rezultate smo analizirali v programu GraphPad Prism in izračunali odstotek internaliziranega liganda.

Test internalizacije smo po isti metodi opravljali tudi pri celicah HEK 293 in celicah MEF z izbitima genoma za β -arestin 1 in 2, prehodno transfeciranih z NK1-R in pretretiranih s citohalazinom D (2 μ M, 1 h, 37 °C).

3.7 METODE ZA UGOTAVLJANJE AKTIVACIJE DRUGOTNEGA SPOROČILNEGA SISTEMA

3.7.1 Merjenje skupnega inozitol fosfata (IP)

Funkcionalne lastnosti NK1-R pri trajnih celičnih linijah CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R in pri celicah HEK 293, prehodno transfeciranih z NK1-R, ter funkcionalne lastnosti konstitutivno aktivnih mutant podenot α heterotrimernega G-proteina ($G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L), $G\alpha_s$ (Q227L)) smo izmerili s testom za merjenje skupnega inozitol fosfata. Sekundarna sporočevalca inozitol 1, 4, 5-fosfat (IP₃) in diacilglicerol (DAG) sta oba produkta hidrolize fosfatidil inozitol fosfata, ki nastaja pri aktivaciji sporočilne poti, ki poteka preko heterotrimernega proteina $G\alpha_{q/11}$. Uporabljena metoda merjenja skupnega inozitol fosfata temelji na

principih afinitetne kromatografije kovinskih kelatov, imobiliziranih na trdnih nosilcih (immobilized metal ion affinity chromatography — IMAC) (Liu in sod., 2003).

Dan po opravljeni transfekciji (prehodne celične linije) smo celice prenesli na ploščo s 96 jamicami, prevlečenimi z 0,01-odstotnim poly-L-lizinom v gostoti 3×10^4 /jamico, in jih 24 ur inkubirali v 100 µl kompletnega medija, ki smo mu dodali 1 µCi [³H]-mioinozitola. Celice smo nato dvakrat sprali s fiziološko raztopino po Hanksu (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)) in jih nato inkubirali 45 minut pri 37 °C v 100 µl raztopine po Hanksu z dodatkom 10 mM LiCl in v prisotnosti naraščajoče koncentracije SP (od 10^{-12} do 10^{-6} M). Po spodbuditvi celic z agonistom smo plošče prenesli na led in nastali IP ekstrahirali z dodatkom 10 mM metanojske (mravljične) kisline (50 µl/jamico). Količino nastalega radioaktivnega [³H]-inozitol fosfata, vezanega na nosilcih (angl. polylysine coated yttrium silicate SPA beads), smo izmerili na TopCount čitalcu za mikrotitrski plošče (TopCount microplate reader (Packard BioScience)). Meritve so bile opravljene v triplikatih. Dobljene rezultate smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism, s katerim smo iz sigmoidne krivulje, ki je odvisna od doze, izračunali tudi srednjo učinkovito koncentracijo (EC_{50} ; nM ± SEM). Poskusi so bili opravljeni v laboratoriju 7TM Pharma A/S (Danska) v okviru slovensko-danskega bilateralnega projekta.

3.7.2 Merjenje inozitol 1-fosfata (IP_1)

Koncentracijo inozitol 1-fosfata (IP_1) v celicah HEK 293, trajno transfeiranih z NK1-R in pEYFP-aktinom (HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%) smo merili s komercialno dostopnim kompletom IP-One ELISA (Cisbio Bioassays, Bagnols-sur-Cèze Cedex, France). Komplet temelji na imunološkem principu kompetitivne vezave med IP_1 iz vzorca in IP_1 -HRP konjugatom, vezanim na monoklonalna protitelesa proti IP, imobilizirana na ploščah ELISA. Dobljene vrednosti IP_1 so zato podane kot odstotek znižanja signala v primerjavi s kontrolo.

Trajno celično linijo HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% smo prenesli na ploščo s 24 jamicami, prevlečenimi z 0,01-odstotnim poly-L-lizinom v gostoti 1×10^5 in celice 24 ur inkubirali v 1 ml kompletnega medija. Na dan poskusa smo celice dvakrat sprali z DPBS in jih nato inkubirali 1 uro pri 37 °C v pufru z dodatkom 10 mM LiCl. Po

končani inkubaciji smo celice tretirali s SP (1 µM, 10 min pri 37 °C). Po končanem tretiranju smo celice lizirali in supernatant prenesli na plošče ELISA, priložene v kompletu. V nadaljevanju smo reakcijo na ploščah ELISA razvili po navodilih proizvajalca. Absorbanco smo izmerili z MTP-čitalcem Rosys Anthos Reader 2010 (Anthos Labtec Instruments) pri 450 nm. Poskus je bil izveden v treh ponovitvah. Dobljene vrednosti smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism.

3.7.3 Merjenje cikličnega adenozin monofosfata (cAMP)

Ciklični adenozin monofosfat (cAMP) je sekundarni sporočevalec, katerega delovanje ureja encim adenilat-ciklaza (AC). Receptorji, ki delujejo prek proteina $G\alpha_s$, aktivirajo delovanje adenilat-ciklaze in zvišujejo koncentracijo cAMP v celicah, nasprotno pa aktivacija receptorjev, ki delujejo prek proteina $G\alpha_i$, prepreči delovanje encima adenilat-ciklaza in tako vodi do znižanja koncentracije cAMP v celici.

Koncentracijo cAMP v celicah HEK 293 prehodno transfeciranih z receptorjem β_2 AR ali konstitutivno aktivno obliko $G\alpha_s$ (Q227L), smo merili s komercialno dostopnim testom cAMP Alpha Screen™ (Perkin Elmer) po predhodno opisanem postopku (Vrecl in sod., 2006) in pri delu upoštevali navodila proizvajalca (www.perkinelmer.com). Uporabljena metoda merjenja cAMP temelji na imunološkem principu kompetitivne vezave med cAMP, iz vzorca in biotinilirano sondjo cAMP vezano na protitelesa proti cAMP, ki je imobilizirana na nosilcih plošče. Poskusi so bili opravljeni v laboratoriju 7TM Pharma A/S (Danska) v okviru slovensko-danskega bilateralnega projekta. Dobljene rezultate smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism, s katerim smo iz sigmoidne krivulje, ki je odvisna od doze, izračunali tudi srednjo učinkovito koncentracijo (EC_{50} ; nM \pm SE).

3.7.4 Merjenje koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+}

Koncentracijo znotrajceličnega Ca^{2+} v celicah CHO K₁ in CHO 215, prehodno transfeciranih z NK1-R, smo izmerili s komercialno dostopnim kalcij testom FLIPR® (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, Ca.) po predhodno opisanem postopku (Heding in sod., 2002), (Kubale in sod., 2007). Uporabljena metoda merjenja

koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+} temelji na principu merjenja intenzitete nastalega fluorescenčnega signala (po aktivaciji receptorja) s fluorometričnim čitalcem (angl. fluorometric imaging plate reader — FLIPR). Komplet vsebuje tudi dušilec fluorescence ozadja, ki nastane kot posledica nespecifične zunajcelične fluorescence ali kot posledica fluorescence sestavin hraničnih medijev.

Meritve so bile opravljene z merilcem NOVOstar Microplate Reader (BMG LabTech, Offenburg, Nemčija) v laboratoriju 7TM Pharma A/S (Danska). Dobljene rezultate smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism, s katerim smo z grafično metodo prilagajanja izračunali tudi srednjo učinkovito koncentracijo (EC_{50} ; $\text{nM} \pm \text{SEM}$).

3.8 OBRATNA TRANSKRIPCIJA IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (RT-PCR) TER VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (Q-PCR)

Metoda obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je postopek, ki je sestavljen iz obratnega prepisovanja, ki mu sledi verižna reakcija s polimerazo (PCR). Kot začetni material pri verižni reakciji smo uporabljali RNA pri čemer je postopek v prvem koraku sestavljen iz obratnega, reverznega prepisovanja, v katerem encim reverzna transkriptaza v navzočnosti ustreznega poli-T začetnega oligonukleotida najprej prepiše molekulo mRNA v komplementarno DNA (cDNA). Kvantitativno vrednost cDNA smo nato določili z metodo PCR v realnem času (angl. quantitative real time PCR — Q-PCR). Metoda Q-PCR v kombinaciji z metodo RT-PCR je trenutno najbolj občutljiva metoda za določanje prisotnosti mRNA v bioloških vzorcih. Njena občutljivost je tako visoka, da z njo lahko določamo prisotnost mRNA tudi v samo eni celici. Metoda temelji na uporabi zaviralcev fluorescence in sond, označenih s fluorofori, in ob hkratnem pomnoževanju DNA pri metodi Q-PCR poteka tudi analiza pomnoženih delov. Za analizo vedno pripravimo različne razredčine vzorca in koncentracijo mRNA nato izračunamo iz umeritvene krivulje, pri čemer moramo za natančno določanje izražanja posameznega gena preračunane vrednost normalizirati tako, da jih delimo z vrednostjo hišnega gena. Pri poskusih smo kot hišni gen uporabljali ribosomalni (r) 18S RNA (ABI PRISM TaqMan[®] Pre-developed Assay Reagent Ribosomal RNA control PN 4310893E).

Z metodo Q-PCR smo določali prisotnost mRNA za kaveolin-1 (WT Cav1) v celicah CHO K₁ in CHO 215 ter β-aktin in pEYFP-aktin v celicah HEK 293, trajno transfeciranih s HANK1-R in pEYFP-aktinom (HEK-NK1-R+pEYFP-aktin in HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%). Celokupno RNA smo iz celic HEK 293, CHO K₁ in CHO 215 izolirali s komercialno dosegljivim kitom Qiagen SV Total RNA Isolation System (Promega) in pri delu upoštevali navodila proizvajalca. Koncentracijo izolirane RNA smo izračunali tako, da smo odčitano vrednost OD pri 260 nm pomnožili s faktorjem razredčitve in vrednostjo 40 (40 µg RNA/ml ima OD₂₆₀ = 1). Iz 10 µg celokupne RNA smo nato s pomočjo poli-T začetnih oligonukleotidov in kompleta High-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) izdelali cDNA.

V naslednjem koraku smo pripravili 4 razredčine cDNA (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000) in pripravili 20 µl reakcijske mešanice za reakcijo Q-PCR. Za določanje β-aktina smo uporabili TaqMan® Gene Expression Assays (Hs99999903_m1; Applied Biosystems). Začetni oligonukleotidi in fluorescenčne sonde za Cav1 in pEYFP-aktin (6-FAM dye-labeled minor groove binder (vezalec malega žleba — MGB) probes) so bili izdelani po naročilu (Assay-by-Design Service).

Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov:

1. **WT Cav1** 5-GAAGATGTGATTGCAGAACCAAGAAG-3 (smerni začetni oligonukleotid)
2. 5-CACAGTGAAGGTGGTGAAGCT-3 (protismerni začetni oligonukleotid)
3. 5-CACACAGTTTGACGGCATT-3 (sonda)
1. **pEYFP-actin** 5-GAGCGCACCATCTTCTTCAAG (smerni začetni oligonukleotid)
2. 5-TGTCGCCCTCGAACTTCAC (protismerni začetni oligonukleotid)
3. 5-ACGACGGCAACTACA (sonda)

Za endogeno kontrolo smo določili izražanje hišnega gena (r) 18S RNA (ABI PRISM TaqMan® Pre-developed Assay Reagent Ribosomal RNA control PN 4310893E). V reakcijsko mešanico smo poleg DNA, oligonukleotidov in sond dodali še TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in analizo opravili po navodilih proizvajalca na sekvenatorju AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Po reakciji je računalniški program določil tisti ciklus reakcije PCR, pri katerem se intenzivnost flourescence loči od ozadja, tj. prazni cikel (angl. threshold cycle — Ct).

Kvantitativne vrednosti cDNA smo nato izračunali z uporabo komparativne Ct-metode (ΔCt) (User Bulletin No.2, Applied Biosystems).

3.9 ANALIZA CELIC S KONFOKALNIM MIKROSKOPOM

Optična mikroskopija visoke ločljivosti, imenovana tudi konfokalna mikroskopija, je neinvazivna metoda mikroskopije, ki pri avtofluorescenci ali z uporabo različnih fluorescenčnih označevalcev omogoča vizualizacijo živih ali fiskiranih celic in tkiv, omogoča pa nam tudi spremljanje različnih metaboličnih procesov v celicah. Vir svetlobe pri konfokalnem mikroskopu je laser. Pomembno je, da uporabimo vir svetlobe, ki lahko vzburi fluorescenčni označevalcev, s katerim je vzorec označen (Frangež in Zabavnik - Piano, 1999). S konfokalnim mikroskopom ne osvetljujemo celotnega preparata hkrati ampak ga z laserskim žarkom po točkah pregledujemo v določeni optični ravnini. Spodbujeno fluorescenčno svetlobo iz posameznih točk nato sprejme detektor, ki informacijo računalniško pretvori v sliko.

Prednost konfokalne mikroskopije pred klasično svetlobno mikroskopijo je poleg izboljšane resolucije (horizontalna resolucija ~0,2 mikrometra, vertikalna resolucija ~0,5 mikrometra) tudi opazovanje več sto mikrometrov debelih preparatov, ki jih laserji lahko slikamo z zelo visoko ločljivostjo v obliki serije različno debelih optičnih rezin, ki jih na koncu lahko sestavimo skupaj in opazujemo celice ali celične organele tudi v tridimenzionalni obliki.

Analizo celic smo opravili z multispektralnim laserskim konfokalnim mikroskopom (Leica TCS NT, Heidelberg, Nemčija). Sočasno detekcijo različnih celičnih struktur (aktinski filmamenti, receptorji, β -arestini in jedra), označenih z različnimi avtofluorescenčnimi in fluorescenčnimi označevalci, smo dosegli z uporabo argonskega laserja z ekscitacijsko linijo 488 nm in helij/neonskega laserja z ekscitacijskimi linijami 543 nm in 633 nm. Za ekscitacijo pEYFP-aktina, z GFP označenih NK1-R, β -arr 1 in 2 ter Cav1, smo uporabili argonski laser z ekscitacijsko linijo 488 nm, za detekcijo z rodamin faloidinom označenih aktinskih filamentov in imunofluorescenčno označenih receptorjev smo uporabljali helij/neonski laser z ekscitacijsko linijo 543 nm in za detekcijo jeder, označenih s TO-PRO.3 jodidom, isti

laser, toda z ekscitacijo 633 nm. Za prikaz slik smo uporabili program Adobe Photoshop 7.0.

3.9.1 Prikaz avtofluorescenčno označenih aktinskih filamentov

Celice, pri katerih smo opazovali spremembe v prerazporeditvi avtofluorescenčno označenih aktinskih filamentov, smo prehodno transfecirali, kot je opisano v poglavju 3.5.1.2. Razporeditev s pEYFP označenih aktinskih filamentov smo spremljali v celicah HEK 293, prehodno ali trajno transfeciranih z NK1-R (HEK 293 NK1+pEYFP-aktin 60 % trajna celična linija), β_2 -AR ali z različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami heterotrimernih G-proteinov — $G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L) in $G\alpha_s$ (Q227L). Po končani transfekciji smo celice sprali z DPBS, tripsinizirali in prenesli na stekelca, očiščena s 70-odstotnim etanolom in prevlečena z 0,01-odstotnim poli-L-lizinom. Stekelca smo položili v petrijevke premera 60 mm in celice prelili s 5 ml kompletnega medija.

48 ur po transfekciji smo medij zamenjali s puferiranim DMEM (Hepes-DMEM) (kontrolne celice, celice transfecirane z različnimi mutantami heterotrimernega G-proteina) ali s puferiranim DMEM z dodatkom SP (1 μ M, 10 min) (celice, transfecirane z NK1-R), isoproterenolom (10 μ M, 10 min) (celice, transfecirane z β_2 -AR) ali karvedilolom (10 μ M, 10 min) (celice, transfecirane z β_2 -AR). Po končanem tretiranju smo celice sprali z DPBS in jih fiksirali 20 min v 4-odstotni raztopini paraformaldehida v 0,01 M PBS (pH 7,2—7,4) pri 4 °C. Po končani fiksaciji smo celice trikrat sprali z DPBS in permeabilizirali celično membrano z 20-minutno inkubacijo v 0,01-odstotni raztopini tritona X-100 (Sigma) v PBS. Po končani permeabilizaciji in trikratnem spiranju smo pri celicah, kotransfeciranih z receptorjem, imunocitokemično prikazali receptor, kot je opisano v poglavju 3.9.3. Pri drugih celicah, ki niso prehodno izražale receptorja je po končani permeabilizaciji in trikratnem spiranju sledilo barvanje jeder s TO-PRO-3-jodidom (2 μ l/ml) (Molecular Probes) 1 uro pri sobni temperaturi v zatemnjenu prostoru. Po končani inkubaciji smo celice temeljito sprali s PBS (3-krat, 10 min). Na predmetnico smo nato nanesli kapljico reagenta proti zbleditvi (ProLong® Gold reagent (Molecular Probes)) in pokrovno stekelce s celicami obrnili navzdol, položili na predmetno stekelce, pritrtili z

lakom za nohte in hrаниli v temnem prostoru pri 4 °C. Tako pripravljene preparate smo nato uporabili za opazovanje avtofluorescenčno označenih aktinskih filamentov s konfokalnim mikroskopom.

3.9.2 Prikaz aktinskih filamentov, označenih z rodamin faloidinom

Razporeditev aktinskih filamentov, označenih z rodamin faloidinom, smo opazovali pri celicah HEK 293, celicah CHO K₁ in CHO 215 ter trajnih celičnih linijah CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R, ki so prehodno soizražale (poleg receptorja) različne, označene z GFP (GFP²/β-arr1, GFP²/β-arr2, Cav1-GFP²). Prerazporeditev aktinskih filamentov, označenih z rodamin faloidinom, ter morebitno prekrivanje s pEYFP označenim aktinom smo opazovali tudi pri trajni celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%.

Celice smo gojili pri standardnih pogojih na pokrovnih stekelcih, očiščenih s 70-odstotnim etanolom, prevlečenih z 0,01-odstotnim poli-L-lizinom v petrijevkah premera 60 mm. Po 48 urah smo odstranili kompletni DMEM in celice 2 uri inkubirali v puferiranem DMEM (Sigma) pri 37 °C. Nato smo medij zamenjali s puferiranim DMEM (Hepes-DMEM) (kontrolne celice) ali s puferiranim DMEM z dodatkom SP (1 μM, 30 s ali 10 min), citohalazina D (1 μM, 1 uro), ali jasplakinolida (100 nM, 2 uri), ali kombinacijo citohalazina D (1 μM), ali jasplakinolida (100 nM, 2 uri) in SP (1 μM, 30s ali 10 min). Pri kombiniranem tretiranju s citohalazinom D in SP smo citohalazin D dodali 1 uro pred 30-sekundnim ali 10-minutnim tretiranjem s SP. Po končanem tretiranju smo celice sprali z DPBS in jih fiksirali 10 min v 4-odstotni raztopini paraformaldehida v 0,01 M PBS (pH 7,2—7,4) pri 4 °C. Po fiksaciji smo celice sprali 3-krat po 5 min z 0,01 M PBS, permeabilizirali celično membrano z raztopino 0,01-odstotnega tritona X-100 (Sigma) v PBS, celice ponovno sprali in blokirali nespecifično barvanje ozadja z 20—30-minutno inkubacijo v 1-odstotni raztopini BSA v 0,01 M PBS. Celice smo nato 30 min inkubirali v 1-odstotni raztopini BSA z dodatkom rodamin faloidina (5 μl/200 μl) in TO-PRO-3-jodida (2 μl/ml) pri sobni temperaturi v zatemnjjenem prostoru. Celice, pretretirane z jasplakinolidom, smo zaradi kompetitivne vezave med jasplakinolidom in faloidinom za ista vezna mesta na aktinskih filamentih (Bubb in sod., 1994) inkubirali v prisotnosti 2-krat višje

koncentracije rodamin faloidina kot druge celice tj. 10 µl/200 µl. Po končani inkubaciji smo celice temeljito sprali s PBS (4-krat, 5 min). Na predmetnico smo nato nanesli kapljico reagenta proti zbleditvi (ProLong® Gold reagent (Molecular Probes)) in pokrovno stekelce s celicami obrnili navzdol, položili na predmetno stekelce, pritrdirili z lakom za nohte in hranili v temnem prostoru pri 4 °C. Tako pripravljene preparate smo nato uporabili za opazovanje aktinskih filamentov, obarvanih z rodamin faloidinom, s konfokalnim mikroskopom.

3.9.3 Imunocitokemični prikaz receptorja

Celice, pri katerih smo opazovali prerazporeditev NK1-R ali β_2 -AR, smo po končanem tretiranju, fiksaciji in permeabilizaciji membrane 30 minut inkubirali v 5-odstotni raztopini BSA v PBS. Po 30-minutnem blokiranju nespecifičnega barvanja ozadja z BSA smo celice 2 uri pri sobni temperaturi ali čez noč (pri 4 °C) inkubirali s primarnimi podganjimi protitelesi proti HA (Roche) v razredčitvi 1 : 25. Po končani inkubaciji smo celice 3-krat temeljito sprali v PBS-u na stresalniku. V nadaljevanju smo jih 1 uro inkubirali s sekundarnimi kozjimi protipodganjimi protitelesi, označenimi s TRITC (Sigma), v razredčitvi 1 : 50 in TO-PRO-3-jodidom (2 µl/ml) (Molecular Probes) pri sobni temperaturi v zatemnjenem prostoru. Po končani inkubaciji smo celice temeljito sprali s PBS (3-krat, 10 min). Na predmetnico smo nato nanesli kapljico reagenta proti zbleditvi (ProLong® Gold reagent (Molecular Probes)) in pokrovno stekelce s celicami obrnili navzdol, položili na predmetno stekelce, pritrdirili z lakom za nohte in hranili v temnem prostoru pri 4 °C. Tako pripravljene preparate smo nato uporabili za opazovanje fluorescenčno označenega receptorja s konfokalnim mikroskopom.

3.10 MERJENJE AKTIVACIJE PROTEINA RhoA

Proteini Rho so družina majhnih gvanozin trifosfat (GTP) vezavnih proteinov, ki v celici sodelujejo pri prenosu sporočila prek številnih efektorskih proteinov. V citoplazmi so v dveh oblikah, v obliki GTP ali aktivni obliki in obliki GDP ali neaktivni obliki. Na efektorske proteine se vežejo v svoji aktivni ali obliki GTP (Takai in sod.,

1995). Obstaja več načinov za merjenje koncentracije nastalega proteina RhoA po aktivaciji GPCR-jev, osnova opisanih metod je vezava aktivne oblike proteina RhoA (RhoA-GTP) na agarozne nosilce, na katerih je področje za vezavo aktivne oblike RhoA ti. področje za vezavo Rho-GTP (angl. Rho-GTP binding domain — RBD). Količino aktivne oblike RhoA, vezanega na nosilce, lahko nato izmerimo z radioaktivno oznako ali s kolorimetričnimi metodami, ki delujejo na podlagi metode ELISA. Za merjenje aktivacije proteina RhoA pri našem delu smo uporabili komercialno dosegljivi komplet G-LISA™ RhoA Activation Biochem Kit™ (Cytoskeleton), ki deluje na podlagi metode ELISA, in pri delu upoštevali navodila proizvajalca (<http://www.cytoskeleton.com>).

Aktivacijo proteina RhoA smo ugotavljali pri celicah, ki smo jih 48 ur pred poskusom transfecirali z različnimi konstitutivno aktivnimi oblikami heterotrimernega proteina G ($G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L), $G\alpha_s$ (Q227L) in $G\alpha_q$ DN (Q209L/D277N)) skupaj z NK1-R ali β_2 -AR. Celice smo transfecirali po postopku, opisanem v poglavju 3.5.1.2, in jih gojili v puferiranem mediju DMEM z 0,5 % FCS. Po 24 urah smo medij z 0,5 % FCS zamenjali s puferiranim DMEM brez dodatka seruma. Na dan poskusa smo celice sprali in jim dodali puferirani DMEM (kontrolne celice in celice, ki izražajo različne konstitutivno aktivne oblike heterotrimernega proteina G), puferirani DMEM z dodatkom citohalazina D (1 μ M, 1 ura) (pozitivna kontrola) ali puferirani DMEM z dodatkom SP (1 μ M, 6 min) (celice, ki izražajo NK1-R), isoproterenola (10 μ M, 6 min) ali karvedilola (10 μ M, 6 min) (celice, ki izražajo β_2 -AR).

Poskusi so bili izvedeni v duplikatih in treh ponovitvah. Dobljene rezultate smo obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism.

3.11 UGOTAVLJANJE PROTEINSKO-PROTEINSKIH INTERAKCIJ

3.11.1 Metoda prenosa energije z resonanco bioluminiscence (BRET)

Do pred kratkim je bila večina proteinsko-proteinskih interakcij v celicah ugotovljena z metodo koimunoprecipitacije, z dvohibridnim sistemom kvasovke in metodo fluorescenčnega prenosa energije z resonanco (angl. fluorescence resonance

energy transfer — FRET). V zadnjem času pa je v rabi metoda, ki temelji na prenosu energije od luminiscentnega donorja na fluorescenčni akceptor s prenosom energije z bioluminiscenco (BRET). Z metodo BRET proučujemo medsebojne interakcije dveh specifično označenih domnevnih proteinskih partnerjev. Za bioluminiscenco oznako nam rabi *Renilla lucifera*za (RLuc), za fluorescentno pa EYFP ali mutantna oblika zeleno fluorescirajočega proteina GFP². Z dodatkom ustreznega substrata za RLuc (koelentrazin) zaradi interakcij med označenima proteinoma nastane pojav BRET, s pogojem, da sta RLuc in EYFP na primerni medsebojni razdalji in primerno orientirana. Luminiscenca nastane zaradi katalitične razgradnje substrata z luciferazo, ki omogoči ekscitacijo EYFP-ja in posledično fluorescenco. Emisijski spekter RLuc je modre barve in ima vrh pri 480 nm, ekscitacijski vrh EYFP-ja pa je pri 488 nm. Metoda BRET je bila pred kratkim z željo po boljšem ločevanju specifičnega signala od ozadja izboljšana z razvojem druge generacije tehnologije BRET, ti. metode BRET². Pri metodi BRET² se kot donorska oznaka še vedno uporablja RLuc, kot akceptorska oznaka pa se namesto EYFP-ja uporablja GFP². Namesto koelentrazina pa se kot substrat uporablja njegov derivat DeepBlueC z značilnimi spekralnimi lastnostmi, saj v procesu oksidacije z RLuc nastane svetloba bistveno krajše valovne dolžine (vrh pri 395 nm) v primerjavi z metodo BRET. GFP² ima prilagojen ekscitacijski spekter za to valovno dolžino (ekscitacija pri 395 nm), kar ob predpostavki, da sta fuzijska konstrukta na GFP² in RLuc na maksimalni razdalji 100 Å, omogoča dobro spektrofotometrično ločevanje emisije donorja (395 nm) in akceptorja (~410 nm) in tako zmanjša problem ozadja ter s tem poveča občutljivost metode.

Z metodo BRET² smo proučevali interakcije GPCR in aktin ter GPCR in β-arestin 1 ali 2 ob uporabi različnih agonistov. Meritve smo opravljali na Kemijskem inštitutu v sodelovanju z dr. Mojco Benčina na čitalcu Mithras LB 940 plate reader (Berthold Technologies) po predhodno opisani metodi (Vrecl in sod., 2004). Pri delu smo uporabljali receptorske konstrukte, označene z RLuc (NK1-R/RLuc in β₂-AR/RLuc), ter EYFP-aktin in β-arestin 1 in 2 in mutanto β-arestina 2, označene z GFP² (GFP²/β-arr1, GFP²/β-arr2 in GFP²/β-arr2/(R393E; R395E)). Uporabljali pa smo tudi β-arestin 2 in mutanto β-arestina 2, ki imata na N-končni del vezano luminiscentno oznako (RLuc) in na C-končni del fluorescenčno mutanto GFP-ja (GFP²) (RLuc/β-arr2/GFP²

in RLuc/β-arr2/(R393E; R395E)/GFP²), pri katerem smo z metodo intramolekularni BRET spremljali morebitne konformacijske spremembe β-arestina 2 po aktivaciji receptorja z agonistom (Charest in sod., 2005). Celice smo gojili v 100 mm ploščah in jih transfecirali z označenimi konstrukti po že opisanem postopku. 48 ur po transfekciji smo celice odlepili od podlage s tripsinom in jih prenesli na ploščo s 96 jamicami (white 96 well OptiPlate) (Perkin Elmer) v gostoti $2 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ DPBS, obogatenega s piruvatom in glukozo (Gibco). Celice smo nato tretirali z agonistom in na jamice dodali substrat Coelentrazin 400A (Perkin Elmer) do končne koncentracije 5 μM. Signal smo izmerili sekvenčno na dveh valovnih dolžinah 400 nm in 515 nm, izračunali razmerje 515/400 ter vrednosti preračunali v enote miliBRET (mBU) (BRET $\times 1000$).

3.12 SPINSKO OZNAČEVANJE IN MERITVE Z ELEKTRONSKO PARAMAGNETNO RESONANCO (EPR)

Z elektronsko paramagnetno resonančno spektroskopijo (EPR) smo ugotavljali urejenosti celične membrane, prerazporejanje receptorja v urejena območja membrane ter vpliv izražanja receptorja na domensko strukturo plazmamembrane pri celicah CHO K₁ in CHO 215. Plazmamembrano celic smo označili z lipofilnim spinškim označevalcem metil ester 5-doksil palmitat (MeFASL (10,3)).

Meritve EPR smo opravljali po že opisanem postopku (Koklic in sod., 2005), (Kubale in sod., 2007). V stekleno epruveto smo dodali ustrezno količino ($25 \mu\text{l}$) 10^{-4} M etanolne raztopine spinskega označevalca MeFASL (10,3). Etanol smo odparili na rotacijskem izparjevalniku, tako da se je spinski označevalci enakomerno porazdelili po stenah epruvete. CHO K₁ in CHO 215 in CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R celice, trajno transfecirane z NK1-R, smo 48 ur pred poskusom prenesli v 25 cm^2 stekleničke (TPP) v gostoti $1,5 \times 10^6$ celic/steklenico in jim dodali kompletni hranilni medij McCoy ter jih inkubirali pri standardnih pogojih. Naslednji dan smo celice sprali v mediju McCoy brez dodatka seruma in celice CHO 215 in CHO 215 NK1-R prenesli na medij McCoy, ki smo mu dodali 5 % LLS. Po 24 urah smo celice s tripsinom odlepili od podlage in jih prenesli v 15 ml epruveto. Celice smo centrifugirali 2 min pri 1000 vrt./min. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice resuspendirali v 3 ml

medija McCoy brez seruma. Nato smo jih prenesli v stekleno epruveto s spinskim označevalcem; epruveto smo v rokah stresali 10 min in nato celice ponovno centrifugirali 2 min pri 1000 vrt./min. Supernatant smo odstranili in vzorec posrkali v kvarčno kapilaro z notranjim premerom 1 mm. Meritve smo izvajali na X-band EPR spektrometru Bruker ESP 300 pri 20 °C, mikrovalovni frekvenci 9,59 GHz, jakosti 20 mW, modulacijski frekvenci 100 kHz in amplitudi 0.2 mT. Merjenje smo izvajali v sodelovanju s prof. Marjeto Šentjurc (EPR center, Laboratorij za biofiziko; Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija). Za izračun in optimizacijo EPR-spektrov smo uporabili programski paket EPERSIM verzija 4.9 (© Janez Štrancar, 1996–2004). Računalniški program EPERSIM pri optimizaciji EPR spektrov upošteva 5 spektralnih parametrov: ureditveni parameter (S), parameter ϕ , rotacijski korelačijski čas (τ_c), širino črte (W) in korekcijski faktor polarnosti (p_A), ki skupaj določajo obliko EPR-spektra. Vsak spekter je sestavljen iz več spektralnih komponent, ki so posledica različnega gibanja spinskega označevalca v različnem okolju membrane. Vsaka spektralna komponenta predstavlja vrsto domen z določeno ureditvijo in dinamiko ter je opisana z različnim nizom petih spektralnih parametrov (Garvas, 2007). V nadaljevanju smo različne rezultate računalniške simulacije spektrov EPR s kondenzacijsko metodo GHOST združili v skupino rešitev, pri čemer je vsaka rešitev predstavljala obliko gibanja spinskega označevalca v membrani (Koklic in sod., 2005). Z diagrami GHOST smo prikazali ureditveni parameter posameznih domen (S) v odvisnosti od korelačijskega časa (τ_c) ter dobili informacije o: številu domen (domena 1, domena 2 in domena 3), deležu posamezne domene (d), urejenosti znotraj domene (S) ter rotacijski korelačijski čas (τ_c).

3.13 STATISTIČNE ANALIZE

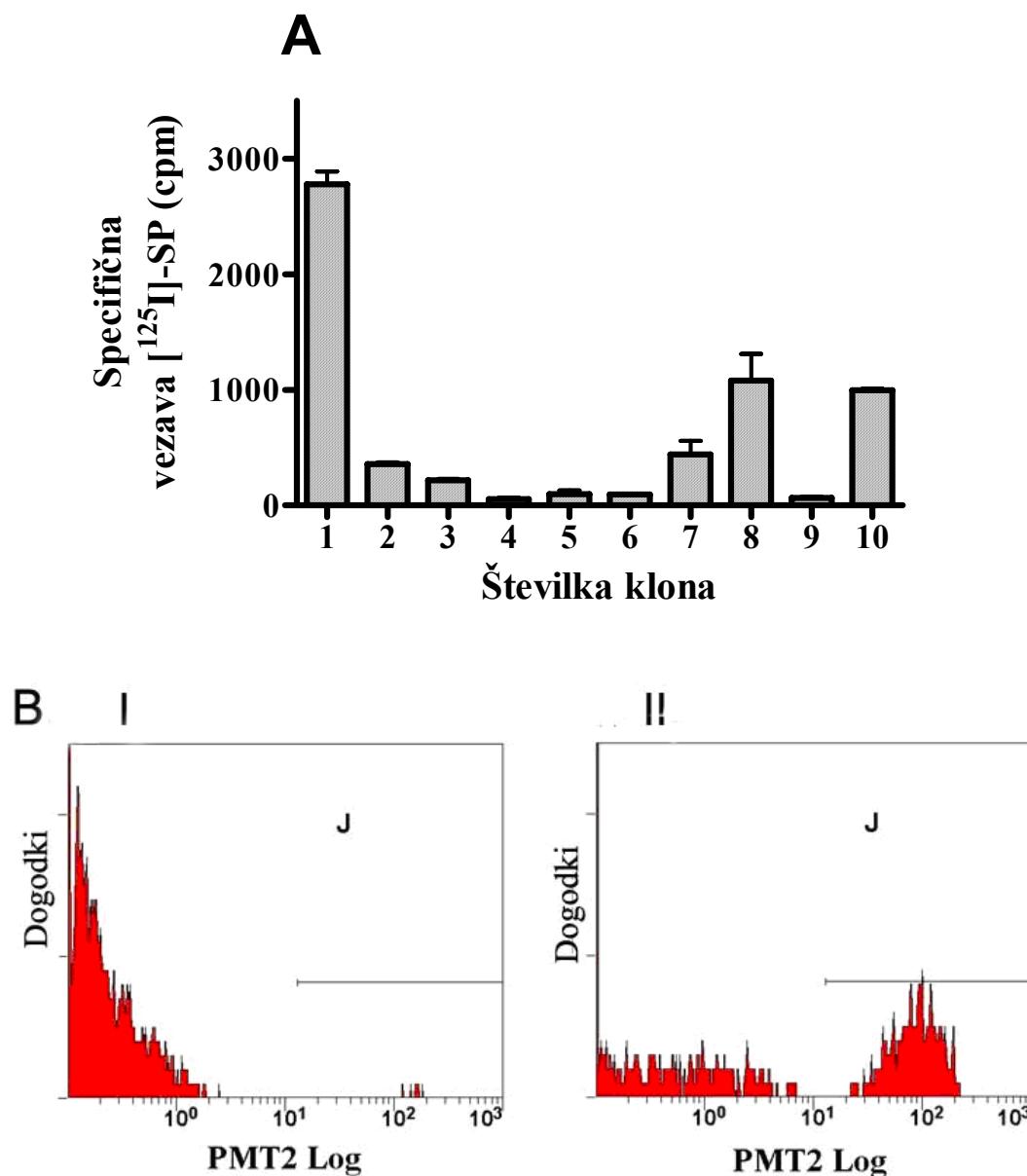
Dobljene rezultate smo analizirali z računalniškim programom GraphPad Prism. Statistične razlike med posameznimi rezultati smo določili s Student t -testom. Razlike med vrednostmi smo ocenili za značilne in jih označili z * pri $p < 0,05$ in z ** pri $p < 0,01$.

4 REZULTATI

4.1 SELEKCIJA TRAJNIH CELIČNIH LINIJ

4.1.1 Potek selekcije trajne celične linije

Celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin in HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% trajno transfecirani s HANK1-R in pEYFP-aktinom, smo pridobili v postopku selekcije trajne celične linije z uporabo geneticina. Z diskami za kloniranje smo osamili večje število klonov in jimi s testom vezave radioaktivno označenega liganda izmerili raven površinsko izraženega NK1-R. Med desetimi kloni so samo štirje izražali znatno količino površinsko izraženega NK1-R, od katerih je bila ta najvišja pri klonu številka 1, ki smo jo poimenovali HEK-NK1-R+pEYFP-aktin (graf 1A). Po opravljeni začetni selekciji s klonalnimi diskami smo celično linijo HEK-NK1-R+pEYFP-aktin analizirali s pretočnim citometrom, s katerim ugotavljamo delež celic, ki izražajo fluorescenčno označeni aktin β . Pri trajni celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin smo ugotovili, da samo 0,1 % celic izraža fluorescenčno označeni aktin β . Te celice smo s pretočnim citometrom še dodatno odsortirali in tako dobili celično linijo, kjer je $\sim 60\%$ celic izražalo fluorescenčno označeni aktin β , celično linijo smo zato poimenovali HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% (graf 1B).

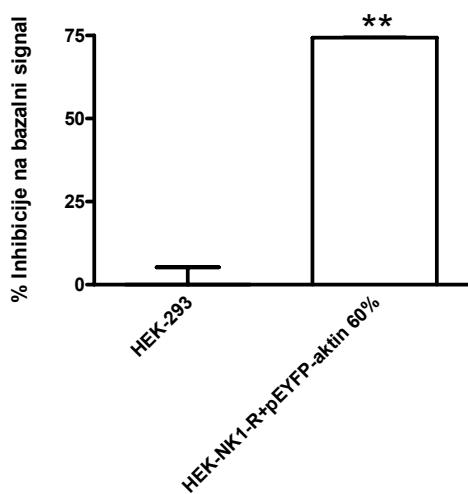


Graf 1: Raven izražanja NK1-R in pEYFP-aktina v trajnih celičnih linijah.

(A) S testom vezave radioaktivno označenega liganda smo določili raven površinsko izraženega NK1-R v posameznih klonih. (B) Izmerjena raven pEYFP-aktina s pretočnim citometrom: (I) pri celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin po opravljeni selekciji z diskami za kloniranje, (II) pri celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% po sortirjanju s pretočnim citometrom.

4.1.2 Lastnosti trajne celične linije

Lastnosti trajne celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% po sortiranju s pretočnim citometrom smo določali s testom samoizpodrivanja z radioaktivno označenim ligandom, farmakološke lastnosti NK1-R pa smo ugotavljali z merjenjem nastalega inozitol 1-fosfata (IP_1) po aktivaciji receptorja s SP (1 μ M, 10 min, 37 °C). S testom samoizpodrivanja smo izračunali, da je koncentracija SP, ki je povzročila 50-odstotno izpodrivanje specifično vezane [125 I]- SP (IC_{50}) pri trajni celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-actin 60% $0,88 \pm 0,17$ nM. Dobljene vrednosti smo uporabili tudi za izračun gostote površinskih receptorjev (B_{max}), ki je bila $\sim 12,1$ fmol/100.000, kar ustreza ~ 75.000 receptorjev/celico. Po spodbuditvi NK1-R s SP je bilo opaženo značilno znižanje (~ 71 -odstotno) začetnega signala IP_1 v primerjavi s kontrolo ($p < 0,01$, $n = 9$) (graf 2). Dobljena raven površinsko izraženega NK1-R je tako zadostna saj presega želeno raven 10.000 receptorjev/celico (Ostrom in Insel, 2004), ohranjena pa je tudi aktivacija drugotne sporočilne poti po vezavi liganda na receptor.



Graf 2: Izmerjena koncentracija nastalega inozitol 1-fosfata (IP_1).

Pri celicah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% smo izmerili koncentracijo nastalega IP_1 . Odstotek inhibicije glede na bazalni signal predstavlja srednjo vrednost s standardno deviacijo (SD) treh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec so bile opravljene tri ponovitve. **Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 9$.

4.1.3 Raven izražanja mRNA za skupni in pEYFP-aktin v celicah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin in HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%

S kvantitativnim RT-PCR smo izmerili raven izražanja mRNA za skupni aktin β , (endogeni aktin β in označeni pEYFP-aktin) in pEYFP-aktin pri celičnih linijah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin in HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%. Raven izražanja mRNA za skupni aktin β je bila pri celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 10,7-krat in pri celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% 1,9-krat višja kot pri kontrolnih celicah HEK 293; kar je statistično značilno pri $p < 0,01$ in $n = 6$. Primerjava ravni izražanja med skupnim aktinom β in pEYFP-aktinom pa je pokazala, da je bila raven izražanja skupnega aktina β pri celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 19-krat višja, pri celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% pa 6,5-krat višja kot raven izražanja pEYFP-aktina (tabela 3); pri obeh celičnih linijah je raven izražanja značilno višja kot pri kontroli pri $p < 0,01$ in $n = 6$. Dobljeni rezultati kažejo, da pri celicah pred selekcijo s pretočnim citometrom avtofluorescenčno označeni aktin β (pEYFP-aktin) predstavlja 5-odstotni, pri celični liniji po selekciji s pretočnim citometrom pa 15-odstotni delež skupnega aktina β in tako ne presega dovoljenega 30-odstotnega deleža celokupnega aktina v celici (Ludin in Matus, 1998).

Tabela 3: Raven izražanja mRNA za skupni aktin β in aktin pEYFP.

Raven izražanja mRNA za skupni aktin β in aktin pEYFP pri celičnih linijah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin in HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako (SE) treh neodvisnih poskusov, za vsak vzorec sta bili opravljeni dve ponovitvi ($n = 6$).

Celična linija	ΔCt (skupni aktin β - 18s)	$2^{-\Delta Ct}$	ΔCt (pEYFP-aktin – 18s)	$2^{-\Delta Ct}$
HEK 293	11,72 ± 0,03	1	-	-
HEK-NK1-R+pEYFP-aktin	8,28 ± 0,09	10,7** ^a	12,53 ± 0,06	19,02** ^b
HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%	10,76 ± 0,17	1,9** ^a	13,47 ± 0,08	6,54** ^b

18s = ribosomalna (r) 18S RNA (hišni gen) — endogena kontrola; Ct = pražni ciklus PCR-reakcije, pri katerem se intenzivnost flourescence loči od ozadja (threshold cycle, Ct); ΔCt = Ct (ciljni gen) – Ct (18s); $2^{-\Delta Ct}$ = relativne spremembe v izražanju genov med posameznimi celičnimi linijami

^a = primerjava ravni izražanja mRNA za skupni aktin β glede na kontrolne celice HEK 293

^b = primerjava ravni izražanja mRNA za skupni aktin β glede na pEYFP-aktin

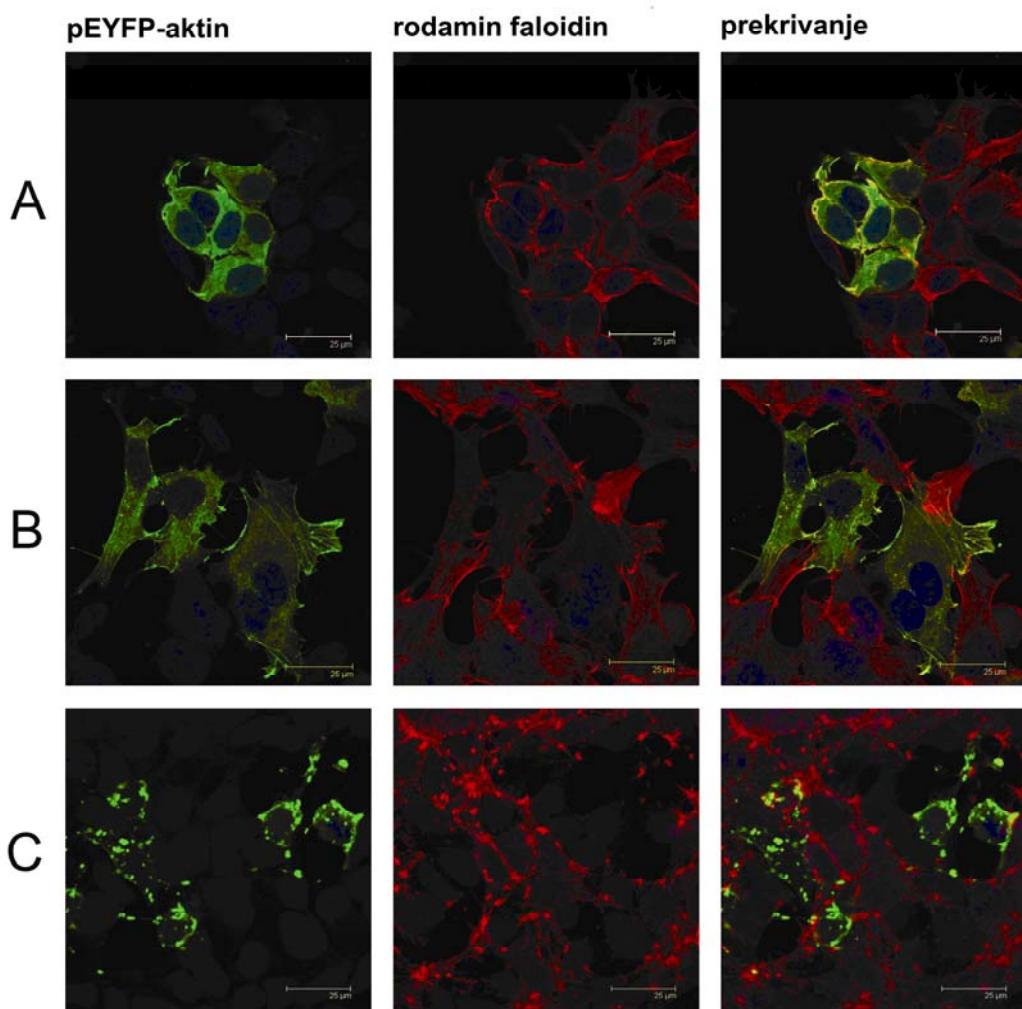
4.1.4 Funkcionalne lastnosti pEYFP-aktina

Funkcionalne lastnosti pEYFP-aktina pri trajni celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% smo ocenjevali na ravni konfokalne mikroskopije. Pri celicah smo spremljali prerazporeditev in kolokalizacijo med pEYFP-aktinom in aktinski filamenti, označenimi z rodamin faloidinom, pred spodbuditvijo receptorja s SP in po njej, spremljali pa smo tudi vpliv farmakološkega agensa jasplakinolida. Ta naj bi v celicah preprečil nastanek in prerazporeditev aktinskih filamentov ter vodil do povezovanja monomernega aktina v aktinske skupke in večje amorfne mase aktina, ki se neenakomerno razporedijo po citoplazmi celice (Bubb in sod., 1994). Pri celicah smo želeli proučiti njegov vpliv na endogeni (z rodamin faloidinom označeni) in pEYFP-aktin.

Pri netretiranih celicah smo opazili, da je pEYFP-aktin (zeleni signal) razporen po citoplazmi v obliki krajših F-aktinskih nitk, večji del zelenega signala pa je razporen vzdolž celične membrane. Podoben vzorec prerazporeditve smo opazili tudi pri aktinu, označenem z rodamin faloidinom (rdeči signal). Dobro je vidna tudi kolokalizacija med zelenim in rdečim signalom na površini celic (slika 16A). Po aktivaciji receptorja s SP smo pri celicah opazili predvsem ojačanje kortikalnega signala in nastanek stresnih filamentov, ki se raztezajo vzdolž citoplazme (slika 16B). Podobno prerazporeditev smo opazili tudi pri aktinskih filamentih, obarvanih z rodamin faloidinom (rdeči signal). Med pEYFP-aktinom (zeleni signal) in aktinski filamenti, označenimi z rodamin faloidinom (rdeči signal), je vidna tudi kolokalizacija. Poleg prerazporeditve aktinskih filamentov je pri tretiranih celicah v primerjavi z netretiranimi opaženo tudi povečanje njihove površine. V nadaljevanju smo želeli preveriti tudi vpliv farmakološkega agensa jasplakinolida na prerazporeditev pEYFP-aktina. Po 1-urnem tretiranju celic z jasplakinolidom smo tako opazili popolno odsotnost F-aktinskih struktur, tj. stresnih filamentov, krajših F-aktinskih nitk, namesto teh smo pri celicah opazili večje pEYFP-pozitivne aktinske skupke (zeleni signal), ki so bili razporejeni predvsem vzdolž celične membrane ali nenakomerno po citoplazmi, nekaj manjših skupkov smo opazili tudi v bližini jeder. Podobno prerazporeditev in nastanek skupkov smo opazili tudi pri endogenem aktinu,

prikazanem z rodamin faloidinom, ponekod smo opazili tudi kolokalizacijo med zelenim in rdečim signalom (slika 16C).

Z dobljenimi rezultati smo potrdili funkcionalnost pEYFP-aktina, saj je ta kolokaliziral z endogenim aktinom, označenim z rodamin faloidinom, tako pri netretiranih celicah kakor po tretiranju celic z agonistom in po uporabi farmakološkega agensa jasplakinolida.

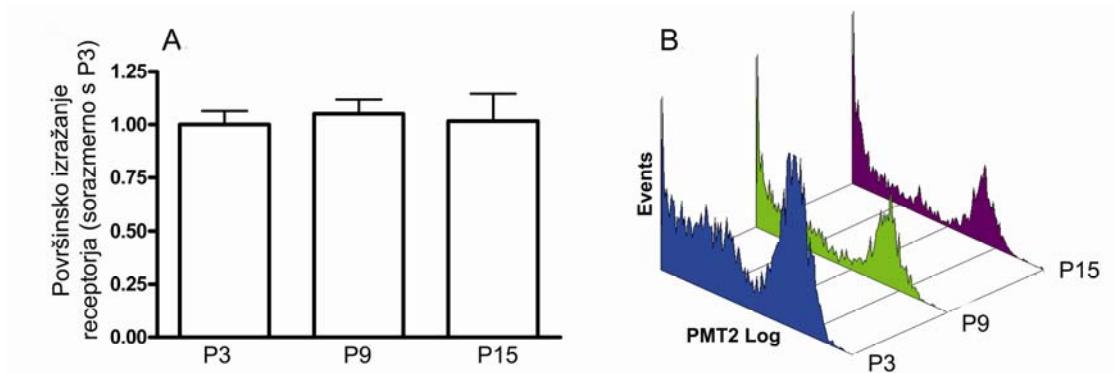


Slika 16: Celična prerezporeditev in kolokalizacija med pEYFP-aktinom in aktinskimi filamenti, označenimi z rodamin faloidinom, pri trajni celični liniji HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%.

Prikazana je prerezporeditev pEYFP-aktina in aktina, označenega z rodamin faloidinom, pri celicah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%. Prerezporeditev smo opazovali pri (A) netretiranih celicah in (B) celicah tretiranih s SP (1 μ M, 10 min, 37 °C), ter (C) celicah, tretiranih z jasplakinolidom (100 nM, 2 h, 37 °C). Za prikaz jeder smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Zeleni signal* pEYFP-aktin; *rdeči signal* rodamin faloidin; *rumeni/oranžni signal* mesta kolokalizacije med pEYFP-aktinom in aktinom, označenim z rodamin faloidinom; *modri signal* jedra.

4.1.5 Stabilnost trajne celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%

Stabilnost trajne celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% smo ugotavljali pri treh pasažah tj. pasaži 3 (P3), 9 (P9) in 15 (P15). Spremljali smo raven izražanja NK1-R, pEYFP-aktina in razmerje med skupnim aktinom β in pEYFP-aktinom. S testom ELISA smo ugotovili, da je raven izražanja NK1-R ostala nespremenjena pri vseh treh pasažah, tj. P3, P9 in P15 (graf 3A). Rezultati merjenja ravni fluorescence s pretočnim citometrom so pokazali, da se je raven izražanja pEYFP-aktina od pasaže 3 do pasaže 9 znižala za ~45 %, od pasaže 9 do pasaže 15 pa za ~6 % (graf 3B). Raven izražanja mRNA za skupni aktin β je bila pri P3 značilno višja (1,9-krat) kot pri kontrolnih celicah HEK 293 ($p < 0,01$, $n = 6$). Pri P9 in P15 pa je bila raven izražanja mRNA za skupni aktin β primerljiva z ravnjo v celicah HEK 293. Primerjava ravni izražanja med skupnim aktinom β in pEYFP-aktinom pa je pokazala, da je bila raven izražanja skupnega aktina β pri P3, P9 in P15 značilno 6,5-, 7,2- in 8-krat višja kot raven izražanja pEYFP-aktina ($p < 0,01$, $n = 6$). Dobljeni rezultati tako kažejo, da označeni aktin β (pEYFP-aktin) pri P3, P9 in P15 celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% predstavlja 15-, 13- in 12,5-odstotni delež celokupnega aktina β (tabela 4), kar kaže na padec v ravni izražanja označenega aktina β v zgodnjih pasažah (do P9), v kasnejših pasažah (od P9 do P15) pa le-ta ostaja dokaj konstantna.



Graf 3: Površinsko izražanje NK1-R in izmerjena raven fluorescence pEYFP-aktina.

Pri celicah HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% smo pri pasažah 3, 9 in 15 (P3, P9 in P15) določili: (A) površinsko izražanje NK1-R s testom ELISA. Površinsko izražanje receptorja predstavlja srednjo vrednost s SD treh neodvisnih poskusov, za vsak vzorec so bile opravljene štiri ponovitve ($n = 12$). (B) S pretočnim citometrom izmerjena raven izražanja fluorescentno označenega aktina β .

Tabela 4: Raven izražanja mRNA za skupni aktin β in pEYFP aktin pri različnih pasažah.

Raven izražanja mRNA za skupni aktin β in pEYFP aktin pri različnih pasažah celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako (SE) treh neodvisnih poskusov, za vsak vzorec sta bili opravljeni dve ponovitvi ($n = 6$).

Celična linija	ΔCt (skupni β -aktin – 18s)	$2^{-\Delta Ct}$	ΔCt (pEYFP- aktin – 18s)	$2^{-\Delta Ct}$
HEK 293	$11,72 \pm 0,03$	1	-	-
HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% P3	$10,76 \pm 0,17$	$1,94 \pm 0,24^{**a}$	$13,47 \pm 0,08$	$6,54 \pm 0,35^{**b}$
HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% P9	$11,67 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,05^{**a}$	$14,51 \pm 0,05$	$7,16 \pm 0,25^{**b}$
HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% P15	$11,57 \pm 0,13$	$1,11 \pm 0,10^{**a}$	$14,57 \pm 0,06$	$8,00 \pm 0,33^{**b}$

18s = ribosomalna (r) 18S RNA (hišni gen) — endogena kontrola; Ct = prazni ciklus PCR-reakcije pri katerem se intenzivnost flourescence loči od ozadja (threshold cycle, Ct); ΔCt = Ct (ciljni gen) – Ct (18s); $2^{-\Delta Ct}$ = relativne spremembe v izražanju genov med posameznimi celičnimi linijami

a = primerjava ravni izražanja mRNA za skupni aktin β glede na kontrolne celice HEK 293

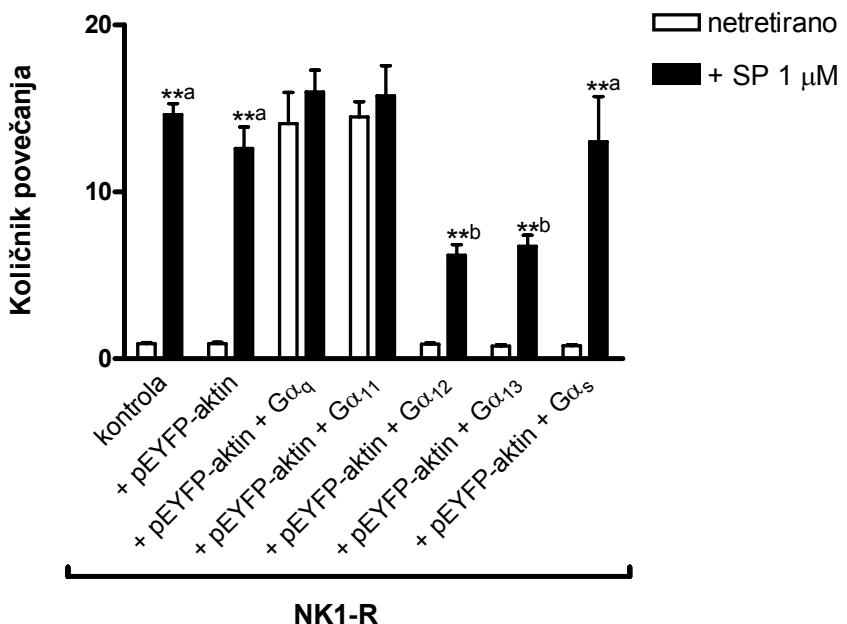
b = primerjava ravni izražanja mRNA za skupni aktin β glede na pEYFP-aktin

4.2 PRERAZPOREDITEV AKTINSKIH FILAMENTOV V CELICAH

4.2.1 Farmakološke lastnosti NK1-R, β_2 -AR in konstitutivno aktivnih oblik heterotrimernih G-proteinov

Farmakološke lastnosti NK1-R, β_2 -AR in konstitutivno aktivnih oblik podenot α heterotrimernih G-proteinov ($G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L), $G\alpha_s$ (Q227L)) v celicah HEK 293 smo preverili s testi aktivacije drugotnega sporočilnega sistema (merjenje koncentracije skupnega IP in cAMP). Aktivacija NK1-R s SP (1 μ M, 45 min, 37 °C) je vodila do značilnega povišanja koncentracije skupnega IP v primerjavi s kontrolo (celice, transfecirane s praznim vektorjem pcDNA3) ($p < 0,01$, $n = 6$). Pred aktivacijo NK1-R je bila koncentracija skupnega IP povišana v celicah, prehodno transfeciranih s konstitutivno aktivnimi oblikami heterotrimernega proteina $G\alpha_q$ in $G\alpha_{11}$. Konstitutivno aktivne oblike $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ in $G\alpha_s$ niso vplivale na bazalno raven skupnega IP v celicah. Aktivacija NK1-R s SP (1 μ M, 45 min, 37 °C) pri celicah, kottransfeciranih z $G\alpha_q$ in $G\alpha_{11}$, ni povzročila dodatnega značilnega povišanja koncentracije skupnega IP v celicah. V celicah, kottransfeciranih z NK1-R in $G\alpha_{12}$ ali $G\alpha_{13}$, pa je aktivacija NK1-R s SP (1 μ M, 45 min, 37 °C) vodila do značilnega povišanja koncentracije IP v primerjavi z netretiranimi celicami ($p < 0,01$, $n = 6$), vendar je bila koncentracija skupnega IP značilno nižja kot pri ostalih testiranih kottransfeciranih celicah ($p < 0,01$, $n = 6$). Kottransfekcija celic HEK 293 z $G\alpha_s$ ni vplivala na raven skupnega IP po aktivaciji NK1-R, le-ta je bila značilno višja kot pri kontroli ($p < 0,01$, $n = 6$) (graf 4). Vrednosti srednje učinkovite koncentracije (angl. effective concentration — EC₅₀) (nM) za aktivacijo PLC pri celicah HEK 293, kottransfeciranih z NK1-R in konstitutivno aktivnimi oblikami heterotrimernih G-proteinov ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_s$), so prikazane v tabeli 5.

β_2 -AR je bil karakteriziran v naši predhodni študiji (Vrecl in sod., 2006). Dobljena EC₅₀ za kopičenje cAMP, spodbujeno z isoproterenolom je $0,33 \pm 0,12$ nM. V celicah kottransfeciranih z $G\alpha_s$, aktivacija z isoproterenolom ni povzročila dodatnega zvišanja ravni cAMP.



Graf 4: Vpliv aktivacije NK1-R in konstitutivno aktivnih oblik heterotrimernega G-proteina na koncentracijo skupnega inositol fosfata (IP) v celicah.

Prikazane so srednje vrednosti s SD za izmerjene vrednosti skupnega IP pred aktivacijo NK1-R s SP in po njej (1 μ M, 45 min, 37 °C) pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih z NK1-R, pEYFP-aktinom in različnimi konstitutivno aktivnimi oblikami heterotrimernega G-proteina ($G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L), $G\alpha_s$ (Q227L)). Vrednosti so podane kot količnik povečanja skupnega IP v primerjavi s pcDNA 3.1 transfeciranimi celicami HEK 293 (kontrola). Prikazane so vrednosti treh poskusov; vsak vzorec je bil narejen v treh ponovitvah. **Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 6$. a = primerjava koncentracije skupnega IP glede na kontrolo; b = primerjava koncentracije skupnega IP glede na druge testirane kotransfecirane celice.

Tabela 5: Vrednosti EC₅₀ (nM) za aktivacijo PLC.

Vrednosti EC₅₀ (nM) za aktivacijo PLC pri celicah HEK 293, kotransfeciranih z NK1-R in konstitutivno aktivnimi oblikami heterotrimernih G-proteinov. Prikazane so srednje vrednosti s SE treh neodvisnih poskusov, za vsak vzorec sta bili opravljeni dve ponovitvi ($n = 6$).

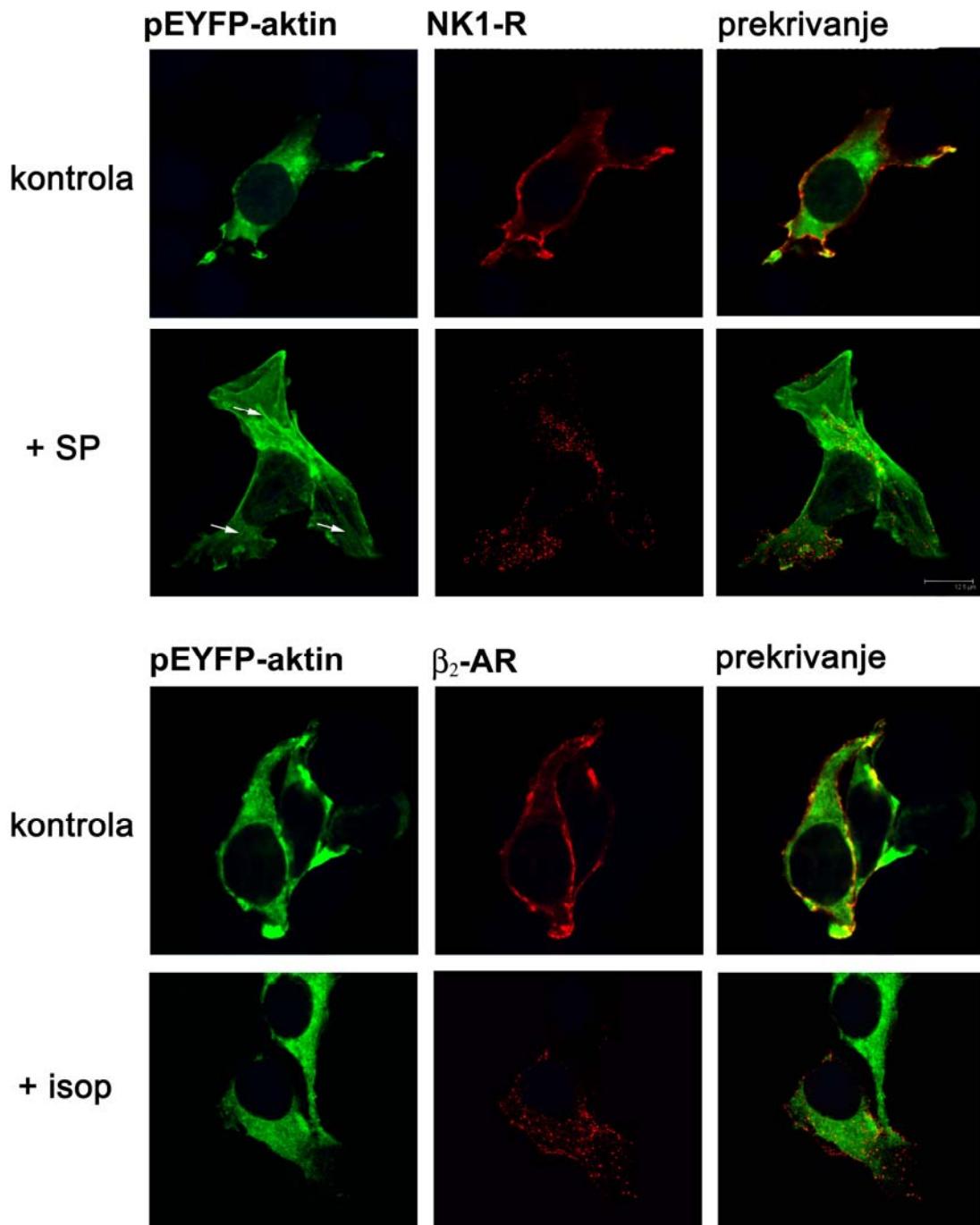
Transfekcija	EC ₅₀ (nM)
NK1-R	2,84 ± 0,82
NK1-R + pEYFP-aktin	2,82 ± 0,42
NK1-R + pEYFP-aktin + Gα _q	0,47 ± 0,23
NK1-R + pEYFP-aktin + Gα ₁₁	0,002 ± 0,00
NK1-R + pEYFP-aktin + Gα ₁₂	2,01 ± 0,19
NK1-R + pEYFP-aktin + Gα ₁₃	2,42 ± 0,23
NK1-R + pEYFP-aktin + Gα _s	2,60 ± 0,08

4.2.2 Razporeditev aktinskega citoskeleta po aktivaciji NK1-R in β_2 -AR

Vpliv aktivacije receptorja na razporeditev aktinskega citoskeleta smo opazovali s konfokalnim mikroskopom pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in NK1-R ali β_2 -AR. Pri netretiranih celicah je bil aktin (zeleni signal) razprt ščedro v citoplazmi; najverjetneje gre za G-aktin ali krajše F-aktinske nitke. Na posameznih mestih smo opazili tudi mrežo aktinskih nitk, razporejenih tik pod celično membrano. Receptor (NK1-R ali β_2 -AR) (rdeč signal) je bil razporen predvsem na membrani. Pri celicah, kotransfeciranih z NK1-R ali β_2 -AR, smo na membrani ponekod opazili prekrivanje med zelenim in rdečim signalom (oranžni signal), kar bi lahko nakazovalo kolokalizacijo med receptorjem in kortikalnim aktinom.

Aktivacija receptorja NK1-R z agonistom SP (1 μ M, 10 min, 37 °C) je povzročila preoblikovanje mreže aktinskih filamentov in nastanek stresnih filamentov, ki se raztezajo po citoplazmi. Poleg prerazporeditve aktinskega citoskeleta v citoplazmi je bil pri tretiranih celicah v primerjavi s kontrolnimi celicami bolj izražen tudi kortikalni signal. Pri tretiranih celicah je bila vidna prerazporeditev receptorja iz plazmamembrane v citoplazmo. Prekrivanja med zelenim in rdečim fluorescenčnim signalom pri tretiranih celicah nismo opazili (slika 17). V celicah, ki prehodno izražajo β_2 -AR, aktivacija receptorja z isoproterenolom (10 μ M, 10 min, 37 °C) ni povzročila vidne reorganizacije aktina, saj je bil vzorec prerazporeditve aktina podoben kot pri netretiranih celicah. Prehod β_2 -AR v citoplazmo je bil podoben kot pri NK1-R, toda v manjšem obsegu. Prekrivanja med zelenim in rdečim fluorescenčnim signalom nismo opazili (slika 17).

Opažene spremembe na ravni konfokalnega mikroskopa kažejo na to, da je spodbuditev NK1-R, ki se prednostno veže z $G\alpha_{q/11}$, vodila do sprememb v razporeditvi aktina (polimerizacija aktina in nastanek stresnih filamentov), nasprotno pa spodbuditev β_2 -AR, ki se prednostno veže z $G\alpha_s$, ni vplivala na razporeditev aktina. Spodbuditev NK1-R in β_2 -AR je v obeh primerih vodila do internalizacije receptorja.



Slika 17: Razporeditev aktinskih filamentov v celicah HEK 293 po aktivaciji receptorja.

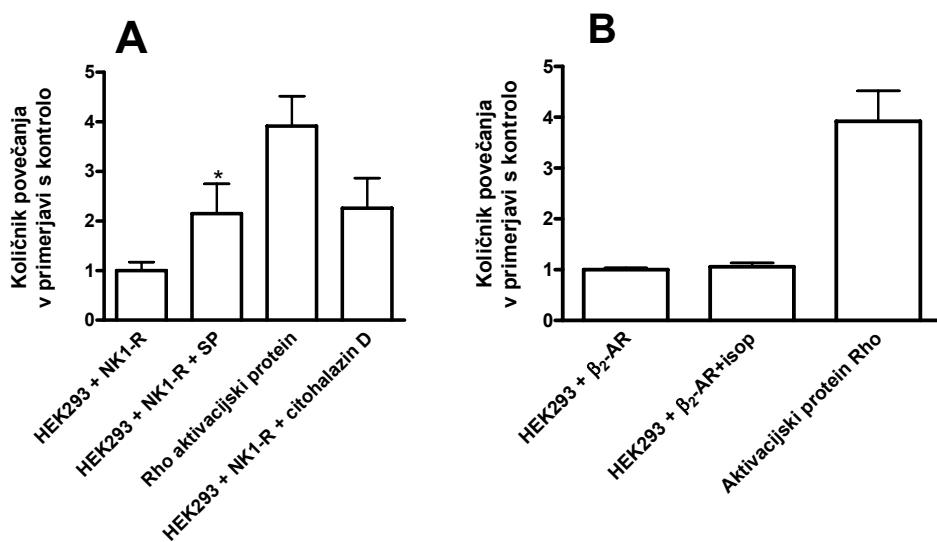
Prikazana je razporeditev autofluorescenčno označenega aktina in receptorja v celicah HEK 293, prehodno kottransfeciranih s pEYFP-aktinom in NK1-R ali β_2 -AR. Razporeditev smo opazovali pri netretiranih celicah in celicah, tretiranih s SP (NK1-R, 1 μ M, 10 min, 37 °C) ali isoproterenolom (β_2 -AR, 10 μ M, 10 min, 37 °C). Za imunocitokemični prikaz NK1-R in β_2 -AR smo uporabili primarna protitelesa proti HA in sekundarna protitelesa označena s TRITC; za prikaz jeder smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Zeleni signal* aktin; *rdeči signal* receptor; *rumeni/oranžni signal* kolokalizacija med aktinom in receptorjem; *modri signal* jedra.

4.2.3 Vpliv spodbuditve NK1-R in β_2 -AR na aktivacijo proteina RhoA

Poleg opazovanja sprememb v razporeditvi aktinskih filamentov s konfokalnim mikroskopom smo pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in NK1-R ali β_2 -AR, spremljali tudi aktivacijo proteina RhoA, ki igra posredno vlogo v razporeditvi aktina po aktivaciji GPCR-jev.

Spodbuditev NK1-R s SP (1 μ M, 6 min, 37 °C) je povzročila značilno (~2-kratno) zvišanje aktivacije proteina RhoA v primerjavi s kontrolo (graf 5A) ($p < 0,01$, $n = 6$), medtem ko spodbuditev β_2 -AR z isopoterenolom (10 μ M, 6 min, 37 °C) ni vodila do aktivacije proteina RhoA (graf 5B).

Dobljeni rezultati nakazujejo, da je razporeditev aktina po spodbuditvi NK1-R, ki se prednostno veže z $G\alpha_{q/11}$, odvisna od RhoA.

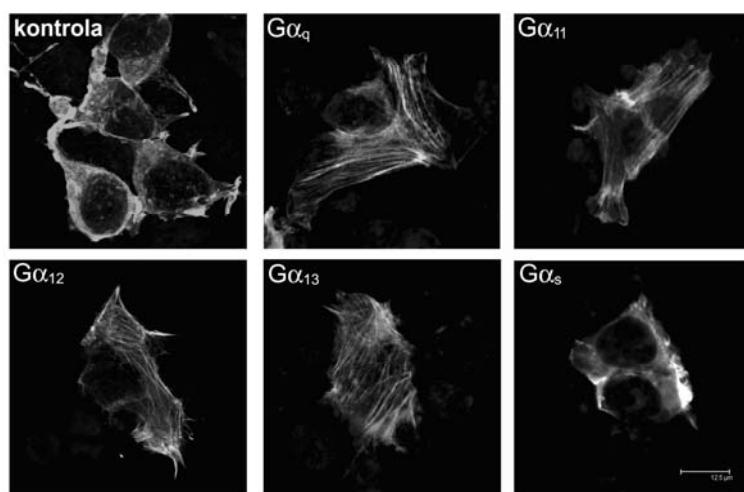


Graf 5: Vpliv stimulacije NK1 in β_2 -AR z agonistom na aktivacijo proteina RhoA v celicah HEK 293.

Prikazana je izmerjena aktivacija proteina RhoA pri celicah HEK 293 prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in (A) NK1-R ali (B) β_2 -AR, pred aktivacijo z naslednjima agonistoma in po njej: SP (NK1-R) (1 μ M, 6 min, 37 °C) ali isoproterenolom (β_2 -AR) (10 μ M, 6 min, 37 °C). Za pozitivno kontrolo smo uporabili konstitutivno aktivno obliko proteina RhoA (aktivacijski protein Rho) (1 ng/jamico) in poznani aktivator proteina RhoA in inhibitor polimerizacije aktina citohalazin D (1 μ M, 1h, 37 °C). Količnik povečanja predstavlja srednjo vrednost s SD treh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec sta bili opravljeni dve ponovitvi.*Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 6$.

4.2.4 Razporeditev aktinskega citoskeleta v celicah transfeciranih z različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α G-proteinov

Receptorsko pogojeno razporeditev aktinskih filamentov smo v nadaljevanju primerjali z razporeditvijo, posredovano z različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α G-proteinov. Razporeditev smo opazovali s konfokalnim mikroskopom pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in različnimi konstitutivno aktivnimi podenotami α G-proteinov ($G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L), $G\alpha_s$ (Q227L)). Robustno prerazporeditev fluorescenčno označenega aktinskega citoskeleta (zelen signal) v primerjavi s kontrolnimi celicami in formiranje jasno izraženih stresnih filamentov smo opazili v celicah, prehodno transfeciranih s konstitutivno aktivnimi $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$. Nasprotno pa polimerizacija aktina in tvorba stresnih filamentov nista bili opaženi v celicah, ki so prehodno izražale konstitutivno aktivno obliko $G\alpha_s$. Ojačanje kortikalnega signala, ki kaže na polimerizacijo kortikalnega aktina, je bilo vidno pri celicah, transfeciranih z vsemi testiranimi konstitutivno aktivnimi oblikami podenot α G-proteinov (slika 18).

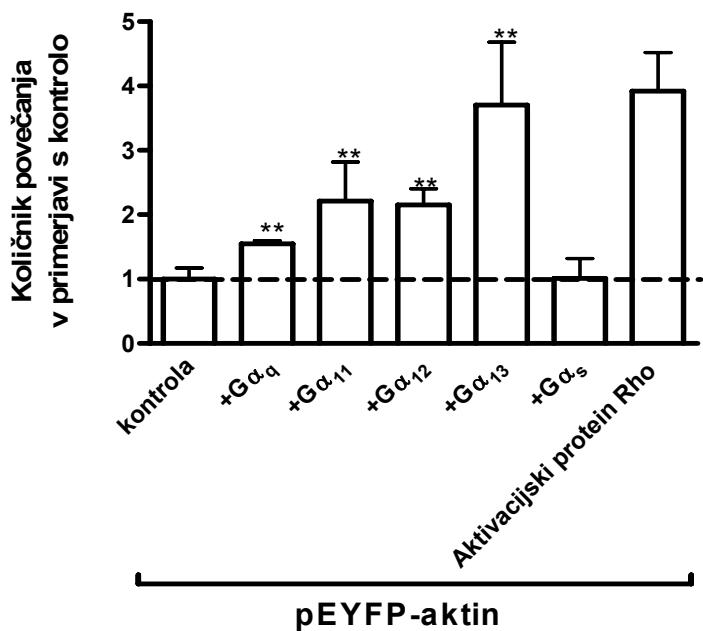


Slika 18: Razporeditev aktinskih filamentov v celicah HEK 293, transfeciranih z različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α G-proteinov.

Prikazana je razporeditev fluorescenčno označenega aktina v celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in $G\alpha_q$ (Q209L), $G\alpha_{11}$ (Q209L), $G\alpha_{12}$ (Q231L), $G\alpha_{13}$ (Q226L) ali $G\alpha_s$ (Q227L). Za prikaz jeder v ozadju smo uporabili TO-PRO-3-jodid.

4.2.5 Vpliv izražanja različnih konstitutivno aktivnih mutant podenot α G-proteinov na aktivacijo proteina RhoA

Poleg opazovanja sprememb v razporeditvi aktina smo izmerili tudi vpliv različnih konstitutivno aktivnih mutant podenot α G-proteinov na aktivacijo proteina RhoA. V ta namen smo v celicah HEK 293 prehodno izrazili pEYFP-aktin in različne konstitutivno aktivne oblike heterotrimernega G-proteina. Prehodno izražanje konstitutivno aktivnih oblik $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ je povzročilo značilno zvišanje aktivacije proteina RhoA v primerjavi s kontrolo (celice, transfecirane s praznim vektorjem pcDNA3) ($p < 0,01$, $n = 12$), vendar je bila njihova učinkovitost različna in je padala v naslednjem vrstnem redu: $G\alpha_{13} > G\alpha_{11} \geq G\alpha_{12} \geq G\alpha_q$. Prehodno izražanje $G\alpha_s$ ni vplivalo na aktivacijo proteina RhoA (graf 6). Spremembe v aktivaciji proteina RhoA se tako ujemajo s spremembami v razporeditvi aktinskega citoskeleta, ki smo jih opisali na ravni konfokalne mikroskopije in kažejo na to, da je reorganizacija aktinskega citoskeleta po prehodnem izražanju $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ odvisna od RhoA. Dobljeni rezultati nakazujejo, da $G\alpha_q$ in $G\alpha_{11}$ spodbudita od RhoA odvisno reorganizacijo aktinskega citoskeleta v celicah HEK 293.



Graf 6: Vpliv konstitutivno aktivnih mutant podenot α G-proteinov na aktivacijo proteina RhoA v celicah HEK 293.

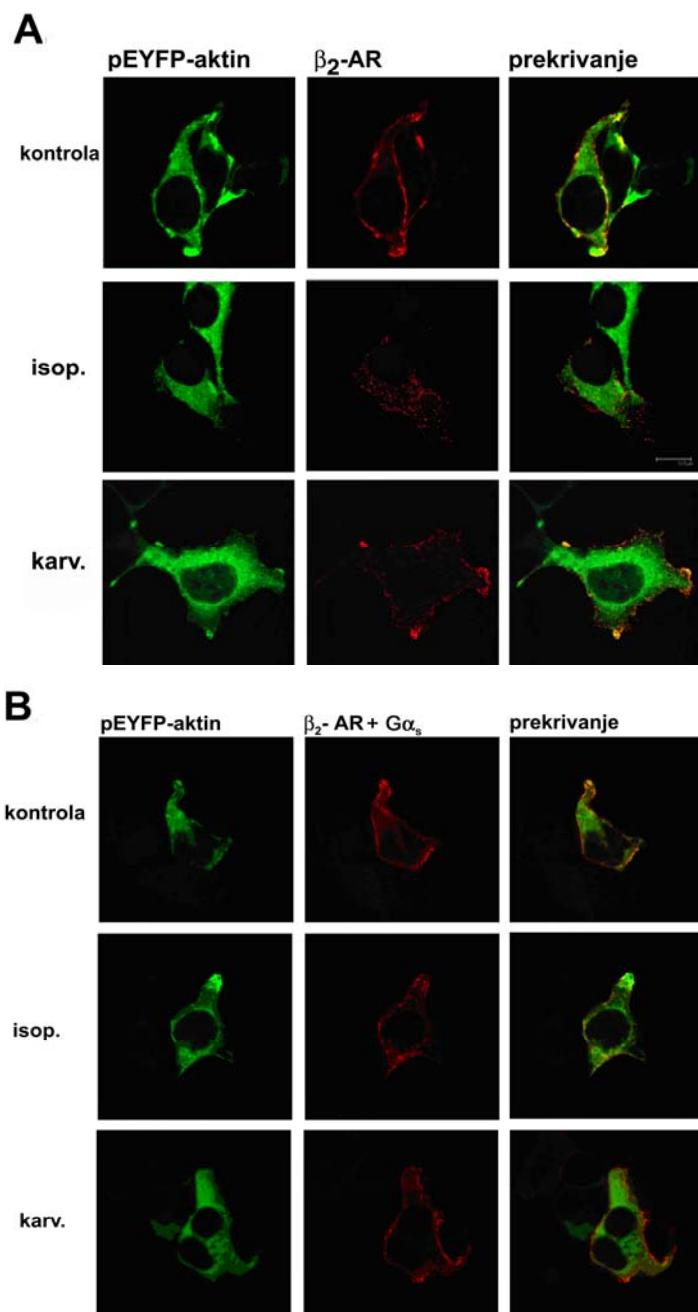
Prikazana je izmerjena aktivacija proteina RhoA pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α G-proteina $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ ali $G\alpha_s$. Za pozitivno kontrolo smo uporabili konstitutivno aktivno obliko proteina RhoA (aktivacijski protein Rho) (1 ng/jamico). Količnik povečanja predstavlja srednjo vrednost s SD treh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec so bile opravljene štiri ponovitve. **Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$; $n = 12$.

4.3 VPLIV FUNKCIONALNO SPECIFIČNEGA AGONISTA β_2 -AR NA RAZPOREDITEV AKTINSKIH FILAMENTOV

4.3.1 Razporeditev aktinskih filamentov po aktivaciji β_2 -AR s funkcionalno specifičnim agonistom

S funkcionalno specifičnim agonistom karvedilolom, ki ob vezavi na β_2 -AR aktivira MAP-kinazno pot prek c-Src in β -arestina 1 in hkrati prepreči prenos sporočila prek G_{α_s} , smo želeli ugotoviti, ali lahko vezava karvedilola na β_2 -AR privede do sprememb v razporeditvi aktinskega citoskeleta. Po aktivaciji GPCR-jev namreč lahko nastane vpliv na RhoA tudi prek c-Src, kjer posredniško vlogo med receptorjem in c-Src igrata predvsem G_{α_i} in G_{α_s} (Luttrell, 2002). Pred kratkim pa je bilo pokazano, da lahko karvedilol z vezavo na β_1 -AR povzroči transaktivacijo receptorja za EGFR (Kim in sod., 2008), ki v celicah med drugim ureja tudi delovanje različnih Rho GTP-az (Tang in Gross, 2003).

Spodbuditev receptorja s karvedilolom (10 μ M, 10 min, 37 °C) je povzročila spremembe v razporeditvi aktinskega citoskeleta; vidni so polimerizacija aktina (zeleni signal) in nastanek tankih F-aktinskih nitk, izraženih predvsem na periferiji celic, ter ojačan kortikalni signal, ponekod, na periferiji celic, opazimo tudi oblikovanje tankih citoplazemskih podaljškov (filopodijev) (slika 19A). Tvorbe izrazitih stresnih filamentov nismo opazili. Receptor (rdeči signal) je v večjem delu zadržan na membrani; ponekod smo opazili prekrivanje med rdečim in zelenim signalom, kar lahko nakazuje kolokalizacijo med β_2 -AR in pEYFP-aktinom. Opazna je tudi sprememba v površini citoplazme, ki je pri celicah, tretiranih s karvedilolom, povečana v primerjavi z netretiranimi in z isoproterenolom tretiranimi celicami. V naslednjem koraku smo preverili, ali kotransfekcija celic s konstitutivno aktivno obliko G_{α_s} , ki se direktno veže na katalitično podenoto c-Src (Ma in sod., 2000), lahko prepreči s karvedilolom spodbujene spremembe. Kotransfekcija celic s konstitutivno aktivno obliko G_{α_s} je zavrla nastanek s karvedilolom spodbujenih sprememb aktinskega citoskeleta (zeleni signal) in spremembo v površini citoplazme, medtem ko je receptor (rdeči signal) še vedno ostal zadržan na membrani. Prekrivanja med rdečim in zelenim signalom nismo opazili (slika 19B).

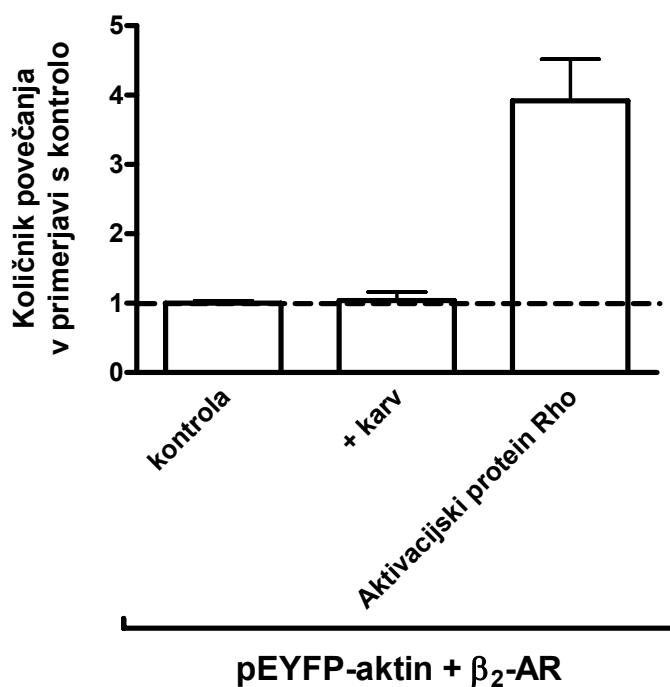


Slika 19: Razporeditev aktinskih filamentov v celicah HEK 293 po aktivaciji β_2 -AR s karvedilolom.

Prikazana je razporeditev fluorescenčno označenega aktina (zeleni signal) v celicah HEK 293, prehodno kotransfenciranih s pEYFP-aktinom in β_2 -AR (A) ter (B) β_2 -AR in konstitutivno aktivno mutanto $G\alpha_s$. Prerazporeditev smo opazovali pri celicah, tretiranih z isoproterenolom (isop.) in karvedilolom (karv.). Za imunocitokemični prikaz NK1-R in β_2 -AR smo uporabili primarna protitelesa proti HA in sekundarna protitelesa, označena s TRITC; za prikaz jeder smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Zeleni signal* aktin; *rdeči signal* receptor; *rumeni/oranžni signal* kolokalizacija med aktinom in receptorjem; *modri signal* jedra

4.3.2 Vpliv aktivacije β_2 -AR s karvedilolom na aktivacijo proteina RhoA

Vpliv spodbuditve receptorja s funkcionalno specifičnim agonistom karvedilolom na aktivacijo proteina RhoA smo izmerili v celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom in β_2 -AR. Tretiranje celic s karvedilolom ($10 \mu\text{M}$, 6 min, 37°C) ni povzročilo aktivacije proteina RhoA v primerjavi s kontrolnimi celicami (celice, transfeceirane s praznim vektorjem pcDNA3) (graf 7), kar kaže na to, da so spremembe v prerazporeditvi aktina, opažene s konfokalnim mikroskopom po spodbuditvi β_2 -AR s karvedilolom, neodvisne od RhoA.



Graf 7: Vpliv aktivacije β_2 -AR s karvedilolom na aktivacijo proteina RhoA v celicah HEK 293.

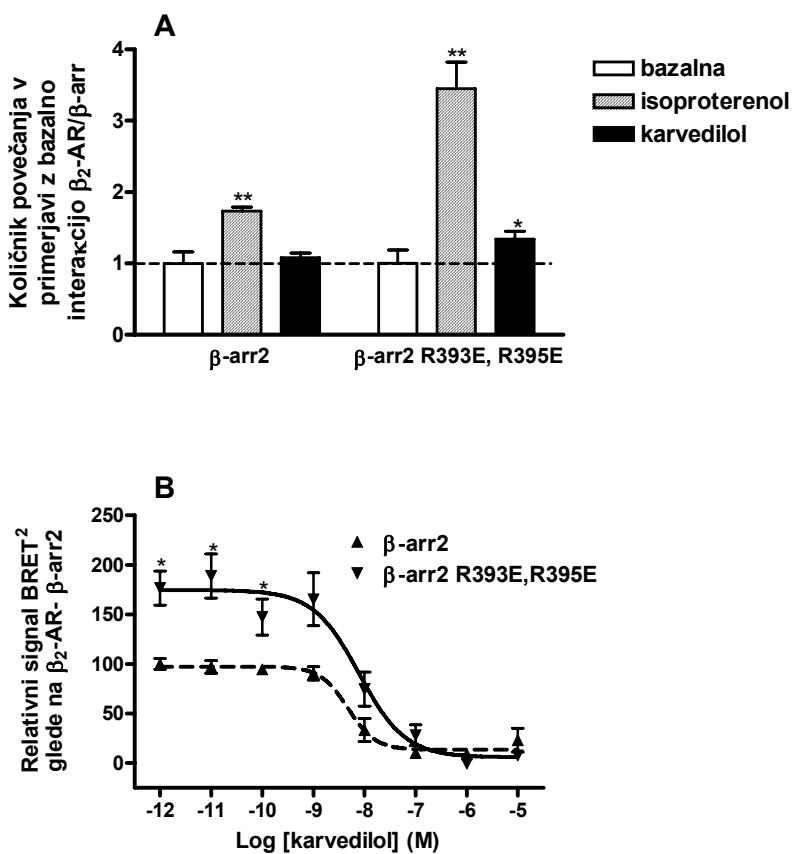
Prikazan je vpliv spodbuditve β_2 -AR s karvedilolom (karv.) na aktivacijo proteina RhoA pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih s pEYFP-aktinom, in β_2 -AR pred aktivacijo s karvedilolom in po njej ($10 \mu\text{M}$, 6 min, 37°C). Za pozitivno kontrolo smo uporabili konstitutivno aktivno obliko proteina RhoA (aktivacijski protein Rho) (1 ng/jamico). Količnik povečanja predstavlja srednjo vrednost s SD dveh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec sta bili opravljeni dve ponovitvi ($n = 6$).

4.3.3 Interakcija β_2 -AR z β -arestinom 2 po aktivaciji receptorja s karvedilolom

Značilnost funkcionalno specifičnih agonistov je, da blokirajo prenos sporočila prek G-proteina, hkrati pa aktivirajo prenos sporočila prek β -arestina (Drake in sod., 2008; Violin in Lefkowitz, 2007). Z metodo BRET² smo zato spremljali interakcijo med β_2 -AR in β -arestinom 2 ali mutanto β -arestina 2 (β -arr2 R393E, R395E) po aktivaciji receptorja s karvedilolom (10 μ M, 10 min). Celice HEK 293 smo kotransfecirali z bioluminiscentno označenim β_2 -AR (β_2 -AR/RLuc) in fluorescenčno označenim β -arestinom 2 (GFP²/ β -arr2) ali mutanto β -arestina 2 (GFP²/ β -arr2 R393E, R395E). Ob dodatku substrata DeepBlueC je v primeru, da sta bila proučevana proteina dovolj blizu, prišlo do prenosa energije od luminiscentnega donorja na fluorescenčni akceptor.

Tretiranje celic z isoproterenolom je v primerjavi z basalno interakcijo privedlo do značilnega zvišanja signala BRET² med β_2 -AR in β -arr2 R393E, R395E ($p < 0,01$, $n = 4$), ki je bil ~2-krat višji od signala BRET² med β_2 -AR in β -arestinom 2. Dobljeni rezultat se ujema tudi s podatki iz predhodne študije (Vrecl in sod., 2004). Tretiranje celic s karvedilolom ni povzročilo značilnega povečanja signala BRET² med β_2 -AR in β -arestinom 2 v primerjavi z basalno interakcijo, medtem ko je bil izmerjeni signal med β_2 -AR in β -arr2 R393E, R395E značilno višji od basalne interakcije ($p < 0,05$; $n = 4$) a vseeno značilno nižji v primerjavi z interakcijo, spodbujeno z agonistom (graf 8A) ($p < 0,01$, $n = 4$). Graf 8B prikazuje krivuljo izpodrivanja v prisotnosti naraščajoče koncentracije karvedilola. Učinkovitost karvedilola na zmanjšanje z agonistom (isoproterenol) spodbujene interakcije (IC_{50}) med β_2 -AR in β -arestinom 2 in β_2 -AR in β -arr2 R393E, R395E je znašala 4,73 in 7,86 nM.

Z metodo BRET² in mutanto β -arestina 2 (β -arr2 R393E, R395E) z okvarjenim veznim mestom za vezavo komponent klatrinskega mešička smo tako pokazali, skladno s predhodnimi študijami (Vrecl in sod., 2004), da sta izmerjeni signal BRET² in s tem stabilnost povezave med receptorjem in mutanto β -arestina 2 bistveno višja kot med receptorjem in divjo obliko β -arestina 2, ter potrdili, da spodbuditev β_2 -AR s karvedilolom vodi do interakcije med β_2 -AR in pomožnim proteinom β -arestinom 2.



Graf 8: Signal BRET² med β₂-AR in β-arestinom 2 ter β₂-AR in mutantu β-arestina 2 R393E, R395E.

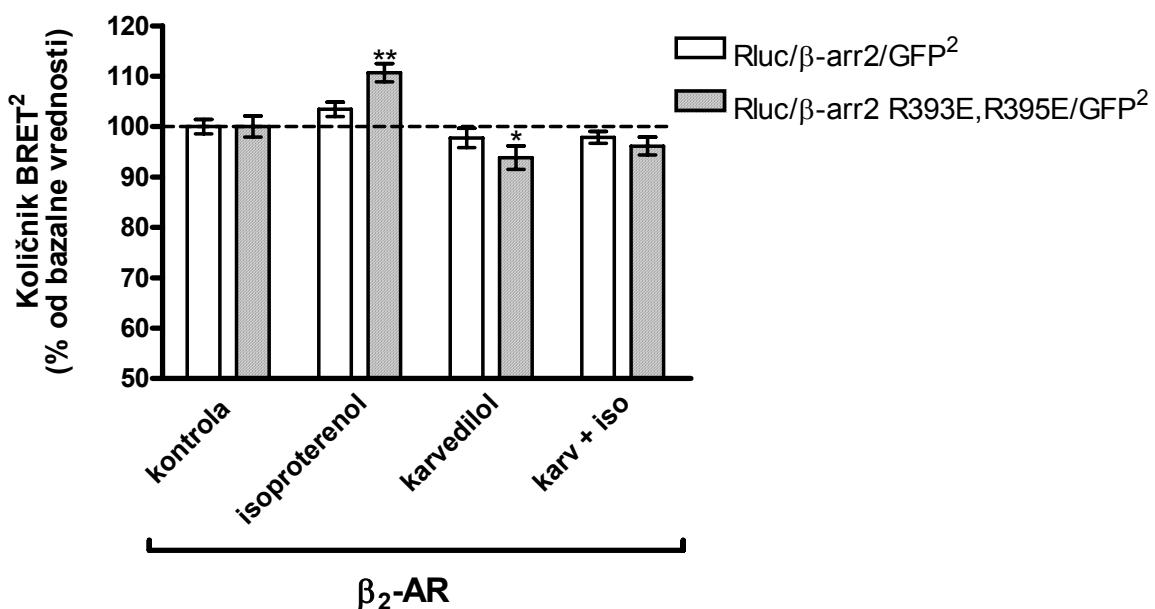
Signal BRET² smo izmerili pri celicah HEK 293, prehodno kotransfenciranih z β₂-AR/RLuc in z GFP²/β-arr2 ali GFP²/β-arr2 R393E, R395E. Prikazan je (A) količnik povečanja interakcije med β₂-AR/β-arr2 in β₂-AR/β-arr2 R393E, R395E po tretiranju celic z isoproterenolom (10 μM, 10 min) ali karvedilolom (10 μM, 10 min) in (B) vpliv karvedilola na zmanjšanje z isoproterenolom (1 μM) spodbujene interakcije med β₂-AR in β-arr2 ter β₂-AR in β-arr2 R393E, R395E po tretiranju celic z naraščajočo koncentracijo karvedilola (10^{-5} — 10^{-12} M). Prikazane so vrednosti dveh poskusov; meritve so bile opravljene v dveh ponovitvah.*Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$, $n = 4$; **Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 4$.

4.3.4 Konformacijske spremembe β -arestina 2 po aktivaciji receptorja s karvedilolom

Z metodo intramolekularni BRET² smo v nadaljevanju želeli ugotoviti, ali je konformacija β -arestina 2 po aktivaciji receptorjev z različnimi ligandi (karvedilol in isoproterenol) enaka. V ta namen smo uporabili dvojno označeni β -arestin 2 (RLuc/ β -arr2/GFP²) ali mutanto β -arestina 2 (RLuc/ β -arr2 R393E,R395E/GFP²). Dvojno označeni β -arestin 2 in mutanta β -arestina 2 imata na N-končni del vezano luminiscentno oznako (RLuc) in na C-končni del GFP². Spodbuditev receptorja z agonistom privede do sprememb v konformaciji β -arestina na način, da se obe oznaki še dodatno zbližata, kar vodi do povečanja bazalnega signala BRET² (Charest in sod., 2005). Celice HEK 293 smo prehodno kotransfecirali z β_2 -AR in RLuc/ β -arr2/GFP² ali RLuc/ β -arr2 R393E,R395E/GFP².

Bazalna vrednost signala BRET² je bila za RLuc/ β -arr2/GFP² in RLuc/ β -arr2 R393E, R395E/GFP² $236,3 \pm 5,6$ in $198,5 \pm 3,9$ mBU. Po spodbuditvi β_2 -AR z isoproterenolom je bil intramolekularni BRET² pri RLuc/ β -arr2/GFP² povišan za ~3,5 % (= ~8,5 mBU); pri RLuc/ β -arr2 R393E, R395E/GFP² pa je bil intramolekularni BRET² značilno višji (~10 % tj. ~20 mBU) kot pri kontrolnih celicah ($p < 0,01$, $n = 6$). Tretiranje celic s karvedilolom je vodilo do značilnega znižanja intramolekularnega količnika BRET² samo pri RLuc/ β -arr2 R393E,R395E/GFP² (~7 %, t.j. ~14 mBU) ($p < 0,05$, $n = 6$). Pretretiranje celic s karvedilolom je pri obeh konstruktih zavrolo z isoproterenolom pogojene konformacijske spremembe (graf 9), saj se intramolekularni BRET² ni značilno razlikoval od bazalne vrednosti.

Z metodo intramolekularni BRET² in z dvojno označeno mutanto β -arestina 2 (RLuc/ β -arr2 R393E, R395E/GFP²) smo ugotovili, da je bil po spodbuditvi receptorja s karvedilolom izmerjeni BRET² signal značilno nižji, po aktivaciji receptorja z isoproterenolom pa značilno višji od bazalnega signala. Z dobljenim rezultatom smo tako potrdili, da aktivna konformacija mutante β -arestina 2 po spodbuditvi β_2 -AR s funkcionalno specifičnim agonistom ni enaka kot po spodbuditvi receptorja z agonistom.



Graf 9: Intramolekularni količnik BRET² po aktivaciji β₂-AR.

Prikazan je intramolekularni količnik BRET² pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih z β₂-AR in z dvojno označenim β-arestinom 2 (RLuc/β-arr2/GFP²) ali mutanto β-arestina 2 (RLuc/β-arr2 R393E, R395E/GFP²). Signal BRET² je bil izmerjen pri netretiranih celicah (kontrola); celicah, tretiranih z isoproterenolom (10 μM, 10 min), celicah, tretiranih s karvedilolom (10 μM, 10 min), in celicah, tretiranih z isoproterenolom in karvedilolom. Prikazane so vrednosti dveh poskusov; meritve so bile opravljene v treh ponovitvah. *Razlika je statistično značilna pri p < 0,05, n = 6; **Razlika je statistično značilna pri p < 0,01, n = 6.

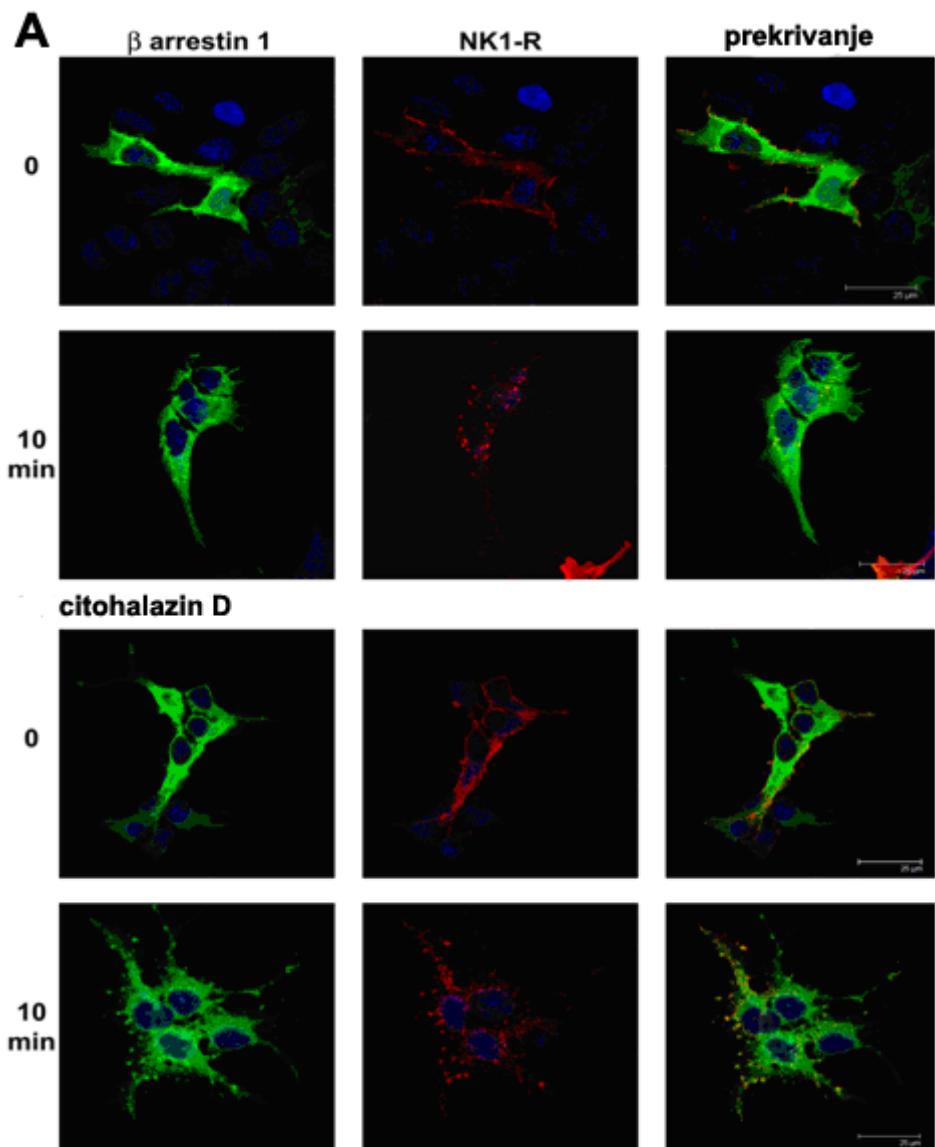
4.4 VLOGA AKTINSKEGA CITOSKELETA V RAZPOREDITVI, INTERNALIZACIJI IN RECIKLIRANJU NK1-R

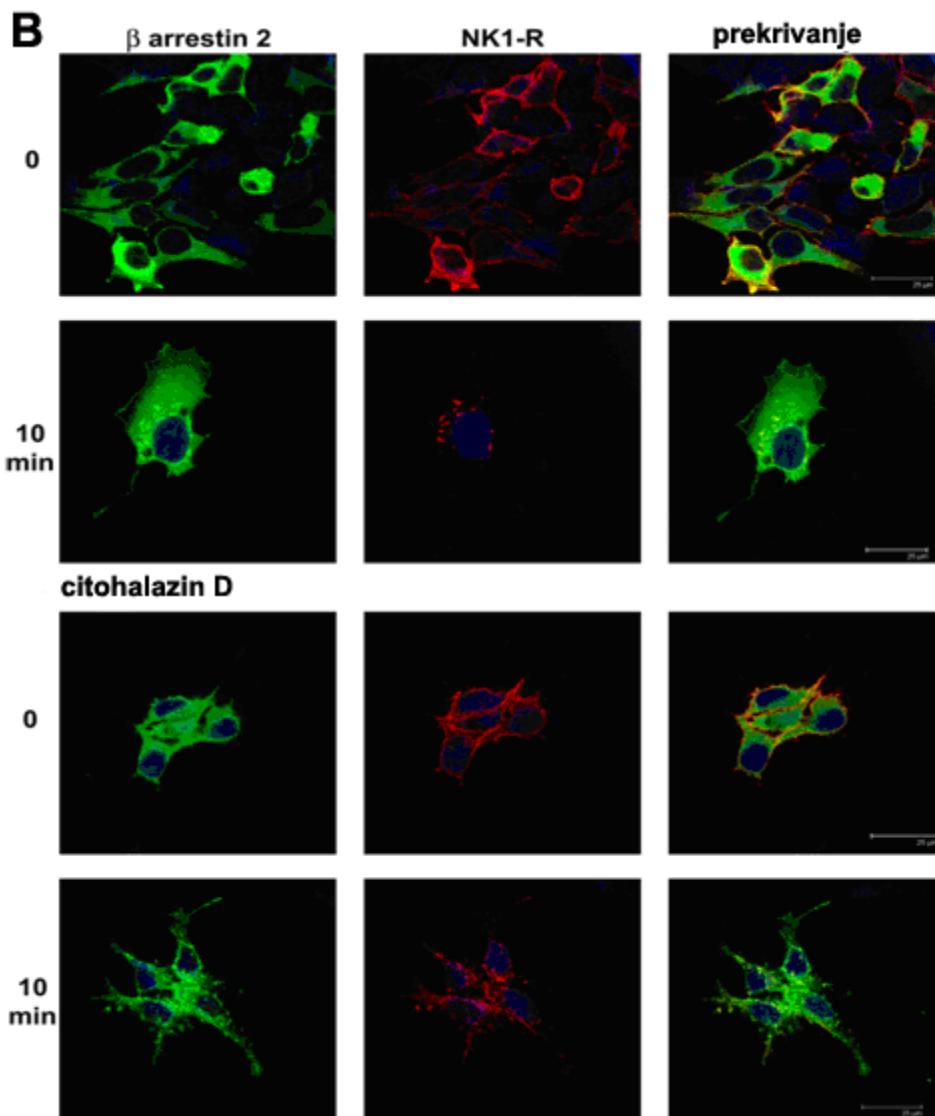
4.4.1 Razporeditev NK1-R, β -arestina 1 in β -arestina 2 v celicah HEK 293

Prerazporeditev in kolokalizacijo med β -arestinom 1 in 2 in NK1-R smo opazovali s konfokalnim mikroskopom pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih z NK1-R in GFP²/ β -arr1 ali GFP²/ β -arr2. Pri netretiranih celicah je bil receptor (rdeči signal) razporejen pretežno na celični membrani, β -arestin 1 in 2 (zeleni signal) pa sta razpršena v citoplazmi. Po 10-minutnem tretiranju z agonistom smo v obeh primerih opazili prehajanje receptorja v kompleksu z β -arestinom 1 ali 2 v citoplazmo. Pri veziklih je bilo na mestih vidno prekrivanje med rdečim in zelenim signalom (rumeni/oranžni signal), kar kaže na kolokalizacijo med β -arestinom 1 in 2 ter NK1-R (sliki 20A in B).

Pretretiranje celic s citohalazinom D (1 μ M, 1h, 37 °C) pri kontrolnih (netretiranih) celicah ni vplivalo na prerazporeditev receptorja in β -arestina 1 ali 2; NK1-R (rdeč signal) je bil še vedno razporejen na celični membrani, β -arestin 1 in 2 pa sta razpršena v citoplazmi. Po spodbuditvi receptorja s SP, tako NK1-R kakor tudi β -arestin 1 in 2, delno prehajajo v notranjost celice v obliki veziklov, delno pa zaostajajo zadržani na celični membrane ali tik pod njo. Prekrivanje med rdečim in zelenim signalom po tretiranju celic s SP je bilo vidno tudi po pretretiranju s citohalazinom D (sliki 20A in B).

Opaženo zaostajanje receptorja ter β -arestina 1 in 2 na celični membrani ali tik pod njo, ter kolokalizacija med obema signaloma (zeleni in rdeči signal) po pretretiranju celic s citohalazinom D kažeta na morebitno vlogo aktina pri internalizaciji kompleksa NK1-R / β -arestin 1 ali 2 po spodbuditvi receptorja z agonistom.



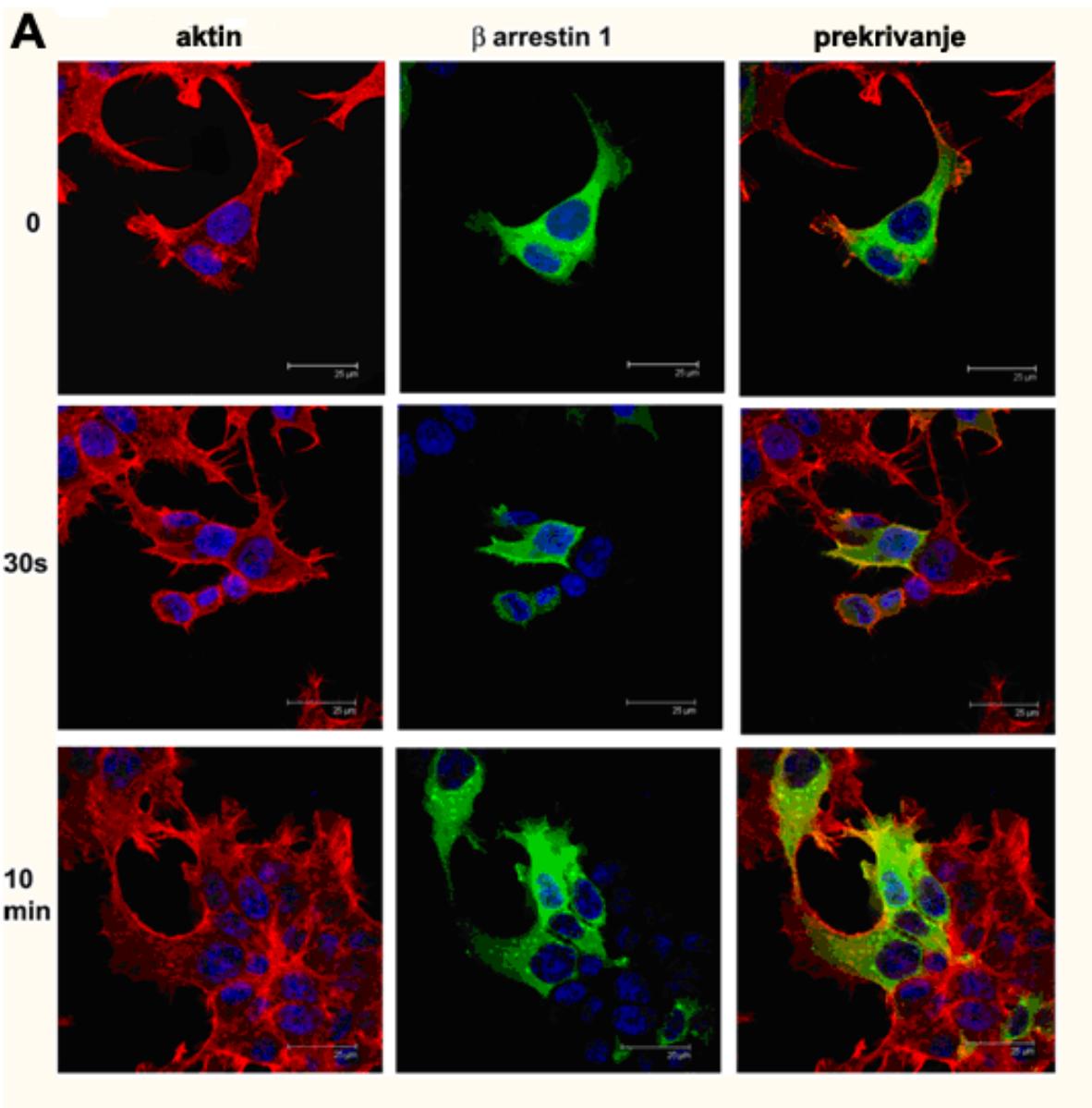


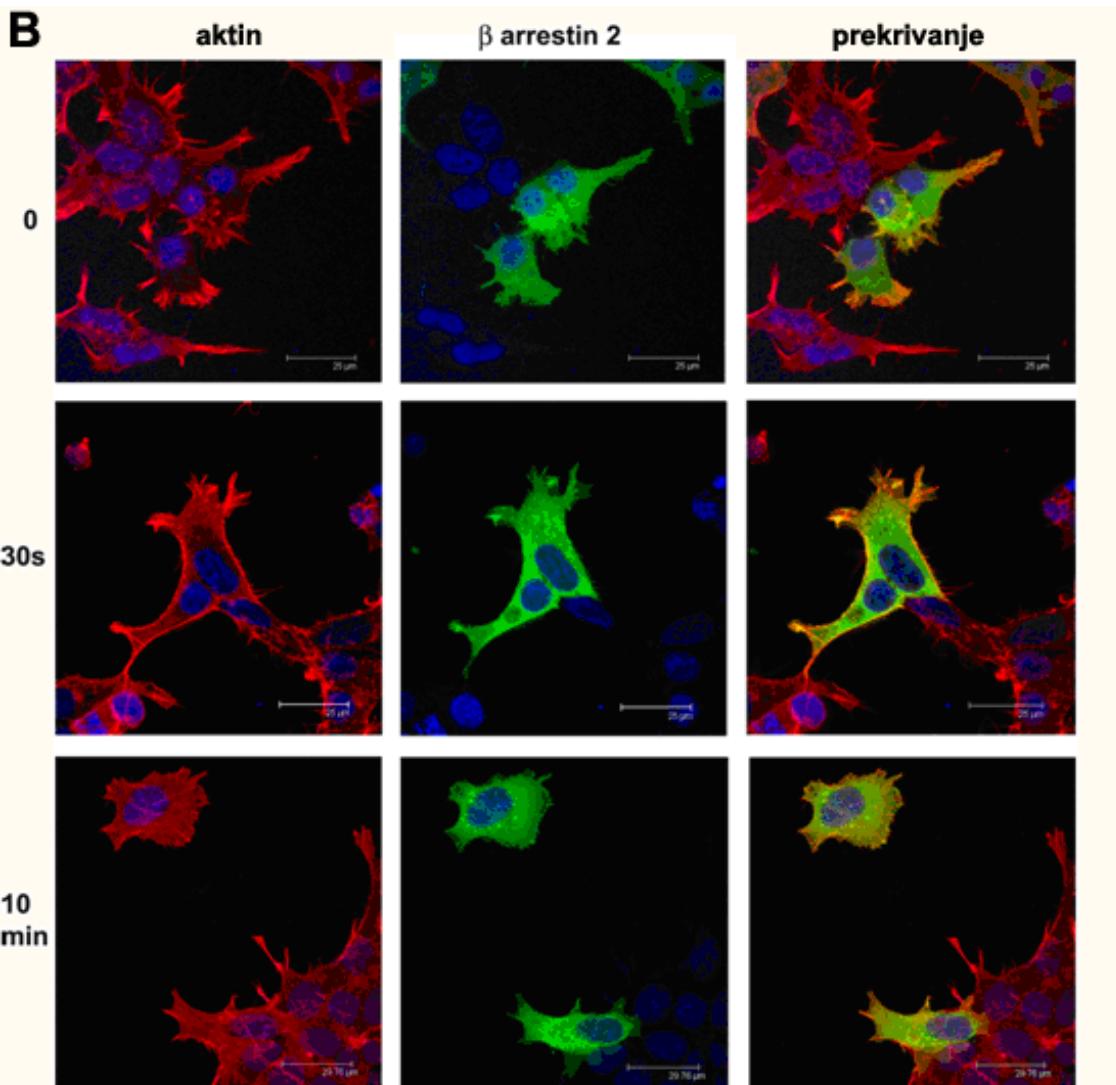
Slika 20: Vpliv agonista (SP) in citohalazina D na razporeditev NK1-R in β -arestina 1 in 2 v celicah HEK 293.

Celice HEK 293 smo prehodno kotransfecirali z NK1-R in z GFP^2 označenim β -arestinom 1 ali 2. Prikazane so: razporeditev (A) NK1-R in $GFP^2/\beta\text{-arr}1$ pri netretiranih (0) in tretiranih celicah ($1 \mu\text{M}$ SP, 10 min, 37°C); razporeditev NK1-R in $GFP^2/\beta\text{-arr}1$ pri celicah, pretretiranih s citohalazinom D ($2 \mu\text{M}$, 1h, 37°C) in tretiranih celicah ($1 \mu\text{M}$ SP, 10 min, 37°C) po pretretiranju s citohalazinom D; (B) NK1-R in $GFP^2/\beta\text{-arr}2$ pri netretiranih (0) in tretiranih celicah ($1 \mu\text{M}$ SP, 10 min, 37°C); razporeditev NK1-R in $GFP^2/\beta\text{-arr}2$ pri celicah, pretretiranih s citohalazinom D ($2 \mu\text{M}$, 1h, 37°C), in tretiranih celicah ($1 \mu\text{M}$ SP, 10 min, 37°C) po pretretiranju s citohalazinom D. Za imunocitokemični prikaz NK1-R smo uporabili primarna protitelesa proti HA in sekundarna protitelesa, označena s TRITC; za prikaz jeder smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Zeleni signal* $GFP^2/\beta\text{-arr}1$ ali $GFP^2/\beta\text{-arr}2$; *rdeč signal* receptor; *rumeni/oranžni signal* kolokalizacija med β -arestinom 1 in 2 in NK1-R; *modri signal* jedra.

4.4.2 Razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali β -arestina 2 v celicah HEK 293

Spremembe v razporeditvi aktinskega citoskeleta ter β -arestina 1 in 2 pri netretiranih in tretiranih celicah smo opazovali s konfokalnim mikroskopom pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih z NK1-R in GFP²/ β -arestinom 1 ali 2 (GFP²/ β -arr1 ali GFP²/ β -arr2). Pri kontrolnih celicah sta bila β -arestin 1 in 2 (zeleni signal) razpršena po citoplazmi, aktin (rdeči signal) je predvsem v obliki kratkih F-aktinskih struktur razpršen po citoplazmi. Po 30-sekundnem tretiranju celic s SP se je večji del obeh arestinov razporedil vzdolž membrane, določena količina pa je ostala še vedno razporejena znotraj citoplazme. Po 30-sekundnem tretiranju smo v citoplazmi opazili tudi razpršeni rdeči signal, ki najverjetneje predstavlja kraje F-aktinske nitke; v primerjavi s kontrolnimi celicami smo opazili tudi bolj izrazit kortikalni signal; vidno je bilo tudi prekrivanje med aktinom in β -arestinom 1 in 2 (rumeni/oranžni signal) kar kaže na kolokalizacijo med kortikalnim aktinom in β arestinom 1 in 2 (sliki 21A in B). Po 10-minutni aktivaciji receptorja s SP je večina aktina nahaja v polimerizirani obliki, v citoplazmi smo ponekod opazili tudi stresne filamente. Ojačanje v kortikalnem signalu je podobno kot pri celicah po 30-sekundnem tretiranju z agonistom. β -arestin 1 in 2 po 10-minutnem tretiranju s SP prehajata v citoplazmo. Pri celicah, ki prehodno izražajo β -arestin 1, smo ponekod opazili tudi kolokalizacijo z aktinom. Pri celicah, ki prehodno izražajo β -arestin 2, prekrivanja med signaloma nismo opazili (sliki 21A in B).





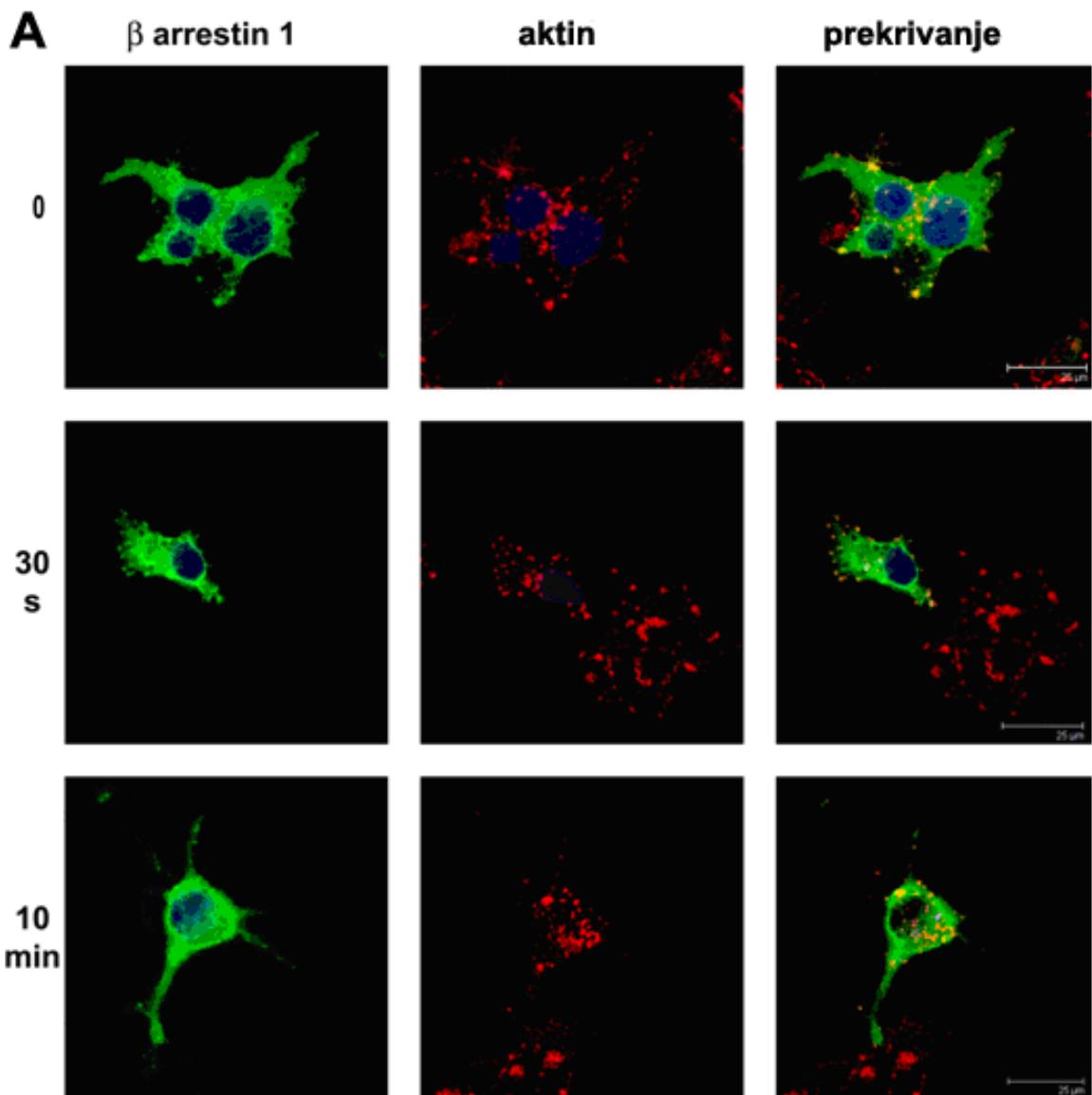
Slika 21: Razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali 2 v celicah HEK 293.

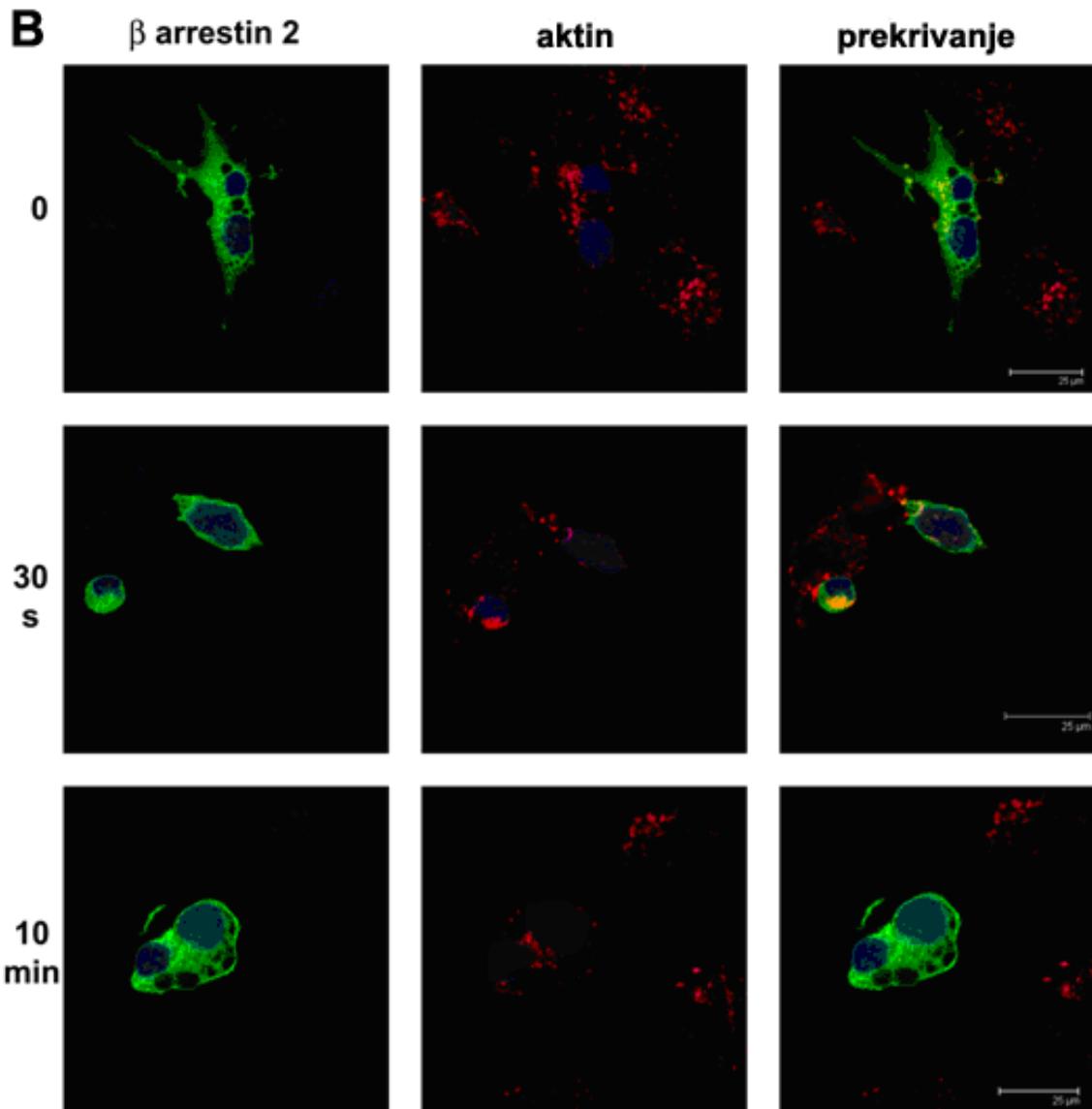
Celice HEK 293 smo prehodno kotransfecirali z NK1-R in z GFP^2 označenim β -arestinom 1 ali 2 ($\text{GFP}^2/\beta\text{-arr}1$ ali $\text{GFP}^2/\beta\text{-arr}2$). Prikazana je razporeditev (A) aktinskih filamentov in $\text{GFP}^2/\beta\text{-arr}1$ pri netretiranih celicah (0) in celicah po 30-sekundni in 10-minutni spodbuditvi NK1-R s SP ($1 \mu\text{M}$, 37°C); (B) aktinskih filamentov in $\text{GFP}^2/\beta\text{-arr}2$ pri netretiranih celicah (0) in celicah po 30-sekundni in 10-minutni spodbuditvi NK1-R s SP ($1 \mu\text{M}$, 37°C). Aktinski filamenti so prikazani z rodamin faloidinom; za prikaz jader smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Rdeči signal* aktinski filimenti; *zeleni signal* $\text{GFP}^2/\beta\text{-arr}1$ ali $\text{GFP}^2/\beta\text{-arr}2$; *rumeni/oranžni signal* kolokalizacija med β -arestinom 1 in 2 in aktinom; *moder signal* jedra.

4.4.3 Razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali β -arestina 2 v celicah HEK 293, pretretiranih s citohalazinom D

Vpliv citohalazina D na razporeditev β -arestina 1 in 2 smo opazovali s konfokalnim mikroskopom pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih z NK1-R in GFP²/ β -arestinom 1 ali 2 (GFP²/ β -arr1 ali GFP²/ β -arr2). Pretretiranje celic s citohalazinom D je v celicah vodilo do izgube večine struktur, ki vsebujejo F-aktin, aktin (rdeči signal) je v obliki skupkov omejen na citoplazmo, prav tako je izginil kortikalni signal. Pri tretiranih celicah so spremembe v aktinskem citoskeletu podobne kot pri kontroli (sliki 22A in B).

Pretretiranje celic s citohalazinom D ni vplivalo na razporeditev β -arestina 1 in 2 pri netretiranih celicah in po 30-sekundnem tretiranju celic s SP. Pri netretiranih celicah sta tako β -arestina 1 in 2 (zeleni signal) razporejena po citoplazmi v obliki razpršenega signala, po 30 sekundah pa oba najdemo razporejena vzdolž membrane. Prekrivanja med rdečim in zelenim signalom pri netretiranih celicah in celicah po 30 sekundni stimulaciji receptorja nismo opazili. Po 10 minutnem tretiranju celic s SP sta β -arestin 1 in 2 delno prehajala v citoplazmo v obliki veziklov, delno pa ostala zadržana vzdolž celične membrane. Podobno kot pri celicah z ohranjenim citoskeletonom opazimo prekrivanje med rdečim in zelenim signalom pri β -arestinu 1 in 2 po 30-sekundnem tretiranju, po 10-minutnem tretiranju pa opazimo prekrivanje samo med β -arestinom 1 in aktinom. Med β -arestinom 2 in aktinom prekrivanja nismo opazili (sliki 22A in B).





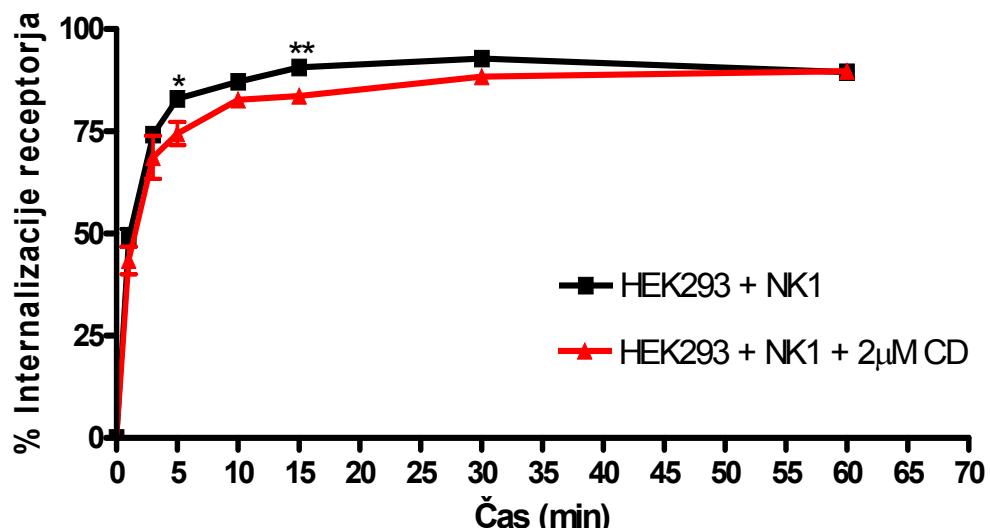
Slika 22: Vpliv citohalazina D na razporeditev aktinskih filamentov in β -arestina 1 ali 2 v celicah HEK 293.

Celice HEK 293 smo prehodno kotransfecirali z NK1-R in z GFP² označenim β -arestinom 1 ali 2 (GFP²/ β -arr1 ali GFP²/ β -arr2). Celice smo pretretirali s citohalazinom D (1 μ M, 1 h, 37 °C). Prikazana je razporeditev (A) GFP²/ β -arr1 in aktinskih filamentov pri netretiranih celicah (0) in celicah po 30-sekundni in 10-minutni spodbuditvi NK1-R s SP (1 μ M, 37 °C); (B) GFP²/ β -arr2 in aktinskih filamentov pri netretiranih celicah (0) in celicah po 30-sekundni in 10-minutni spodbuditvi NK1-R s SP (1 μ M, 37 °C). Aktinske filamente smo prikazali s pomočjo rodamin faloidina; za prikaz jeder smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Zeleni signal* prikazuje prerazporeditev β -arestina 1 in 2; *rdeči signal* aktinske filamente; *rumeni/oranžni signal* kolokalizacijo med β -arestinom 1 in 2 in aktinom; *modri signal* jedra.

4.4.4 Internalizacija NK1-R v celicah HEK 293, pretretiranih s citohalazinom D

Na ravni konfokalnega mikroskopa smo opazili, da je tretiranje celic s citohalazinom D vodilo do zaostajanja določenega dela receptorja v kompleksu z β -arestinom 1 ali 2 tik pod plazmamembrano. V naslednjem koraku smo zato z radioaktivnim ligandom [125 I]-SP pri celicah HEK 293, prehodno transfeciranih z NK1-R in tretiranih ali netretiranih s citohalazinom D, bolj natančno spremljali internalizacijo NK1-R v različnih obdobjih. Predhodno tretiranje celic s citohalazinom D ($2 \mu\text{M}$, 1 h, 37°C) ni značilno zavrolo obsega internalizacije NK1-R v celotnem opazovanem časovnem obdobju (1—60 min). Značilno razliko v odstotku internalizacije med kontrolnimi celicami in celicami, pretretanimi s citohalazinom D, smo opazili le v začetni fazi internalizacije (do 30 min) (graf 10) ($p < 0,01$ in $p < 0,05$, $n = 6$).

Dobljeni rezultat je skladen z opaženimi spremembami na ravni konfokalnega mikroskopa in kaže na pomen aktina pri internalizaciji NK1-R.



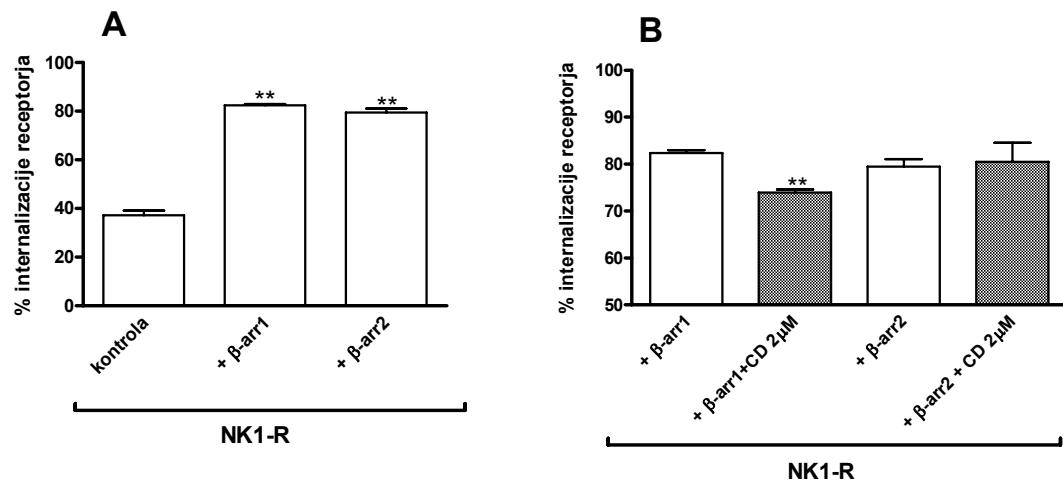
Graf 10: Časovni potek internalizacije NK1-R v celicah HEK 293.

Prikazana je internalizacija NK1-R pri kontrolnih in celicah, pretretiranih s citohalazinom D (CD) ($2 \mu\text{M}$, 1 h, 37°C). Internalizacijo smo izmerili po 1-, 3-, 5-, 10-, 15-, 30- in 60-minutni spodbuditvi receptorja z radioaktivnim ligandom ($[^{125}\text{I}]$ -SP). Prikazane so srednje vrednosti s SD dveh neodvisnih poskusov, za vsak vzorec so bile opravljene tri ponovitve. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$, $n = 6$; **Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 6$.

4.4.5 Internalizacija NK1-R v celicah MEF z izbitima genoma za β -arestin 1 in 2

Na ravni konfokalne mikroskopije smo pri celicah HEK 293 opazili, da je bila po 10-minutni spodbuditvi receptorja z agonistom kolokalizacija prisotna le med aktinom in β -arestinom 1 in je bila opažena tako pri celicah z ohranjenim aktinom kot pri celicah, pri katerih smo preprečili polimerizacijo aktina s citohalazinom D. V nadaljevanju smo zato želeli proučiti vlogo aktinskega citoskeleta za normalen potek z β -arestinom 1 in 2 posredovane internalizacije. V ta namen smo uporabili celice MEF z izbitima genoma za β -arestin 1 in 2 (MEF DKO β -arr 1/2) in jih prehodno kotransfecirali z NK1-R in β -arestinom 1 ali 2.

Odstotek internalizacije NK1-R po 30-minutni spodbuditvi receptorja z radioaktivnim ligandom je bil v celicah MEF, kjer nismo soizrazili β -arestina 1 ali 2 (kontrola; celice, transfecirane samo z NK1-R), izrazito nizek, internaliziralo je ~30 % NK1-R (graf 11A). Pri celicah MEF kotransfeciranih z NK1-R in β -arestinom 1, je internaliziralo ~81% NK1-R, po pretretiranju s citohalazinom D pa ~73 % NK1-R (graf 11A in B); razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 6$. Pri celicah MEF, kotransfeciranih z β -arestinom 2, je internaliziralo ~79 % NK1-R, pretretiranje celic s citohalazinom D pa ni zavrnlo z β -arestinom 2 posredovane internalizacije NK1-R (graf 11A in B). Dobljeni rezultati so tako potrdili spremembe, opažene na ravni konfokalnega mikroskopa, in pokazali na vlogo aktina pri internalizaciji NK1-R, posredovani z β -arestinom 1.



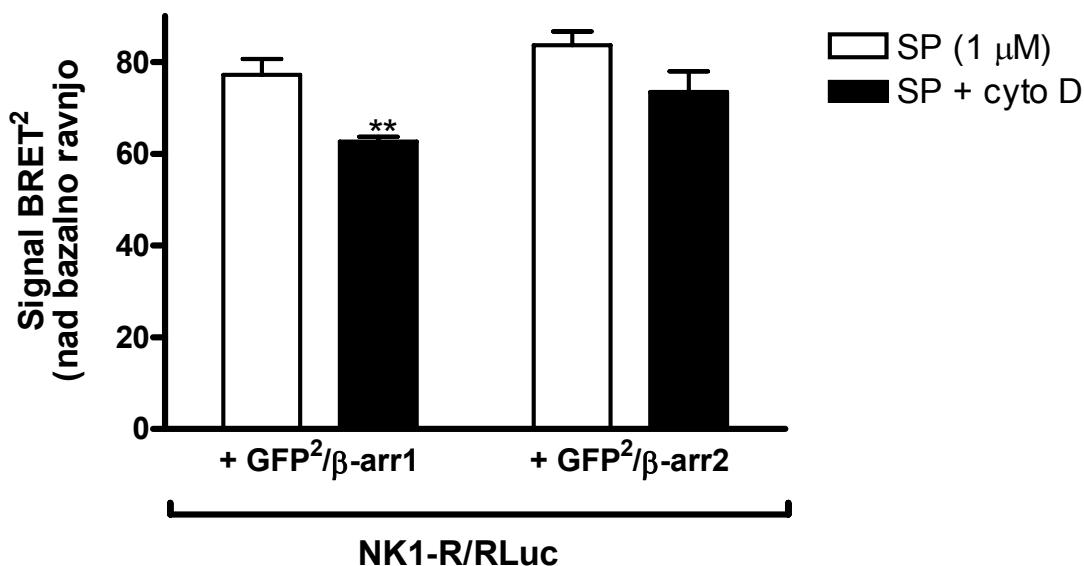
Graf 11: Internalizacija NK1-R po pretretiranju celic s citohalazinom D v celicah MEF DKO β -arr 1/2 .

Prikazana je internalizacija NK1-R pri celicah MEF DKO β -arr 1/2, prehodno kotransfeciranih z NK1-R (kontrola) ali z NK1-R v kombinaciji z β -arestinom 1 ali 2. (A) Internalizacija pri netretiranih celicah in (B) celicah, pretretiranih s citohalazinom D (CD) (2 μ M, 1 h, 37 °C). Internalizacijo smo izmerili po 30-minutni stimulaciji receptorja z radioaktivnim ligandom ($[^{125}\text{I}]$ -SP). Prikazane so srednje vrednosti s SD dveh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec so bile opravljene tri ponovitve.**Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 6$.

4.4.6 Vpliv aktinskih filamentov na interakcijo med NK1-R in β -arestinom 1 in 2

Rezultati na ravni konfokalne mikroskopije in internalizacijski testi so pokazali na vlogo aktina v internalizaciji NK1-R, posredovani z β -arestinom 1, zato smo v nadaljevanju z metodo BRET² ugotavljali pomen aktinskega citoskeleta za oblikovanje proteinsko-proteinskih povezav med NK1-R in β -arestini (β -arr 1 in β -arr 2). V ta namen smo celice HEK 293 prehodno kotransfecirali z bioluminiscentno označenim NK1-R (NK1-R/RLuc) in fluorescenčno označenim β -arestinom 1 ali 2 (GFP²/ β -arr1 ali GFP²/ β -arr2). Interakcijo smo merili pri celicah z ohranjenim aktinskim citoskeletom in celicah, kjer smo s pretretiranjem s citohalazinom D (2 μ M, 1 h, 37 °C) povzročili depolimerizacijo aktina.

Z agonistom spodbujeni signal BRET² med NK1-R in β -arestinom 1 in med NK1-R in β -arestinom 2 je bil primerljiv. Pri celicah, pretretiranih s citohalazinom D, je bil z agonistom spodbujeni signal BRET² značilno znižan le med NK1-R in β -arestinom 1 ($p < 0,01$, $n = 12$) (graf 12), medtem ko pretretiranje celic s citohalazinom D ni imelo značilnega vpliva na interakcijo med NK1-R in β -arestinom 2.



Graf 12: Interakcija β -arestina 1 in 2 z NK1-R po aktivaciji receptorja z agonistom v celicah HEK 293.

Prikazan je izmerjeni signal BRET² pri celicah HEK 293, prehodno kotransfeciranih z NK1-R/RLuc in GFP²/β-arr1 ali GFP²/β-arr2. Signal BRET² je bil izmerjen po stimulaciji celic s SP (1 μ M, 5 min) in celicah, pretretiranih s citohalazinom D (2 μ M, 1 h, 37 °C) in tretiranih s SP (1 μ M, 5 min). Prikazane so srednje vrednosti s SD treh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec so bile opravljene štiri ponovitve.**Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 12$.

4.5 KARAKTERIZACIJA CELIČNIH LINIJ CHO K₁ IN CHO 215

Ovarijske celice kitajskega hrčka K₁ (CHO K₁) in mutirano obliko celic kitajskega hrčka CHO 215 z okvarjeno dekarboksilacijo 4-karboksisterola (Plemenitas in sod., 1990) in posledično nezmožnostjo tvorbe lipidnih raftov smo pridobili iz laboratorija prof. dr. Ane Plemenitaš (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani).

V prvem delu smo ugotavljali primernost celične linije CHO 215 kot sredstva za proučevanje vloge lipidnih raftov in kaveol v mikrolokalizaciji in funkcionalni neokrnjenosti NK1-R. Celično linijo CHO K₁ smo uporabljali kot kontrolo.

4.5.1 Raven izražanja mRNA za kaveolin 1 v celicah CHO K₁ in CHO 215

S kvantitativno analizo RT-PCR smo izmerili raven izražanja mRNA za kaveolin 1 (Cav 1) pri celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215, gojenih na mediju z dodatkom 5 % FCS in mediju z dodatkom 5 % LLS. Raven izražanja mRNA za Cav 1 je bila pri obeh celičnih linijah, gojenih na različnih medijih, podobna; odstopanja med posameznimi vrednostmi so bila minimalna. Raven izražanja mRNA za Cav 1 pri celicah HEK 293 je bila značilno (pribl. 13-krat) nižja kot pri celicah CHO (tabela 6) ($p < 0,01$, $n = 6$).

Tabela 6: Raven izražanja mRNA za WT Cav 1.

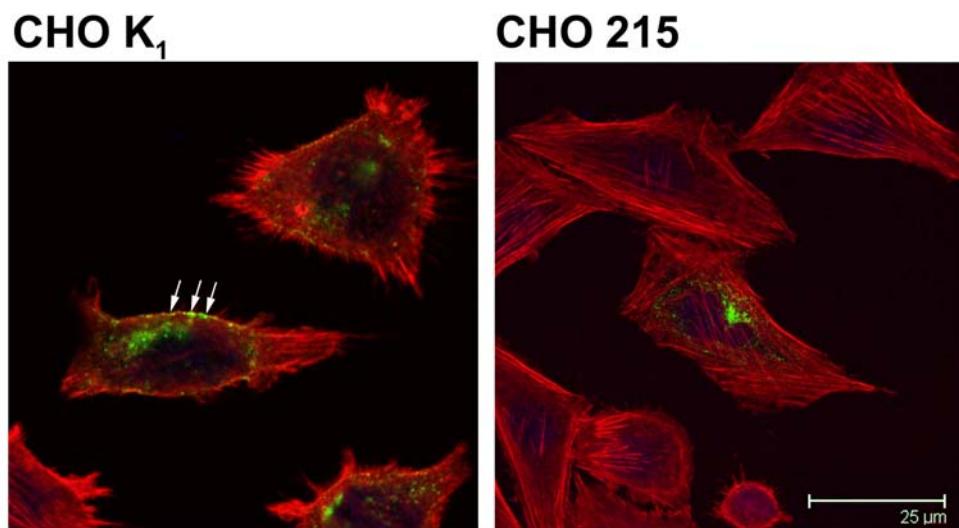
Raven izražanja mRNA za WT Cav 1 pri celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako (SE) treh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec sta bili opravljeni dve ponovitvi ($n = 6$).

Celična linija	ΔCt (WT Cav1-18s)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
CHO K ₁ (5 % FCS)	$11,57 \pm 0,25$	1,00
CHO 215 (5 % FCS)	$11,91 \pm 0,02$	0,79
CHO K ₁ (5 % LLS)	$11,25 \pm 0,07$	1,25
CHO 215 (5 % LLS)	$11,68 \pm 0,04$	0,93
HEK 293	$15,24 \pm 0,23$	0,08** (Kubale, 2007)

18s = ribosomalna (r) 18S RNA (hišni gen) — endogena kontrola; Ct = prazni ciklus PCR-reakcije pri katerem se intenzivnost fluorescence loči od ozadja (threshold cycle, Ct); ΔCt = Ct (ciljni gen) – Ct (18s); $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = relativne spremembe v izražanju genov med posameznimi celičnimi linijami

4.5.2 Razporeditev kaveolina 1 v celicah CHO K₁ in CHO 215

S konfokalnim mikroskopom smo v nadaljevanju žeeli proučiti pomen lipidnih raftov v razporeditvi kaveolina na celični membrani. Razporeditev z GFP² označenega kaveolina 1 (Cav1-GFP²) smo opazovali pri celicah CHO K₁ in CHO 215. Pri celicah CHO K₁ je večino kaveolina (i signal) razporejenega na citoplazemskem delu plazmamembrane (puščice slika 23). Z rodamin faloidinom označeni aktin (rdeči signal) je enakomerno razporen v membrani v obliki kratkih F-aktinskih nitk, viden so tudi ojačan kortikalni signal in citoplazemski podaljški. POnekod je opazna tudi kolokalizacija med aktinom in kaveolinom. Pri celicah CHO 215 je kaveolin v obliki gmot razporen znotraj citoplazme, najverjetneje gre za zadržani kaveolin znotraj endoplazemskega retikuluma. Aktin je organiziran v stresne filamente, ki se raztezajo po citoplazmi in potekajo paralelno s plazmamembrano. Kortikalni aktin je viden samo pri posameznih manjših celicah, pri večini celic ga ne vidimo. Rezultati tako kažejo, da se kljub ohranjeni ravni mRNA za kaveolin ta v celicah CHO 215 brez lipidnih raftov ne procesira na plazmamembrano.

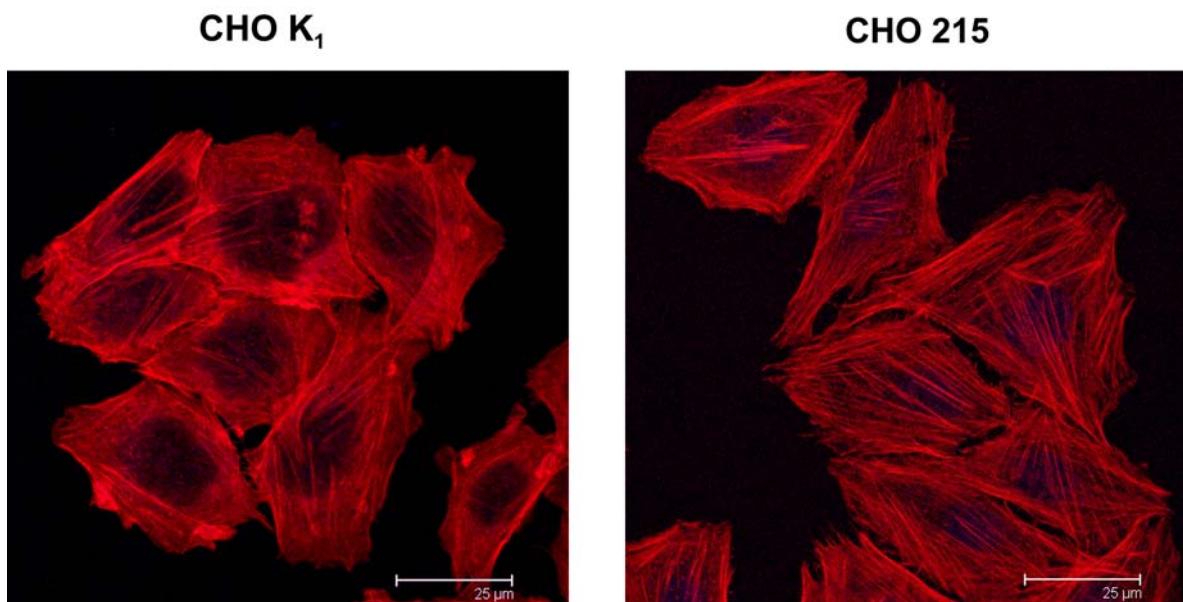


Slika 23: Razporeditev kaveolina-1 in aktina.

Prikazana je razporeditev z GFP² označenega kaveolina-1 (Cav1-GFP²), prehodno izraženega v trajnih celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215. Za prikaz aktinskih filamentov smo uporabili rodamin faloidin; za prikaz jeder smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Zeleni signal* prikazuje razporeditev kaveolina-1; *rdeči signal* aktin; *rumeni/oranžni signal* kolokalizacijo med kaveolinom-1 in aktinom; *modri signal* jedra.

4.5.3 Razporeditev aktinskega citoskeleta v celicah CHO K₁ in CHO 215

Pri celicah CHO K₁ in CHO 215 smo s konfokalnim mikroskopom opazovali tudi razporeditev aktinskega citoskeleta. Pri celicah CHO K₁ je aktin (rdeči signal) razporejen v obliki krajsih F-aktinskih nitk v citoplazmi, ponekod vidimo posamične stresne filamente in ojačan kortikalni aktin. Pri celicah CHO 215, drugače kot pri celicah CHO K₁, kortikalni signal ni izrazit; aktin v citoplazmi je organiziran v obliki izrazitih stresnih filamentov, ki potekajo paralelno s celično membrano in se raztezajo prek citoplazme (slika 24).



Slika 24: Razporeditev aktinskega citoskeleta v celicah CHO K₁ in CHO 215.

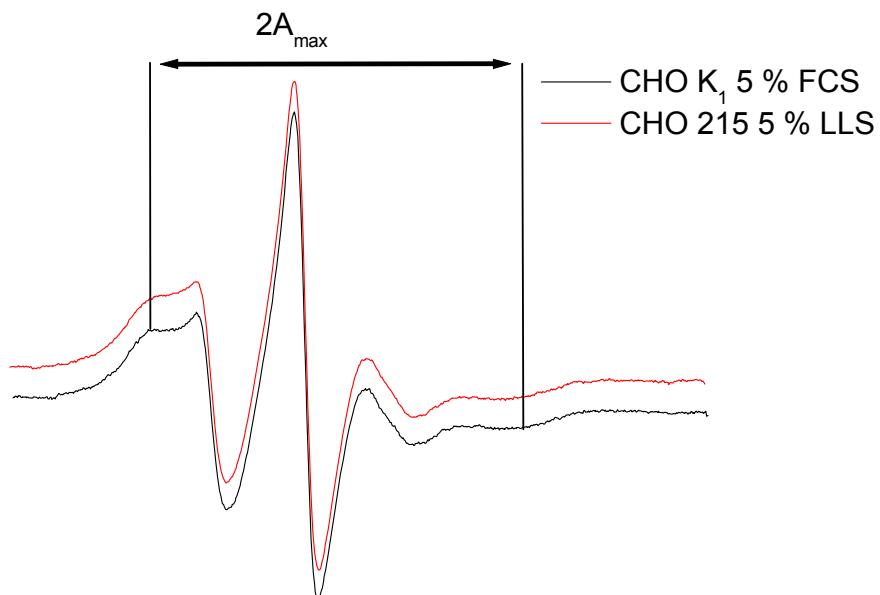
Prikazana je razporeditev aktina, označenega z rodamin faloidinom, pri celicah CHO K₁ in CHO 215. Za prikaz jader v ozadju smo uporabili TO-PRO-3-jodid. *Rdeči signal* aktinski filamenti; *modri signal* jedra.

4.5.4 Lastnosti membranskih domen pri celicah CHO K₁ in CHO 215

Pomen lipidnih raftov/kaveol v urejenosti celične membrane pri celicah CHO K₁ in CHO 215 smo ugotavljali z metodo spektroskopije EPR s pomočjo spinskega označevalca MeFASL (10,3). Za meritve smo celice CHO K₁ gojili v mediju z dodatkom 5 % FCS, celice CHO 215 pa smo gojili v mediju brez holesterola, tj. z dodatkom 5 % LLS.

S spektroskopijo EPR smo ob dodatku spinskega označevalca dobili eksperimentalne spektre za posamezne celice, pri katerih smo z računalniško simulacijo ugotovili, da so večinoma seštevek treh spektralnih komponent, ki predstavljajo membranske domene z različno urejenostjo: najbolj urejena domena D1, srednje urejena domena D2 in najbolj fluidna domena D3. Iz dobljenih spektrov smo izračunali tudi maksimalni hiperfizni razcep ($2A_{max}$), ki poda informacijo o dinamiki in urejenosti fosfolipidov v membrani. Meritve smo izvajali v paralelkah in statistične razlike med posameznimi rezultati določili s Student *t*-testom.

Dobljeni spektri EPR pri celicah CHO K₁ in CHO 215 so prikazani na grafu 13. Primerjava maksimalnega hiperfiznega razcepa ($2A_{max}$), ki je značilno večji pri celicah CHO K₁ ($2A_{max} = 51,6 \pm 0,3$; $p < 0,05$, $n = 21$) kot pri celicah CHO 215 ($2A_{max} = 49,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$, $n = 24$), kaže na večjo urejenost plazmamembrane pri celicah CHO K₁. Skladno s tem so tudi meritve skupnega holesterola v celicah CHO K₁ in CHO 215 pokazale, da je koncentracija skupnega holesterola v celicah CHO 215 ~41 % nižja kot v celicah CHO K₁, kar se ujema s predhodno objavljenimi podatki (Zheng in sod., 2001).



Graf 13: Eksperimentalni spektri EPR plazmamembrane celic CHO K₁ in CHO 215.

Celice CHO K₁ so bile gojene v mediju z dodatkom 5 % FCS, celice CHO 215 pa v mediju z dodatkom 5 % LLS. Spekter EPR celic CHO K₁ (črna krivulja) in CHO 215 (rdeča krivulja). Spinski označevalec je MeFASL (10,3). $2A_{\max}$ – maksimalni hiperfizni razcep.

S kondenzacijsko metodo GHOST smo različne rezultate računalniške simulacije spektrov EPR združili v skupino rešitev, pri čemer je vsaka rešitev predstavljala obliko gibanja spinskega označevalca v membrani. Kondenzacijska metoda GHOST nam je tako še dodatno izboljšala vpogled v urejenost plazmamembrane in posameznih domen (Koklic in sod., 2005). S pomočjo diagramov GHOST smo prikazali ureditveni parameter posameznih domen (S) v odvisnosti od korelacijskega časa (τ_c). Drugi parametri, ki jih dobimo s kondenzacijsko metodo GHOST, so navedeni v tabeli 7: informacija o številu domen (v tabeli označene kot domena 1, domena 2 in domena 3), delež posamezne domene (d), urejenosti znotraj domene (S) ter rotacijski korelacijski čas (τ_c).

Pri celicah CHO 215 so ureditveni parametri nižji v vseh treh domenah, v primerjavi s celicami CHO K₁ je v vseh treh domenah pri celicah CHO 215 skrajšan tudi rotacijski korelacijski čas, kar kaže na hitrejše rotacijsko gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca v posamezni domeni in s tem tudi na večjo fluidnost (glej tabelo 7).

Tabela 7: Parametri posameznih domen plazmamembrane, dobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST.

Število domen (označene z D1, D2 in D3), delež posamezne domene (d), ureditveni parameter domene (S) ter rotacijski korelacijski čas (τ_c).

		CHO K1	CHO 215
Domena 1 (D1)	S	0,68 ± 0,00	0,67 ± 0,00
	τ_c (ns)	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00
	d	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00
Domena 2 (D2)	S	0,37 ± 0,02	0,36 ± 0,00
	τ_c (ns)	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2
	d	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Domena 3 (D3)	S	0,15 ± 0,04	0,08 ± 0,0
	τ_c (ns)	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,1
	d	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,005

S primerjavo celic CHO K₁ in CHO 215 smo ugotovili, da je pri mutiranih celicah CHO 215 brez lipidnih raftov:

- okvarjeno procesiranje kaveolina 1 na plazmamembrano, kljub ohranjeni ravni mRNA za kaveolin 1,
- spremenjen vzorec prerazporeditve aktinskega citoskeleta, več stresnih filamentov ter neizrazit kortikalni signal,
- znižana koncentracija skupnega holesterola ter zmanjšana urejenost plazmamembrane.

4.6 SELEKCIJA TRAJNIH CELIČNIH LINIJ CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R

4.6.1 Potek selekcije trajne celične linije

Za proučevanje vloge lipidnih raftov/kaveol v mikrolokalizaciji in delovanju NK1-R smo pripravili celični liniji CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R, trajno transfecirani s HANK1-R, ki smo ju pridobili v postopku selekcije z uporabo geneticina in sortiranjem s pretočnim citometrom. Na podlagi morfološke ocene celic na ravni svetlobne mikroskopije, ki smo jo opravljali v 24-urnih presledkih, smo ugotovili, da je dodatek G418 v koncentracijah 750 ali 1000 µg/ml smrten za večino netransfeciranih celic v 24 urah, medtem ko je v daljšem obdobju učinkovita tudi koncentracija G418 v odmerku 500 µg/ml. Za proces selekcije smo zato izbrali koncentracijo 1000 µg/ml, medtem ko smo za vzdrževanje že presortiranih in karakteriziranih celičnih linij CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R uporabljali G418 v koncentraciji 500 µg/ml. Po opravljeni začetni selekciji z geneticinom smo s pretočnim citometrom (EPICS Altra cell sorter (Beckman Coulter), Kemijski inštitut) izmerili raven izražanja fluorescenčno označenega receptorja in nato celice, ki so izražale največ receptorja, odsortirali.

4.6.2 Lastnosti trajnih celičnih linij

Lastnosti trajnih celičnih linij CHOK₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R smo določali s testom ELISA in testom samoizpodrivanja z radioaktivno označenim ligandom.

Po opravljenem sortiranju s pretočnim citometrom je bila izmerjena raven površinsko izraženega NK1-R pri trajni celični liniji CHO K₁ NK1-R $6,2 \pm 0,78$ -krat višja kot pri kontrolnih celicah CHO K₁, pri trajni celični liniji CHO 215 NK1-R pa $4,73 \pm 0,12$ -krat višja kot pri kontrolnih celicah CHO 215.

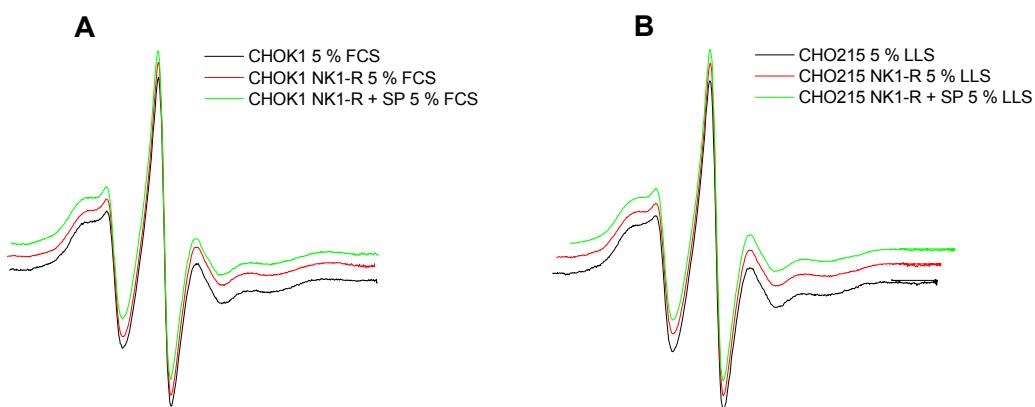
S testom samoizpodrivanja smo izračunali, da je koncentracija SP, ki je povzročila 50-odstotno izpodrivanje specifično vezane [¹²⁵I]-SP (IC_{50}) pri trajni celični liniji CHO K₁ NK1-R gojeni na mediju s 5 % FCS, $1,56 \pm 0,65$ nM ter $0,71 \pm 0,59$ nM pri isti celični liniji, gojeni na mediju z dodatkom 5 % LLS. Pri trajni celični liniji CHO 215 NK1-R, gojeni na mediju z dodatkom 5 % FCS, je bila $IC_{50} 1,59 \pm 1,42$ nM ter $0,26 \pm 0,14$ nM pri isti celični liniji, gojeni na mediju z dodatkom 5% LLS. Dobljene vrednosti smo uporabili tudi za izračun gostote površinskih receptorjev (B_{max}), ki je bila pri celični liniji CHO K₁ NK1-R ~ 382 fmol/100.000 celic in ~ 289 fmol/100.000 celic pri celični liniji CHO 215 NK1-R.

4.6.3 Lastnosti membranskih domen pri trajnih celičnih linijah

Vpliv izražanja receptorja v celični membrani na lastnosti membranskih domen in ugotavljanje vloge lipidnih raftov/kaveol pri razporejanju receptorja v plazmamembrani smo spremljali pri celičnih linijah CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R, trajno transformiranih s HANK1-R z metodo spektroskopije EPR s spinškim označevalcem MeFASL (10,3). Za meritve smo celice CHO K₁ NK1 gojili v mediju z dodatkom 5 % FCS, celice CHO 215 NK1-R pa smo gojili v mediju osiromašenem, z lipoproteini tj. 5 % LLS. Meritve smo izvajali v paralelkah in statistične razlike med posameznimi rezultati določili s Student *t*-testom. Prisotnost receptorja v membrani je pri obeh celičnih linijah CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R povzročila manjše spremembe v spektrih EPR kot pri celicah brez receptorja (CHO K₁ in CHO 215) (glej graf 13 in 14). Maksimalni hiperfizni razcep ($2A_{max}$) pri celicah CHO K₁ NK1-R ($2A_{max} = 50,0 \pm 0,4$; $p < 0,05$, $n = 18$) je značilno manjši kot pri celicah CHO K₁ ($2A_{max} = 51,6$

$\pm 0,3; p < 0,05, n = 21$). Razlika v $2A_{max}$ med celicami CHO 215 NK1-R ($2A_{max} = 49,2 \pm 0,3, n = 21$) in CHO 215 ($2A_{max} = 49,7 \pm 0,2, n = 24$) pa ni značilno različna.

Po tretiranju celic CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R z agonistom (SP 10 μ M, 10 min) se spektri pri obeh celičnih linijah bolj prekrivajo s spektri pri netretiranih celicah (graf 14). Maksimalni hiperfizni razcep pri celicah CHO K₁ NK1-R po tretiranju z agonistom ($2A_{max} = 49,4 \pm 0,3; p < 0,05, n = 36$) je značilno manjši kot pri celicah CHO K₁ in CHO K₁ NK1-R v odsotnosti agonista. Tretiranje celic CHO 215 NK1-R z agonistom ni povzročilo značilnih razlik v $2A_{max}$ med CHO 215 NK1-R pred tretiranjem in kontrolnimi celicami CHO 215.



Graf 14: Eksperimentalni spektri EPR plazmamembrane trajnih celičnih linij CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R pred spodbuditvijo z agonistom in po njej.

Celice CHO K₁ NK1-R so bile gojene v mediju z dodatkom 5 % FCS, celice CHO 215 NK1-R pa v mediju z dodatkom 5 % LLS. (A) Spekter EPR celic CHO K₁ NK1-R; netretirane celice (rdeča krivulja) in tretirane celice (1 μ M SP; zelena krivulja). Spekter EPR celic CHO K₁ (črna krivulja). (B) Spekter EPR celic CHO 215 NK1-R; netretirane celice (rdeča krivulja) in tretirane celice (1 μ M SP; zelena krivulja). Spekter EPR celic CHO 215 (črna krivulja). Spinski označevalci je MeFASL (10,3).

S kondenzacijsko metodo GHOST smo nato različne rezultate računalniške simulacije spektrov EPR združili v skupino rešitev, pri čemer je vsaka rešitev predstavljala obliko gibanja spinskega označevalca v plazmamembrani.

Prisotnost receptorja v membrani pri celični liniji CHO K₁ NK1-R je zvišala ureditveni parameter predvsem v domeni 1 in delno v domeni 2, v domeni 3 pa se je v primerjavi s celicami CHO K₁ ureditveni parameter zmanjšal (glej tabelo 7 in 8), poleg

tega je prisotnost receptorja v membrani vodila do povečanega deleža domen z nižjimi ureditvenimi parametri, tj. domen 2 in 3. Pri celicah CHO 215 NK1-R je prisotnost receptorja v membrani zvišala ureditveni parameter samo v domenah 1 in 3, v domeni 2 pa se je v primerjavi s celicami CHO 215 ureditveni parameter zmanjšal (tabela 7 in 8). Večja sprememba v korelacijskem času pri celicah CHO K₁ NK1-R je bila prisotna samo v domeni 2, kjer je bil le-ta krajši kot pri celicah CHO K₁. Pri celicah CHO 215 NK1-R pa je bil v primerjavi s celicami CHO 215 korelacijski čas podaljšan v vseh treh domenah (tabela 7 in 8). Na diagramu GHOST samo pri celicah CHO K₁ NK1-R opazimo zbližanje domene 1 in domene 2 (graf 15). Na diagramu GHOST pri celicah CHO 215 NK1-R v primerjavi s celicami CHO 215 zbliževanja ali združevanja med domenami nismo opazili (graf 15). Po tretirajujočem celic CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R z agonistom (SP 10 μM, 10 min) na diagramu GHOST vidimo podobno razporeditev domen kot pri celicah, ki ne izražajo receptorja. Razlike v ureditvenih parametrih med tretiranimi in netretiranimi celicami opazimo samo pri celicah CHO 215 NK1-R, pri katerih je aktivacija receptorja znižala ureditvene parametre v domenah 1 in 3, v domeni 2 pa se je v primerjavi z netretiranimi celicami ureditveni parameter zvišal (tabela 8); pri celicah CHO K₁ NK1-R večjih razlik v ureditvenih parametrih med tretiranimi in netretiranimi celicami nismo ugotovili.

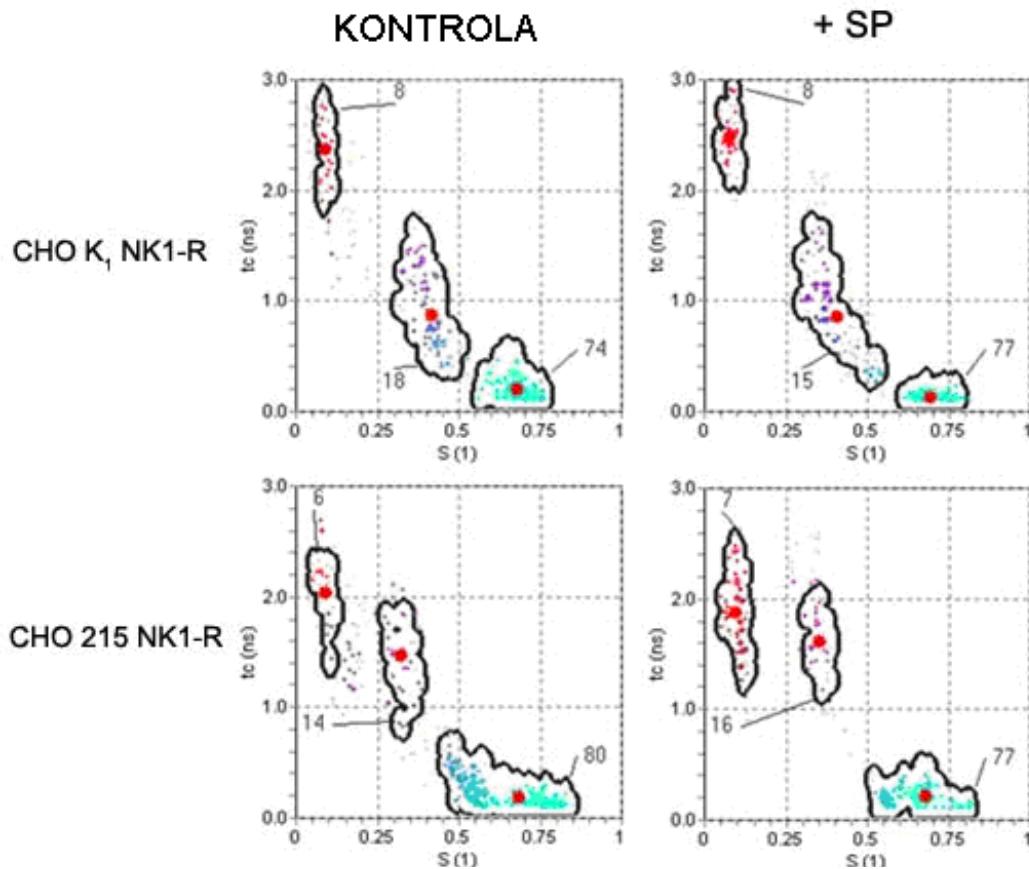
Dobljene spremembe v spektrih EPR, razlike v 2A_{max} in rezultati dobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST, so pokazali, da je prisotnost receptorja v celični membrani pri trajni celični liniji CHO K₁ NK1-R v primerjavi s kontrolnimi celicami CHO K₁ vodila do povečanja fluidnosti plazmamembrane. Spremembe na diagramih GHOST pri celicah CHO K₁ NK1-R kažejo tudi na razporejanje določenega deleža NK1-R v urejena območja membrane, tj. D1 in D2, ali razporejanje receptorja na mejnih področjih D1 in D2. Za D1 je bilo opisano, da vsebuje več holesterola in visoko zasičenih maščob, kar je predvsem značilno za rafte, zato nekateri menijo, da D1 predstavlja lipidne rafte (Simons in Ikonen, 2000). Dobljene spremembe pri celicah CHO K₁ NK1-R bi tako lahko kazale na razporejanje receptorja znotraj lipidnih raftov oziroma na mejnem delu plazmamembrane z lipidnimi rafti. Pri celicah CHO 215 NK1-R brez lipidnih raftov smo sicer opazili določene spremembe v urejnosti membrane, v primerjavi s kontrolnimi celicami je bil podaljšan rotacijski

korelacijski čas v vseh treh domenah, kar kaže na zmanjšano fluidnost plazmamembrane v prisotnosti receptorja. Sprememb, ki bi kazale na razporejanje receptorja znotraj membranskih mikrodomen, pa pri celicah CHO 215 v prisotnosti receptorja v plazmamembrani nismo opazili.

Tabela 8: Parametri posameznih domen plazmamembrane, dobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST.

Število domen (označene z D1, D2 in D3), delež posamezne domene (d), ureditveni parameter domene (S) ter rotacijski korelacijski čas (τ_c)

CHO K1 NK1-R			CHO 215 NK1-R		
netretirane			+ SP	netretirane	+ SP
Domena 1 (D1)	S	0,69 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,69 ± 0,00	0,68 ± 0,01
	τ_c (ns)	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
	d	0,76 ± 0,02	0,76 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,75 ± 0,02
Domena 2 (D2)	S	0,41 ± 0,05	0,42 ± 0,04	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,01
	τ_c (ns)	0,7 ± 0,1	0,95 ± 0,02	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,3
	d	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Domena 3 (D3)	S	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01
	τ_c (ns)	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1
	d	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,00



Graf 15: Diagrami GHOST različnih gibanj spinskega označevalca v membrani.

Prikazan je ureditveni parameter posameznih domen (S) v odvisnosti od korelacijskega časa (τ_c). CHO K₁ NK1-R trajna celična linija pred tretiranjem s SP (kontrola) in po njem (1 μM, 10 min); CHO 215 NK1-R trajna celična linija in CHO 215 NK1-R trajna celična linija pred tretiranjem s SP (kontrola) in po njem (1 μM, 10 min). Celice CHO K₁ NK1-R so bile gojene v mediju z dodatkom 5 % FCS, celice CHO 215 NK1-R pa v mediju z dodatkom 5 % LLS. Spinski označevalci so MeFASL (10,3).

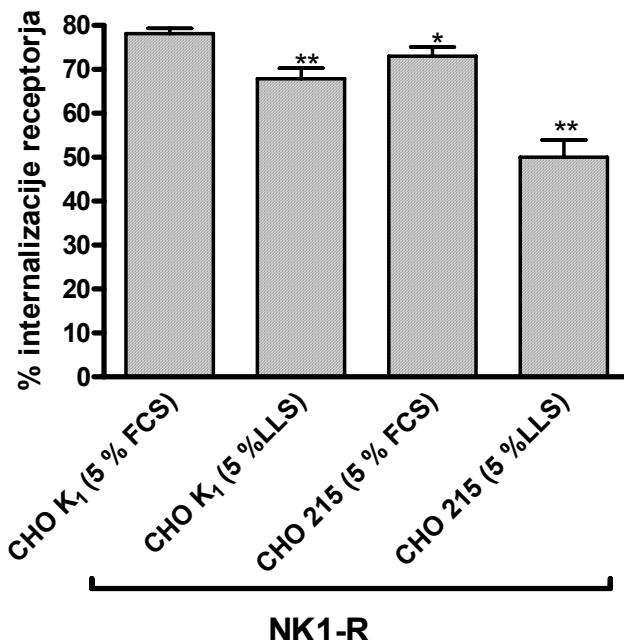
4.7 VLOGA LIPIDNIH RAFTOV/KAVEOL V INTERNALIZACIJI RECEPTORJA, AKTIVACIJI DRUGOTNE SPOROČILNE POTI IN INTERAKCIJI RECEPTORJA Z β -ARESTINI

4.7.1 Vpliv lipidnih raftov/kaveol na internalizacijo receptorja pri celicah CHO K₁ in CHO 215

Vlogo lipidnih raftov/kaveol v procesu internalizacije receptorja smo ugotavljali pri celicah CHO K₁ in CHO 215, prehodno transfeciranih z NK1-R, gojenih v komplettnem mediju (5 % FCS) in mediju brez holesterola (5 % LLS).

Pri celicah CHO K₁, gojenih v komplettnem mediju se je po 10-minutnem tretiranju z agonistom delež površinsko izraženega receptorja zmanjšal za ~78 %, pri celicah CHO K₁ gojenih v mediju brez holesterola, pa za ~67 %. Pri celicah CHO 215, gojenih na komplettnem mediju, je bila internalizacija NK1-R značilno nižja kot pri celicah CHO K₁, internaliziralo je ~73 % vseh površinskih receptorjev ($p < 0,05$, $n = 12$). Drugače kot pri celicah CHO K₁ pa je odsotnost holesterola v mediju pri celicah CHO 215 vodila do ~40-odstotnega znižanja internalizacije NK1-R v primerjavi s celicami CHO K₁ in celicami CHO 215 gojenimi v mediju s FCS (graf 16); znižanje je statistično značilno pri $p < 0,01$ in $n = 12$.

Dobljeni rezultati kažejo, da je funkcionalna neokrnjenost plazmamembrane pomembna za učinkovito internalizacijo NK1-R.



Graf 16: Internalizacija NK1-R v celicah CHO K₁ in CHO 215.

Internalizacija receptorja pri celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215, prehodno transfeciranih z NK1-R, gojenimi v mediju s holesterolom (5 % FCS) in mediju brez holesterola (5 % LLS). Internalizacijo smo izmerili po 10 minutni stimulaciji receptorja z agonistom. Odstotek internalizacije receptorja predstavlja srednjo vrednost s SD štirih neodvisnih poskusov; za vsak vzorec so bile opravljene tri ponovitve.

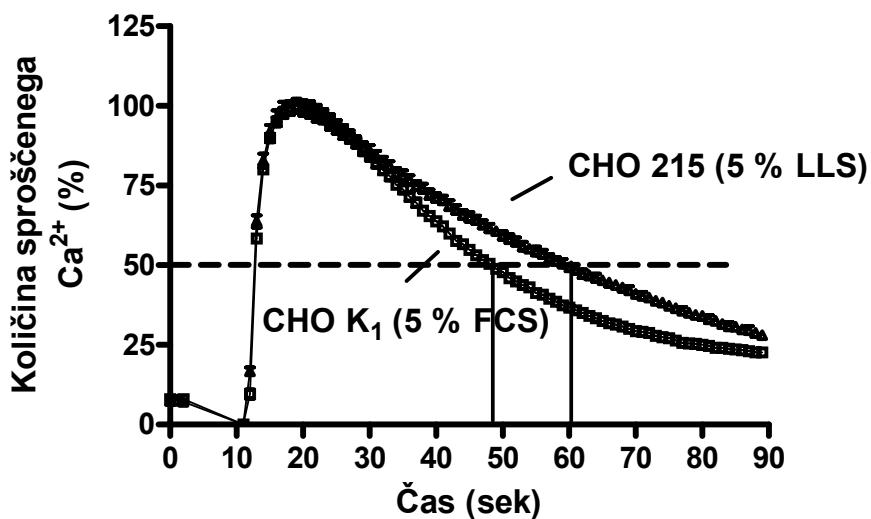
*Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$, $n = 12$; **Razlika je statistično značilna pri $p < 0,01$, $n = 12$.

4.7.2 Vpliv lipidnih raftov/kaveol na aktivacijo drugotne sporočilne poti pri celicah CHO K₁ in CHO 215

Aktivacijo drugotne sporočilne poti po spodbuditvi receptorja pri celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215 prehodno transfeciranih z NK1-R, gojenih v kompletнем mediju (5 % FCS) in mediju brez holesterola (5 % LLS) smo preverjali z merjenjem koncentracije znotrajceličnega Ca²⁺.

Pri obeh celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215 je najvišja koncentracija znotrajceličnega Ca²⁺ dosežena v 20 sekundah po dodatku agonista. Pri celicah CHO K₁ gojenih v mediju s holesterolom, je koncentracija znotrajceličnega Ca²⁺ dosegla 50-odstotno znižanje vrednosti v ~48 sekundah, pri celicah CHO 215 pa v ~60 sekundah (graf 17). Dobljeni rezultati tako lahko kaže na pomen lipidnih raftov/kaveol v oblikovanju multiproteinskih kompleksov med receptorjem in

adaptornimi proteini β -arestini, saj je za utišanje signala (znižanja ravni signalizacije), ki ga sproži spodbuditev receptorja z agonistom, med drugim potrebna ločitev G-proteina od receptorja (desenzibilizacija receptorja), kjer pomembno sodelujejo β -arestin 1 in 2.



Graf 17: Koncentracija znotrajceličnega Ca^{2+} .

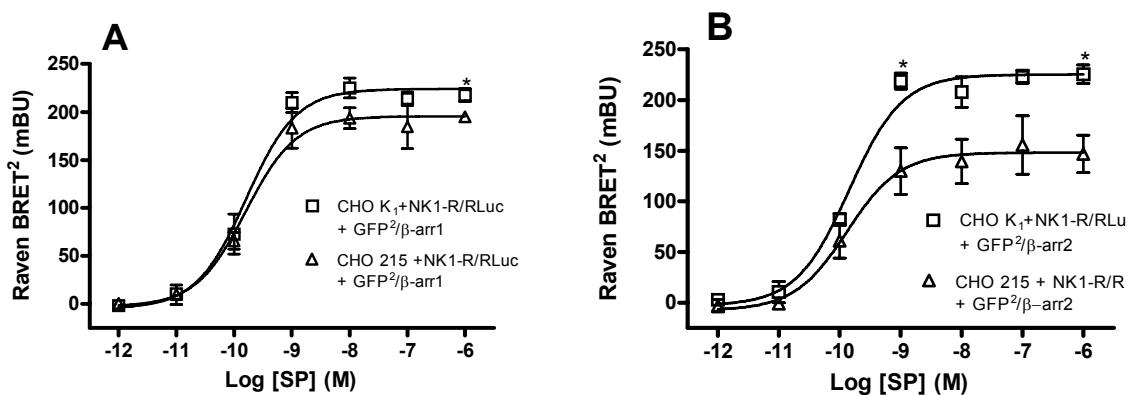
Prikazana je časovna odvisnost koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+} po aktivaciji receptorja pri celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215, prehodno transfeciranih z NK1-R, gojenih v kompletnem mediju (5 % FCS) ali v mediju brez holesterola (5 % LLS) na ploščah s 96 jamicami (št. celic na jamico = 30.000). Meritve so bile opravljene v štirih neodvisnih poskusih; za vsak vzorec so bile opravljene tri ponovitve. Prikazane so vrednosti enega reprezentativnega poskusa od štirih.

4.7.3 Vpliv lipidnih raftov/ kaveol na interakcijo med NK1-R in β -arestini

V nadaljevanju smo z metodo BRET² izmerili interakcijo med NK1-R in β -arestinoma 1 in 2 (β -arr 1 in β -arr 2). V ta namen smo celice CHO K₁ in CHO 215 prehodno transfecirali z NK1-R/RLuc in z GFP²/ β -arr1 ali GFP²/ β -arr2.

Pri celicah CHO 215 je bil z agonistom spodbujeni maksimalni signal BRET² (BRET_{max}) med receptorjem in β -arestinom 1 ~10 % nižji kot BRET_{max} pri celicah CHO K₁ (BRET_{max} (CHO 215) ~195 mBU v primerjavi z BRET_{max} (CHO K₁) ~217 mBU; značilno znižanje opazimo samo pri najvišji koncentraciji liganda ($p < 0,05$, $n = 9$). Večje znižanje (~35 %) v signalu BRET² smo opazili med receptorjem in β -arestinom 2 (BRET_{max} (CHO 215) ~147 mBU v primerjavi z BRET_{max} (CHO K₁) ~226 mBU; znižanje je statistično značilno pri $p < 0,05$ in $n = 9$) (graf 18A in B).

Dobljeni rezultati merjenja funkcionalne interakcije med NK1-R in β -arestinoma 1 in 2 po spodbuditvi receptorja z agonistom so potrdili naše domneve, saj je bila v odsotnosti lipidnih raftov/kaveol pri celicah CHO 215 funkcionalna interakcija med NK1-R in β -arestinoma 1 in 2 značilno zmanjšana, vsekakor pa so bile razlike v maksimalnem signalu BRET² bolj izražene med receptorjem in β -arestinom 2. Na podlagi tega rezultata lahko sklepamo, da spodbuditev NK1-R z agonistom vodi do nastanka multiproteinskih kompleksov med receptorjem in adaptornimi proteini β -arestini in da je pri tem pomembna razporeditev NK1-R in β -arestina 2 znotraj lipidnih raftov/kaveol.



Graf 18: Interakcija NK1-R z β -arestinom 1 ali 2 po aktivaciji receptorja z agonistom.

Prikazan je izmerjeni signal BRET² v prisotnosti naraščajoče koncentracije SP pri celicah CHO K₁ in CHO 215: (A) celice CHO K₁ in CHO 215, prehodno kotransfencirane z NK1-R/RLuc in GFP²/β-arr1; (B) celice CHO K₁ in CHO 215, prehodno kotransfencirane z NK1-R/RLuc in GFP²/β-arr2. Celice CHO K₁ so bile gojene v mediju s holesterolom (5 % FCS) in celice CHO 215 na mediju brez holesterola (5 % LLS). Rezultat predstavlja srednjo vrednost s SD treh neodvisnih poskusov; za vsak vzorec so bile opravljene tri ponovitve. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$, $n = 9$.

S poskusi, opravljenimi na celičnih linijah CHO K₁ in CHO 215, smo potrdili, da so območja lipidnih raftov in kaveol v plazmamembrani pomembna za:

- pravilno razporejanje NK1-R v plazmamembrani,
- afiniteto NK1-R za vezavo liganda,
- uravnavanje znotrajcelične signalizacije na ravni Ca²⁺,
- sposobnosti interakcije NK1-R z β -arestinom 2 in posledično internalizacijo NK1-R.

5 RAZPRAVA

5.1 PRIPRAVA IN FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA CELIČNE LINIJE HEK 293, TRAJNO TRANSFECIRANE Z AVTOFLUORESCENČNO OZNAČENIM AKTINOM β (pEYFP-AKTIN) IN NEVROKININSKIM RECEPTORJEM 1 (NK1-R)

Izbor metode za pripravo celičnih linij, ki trajno in stabilno izražajo visoko raven želenih proteinov, je zelo pomemben korak pri načrtovanju raziskav, pri katerih želimo proučevati strukturo in funkcijo proteinov v pogojih *in vitro*. Za pripravo trajne celične linije, ki izraža avtofluorescenčno označeni aktin β in predstavnika družina GPCR-jev, smo uporabili kombinacijo metode selekcije klonalnih celičnih linij z diskami za kloniranje in sortiranja celic s pretočnim citometrom. Z metodo ELISA, testom vezave radioaktivnega liganda ter farmakološkimi testi za ugotavljanje aktivacije drugotne sporočilne poti smo ugotavljali farmakološke lastnosti in delovanje NK1-R. Na ravni konfokalne mikroskopije in z uporabo farmakoloških agensov, ki delujejo na aktin, pa smo proučevali funkcionalne lastnosti pEYFP-aktina ter morebitno kolokalizacijo z endogenim aktinom β . S testom RT-PCR smo ugotavljali količino avtofluorescenčno označenega aktina (pEYFP-aktin) glede na celokupni aktin β v celicah.

S kombinacijo dveh metod smo želeli pridobiti trajno celično linijo, pri kateri bi raven površinsko izraženega NK1-R znašala $\sim 10.000/\text{celico}$ (Ostrom in Insel, 2004) in pri kateri raven pEYFP-aktina ne bi presegla 30-odstotnega deleža celokupnega aktina β v celici. Ugotovljeno je bilo namreč, da za normalno delovanje aktina delež avtofluorescenčno označenega aktina v celici ne sme presegati 30 % celokupnega aktina (Ludin in Matus, 1998). V prvotni selekciji, kjer smo posamezne kolonije osamili z diskami za kloniranje, je dobljena celična linija, kljub visoki ravni površinsko izraženega receptorja v primerjavi z drugimi kloni, izražala le 0,1 % avtofluorescenčno označenega aktina. Pojav nas ni presenetil, saj je pri selekciji celic z diskami za kloniranje pogosta kontaminacija z okolnimi celicami, ki morda ne izražajo želenih proteinov v dovolj visokih koncentracijah, ki pa med gojenjem selekcionirane

klonalne celične linije pogosto prerastejo in s tem kontaminirajo izbrano klunalno celično linijo (McFarland, 2000). Poleg kontaminacije klunalne celične linije v procesu selekcije je lahko nizek odstotek izražanja pEYFP-aktina tudi posledica utišanja genov zaradi njihovega položaja na heterokromatinu (Birchler in sod., 2000) ali posledica metilacije DNA (Hsieh, 2000). V študiji, kjer so v celicah poskušali izraziti tubulin β , označen z GFP-jem, naj bi bilo vzrok nizke ravni avtofluorescenčno označenega proteina posttranskripcjsko uravnavanje pri sintezi tubulina β (Ludin in Matus, 1998). Celice, ki so izražale najvišjo raven pEYFP-aktina, smo po selekciji s klunalnimi diskami še dodatno odsortirali s pretočnim citometrom, in pridobili celično linijo, v kateri je okoli 60 % celic izražalo pEYFP-aktin nad bazalno ravnjo; celična linija HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60%. Po opravljenem sortiranju smo s pretočnim citometrom izmerili tudi raven in stabilnost izražanja avtofluorescenčno označenega aktina v treh različnih pasažah. Pri celicah v zgodnjih pasažah (P3) je bila raven pEYFP-aktina enaka kot po opravljenem sortiranju in je znatno presegala vrednosti pri netransfenciranih celicah HEK 293 in celicah pred sortiranjem s pretočnim citometrom. V zgodnjih pasažah do P9 pa se je raven znižala in ostala nato v kasnejših pasažah (od P9 do P15) dokaj konstantna. V predhodnih študijah so poročali, da celica z mehanizmi avtoregulacije vzdržuje konstantno raven aktina (Leavitt in sod., 1987) in teoretično lahko z njimi pojasnimo tudi opaženi začetni padec (od P3 do P9) v izražanju pEYFP-aktina. S spremembami v avtofluorescenci, izmerjeni s pretočnim citometrom, se ujemajo tudi rezultati testa RT-PCR, ki so pokazali, da je raven izražanja mRNA za celokupni aktin β v celicah pri kasnejših pasažah (P9 in P15) primerljiva z izmerjeno ravnjo izražanja aktina β pri kontrolnih celicah HEK 293, nasprotno pa je pri zgodnjih pasažah (P3) in celični liniji pred sortiranjem višja. Dobljeni rezultat tako še dodatno nakazuje, da je začetni padec ravni pEYFP-aktina najverjetneje posledica avtoregulacijskih mehanizmov, s katerimi celica vzdržuje relativno stalno raven aktina v celici. Izmerjena raven površinsko izraženega NK1-R je bila po opravljenem sortiranju s pretočnim citometrom višja kot pri kontrolnih celicah in celicah pred sortiranjem in je v nasprotju z avtofluorescenčno označenim aktinom ostala izražena na enaki ravni tudi v kasnejših pasažah (P9 in P15). Aktivacija drugotne sporočilne poti po spodbuditvi receptorja z ligandom je bila pri celicah pred sortiranjem s pretočnim citometrom in po njem nespremenjena. To si

lahko razlagamo s stehiometrijo, tj. kvantitativnim ravnotežjem med številom receptorjev, pripadajočih G-proteinov in sporočilnih molekul (Milligan, 1996). Poleg ravni izražanja pEYFP-aktina smo v naslednjem koraku žeeli preveriti tudi njegov delež v celicah pred sortiranjem s pretočnim citometrom in po njem, ter preveriti delež pEYFP-aktina v primerjavi s celokupnim aktinom β (endogeni aktin + pEYFP-aktin). V predhodnih študijah je bilo namreč pokazano, da je za funkcionalno ohranjenost aktina pomembno, da raven fuzijskih proteinov, kot npr. pEYFP-aktina, v celicah ne sme presegati 30 % celokupnega proteina (Doyle in Botstein, 1996). Delež pEYFP-aktina in razmerje med pEYFP-aktinom in celokupnim aktinom β smo ugotavljali z metodo RT-PCR in ugotovili, da je bil delež avtofluorescenčno označenega aktina β višji pri celicah po sortiranju s pretočnim citometrom in da v nobeni izmed pasaž (od P3 do P15) ni presegal 30 % celokupnega aktina. Kljub temu da se raven izražanja mRNA za nek protein v celicah ne ujema vedno tudi z ravnjo izražanja tega proteina v celici, je dovolj zanesljiv kazalnik stabilnosti transfekcije ter pomaga pri oceni razmerja med označenim in celokupnim proteinom v celici. Funkcionalna okrnjenost z GFP-jem označenega aktina bi lahko bila bodisi posledica steričnih ovir, ki jih za protein predstavlja fluorescenčna oznaka (Westphal in sod., 1997), bodisi spremenjenega razmerja med različnimi izoformami aktina zaradi čezmernega izražanja aktina β (Ballestrem in sod., 1998). pEYFP je pri uporabljenem konstraktu na N-terminalnem koncu aktina β in tako naj ne bi oviral normalne konformacije in funkcionalnosti aktina (Verkhusha in sod., 2003; Westphal in sod., 1997). Seveda pa smo funkcionalnost aktina preverili tudi na ravni konfokalne mikroskopije, kjer smo pokazali kolokalizacijo med pEYFP-aktinom in aktinom, označenim z rodamin faloidinom. Kolokalizacija je bila prisotna tako pri netretiranih celicah kot pri celicah po spodbuditvi receptorja z agonistom. Podobno je bilo opisano tudi v primerljivih študijah (Ballestrem in sod., 1998; Herget-Rosenthal in sod., 2001). Poleg tega smo funkcionalnost aktina še dodatno preverili s farmakološkim agensom jasplakinolidom, za katerega je bilo pokazano, da v pogojih *in vitro* pospešuje polimerizacijo aktina, znižuje kritično koncentracijo monomernega aktina za polimerizacijo ter stabilizira nastale F-aktinske strukture (Bubb in sod., 1994; Visegrady in sod., 2004), nasprotno pa pri celicah v kulturi vodi do razpada aktinskih nitk in nastanka različno velikih aktinskih gmot, ki se različno razporedijo po

citoplazmi (Bubb in sod., 1994). Jasplakinolide je imel podoben vpliv tudi na pEYFP-aktin v trajni celični liniji, kjer smo avtofluorescenčno označene aktinske gmote opazili razporejene pod celično membrano in v perinuklearnem območju. Podobno prerazporeditev smo opazili tudi pri aktinu, označenem z rodamin faloidinom. Poleg nastanka aktinskih gmot pa je bilo opazno tudi slabše barvanje aktina z rodamin faloidinom, kar je posledica kompetitivne vezave med jasplakinolidom in faloidinom za ista vezna mesta na aktinu (Bubb in sod., 1994).

Dobljeni rezultati priprave in funkcionalne karakterizacije trajne celične linije HEK-NK1-R+pEYFP-aktin 60% so potrdili uporabnost kombinacije dveh metod za pripravo trajne celične linije, tj. klasične metode selekcije celic z diskami za kloniranje ter v drugem koraku dodatno sortiranje celic s pretočnim citometrom (Hrovat in sod., 2009). Oba izražena proteina (NK1-R in pEYFP-aktin) imata ohranjene funkcionalne lastnosti in zadostno raven izražanja. Dobljena trajna celična linija, ki izraža predstavnika družine GPCR-jev in avtofluorescenčno označeni aktin, je tako primerna za proučevanje vloge aktina v delovanju NK1-R in vloge NK1-R, ki aktivira sporočilno pot prek heterotrimernega proteina $G_{\alpha q/11}$ v reorganizaciji aktinskih filamentov v živih in fiksiranih celicah.

5.2 PRERAZPOREDITEV AKTINSKIH FILAMENTOV V CELICAH PO AKTIVACIJI GPCR-jev

V zadnjem desetletju je bilo pokazano, da se aktivacija GPCR-jev, pogosto ujema tudi s prerazporeditvijo aktinskih filamentov (Sah in sod., 2000). Največ objav poroča o vlogi GPCR-jev, ki delujejo prek heterotrimernih proteinov $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$ na aktivacijo proteinov RhoA in posledično reorganizacijo aktina v celicah, medtem ko je vloga preostalih heterotrimernih G-proteinov, predvsem $G_{\alpha q/11}$, v aktivaciji proteinov RhoA nejasna oz. so si podatki iz literature nasprotujoči (Barnes in sod., 2005; Dutt in sod., 2002; Vogt in sod., 2003). Aktivacija receptorjev, ki delujejo prek heterotrimernih proteinov $G_{\alpha i}$ in $G_{\alpha s}$, pa naj po podatkih iz literature ne bi privedla do aktivacije proteina RhoA in reorganizacije aktinskega citoskeleta (Dutt in sod., 2002; Sah in sod., 2000; Vogt in sod., 2003).

Pri delu smo se zato osredotočili na ugotavljanje morebitne posredovalne vloge posameznih podenot α heterotrimernih G-proteinov med aktiviranim GPCR-jem in RhoA. Proučevali smo organizacijo aktinskega citoskeleta po aktivaciji dveh receptorjev: i) NK1-R, ki aktivira sporočilno pot primarno prek $G_{\alpha q/11}$ (Khawaja in Rogers, 1996) in ii) β_2 -AR, ki aktivira sporočilno pot prek $G_{\alpha s}$ (Johnson, 1998). Organizacijo aktina po aktivaciji receptorjev smo nato primerjali z njegovim statusom v celicah, ki so prehodno izražale različne konstitutivno aktivne mutante podenot α heterotrimernih G-proteinov. S testi aktivacije drugotne sporočilne poti smo ugotavljali funkcionalno delovanje receptorjev in konstitutivno aktivnih mutant, spremembe v prerazporeditvi aktina smo opazovali s konfokalnim mikroskopom ter spremljali aktivacijo RhoA po aktivaciji receptorja ali prehodnem izražanju različnih konstitutivno aktivnih mutant.

Poleg farmakoloških lastnosti NK1-R in β_2 -AR, ki so se ujemale s podatki iz literature za oba receptorja (Vrecl in sod., 2006; Vrecl in sod., 2004), je po spodbuditvi NK1-R v citoplazmi celic HEK 293 prišlo tudi do polimerizacije in povezovanja F-aktina v višje organizirane tvorbe aktina, kot so stresni filamenti in ojačanje kortikalnega aktina. Podobne spremembe v razporeditvi aktina smo opazili že v naši predhodni študiji, in sicer po aktivaciji TRH, ki tako kot NK1-R aktivira sporočilno pot primarno

prek $G_{\alpha q/11}$ (Hrovat in sod., 2003). Aktivacija β_2 -AR pa nasprotno ni povzročila sprememb v organizaciji aktina v primerjavi s kontrolnimi celicami. Prerazporeditev aktina se je ujemala z aktivacijo RhoA po aktivaciji NK1-R, medtem ko aktivacija β_2 -AR ni vplivala na aktivnost RhoA. Podobne spremembe v prerazporeditvi aktina kot po aktivaciji NK1-R smo opazili tudi zatem, ko smo v celicah prehodno izrazili konstitutivno aktivne mutante $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$. Funkcionalnost konstitutivno aktivnih mutant smo preverjali z merjenjem skupnega IP, ki je bil povečan pri prehodnem izražanju $G_{\alpha q}$ in $G_{\alpha 11}$ in nespremenjen po prehodnem izražanju $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 13}$ in $G_{\alpha s}$. Naknadna aktivacija NK1-R s SP pri celicah, kotransfeciranih z $G_{\alpha q}$ in $G_{\alpha 11}$, ni povzročila dodatnega značilnega povečanja v koncentraciji skupnega IP v celicah, nasprotno pa je vodila do povišane koncentracije skupnega IP v celicah, kotransfeciranih z $G_{\alpha 12}$ ali $G_{\alpha 13}$, vendar je bila koncentracije skupnega IP nižja kot pri drugih testiranih kotransfeciranih celicah. Kotransfekcija celic HEK 293 z $G_{\alpha s}$ ni imela vpliva na raven skupnega IP po aktivaciji NK1-R. Za številne GPCR-je je bilo pokazano, da simultano lahko aktivirajo več podenot α heterotrimernega G-proteina, kar vodi do aktivacije več sporočnih poti v celici (Hermans, 2003). Poleg tega je bila za isti receptor pokazana tudi kompetitivna inhibicija med različnimi G-proteini (Kukkonen, 2004). Izmerjena nižja koncentracija skupnega IP pri celicah, kotransfeciranih s konstitutivno aktivnimi oblikami $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$ po aktivaciji NK1-R, ki aktivira sporočilno pot prek heterotrimernega proteina $G_{\alpha q/11}$, se ujema z vrednostmi, izmerjenimi pri drugih konstitutivno aktivnih mutantah. Znižanje tako lahko kaže na kompetitivno inhibicijo med $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$ ter $G_{\alpha q/11}$ za ista vezna mesta na NK1-R. Prehodno izražanje konstitutivno aktivnih mutant, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$, je v celicah vodilo do robustnih sprememb v prerazporeditvi fluorescenčno označenega aktina in povišane aktivacije proteina RhoA v primerjavi s kontrolo, vendar je bila njihova učinkovitost pri tem različna in je padala v naslednjem vrstnem redu: $G_{\alpha 13} > G_{\alpha 11} \geq G_{\alpha 12} \geq G_{\alpha q}$. Dobljeni rezultati se ujemajo s podatki iz literature, saj smo reorganizacijo aktina in nastanek stresnih filamentov opazili tako pri celicah, ki so prehodno izražale konstitutivno aktivne oblike $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$, kot tudi pri celicah po aktivaciji NK1-R in po prehodnem izražanju konstitutivno aktivnih $G_{\alpha q}$ in $G_{\alpha 11}$ (Gohla in sod., 1999; Le Page in sod., 2003; Sah in sod., 2000; Vogt in sod., 2003). S podatki iz literature se ujema tudi opažena višja učinkovitost podenot $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$ pri

aktivaciji RhoA v primerjavi s podenoto $G_{\alpha q}$ (Sah in sod., 2000). Podobno kot pri sorodnih študijah aktivacija β_2 -AR in prehodno izražanje $G_{\alpha s}$ nista vodila do sprememb v aktinskem citoskeletu (Dutt in sod., 2002; Vogt in sod., 2003). V tem sklopu nas je zato zanimalo, ali bi aktivacija sporočilne poti mimo $G_{\alpha s}$ po spodbuditvi β_2 -AR s funkcionalno specifičnim agonistom lahko privedla do prerazporeditve aktina. V ta namen smo uporabili funkcionalno specifični agonist karvedilol, ki prepreči prenos sporočila prek $G_{\alpha s}$, in aktivira MAPK (ERK 1/2) prek β -arestina (Wisler in sod., 2007). Za aktivacijo MAP-kinazne poti pa je potrebna predhodna fosforilacija receptorja, na katerega se nato vežeta β -arestin in kinaza c-Src (Kim in sod., 2008). Aktivirana kinaza Src pa v celicah med drugim lahko povzroči tudi prerazporeditev aktina (Luttrell, 2002). V prvem koraku smo s konfokalnim mikroskopom spremljali razporeditev aktina in izmerili aktivacijo proteina RhoA v celicah po tretiranju β_2 -AR s karvedilolom. V primerjavi s celicami, tretiranimi z agonistom (isoproterenol), kjer ni bilo opaziti razlik med kontrolo in tretiranimi celicami, se je po spodbuditvi receptorja s karvedilolom povečala citoplazemska površina, polimeriziral je aktina in nastale so tanke F-aktinske nitke, izražene predvsem na periferiji celic, prišlo pa je tudi do ojačanja v kortikalnem aktinu, ponekod na površini celic opazimo tudi nastanek filopodijev. Spodbuditev s karvedilolom pa ni vodila do nastanka vidnih stresnih filamentov in do povečanja koncentracije RhoA. Dobljene spremembe se ujemajo s podatki iz literature, saj vezava karvedilola na receptor vodi do aktivacije c-Src (Kim in sod., 2008), ki s svojim delovanjem na p190RhoGAP zavira aktivnost RhoA (Luttrell, 2002) in s tem tudi nastanek stresnih filamentov. Opažena razporeditev aktinskega citoskeleta pa vseeno nakazuje določen vpliv funkcionalno specifičnega agonista na družino Rho GTP-az. Pred kratkim je bilo pokazano, da kinaza Src med drugim lahko vodi do transaktivacije EGFR (Kim in sod., 2008), ki v celicah ureja delovanje različnih Rho GTP-az (Tang in Gross, 2003). Do aktivacije katere izmed poddružine Rho GTP-az (RhoA, Cdc 42 ali Rac) bo prišlo po aktivaciji EGFR, pa je odvisna od uporabljeni celične linije, načina aktivacije EGFR in različnih drugih dogodkov, ki privedejo do aktivacije EGFR (Yin in sod., 2008). Transaktivacija EGFR prek β_2 -AR in c-Src je povzročila tudi aktivacijo PLC γ 1 (Drube in sod., 2006), ki med drugim v celicah poleg direktnega vpliva na citoskelet lahko uravnava tudi delovanje Cdc 42 in Rac (Jones in Katan, 2007). Ti dve poddružini Rho GTP-az sodelujeta pri

nastanku filopodijev in lamelopodijev, polimerizaciji aktina na periferiji celic in formirjanju citoplazemskih podaljškov (angl. microspikes) (Hall, 1998), s čimer se teoretično ujemajo tudi morfološke spremembe v aktinskem citoskeletu po tretiranju celic s karvedilolom.

V nadaljevanju poskusov smo želeli preveriti, ali bi s prehodnim izražanjem konstitutivno aktivne mutante $G\alpha_s$ v celicah lahko zavrli s karvedilolom spodbujene spremembe v reorganizaciji aktina. Dobljeni rezultati so potrdili našo domnevo, saj je bila razporeditev aktina po spodbuditvi s karvedilolom podobna kot pri kontrolnih celicah in celicah, tretiranih z isoproterenolom. V predhodnih študijah sta bili pokazani direktna vezava $G\alpha_s$ na katalitično enoto c-Src in posledična aktivacija c-Src (Ma in sod., 2000), kar v sklopu dobljenih rezultatov pomaga pri razumevanju razporeditve aktina po aktivaciji β_2 -AR in prehodnem izražanju konstitutivno aktivne mutante $G\alpha_s$ v celicah. Prerazporeditev aktina po aktivaciji β_2 -AR je teoretično tako najverjetnejše posledica aktivacije c-Src z $G\alpha_s$, ki nato s svojim delovanjem na Rho GAP zmanjša količino aktivne oblike proteinov RhoA v celici in tako prepreči nastanek stresnih filamentov.

Z metodo BRET² smo nato želeli ugotoviti, ali aktivacija β_2 -AR s karvedilolom vodi do interakcije med β_2 -AR in pomožnim proteinom β -arestinom (Drake in sod., 2008; Violin in Lefkowitz, 2007). Prerazporeditev β -arestina 2 na membrano po aktivaciji receptorja s karvedilolom je bila namreč pokazana pri kimeri β_2 -AR s C-terminalnim koncem vazopresinskega receptorja (V2R) (Wisler in sod., 2007), poleg tega je bila pokazana tudi koimunoprecipitacija med β -arestinom 2 in β_1 -AR (Kim in sod., 2008). β_2 -AR spada v razred A GPCR-jev, ki vežejo β -arestin 2 z višjo afiniteto kot β -arestin 1 (Claing in sod., 2002), interakcija med β -arestinom 2 in receptorjem pa je šibka in prehodne narave (Oakley in sod., 2001). Da bi dosegli bolj stabilno povezavo med receptorjem in β -arestinom 2, smo za merjenje funkcionalne interakcije β_2 -AR/ β -arestin 2 z metodo BRET² po stimulaciji s karvedilolom uporabili mutanto β -arestina 2 (β -arr2 R393, 395E) z okvarjenim veznim mestom za vezavo komponent klatrinskega mešička, pri kateri je bil v predhodnih študijah izmerjeni signal BRET² bistveno višji in bolj stabilen od signala med receptorjem in divjo obliko β -arestina 2 (Vrecl in sod., 2004). Dobljeni rezultati so se ujemali s podatki iz literature, saj je bil signal BRET²

med β_2 -AR in β -arr2 R393, 395E po aktivaciji z agonistom skoraj 2-krat višji od signala BRET² med β_2 -AR in β -arestinom 2. Podobno smo opazili tudi po tretiranju celic s karvedilolom, kjer je bil signal BRET² med β_2 -AR in β -arr2 R393, 395E sicer nižji kot po stimulaciji receptorja z agonistom, a vseeno značilno višji ko pri bazalni interkaciji in interakciji med β_2 -AR in β -arestinom 2.

Ker je bila interakcija med β_2 -AR in β -arestinom 2 do danes opisana predvsem po aktivaciji receptorja z agonisti in je potrebna za internalizacijo receptorja (Laporte in sod., 2000), smo želeli preveriti, ali je aktivna konformacija, ki jo zavzame β -arestin 2 po aktivaciji receptorja z agonistom, enaka konformaciji po aktivaciji receptorja s funkcionalno specifičnim agonistom. V ta namen smo uporabili metodo intramolekularni BRET², tehniko, pri kateri z dvojno označenim β -arestinom 2, ki ima na N-končni del vezano luminiscentno oznako (RLuc) in na C-končni del fluorescenčno mutanto GFP-ja (GFP²), merimo konformacijske spremembe arestina po aktivaciji receptorja z agonistom (Charest in sod., 2005). Predvideva se, da stimulacija receptorja z agonistom vodi do spremembe v konformaciji β -arestina na način, da se obe oznaki dovolj zbližata, da se energija prenese od luminiscentnega donorja na fluorescenčni akceptor (Charest in sod., 2005). Z metodo intramolekularni BRET² smo tako z dvojno označeno mutanto β -arestina 2 (RLuc/ β -arr2 R393E, R395E/GFP²) ugotovili, da je bil po aktivaciji receptorja s karvedilolom izmerjeni signal BRET² značilno nižji, po aktivaciji receptorja z isoproterenolom pa višji od bazalnega signala. Dobljeni rezultat napeljuje na ugotovitev, da poleg različnih aktivnih konformacij, ki jih lahko zavzamejo receptorji pri vezavi različnih agonistov, simultano nastanejo tudi spremembe v aktivni konformaciji arestinov, ki se vežejo na receptor. V pred kratkim objavljeni študiji domnevajo, da se različne aktivne konformacije β -arestina 2 ujemajo z različnimi funkcijami, ki jih β -arestin 2 opravlja znotraj celic (Shukla in sod., 2008). Tako naj bi aktivna konformacija, ki jo β -arestin 2 zavzame ob stimulaciji β_2 -AR z isoproterenolom, vodila do desenzibilizacije receptorja, konformacija, ki jo β -arestin 2 zavzame ob aktivaciji receptorja s karvedilolom, pa do aktivacije sporočilne poti mimo G-proteina (Shukla in sod., 2008). Izmerjeni nižji intramolekularni signal BRET², lahko kaže na aktivno

konformacijo β -arestina 2, ki je potrebna za aktivacijo MAP-kinazne sporočilne poti, ne omogoči pa internalizacije receptorja.

V raziskavi nam je tako s pomočjo NK1-R in konstitutivno aktivnih mutant kljub nasprotujočim si podatkom iz literature uspelo potrditi postavljeni hipotezi, in sicer, da stimulacija GPCR-jev, ki se prednostno vežejo z $G_{\alpha q/11}$, vodi do preoblikovanja mreže aktinskih filamentov v celicah HEK 293 in da $G_{\alpha q/11}$ deluje kot posredovalni protein pri receptorsko spodbujeni prerazporeditvi aktinskih filamentov. Potrdili smo tudi posredovalno vlogo heterotrimernih proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ v tem procesu. Aktivacija β_2 -AR z agonistom kakor tudi izražanje konstitutivno aktivne $G\alpha_s$ nista vodila do reorganizacije aktina v celicah. Nasprotno pa smo razporeditev aktina, ki je neodvisna od RhoA, izzvali s tretiranjem β_2 -AR s funkcionalno specifičnim agonistom karvedilolom in hkrati osvetlili pomen konformacijskih sprememb v β -restinu 2 za ta proces. Do danes je to tudi prva študija, ki je z metodo BRET² pokazala interakcijo med divjo obliko β_2 -AR in β -restinom 2 po tretiraju celic s funkcionalno specifičnim agonistom, saj so bili poskusi v primerljivih študijah opravljeni zgolj na kimernih oblikah β_2 -AR. Prvi pa smo prikazali tudi od RhoA neodvisno razporeditev aktina po spodbuditvi β_2 -AR s funkcionalno specifičnim agonistom karvedilolom.

5.3 VLOGA AKTINSKEGA CITOSENKELETA V RAZPOREDITVI, INTERNALIZACIJI IN FUNKCIONALNEM POVEZOVANJUI MED NK1-R IN β -ARESTINOM 1 IN 2

V začetnem delu naloge smo ugotovili, da stimulacija GPCR-jev z agonistom in aktivacija drugotne sporočilne prek $G_{\alpha q/11}$ lahko vodita do preoblikovanja mreže aktinskih filamentov, v nadaljevanju naše raziskave pa smo proučili funkcionalni pomen aktinskega citoskeleta v razporeditvi, internalizaciji in funkcionalnem povezovanju med NK1-R in β -arestinom 1 in 2.

Spremembe v razporeditvi fluorescenčno označenega aktina, NK1-R, in β -arestinov 1 in 2 v prisotnosti agonista in farmakološkega sredstva citohalazina D, ki vpliva na polimerizacijo aktina, smo opazovali s konfokalnim mikroskopom, vlogo aktina v funkcionalni interakciji med β -arestinoma 1 in 2 in internalizaciji NK1-R pa smo spremajali z metodo BRET² in s testom internalizacije z radioaktivnim ligandom. V prvem koraku smo se osredotočili predvsem na funkcionalni pomen aktina v razporeditvi β -arestinov 1 in 2 po aktivaciji receptorja. NK1-R je receptor razreda B, kar pomeni, da z enako afiniteto veže β -arestina 1 in 2, s katerima skupaj preide v proces počasne defosforilacije in recikliranja (Claing in sod., 2002). S konfokalnim mikroskopom pridobljeni rezultati so se ujemali s podatki iz literature, po aktivaciji NK1-R z agonistom je bila namreč dobro vidna kolokalizacija med β -arestinoma 1 in 2 ter receptorjem. Po tretiraju celic s citohalazinom D, ki prepreči polimerizacijo aktina, je bila kolokalizacija med receptorjem in β -arestinoma 1 in 2 še vedno prisotna, v obeh primerih pa smo po stimulaciji receptorja z agonistom opazili, da je določen delež β -arestina v kompleksu z receptorjem ostal zadržan na celični membrani oziroma tik pod njo. Poleg povezovanja med receptorjem in β -arestinoma 1 in 2 smo opazili tudi kolokalizacijo obeh β -arestinov z aktinom. Kolokalizacija med β -arestinom 1 ter aktinom je bila opažena pri tretiranih celicah po 30-sekundni in 10-minutni stimulaciji receptorja z agonistom, med β -arestinom 2 ter aktinom pa samo po 30 sekundni stimulaciji receptorja z agonistom. Po delovanju citohalazina D na celice smo po tretiraju celic z agonistom ponovno opazili zaostajanje obeh β -

arestinov na celični membrane oziroma tik pod njo, kolokalizacije med nastalimi aktinskimi skupki in β -arestini nismo opazili.

Preliminarni rezultati na ravni konfokalnega mikroskopa so nakazovali vlogo aktinskega citoskeleta v razporeditvi receptorja in β -arestina 1 in 2 pri tretiranih celicah. Testi internalizacije NK1-R so deloma potrdili naše domneve, saj je bil odstotek internalizacije receptorja pri celicah HEK 293 pretretiranih s citohalazinom D, nekoliko nižji v začetni fazi internalizacije kot pri celicah, pri katerih je bil aktinski citoskelet ohranjen. Dobljene rezultate lahko delno pripisemo specifičnemu vplivu citohalazina D na različne višje organizirane tvorbe F-aktina v celicah. Tako se o citohalazinu D predvideva, da ima v celici večji vpliv na aktin, ki je na apikalnem področju celic, kar je bilo opisano tudi pri ledvičnih celicah psa Madin-Derby (angl. Madin-Derby kidney cells; MADK) in celicah CaCO 2 (Lamaze in sod., 1997). Podobne razlike v kinetiki internalizacije v začetnih fazah endocitoze pri celicah, pretretiranih s citohalazinom D, pa so bile opisane tudi pri receptorjih za transferin in α 2-mikroglobulin (Durrbach in sod., 1996; Engqvist-Goldstein in Drubin, 2003). Poleg vpliva na aktin na apikalnem delu membrane citohalazin D preprečuje tudi tvorbo stresnih filamentov (Lamaze in sod., 1997; Laroche in sod., 2005), kar potrjujejo tudi naši rezultati, saj je pri celicah po pretretiranju s citohalazinom D aktin v citoplazmi viden v obliki amorfnih skupkov. Počasnejše prehajanje NK1-R iz membrane v začetnih fazah endocitoze lahko nakazuje predvsem vlogo aktina v procesu kompartmentalizacije komponent klatrinskega mešička na omejenih območjih membrane (Yarar in sod., 2005). Predvideva se, da na teh mestih aktin deluje kot ogrodje, ki omogoča zbiranje komponent obloženega mešička na enem mestu. Pretretiranje celic z latrunkulinom B, ki tako kot citohalazin D preprečuje polimerizacijo aktina, je pri celicah vodilo do povečanega lateralnega gibanja komponent obloženega mešička (Engqvist-Goldstein in Drubin, 2003). Osrednjo posredovalno vlogo pri ločevanju obloženega mešička od membrane pripisujejo tudi dinaminu. Pri kvasovkah in sesalskih celicah je bila pokazana interakcija med dinaminom in kortaktinom ter Abp1p, dvema aktivatorjem na nastanka aktinskih filamentov (Jeng in Welch, 2001). Polimerizacija aktina v endocitozi odvisni od klatrina in dinamina je bila pokazana tudi na apikalni površini epitelijskih celic (Girao in sod., 2008). Zanimive pa so tudi raziskave, ki kažejo, da je na mestih odcepitve

mešička od membrane za interakcijo med dinaminom in kortaktinom potrebna predhodna polimerizacija aktina, saj pri celicah, pretretiranih s citohalazinom D, ni bilo interakcije med tema dvema proteinoma (Zhu in sod., 2005).

Naši rezultati pa kažejo tudi na vlogo aktinskega citoskeleta v razporeditvi in delovanju β -arestinov, ki z vezavo na receptor fizično preprečijo interakcijo med receptorjem in G-proteinom, z visoko afiniteto pa se vežejo tudi na $\beta 2$ -adaptinsko podenoto AP2 in nato s klatrinom (Ferguson, 2001). Preliminarni rezultati na ravni konfokalne mikroskopije so pokazali, da uničenje citoskeleta s citohalazinom D, ni vplivalo na razporejanje β -arestinov 1 in 2 na membrano po stimulaciji receptorja z agonistom. Nasprotno pa je bila ohranjenost aktina pomembna za prehajanje β -arestinov 1 in 2 iz membrane v področje citoplazme, saj je pretretiranje celic s citohalazinom D povzročilo, da je določen delež β -arestinov 1 in 2 v kompleksu z receptorjem ostal zadržan na membrani oz. pod njo. Rezultati merjenja internalizacije NK1-R v celicah MEF z izbitima genoma za β arestina 1 in 2 (MEF DKO β -arr 1/2) so pokazali, da pretretiranje celic s citohalazinom D ni vplivalo na internalizacijo NK1-R, posredovano z β -arestinom 2, deloma pa je zavrlo internalizacijo, posredovano z β -arestinom 1. Poleg merjenja internalizacije NK1-R smo z metodo BRET² izmerili tudi funkcionalno interakcijo med NK1-R in β -arestinom 1 ali 2 pri celicah HEK 293 z ohranjenim in poškodovanim aktinskim citoskeletom. Dobljeni podatki so pokazali, da je ohranjenost aktina pomembna predvsem za interakcijo med NK1-R in β -arestinom 1. Na podlagi dobljenih rezultatov pri celicah MEF DKO β -arr 1/2 in HEK 293 lahko sklepamo, da je vloga aktina pomembna predvsem za nemoteno delovanje β -arestina 1. Različni funkcionalni pomen aktina pri interakciji med receptorjem in β -arestini lahko nakazuje predvsem obstoj dveh tipov endocitoze, in sicer od β -arestina in aktina odvisne endocitoze in od β -arestina in aktina neodvisne endocitoze. Podobno je bilo opisano tudi pri receptorju za tromboksan A2, ki tako kot NK1-R spada v razred B GPCR-jev in je endocitoza receptorja pri celicah, kjer je bil aktin poškodovan, lahko normalno stekla samo s pomočjo β -arestina 2. Normalno delovanje β -arestina 1 pa je bilo pri celicah, kjer je bil aktin poškodovan, okvarjeno in posledično tudi receptorsko pogojena endocitoza (Laroche in sod., 2005). Različni funkcionalni pomen aktina pri delovanju β -arestinov 1 in 2 kljub 78-odstotni

homolognosti v sekvenci aminokislin med obema (Attramadal in sod., 1992) naj bi bil predvsem posledica različnega prerazporejanja β -arestinov 1 in 2 v celicah. Za β -arestin 1 je bilo tako pokazano, da je enakomerno razporen med frakcijami celice, ki so topne v tritonu, in tistimi, ki so v tritonu netopne, β -arestin 2 pa je predvsem v frakcijah, ki so v tritonu netopne (Santini in sod., 2000). Med frakcije, ki so v tritonu topne, spadajo predvsem citosolni proteini, med frakcije, ki so v tritonu netopne, pa pomožni proteini citoskeleta in membranske mikrodromene, bogate z glikozilfosfatidilinozitolom. Poskusi z latrunkulinom B so pokazali, da depolimerizacija aktina ni preprečila kompartmentalizacije β -arestina 2 (Santini in sod., 2000) in receptorja za transferin (Laroche in sod., 2005) znotraj membranskih mikrodromen, kar lahko kaže na neodvisnost β -arestina 2 od ohranjenosti aktina. Vzrok zato naj bi bila predvsem prerazporejanje β -arestina 2 v obloženih delih membrane in njegova povezanost s komponentami obloženega dela membrane, zaradi česar lahko kljub odsotnosti aktina β -arestin 2 še vedno nemoteno usmeri receptor v obložene dele membrane (Laroche in sod., 2005).

Naši podatki kažejo na funkcionalni pomen aktinskega citoskeleta v endocitozi NK1-R. Vloga aktina je bila izrazita predvsem v začetnih fazah endocitoze, in sicer: i) pri interakciji med receptorjem in β -arestinom 1 in ii) pri internalizaciji NK1-R, ki je odvisna od β -arestina 1.

5.4 VLOGA LIPIDNIH RAFTOV/KAVEOL V PRERAZPOREDITVI IN DELOVANJU GPCR-jev

V zadnjem desetletju je vse več dokazov o prerazporejanju GPCR-jev v področja lipidnih raftov in kaveol. Poleg GPCR-jev se na ta območja prerazporejajo tudi različni G-proteini in sporočilne molekule (Ostrom in Insel, 2004). Receptorji so na omejenih območjih membrane lahko razporejeni konstitutivno, lahko pa se prerazporejajo iz območij membrane po vezavi agonista in v ta območja ter nato vstopijo v celico v procesu endocitoze. Poleg vloge v endocitozi pa kompartmentalizacija GPCR-jev in molekul sporočilne verige znotraj raftov ureja predvsem hitrost prenosa sporočil po aktivaciji receptorja, ki zaradi visoke koncentracije molekul na omejenih področjih membrane traja le nekaj milisekund (Insel in sod., 2005b; Pike, 2009). Kljub številnim dokazom o prerazporejanju GPCR-jev in sporočilnih molekul znotraj lipidnih raftov in kaveol pa študije po večini poročajo o metodoloških ovirah, zaradi katerih natančnejše razumevanje vloge posameznih molekul v teh procesih oteženo. Rafti so povečini majhni (15–30 molekul sfingomielina in holesterola) in nestabilni – njihov življenjski čas je krajši od 1 ms; v tem pogledu je zato klasična mikroskopija (svetlobna, fluorescenčna) za proučevanje raftov neprimerena (Insel in sod., 2005a; Day in Kenworthy, 2009). Podobno velja za biokemijske metode, pri katerih rafte izoliramo z rabo različnih detergentov. Dobljene frakcije se med seboj razlikujejo po vsebnosti holesterola in sfingolipidov, zato je primerljivost izsledkov posameznih študij slabša (Insel in sod., 2005b; Ostrom in Liu, 2007). Farmakološke substance s katerimi celicam odvzamemo holesterol *in vivo*, imajo stranske učinke, predvsem na sporočilno pot po aktivaciji receptorja (Insel in sod., 2005b; Ostrom in Liu, 2007). Raba dominantno negativnih proteinov sicer pomeni obetaven pristop v študijah funkcionalnosti proteinov, žal pa dominantno negativne mutante pogosto ne zavrejo popolnoma izražanja endogenih proteinov (Bear in sod., 2001; Sheppard, 1994).

Celice CHO 215, ki smo jih uporabljali pri našem delu, zaradi okvare v dekarboksilaciji 4-karboksisterola v mediju, osiromašenem s holesterolom, ne tvorijo lipidnih raftov (Plemenitas in sod., 1990; Zheng in sod., 2001). Celice imajo zato čisto genetsko ozadje in so nam omogočile proučevanje vloge lipidnih raftov/kaveol v: i)

urejenosti celične membrane in prerazporejanju NK1-R v urejena območja membran ter vpliv izražanja NK1-R na domensko strukturo plazmamembane, ii) delovanju NK1-R po aktivaciji z agonistom in iii) učinkovitem spajanju NK1-R s proteinskimi partnerji. Za kontrolo smo pri delu uporabljali celice CHO K₁.

V prvem koraku raziskave smo pri celicah CHO 215 z merjenjem holesterola s testom RT-PCR in opazovanjem razporeditve aktinskega citoskeleta in kaveolina s konfokalnim mikroskopom spremljali lastnosti celične linije kot sredstva za proučevanje lipidnih raftov in kaveol ter jih primerjali s kontrolnimi celicami CHO K₁. Za proučevanje vloge lipidnih raftov v urejenosti/fluidnosti celične membrane smo uporabili metodo spektrometrije EPR z lipofilnim spinskim označevalcem MeFASL (10,3), ki se je že predhodno izkazala za ustrezno tehniko za detekcijo in proučevanje heterogenosti plazmamembrane (Arsov, 2004; Koklic in sod., 2005) ter ugotavljanja mikrolokalizacije GPCR-jev znotraj omejenih mikrodomen membrane (Kubale in sod., 2007). Metodo EPR smo dopolnili še s kondenzacijsko metodo GHOST, ki nam je omogočala boljši vpogled v strukturo membranskih domen (Koklic in sod., 2005).

Dobljeni rezultati so pokazali, da je bila izmerjena koncentracija holesterola pri celicah CHO 215, gojenih na mediju osiromašenem s holesterolom, nižja kot pri kontrolnih celicah CHO K₁ in se ujemajo s podatki iz predhodne študije (Zheng in sod., 2001). Raven izražanja mRNA za kaveolin 1 je bila pri celični liniji CHO 215 primerljiva s celicami CHO K₁, nasprotno pa je bila znotrajcelična razporeditev autofluorescenčno označenega kaveolina 1 pri celicah CHO 215 drugačna kot pri celicah CHO K₁. Pri kontrolnih celicah je bil kaveolin 1 večinoma razporen vzdolž plazmamembrane, pri celicah CHO 215 pa je bil v obliki skupkov zadržan v bližini jedra. Dobljeni rezultat nakazuje, da so lipidni rafti pomembni za normalno razporejanje kaveolina 1, saj je bila razporeditev autofluorescenčno označenega kaveolina 1 pri celicah CHO 215, kljub enaki ravni mRNA za kaveolin 1 kot pri celicah CHO K₁, okvarjena. Iz literature vemo, da so kaveole zaradi strukturnih podobnosti poddomena lipidnih raftov in se od lipidnih raftov razlikujejo predvsem po signalnih molekulah, ki jih lahko izoliramo iz kaveol in iz lipidnih raftov, ter prisotnosti poteina kaveolin 1 (Ostrom in Insel, 2004). Prav tako pri izolaciji lipidnih raftov in kaveol iz membrane z različnimi detergenti dobljenih frakcij zaradi podobne sestave med seboj

ne moremo ločevati, kaveole pa iz lipidnih raftov lahko izoliramo zgolj z imunocitokemičnimi metodami (Aspenstrom, 1999). Pri celicah CHO 215 pa smo opazili tudi drugačno razporeditev aktina kot pri kontrolnih celicah, predvsem odsotnost kortikalnega aktina in prisotnost prominentnih stresnih filamentov. Aktinski filamenti sodelujejo v sidranju kaveol na membrano in se lahko z njimi povezujejo direktno ali indirektno preko proteina filamina (Anderson, 2006; Popowicz in sod., 2006), razporeditev aktinskega citoskeleta pri celicah CHO 215 je teoretično skladna s temi podatki, saj je odsotnost kortikalnega aktina lahko posledica nenormalnega sidranja aktina na področju membrane. Primerjava spektrov EPR in maksimalnega hiperfiznega razcepa, odčitanega neposredno iz spektrov, je nakazovala večjo urejenost membrane pri celicah CHO K₁. Podobno smo opazili tudi na diagramih GHOST, kjer je poleg znižanih parametrov urejenosti posameznih domen pri celicah CHO 215 v primerjavi s celicami CHO K₁ v vseh treh domenah skrajšan tudi rotacijski korelacijski čas, ki kaže na hitrejše rotacijsko gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca v posamezni domeni in s tem na manjšo urejenost v domenski strukturi plazmamembrane pri celicah CHO 215.

V nadaljevanju raziskave smo spremljali vpliv izražanja NK1-R na domensko strukturo plazmamembane in funkcionalni pomen prerazporejanja NK1-R znotraj membranskih mikrodomen. V ta namen smo celice CHO K₁ in CHO 215 trajno transfecirali z NK1-R. Prisotnost receptorja v celični membrani pri trajnih celičnih linijah CHO K₁ NK1-R in CHO 215 NK1-R je pri obeh celičnih linijah privedla do manjših sprememb v spektrih EPR v primerjavi s kontrolo, razlike v $2A_{max}$ med celicami CHO K₁ NK1-R in CHO K₁ so nakazovale, da je izražanje receptorja v membrani povzročilo večjo fluidnost membrane, medtem ko pri celicah CHO 215 NK1-R v primerjavi s celicami CHO 215 tega nismo opazili. Na diagramih GHOST je bilo samo pri celicah CHO K₁ NK1-R opaziti rahlo zbliževanje med domenama 1 in 2 (D1 in D2), pri celicah CHO 215 NK1-R sprememb na diagramu GHOST nismo opazili. Pri celicah CHO K₁ NK1-R je prisotnost receptorja v membrani zvišala ureditveni parameter predvsem v D1 in delno v D2, povečan pa je tudi delež D2 in D3 tj. delež manj urejenih domen. Pri celicah CHO 215 NK1-R pa je prisotnost receptorja v membrani zvišala ureditveni parameter samo v D1 in D3, v D2 pa se je v primerjavi s celicami CHO 215 ureditveni parameter zmanjšal, povečan pa je tudi

delež D3. V primerjavi s celicami CHO 215 pa je bil pri celicah CHO 215 NK1-R podaljšan tudi korelacijski čas v vseh treh domenah. Dobljeni rezultat pri celicah CHO K₁ NK1-R tako lahko kaže na prehod določenega deleža receptorja v urejena območja membrane, tj. D1 in D2, ali razporejanje receptorja na mejnih področjih D1 in D2. Za D1 je bilo opisano, da vsebuje večje količine holesterola in visoko zasičenih maščob, kar je predvsem značilno za rafte, zato nekateri menijo, da D1 predstavlja lipidne rafte (Simons in Ikonen, 2000). Poleg tega na povišano fluidnost membrane kaže tudi povečan delež domen z nižjo urejenostjo, tj. D2 in D3. Znotraj tega bi lahko dobljene spremembe fluidnosti membrane pri celicah CHO K₁ NK1-R kazale na razporejanje receptorja znotraj lipidnih raftov oziroma na mejnem delu plazmamembrane z lipidnimi rafti. Pri celicah CHO 215 NK1-R brez lipidnih raftov sprememb v urejenosti membrane, ki bi lahko kazale na razporejanje receptorja znotraj raftov, nismo opazili oziroma so manj izražene kot pri celicah CHO K₁ NK1-R. Podobne spremembe v urejenosti membrane, kot pri celicah CHO K₁ NK1-R so bile opisane pri celicah HEK 293, izražanje dominantno negativne oblike kaveolina 1 pa je vodilo do podobnih sprememb v urejenosti membrane, kot smo jih opazili pri celicah CHO 215 NK1-R (Kubale in sod., 2007). Spinski označevalec MeFASL (10,3), ki smo ga uporabljali za označevanje lipidnega dvoslojnika, ima doksilni obroč z nitroksidno skupino vezan na petem C-atomu alkilne skupine in kaže predvsem gibanje lipidov na zunanjem območju lipidnega dvoslojnika (Garvas, 2007). Do danes je bil spinski označevalec MeFASL (10,3) uporabljen za proučevanje vloge domenskih struktur membrane v prerazporeditvi GPCR-jev samo pri celicah HEK 293 (Kubale in sod., 2007). Uporabljen pa je bil tudi pri spremljanju urejenosti membrane različnih vrst malignih celic (različni tipi tumorskih celic dojke in celic adenokarcinoma materničnega vratu) v primerjavi z nemalignimi celicami, kjer je bila pokazana večja fluidnost membrane pri malignih celicah, na diagramih GHOST pa je bilo opisano povečano število domen (namesto treh domen jih je bilo opaziti pet) v eksponentni fazi rasti malignih celic (Koklic in sod., 2005).

V nadaljevanju smo z radioaktivnimi testi (test vezave radioaktivno označenega liganda, internalizacija receptorja) in merjenjem aktivacije drugotne sporočilne poti želeli ugotoviti, ali je mikrolokalizacija pomembna za normalno delovanje receptorja. Z radioaktivnim ligandom smo pokazali, da je pri celicah CHO 215 NK1-R v

primerjavi s celicami CHO K₁ NK1-R afiniteta za vezavo liganda višja in da je bila internalizacija receptorja po vezavi radioaktivno označenega liganda pri celicah CHO 215 NK1-R v primerjavi s celicami CHO K₁ NK1-R bistveno nižja. Poleg tega je bila po spodbuditvi NK1-R z agonistom pri celični liniji CHO 215 ugotovljena počasnejša desenzibilizacija na ravni znotrajceličnega Ca²⁺ kot pri celicah CHO K₁. Oba rezultata nakazujeta vlogo lipidnih raftov in kaveol tako v internalizaciji receptorja kot pri aktivaciji drugotne sporočilne poti. Dobljeni rezultati se ujemajo tudi s podatki iz literature, saj je bila za NK1-R ugotovljena nižja internalizacija pri celicah z odstranjениm holesterolom in pri celicah po izražanju dominantno negativne oblike kaveolina 1. Poleg internalizacije receptorja je bila spremenjena tudi njegova signalizacija (Kubale in sod., 2007; Monastyrskaya in sod., 2005). Vloga lipidnih raftov/kaveol pa je bila pri celicah HEK 293 pomembna tudi za učinkovito spajanje receptorja z β-arestinom 2 (Kubale in sod., 2007). Počasnejša desinzibilizacija NK1-R pri celicah CHO 215 po stimulaciji z agonistom lahko nakazuje slabšo interakcijo med NK1-R in β-arestini. S pomočjo metode BRET² smo to tudi potrdili, saj je bila v odsotnosti lipidnih raftov/kaveol pri celicah CHO 215 funkcionalna interakcija med NK1-R in β-arestinom 2, in ne β-arestinom 1, zmanjšana. Interakcija med NK1-R in β-arestinom 2 je bila zmanjšana tudi pri celicah HEK 293 po izražanju dominantno negativne oblike kaveolina 1 ali po ekstrakciji holesterola z dimetil-beta-ciklodekstrinom (MβCD) (Kubale in sod., 2007). Zmanjšana interakcija med NK1-R in β-arestinom 2 pri celicah brez lipidnih raftov je najverjetneje posledica primarnega razporejanja β-arestina 2 znotraj lipidnih raftov (Laroche in sod., 2005), kar pa ne velja za β-arestin 1.

Naši rezultati tako kažejo na vlogo lipidnih raftov/kaveol v: i) mikrolokalizaciji receptorja NK1-R na membrani, ii) delovanju receptorja po stimulaciji z agonistom in iii) funkcionalni interakciji med NK1-R in β-arestinom 2. Celična linija CHO 215 je tako obetavno sredstvo za proučevanje vloge membranskih mikrodomen v delovanju GPCR-jev.

6 POVZETEK

Citoskeletu se poleg številnih mehanskih funkcij, ki jih opravlja v celici, pripisuje vse bolj aktivna vloga tudi v uravnavanju delovanja številnih receptorjev. Pri svojem delu smo se osredotočili predvsem na vlogo aktinskega citoskeleta v delovanju receptorjev iz družine GPCR-jev in preverjali naslednje hipoteze: i) spodbuditev GPCR-jev, ki se prednostno vežejo z $G_{\alpha q/11}$, vodi do preoblikovanja mreže aktinskih filamentov in sprememb v celični morfologiji, ii) $G_{\alpha q/11}$ deluje kot posredovalni protein pri receptorsko spodbujeni prerazporeditvi aktinskih filamentov, iii) izražanje β -arestina 1 je pomembno za receptorsko spodbujeno prerazporeditev aktinskih filamentov in iv) spodbuditev z agonistom privede do oblikovanja multiproteinskih kompleksov med receptorji, adaptornimi proteini in aktinom.

V začetku raziskave smo pripravili celično linijo, ki trajno izraža predstavnika družine GPCR-jev, tj. NK1-R in avtofluorescenčno označeni aktin β (pEYFP-aktin), in potrdili funkcionalnost in neokrnjenost izraženih proteinov.

Spremembe v reorganizaciji aktina pa smo v nadaljevanju proučevali tudi v celicah, prehodno transfeciranih z NK1-R ali β_2 -AR ter različnimi konstitutivno aktivnimi mutantami podenot α heterotrimernega G-proteina. Na ravni konfokalne mikroskopije smo ugotovili, da sta aktivacija NK1-R in prehodno izražanje konstitutivno aktivnih mutant podenot α heterotrimernih G-proteinov $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$ in $G_{\alpha 13}$ v celicah vodila do robustnih sprememb v prerazporeditvi avtofluorescenčno označenega aktina in nastanka stresnih filamentov ter povišane aktivnosti proteina RhoA. Nasprotno pa aktivacija β_2 -AR kakor tudi prehodno izražanje konstitutivno aktivne oblike $G_{\alpha s}$ nista povzročila sprememb v reorganizaciji aktina kakor tudi ne zvišanja aktivnosti RhoA. Znotraj tega sklopa smo osvetlili tudi delovanje funkcionalno specifičnega agonista β_2 -AR karvedilola, ki ne aktivira z G-proteini, temveč z β -arestini posredovano znotrajcelično sporočilno pot. Vezava karvedilola na β_2 -AR je privedla do polimerizacije aktina in nastanka tankih F-aktinskih nitk, izraženih predvsem na periferiji celic, ter ojačanja v kortikalnem aktinu, ponekod smo na površini celic opazili tudi nastanek filopodijev, nismo pa opazili nastanka stresnih filamentov in povišane aktivnosti RhoA. S kotransfekcijo celic s konstitutivno aktivno mutanto $G_{\alpha s}$ smo v

nadaljevanju zavrl s karvedilolom povzročene spremembe v razporeditvi aktina. Po stimulaciji receptorja s karvedilolom smo pokazali tudi interakcijo med β_2 -AR in β -arestinom 2, ki je potrebna za aktivacijo sporočilne poti, neodvisne od G-proteina. Z metodo intramolekularni BRET² smo pokazali, da je konformacija β -arestina 2 pri tem drugačna kot po aktivaciji receptorja z agonistom.

V drugem delu naloge smo se osredotočili predvsem na vlogo aktina v procesu internalizacije NK1-R in na funkcionalni pomen aktina v oblikovanju proteinsko–proteinskih povezav med NK1-R in β -arestinoma 1 in 2. Dobljeni rezultati so pokazali, da je vloga aktina izražena predvsem v začetnih fazah endocitoze NK1-R, poleg tega je aktin pomemben tudi pri interakciji med receptorjem in β -arestinom 1 in prehajanju kompleksa receptor/ β -arestin v notranjost celice.

V tretjem delu naloge pa smo proučevali pomen mikrolokalizacije NK1-R na omejenih območjih plazmamembrane in v ta namen uporabili celično linijo CHO 215 z okvarjeno dekarboksilacijo 4-karboksisterola in posledično nezmožnostjo tvorbe lipidnih raftov. Z metodo EPR in diagrami GHOST pa smo pokazali tudi večjo fluidnost membrane pri celicah brez lipidnih raftov in razporejanje NK1-R v urejenih območjih membrane, ki po vsej verjetnosti predstavljajo lipidne rafte. Dobljeni rezultati so pokazali, da lipidni rafti/kaveole igrajo pomembno vlogo v razporeditvi kaveolina 1 in aktina, učinkovitem celičnem signaliziranju, internalizaciji receptorja in interakciji receptorja z β -arestinom 2. Do danes je to prva študija, ki je v genetsko čistem ozadju pokazala vlogo lipidnih raftov/kaveol v urejenosti plazmamembrane ter mikrolokalizaciji NK1-R in njenem pomenu za delovanje NK1-R.

7 SUMMARY

In addition to several mechanical functions, the cytoskeleton is a major participant in the regulation and function of numerous receptors within the cell. The aim of this thesis was to establish the role of actin filaments in several aspects of GPCR regulation and function, in this view the following hypotheses were tested: i) the activation of $G_{\alpha q/11}$ coupled GPCRs results in the actin filaments rearrangement and changes in cell morphology, ii) receptor induced actin filaments rearrangement is a $G_{\alpha q/11}$ mediated event, iii) the β -arrestin 1 expression is important for the receptor induced actin filaments rearrangement and iv) the activation of the receptor with agonist leads to formation of multiprotein complexes between the receptor, adaptor proteins and actin.

In our study we firstly established a cell line stably expressing a GPCR, namely NK1-R and autofluorescently tagged actin (pEYFP-actin) and demonstrated the functionality and integrity of the expressed proteins.

Next, we studied the actin cytoskeleton rearrangement in cells transiently expressing NK1-R and β_2 -AR as well as several constitutively active mutants (CAM's) of heterotrimeric G-proteins. Using confocal microscope we showed that the activation of NK1-R, as well as the transient expression of CAMs of $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$ and $G_{\alpha 13}$, resulted in the reorganization of actin filaments and robust stress fiber formation, as well as the activation of RhoA. On the contrasts the activation of β_2 -AR, as well as transient expression of $G_{\alpha s}$, had no such effect. In this view we studied the function of the β_2 -AR biased ligand carvedilol that activates the β -arrestin but not the G-protein dependent signalling in the actin cytoskeleton reorganization. The activation of β_2 -AR with carvedilol resulted in the polymerization of actin and the formation of thin F-actin filaments located at the cell periphery, in addition the enhancement in the cortical signal belonging to cortical actin and phalloidia formation was also observed, however no stress fibers were seen and the concentration of RhoA remained unchanged. Additionally, the coexpression of CAM of $G_{\alpha s}$ inhibited the carvedilol induced changes in actin cytoskeleton. Next, we demonstrated a functional interaction between β_2 -AR and β -arrestin 2 after the stimulation of the receptor with

carvedilol, required for the G-protein independent signalling. With the intramolecular BRET² method we also observed a distinct conformation of β -arrestin 2 as oppose to the one seen after the activation of β_2 -AR with the agonist.

In the second part of the thesis we studied the role of actin in the NK1-R internalization and functional protein-protein interactions between the NK1-R and β -arrestin 1 and 2. Our data demonstrated the importance of actin cytoskeleton in the NK1-R endocytosis, which was especially prominent during the early stages of endocytosis. Our data also showed that functional coupling of NK1-R with β -arrestin 1 and the translocation of the receptor/ β -arrestin complex from the cell membrane can be actin-dependent.

In the third part of the thesis we studied the role of NK1-R plasma membrane microlocalisation. To study this we employed a CHO 215 cell line with the primary metabolic defect located at the level of 4-carboxysterol and therefore lacking lipid rafts. The characterization of the plasma membrane properties using EPR spectroscopy supplemented with GHOST condensation routine showed a less ordered domain structure of the plasma membrane in cell line lacking lipid rafts and the NK1-R distribution in well ordered domain or alternatively at the boundaries of the middle and well ordered domains. Our data showed the role of lipid rafts/caveolae in the caveolin 1 distribution, actin cytoskeleton rearrangement, agonist induced cell signalling, internalization and functional interaction with β -arrestins, in particular with β -arrestin 2. This is the first study performed in the genetically homogenous environment that has demonstrated the role of lipid rafts/caveolae in plasma membrane domain structure, as well as NK1-R microlocalisation, and its relevance for the NK1-R functional integrity.

8 SKLEPI

1. **GPCR-ji, ki se prednostno vežejo z $\text{G}\alpha_{q/11}$, povzročijo od RhoA odvisno preoblikovanje mreže aktinskih filamentov.**
2. **$\text{G}\alpha_{q/11}$ deluje kot posredovalni protein pri receptorsko spodbujeni prerazporeditvi aktinskih filamentov.**
3. **Tretiranje GPCR-jev, ki se prednostno vežejo z $\text{G}\alpha_s$, s funkcionalno specifičnim agonistom, privede do prerazporeditve aktinskega citoskeleta, ki je neodvisna od RhoA in odvisna od β -arestina.**
4. **Neokrnjenost aktinskega citoskeleta je pomembna za endocitozo NK1-R posredovano z β -arestinom 1, in za učinkovito interakcijo med β -arestinom 1 in NK1-R.**
5. **Celična linija CHO 215 je primerno sredstvo za proučevanje lipidnih raftov in kaveol ter njihove vloge v delovanju GPCR-jev.**
6. **Mikrolokalizacija NK1-R v plazmamembrani je pomembna za učinkovitost z agonistom spodbujene signalizacije, internalizacijo in oblikovanje proteinskih povezav receptorja z adaptornimi proteini.**

9 ZAHVALA

Naloga je bila opravljena na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Najprej in najbolj bi se zahvalila svoji mentorici dr. Milki Vreci za: navdih, potrpežljivost, napotke, učenje, poslušanje, učenje vztrajnosti, nepopustljivost, pomoč pri številnih odločitvah in ne nazadnje, da sem lahko pod njenim mentorstvom končala doktorsko nalogo.

Za spodbudo, nasvete, poslušanje, potrpežljivost in za to, da mi je omogočila izdelavo doktorske naloge pod mentorstvom dr. Vreclove ter da nikoli ni obupala nad mano, se iskreno zahvaljujem predstojnici Inštituta prof. dr. Azri Pogačnik.

Za možnost opravljanja meritve EPR, pomoč pri delu in koristnim napotkom bi se rada zahvalila vsem sodelavcem Laboratorija za biofiziko, EPR centra na Inštitutu Jožef Stefan (dr. Marjeta Šentjurc, dr. Janez Štrancar, dr. Tilen Koklič, dr. Zoran Arsov, dr. Daniele Biglino in tehničnima sodelavkama Marjani Nemec in Sandri Kure).

Za opravljeno sortiranje celic s pretočnim citometrom bi se rada zahvalila dr. Apoloniji Bedina - Zavec s Kemijskega inštituta.

Za celično linijo CHO 215 in CHO K₁ ter opravljene meritve skupnega holesterola v celicah bi se rada zahvalila prof. dr. Ani Plemenitaš in tehnični sodelavki Mileni Marušič z Inštituta za biokemijo na Medicinski fakulteti.

Za sodelovanje pri delu s konfokalnim mikroskopom ter za koristne nasvete in napotke bi se rada zahvalila prof. dr. Robertu Frangežu z Inštituta za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo.

Za pomoč in koristne napotke, se zahvaljujem predvsem tehnični sodelavki na Inštitutu Magdaleni Dobravec in dr. Marku Cotmanu. Za pomoč pri delu se zahvaljujem tudi tehnični sodelavki na Inštitutu Jasni Šporar, ter dr. Matjažu Uršiču in Jerneju Alifu za pomoč pri odpravljanju računalniških ovir.

Za pomoč pri meritvah absorbance se želim zahvaliti tehničnima sodelavcema Boštjanu Drolcu z Inštituta za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo in tehnični sodelavki Alenki-Magdaleni Usenik z Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo.

Zahvala gre tudi dr. Valentini Kubale - Dvojmoč, katere spisani rezultati, raziskovalno delo in shranjeni računi ter urejeni dokumenti so mi olajšali marsikatero dodatno delo. Za lektoriranje slovenskega besedila naloge se zahvaljujem Nedi Miloš in mag. Giti Grečs - Smole za pregled seznama literature.

Za lektoriranje angleškega dela besedila naloge se zahvaljujem Gregorju Zajcu.

Ne nazadnje sem se dolžna zahvaliti vsem drugim sodelavcem (Branku Travnikarju – tehnična pomoč; prof. dr. Gregorju Fazarincu, prof. dr. Jelki Zabavnik-Piano in bivši sodelavki doc. dr. Malan Štrbenc) z Inštituta za anatomijo, histologijo in embriologijo, ki so mi na različne načine pomagali pri izdelavi naloge, ter za njihovo ljubeznost in potrpežljivost.

Za vse duhovne in praktične spodbude, razumevanje, potrpežljivo poslušanje, goreče navdušenje in predvsem za to, da verjame vame, se zahvaljujem svoji mami Ireni Kafol.

10 LITERATURA

- Anderson GP (2006). Current issues with beta2-adrenoceptor agonists: pharmacology and molecular and cellular mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 31: 119-30.
- Anon (2004). The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* 3: 575, 577-626.
- Arsov Z (2004). Študij lateralne strukture bioloških membran z EPR: disertacija. Ljubljana: Fakulteta za matematiko in fiziko, 92 str.
- Aspenstrom P (1999). The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 246: 20-5.
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C et al (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267: 17882-90.
- Baldwin JM (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 12: 1693-703.
- Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Imhof BA (1998). Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 12): 1649-58.
- Barnes WG, Reiter E, Violin JD et al (2005). beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* 280: 8041-50.
- Bear JE, Krause M, Gertler FB (2001). Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 13: 158-66.
- Birchler JA, Bhadra MP, Bhadra U (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr Opin Genet Dev* 10: 211-6.
- Bourne HR, Stryer L (1992). G proteins. The target sets the tempo. *Nature* 358: 541-3.
- Bubb MR, Senderowicz AM, Sausville EA et al (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* 269: 14869-71.
- Buchanan FG, DuBois RN (2006). Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle* 5: 2060-3.
- Buhl AM, Johnson NL, Dhanasekaran N et al (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem* 270: 24631-4.

- Chakir K, Xiang Y, Yang D et al (2003). The third intracellular loop and the carboxyl terminus of beta2-adrenergic receptor confer spontaneous activity of the receptor. *Mol Pharmacol* 64: 1048-58.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G et al (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-5.
- Charest PG, Terrillon S, Bouvier M (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* 6: 334-40.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA et al (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258-65.
- Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS (2002). Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 277: 12463-73.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG et al (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66: 61-79.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88-91.
- Day CA, Kenworthy AK (2009). Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788: 245-53.
- De Priester W (1991). Techniques for the visualisation of cytoskeletal components in *Dictyostelium discoideum*. *Electron Microsc Rev* 4: 343-76.
- DeFea KA (2007). Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu Rev Physiol* 69: 535-60.
- den Hartigh JC, van Bergen en Henegouwen PM, Verkleij AJ et al (1992). The EGF receptor is an actin-binding protein. *J Cell Biol* 119: 349-55.
- dos Remedios CG, Thomas DD (2001). An overview of actin structure and actin-binding proteins. *Results Probl Cell Differ* 32: 1-7.
- Doyle T, Botstein D (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3886-91.
- Drake MT, Violin JD, Whalen EJ et al (2008). beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 283: 5669-76.

- Drube S, Stirnweiss J, Valkova C et al (2006). Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from beta2-adrenergic receptor signalling. *Cell Signal* 18: 1633-46.
- Durrbach A, Louvard D, Coudrier E (1996). Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci* 109 (Pt 2): 457-65.
- Dutt P, Kjoller L, Giel M et al (2002). Activated Galphaq family members induce Rho GTPase activation and Rho-dependent actin filament assembly. *FEBS Lett* 531: 565-9.
- Eggeling C, Ringemann C, Medda R et al (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457: 1159-62.
- Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 287-332.
- Ferguson SS (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53: 1-24.
- Franež R, Zabavnik - Piano J (1999). Laserska konfokalna mikroskopija - potencialna uporaba v biomedicinskih raziskavah. *Vet Nov*: 277-281.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M et al (1999). A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* 274: 5868-79.
- Garvas M (2007). Proučevanje tvorbe membranskih domen v lipidnih veziklih iz sfingomielina in holesterola z elektronsko paramagnetno resonanco: diplomsko delo. Ljubljana: Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta. Ljubljana, 55 str.
- Gether U (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21: 90-113.
- Girao H, Geli MI, Idrissi FZ (2008). Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett* 582: 2112-9.
- Gohla A, Harhammer R, Schultz G (1998). The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* 273: 4653-9.
- Gohla A, Offermanns S, Wilkie TM et al (1999). Differential involvement of Galphai1 and Galphai3 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 274: 17901-7.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC et al (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
- Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-14.

- Hamm HE (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273: 669-72.
- Hanson SM, Cleghorn WM, Francis DJ et al (2007). Arrestin mobilizes signaling proteins to the cytoskeleton and redirects their activity. *J Mol Biol* 368: 375-87.
- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T et al (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galphai3. *Science* 280: 2112-4.
- Head BP, Patel HH, Roth DM et al (2006). Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem* 281: 26391-9.
- Heding A, Elling CE, Schwartz TW (2002). Novel method for the study of receptor Ca²⁺ signalling exemplified by the NK1 receptor. *J Recept Signal Transduct Res* 22: 241-52.
- Heding A, Vrecl M, Bogerd J et al (1998). Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetics. *J Biol Chem* 273: 11472-7.
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-4.
- Herget-Rosenthal S, Hosford M, Kribben A et al (2001). Characteristics of EYFP-actin and visualization of actin dynamics during ATP depletion and repletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1858-70.
- Hermans E (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99: 25-44.
- Hokfelt T, Kuteeva E (2006). Substance P: a neuropeptide. *Am J Psychiatry* 163: 578.
- Holst B, Hastrup H, Raffetseder U et al (2001). Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis. *J Biol Chem* 276: 19793-9.
- Horn F, Bettler E, Oliveira L et al (2003). GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* 31: 294-7.
- Hrovat A, Frangez R, Pogacnik A et al (2003). Prerazporeditev aktinskega citoskeleta v celicah po aktivaciji membranskega receptorja za tiroliberin. *Slov Vet Res* 40: 185-93.
- Hrovat A, Zavec AB, Pogacnik A et al (2009). Establishing and functional characterization of an HEK-293 cell line expressing autofluorescently tagged beta-actin (pEYFP-ACTIN) and the neurokinin type 1 receptor (NK1-R). *Cell Mol Biol Lett*.

- Hsieh CL (2000). Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr Opin Genet Dev* 10: 224-8.
- Hubbell WL, McConnell HM (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J Am Chem Soc* 93: 314-26.
- Insel PA, Head BP, Ostrom RS et al (2005a). Caveolae and lipid rafts: G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047: 166-72.
- Insel PA, Head BP, Patel HH et al (2005b). Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem Soc Trans* 33: 1131-4.
- Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9: 7-14.
- Janmey PA, Shah JV, Tang JX et al (2001). Actin filament networks. *Results Probl Cell Differ* 32: 181-99.
- Jeng RL, Welch MD (2001). Cytoskeleton: actin and endocytosis--no longer the weakest link. *Curr Biol* 11: R691-4.
- Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273: 17299-302.
- Johnson M (1998). The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 158: S146-53.
- Johnson M (2006). Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol* 117: 18-24; quiz 25.
- Jones NP, Katan M (2007). Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* 27: 5790-805.
- Kekic M, Nosworthy NJ, Dedova I et al (2001). Regulation of the cytoskeleton assembly: a role for a ternary complex of actin with two actin-binding proteins. *Results Probl Cell Differ* 32: 165-79.
- Kenworthy AK (2005). Fleeting glimpses of lipid rafts: how biophysics is being used to track them. *J Investig Med* 53: 312-7.
- Khawaja AM, Rogers DF (1996). Tachykinins: receptor to effector. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 721-38.
- Kim IM, Tilley DG, Chen J et al (2008). Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14555-60.

- Koklic T, Pirs M, Zeisig R et al (2005). Membrane switch hypothesis. 1. Cell density influences lateral domain structure of tumor cell membranes. *J Chem Inf Model* 45: 1701-7.
- Kubale V, Abramovic Z, Pogacnik A et al (2007). Evidence for a role of caveolin-1 in neurokinin-1 receptor plasma-membrane localization, efficient signaling, and interaction with beta-arrestin 2. *Cell Tissue Res* 330: 231-45.
- Kukkonen JP (2004). Explicit formulation of different receptor-G-protein interactions and effector regulation. *Bioinformatics* 20: 2411-20.
- Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL et al (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 20332-5.
- Laporte SA, Oakley RH, Holt JA et al (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275: 23120-6.
- Laroche G, Rochdi MD, Laporte SA et al (2005). Involvement of actin in agonist-induced endocytosis of the G protein-coupled receptor for thromboxane A2: overcoming of actin disruption by arrestin-3 but not arrestin-2. *J Biol Chem* 280: 23215-24.
- Le Page SL, Bi Y, Williams JA (2003). CCK-A receptor activates RhoA through G alpha 12/13 in NIH3T3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1197-206.
- Leavitt J, Ng SY, Varma M et al (1987). Expression of transfected mutant beta-actin genes: transitions toward the stable tumorigenic state. *Mol Cell Biol* 7: 2467-76.
- Lee AG (2005). How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. *Mol Biosyst* 1: 203-12.
- Lefkowitz RJ (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273: 18677-80.
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300: 87-91.
- Liu JJ, Hartman DS, Bostwick JR (2003). An immobilized metal ion affinity adsorption and scintillation proximity assay for receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis. *Anal Biochem* 318: 91-9.
- Ludin B, Doll T, Meili R et al (1996). Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. *Gene* 173: 107-11.
- Ludin B, Matus A (1998). GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 8: 72-7.

- Luttrell LM (2002). Big G, little G: G proteins and actin cytoskeletal reorganization. *Mol Cell* 9: 1152-4.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y et al (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283: 655-61.
- Ma YC, Huang J, Ali S et al (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102: 635-46.
- Macdonald JL, Pike LJ (2005). A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* 46: 1061-7.
- Machesky LM, Hall A (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 6: 304-10.
- Maggi CA (1995). The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 26: 911-44.
- Maggi CA, Schwartz TW (1997). The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 18: 351-5.
- Marion S, Oakley RH, Kim KM et al (2006). A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 281: 2932-8.
- Marsh D (1981). Electron spin resonance: spin labels. *Mol Biol Biochem Biophys* 31: 51-142.
- Maxfield FR (2002). Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 14: 483-7.
- McFarland DC (2000). Preparation of pure cell cultures by cloning. *Methods Cell Sci* 22: 63-6.
- Milligan G (1996). The stoichiometry of expression of protein components of the stimulatory adenylyl cyclase cascade and the regulation of information transfer. *Cell Signal* 8: 87-95.
- Milligan G, Kostenis E (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.
- Monastyrskaya K, Hostettler A, Buerger S et al (2005). The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J Biol Chem* 280: 7135-46.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA et al (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem* 276: 19452-60.

- Ostrom RS, Insel PA (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* 143: 235-45.
- Ostrom RS, Liu X (2007). Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae. *Methods Mol Biol* 400: 459-68.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T et al (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-45.
- Parton RG, Simons K (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 185-94.
- Perroy J, Adam L, Qanbar R et al (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* 22: 3816-24.
- Pike LJ (2009). The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* 50 (Suppl): S323-8.
- Pineyro G (2009). Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal* 21: 179-85.
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-92.
- Plemenitas A, Havel CM, Watson JA (1990). Sterol-mediated regulation of mevalonic acid synthesis. Accumulation of 4-carboxysterols as the predominant sterols synthesized in a Chinese hamster ovary cell cholesterol auxotroph (mutant 215). *J Biol Chem* 265: 17012-7.
- Pontier SM, Percherancier Y, Galandrin S et al (2008). Cholesterol-dependent separation of the beta2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *J Biol Chem* 283: 24659-72.
- Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA et al (2006). Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 31: 411-9.
- Prasher DC (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet* 11: 320-3.
- Ramsay D, Kellett E, McVey M et al (2002). Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J* 365: 429-40.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM et al (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450: 383-7.

- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF et al (2001). Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 350-60.
- Rivero F, Cvrckova F (2007). Origins and evolution of the actin cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 607: 97-110.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA et al (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318: 1266-73.
- Rosenkilde MM, Cahir M, Gether U et al (1994). Mutations along transmembrane segment II of the NK-1 receptor affect substance P competition with non-peptide antagonists but not substance P binding. *J Biol Chem* 269: 28160-4.
- Sagi SA, Seasholtz TM, Kobiashvili M et al (2001). Physical and functional interactions of Galphaq with Rho and its exchange factors. *J Biol Chem* 276: 15445-52.
- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA et al (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 459-89.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual: 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1695.
- Santini F, Penn RB, Gagnon AW et al (2000). Selective recruitment of arrestin-3 to clathrin coated pits upon stimulation of G protein-coupled receptors. *J Cell Sci* 113 (Pt 13): 2463-70.
- Schafer DA (2002). Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14: 76-81.
- Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H et al (2004). Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* 104: 173-206.
- Schwartz T (2003). Molecular structure and function of 7TM G - protein coupled receptors. In: Foreman JC, Johansen T. *Textbook of receptor pharmacology*. Boca Raton. CRC Press: 81-111.
- Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B et al (2006). Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 481-519.
- Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH (1999). Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* 55: 949-56.
- Severini C, Imrota G, Falconieri-Erspamer G et al (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54: 285-322.
- Sheppard D (1994). Dominant negative mutants: tools for the study of protein function in vitro and in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 1-6.

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39.
- Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ et al (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9988-93.
- Simons K, Ikonen E (2000). How cells handle cholesterol. *Science* 290: 1721-6.
- Steinkamp JA (1984). Flow cytometry. *Rev of Sci Instrum* 55: 1375-1400.
- Swaminath G, Xiang Y, Lee TW et al (2004). Sequential binding of agonists to the beta₂ adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J Biol Chem* 279: 686-91.
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K et al (1995). Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 20: 227-31.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T et al (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 520: 97-101.
- Tang J, Gross DJ (2003). Regulated EGF receptor binding to F-actin modulates receptor phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 930-6.
- Tehrani S, Tomasevic N, Weed S et al (2007). Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11933-8.
- Verkhusha VV, Shavlovsky MM, Nevzglyadova OV et al (2003). Expression of recombinant GFP-actin fusion protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* 3: 105-11.
- Violin JD, Lefkowitz RJ (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 416-22.
- Visegrady B, Lorinczy D, Hild G et al (2004). The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments. *FEBS Lett* 565: 163-6.
- Vogt S, Grosse R, Schultz G et al (2003). Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J Biol Chem* 278: 28743-9.
- Vrecl M, Anderson L, Hanyaloglu A et al (1998). Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol Endocrinol* 12: 1818-29.
- Vrecl M, Drinovec L, Elling C et al (2006). Opsin oligomerization in a heterologous cell system. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 505-26.

- Vrecl M, Jorgensen R, Pogacnik A et al (2004). Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J Biomol Screen* 9: 322-33.
- Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC et al (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci* 114: 1025-36.
- Westphal M, Jungbluth A, Heidecker M et al (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol* 7: 176-83.
- Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ et al (2007). A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16657-62.
- Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL (2005). A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16: 964-75.
- Yin J, Lu J, Yu FS (2008). Role of small GTPase Rho in regulating corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 900-9.
- Yu R, Hinkle PM (1999). Signal transduction and hormone-dependent internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor in cells lacking Gq and G11. *J Biol Chem* 274: 15745-50.
- Zheng YH, Plemenitas A, Linnemann T et al (2001). Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol* 11: 875-9.
- Zhu J, Zhou K, Hao JJ et al (2005). Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *J Cell Sci* 118: 807-17.