

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Izolace, charakterizace a interakce lipidových raftů
s farmakologicky aktivními ligandy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Anastasie Mateckaja

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Olomouc 2023

Prohlášení

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 17. 01. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce, prof. Ing Janu Vackovi, Ph.D., za odborné vedení a rady, které mi byly během vypracovávání práce poskytovány. Dále děkuji Mgr. Martině Zatloukalové, Ph.D., za pomoc při vypracovávání diplomové práce. Děkuji všem pracovníkům na Ústavu lékařské chemie a biochemie za přátelské prostředí a spolupráci. A v neposlední řadě děkuji svým nejbližším, kteří mě podporovali během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Anastasie Mateckaja

Název práce: Izolace, charakterizace a interakce lipidových raftů s farmakologicky aktivními ligandy.

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra organické chemie

Vedoucí práce: prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt: Lipidové rafty jsou detergent rezistentní membránové domény obsahující vysoký podíl cholesterolu a sfingolipidů. Proteiny přítomné v těchto strukturách se významně podílejí na regulaci řady buněčných procesů vč. buněčné signalizace. V diplomové práci byly vypracovány dva izolační postupy k izolaci lipidových raftů/detergent rezistentních membrán, které využívaly ultracentrifugaci v gradientů sacharózy a OptiprepuTM. Izolované frakce byly charakterizovány pomocí elektroforetických, imunochemických, spektrofotometrických a elektrochemických metod. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace celkového proteinu, cholesterolu a volných thiolových skupin ve všech frakcích. Imunochemicky byly potvrzeny proteiny asociované s lipidovými rafty/detergent rezistentními membránami (kaveolin-1, flotillin-1). Na závěr byly zkoumány oxidačně-redukční přeměny frakcí pomocí chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy konstantním proudem. Získané výsledky budou použity k výzkumu interakcí lipidových raftů/detergent rezistentních membrán s farmakologicky aktivními ligandy a pro účely lipidomických a proteomických analýz.

Klíčová slova: lipidové rafty, izolace, detergent rezistentní membrány

Počet stran: 86

Počet příloh: 14, 7 stran

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Anastasie Mateckaja

Title: Isolation, characterisation and interactions of lipid rafts with pharmacologically active ligands.

Type of thesis: Master's

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract: Lipid rafts are detergent resistant membrane domains enriched for cholesterol and sphingolipids. Proteins associated with these structures play a role in regulation of cellular processes, including cell signaling. Lipid rafts can be isolated from cells *via* gradient ultracentrifugation. In this diploma thesis two isolation protocols for lipid rafts/detergent resistant membranes using ultracentrifugation based on sucrose or OptiprepTM gradient were optimized. Isolated fractions were characterised *via* electrophoretic, immunochemical, spectroscopic and electrochemical methods. The spectroscopical concentration of total protein, cholesterol and free thiols in all fractions were determined. The proteins associated with lipid rafts/detergent resistant membranes (caveolin-1, flotillin-1) were confirmed immunochemically. Using electrochemical methods redox transformations in fractions using constant-current chronopotentiometric stripping analysis were investigated. The results could be used for further research of lipid rafts/detergent resistant membranes interactions with pharmacologically active ligands and for lipidomic and proteomic studies.

Keywords: lipid rafts, isolation, detergent resistant membranes

Number of pages: 86

Number of appendixes: 14, 7 pages

Language: Czech

Seznam zkratek

A β	β -amyloidní peptid
AC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
AMK	aminokyseliny
APS	peroxosíran amonný
BCA	kyselina bicinchoninová
BCR	B-buněčný receptor
BSA	hovězí sérový albumin
CCR5	buněčný chemokinový receptor 5
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CPSA	chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza konstantním proudem
Cryo-em	kryoelektronová mikroskopie
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typu 4
DIG	z angl. „detergent-insoluble glycolipid-enriched domains“
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	kyselina 5,5'-dithio-bis(2-nitro)benzoová
DRM	detergent rezistentní membrány
EDTA	sodná sůl kyseliny ethylen-1,2-diamintetraoctové
eNOS	endotelová syntasa oxidu dusnatého
ER	endoplazmatické retikulum
FBS	fetální bovinní sérum
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FRET	Forsterův rezonanční přenos energie
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GPMV	vezikuly plazmatické membrány (z angl. „giant plasma membrane vesicles“)
GUV	velké unilamelární vezikuly (z angl. „giant unilamellar vesicles“)
HA	hemaglutinin
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HSA	lidský sérový albumin
iSCAT	interferometrická skenovací mikroskopie
L _d	fluidní neuspořádaná fáze
L _o	fluidní uspořádaná fáze

LR	lipidové rafty
MAM	membrány asociované s mitochondriemi (z angl. „mitochondria associated membranes“)
MDCK	z angl. „Madin-Darby canine kidney cells“
M β CD	methyl- β -cyklodextrin
NEAA	neesenciální aminokyseliny
NOX	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidasa
NSOM	optická skenovací mikroskopie v optickém poli
PALM	fotoaktivovaná lokalizační mikroskopie
PBS	z angl. „phosphate buffer saline“
PM	plazmatická membrána
RBL-2H3	z angl. „basophilic leukemia cells“
ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu
RTK	receptory tyrosin kinas
SARS-CoV	virus syndromu náhlého akutního respiračního selhání
SD	směrodatná odchylka
SDS	laurylsulfát sodný
SNARE	z angl. „soluble <i>N</i> -methylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor“
SPT	sledování jednotlivých částic
STED	mikroskopie se stimulovanou emisní deplecí
SV40	opičí vakuolační polyomavirus 40
TBS	z angl. „Tris buffer saline“
TBST	TBS-Tween® 20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin
TfR2	z angl. „transferrin receptor 2“
TLR1/2	z angl. „toll-like“ receptory 1 a 2
TNF- α	z angl. „tumor necrosis factor α “
TNFR1	z angl. „tumor necrosis factor α receptor 1“
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol

Obsah

Cíle diplomové práce	11
1 Úvod.....	12
2 Teoretická část	13
2.1 Vlastnosti membrány	13
2.1.1 Složení membrány.....	13
2.1.1.1 Cholesterol	15
2.1.1.2 Lipidy plazmatické membrány a jejich interakce s cholesterolem	15
2.1.1.3 Proteiny	16
2.1.2 Gelová fáze, fluidní neuspořádaná fáze a fluidní uspořádaná fáze	16
2.1.3 Membránový transport a signalizace.....	17
2.2 Lipidové rafty	18
2.2.1 Detergent rezistentní membrány	19
2.2.2 Kaveoly	19
2.2.2.1 Struktura kaveol	20
2.2.3 Biologická relevance kaveol	21
2.2.3.1 Endocytóza	21
2.2.3.2 Scaffold proteiny	22
2.2.3.3 Receptory spřažené s G-proteiny	22
2.2.3.4 Interakce s inzulinovým receptorem	23
2.2.3.5 Mediátory apoptózy.....	23
2.3 Proteom lipidových raftů	23
2.4 Izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán	24
2.4.1 Materiál pro izoalci lipidových raftů/detergent rezistentních membrán	25
2.4.2 Postup izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán	25
2.4.2.1 Narušení membrán a pretreatment	25
2.4.2.2 Metody využívající detergent.....	25

2.4.2.3	Metody nevyužívající detergent	27
2.4.2.4	Další techniky	27
2.4.2.5	Separace v gradientu	28
2.5	Charakterizace lipidových raftů	29
2.5.1	Metody cílící na komponenty lipidových raftů	29
2.5.2	Metody vizualizace	30
2.6	Biologická relevance lipidových raftů	31
2.6.1	Rozpoznávání patogenů a sekrece cytokinů	31
2.6.2	Apoptóza a redox signalizace	33
2.6.3	Lipidové rafty jako vstupní centra pro viry	33
2.6.4	Farmaceutické ligandy působící na lipidové rafty	34
2.6.5	Neurodegenerativní onemocnění	35
2.6.6	Kardiovaskulární onemocnění	37
2.7	Lipidové rafty v jiných organelách	37
2.7.1	Mitochondrie	37
2.7.2	Endoplazmatické retikulum	37
3	Experimentální část	39
3.1	Chemikálie a roztoky	39
3.1.1	Chemikálie	39
3.1.2	Roztoky	40
3.1.2.1	Pufry	40
3.1.2.2	Kultivační médium	41
3.2	Přístrojové vybavení	41
3.3	Biologický materiál	42
3.4	Metody	42
3.4.1	Výsev buněk	42
3.4.2	Kultivace buněk	42

3.4.3	Pasážování buněk	42
3.4.4	Izolace buněk.....	43
3.4.5	Izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán	43
3.4.6	Stanovení celkového množství proteinu metodou BCA	44
3.4.7	Stanovení množství celkového cholesterolu	45
3.4.8	Stanovení koncentrace volných thiolových skupin Ellmanovou metodou	46
3.4.9	Separace proteinů pomocí elektroforézy	47
3.4.10	Western blot.....	48
3.4.11	Elektrochemické stanovení.....	49
3.4.11.1	Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza konstantním proudem	49
4	Výsledky	51
4.1.1	Biologický materiál.....	51
4.1.2	Izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán	51
4.1.3	Stanovení celkového množství proteinu	52
4.1.4	Stanovení celkového množství cholesterolu	55
4.1.5	Stanovení koncentrace thiolových skupin.....	56
4.1.6	Western blot a detekce proteinů	56
4.1.7	Elektrochemická analýza.....	57
5	Diskuze	59
6	Závěr	64
7	Zdroje.....	65
8	Přílohy.....	87

Cíle diplomové práce

Cílem této práce je vypracovat literární rešerši na téma lipidových raftů a jím podobných struktur. V teoretické části podat stručný přehled jejich zastoupení v biologických membránách, charakterizaci a jejich biologické relevanci. Dále pak doplnit rešerši o techniky izolace, charakterizace a interakce těchto domén s farmakologicky aktivními ligandy.

V praktické části bylo cílem optimalizovat izolaci lipidových raftů/detergent rezistentních membrán z HeLa buněčné linie a charakterizovat je pomocí elektroforetických, spektrofotometrických, elektrochemických a imunochemických metod.

Cíle praktické části jsou:

- Provést izolaci lipidových raftů/detergent rezistentních membrán z HeLa buněčné linie a sestavit optimalizovaný protokol izolace.
- Pomocí spektrofotometrických měření stanovit přítomnost celkového proteinu, cholesterolu a volných thiolových skupin.
- Pomocí imunochemických metod stanovit přítomnost proteinů jakožto markerů lipidových raftů.
- Pomocí elektrochemických metod zkoumat oxidačně-redukční přeměny.

1 Úvod

Zásadním krokem v poznání struktur biologických membrán byl popis plazmatické membrány pomocí modelu fluidní mozaiky. Tento model popisoval plazmatickou membránu jako primárně lipidovou matrix s náhodně distribuovanými proteiny. ¹ Dalším studiem bylo však dokázáno, že plazmatická membrána obsahuje shluky jak lipidů, tak proteinů a je vysoce heterogenním systémem. Pro tyto „shluky“ vzniklo mnoho označení, mezi něž patří i termín lipidové rafty.

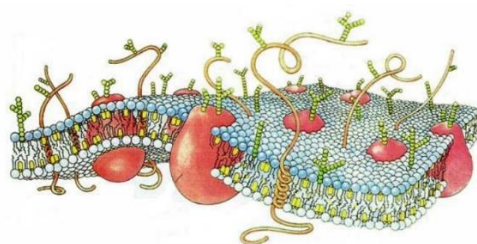
Lipidové rafty jsou plazmatické membránové domény obsahující vysoký podíl cholesterolu a sfingolipidů. Zároveň jsou to vysoce dynamické a heterogenní struktury bez pevně definované velikosti. Proteiny přítomné v těchto strukturách se významně podílejí na regulaci řady buněčných procesů vč. buněčné signalizace. LR jsou strukturní domény existující v živých buňkách, které lze izolovat jako detergent rezistentní membrány. ²

Předmětem diplomové práce byla izolace a fyzikálně-chemická charakterizace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán izolovaných z HeLa buněčné linie. Získané frakce lipidových raftů byly charakterizovány pomocí elektroforetických, spektrofotometrických a byly prozkoumány jejich oxidačně-redukční přeměny.

2 Teoretická část

2.1 Vlastnosti membrány

Plazmatická membrána (PM) je základní obal živé buňky oddělující vnitřní prostory buňky od okolního prostředí. Je to selektivně propustná asymetrická dvouvrstva membránových lipidů s proteiny (obr. 1). Kromě přirozené bariéry slouží PM k transportu a komunikaci buněk se svým okolím. Je považována za dvoudimenzionální tekutinu (model fluidní mozaiky), ve které se mohou obsažené lipidy i proteiny omezeně pohybovat.^{3,1}



Obrázek 1: Obecné uspořádání plazmatické membrány.³

2.1.1 Složení membrány

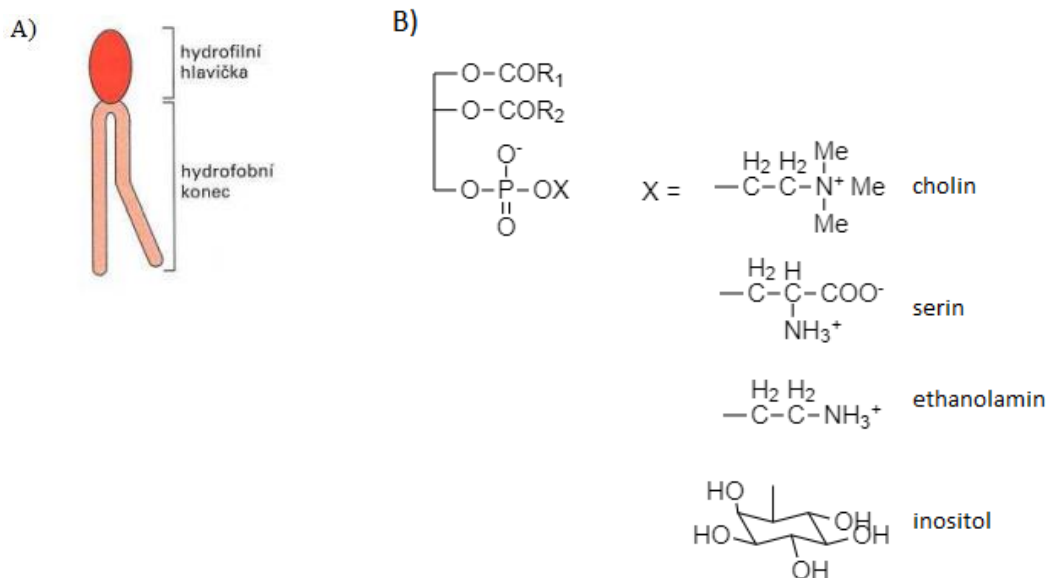
Nejpočetnější složkou PM živočišných buněk jsou lipidy, které představují asi 50 % hmoty. Na oblast $1 \times 1 \mu\text{m}$ vychází přibližně 5×10^6 molekul lipidů. Základem struktury membránových lipidů (také označovaných jako amfipatické) je hydrofilní část („hlavička“) s hydrofobním koncem (obr. 2A). Mezi nejběžnější lipidy PM patří fosfolipidy, sfingolipidy, glykolipidy a cholesterol. Membrány živočišných buněk obsahují pravděpodobně více než tisícovku různých lipidů díky variabilitě uhlovodíkových řetězců a množství polárních hydrofilních hlaviček. Jejich distribuci dvouvrstvou zajišťuje řada enzymů flipas a flopas.³

- Hydrofobní konec

Hydrofobní konec je tvořen uhlovodíkovým řetězcem acylů mastných kyselin. V případě fosfolipidů jsou to řetězce dva, které se mohou lišit v délce (14–24 atomů uhlíku) a přítomností dvojných vazeb (stupeň nasycení). Přítomnost dvojných vazeb na acylovém řetězci vytváří malou nepravidelnost, která znesnadňuje přiléhání uhlovodíkových řetězců na sebe, a tím zvyšuje fluiditu celé membrány.^{3,4}

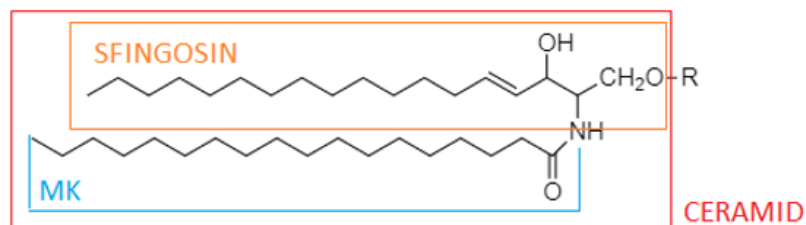
- Hydrofilní hlavička

Hydrofilní hlavička se v případě fosfolipidů s acylovým řetězcem pojí přes glycerol a fosfát, na který navazuje cholin (fosfatidylcholin), serin (fosfatidylserin), inositol (fosfatidylinositol) nebo ethanolamin (fosfatidylethanolamin, viz obr. 2B).^{3, 4}



Obrázek 2: A) Obecná struktura membránového lipidů;⁵ B) Struktury fosfolipidů.

Kromě fosfolipidů existují v PM také sfingolipidy. Základní strukturou všech sfingolipidů je tzv. ceramid, který vzniká navázáním mastné kyseliny na aminoskupinu sfingosinu pomocí amidové vazby (obr. 3). Ceramid lze dále modifikovat substitucí na hydroxylové skupině prvního uhlíku pomocí sacharidové složky (glykosfingolipidy – cerebrosidy, sulfatidy, gangliosidy) nebo fosfocholinové složky (sfingomyelin).^{3, 4}



Substituent (R)	sfingolipid
H	ceramid
fosfocholin	sfingomyelin
sacharid	glykosfingolipid

Obrázek 3: Obecná struktura ceramidu.

PM je vysoce heterogenní v lipidovém složení vně i uvnitř buňky. Toto rozložení se u různých buněk a živočichů liší. Vnější vrstva savčích buněk obsahuje ve zvýšené míře fosfatidylcholin a sfingomyelin. Naopak vnitřní vrstva disponuje zvýšeným podílem fosfatidylserinu, fosfatidylcholinu a fosfatidylinositolu. Navzdory tomuto obecnému rozdělení přežvýkavci (převážně ovce) nemají ve svých membránách skoro žádný fosfatidylcholin a tento nedostatek kompenzují zvýšenou mírou sfingomyelinu.^{6, 7}

2.1.1.1 *Cholesterol*

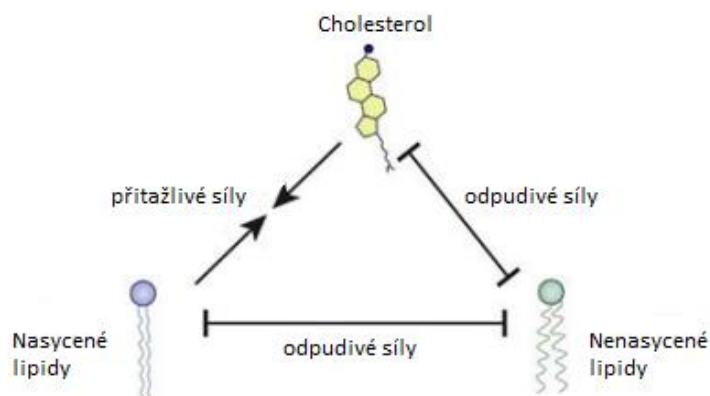
Cholesterol je steroidní amfipatická molekula přítomná v eukaryotních buňkách s hydroxylovou skupinou orientovanou vně dvojvrstvy a uhlovodíkovým řetězcem orientovaným dovnitř membrány. K syntéze cholesterolu dochází na endoplazmatickém retikulu (ER). Snižuje fluiditu membrány, neboť vyplňuje mezery vzniklé mezi nenasycenými uhlovodíkovými řetězci. Zároveň zvyšuje hydrofobní charakter membrány.⁸

Nejméně cholesterolu je přítomno v membránách ER, Golgiho aparátu, mitochondriích a jádře. Nejvíce je ho obsaženo v PM.⁹ Množství cholesterolu se také liší napříč buňkami a tkáněmi. Zvýšený obsah cholesterolu lze najít v PM červených krvinek, myelinových membránách Schwannových buněk, buňkách oční čočky.^{3, 9}

2.1.1.2 *Lipidy plazmatické membrány a jejich interakce s cholesterolem*

Lipidy buněčné membrány lze rozdělit podle jejich teploty fázového přechodu (T_m) z gelové fáze do fluidní neuspořádané fáze a počtu dvojných vazeb na acylovém řetězci. Rozlišujeme lipidy neobsahující dvojně vazby (nasycené), které mívají vyšší T_m , a lipidy obsahující dvojně vazby (nenasycené), které mívají nižší T_m . Typickým příkladem lipidů s vysokou T_m hojně zastoupených v PM je fosfatidylcholin a sfingomyelin. Mezi lipidy s nízkou T_m patří například 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholin a dioleoylfosfatidylcholin.^{10, 11}

Cholesterol přítomný v PM vykazuje zvýšenou afinitu k lipidům s vysokou T_m , neboť jejich flexibilní nasycené acylové řetězce přiléhají na plochou rigidní strukturu cholesterolu více, než lipidy s dvojnou vazbou (obr. 4). To vede k silnějším přitažlivým van der Waalsovým interakcím a jejich seskupování do méně fluidních domén. Oproti tomu lipidy s nízkou teplotou tání cholesterol a lipidy s vysokou T_m odpuzují. Repulze se zvyšuje s rostoucím počtem dvojných vazeb. Vzhledem k množství polynenasycených lipidů v membráně živočišných buněk, je pravděpodobné, že tyto odpudivé síly vůči cholesterolu a lipidům s vysokou T_m významně podporují tvorbu lipidových mikrodomén v membráně.^{11, 12, 13, 14, 15, 16}



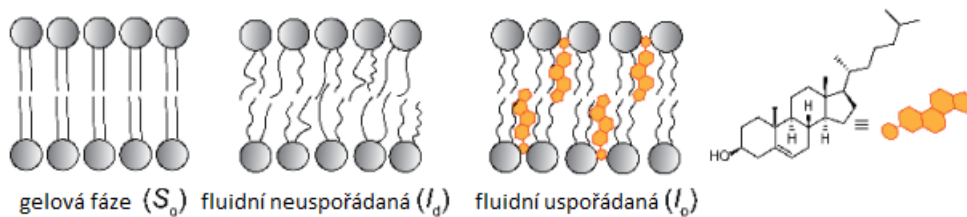
Obrázek 4: Vztah cholesterolu k lipidům PM. ¹⁵

2.1.1.3 Proteiny

Asymetrické rozložení lipidů a proteinů napříč plazmatickou membránou je zásadní pro signalizaci a transport mezi buňkami. Proteiny plazmatické membrány se dělí na transmembránové (integrální) a periferní. Pohled na membránu jako na moře lipidů s volně plujícími proteiny je však zjednodušený. Buňky mohou seskupovat určité proteiny plazmatické membrány a tím vytvářet membránové domény. Proteiny mohou být poutány na struktury vně i uvnitř buňky a vytvářet tak spoje nebo se podílet na tvorbě buněčných kompartmentů. ³

2.1.2 Gelová fáze, fluidní neuspořádaná fáze a fluidní uspořádaná fáze

Typická fosfolipidová dvojvrstva při nízkých teplotách tvoří tzv. gelovou fázi („solid-ordered“, S_o , obr. 5). V gelové fázi jsou acylové řetězce lipidů uspořádané, což vede ke snížení laterální mobility fosfolipidů (rychlost difúze $10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Po zvýšení teploty nad teplotu fázového přechodu T_m lipidy „roztají“ a vytváří fluidní neuspořádanou fázi („liquid disordered/liquid-crystalline“, l_d) s mnohem vyšší rychlostí laterální difúze (rychlost 10^{-7} až $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) a možností transverzální difúze mezi vrstvami („flip-flop“). Kromě teploty fázového přechodu nelze opomenout vliv tlaku. Rychlost transverzální difúze je nižší (i několik hodin/dnů) než rychlost difúze laterální, neboť translokace polární hlavičky přes hydrofobní část dvojvrstvy vyžaduje značnou aktivační energii. Pokud jsou v membráně přítomny molekuly cholesterolu, dochází k tvorbě třetí, fluidní uspořádané fáze („liquid ordered“, l_o). Molekuly cholesterolu se orientují ve dvojvrstvě tak, aby polární hydroxylová skupina byla v blízkosti polární hlavičky fosfolipidů, což snižuje mobilitu uhlovodíkových řetězců acylů v jejich okolí. Uspořádaná l_o fáze je méně fluidní než neuspořádaná l_d fáze, ale více fluidní než gelová fáze. Rychlost laterální difúze je u l_d fáze vyšší oproti l_o fázi. ^{11, 13, 17}

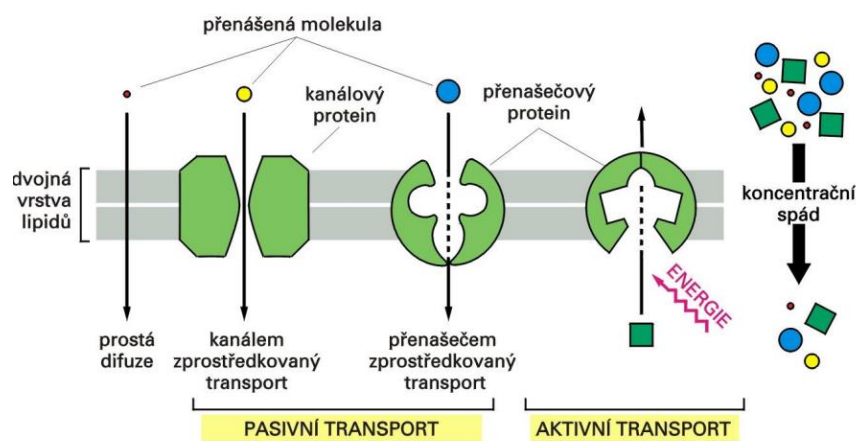


Obrázek 5: Obecné schéma fází lipidové dvojvrstvy.¹⁷

2.1.3 Membránový transport a signalizace

Jednou z hlavních funkcí PM je regulace transportu molekul. Jen pro málo z nich PM nepředstavuje žádnou překážku. Malé nenabité polární molekuly mohou pomocí volné difúze procházet přes membránu poměrně snadno (voda, ethanol). Naopak nabitě a rozměrné molekuly (signální molekuly, ionty, aminokyseliny, nukleotidy, sacharidy) volně přes membránu neprocházejí (prostá difúze by trvala příliš dlouho). Tyto látky využívají transportních proteinů (např. póry, kanály, pumpy, přenašeče).¹⁸

Kromě dělení dle typu transportovaných molekul se transport rozlišuje na pasivní a aktivní (obr. 6). Pasivní transport nespotřebovává energii a řadí se do něj prostá difúze a usnadněná difúze přes póry, kanály a přenašeče (transportéry). Využívá koncentračního a elektrochemického gradientu. Aktivní transport spotřebovává energii a jde proti směru koncentračního a elektrochemického gradientu. K přenosu molekul přes membránu využívá transportní membránové proteiny.¹⁸



Obrázek 6: Srovnání pasivního a aktivního transportu.¹⁸

2.2 Lipidové rafty

Představení modelu fluidní mozaiky v roce 1972 dalo podnět k dalšímu studiu složení PM. ¹ K distribuci lipidů a membránových proteinů napříč PM nedochází náhodně, nýbrž podléhá potřebě koncentrovat a zapojovat tyto složky do cytoskeletu, signalizačních a transportních kaskád. ¹⁹

Z těchto poznatků vychází předpoklad existence heterogenního systému s doménami. Původně se uvažovala existence lipidových klastrů v membráně, které tyto domény tvoří. Hlavní hnací silou pro jejich vznik jsou interakce lipid-lipid, které vychází z biofyzikálních vlastností lipidů v membráně. ^{20, 21}

Přínosem v tomto bádání byly publikované práce vycházející z poznatků o nerozpustnosti komponent PM v neionogenních detergentech. ^{22, 23, 24, 25, 26, 27, 28}

Představa o existenci domén byla následně rozšířena o poznání, že oblasti membrány nerozpustné v detergentech obsahují ve zvýšené míře steroly (cholesterol), sfingolipidy, glykolipidy a asociované proteiny (převážně GPI-kotvené proteiny), které se podílejí na buněčné signalizaci a transportu. ^{29, 30, 31, 32, 33}

V průběhu let pro tyto struktury vzniklo několik terminologických označení. Ty převážně vycházely z jejich nerozpustnosti v neionogenních detergentech při nízkých teplotách. Z tohoto vychází nejčastější pojmenování detergent rezistentní membrány (DRM) a detergent rezistentní glykolipid/glykosfingolipid obohacené komplex/membrány (DIG, z angl. „detergent-insoluble glycolipid-enriched domains“). ^{34, 35, 36, 37, 38, 39,}

Rezistence k detergentům byla považována za základní vlastnost těchto mikrodomén, nicméně pozdějším studiem bylo zjištěno, že použití detergentu k jejich izolaci nereprezentuje dokonale jejich *in vivo* existenci, neboť se předpokládá ovlivnění jejich struktury během interakce s detergentem. ^{40, 41}

V roce 1997 publikovaná práce skupinou Simons a kol. ustanovila termín **lipidové rafty (LR)**, který se ujal k popisu těchto struktur. LR jsou strukturní domény existující v živých buňkách, které lze izolovat jako DRM. Tyto mikrodomény mohou vznikat interakcí lipid-lipid, lipid-protein nebo zapojením těchto domén do membránového cytoskeletu. ^{42, 43}

2.2.1 Detergent rezistentní membrány

Domény PM obohacené o sfingolipidy a cholesterol vykazují sníženou rozpustnost v neionogenních detergitech (např. Triton X-100, Chaps, Brij a další) při nízkých teplotách a lze je izolovat jako nízko hustotní frakce detergent rezistentních membrán (DRM) v hustotním gradientu pomocí ultracentrifugace. Díky vysokému obsahu lipidu DRM komplexy vystoupají v nízkohustotním gradientu při ultracentrifugaci. Takto izolované fragmenty PM lze nazývat detergent rezistentní membrány (DRM) a reprezentují l_0 fázi. DRM lze izolovat z různých typů buněk a tkání: epitelové buňky, fibroblasty, hematopoetické buňky, buňky endotelu, adipocyty, svalové buňky, neurony, buňky melanomu. ^{42, 44, 45}

Domény nerozpustné v detergitech obsahují specificky asociované proteiny. Těmi jsou nejčastěji GPI-vázané proteiny (první identifikované proteiny v DRM) ^{28, 36, 46}, tyrosin kinasy rodiny Src, ^{37, 47, 48}, α podjednotka heterotrimerního G-proteinu ⁴⁹, endotelová syntasa oxidu dusnatého a další. Tyto proteiny jsou ukotveny v PM pomocí nasycených acylových zbytků. Proteiny mohou být ukotveny na nasycené acyly přes GPI kotvu nebo *S*-acylací (palmitoylací) a *N*-myristoylací. ^{39, 50, 42}

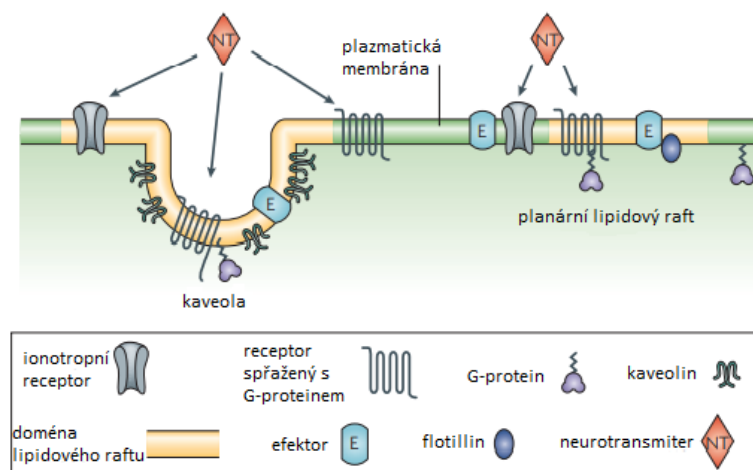
Mezi obecně přijímané vlastnosti lipidových raftů patří jejich:

- A. Velikost 10–200 nm
- B. Heterogenita a vysoká dynamika (struktury existují nejen v prostoru ale i v čase)
- C. Podílí se na kompartmentizaci buněčných procesů a mohou být stabilizovány pomocí interakcí protein-lipid nebo protein-protein.

Hlavní funkcí LR v živých buňkách je schopnost koncentrovat signální molekuly a podporovat tak jejich interakce. ^{42, 2}

2.2.2 Kaveoly

Kaveoly jsou považovány za specifickou podtřídu LR o velikosti přibližně 25-100 nm (obr. 7). ⁵¹ Díky své specifické struktuře byly identifikovány dříve než LR. ^{52, 53} Kaveoly také vykazují sníženou rozpustnost v neionogenních detergitech a jejich existence je podmíněna přítomností cholesterolu a sfingolipidů. Jejich charakteristickým proteinem je kaveolin, který lze izolovat jako součást DRM. Nicméně ne všechny DRM obsahují kaveolin. Navíc lze kaveolin izolovat i z buněk, které kaveoly neobsahují. ^{44, 54}

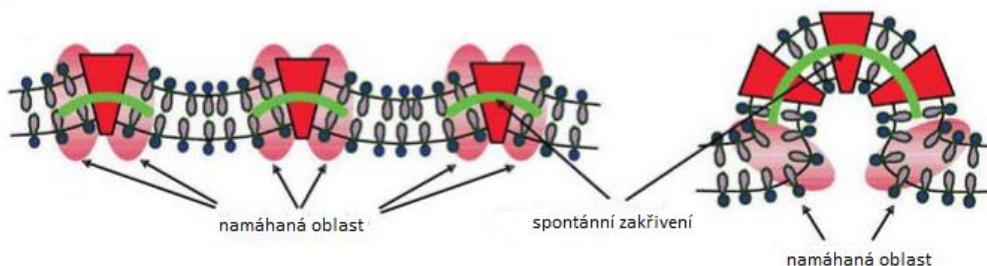


Obrázek 7: Struktura kaveol a planárních lipidových raftů. ⁵¹

Kaveoly jsou vchlípeniny plazmatické membrány nacházející se v mnoha buňkách (adipocyty, endoteliální buňky, fibroblasty, buňky hladkého svalstva a další). Velmi vzácně se vyskytují ve kmenových a nervových buňkách. Kaveoly jsou v membráně stabilizovány aktinovými filamenty cytoskeletárního systému. Podílí se na signalizaci a vezikulárním transportu (endocytóze), kdy bez účasti klathrinu (podrobněji v kapitole 2.2.3.1) vytváří váčky (50-60 nm) a transportují sfingolipidy, albumin, kyselinu listovou, cholesterol a další. ^{51, 55}

2.2.2.1 Struktura kaveol

PM je převážně planární struktura a jakýkoliv ohyb či vychlípění vyžaduje jistý druh mechanického tlaku, respektive energii schopnou membránu deformovat (obr. 8). Vytvarování kaveol, které jde „proti“ principům lineárního uskupení membrány, musí mít proto pro buňku význam. Struktura caveolinu a jeho množství v membráně hraje zásadní roli ve vzniku a velikosti kaveol. Je známo, že v membráně tvoří hetero a homooligomery přibližně 15 molekul proteinu. Integrální proteiny obsahující hydrofobní část nemusí být vždy stejně „široké“ jako hydrofobní část plazmatické membrány. Případný rozdíl v šířce vyvolá napětí, které membránu deformuje. Následkem takovéto deformace může docházet k agregaci proteinů. V případě caveolinu dochází při jejich agregaci k morfologickým změnám na membráně, které vedou k vychlípění. ⁵⁶



Obrázek 8: Interakce kaveol s membránou. ⁵⁶

Dělení kaveolinů

Proteinová rodina (kaveolin-1, kaveolin-2, kaveolin-3) o hmotnosti 21–22 kDa je přítomna napříč tkáněmi. Ve své vlásečkové asymetrické struktuře obsahuje jednu hydrofobní doménu (32 AMK) a dva hydrofilní konce (N-konec 101 AMK, C-konec 43 AMK) směřující do cytoplazmy. Kaveoliny vykazují silnou afinitu k cholesterolu a po jeho depleci dojde k rozvolnění samotné struktury kaveol. ⁵⁵ Kaveolin-1 (dvě isoformy Cav-1 α a Cav-1 β) a kaveolin-2 jsou exprimovány v mnoha typech buněk (adipocyty, buňky endotelu, fibroblasty). Kaveolin-3 je protein specificky exprimovaný ve svalových buňkách (kosterní svalstvo, hladké a srdeční). Kaveolin-3 je nejvíce podobný kaveolinu-1 (na 65 % identický a přibližně na 85 % podobný).^{57, 58, 59}

Kaveolin-1 byl poprvé izolován v roce 1989 z RSV (Rous sarcoma virus) fibroblastů slepic jako na tyrosinu (Tyr14) fosforylovaný protein. ⁶⁰

2.2.3 Biologická relevance kaveol

2.2.3.1 Endocytóza

Proces endocytózy patří mezi základní transportní mechanismy buňky. Nejběžněji endocytóza zahrnuje interakci makromolekuly se specifickým receptorem na povrchu membrány a tvorbu váčku pomocí proteinu clathrinu, který se „zaškrtní“ pomocí proteinu dynaminu. ⁶¹

Nicméně existují další mechanismy, které klathrin k endocytóze nevyužívají. Jedním z nich je i kaveolární transport. Ve struktuře kaveol se také nachází proteiny dynaminy, které oddělí váček (50-60 nm) od plazmatické membrány. ⁶² Tento mechanismus je specifický a pro vstup do buňky částečně využívaný například cholera toxinem, tetanotoxinem, ⁵³ opičím vakuolačním polyomavirem 40. ⁶³ Kromě virů lze pomocí kaveol transportovat i buňce vlastní látky jako cholesterol, albumin, kyselinu listovou, fosfoglucoizomerasu, alkalickou fosfatasa a další. ^{55, 64, 65}

2.2.3.2 Scaffold proteiny

Kaveoliny hrají důležitou roli jako tzv. scaffold proteiny, kdy napomáhají interakcím signálních molekul v kaveolách bez vlastní enzymatické aktivity. Mezi signální molekuly, které takto kaveoliny využívají, patří například α -podjednotka G proteinu, H-Ras proteiny, Src rodina tyrosin kinas, endotelová syntasa oxidu dusnatého.

- **Heterotrimerní G-proteiny** (velké G-proteiny, také velké GTPasy) jsou proteiny signálních drah, ve zvýšené míře přítomné ve struktuře kaveol, kde cytosolová doména kaveolinu-1 přímo interaguje s neaktivní α -podjednotkou G-proteinu a může regulovat GTPasovou aktivitu G proteinu. ^{66, 67, 68}
- **H-Ras proteiny** patří mezi malé G-proteiny (také malé GTPasy) a stejně jako heterotrimerní G-proteiny přímo interagují s kaveolinem-1. Protože H-Ras proteiny jsou molekuly zapojené do signálních drah, může interakce s kaveolinem-1 ovlivňovat jejich funkci. H-Ras proteiny ovlivňují molekuly zapojené do mitózy a buněčné diferenciaci, často ovlivňující vznik lidských a zvířecích nádorů. ^{67, 69}
- **c-Src tyrosin kinasa** (protoonkogen c-Src) je protein nerekceptorových tyrosin kinas, který ve své kinasové doméně obsahuje tyrosin. Fosforylací tyrosinu je c-Src inhibován. Ovlivňuje buněčný růst a signalizaci. Kaveolin-1 interaguje s c-Src a potlačuje jeho tyrosin kinasovou aktivitu. ^{67, 69}
- **Endotelová syntasa oxidu dusnatého (eNOS)** vykazuje schopnost interagovat s kaveoliny. V buňkách endotelu interaguje s kaveolinem-1 ⁷⁰ a ve svalových a srdečních buňkách interaguje s kaveolinem-3. ⁷¹ Interakce kaveolinů s eNOS může ovlivňovat aktivitu eNOS, což může zasahovat do produkce oxidu dusnatého v buněčném endotelu. ⁷²

2.2.3.3 Receptory spřažené s G-proteiny

Ve struktuře kaveol bylo identifikováno několik receptorů spřažených s G-proteinem: endothelin ⁷³, bradykinin ⁷⁴, muskarinový acetylcholinový receptor ⁷⁵, β -adrenergní receptory ⁷⁶. Asociace těchto receptorů se strukturami kaveol je v některých případech iniciována až po vazbě receptorového agonisty. To může naznačovat zapojení kaveol do iniciace signálních drah, jež jsou s těmito receptory spojovány. ⁶⁸

2.2.3.4 Interakce s inzulinovým receptorem

Inzulinový receptor, patřící do skupiny tyrosinkinasových receptorů, hraje zásadní roli v udržování glukózové homeostázy. Zvýšená exprese kaveolinu-3 indukuje fosforylaci substrátu inzulinového receptoru 1, což ukazuje na schopnost kaveolinu podílet se na aktivaci inzulinového receptoru.⁷⁷

2.2.3.5 Mediátory apoptózy

Cholesterol a sfingolipidy jsou hlavními lipidovými komponenty kaveol a přímo interagují s kaveolinem-1. Sfingolipidy (např. sfingomyelin) jsou substrátem pro tvorbu ceramidu (intracelulární sekundární buněčný posel). Kaveolin-1 asociuje s cytoplazmatickou doménou proteinu p75 (nádorový supresor zapojený do regulace buněčného cyklu a apoptózy) a podporuje hydrolýzu sfingomyelinu v oblasti kaveol.^{78, 79}

2.3 Proteom lipidových raftů

LR jsou komplexní a dynamické struktury, různorodé ve velikosti a proteinovém složení, které se může v čase měnit. Proteiny asociované s lipidovými rafty neslouží pouze jako signální molekuly, ale hrají i strukturální roli v jejich stabilizaci.¹⁵

Mezi základní proteiny asociované s lipidovými rafty patří:

Flotilliny (flotillin-1, flotillin-2, 47 kDa) jsou považovány za všudypřítomné markery lipidových raftů a kaveol. Existuje pro ně další méně časté pojmenování: reggie-1 a reggie-2.⁸⁰ Flotillin-1 je exprimován převážně v jaterních buňkách, svalových buňkách a fibroblastech. Flotillin-2 je zastoupen napříč všemi buňkami.⁸¹ Flotilliny interagují se substrátem inzulinového receptoru (komplex CAP-Cb1) a ukotvuje jej do lipidových raftů, což napovídá o roli flotillinu a lipidových raftů v procesu vstřebávání glukózy, kterého se inzulinový receptor účastní.⁸² Expze flotillinu je spojována s výskytem Alzheimerovy choroby, což lze využít jako marker tohoto onemocnění.⁸³

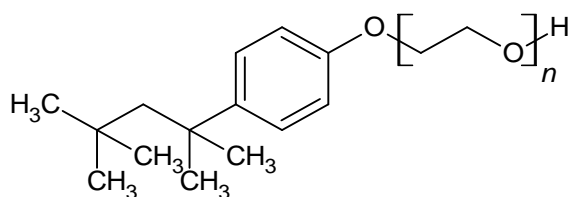
Raftlin (63 kDa)⁸⁴ je protein exprimovaný pouze ve struktuře lipidových raftů. Má roli v aktivaci B-lymfocytů, neboť je asociován s B-buněčným receptorem (BCR) na jejich povrchu. B-lymfocyty jsou buňky imunitního systému zodpovědné především za specifickou, protilátkami zprostředkovanou imunitní odpověď. Deplece raftlinu vede ke narušení struktur LR a negativně ovlivňuje fungování BCR receptoru.^{84, 85}

Glykosylfosfatidylinositol (GPI) ukotvené proteiny jsou organizovány do mikrodomén na povrchu buněk, kde se nachází v klastrech často jako homodimery. Jejich existence v membráně je závislá na přítomnosti cholesterolu, který napomáhá jejich organizaci. V případě odstranění buněčného cholesterolu dochází k rozpadu těchto klastrů i samotných mikrodomén.^{46,86} Prekurzory GPI jsou syntetizované na endoplazmatickém retikulu (ER) a po spojení s proteiny a následné úpravě na Golgiho komplexu jsou transportovány na povrch buňky.³⁴ Shlukování GPI ukotvených proteinů ovlivňuje jejich funkčnost a zapojení do signálních drah. Proteiny využívající GPI kotvu se nachází pouze na vnější straně membrány a zastávají mnoho funkcí (receptory, hydrolytické enzymy, adhezní molekuly, inhibitory proteáz a další).^{87, 88, 89, 90}

Dalšími zásadními proteiny asociovanými s LR jsou: Src rodina nerekceptorových tyrosin kinas^{48,37}, receptory tyrosin kinas (RTK)⁹¹, transferrin receptor 2 (TfR2)⁹², alkalická fosfatasa (patří mezi GPI vázané proteiny).³⁶

2.4 Izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán

První pokusy o izolaci vycházely z postupů pro detergent rezistentní membrány. Zásadní práce publikovaná v roce 1992 (Brown a kol.)³⁴, vycházející z práce Lisanti a kol.⁹³ popisuje izolaci frakce GPI-kotvených proteinů z MDCK (z angl. „Madin-Darby canine kidney cells“) epitelové buněčné linie pomocí neionogenního detergentu Triton X-100 (obr. 8) při 0 °C. Buňky inkubované s 1% detergentem, byly dále separovány pomocí ultracentrifugace v hustotním gradientu sacharózy. Při ultracentrifugaci došlo k oddělení nízko hustotní frakce obsahující převážně GPI-kotvené proteiny a glykosfingolipidy.³⁴



Obrázek 8: Struktura detergentu Triton X-100.

Použití detergentu k izolaci LR/DRM poskytuje pouze omezené množství informací o lipidových raftech a jejich funkci v nativní membráně živých buněk. Kromě studií modelových membrán vznikaly i další izolační techniky, které nevyužívaly detergenty.⁴⁰

2.4.1 Materiál pro izolaci lipidových raftů/detergent rezistentních membrán

Původní práce se zaměřují na izolaci z buněčných linií savčích buněk. Buňky epitelu – převážně zmiňovaná MDCK buněčná linie^{34, 94}, fibroblasty⁹⁵, CHO (z angl. „Chines hamster ovary“) buněčná linie³⁶, buněk bazofilní leukémie (RBL-2H3)⁹⁶, hematopoetické kmenové buňky a další. K izolaci lipidových raftů lze využít i tkáně – nervová tkáň, plicní tkáň⁹⁷, svalová tkáň⁹⁸ a další.³⁹

Kromě prací zabývajících se izolací LR/DRM ze savčích buněk, existují i publikace popisující přítomnost detergent rezistentních membránových domén v kvasinkách.^{99, 100}

2.4.2 Postup izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán

2.4.2.1 Narušení membrán a pretreatment

Tento krok vždy vychází z materiálu, který byl zvolen pro izolaci LR (kultivované buňky, tkáň) a je potřeba optimalizovat. Techniky jsou mechanické či fyzikálně–chemické. Mezi mechanické patří homogenizátory (Dounce, Potter-Elvehjem), homogenizace pomocí skleněných kuliček. Fyzikálně–chemické jsou například sonikace, enzymatická homogenizace, detergentová homogenizace a osmotická homogenizace v hypotonickém prostředí.¹⁰¹

2.4.2.2 Metody využívající detergent

Rozpustnost v detergencích

Ve struktuře LR jsou acylové řetězce pevně přimknuté k sobě a stabilizovány přítomností cholesterolu (L_o fáze). Neionogenní detergenty jsou těmito strukturami odpuzovány. Naopak preferují neuspořádané acylové řetězce, ochotně se v nich koncentrují a vytváří micely. Se zvyšující se koncentrací detergentu se acyly rozpouští, přednostně domény neuspořádané (L_d fáze). Pokud koncentrace detergentu dosáhne kritické hodnoty, dojde k rozpuštění i domén LR. Data získaná použitím těchto metod vypovídají převážně o proteinovém a lipidovém složení, nikoliv však o jejich vzájemných interakcích. Míra rozpustnosti závisí na lipidovém složení, typu detergentu a teplotě. Proteiny asociované s lipidovými rafty vykazují rozdílnou rozpustnost v závislosti na použité koncentraci a typu detergentu.⁴⁰

Vliv teploty

Původní protokoly popisující izolaci DRM uvádí, že práce by měla probíhat za nízkých teplot (0–4 °C), neboť by mohlo dojít k rozpuštění komponent DRM. Tyto poznatky vedly k předpokladu, že se LR v živých buňkách formují pouze za nízkých teplot a jejich existence *in vivo* byla zpochybněna.¹⁰² Pozdější práce však popisují izolaci DRM při 20 °C či dokonce

37 °C.^{33, 103} Proteinové markery LR (např. flotillin) jsou hojně přítomné za nízkých teplot, ale částečně rozpuštěné při 37 °C. Tyto výsledky indikují, že při 37 °C jsou tyto proteiny méně rezistentní vůči působení detergentů. DRM jsou při nízké teplotě stabilnější díky lipid-lipid interakcím a odolávají působení detergentu lépe než při 37 °C. Naopak množství cholesterolu izolované při 4 °C i 37 °C zůstává podobné.^{104, 105, 106}

Typ detergentu

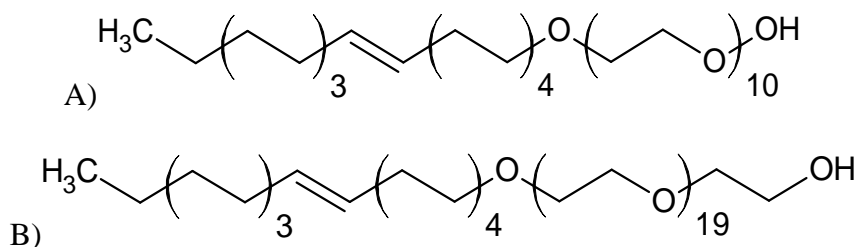
K izolaci DRM lze využít celou řadu detergentů. Nejčastěji jsou to neionogenní detergenty řady Triton, Brij a Lubrol WX, dále žlučové kyseliny či zwitteriony. Vzhledem k rozdílným strukturám detergentů lze předpokládat i rozdílné interakce s buněčnou membránou. Proteiny asociované s DRM či lipidovými rafty vykazují rozdílnou rozpustnost v závislosti na použité koncentraci a typu detergentu.⁴⁰

Řada Triton (Triton X-100, Triton X-114) (obr. 8)

Historicky nejčastěji používaný detergent k izolaci DRM je Triton X-100. Většina protokolů vycházející z použití Tritonu jako detergentu uvádí potřebu pracovat při snížené teplotě (0-4 °C). Bylo popsáno, že Triton může zvyšovat velikost domén, neboť může docházet k jejich agregaci, což sťažuje jejich další charakterizaci. Triton X-100 vykazuje schopnost selektivně rozpouštět fosfolipidy vnitřní části dvojvrstvy. Proteiny nerozpustné v Triton X-100 jen částečně reprezentují všechny proteiny obsažené v LR.^{107, 23}

Brij96/Brij98 (obr. 9)

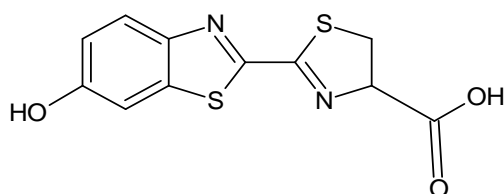
Oba tyto detergenty lze využít k izolaci lipidových raftů, jejich selektivita je však oproti Tritonu nižší. Tato různá selektivita reflektuje slabší interakce mezi detergentem a doménami a jejich nižší schopnost je rozpouštět, což se negativně projevuje na přítomnosti plazmatických proteinů v DRM frakcích.¹⁰⁸



Obrázek 9: Struktura detergentů Brij96 (A) a Brij98 (B).

Lubrol WX (obr. 10)

Jedná se o slabší detergent, než jsou Triton X-100 a Brij96/98 a pro izolaci DRM je třeba udržovat teplotu na 4 °C. Použitím tohoto detergentu byly izolovány proteiny (promininy), které se nepodařilo izolovat za pomoci silnějších detergentů. Vznikla tak hypotéza, že je tento detergent schopen izolovat nový typ lipidových raftů (Lubrol rafts), ve kterých je prominin exprimován.¹⁰⁹ Nicméně dalším studiem bylo prokázáno, že tento detergent neefektivně rozpouští plazmatické proteiny a množství cholesterolu a sfingolipidů je v porovnání s Tritonem X-100 násobně nižší.⁴⁰



Obrázek 10: Struktura Lubrolu WX.

2.4.2.3 *Metody nevyužívající detergent*

První metodu publikoval Song a kol. v roce 1996 pro izolaci kaveol z MDCK buněk. Buňky byly podrobeny působení hydrogenuhličitanového pufru o pH 11 s následnou sonikací. Takto připravený lyzát byl separován v diskontinuálním gradientu sacharózy po dobu 16 až 20 hodin (při 39000 rpm, bez specifikované teploty).¹¹⁰

Další metodu navrhl Smart a kol. cílicí na izolaci kaveol z lidských fibroblastů (za nízkých teplot). Buňky byly lyzovány v isotonickém pufru obsahujícím EDTA, sacharózu a triclin. Následovala centrifugace a sonikace supernatantu, který byl dále separován pomocí centrifugace v diskontinuálním gradientu OptiprepTM po dobu 90 minut při 52000 g.¹¹¹

Z těchto postupů byly během let vypracovány další protokoly, které se zabývaly izolací jak kaveol tak obecně lipidových raftů. Zásadní práce z roku 2005 (Pike a kol.) popisovala izolaci lipidových raftů pomocí isotonického pufru obsahující vápenaté a hořečnaté ionty v jedнокrokové separaci v gradientu OptiprepTM.¹¹²

Tyto izolační postupy produkují LR s podobným složením jako DRM a nedávají vzniknout artefaktům spojeným s použitím detergentu.¹¹³

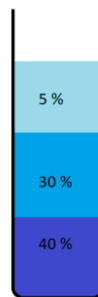
2.4.2.4 *Další techniky*

Imunoizolační metody využívají magnetické mikroskopické částice, jejichž povrch lze pokrýt žádanými protilátkami pro proteiny, které chceme izolovat. Tyto částice jsou inkubovány

s buňkami, které jsou v následujících krocích podrobeny dusíkové kavitaci. Dusíková kavitace je neinvazivní homogenizační technika, během které je na vzorek pouštěn plynný dusík, který zkapalní v pufu a samotných buňkách. Náhlá změna tlaku vede dusík k přechodu zpět do plynného skupenství a tím dojde k rozrušení buněk, ve kterých je obsažen. Po kavitaci následuje separace částic od zbytku buněčného obsahu a vymytí separovaných „imunoizolátů“ z částic nosiče. ^{114, 115, 116}

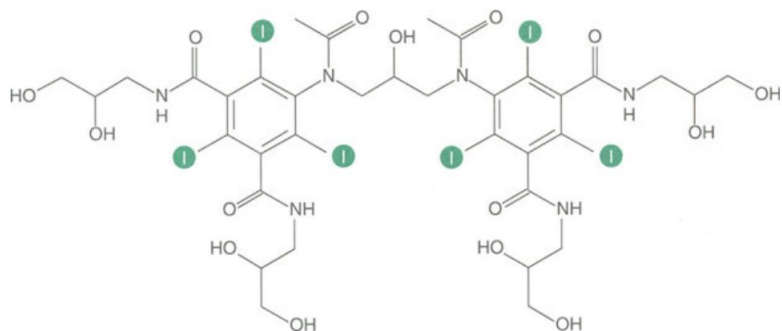
2.4.2.5 Separace v gradientu

Díky vysokému podílu lipidů vůči proteinům mají DRM nižší hustotu vůči zbytku rozpuštěného buněčného obsahu. Díky tomu lze DRM separovat pomocí ultracentrifugace na gradientu, kdy jsou DRM schopny v gradientu vystoupat. Historicky první gradient, na kterém byly izolovány DRM byl 5-40 % gradient sacharózy v diskontinuálním uspořádání (obr. 11).³⁴ Sacharózový gradient patří stále mezi nejpoužívanější (nenáročný na přípravu a inertní k dalším stanovení).



Obrázek 11: Uspořádání diskontinuálního gradientu sacharózy.

Dalším často používaným gradientem je gradient připravený z 60% roztoku iodixanolu, komerčně známý jako OptiprepTM (obr. 12). Iodixanol byl vyvinut jako neionogenní izotonické hydrofilní kontrastní činidlo pro rentgenovou diagnostiku. Díky své nízké toxicitě, optimální viskozitě a hustotě 1,32 g/ml začal být využíván pro separaci v hustotním gradientu. A dále také pro separaci DRM. ^{117, 118, 111}



Obrázek 12: Struktura iodixanolu tzv. OptiprepTM.¹¹⁹

2.5 Charakterizace lipidových raftů

2.5.1 Metody cílení na komponenty lipidových raftů

Cholesterol a jeho deplece

Jak bylo uvedeno výše, přítomnost cholesterolu je zásadní pro vznik LR v plazmatické membráně buněk. Izolované frakce LR jsou také obohaceny o cholesterol. Proto i stanovení celkového cholesterolu ve frakcích patří mezi základní stanovení. Ovlivňování obsahu cholesterolu by zároveň mělo vést ke změnám ve vlastnostech těchto domén. Existuje množství studií popisujících změny v obsahu proteinů asociovaných s LR po depleci cholesterolu z jejich struktur. Odstranění cholesterolu z buněčných membrán vede i k rozvolnění struktur kaveol.^{107, 120, 113, 106}

K depleci cholesterolu z biologických membrán lze využít například cyklodextriny.¹²¹ Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy složené ze α -(1–4) -spojených D-glycopyranozových jednotek. Tyto ve vodě rozpustné molekuly obvykle existují jako hexamery (α -cyklodextriny), heptamery (β -cyklodextriny) a oktamery (γ -cyklodextriny). β -Cyklodextriny vykazují největší afinitu k cholesterolu a jsou nejefektivnější při jeho extrakci z buněčných či modelových membrán. Rozpustnost ve vodě je pro α - a γ - větší než pro β -cyklodextriny, nicméně lze ji zvýšit hydrofilní modifikací (například methylací). Methyl- β -cyklodextriny (M β CD) jsou nejčastěji používané k depleci buněčného cholesterolu.¹²²

Vliv deplece cholesterolu pomocí M β CD neovlivňuje pouze rozvolnění struktur LR. Příkladem je zvýšená permeabilita membrány pro ionty a narušení membránového potenciálu.¹²³ Látky cílících na syntézu cholesterolu (statiny)¹²⁴ či jeho modifikaci (cholesterol oxidasa)¹²⁵ mohou

nahradiť M β CD pro rozrušení LR, nicméně jejich specificita a efektivita zatím nebyla dostatečně demonstrována.¹²³

2.5.2 Metody vizualizace

Biofyzikální metody

Paralelně se studiem DRM vznikaly studie zabývající se biomimetickými modely buněčných membrán. Tyto modely se zaměřovaly na studium fyzikálních principů fázových přechodů lipidů PM.¹²⁶ Jedná se o fázové přechody mezi S₀, L_d a L_o fází.¹⁷ Ke studiu molekulárních principů těchto fázových přechodů sloužily: biomimetické monovrstvy¹²⁷, kotvené lipidové dvojvrstvy (SLB, z angl. „supported lipid bilayers“) ¹²⁸, nanoskopické dvouvrstvé vezikuly¹²⁹ a velké unilamelární vezikuly (GUV, z angl. „giant unilamellar vesicles“).¹³⁰ Ačkoliv se jedná o důležité nástroje pro studium fluidní uspořádané fáze a jejího vzniku, nelze výsledky z modelových membrán přímo aplikovat na membrány nativní. Většina těchto experimentů probíhá v čistě lipidových systémech s malým zastoupením proteinů.¹³¹ To je v kontrastu s biologickou membránou, kde jsou proteiny zastoupeny až z 25%.¹³² Některé vlastnosti syntetických membrán nemusí realisticky reprezentovat situaci *in vivo*. Například fluidní uspořádané fáze modelových membrán vykazují vyšší míru uspořádanosti, než je tomu u membrán nativních.¹³³ Pokrokem v tomto studiu jsou systémy vezikul plazmatické membrány (GPMV, z ang. „giant plasma membrane vesicles“), které více odpovídají nativním membránám. GPMV obsahují lipidovou i proteinovou diverzitu buněčných membrán, nicméně postrádají zapojení do cytoskeletárního systému a vysokou asymetrii mezi jednotlivými vrstvami.^{126, 134, 135}

Analytické metody

LR přítomné v buňkách jsou považovány za nanoskopické domény (<200 nm), proto k jejich vizualizaci není možné použít konvenčních optických mikroskopů. Lokalizace molekul asociovaných s markery LR pomocí konfokální mikroskopie poskytuje informace o lipidovém a proteinovém složení LR, ale nedokáže vizualizovat struktury LR v buňce.¹³⁶

Techniky, které cílí na překonání těchto omezení jsou fotoaktivovaná lokalizační mikroskopie (PALM)¹³⁷, mikroskopie se stimulovanou emisní deplecí (STED)¹³⁸, optická skenovací mikroskopie v optickém poli (NSOM)¹³⁹, sledování jednotlivých částic (SPT)¹⁴⁰, interferometrická skenovací mikroskopie (iSCAT)¹⁴¹ a fluorescenční korelační spektroskopie (FCS).¹⁴² Spojení STED mikroskopie s FCS poskytuje rozlišení přibližně 20–40 nm, čímž lze studovat vlastnosti membrány v nano měřítku.¹⁴³ Tyto techniky mohou vysvětlit laterální

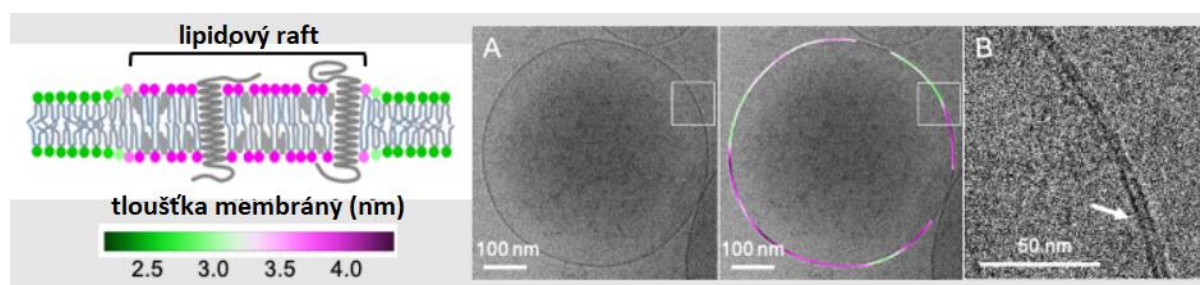
difuzi, heterogenní organizaci a oligomerizaci molekul ve strukturách LR. V neposlední řadě patří mezi zásadní techniky pro studium LR Försterův rezonanční přenos energie (FRET).¹⁴⁴ Tuto techniku lze uplatnit na studium modelových membrán i živých buněk s jejíž pomocí lze studovat nejen samotnou existenci domén, ale i jejich velikost.^{145, 146}

Většina zmíněných analytických metod závisí na fluorescenčním značení molekul, což přináší jistá omezení. Chování lipidů v membráně závisí na jejich amfifilních vlastnostech a interakcích s okolními molekulami. Fluorescenční značky mohou tuto rovnováhu narušit svou velikostí, která je často obdobná samotným molekulám lipidů.^{133, 135}

Hmotnostní spektrometrie je vhodný nástroj pro studium lipidového a proteinového složení membrán.¹⁴⁷ Další technikou je Ramanova spektrometrie, pomocí které lze studovat složení membránových domén.¹⁴⁸ Pomocí elektronové mikroskopie lze získat obrázek uspořádání molekul buněčného povrchu a asociovaných proteinů ve strukturách LR.¹⁴⁹ Nevýhodou těchto metod je potřeba fixace buněk a jejich barvení, což je u molekul lipidů problematické.¹³⁵

Preferovanou technikou pro studium LR zůstává převážně fluorescenční mikroskopie, což vede k potřebě stálého zdokonalování používaných fluorescenčních značek.¹³⁵

Kryoelektronová mikroskopie (Cryo-em) patří mezi nejmodernější techniky pro vizualizaci struktur LR (obr. 13), která dokáže rozlišit sub-nanometrové rozdíly ve tloušťce biologických membrán (až 0,5 Å rozdíly v tloušťce dvouvrstvy) bez použití fluorescenční značky.^{150, 151}



Obrázek 13: Vizualizace rozdílné tloušťky membrány pomocí Cryo-em. Převzato z Heberle a kol.¹⁵¹

2.6 Biologická relevance lipidových raftů

2.6.1 Rozpoznávání patogenů a sekrece cytokinů

LR hrají důležitou roli ve vrozené a adaptivní imunitní odpovědi vůči patogenům. Kromě toho, že ve své struktuře obsahují proteiny důležité pro fagocytózu, navíc akumulují receptory

rozpoznávající patogeny.¹⁵² Příkladem jsou lektinové receptory typu C a toll-like receptory (TLR), využívané k detekci a iniciaci signální kaskády pro vyplavení cytokinů a komplementárních systémů pro boj s patogeny.^{153, 154}

TLR receptory jsou součástí vrozeného imunitního systému a slouží jako primární senzory pro rozpoznávání patogenů. Rodina TLR obsahuje 10 receptorů, z toho některé jsou přítomné na buněčném povrchu (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) a některé jsou intracelulární (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Tyto receptory rozpoznávají různé patogeny a spouští sekreci cytokinů, která je závislá na přítomnosti cholesterolu.¹⁵⁴

Bakteriální lipopolysacharidy se vážou na proteiny, které jsou obsažené ve struktuře LR. Tyto proteiny následně iniciují signální kaskádu po interakci s TLR4. Narušení LR pomocí nystatinu vede k zastavení signální kaskády cytokinů, což naznačuje důležitou roli lipidových raftů v aktivaci TLR4.¹⁵⁵

Dalším TLR receptorem je TLR2, který rozpoznává komponenty kyseliny lipoteichové buněčné stěny gram pozitivních bakterií a je obohacen v LR.¹⁵⁶ Po interakci buněk s kyselinou lipoteichovou je TLR2 transportován do Golgiho aparátu. Narušení LR pomocí cyklodextrinů inhibuje TLR2 a jeho transport do Golgiho aparátu a tím naznačuje roli LR v aktivaci a transportu TLR2.¹⁵⁷

Lektinové receptory typu C jsou schopny rozpoznat sacharidové domény hub a aktivovat signální kaskády. Tyto receptory byly také nalezeny v doménách LR.¹⁵⁸

Dectin-1 (malý glykoprotein patřící do rodiny lektinů typu C) je primárně exprimován v dendritických buňkách, makrofázích a neutrofilech a hraje důležitou roli v antitumorigenitě. Je schopen rozpoznávat β -glukany a zymosany a translokovat se spolu se svými signálními molekulami (jaterní tyrosin kinasy, fosfolipasy C) do domén LR. Narušení struktury LR cyklodextriny vede k zastavení fosforylace SYK v dendritických buňkách, což napovídá zapojení LR v signalizaci dectinu-1.¹⁵⁹

Cytokiny jsou rozpustné faktory uvolňované buňkami v odpovědi na infekci a zánět a zároveň patří mezi hlavní modulatory imunitního systému. Mezi cytokiny patří TNF (z angl. „tumor necrosis factor“). TNF- α je homotrimerní protein patřící do rodiny cytokinů, který se váže převážně na TNF receptory 1 (TNFR1). Cytokinové receptory jsou soustředovány do LR k zprostředkování cytokinové signalizace. Narušení LR vede k redukci uvolňování cytokinů.

Mimoto, uvolňování cytokinů vyžaduje fúzi s plazmatickou membránou pomocí SNARE (soluble N-methylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) proteinů, které jsou taktéž asociované s lipidovými rafty. ¹⁶¹

Ačkoli uvolnění cytokinů je závislé na lipidových raftech, samotná integrita lipidových raftů je zpětně ovlivňována signalizací cytokinů. Například protein viperin, který je indukován interferony, interaguje s farnesyl difosfát syntasou a inhibuje syntézu cholesterolu a tvorbu lipidových raftů. ¹⁶²

2.6.2 Apoptóza a redox signalizace

Reaktivní formy kyslíku (ROS) produkované ve fagosomech eliminují patogeny přes oxidační poškození pomocí vrozených imunitních buněk. ¹⁶³ Tím reprezentují důležitý element hostitelovy obrany vůči zánětu a infekcím. Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfát oxidasa (NOX) je hlavním zdrojem ROS v hostitelské buňce, jehož komponenty jsou asociovány s LR. Narušení LR snižuje produkci ROS, neboť nedochází k asociaci cytosolových komponent NOX komplexu v plazmatické membráně. ¹⁶⁴

Lipoproteinový agonista TLR1/2 z *Mycobacterium tuberculosis*, spouští translokaci TLR2 a protein kinasy C do struktury lipidových raftů a indukuje produkci ROS. Narušení lipidových raftů v makrofázích vede ke snížené produkci ROS. Zvýšená koncentrace ROS v důsledku infekce napomáhá odstranění patogenů pomocí aktivace apoptózy a nekroptózy. ¹⁶⁵

2.6.3 Lipidové rafty jako vstupní centra pro víry

Prvním krokem virové infekce je vstup virové částice do buňky hostitele. K tomu je potřeba spojení s receptory buněčné membrány, které jsou obohaceny ve strukturách LR. LR jsou zásadní komponenty interakcí mezi patogenem a hostitelem na buněčném povrchu (iniciace signalizace pomocí receptorů, zprostředkování buněčného transportu). ¹⁶⁶

Vstup HIV-1 do buňky probíhá po rozpoznání glykoproteinu gp120, který se nachází na virové obálce. Receptory buněčného povrchu CD4⁺ T-lymfocytů, které tento glykoprotein rozpoznávají jsou CD4 koreceptor, buněčný chemokinový CCR5 receptor a C-X-C chemokinový receptor typu 4 (CXCR4). Tyto receptory jsou asociované s LR. Navíc cholesterol přítomný v LR vyžadují některé glykoproteiny na povrchu HIV-1 pro vazbu viru na povrch buňky. ^{167, 168}

Virus vaccinia se shlukuje u lipidových raftů, kde interaguje s CD98 glykoproteiny 2 typu a spouští endocytózu. Narušení lipidových raftů a CD98 vede k redukcí endocytózy viru vaccinia, což ukazuje na roli lipidových raftů ve vstupu viru do buňky. ¹⁶⁹

Hemaglutinin (HA) glykoprotein viru chřipky je zásadní komponent pro spojení a fúzi viru s buňkou. K tomu dochází snáze v doménách lipidových raftů, což naznačuje jejich využití ke vstupu do buňky. ¹⁷⁰

Opičí vakuolační polyomavirus 40 (SV40) je po infikování v buňkách transportován do membrán obohacených o caveoly. Specifické narušení caveol pomocí nystatinu vede k blokaci vstupu SV40 do buněk. ¹⁷¹

Lidský herpes virus-6 (HHV-6) vstupuje do buňky pomocí vazby na receptor CD46, který je asociován s lipidovými rafty. Deplece cholesterolu inhibuje vstup HHV-6 do buněk. Následná zpětná substituce cholesterolu vstup do buněk zpětně umožňuje. ¹⁷²

Asociace s lipidovými rafty pro vstup do buňky byla popsána i pro některé viry z rodiny koronavirů. Například virus myši hepatitidy ¹⁷³, vir infekční bronchitidy ¹⁷⁴, virus syndromu náhlého akutního respiračního selhání (SARS-CoV). ¹⁷⁵

Výstup patogenů z buněk je zásadní pro rozšíření infekce do dalších buněk, tkání či hostitelů. Patogeny mohou indukovat apoptózu a prasknutí buněk pomocí tvorby „výčnělků“ či tzv. buddingu, který zahrnuje interakce s lipidovými rafty. Pro tento krok viry využívají cholesterol hojně přítomný ve strukturách LR. Mezi viry, které takovýto systém využívají patří virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) ^{168, 176, 177}

2.6.4 Farmaceutické ligandy působící na lipidové rafty

Mnoho receptorů využívaných patogeny pro vstup do buňky asociují s LR. Tudiž cílení na domény raftů může být významná strategie boje proti infekci. ¹⁷⁸

Některé farmaceutické přípravky vykazují schopnost interakce s LR, která vede k blokaci vstupu patogenů do buňky. Mezi sloučeniny cílící na LR patří:

Statiny

Statiny jsou látky využívané k léčbě kardiovaskulárních onemocnění navíc s popsánými protizánětlivými účinky. Jsou schopny inhibovat 3-hydroxy-3-methyl glutaryl (HMG-CoA) reduktasu, která je zodpovědná za produkci kyseliny mevalonové. Kyselina mevalonová je prekurzor pro syntézu buněčného cholesterolu a isoprenoidů. Cholesterol je

zásadní komponent LR, se kterými asociují receptory rozpoznávající patogeny. Inhibice produkce isoprenoidů vede ke snížení prenylace proteinů, a tudíž i snížení zánětlivé reakce.¹⁷⁹

Statiny vykazují také protivirové vlastnosti. Jsou schopny inhibovat replikaci HIV-1 viru v CD4⁺ T buňkách, kdy zvyšují expresi proteinu p21, který tlumí činnosti komplexu cyklin-dependentních kinas s cyklinem. Tento komplex inhibuje aktivaci a proliferaci imunitních buněk. Navíc jsou schopny inhibovat expresi CCR5, který je součástí vstupní dráhy viru HIV-1 do buňky.¹⁸⁰ Studie popisující tyto účinky využívaly například atorvastatin¹⁸¹ a nystatin.¹⁸²

Statiny inhibují uvolňování virů z hostitelských buněk pomocí snížení přístupnosti cholesterolu, který je pro uvolnění zásadní.¹⁸³

Kromě viru HIV-1 vykazují statiny protivirové vlastnosti například vůči viru chřipky (fluvastatin)¹⁸⁴, viru hepatitidy C (fluvastatin)¹⁸⁵, SARS-CoV-2 (fluvastatin)¹⁸⁶, lidský respirační syncytiální virus (lovastatin).¹⁸⁷

Propofol je krátkodobě působící anestetikum s popsányými imunomodulačními vlastnostmi. Redukuje sekreci cytokinů TNF- α , které se vyplavují v průběhu imunitní odpovědi na patogeny.¹⁸⁸

Některá antidepresiva vykazují schopnost interagovat s receptory asociovanými s LR.¹⁸⁹ Tyto interakce mohou mít vliv na schopnost buněk bojovat s patogeny.^{189, 190}

2.6.5 Neurodegenerativní onemocnění

V nervovém systému vedou změny metabolismu lipidů asociované se špatnou funkcí nervového systému k abnormálním funkcím LR, a tím napomáhají vývoji patogenních změn nervového systému.¹⁹¹

Některé změny složení lipidů v mozku jsou spojovány s procesem fyziologického stárnutí. Mezi takovéto změny patří snížení celkového množství lipidů, změny v množství a profilu polynenasycených mastných kyselin, snížené množství gangliosidů, změny struktur sfingolipidů. Je složité prokázat vztah mezi těmito změnami a postupným snižováním fyziologického výkonu, který vzniká jako součást stárnutí mozku. Nicméně studie naznačují, že tyto změny mají efekt na fyzikálně-chemické vlastnosti LR, tudíž mohou LR samy podstupovat přirozené procesy stárnutí.^{191, 192}

Vrozená metabolická onemocnění vycházející z chyb v metabolismu sfingolipidů často vedou k fatálním neurodegenerativním onemocněním. Příkladem může být Tay-Sachsova choroba

(defekt degradace gangliosidů v lysozomech)¹⁹³, některé formy Gaucherovy choroby (defekt aktivity glukosylceramidasy)¹⁹⁴, Niemann-Pickova choroba typu A (nedostatek kyselých sfingolmyelinasy).¹⁹⁵ Některé vrozené změny v přeměnách a ukládání cholesterolu mají spojitost s chronickými neurodegenerativními nemocemi a jsou spojovány s uspořádáním LR.¹⁹¹

Huntingtonova choroba je neurodegenerativní dědičné onemocnění. Je způsobováno mutací genu kódující protein huntingtin a je spojena se změnami v metabolismu cholesterolu. Tyto změny jsou zprostředkovány účinky mutovaného proteinu na proteiny regulující steroly.¹⁹⁶ Vedou ke změně hladiny cholesterolu v neuronálních PM a snížení životnosti neuronů. V mozkové tkáni pacientů trpících Huntingtonovou chorobou bylo pozorováno výrazné snížení koncentrace gangliosidů a abnormální exprese genů kódujících různé glykosyltransferasy zapojené do biosyntézy gangliosidů. Takovéto změny v koncentraci gangliosidů a jejich vliv na organizaci LR mohou vysvětlit přítomnost huntingtoninu v LR a jeho vliv na apoptózy neuronů.^{197, 198}

Parkinsonova choroba je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy, které přímo souvisí s úbytkem nervových buněk v části mozku známé jako Substantia nigra. Tyto buňky za normálního stavu produkují dopamin. U pacientů trpících Parkinsonovou chorobou je pozorována snížená hladina cholesterolu v séru a neregulovaná hladina cholesterolu v mozkové tkáni.¹⁹⁹ Několik proteinů spojovaných s tímto onemocněním (např. parkin, α -synuklein) byly pozorovány ve strukturách neuronálních LR.^{200, 201} V mozkové tkáni pacientů trpících Parkinsonem bylo pozorováno množství změn v lipidovém složení LR (zvýšení množství polynenasycených řetězců mastných kyselin, snížení množství cerebrosidů a sulfatidů).²⁰²

Alzheimerova choroba je běžně se vyskytující onemocnění převážně u starších osob charakterizované progresivní degenerací neuronů v částech mozku zodpovědných za paměť a učení. Alzheimerova choroba zahrnuje postupné usazování β -amyloidní peptidu ($A\beta$) a degeneraci neuronů. Dva hlavní faktory přispívají k progresi tohoto onemocnění. Jsou to oxidační stres a zvýšená produkce neurotoxického $A\beta$. Hlavním zdrojem $A\beta$ je štěpení prekursorového proteinu enzymem sekretasou. $A\beta$ poškozuje neurony indukci oxidačního stresu spojeného s buněčnou membránou. Tím poškozuje membránové transportéry a narušuje homeostázu iontů.²⁰³

Vazba A β na membránu hraje zásadní roli v agregaci A β a následném propuknutí onemocnění. Lidská mozková tkáň obsahuje ve zvýšené míře gangliosidy (převážně GM1), které asociují do struktur LR. A β je schopen interagovat s GM1, což je zásadní pro jeho agregaci na membránu. Studie ukazují, že A β může indukovat oxidační stres ve struktuře LR a narušovat signální dráhy spojené s rafty.¹⁹¹

2.6.6 Kardiovaskulární onemocnění

Ateroskleróza je jednou z hlavních příčin kardiovaskulárních onemocnění lidské populace. Vzniká jako výsledek nadměrné akumulace lipidů (převážně oxidovaných lipoproteinů – LDL z angl. „low density lipoproteins“) a dalších komponent krve makrofágy na stěnu arterií. Následně dochází k přeměně makrofágů na pěnové buňky, které se akumulují na stěnách cév. Může docházet k ucpání cév a tím dojde k přerušení krevního zásobování, což může vést k infarktu myokardu, cévní mozkové příhodě či perifernímu cévnímu onemocnění.²⁰⁴ Přeměna makrofágů na pěnové buňky vykazuje jistou závislost na LR, neboť se receptory pro oxidovaný LDL lipoprotein akumulují ve strukturách LR.²⁰⁵

2.7 Lipidové rafty v jiných organelách

2.7.1 Mitochondrie

Interakce mezi ER a mitochondrií vzniká na subdoméně ER pojmenované membrány asociované s mitochondriemi (MAM).²⁰⁶ Tyto subdomény jsou obohaceny o enzymy zodpovědné za syntézu lipidů. MAM tedy může fungovat jako místo nevezikulárního transportu lipidů mezi ER a mitochondrií. Vznikla hypotéza, že existence MAM domén a jejich funkce závisí na proteinovém a lipidovém složení převážně cholesterolu a glykosfingolipidů. Cholesterol, který je hojně obsažen v buněčné membráně a má vliv na řadu buněčných procesů, je obohacen také v MAM doménách. Spolu s glykosfingolipidy vytváří klastry podobné LR objevených v PM. Tyto klastry se účastní signalizace a mají vliv na apoptózu jak v PM, tak i v mitochondriích a ER.^{206, 207, 208, 209}

2.7.2 Endoplazmatické retikulum

Domény podobné LR lze najít i ve struktuře ER. Jsou charakterizovány přítomností proteinů erlin-1 a erlin-2, které se nevyskytují v jiných buněčných kompartmentech.²¹⁰ Erliny lze izolovat jako DRM pomocí ultracentrifugace na sacharózovém gradientu. Tyto proteiny patří do stejné proteinové rodiny jako flotillin a stomatin a lze je najít v mnoha buněčných kulturách. V ER se vyskytují jako heterooligomerní komplexy erlinu-1 s erlinem-2. Jejich funkce je

degradace proteinů asociovaná s ER, ovlivňování receptorů inositol 1,4,5-trisfosfátu a regulace metabolismu lipidů. Za patofyziologických podmínek je lze najít také ve struktuře MAM, kde hrají roli v apoptóze a signalizaci. Existence domén podobných LR v ER je překvapivá, neboť ER není významně obohaceno o cholesterol a sfingolipidy. ²¹¹

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a roztoky

3.1.1 Chemikálie

Kultivační médium Minimum essential medium eagle (firma Sigma Aldrich), fetální bovinní sérum (FBS, Serana), neesenciální aminokyseliny (NEAA, Sigma Aldrich), penicilin-streptomycin (Sigma Aldrich), dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich), trypanová modř (0,4% roztok, Sigma Aldrich), Triton X-100 (Merck), 40% akrylamid s *N,N'*-methylenbisakrylamid (29:1, Merck), glycerol (Sigma Aldrich), laurylsulfát sodný (10% SDS, Sigma Aldrich), *N,N,N',N'*-tetramethyldiamin (TEMED, Sigma Aldrich), kyselina octová (CH_3COOH zásobní 99,8%, VWR Chemicals BDH), OptiprepTM Density gradient (60% zásobní, Sigma Aldrich), transferový pufr Trans-Blot 5x (Bio-Rad USA), polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween® 20, Sigma Aldrich), trypsin-EDTA (0,25%, Gibco), western blotting luminol reagent (Immuno Cruz), BCA (kyselina bicinchoninová) pracovní roztok (PierceTM BCA protein assay reagent A / reagent B, Thermo Scientific), primární polyklonální protilátka proti kaveolinu-1 (kat. číslo: 3238, Cell Signaling Technology), primární monoklonální protilátka proti flotillinu-1 (kat. číslo: ab233438, Santa Cruz Biotechnology), sekundární protilátky: anti-rabbit IgG HRP-linked proti kaveolinu (kat. číslo: 7074S, Cell Signaling Technology) a anti-mouse IgG HRP-linked proti flotillinu (kat. číslo: 7076S, Cell Signaling Technology), deionizovaná voda (ddH_2O), migrační pufr 10× (kat. číslo: sc-24949, Santa Cruz Biotechnology), marker molekulových hmotností proteinů (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) ethanol (96 % zásobní, Penta Chemicals), diagnostická sada pro enzymatické stanovení cholesterolu (kat. č.: BLT00034, Erba Lachema)

Peroxosíran amonný (APS, Sigma Aldrich), trihydrát octanu sodného ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich), heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich), dekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich) monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich), sacharóza (Sigma Aldrich), 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris, Sigma Aldrich), chlorid sodný (NaCl, Sigma Aldrich), sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, Sigma Aldrich), hovězí sérový albumin (BSA, Sigma Aldrich), N-acetyl-L-cystein (Sigma Aldrich), chlorid draselný (KCl, Sigma Aldrich), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 , Sigma

Aldrich), sušené odtučněné mléko (Nutri House), dithiotreitol (Sigma Aldrich), bromfenolová modř (Spolana Neratovice)

3.1.2 Roztoky

3.1.2.1 Pufry

Fosfátový pufr 0,1 M pH 7,4: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Acetátový pufr 0,1 M pH 6,5: $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$

10× PBS (z angl. „phosphate buffer saline“) pH 7,4: 1,4 M NaCl + 0,03 M KCl, 0,09 M + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + 0,015 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$

1× PBS pH 7,4: 10x PBS + ddH₂O v poměru 1:9

10× migrační pufr pH 8,3: 25 mM Tris + 192 mM glycin, 0,1% SDS

1× migrační pufr pH 8,3: migrační pufr 10× + ddH₂O v poměru 1:9

1× TBS (z angl. „Tris buffer saline“) pufr pH 8: 20 mM Tris, 150 mM NaCl

TBST (TBS-Tween® 20) pufr: 50 ml 1× TBS (pH 8) + 450 ml ddH₂O + 0,5 ml Tween® 20

Lyzační pufr: 1× TBS + 1% Triton X-100, pH 8

Gradientový pufr: 1× TBS pH 8

Transferový pufr: 200 ml 5× Trans-Blot pufr + 600 ml ddH₂O + 200 ml ethanol

1 M Tris pH 8: 6 g Tris + 50 ml ddH₂O + pH upraveno konc. HCl

4× Pufr migračního gelu pH 8,8: 36,3 g Tris + 200 ml ddH₂O + pH upraveno HCl

4× Pufr zaostřovacího gelu pH 6,8: 3,0 g Tris + 50 ml ddH₂O + pH upraveno HCl

Činidlo pro stanovení cholesterolu: Goodův pufr pH 6,7 (složení neuvedeno) + fenol 5 mM + 4-aminoantipyrin 0,3 mM + cholesterolesterasa $\geq 3,33 \mu\text{kat/l}$ + cholesteroxidasa $\geq 0,83 \mu\text{kat/l}$ + peroxidasa $\geq 50 \mu\text{kat/l}$

Vzorkovací pufr: 2,5 ml 4× pufr zaostřovacího gelu + 4 ml 10% SDS + 2 ml glycerol + 2 mg bromfenolové modři + 0,31 g dithiotreitolu + 10 ml ddH₂O

3.1.2.2 Kultivační médium

Minimum essential medium eagle médium slouží ke kultivaci HeLa buněk. Médium obsahuje Earles salts, L-glutamin, hydrogenuhličitan sodný. Dále je přidáno 50 ml FBS, 5 ml penicilin-streptomycin a 5 ml NEAA.

3.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy AX 105 Delta-Range (Mettler, Španělsko)

Centrifuga Eppendorf miniSpin (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Rotina 380R (Schoeller Instruments, Česká republika)

Ultracentrifuga Optima XPN-90 (Beckman Coulter, USA)

Termomixér Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo)

pH metr HI 2211 pH/ORP (HANNA instruments, Itálie)

Systém pro elektroforézu Mini PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad, USA)

Systém pro western blotting Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém (Bio-Rad, USA)

Inverzní mikroskop CK40-F200 (Olympus Optical, Japonsko)

Systém pro elektrochemickou analýzu µAutolab III analyzátor (Metrohm, Švýcarsko)

UV-VIS spektrofotometr Specord 250 Plus (Analytik Jena, Německo)

Inkubátor MCO-17A/C (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Spektrofotometr Tecan infinite M200PRO (Schoeller Instruments, Česká republika)

Laminární box BIO130 A2 (Alpina, Polsko)

Mrazicí box skříňový Forma 89000 Series -80 °C (Thermo Scientific, USA)

Snímací systém G:BOX Chemi XX6 (Syngene, Bangalore)

3.3 Biologický materiál

Pro experimenty sloužila buněčná linie HeLa (zakoupena od ECACC, katalogové číslo 93021013). Jedná se o adherentní buněčnou linii lidských epitelových buněk, které byly poprvé odebrány z karcinomu děložního hrdla v roce 1951. Tato buněčná linie je běžně dostupná na pracovišti a roste rychle. ²¹²

3.4 Metody

3.4.1 Výsev buněk

Buňky se uchovávají zamražené v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v roztoku FBS/DMSO (1:9). Po rozmražení se vysévají do kultivačních lahví s kultivační plochou 25 cm^2 . Na láhev se vyseje přibližně 1.10^6 buněk. Při práci s buňkami je důležité dodržovat pravidla sterilní manipulace.

3.4.2 Kultivace buněk

Buňky se kultivují v inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, v atmosféře 5% CO_2 a prostoru nasyceném vodní parou. HeLa buňky se pěstují adherentně, kdy rostou v jedné vrstvě. Růst buněk se pravidelně kontroluje pod inverzním mikroskopem. Buňky rostou do doby, kdy dosáhnou vysokého procenta konfluence, tj. stavu, kdy buňky zaplní povrch dna nádoby a dostanou se do vzájemného kontaktu. Vzájemný kontakt vede k tzv. kontaktní inhibici, a proto je třeba buňky přenést (pasážovat) do nové kultivační nádoby. ²¹³

3.4.3 Pasážování buněk

Pasážování adherentních buněk se provádí, pokud je dno nádoby pokryto z 80 %. K pasážování se používá trypsin, díky kterému dojde k uvolnění buněk z kultivační nádoby.

Postup:

Z kultivační nádoby s buňkami se vyleje kultivační médium. Pomocí $1\times\text{ PBS}$ se buňky dvakrát opláchnou od zbytku média. Následně se přidá 1 ml trypsinu. Buňky se na 2 minuty vloží do inkubátoru, kde dojde k oddělení ze dna nádoby. Po vytažení z inkubátoru se k buňkám přidá 9 ml kultivačního média. Suspenze se přenesse do zkumavky a nechá centrifugovat 3 minuty při 1000 g. Oddělí se supernatant a k peletu buněk se přidá 10 ml média. Následně se buňky spočítají v Bürkerově komůrce ($100\text{ }\mu\text{l}$ tropanové modři + $10\text{ }\mu\text{l}$ suspenze buněk). Poté lze buňky rozdělit do nových kultivačních nádob s větší kultivační plochou nebo do Petriho misek (tab. 1).

Láhev 25 cm ²	10 ml média	1×10 ⁶ buněk
Láhev 75 cm ²	30 ml média	2×10 ⁶ buněk
Láhev 150 cm ²	50 ml média	4×10 ⁶ buněk
Petriho miska 10 mm	10 ml média	1×10 ⁶ buněk

Tabulka 1: Poměr plochy kultivační plochy ku množství kultivačního média a buněk.

3.4.4 Izolace buněk

Buňky sloužící k experimentům se již nepasážují, ale dojde k jejich manuálnímu seškrábání z povrchu kultivační nádoby. Práce nemusí probíhat za sterilních podmínek, ale je důležité udržovat nízkou teplotu 4 °C. Nejdříve se odsaje médium a buňky se dvakrát opláchnou ledovým 1× PBS. Poté se přidá 5 ml 1× PBS a buňky se pomocí škrabky oddělí od povrchu Petriho misky. Suspenze buněk v 1× PBS se stočí 3 minuty 1000 g při 4 °C. Oddělí se supernatant a pelet buněk se rozsuspenduje v 1 ml 1× PBS. Takto zpracované buňky lze zamrazit či ihned použít k dalším experimentům.

3.4.5 Izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán

Buňky používané k izolaci LR/DRM (obr. 14) byly uchovávány v -80 °C v mikrozkuvkách s 1 ml PBS. Všechny kroky je důležité provádět za nízké teploty 4 °C.

(1) Buňky se nechaly rozmrazit na ledu a následně byl odebrán PBS. K rozmraženým buňkám bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru obsahující 1% Triton X-100. Následovala inkubace na ledu po dobu 30 minut. Po inkubaci se buňky stočily na centrifuze po dobu 10 minut při 1000g při 4 °C. Následně byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno znovu 500 µl lyzačního pufru. Po 30ti minutové inkubaci byla provedena centrifugace (podmínky: 10 min, 1000 g, 4 °C) a odebrání druhého supernatantu. Oba supernatanty o byly spojeny do celkového objemu 1 ml.

(2) V dalších krocích byla provedena separace DRM obsažených v supernatantu od zbytku nerozpuštěného buněčného obsahu. Separace probíhala pomocí dvou gradientů: **sacharóza** a **Optiprep™**. K 1000 µl supernatantu bylo přidáno 1000 µl 85% sacharózy či 1000 µl 50% Optiprepu™, tedy konečná koncentrace 42,5% sacharózy a 25% Optiprep™. Tato směs byla dávkována na dno ultracentrifugační zkumavky. Následovalo převrstvení 1000 µl 35% sacharózy či 20% Optiprepu™. A poslední vrstvu tvořilo 1000 µl 5% sacharózy či 10% Optiprepu™. Tímto vznikl diskontinuální hustotní gradient sacharózy a Optiprepu™. Kromě zkumavek s buněčným supernatantem byly provedeny experimenty čistě jen s lyzačním pufrem bez buněk, tyto zkumavky sloužily jako slepé vzorky.

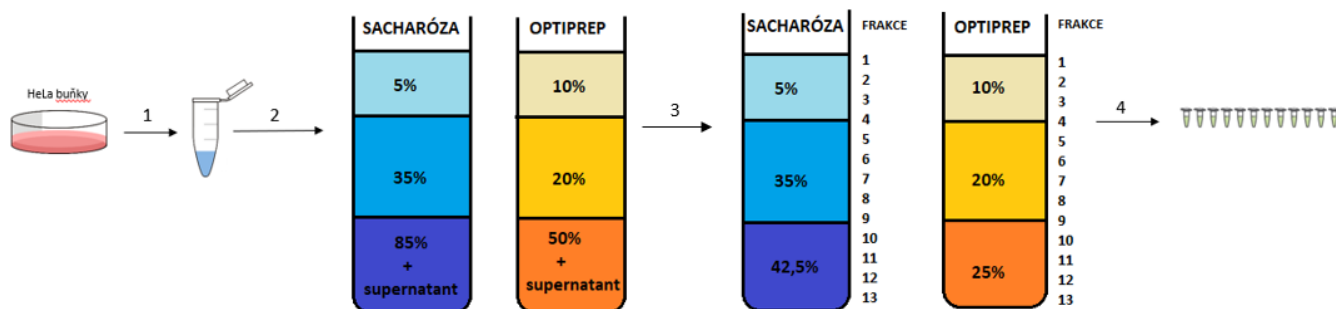
(3) Následovala ultracentrifugace ve dvou časových intervalech: **4 hodiny** (200 000 g, 4 °C) a **18 hodin** (200 000 g, 4 °C).

(4) Po ultracentrifugaci byly odebrány frakce 1-13 v objemech po 300 µl (Tab. 2). Takto připravené frakce byly používány k dalším experimentům (obr. 14).

	Sacharóza 4 hodiny	Sacharóza 18 hodin	Optiprep 4 hodiny	Optiprep 18 hodin
Frakce	1-13	1-13	1-13	1-13
Zkr.	S4(1-13)	S18(1-13)	O4(1-13)	O18(1-13)

	Slepý vzorek Sacharóza 4 hodiny	Slepý vzorek Sacharóza 18 hodin	Slepý vzorek Optiprep 4 hodiny	Slepý vzorek Optiprep 18 hodin
Frakce	1-13	1-13	1-13	1-13
Zkr.	SB4(1-13)	SB18(1-13)	OB4(1-13)	OB18(1-13)

Tabulka 2: Odebrané frakce



Obrázek 14: Schéma izolace DRM.

3.4.6 Stanovení celkového množství proteinu metodou BCA

Princip:

Tato metoda se využívá ke stanovení celkového proteinu ve vzorku. K měření se využívá kyselina bicinchoninová. Metoda je založena na tvorbě komplexu Cu^{2+} iontů s proteiny a jejich následná redukce na Cu^+ ionty. Kyselina bicinchoninová tvoří se vzniklými Cu^+ ionty v zásaditém prostředí modro-fialový komplex, který lze spektrofotmetricky změřit při 562 nm.²¹⁴

Postup:

BCA pracovní roztok (Pierce™ BCA protein assay reagent) se připraví smícháním činidel A a B v poměru 50:1. Připravené činidlo se v objemech 200 µl přidá k 10 µl vzorku do jamky

mikrotitrační desky. Směs se nechá 30 minut inkubovat při 37 °C a následně se změří absorbance při 562 nm. Koncentrace proteinu se vypočítá z kalibrační řady založené na známých koncentracích BSA ve vodě (zásobní roztok 0,5 mg/ml, viz tab. 3). Všechny grafy byly vypracovány v programu Microsoft Excel spolu s výpočty a směrodatnými odchylkami (SD).

Koncentrace (mg/ml)	0	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,5
BSA (μl)	0	25	50	100	150	200	250	500
Voda (μl)	500	475	450	400	350	300	250	0

Tabulka 3: Kalibrační řada BSA ve vodě.

3.4.7 Stanovení množství celkového cholesterolu

Princip:

Ke spektrofotometrickému stanovení celkového cholesterolu ve frakcích byla využita komerční diagnostická sada od firmy Erba Lachema. Sada obsahuje reagenční činidlo a standard o koncentraci 5,18 mmol/l. Principem metody je enzymatická hydrolýza esterů cholesterolu pomocí cholesterolesterasy na cholesterol a mastné kyseliny. Volný cholesterol je následně oxidován cholesteroloxidasou na 4-cholesten-3on a peroxid vodíku. V přítomnosti enzymu peroxidasy pak reaguje peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem a fenolem za vzniku chinoniminového barviva, jehož absorbance se měří při 500 nm.²¹⁵

Pro měření absorbance v UV-VIS oblasti byly použity křemenné kyvety o velikosti 1 cm. Koncentrace celkového cholesterolu byla následně stanovena pomocí standardu.

Výpočet koncentrace:

$$\text{cholesterol (mmol/l)} = \frac{\Delta A_{vz}}{\Delta A_{st}} \times C_{st} \qquad \text{Standard: } C_{st} = 5,18 \text{ mmol/l}$$

Postup měření:

Všechny reagenty byly smíchány dle tabulky níže (tab. 4). Vzorek: 10 μl odebrané izolované frakce (tab. 2). Směs se promíchá a nechá inkubovat 10 minut při 37 °C. Následně se změří absorbance vzorku A_{vz} a standardu A_{st} proti blanku při 500 nm.

	Blank	Standard	Vzorek
Činidlo	1 ml	1 ml	1 ml
Vzorek	-	-	0,01 ml
Standard	-	0,01 ml	-
Destilovaná voda	0,01 ml	-	-

Tabulka 4: Poměr reagentů pro stanovení celkového cholesterolu.

3.4.8 Stanovení koncentrace volných thiolových skupin Ellmanovou metodou

Princip:

Ke spektrofotometrickému stanovení obsahu volných thiolových skupin proteinů lze využít tzv. Ellmanovo činidlo (5,5'-dithio-bis(2-nitro)benzoová kyselina, DTNB). Tato látka se po reakci s volnou thiolovou skupinou proteinu rozkládá za vzniku kyseliny thio-2-nitrobenzoové. Pro kyselinu thio-2-nitrobenzoovou lze změřit absorbanci při 412 nm na mikrotitrační desce. Absorbance je přímo úměrná množství volných thiolových skupin zkoumané látky.²¹⁶

Postup měření:

Roztok DTNB o koncentraci 2 mM byl připraven rozpuštěním 7,9 mg DTNB v 10 ml 50 mM octanu sodného. K 50 μ l vzorku frakce (tab. 5) bylo následně přidáváno 100 μ l 1 M Tris pH 8 a 50 μ l roztoku DTNB. Připravená směs byla pipetována do mikrotitrační desky a byla změřena absorbance při 412 nm.

Koncentrace volných thiolových skupin ve vzorcích byla stanovena pomocí metody standardního přídatku N-acetyl-L-cysteinu (40 μ M, AC) ke vzorku. K 50 μ l vzorku frakce bylo přidán 40 μ M AC, přidáváno 100 μ l 1 M Tris pH 8 a 50 μ l roztoku DTNB. Připravená směs byla pipetována do mikrotitrační desky a byla změřena absorbance při 412 nm.

Vzorky
50 μ l S4(1-13)
50 μ l S18(1-13)
50 μ l SB4(1-13)
50 μ l SB18(1-13)
50 μ l O4(1-13)
50 μ l O18(1-13)
50 μ l OB4(1-13)
50 μ l OB18(1-13)

Tabulka 5: Vzorky měřených frakcí.

Výpočet koncentrace volných thiolových skupin

Např.	$A_{S4(1)}$	absorbance vzorku frakce S4(1)
$A_{S4(1)} - A_{SB4(1)} = A_{S4(1) \text{ reálná}}$	$A_{SB4(1)}$	absorbance vzorku frakce SB4(1)
$A_{S4(1)+AC} - A_{SB4(1)} = A_{ST}$	$A_{S4(1) \text{ reálná}}$	reálná absorbance vzorku frakce S4(1)
$c_{vz} = (A_{S4(1) \text{ reálná}} * 40) / A_{ST}$	$A_{S4(1)+AC}$	absorbance vzorku frakce S4(1) s přidavkem AC
	A_{ST}	absorbance standardu 40 μ M AC
	c_{vz}	koncentrace vzorku (mol/l)

3.4.9 Separace proteinů pomocí elektroforézy

Na 10% separační polyakrylamidový gel (složení níže) o tloušťce 1,5 mm byl dávkován vzorek frakce. Před dávkováním vzorků na gel byla provedena inkubace se vzorkovacím pufrem v poměru 1:4 (pufr: vzorek) po dobu 2 minut při 95 °C a následně ochlazeny na ledu a stočeny na centrifuze miniSpin. Objem vzorků dávkovaných do jamek byl 20 μ l. Se vzorky byl na gel dávkován marker molekulových hmotností (M) v objemu 2 μ l. Pořadí dávkování vzorků na gel je zobrazeno níže v tabulce 6.

M	1 frakce	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	M
2 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	2 μ l

Tabulka 6: Pořadí dávkování vzorků na gel.

Elektroforéza probíhala v 1× migračním puftru po dobu přibližně 2,5 hodin při konstantním napětí 100 V.

- Příprava migračního gelu (10% polyakrylamidový gel)

složení migračního gelu: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (2,5 ml), deionizovaná voda (4,8 ml), 4× pufr migračního gelu (2,5 ml), 10% peroxidisíran amonný (100 µl), 0,1% tetramethyldiamin (10 µl), 10% SDS (100 µl)

- Příprava zaostřovacího gelu (10% polyakrylamidový gel)

složení zaostřovacího gelu: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (400 µl), deionizovaná voda (2,56 ml), 4× pufr zaostřovacího gelu (1 ml), 10% peroxidisíran amonný (30 µl), 0,1% tetramethyldiamin (4 µl), 10% SDS (40 µl)

3.4.10 Western blot

Princip:

Western blot je technika používaná k detekci specifických proteinů ve směsi po provedení gelové elektroforézy. Proteiny jsou z gelu přeneseny („přebloťovány“) na polyvinylfluoridovou membránu (PVDF) pomocí semi-dry (polosuchého) elektroblotingu. Následuje chemiluminiscenční detekce specifických protilátek.²¹⁷

Protilátky:

Primární protilátky

- Kaveolin-1: 21, 24 kDa – ředěno 1:1000 v 5% sušeného mléka/TBST
- Flotillin-1: 47 kDa – ředěno 1:1000 v 5% sušeného mléka/TBST

Sekundární protilátky

- anti-rabbit protilátka proti kaveolinu – ředěno 1:5000 v 5% sušeného mléka/TBST
- anti-mouse protilátka prot flotillinu – ředěno 1:5000 v 5% sušeného mléka/TBST

Postup:

Gely byly po elektroforéze omyty transferovým pufrem. PVDF membrána byla mezi tím hydratována pomocí methanolu po dobu 10 s a následně byl methanol vyměněn za destilovanou vodu. Do blotovací kazety byly postupně vloženy blotovací papír a na něj filtrační papír, které byly předem navlhčeny v transferovém puftru. Na filtrační papír byla položena

hydratovaná membrána a na membránu gel. Gel byl přikryt navlhčeným filtračním papírem a blotovacím papírem. Takto připravená kazeta se uzavřela a vložila do blotovacího přístroje, kde dochází k přenosu proteinů na membránu vlivem působení elektrického pole (podmínky: 25 V, 1 A, 30 minut). Po přenosu byla membrána 3 × promyta v TBST po dobu 5 minut. Následovala blokace v roztoku sušeného mléka (5% roztok sušeného mléka v TBST) po dobu 1 hodiny, kdy došlo k blokaci zbývajících vazebných míst na membráně. Blokovaná membrána byla inkubována s primární protilátkou po dobu 24 hodin při 4 °C. Poté byla membrána promyta v 5× TBST a následovalo přidání sekundární protilátky, která byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci se sekundární protilátkou následovala detekce.

K detekci sledovaných proteinů byl použit kit pro detekci proteinů WB LumiGLO pro detekci avidin-peroxidase značených protilátek pomocí luminolu. Vzniklá chemiluminiscence byla vizualizována softwarem Genesis (parametry: Chemiblot, lumiglo, viditelný marker, expozice 30 s). Intenzita signálu byla kvantifikována denzitometricky pomocí programu ImageJ.

Princip detekce

Luminol je chemiluminiscenční substrát avidin-peroxidasy. V přítomnosti peroxidu avidin-peroxidasa oxiduje luminol na excitovaný produkt 3-aminofthalát, který emituje světlo při 425 nm. Emitované světlo lze zachytit pomocí kamery.^{218, 219}

3.4.11 Elektrochemické stanovení

3.4.11.1 Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza konstantním proudem

Princip:

Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza konstantním proudem (CPSA) patří mezi galvanostatické techniky. Galvanostatické techniky spočívají v měření změny potenciálu v čase po vložení konstantního proudu na pracovní elektrodu. Pracovní elektrodou je v tomto případě rtuťová visící kapková elektroda (HMDE). Vložený konstantní proud určuje tok náboje přes rozhraní elektroda-roztok. Změna potenciálu nastává při elektrochemické proměně. Zaznamenává se závislost $(dE/dt)^{-1}$ na potenciálu pracovní elektrody E . Bioaktivní peptidy a bílkoviny poskytují při CPSA za vhodných podmínek u negativních potenciálů dobře definovaný pík. Tento pík (nazývaný pík H) je způsoben vylučováním vodíku katalyzovaný zbytky aminokyselin jako cystein, histidin, lysin a arginin.^{220, 221}

Postup:

Pro elektrochemické měření byly izolované frakce spojeny dle tabulky 8.

Frakce	Sacharóza 4 hodiny	Sacharóza 18 hodin
1 až 4 frakce	S4(1-4)	S18(1-4)
5 až 8 frakce	S4(5-8)	S18(5-8)
9 až 13 frakce	S4(9-13)	S18(9-13)

Tabulka 8: Izolované spojené frakce.

Elektrochemické měření bylo prováděno adsorpčním přenosem v tříelektrodovém zapojení. 10 μl vzorku bylo 30 s adsorbováno na rtuťové kapce. Jako pomocná elektroda sloužil platinový drátek. Jako referenční elektrodu byla použita argentochloridová $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$. Základním elektrolytem byl fosfátový pufr (pH 6,5). Před každým měřením byl povrch elektrody obnovován odkapáním rtuti. K elektrochemickému měření byl použit potenciostat $\mu\text{Autolab III}$ analyzer (Metrohm). Měření proběhlo při parametrech: limitní potenciál (-2 V), rozpouštěcí proud (-95 μA), maximální čas měření (120 s).

4 Výsledky

4.1.1 Biologický materiál

V této práci byly použity kultivované buňky HeLa buněčné linie. Na provedení jednoho experimentu bylo použito přibližně 30×10^6 buněk.

4.1.2 Izolace lipidových raftů/detergent rezistentních membrán

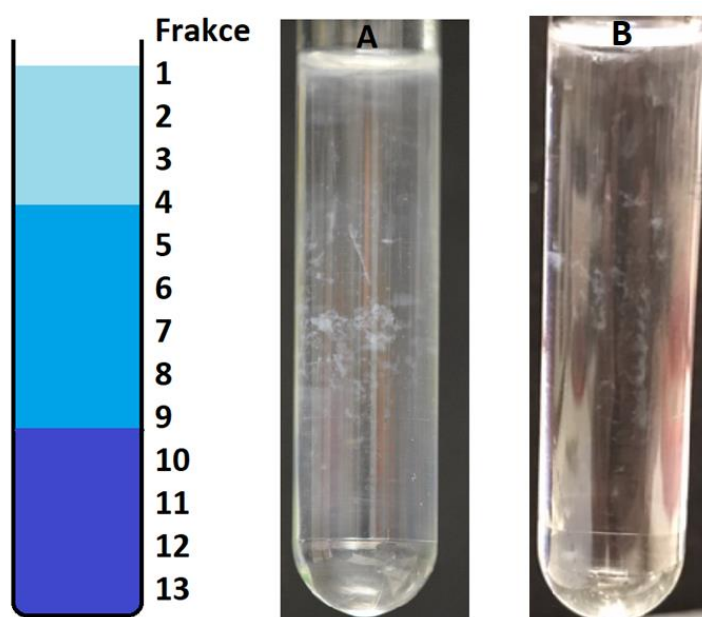
Po přípravě supernatantu HeLa buněk (postup viz 3.4.5) obsahující nerozpuštěné LR/DRM frakce, byla provedena separace pomocí ultracentrifugace na dvou gradientech (sacharóza, Optiprep™) při dvou různých časových intervalech separace (4 hodiny, 18 hodin).

- Sacharóza (obr. 15)

(A) Ultracentrifugace 4 hodiny, 200 000 g, 4 °C

(B) Ultracentrifugace 18 hodin, 200 000 g, 4 °C

Odebrané frakce 1–13 (tab. 2)



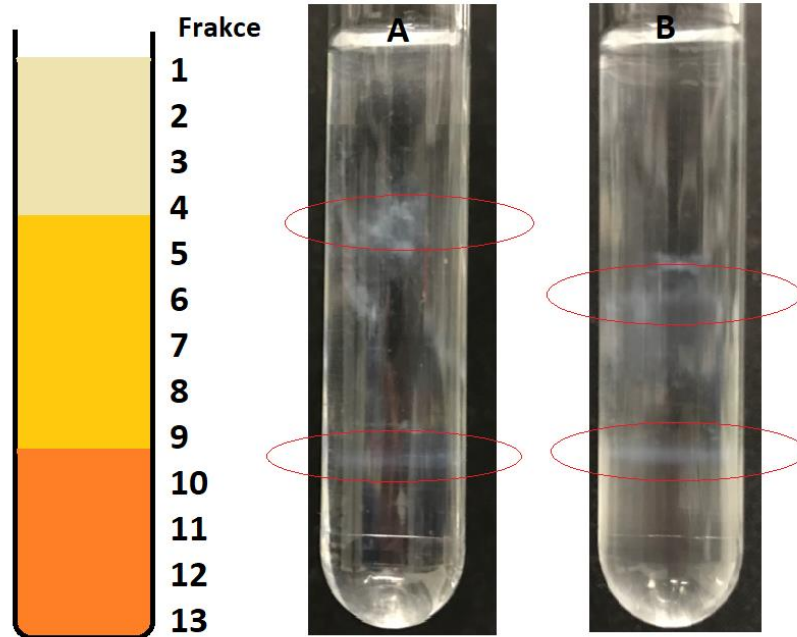
Obrázek 15: (A) Zkumavka sacharózového gradientu po (A) 4 hodinové a (B) 18 hodinové ultracentrifugaci.

- **Optiprep™ (obr. 16)**

(A) Ultracentrifugace 4 hodiny, 200 000g, 4 °C

(B) Ultracentrifugace 18 hodin, 200 000g, 4 °C

Odebrané frakce 1-13 (tab. 2)



Obrázek 16: Zkumavka Optiprep™ gradientu po (A) 4 hodinové a (B) 18 hodinové ultracentrifugaci s červeně zaznačenými „prstenci“ LR/DRM.

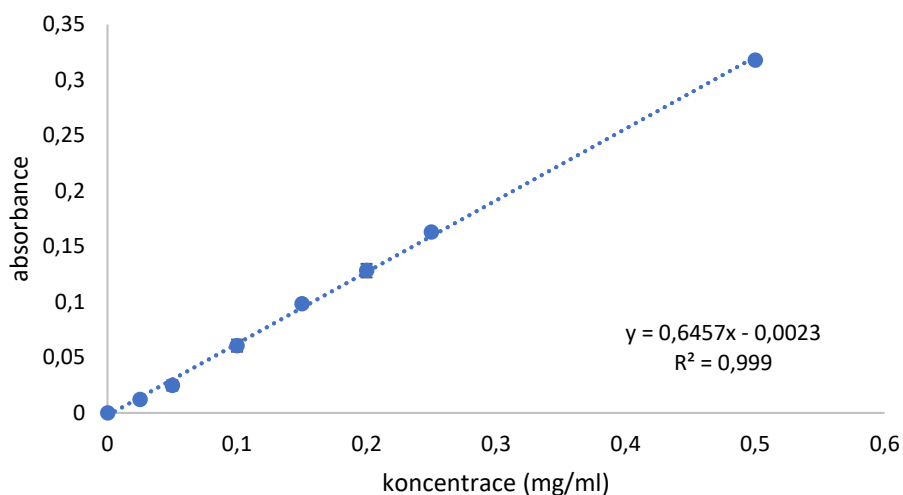
U gradientu sacharózy nedošlo k vizuálně patrnému zakoncentrování LR/DRM v gradientu, neboť nebylo možné pozorovat „prsteneček“ v žádné části ultracentrifugační zkumavky. U gradientu Optiprep™ bylo možné pozorovat vznik dvou „prstenců“ LR/DRM, jejichž pozice se však lišila u časových intervalů separace (4 hodiny a 18 hodin).

4.1.3 Stanovení celkového množství proteinu

Ke stanovení množství celkového proteinu ve frakcích byla použita BCA metoda (viz 3.4.6). Pomocí standardu BSA byla sestavena kalibrační řada (viz tab. 9) a vynesena kalibrační křivka (graf 1). Z kalibrační křivky bylo u jednotlivých frakcí vypočteno množství proteinu a vyjádřeno v mg/ml (graf 2 a 3). Jako pozadí pro všechny měřené frakce sloužily slepé vzorky SB4(1-13), SB18(1-13), OB4(1-13) a OB18(1-13), které při měření neukázaly interferenci s detergentem přítomným v gradientu. Všechna měření byla provedena ve třech opakováních.

Koncentrace BSA mg/ml	Absorbance (průměr 3 měření)
0,00	0,0770
0,025	0,0891
0,05	0,1017
0,10	0,1376
0,15	0,1754
0,20	0,2052
0,25	0,2399
0,50	0,3949

Tabulka 9: Kalibrační řada BSA/voda.



Graf 1: Kalibrační křivka BSA/voda pro stanovení celkového proteinu. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (\pm SD).

Pro 4 hodinové separace v sacharózovém gradientu bylo stanoveno nejméně proteinu ve frakci S4(1) s hodnotou 0,11 mg/ml (graf 2). Podobné hodnoty byly stanoveny i ve frakcích S4(2) a S4(3) s hodnotami 0,10 mg/ml a 0,11 mg/ml. Dále docházelo k nárůstu koncentrace proteinu až do frakce S4(5) s hodnotou 0,53 mg/ml, po které následoval pokles až do frakce S4(8) na hodnotu 0,21 mg/ml. Ve zbylých frakcích se množství proteinu pohybovalo v hodnotách okolo 0,50 mg/ml.

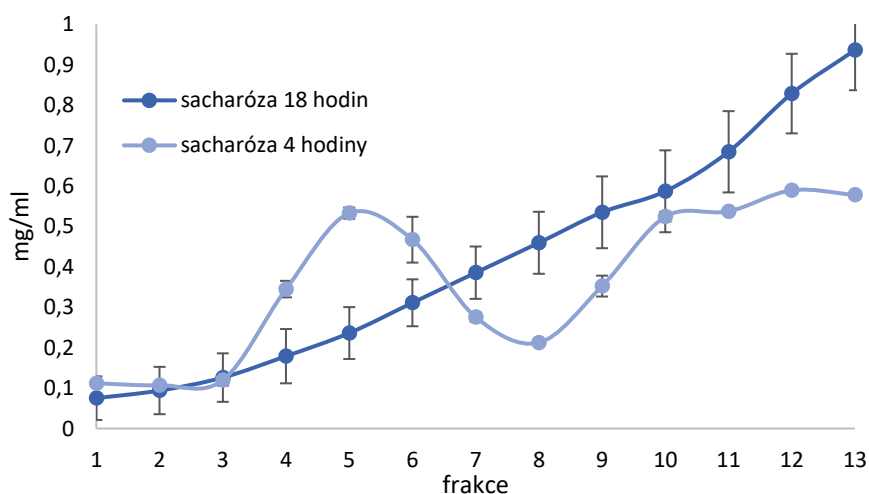
Pro 18 hodinové separace v sacharózovém gradientu bylo stanoveno nejméně proteinu ve frakci S18(1) s hodnotou 0,075 mg/ml (graf 2). Dále docházelo ke kontinuálnímu nárůstu

množství proteinu ve frakcích. Nejvíce proteinu bylo stanoveno ve frakci S18(13) s hodnotou 0,91 mg/ml.

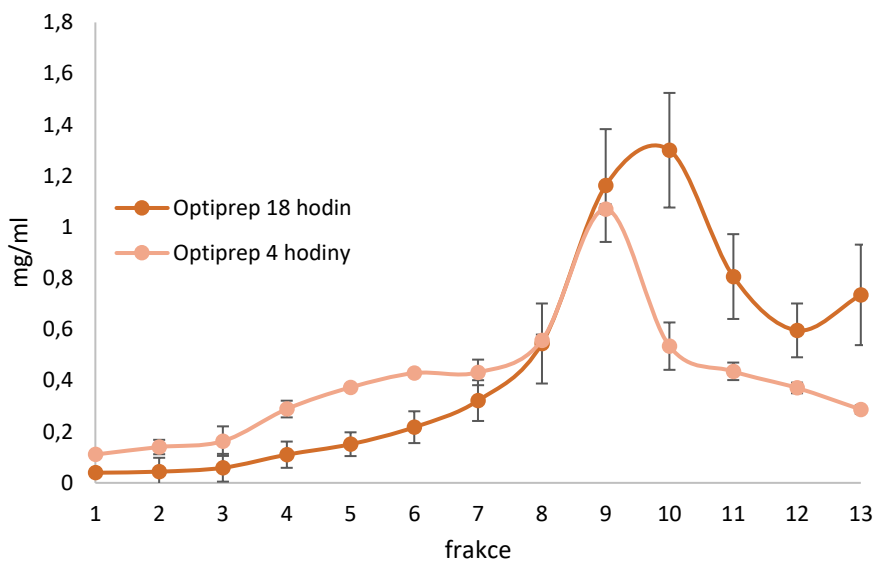
Gradient lze rozdělit, podle koncentrace hustotního gradientu, na lehkou (5%), střední (35%) a těžkou (42,5%) část. Pro oba časové intervaly separace je nejvíce proteinu obsaženo v těžké části gradientu.

Pro 4 hodinové separace v gradientu Optiprepu™ bylo nejméně proteinu stanoveno ve frakci O4(1) s hodnotou 0,11 mg/ml (graf 3). Do frakce O4(3) se hodnoty pohybovaly do 0,20 mg/ml. Poté docházelo k nárůstu až do frakce O4(9) s hodnotou 1,07 mg/ml proteinu. Ve zbytku frakcí docházelo k poklesu množství proteinu až na hodnotu 0,28 mg/ml ve frakci O4(13).

Pro 18 hodinové separace v gradientu Optiprepu™ bylo nejméně proteinu stanoveno ve frakci O18(1) s hodnotou 0,039 mg/ml (graf 3). Podobné hodnoty byly stanoveny i ve frakcích O18(2) a O18(3) s hodnotami 0,043 mg/ml a 0,058 mg/ml. Poté docházelo k nárůstu až do frakce O18(10), kde bylo stanoveno nejvíce proteinu a to 1,30 mg/ml. Pro oba časové intervaly separace bylo nejvíce proteinu obsaženo v těžké části gradientu.



Graf 2: Množství celkového proteinu ve frakcích gradientu sacharózy ve dvou časových intervalech separace (4 hodiny – světle modrá křivka; 18 hodin – tmavě modrá křivka). Zobrazeno jako průměrné hodnoty (\pm SD) ze tří samostatných izolací pro 4 hodinovou separaci a pěti izolací pro 18 hodinovou separaci (\pm SD).



Graf 3: Množství celkového proteinu ve frakcích gradientu Optiprep™ ve dvou časových intervalech separace (4 hodiny – světle oranžová křivka; 18 hodin – tmavě oranžová křivka). Zobrazeno jako průměrné hodnoty ze tří izolací (\pm SD).

4.1.4 Stanovení celkového množství cholesterolu

Ke spektrofotometrickému stanovení celkového cholesterolu přítomného v LR/DRM ve frakcích byla využita komerční diagnostická sada od firmy Erba Lachema (viz 3.4.7). Množství celkového cholesterolu ve frakcích bylo spočítáno pomocí standardu a vyjádřeno v μ g cholesterolu na mg proteinu a porovnáno s distribucí proteinu (grafy 4-7, viz přílohy).

Pro 4 i 18 hodinové separace v Optiprep™ gradientu bylo nejvíce cholesterolu na mg proteinu stanoveno ve frakcích O4(1) a O18(1) s hodnotami 271,30 μ g a 963,16 μ g cholesterolu na mg proteinu (grafy 4 a 5). Pro oba časové intervaly gradientu Optiprep™ bylo zjištěno, že nejvíce cholesterolu na mg proteinu obsahovala lehká část gradientu.

Pro 4 hodinové separace v sacharózovém gradientu bylo nejvíce cholesterolu na mg proteinu stanoveno ve frakci S4(7) s hodnotou 56,73 μ g cholesterolu na mg proteinu (graf 6). Množství cholesterolu po 4 hodinové separaci se v ostatních frakcích pohybovalo v rozmezí 20–50 μ g cholesterolu na mg proteinu. Nejvíce cholesterolu na mg proteinu po 4 hodinové separaci obsahovala střední část gradientu.

Pro 18 hodinové separace v sacharózovém gradientu bylo nejvíce cholesterolu na mg proteinu stanoveno ve frakci S18(1) s hodnotou 456,51 μ g na mg proteinu (graf 7). Poté docházelo ke

kontinuálnímu poklesu množství cholesterolu. Nejvíce cholesterolu na mg proteinu po 18 hodinové separaci obsahovala lehká část gradientu.

4.1.5 Stanovení koncentrace thiolových skupin

Ke spektrofotometrickému stanovení obsahu volných thiolových skupin proteinů přítomných v LR/DRM ve frakcích byla využita Ellmanova metoda (viz 3.4.8). Koncentrace volných thiolových skupin ve frakcích byla stanovena pro každý gradient pomocí standardního přídatku *N*-acetyl-L-cysteinu a vyjádřena v μM (grafy 8-9 viz přílohy).

Nejvyšší koncentrace volných thiolových skupin v sacharózovém gradientu po 4 hodinové separaci byla stanovena ve frakci S4(13) s hodnotou 2,66 μM (graf 8). Nejvyšší koncentrace volných thiolových skupin po 18 hodinové separaci byla stanovena ve frakci S18(12) s hodnotou 5,25 μM (graf 8).

Nejvyšší koncentrace volných thiolových skupin v gradientu OptiprepTM po 4 hodinové separaci byla stanovena ve frakci O4(11) s hodnotou 2,93 μM (graf 9). Nejvyšší koncentrace thiolových skupin po 18 hodinové separaci byla stanovena ve frakci O18(9) s hodnotou 7,80 μM .

4.1.6 Western blot a detekce proteinů

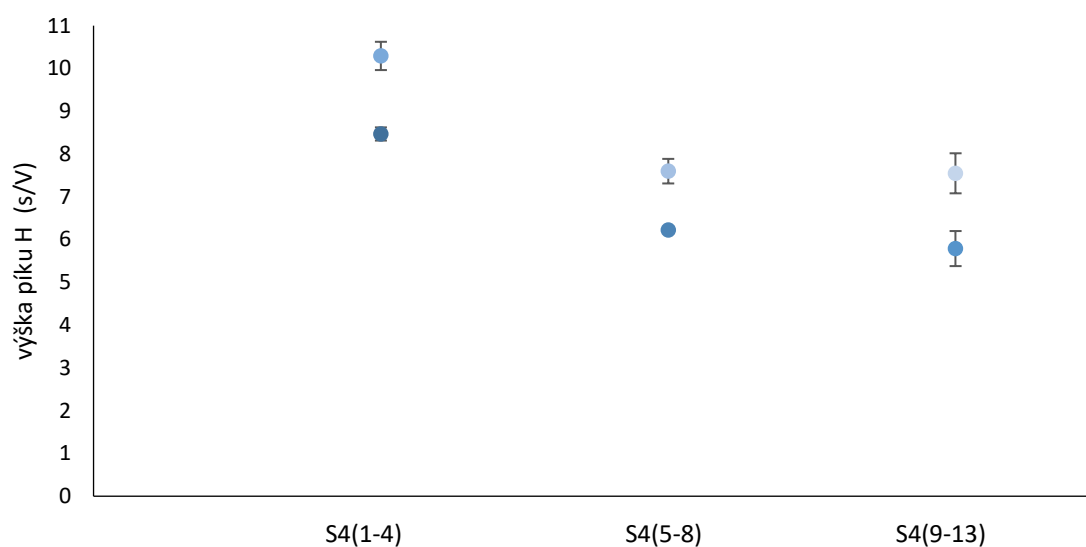
Detekci proteinů přítomných v LR/DRM předcházela SDS elektroforéza a přenos na membránu (viz 3.4.9 a 3.9.10). Na membráně byly následně detegovány proteiny asociované s DRM/LR (kaveolin-1 a flotillin-1, obrázky 17-24 viz přílohy) pomocí protilátek.

Pro sacharózový gradient po 4 hodinové separaci bylo nejvíce kaveolinu-1 detegováno ve střední a těžké části gradientu (obr. 17). Po 18 hodinové separaci byla distribuce kaveolinu-1 posunuta do střední části gradientu, nejvíce bylo proteinu detegováno ve frakci S18(4), což odpovídá rozmezí lehké a střední části gradientu (obr. 18). Pro sacharózový gradient po 4 hodinové separaci bylo nejvíce flotillinu-1 detegováno ve střední části gradientu (obr. 19). Po 18 hodinové separaci bylo nejvíce flotillinu-1 detegováno na rozmezí lehké a střední části gradientu (obr. 20).

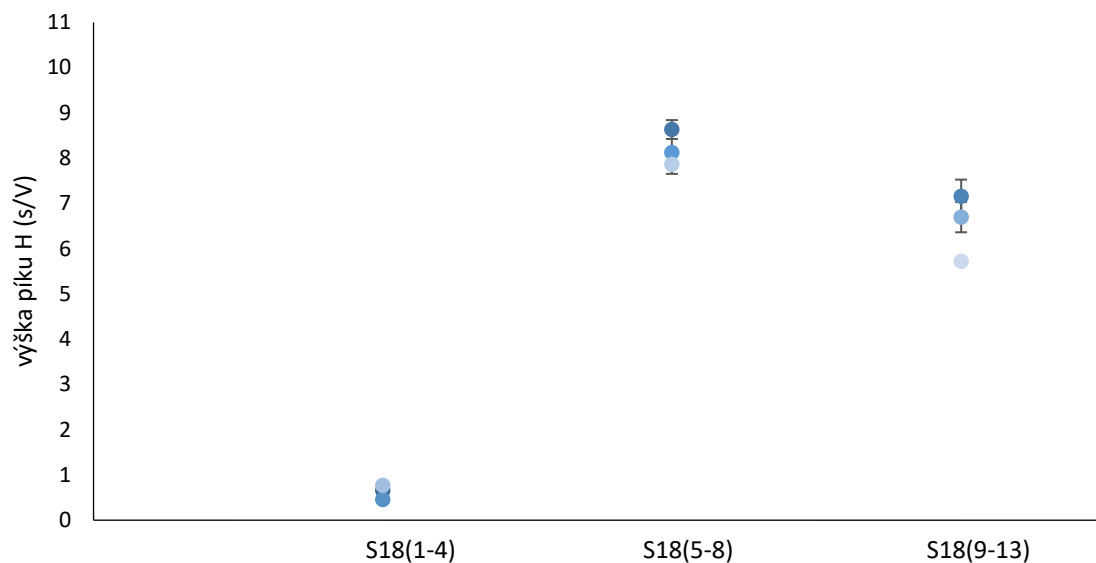
Pro gradient OptiprepTM bylo po 4 hodinové separaci nejvíce kaveolinu-1 detegováno v lehké a střední části gradientu (obr. 21). Po 18 hodinové separaci došlo ke zakoncentrování kaveolinu-1 do střední části gradientu (obr. 22). Pro gradient OptiprepTM bylo po 4 hodinové separaci nejvíce flotillinu-1 v lehké části gradientu (obr. 23). Po 18 hodinové separaci došlo k posunu do střední části gradientu (obr. 24).

4.1.7 Elektrochemická analýza

Elektrochemická měření byla provedena metodou chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy konstantním proudem (CPSA). Měření bylo prováděno pouze pro gradient sacharózy pro oba časové intervaly separace – 4 hodiny (graf 10) a 18 hodin (graf 11). Pro elektrochemická měření byly izolované frakce spojeny dle tabulky 8. Individuální podmínky pro elektrochemická měření jsou uvedeny v popisku příslušných grafů. Měření probíhala přenosem (*ex situ*). Byly zaznamenávány změny výšky píku H v příslušných spojených frakcích.



Graf 10: Změny výšky píku H sacharózového gradientu pro **4 hodinovou** separaci. Vzorek frakce LR/DRM (10 μ l) adsorbován 30 s na rtuťovou kapku HDME elektrody, měřeno přenosem ve fosfátovém pufru pH 6,5 ve třech opakováních (\pm SD). Limitní potenciál -2 V, rozpouštěcí proud -95 μ A, maximální čas měření 120 s. Zaznamenáno jako výška píku H na frakci (změřeno při -1,95 V).



Graf 11: Změny výšky píku H sacharózového gradientu pro **18 hodinovou** separaci. Vzorek frakce LR/DRM (10 μ l) adsorbován 30 s na rtuťovou kapku HDME elektrodu, měřeno přenosem ve fosfátovém pufru pH 6,5 ve třech opakováních (\pm SD). Limitní potenciál -2 V, rozpouštěcí proud -95 μ A, maximální čas měření 120 s. Zaznamenáno jako výška píku H na frakci (změřeno při -1,95 V).

Pík H souvisí s přítomností proteinů/peptidů resp. lysinu, cysteinu, argininu a histidinu (případně dalších komponent schopných katalyzovat vylučování vodíku) ve vzorku.²²¹

5 Diskuze

Mezi základní vlastnosti přisuzované LR/DRM je jejich schopnost odolávat působení neionogenních detergentů za nízkých teplot.⁴⁵ K izolaci LR/DRM lze proto využít techniky vycházející z této vlastnosti. V existujících protokolech je nejvíce používán detergent Triton X-100⁴¹, a proto byl zvolen do této diplomové práce. K izolaci LR/DRM byla použita buněčná linie HeLa. Tato buněčná linie je běžně dostupná na pracovišti a roste s dostatečnou rychlostí. Byl vypracován izolační protokol pro izolaci LR/DRM z HeLa buněčné linie vycházející z protokolů Pike a kol.¹¹², Persaud-Sawin a kol.²²² a Graham a kol.²²³

Izolační postup lze shrnout do několika základních bodů: (A) inkubace s detergentem; (B) centrifugace a odebrání supernatantu; (C) separace LR/DRM obsažených v supernatantu pomocí ultracentrifugace v hustotním gradientu; (D) odebrání frakcí; (D) stanovení celkového proteinu, cholesterolu, volných thiolových skupin, proteinů asociovaných s LR/DRM, oxidačně–redukčních přeměn ve frakcích.

V mé práci byla porovnávána účinnost gradientů pro separaci na základě ultracentrifugace ve dvou hustotních gradientech, a to gradient sacharózy (42,5%; 35%; 5%) a gradient OptiprepuTM (25%; 20%; 10%).¹¹⁷

Kromě složení gradientu byla srovnávána i doba ultracentrifugace – 4 hodiny a 18 hodin pro oba gradienty. Snížení časového intervalu separace by vedlo ke snížení časové náročnosti celého izolačního postupu. Sledovala jsem schopnost gradientu separovat domény LR/DRM a jejich zakoncentrování v určité části gradientu.

Z distribuce proteinů asociovaných s LR/DRM napříč gradientem, lze říci, že celý gradient obsahuje LR/DRM domény, které se liší ve své velikosti/hustotě, proto byly oba gradienty rozděleny na 3 části odpovídající rozdělení gradientu podle hustotních frakcí.²²⁴

Sacharózový gradient byl rozdělen na lehkou část pro frakce S4/18(1-4) odpovídající 5% sacharóze, střední část pro frakce S4/18(5-8) odpovídající 35% sacharóze a těžkou pro frakce S4/18(9-13) odpovídající 42,5% sacharóze. Gradient OptiprepuTM byl rozdělen na lehkou část pro frakce O4/18(1-4) odpovídající 10% OptiprepuTM, střední pro frakce O4/18(5-8) odpovídající 20% OptiprepuTM a těžkou pro frakce O4/18(9-13) odpovídající 25% OptiprepuTM.

Stanovení množství celkového proteinu (viz 4.1.3)

Ke stanovení celkového množství proteinu ve frakcích byla využita metoda BCA stejně jako v publikaci Persaud-Sawin.²²² Tato metoda je ve srovnání s metodou Bradfordové méně náchylná na interferenci s detergenty.²²⁵

Gradient sacharózy se v distribuci celkového proteinu napříč frakcemi lišil při porovnání délky separace. Distribuce celkového proteinu 4 hodinové separace se více podobala protokolu Persaud-Sawin, který popisoval 18 hodinovou separaci při 200 000g a 4 °C, kdy docházelo k nárůstu celkového proteinu v 5 frakci. Množství proteinu se však čtyřnásobně lišilo, což může být zapříčiněno použitím většího množství biologického materiálu k izolaci, neboť protokol Persaud-Sawin popisuje izolaci z mozkové tkáně.²²² Distribuce celkového proteinu po 18 hodinové separaci kontinuálně narůstala, což se neshoduje s protokolem Persaud-Sawin, nicméně jej lze porovnat s jinými pracemi.²²⁶ Po rozdělení gradientu na 3 části dle hustoty frakcí, lze pro 4 i 18 hodinovou separaci říci, že nejméně proteinu se nachází v lehké části gradientu. To odpovídá předpokladu, že frakce nejvíce obohacené o LR/DRM vykazují nejmenší množství proteinu a jsou obohaceny o cholesterol.¹¹²

Gradient OptiprepuTM se v obou časových intervalech separace významně nelišil v distribuci celkového proteinu. Pro 4 i 18 hodinovou separaci se nejméně proteinu nacházelo v lehké části gradientu, což je srovnatelné i s gradientem sacharózy. Tyto výsledky odpovídají předpokladu, že frakce nejvíce obohacené o LR/DRM mají málo proteinu a jsou obohaceny o cholesterol. V porovnání s protokolem Persaud-Sawin jsou však výsledky separace rozdílné. Protokol popisuje zvýšené množství proteinu v lehké části gradientu, což neodpovídá předpokladu, že frakce nejvíce obohacené o LR/DRM mají relativně málo proteinu. Protein v gradientu kontinuálně nenarůstal, neboť se množství proteinu pohybovalo v rozmezí 400–1000 µg téměř ve všech frakcích.²²²

Stanovení množství celkového cholesterolu (viz 4.1.4)

Ke spektrofotometrickému stanovení celkového cholesterolu ve frakcích byla využita komerční diagnostická sada od firmy Erba Lachema. Množství celkového cholesterolu bylo spočítáno pomocí standardu a vyjádřeno v µg cholesterolu na mg proteinu. To bylo následně porovnáno s distribucí celkového proteinu ve frakcích v kombinovaném grafu.

U obou gradientů je patrné, že kromě 4 hodinové separace v gradientu sacharózy, obsahuje nejvíce cholesterolu vůči proteinům převážně lehká část gradientu, což se shoduje s distribucí celkového cholesterolu vztaženého na celkový protein popsanou v protokole Pike a kol.¹¹²

Stanovení množství volných thiolových skupin (viz 4.4.5)

Ke spektrofotometrickému stanovení obsahu volných thiolových skupin proteinů ve frakcích byla využita Ellmanova metoda. Podle vypracovaných grafů 8 a 9 distribuce volných thiolových skupin napříč oběma gradienty přibližně kopíruje křivky distribuce celkového proteinu ve frakcích. Nejvíce volných thiolových skupin bylo přítomno v těžké části gradientu OptiprepTM. Pro 4 hodinovou separaci gradientu OptiprepTM se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,2-2,9 μM . Pro 18 hodinovou separaci gradientu OptiprepTM se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,2-7,8 μM . Nejvíce volných thiolových skupin gradientu sacharózy bylo přítomno taktéž v těžké části gradientu. Pro 4 hodinovou separaci se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,25 nM až 2,66 μM . Pro 18 hodinovou separaci se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,32-5,25 μM .

V biologických systémech jsou thiolové skupiny přítomny v proteinech obsahující Cys zbytky a v molekulách jako je glutathion. Thioly jsou významná redukční činidla a nukleofily. Podílí se na buněčné signalizaci, strukturní stabilizaci a udržení homeostázy. Ve většině proteinů je cystein zastoupen méně než 3 %. Proteiny buněčného povrchu obsahující thiolové skupiny jsou například proteindisulfidomerasa, thioredoxin, Na/K ATPasa, 5'-nukleotidasa, akvaporin a další.^{227, 228}

V buňkách jsou thiolové skupiny přítomny v milimolárních koncentracích a existují převážně ve své redukované formě. Celková koncentrace glutathionu se pohybuje v rozmezí 2-17 mM. Thiolové skupiny proteinů jsou zastoupeny v koncentracích 10-50 mM. V extracelulárním prostoru je koncentrace thiolových zbytků snížena a pohybuje s v rozmezí 0,4-0,6 mM.²²⁸

Distribuce proteinů asociovaných s LR/DRM (kaveolin-1 a flotillin-1, viz 4.1.6)

V této diplomové práci byly použity proteiny kaveolin-1 a flotillin-1, které patří mezi základní proteinové markery LR/DRM. Kaveolin-1 (21, 24 kDa) je jedním ze základních proteinových markerů kaveol v PM buněk.^{44, 112} Flotillin-1 (47 kDa) se používá jako základní proteinový marker LR/DRM v PM buněk.^{81, 222}

Distribuce kaveolinu-1 se ve dvou časových intervalech separace pro gradient sacharózy lišila. Pro 4 hodinovou separaci je protein přítomen napříč celým gradientem. Nejvíce proteinu bylo

detegováno ve frakci S4(13), což odpovídá těžké části gradientu. Jeho přítomnost v těžké části gradientu a nízké zastoupení v lehké části naznačuje, že 4 hodinová separace koncentruje LR/DRM domény v těžších částech gradientu. V případě 18 hodinové separace v gradientu sacharózy je distribuce kaveolinu-1 posunuta více do střední části, nicméně je patrné, že nedošlo k výraznému zakoncentrování proteinu žádné části gradientu. Vystává otázka, zda by při prodloužení doby separace nad 18 hodin docházelo k dalšímu zakoncentrování či naopak „rozmytí“ proteinu ve frakcích gradientu.

Pro protein flotillin-1 byla distribuce napříč gradientem sacharózy po 4 hodinové separaci patrná nejvíce na rozmezí lehké a střední části (frakce 4-6). Nejvíce flotillinu-1 bylo detegováno ve frakci S4(4). Po 18 hodinové separaci došlo k posunu a zakoncentrování proteinu v rozmezí lehké a střední části gradientu, nejvíce ve frakcích S18(3) - S18(5). To naznačuje, že prodloužení separace ze 4 na 18 hodin vede ke zakoncentrování LR/DRM domén ve střední části gradientu.

Výsledky 4 hodinové separace sacharózového gradientu se více shodují s protokolem Persaud-Sawin,²²² kde je flotillin-1 přítomen napříč celým gradientem sacharózy a není detegován v prvních dvou frakcích. Porovnání 18 hodinové separace se neshodují, neboť v mých experimentech je flotillin-1 více zakoncentrován do lehké části gradientu (frakce 3-5), která je zároveň obohacena o cholesterol a vyznačuje se sníženým množstvím proteinu.²²²

Distribuce kaveolinu-1 v gradientu OptiprepuTM se pro oba časové intervaly lišila. Pro 4 hodinovou separaci je protein přítomen napříč gradientem nejvíce v lehké a střední části (frakce 1-10) s malým zastoupením v nejtěžších frakcích (11-13). V porovnání s gradientem sacharózy stejného časového intervalu dochází k posunu proteinu z těžké části gradientu, což naznačuje, že gradient OptiprepuTM více koncentruje LR/DRM v gradientu. V případě 18 hodinové separace v gradientu OptiprepuTM dochází k zakoncentrování kaveolinu-1 do střední části gradientu (frakce 6-9). To naznačuje, že prodloužení doby separace vede ke koncentraci LR/DRM do střední části gradientu jak pro OptiprepTM, tak i sacharózu.

Pro protein flotillin-1 v gradientu OptiprepTM byla distribuce rozdílná v obou časových intervalech. Pro 4 hodinovou separaci bylo nejvíce proteinu detegováno v lehké části gradientu nejvíce ve frakcích O4(2)-O4(4). V případě 18 hodinové separace došlo k posunu proteinu do střední části gradientu do frakcí O18(6)-O18(8), což lze porovnat s protokolem Persaud-Sawin, kde je flotillin-1 nejvíce přítomen ve frakcích 3-5.²²² V porovnání se sacharózovým

gradientem lze říci, že gradient OptiprepuTM je schopný více koncentrovat LR/DRM v gradientu.

Elektrochemická analýza (viz 4.1.7)

Pro měření oxidačně–redukčních přeměn byla využita CPSA metoda. Měření bylo prováděno pouze pro gradient sacharózy pro oba časové intervaly separace (4 hodiny i 18 hodin). Gradient OptiprepTM nebyl pomocí této metody analyzován, neboť docházelo k interferencím. Byly odečteny výšky píku H. Pro 4 hodinovou separaci byl pík H nejvyšší v lehké části gradientu (graf 10), což může souviset s přítomností aminokyselinových zbytků (histidin, lysin, cystein, arginin) odpovídající za elektrokatalytickou reakci. Po 18 hodinové separaci byl pík H nejvyšší ve střední části gradientu (graf 11). To, zda za pík H odpovídají pouze proteiny obsažené v jednotlivých frakcích nebo i jiné komponenty schopné katalyzovat vylučování vodíku bude předmětem dalšího výzkumu. Vzhledem k tomu, že nejvyšší koncentrace proteinu se vyskytuje v těžkých frakcích (grafy 2 a 3) lze předpokládat, že by se do elektrokatalytické reakce mohly zapojovat i další nízkomolekulární látky.

6 Závěr

V této diplomové práci byl sepsán literární přehled na téma lipidové rafty/detergent rezistentní membrány, jejich základní vlastnosti a interakce. V experimentální části byl vypracován izolační protokol vycházející z nerozpustnosti těchto mikrodomén plazmatické membrány v neionogenních detergitech a následné ultracentrifugace. Jako detergent byl zvolen Triton X-100. Byly porovnány dva separační gradienty (sacharóza, Optiprep™) ve dvou různých časových intervalech separace (4 hodiny, 18 hodin). Bylo stanoveno množství celkového proteinu ve frakcích s hodnotami v rozmezí 0,075-0,91 mg/ml pro gradienty sacharózy a 0,039-1,30 mg/ml pro gradienty Optiprep™. Bylo stanoveno množství celkového cholesterolu ve frakcích s hodnotami 271,30-963,16 µg cholesterolu na mg proteinu pro gradienty Optiprep™ a 56,73-456,51 µg cholesterolu na mg proteinu pro gradienty sacharózy. Dále byla stanovena koncentrace volných thiolových skupin ve frakcích s hodnotami v rozmezí 0,00025-5,25 µM pro gradienty sacharózy a 0,25-7,8 µM pro gradienty Optiprep™. Byly stanoveny proteiny asociované s lipidovými rafty/detergent rezistentními membránami kaveolin-1 a flotillin-1. Z naměřených dat vyplývá, že oba gradienty jsou vhodné pro separaci lipidových raftů/detergent rezistentních membrán. Získané výsledky budou použity k dalšímu výzkumu interakcí lipidových raftů/detergent rezistentních membrán a farmakologicky aktivními ligandy a pro účely lipidomických a proteomických analýz.

7 Zdroje

1. Singer, S. J.; Nicolson Garth, L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, *175* (4023), 720-731.
2. Pike, L. J., Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research* **2006**, *47* (7), 1597-1598.
3. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. **2015**.
4. Gunstone, F. D., Harwood, J.L., *The Lipid Handbook* , 3rd Edition ed.; **2007**; p 1472.
5. Malagarie-Cazenave S, Andrieu-Abadie N, Ségui B, Gouazé V, Tardy C, Cu villier O, Levade T. Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF-alpha-induced cell death. *Expert Rev Mol Med*. **2002** Dec 20;4(28):1-15.
6. Bretscher, M. S., Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol*. **1972** Mar 1;236(61):11-2.
7. Devaux, P. F., Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **1991**, *30* (5), 1163-1173.
8. Simons, K.; Ikonen, E., How cells handle cholesterol. *Science*. **2000** Dec 1;290(5497):1721-6.
9. Subczynski, W. A.-O.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Widomska, J.; Mainali, L.; Raguz, M., High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. *Cell Biochem Biophys*. **2017** Dec;75(3-4):369-385.
10. Almeida, P. F., Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. *Biochim Biophys Acta*. **2009** Jan;1788(1):72-85.
11. Regen, S. A.-O., The Origin of Lipid Rafts. *Biochemistry*. **2020** Dec 15;59(49):4617-4621
12. Engberg, O.; Hautala, V.; Yasuda, T.; Dehio, H.; Murata, M.; Slotte, J. P.; Nyholm, T. K. M., The Affinity of Cholesterol for Different Phospholipids Affects Lateral Segregation in Bilayers. *Biophys J* **2016**, *111* (3), 546-556.

13. Bakht, O.; Pathak P.; London, E., Effect of the structure of lipids favoring disordered domain formation on the stability of cholesterol-containing ordered domains (lipid rafts): identification of multiple raft-stabilization mechanisms. *Biophys J.* **2007** Dec 15;93(12):4307-18.
14. Heberle, F.A.; Petruzielo, R. S.; Pan, J.; Drazba, P.; Kučerka, N.; Standaert, RF.; Feigenson, GW.; Katsaras, J., Bilayer thickness mismatch controls domain size in model membranes. *J Am Chem Soc.* **2013** May 8;135(18):6853-9.
15. Levental, I.; Levental, K. R.; Heberle, F. A., Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol.* **2020** May;30(5):341-353.
16. Frazier, M. L.; Wright J. R.; Pokorny, A.; Pokorny A.; Almeida, P. F., Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. *Biophys J.* **2007** Apr 1;92(7):2422-33.
17. Barba-Bon, A.; Nilam, M.; Hennig, A., Supramolecular Chemistry in the Biomembrane. *ChemBioChem.* **2019**, 21.
18. Stillwell, W., Membrane Transport. An Introduction to Biological Membranes. 2016:423–51.
19. Lee, A. G.; Birdsall, N. J.; Metcalfe, J. C.; Toon, P. A.; Warren, G. B., Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes. *Biochemistry.* **1974** Aug 27;13(18):3699-705.
20. Israelachvili, J. N.; Marčelja, S.; Horn, R. G., Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1980**, 13 (2), 121-200.
21. Karnovsky, M. J.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Klausner, R. D., The concept of lipid domains in membranes. *Journal of Cell Biology* **1982**, 94 (1), 1-6.
22. Yu J Fau - Fischman, D. A.; Fischman Da Fau - Steck, T. L.; Steck, T. L., Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct.* **1973**, 1(3):233-48.
23. Simons K Fau - Helenius, A.; Helenius A Fau - Garoff, H.; Garoff, H., Solubilization of the membrane proteins from Semliki Forest virus with Triton X100. *J Mol Biol.* **1973** Oct 15;80(1):119-33.

24. Helenius A Fau - Simons, K.; Simons, K., Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*. **1975** Mar 25;415(1):29-79.
25. Osborn, M.; Weber, K., The detergent-resistant cytoskeleton of tissue culture cells includes the nucleus and the microfilament bundles. *Experimental Cell Research* **1977**, 106 (2), 339-349.
26. Lehto, V. P.; Vartio, T.; Badley, R. A.; Virtanen, I., Characterization of a detergent-resistant surface lamina in cultured human fibroblasts. *Exp Cell Res*. **1983** Feb;143(2):287-94.
27. Hoessli, D.; Rungger-Brändle, E., Association of specific cell-surface glycoproteins with a triton X-100-resistant complex of plasma membrane proteins isolated from T-lymphoma cells (P1798). *Exp Cell Res*. **1985** Jan;156(1):239-50.
28. Stefanová, I.; Horejsí, V., Association of the CD59 and CD55 cell surface glycoproteins with other membrane molecules. *J Immunol*. **1991** Sep 1;147(5):1587-92.
29. Simons, K.; Van Meer, G., Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **1988**, 27 (17), 6197-6202.
30. Karnovsky, M. J.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Klausner, R. D., The concept of lipid domains in membranes. *J Cell Biol*. **1982** Jul;94(1):1-6.
31. Schroeder, R.; London, E.; Brown, D., Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994** Dec 6;91(25):12130-4.
32. Silvius, J. R; del Giudice, D.; Lafleur, M., Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. *Biochemistry*. **1996** Dec 3;35(48):15198-208.
33. Ahmed, S. N; Brown, D. A.; London, E., On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*. **1997** Sep 9;36(36):10944-53.

34. Brown, D. A.; Rose, J. K., Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. **1992** Feb 7;68(3):533-44.
35. Cerneus, D. P.; Ueffing, E.; Posthuma, G.; Strous, G. J.; van der Ende, A., Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol. *J Biol Chem*. **1993** Feb 15;268(5):3150-5.
36. Hanada, K.; Nishijima M Fau - Akamatsu, Y.; Akamatsu Y Fau - Pagano, R. E.; Pagano, R. E., Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. *J Biol Chem*. **1995** Mar 17;270(11):6254-60.
37. Field, K. A.; Holowka, D.; Baird, B., Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92 (20), 9201-9205.
38. Danielsen, E. M., Involvement of Detergent-Insoluble Complexes in the Intracellular Transport of Intestinal Brush Border Enzymes. *Biochemistry* **1995**, 34 (5), 1596-1605.
39. Brown, D. A.; London, E., Structure of Detergent-Resistant Membrane Domains: Does Phase Separation Occur in Biological Membranes? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, 240 (1), 1-7.
40. Shogomori, H.; Brown, D. A., Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem*. **2003** Sep;384(9):1259-63.
41. Chamberlain, L. H., Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett*. **2004** Feb 13;559(1-3):1-5.
42. Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, 387 (6633), 569-572.
43. Pike, L. J., The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research* **2009**, 50, S323-S328.
44. Harder, T.; Simons, K., Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*. **1997** Aug;9(4):534-42.

45. Schroeder, R. J.; Ahmed S. N.; Zhu, Y.; London, E.; Brown, D. A.; Brown, D. A., Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains.. *J Biol Chem.* **1998** Jan 9;273(2):1150-7.
46. Chang, W. J.; Rothberg, K. G.; Kamen, B. A.; Anderson, R. G., Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *Journal of Cell Biology* **1992**, 118 (1), 63-69.
47. Dráberová, L.; Dráber, P., Thy-1 glycoprotein and src-like protein-tyrosine kinase p53/p56lyn are associated in large detergent-resistant complexes in rat basophilic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90 (8), 3611-3615.
48. Arreaza, G.; Melkonian, K. A.; LaFevre-Bernt, M.; Brown, D. A., Triton X-100-resistant membrane complexes from cultured kidney epithelial cells contain the Src family protein tyrosine kinase p62yes. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269 (29), 19123-19127.
49. Sargiacomo, M., Signal transducing molecules and GPI-linked proteins from a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *The Journal of Cell Biology* **1993**, 122, 789-807.
50. Hooper, N. M., Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol.* **1999** Apr-Jun;16(2):145-56
51. Allen, J. A.; Halverson-Tamboli, R. A.; Rasenick, M. M., Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, 8 (2), 128-140.
52. Yamada, E., The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol.* **1955** Sep 25;1(5):445-58.
53. Montesano, R.; Roth, J.; Robert, A.; Orci, L., Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* **1982**, 296 (5858), 651-653.
54. Brown, D. A.; London, E., Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **1998**;14:111-36

55. van Deurs, B.; Vilhardt, F.; Torgersen, M.; Roepstorff, K.; Hommelgaard, A. M.; Sandvig, K., The Role of Caveolae and Noncaveolar Rafts in Endocytosis. *Lipid Rafts and Caveolae* **2006**, 69-89.
56. Sens, P.; Turner, M. S., The Forces that Shape Caveolae. *Lipid Rafts and Caveolae* **2006**, 25-44.
57. Tang, Z.; Scherer, P. E.; Okamoto, T.; Song, K.; Chu, C.; Kohtz, D. S.; Nishimoto, I.; Lodish, H. F.; Lisanti, M. P., Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* **1996** Jan 26;271(4):2255-61.
58. Rothberg, K. G.; Heuser, J. E.; Donzell, W. C.; Donzell, W. C.; Ying, Y. S.; Ying, Y. S.; Glenney, J. R.; Glenney, J. R.; Anderson, R. G.; Anderson, R. G., Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* **1992** Feb 21;68(4):673-82.
59. Parton, R. G., Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* **1996** Aug;8(4):542-8.
60. Glenney, J. R., Jr.; Zokas, L., Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol.* **1989** Jun;108(6):2401-8.
61. Donaldson, J. G., Endocytosis. In *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, Lennarz, W. J.; Lane, M. D., Eds. Academic Press: Waltham, 2013; pp 197-199.
62. Oh, P.; McIntosh, D. P.; Schnitzer, J. E., Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **1998**, 141 (1), 101-14.
63. Pelkmans, L.; Kartenbeck, J.; Helenius, A.; Helenius, A., Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* **2001** May;3(5):473-83.
64. Smart, E. J.; Ying, Y.-s.; Donzell, W. C.; Anderson, R. G. W., A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol from Endoplasmic Reticulum to Plasma Membrane*. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271 (46), 29427-29435.
65. Pelkmans, L.; Helenius, A., Endocytosis via caveolae. *Traffic.* **2002** May;3(5):311-20.

66. Li, S.; Okamoto T.; Chun, M.; Chun M.; Sargiacomo, M.; Sargiacomo M.; Casanova, J. E.; Hansen, S. H.; Hansen S. H.; Nishimoto, I.; Lisanti, M. P., *J Biol Chem.* **1995** Jun 30;270(26):15693-701.
67. Li, S.; Couet J.; Lisanti, M. P., Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* **1996** Nov 15;271(46):29182-90.
68. Okamoto, T.; Schlegel A. ; Scherer, P. E.; Lisanti, M. P., Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* **1998** Mar 6;273(10):5419-22.
69. Song, K. S.; Li, S.; Okamoto, T.; Quilliam, L. A.; Sargiacomo, M.; Lisanti, M. P., Co-purification and Direct Interaction of Ras with Caveolin, an Integral Membrane Protein of Caveolae Microdomains: . *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271 (16), 9690-9697.
70. García-Cardena, G.; Martasek P.; Masters, B. S.; Skidd, P. M.; Couet, J.; Couet J.; Li, S.; Lisanti, M. P.; Sessa, W. C., Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* **1997** Oct 10;272(41):25437-40.
71. Venema, V. J.; Ju, H.; Zou, R.; Venema, R. C., Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem.* **1997** Nov 7;272(45):28187-90.
72. Feron, O.; Belhassen, L.; Kobzik, L.; Smith, T. W.; Kelly, R. A.; Michel, T., Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* **1996**, 271 (37), 22810-4.
73. Chun, M.; Liyanage U. K.; Lisanti, M. P.; Lodish, H. F., Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994** Nov 22;91(24):11728-32.
74. de Weerd, W. F. C.; Leeb-Lundberg, L. M. F., Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272 (28), 17858-17866.

75. Feron, O.; Smith T. W.; Michel, T.; Kelly, R. A., Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* **1997** Jul 11;272(28):17744-8.
76. Bouilliot, C.; Prochiantz, A.; Rougon, G.; Allinquant, B., Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271 (13), 7640-7644.
77. Yamamoto, M.; Toya Y.; Schwencke, C.; Lisanti, M. P.; Myers, M. G., Jr.; Ishikawa, Y., Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem.* **1998** Oct 9;273(41):26962-8.
78. Bilderback, T. R.; Gazula, V.-R.; Lisanti, M. P.; Dobrowsky, R. T., Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274 (1), 257-263.
79. Liu, P.; Anderson, R. G. W., Compartmentalized Production of Ceramide at the Cell Surface (*). *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270 (45), 27179-27185.
80. Schulte, T.; Paschke K. A.; Laessing, U.; Lottspeich, F.; Stuermer, C. A., Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development.* **1997** Jan;124(2):577-87.
81. Bickel, P. E.; Scherer P. E.; Schnitzer, J. E.; Oh, P.; Lisanti, M. P.; Lodish, H. F., Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem.* **1997** May 23;272(21):13793-802.
82. Baumann, C. A.; Ribon V.; Kanzaki, M.; Thurmond, D. C.; Mora, S.; Shigematsu, S.; Bickel, P. E.; Pessin, J. E.; Saltiel, A. R., CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature.* **2000** Sep 14;407(6801):202-7.
83. Angelopoulou, E.; Paudel, Y. N.; Shaikh, M. F.; Piperi, C., Flotillin: A Promising Biomarker for Alzheimer's Disease. *J Pers Med.* **2020** Mar 26;10(2):20
84. Lucero, H. A.; Robbins, P. W., Lipid rafts–protein association and the regulation of protein activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, 426 (2), 208-224.

85. Saeki, K.; Miura, Y.; Aki, D.; Kurosaki, T.; Yoshimura, A., The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction. *The EMBO Journal* **2003**, 22 (12), 3015-3026.
86. Varma, R.; Mayor, S., GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*. **1998** Aug;394(6695):798-801.
87. Sangiorgio, V.; Pitto M.; Palestini P.; Masserini, M., GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital J Biochem*. **2004** Jul;53(2):98-111.
88. Kinoshita, T., Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **2014**, 90 (4), 130-143.
89. Wang, J.; Gunning W.; Kelley, K. M. M.; Ratnam, M., Evidence for segregation of heterologous GPI-anchored proteins into separate lipid rafts within the plasma membrane. *J Membr Biol*. **2002** Sep 1;189(1):35-43
90. Anderson, R. G., Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol*. **1993** Aug;5(4):647-52.
91. Rohwedder, A.; Knipp, S.; Roberts, L. D.; Ladbury, J. E., Composition of receptor tyrosine kinase-mediated lipid micro-domains controlled by adaptor protein interaction. *Sci Rep*. **2021**. 11, 6160.
92. Calzolari, A.; Raggi C.; Deaglio, S.; Sposi, N. M.; Stafsnes, M.; Fecchi, K.; Parolini, I.; Malavasi, F.; Peschle, C.; Sargiacomo, M.; Testa, U., Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci*. **2006** Nov 1;119(Pt 21):4486-98.
93. Lisanti, M. P.; Caras I. W.; Davitz, M. A.; Rodriguez-Boulan, E., A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. **1989** Nov;109(5):2145-56.
94. Fiedler, K.; Kobayashi T.; Kurzchalia, T. V.; Simons, K., Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. **1993** Jun 29;32(25):6365-73.
95. Fielding, P. E.; Fielding, C. J., Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry*. **1995** Nov 7;34(44):14288-92

96. Dráberová, L.; Dráber, P., Thy-1 glycoprotein and src-like protein-tyrosine kinase p53/p56lyn are associated in large detergent-resistant complexes in rat basophilic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993** Apr 15;90(8):3611-5.
97. Lisanti, M. P.; Scherer, P. E.; Vidugiriene, J.; Tang, Z.; Hermanowski-Vosatka, A.; Tu, Y. H.; Cook, R. F.; Sargiacomo, M., Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *The Journal of cell biology* **1994**, 126 (1), 111-126.
98. Chang, W. J.; Ying Y. S.; Rothberg, K. G.; Hooper, N. M.; Turner, A. J.; Gambliel, H. A.; De Gunzburg, J.; Mumby, S. M.; Gilman, A. G.; Anderson, R. G., Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol*. **1994** Jul;126(1):127-38.
99. Kübler, E.; Dohlman H. G.; Lisanti, M. P., Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J Biol Chem*. **1996** Dec 20;271(51):32975-80.
100. Bagnat, M.; Keränen S.; Shevchenko, A.; Shevchenko, A.; Simons, K., Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000** Mar 28;97(7):3254-9.
101. de Araújo, M. E.; Lamberti, G.; Huber, L. A., Homogenization of Mammalian Cells. *Cold Spring Harb Protoc*. **2015** Nov 2;2015(11):1009-12
102. Heerklotz, H., Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J*. **2002** Nov;83(5):2693-701.
103. Arvanitis, D. N.; Min W.; Gong, Y.; Heng, Y. M.; Boggs, J. M., Two types of detergent-insoluble, glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains from isolated myelin. *J Neurochem*. **2005** Sep;94(6):1696-710
104. Kim, K. B.; Kim S. I.; Choo, H.-J.; Kim, J.-H.; Ko, Y.-G., Two-dimensional electrophoretic analysis reveals that lipid rafts are intact at physiological temperature. *Proteomics*. **2004** Nov;4(11):3527-35.
105. Chen, X.; Jen A.; Warley, A.; Lawrence, M. J.; Quinn, P. J.; Morris, R. J., Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. *Biochem J*. **2009** Jan 15;417(2):525-33.

106. Domingues, C. C.; Ciana A.; Buttafava, A.; Casadei, B. R.; Balduini, C.; de Paula, E.; Minetti, G., Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. *J Membr Biol.* **2010** Apr;234(3):195-205.
107. London, E.; Brown, D. A., Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta.* **2000** Nov 23;1508(1-2):182-95.
108. Schuck, S.; Honsho, M.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Simons, K., Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (10), 5795-800.
109. Röper, K.; Corbeil D.; Huttner, W. B., Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol.* **2000** Sep;2(9):582-92.
110. Song, K. S.; Li Shengwen; Okamoto T.; Quilliam, L. A.; Sargiacomo, M.; Lisanti, M. P., Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem.* **1996** Apr 19;271(16):9690-7.
111. Smart, E. J.; Ying Y. S.; Mineo, C.; Anderson, R. G., A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995** Oct 24;92(22):10104-8
112. Macdonald, J. L.; Pike, L. J., A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *Journal of Lipid Research* **2005**, *46* (5), 1061-1067.
113. Pike, L. J., Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J.* **2004** Mar 1;378(Pt 2):281-92.
114. Broekman, M. J., Homogenization by nitrogen cavitation technique applied to platelet subcellular fractionation. **1992**, (0076-6879 (Print)).
115. Harder, T.; Kuhn, M., Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. **2000**, (0021-9525 (Print)).
116. Harder, T.; Kuhn, M., Immunoisolation of TCR signaling complexes from Jurkat T leukemic cells. **2001**, (1525-8882 (Electronic)).

117. Ford, T.; Graham J Fau - Rickwood, D.; Rickwood, D., Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. **1994**, (0003-2697 (Print)).
118. Dawson P Fau - Howell, M.; Howell, M., The non-ionic dimers: a new class of contrast agents. **1986**, (0007-1285 (Print)).
119. Spencer, C. M.; Goa, K. L., Iodixanol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and diagnostic use as an x-ray contrast medium. **1996**, (0012-6667 (Print)).
120. Ilangumaran, S.; Hoessli, D. C., Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. **1998**, (0264-6021 (Print)).
121. Christian, A. E.; Haynes Mp Fau - Phillips, M. C.; Phillips Mc Fau - Rothblat, G. H.; Rothblat, G. H., Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **1997**, (0022-2275 (Print)).
122. Zidovetzki, R.; Levitan, I., Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. **2007**, (0006-3002 (Print)).
123. Pottosin, II; Valencia-Cruz G Fau - Bonales-Alatorre, E.; Bonales-Alatorre E Fau - Shabala, S. N.; Shabala Sn Fau - Dobrovinskaya, O. R.; Dobrovinskaya, O. R., Methyl-beta-cyclodextrin reversibly alters the gating of lipid rafts-associated Kv1.3 channels in Jurkat T lymphocytes. **2007**, (0031-6768 (Print)).
124. Hillyard DZ, Nutt CD, Thomson J, McDonald KJ, Wan RK, Cameron AJ, Mark PB, Jardine AG. Statins inhibit NK cell cytotoxicity by membrane raft depletion rather than inhibition of isoprenylation. *Atherosclerosis*. **2007** Apr;191(2):319-25.
125. Ahn, K. W.; Sampson, N. S., Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure. *Biochemistry*. **2004** Jan 27;43(3):827-36.
126. Sezgin, E.; Schwille, P., Model membrane platforms to study protein-membrane interactions. *Mol Membr Biol*. **2012** Aug;29(5):144-54.
127. McConnell, H. M.; Tamm L. K.; Weis, R. M., Periodic structures in lipid monolayer phase transitions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1984** May;81(10):3249-53.

128. Tamm L. K.; McConnell, H. M., Supported phospholipid bilayers. *Biophys J.* **1985** Jan;47(1):105-13
129. Feigenson, G. W.; Buboltz, J. T., Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophys J.* **2001** Jun;80(6):2775-88.
130. Veatch, S. L.; Keller, S. L., Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J.* **2003** Nov;85(5):3074-83.
131. Kahya, N.; Brown D. A.; Schwille, P., Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry.* **2005** May 24;44(20):7479-89.
132. Dupuy, A. D.; Engelman, D. M., Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008** Feb 26;105(8):2848-52.
133. Sezgin, E.; Levental I.; Grzybek, M.; Schwarzmann, G.; Mueller, V.; Honigmann, A.; Belov, V. N.; Eggeling, C.; Coskun, U.; Simons, K.; Schwille, P., Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* **2012** Jul;1818(7):1777-84.
134. Baumgart, T.; Hammond A. T.; Sengupta, P.; Hess, S. T.; Holowka, D. A.; Baird, B. A.; Webb, W. W., Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007** Feb 27;104(9):3165-70.
135. Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C., The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2017** Jun;18(6):361-374.
136. Gupta, N.; DeFranco, A. L., Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell.* **2003** Feb;14(2):432-44.
137. Sengupta, P.; Jovanovic-Talisman T.; Skoko, D.; Renz, M.; Veatch, S. L.; Lippincott-Schwartz, J., Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nat Methods.* **2011** Sep 18;8(11):969-75.

138. Eggeling, C.; Ringemann C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V. N.; Hein, B.; von Middendorff, C.; Schönle, A.; Hell, S. W., Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*. **2009** Feb 26;457(7233):1159-62
139. van Zanten, T. S.; Cambi A.; Koopman, M.; Joosten, B.; Figdor, C. G.; Garcia-Parajo, M. F., Hotspots of GPI-anchored proteins and integrin nanoclusters function as nucleation sites for cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009** Nov 3;106(44):18557-62.
140. Suzuki, K. G., Single-Molecule Imaging of Signal Transduction via GPI-Anchored Receptors. *Methods Mol Biol*. **2016**;1376:229-38.
141. Wu, H. M.; Lin, Y. H.; Yen, T. C.; Hsieh, C. L., Nanoscopic substructures of raft-mimetic liquid-ordered membrane domains revealed by high-speed single-particle tracking. *Sci Rep*. **2016** Feb 10;6:20542.
142. Wawrezynieck, L.; Rigneault H.; Marguet, D.; Lenne, P. F., Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J*. **2005** Dec;89(6):4029-42.
143. Honigmann, A.; Mueller, V.; Ta, H.; Schönle, A.; Sezgin, E.; Hell, S.; Eggeling, C., Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nature communications* **2014**, 5, 5412.
144. Enoki, T.; Heberle, F.; Feigenson, G., FRET Detects the Size of Nanodomains for Coexisting Liquid-Disordered and Liquid-Ordered Phases. *Biophys J* **2018**, 114, 1921-1935.
145. Saha, S.; Raghupathy R.; Mayor, S., Homo-FRET imaging highlights the nanoscale organization of cell surface molecules. *Methods Mol Biol*. **2015**;1251:151-73.
146. Kenworthy, A. K.; Petranova N.; Edidin, M., High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell*. **2000** May;11(5):1645-55.
147. Barrera, N. P.; Zhou M.; Robinson, C. V., The role of lipids in defining membrane protein interactions: insights from mass spectrometry. *Trends Cell Biol*. **2013** Jan;23(1):1-8.
148. Ando, J.; Kinoshita, M.; Cui, J.; Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Fujita, K.; Murata, M.; Sodeoka, M., Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes

visualized by Raman microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, 4558-4563.

149. Prior, I. A.; Muncke C.; Parton, R. G.; Hancock, J. F., Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* **2003** Jan; 160 (2): 165–170.

150. Cornell, C. E.; Mileant, A.; Thakkar, N.; Lee, K. K.; Keller, S. L., Direct imaging of liquid domains in membranes by cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117* (33), 19713-19719.

151. Heberle, F.; Doktorova, M.; Scott, H.; Skinkle, A.; Waxham, M.; Levental, I., Direct label-free imaging of nanodomains in biomimetic and biological membranes by cryogenic electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*, 202002200.

152. Barnett, K. C.; Kagan, J. A.-O., Lipids that directly regulate innate immune signal transduction. *Innate Immun.* **2020** Jan;26(1):4-14.

153. Köberlin, M. S.; Heinz, L. X.; Superti-Furga, G., Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. *Curr Opin Cell Biol.* **2016** Apr;39:28-36.

154. Varshney, P.; Yadav, V.; Saini, N., Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology.* **2016** Sep;149(1):13-24.

155. Triantafilou, M.; Miyake K.; Golenbock, D. T.; Triantafilou, K., Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci.* **2002** Jun 15;115(Pt 12):2603-11.

156. Triantafilou, M.; Manukyan M.; Mackie, A.; Morath, S.; Hartung, T.; Heine, H.; Triantafilou, K., Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J Biol Chem.* **2004** Sep 24;279(39):40882-9.

157. Soong, G.; Reddy B.; Sokol, S.; Adamo, R.; Prince, A., TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest.* **2004** May;113(10):1482-9.

158. Cambi, A.; Koopman M.; Figdor, C. G.; Figdor, C. G., How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* **2005** Apr;7(4):481-8.

159. Xu, S.; Huo, J.; Gunawan, M.; Su, I. H.; Lam, K. P., Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. *J Biol Chem.* **2009** Aug 14;284(33):22005-22011.
160. Legler, D. F.; Micheau O.; Doucey, M.-A.; Tschopp, J.; Bron, C., Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF-kappaB activation. *Immunity.* **2003** May;18(5):655-64.
161. Kay, J. G.; Murray R. Z.; Pagan, J. K.; Stow, J. L., Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup. *J Biol Chem.* **2006** Apr 28;281(17):11949-54.
162. Wang, X.; Hinson E. R.; Cresswell, P., The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe.* **2007** Aug 16;2(2):96-105
163. Nguyen, G. T.; Green, E. R.; Meccas, J., Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* **2017** Aug 25;7:373.
164. Shao, D.; Segal A. W.; Dekker, L. V., Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett.* **2003** Aug 28;550(1-3):101-6.
165. Shin, D. M.; Yang C. S.; Lee, J.Y.; Lee, S. J.; Choi, H.-H.; Lee, H.-M.; Yuk, J.-M.; Harding, C. V.; Jo, E. K., Mycobacterium tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein kinase C zeta in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signalling in macrophages. *Cell Microbiol.* **2008** Sep;10(9):1893-905.
166. Bukrinsky, M. I.; Mukhamedova, N.; Sviridov, D., Lipid rafts and pathogens: the art of deception and exploitation. *J Lipid Res.* **2020** May;61(5):601-610.
167. Popik, W.; Alce T. M.; Au, W. C., Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol.* **2002** May;76(10):4709-22.
168. Liao, Z.; Cimasky L. M.; Hampton, R.; Nguyen, D. H.; Hildreth, J. E., Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **2001** Jul 20;17(11):1009-19.

169. Schroeder, N.; Chung, C.-S.; Chen, C.-H.; Liao, C.-L.; Chang, W., The Lipid Raft-Associated Protein CD98 Is Required for Vaccinia Virus Endocytosis. *Journal of Virology* **2012**, *86* (9), 4868-4882.
170. Takeda, M.; Leser G. P.; Russell, C. J.; Lamb, R. A., Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003** Dec 9;100(25):14610-7.
171. Anderson, H. A.; Chen Y.; Norkin, L. C., Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell*. **1996** Nov;7(11):1825-34
172. Kawabata, A.; Tang, H.; Huang, H.; Yamanishi, K.; Mori, Y., Human herpesvirus 6 envelope components enriched in lipid rafts: evidence for virion-associated lipid rafts. *Virology Journal* **2009**, *6* (1), 127.
173. Choi, K. S.; Aizaki H.; Lai, M. M. C., Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J Virol*. **2005** Aug;79(15):9862-71.
174. Guo, H.; Huang, M.; Yuan, Q.; Wei, Y.; Gao, Y.; Mao, L.; Gu, L.; Tan, Y.; Zhong, Y.; Liu, D.; Sun, S., The Important Role of Lipid Raft-Mediated Attachment in the Infection of Cultured Cells by Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Beaudette Strain. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0170123.
175. Lu, Y.; Liu D. X.; Tam, J. P., Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2008** May 2;369(2):344-9.
176. Morita, E.; Sandrin, V.; McCullough, J.; Katsuyama, A.; Baci Hamilton, I.; Sundquist, W. I., ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*. **2011** Mar 17;9(3):235-242.
177. Weissenhorn, W.; Göttlinger, H., Essential ingredients for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*. **2011** Mar 17;9(3):172-174.
178. Tsuchiya, H.; Mizogami, M., Interaction of drugs with lipid raft membrane domains as a possible target. *Drug Target Insights* **2020**, *14*, 34-47.
179. Parihar, S. P.; Guler, R.; Brombacher, F., Statins: a viable candidate for host-directed therapy against infectious diseases. *Nature Reviews Immunology* **2019**, *19* (2), 104-117.

180. Gorabi, A. M.; Kiaie, N.; Bianconi, V.; Jamialahmadi, T.; Al-Rasadi, K.; Johnston, T. P.; Pirro, M.; Sahebkar, A., Antiviral effects of statins. *Prog Lipid Res.* **2020** Jul;79:101054
181. Elahi, S.; Weiss R. H.; Merani, S., Atorvastatin restricts HIV replication in CD4+ T cells by upregulation of p21. *AIDS.* **2016** Jan;30(2):171-83.
182. Selvam, M. P.; Blay R. A.; Geyer, S.; Buck, S. M.; Pollock, L.; Mayner, R. E.; Epstein, J. S., Inhibition of HIV-1 replication in H9 cells by nystatin-A compared with other antiviral agents. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **1993** May;9(5):475-81.
183. Lalonde, M. S.; Sundquist, W. I., How HIV finds the door. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012** Nov 13;109(46):18631-2
184. Li, Y. J.; Chen, C. Y.; Yang, J. H.; Chiu, Y. F., Modulating cholesterol-rich lipid rafts to disrupt influenza A virus infection. *Front Immunol.* **2022** Sep 13;13:982264.
185. Bader, T.; Fazili J.; Madhoun, M.; Aston, C.; Hughes, D.; Rizvi, S.; Seres, K.; Hasan, M., Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol.* **2008** Jun;103(6):1383-9.
186. Zapatero-Belinchón, F. J.; Moeller, R.; Lasswitz, L.; van Ham, M.; Becker, M.; Brogden, G.; Rosendal, E.; Bi, W.; Carriquí-Madroñal, B.; Islam, K.; Lenman, A.; Gunesch, A. P.; Kirui, J.; Pietschmann, T.; Överby, A. K.; Jänsch, L.; Gerold, G., Fluvastatin mitigates SARS-CoV-2 infection in human lung cells. *Iscience.* **2021** Dec;24(12):103469.
187. Gower, T. L.; Graham, B. S., Antiviral activity of lovastatin against respiratory syncytial virus in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001** Apr;45(4):1231-7.
188. Shen, T. A. O.; Chen, C. L.; Jhan, M. K.; Tseng, P. C.; Satria, R. D.; Hsing, C. A. O., Antiviral Efficacy of the Anesthetic Propofol against Dengue Virus Infection and Cellular Inflammation. *J Immunol Res.* **2021** Mar 31;2021:6680913.
189. Dechaumes, A.; Nekoua, M. P.; Belouzard, S.; Sane, F.; Engelmann, I.; Dubuisson, J.; Alidjinou, E. K.; Hober, D., Fluoxetine Can Inhibit SARS-CoV-2 In Vitro. *Microorganisms* **2021**, 9 (2).
190. Kulkarni, R.; Wiemer, E. A. C.; Chang, W., Role of Lipid Rafts in Pathogen-Host Interaction - A Mini Review. *Front Immunol.* **2022** Jan 20;12:815020.

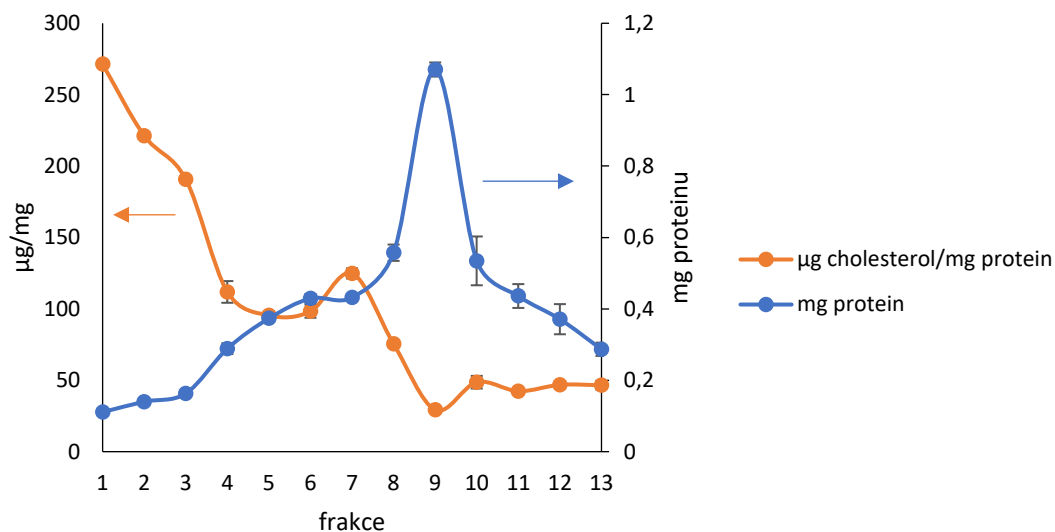
191. Sonnino, S.; Aureli, M.; Grassi, S.; Mauri, L.; Prioni, S.; Prinetti, A., Lipid Rafts in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Molecular neurobiology* **2013**, *50*.
192. Ledesma, M. D.; Martin, M. G.; Dotti, C. G., Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog Lipid Res* **2012**, *51* (1), 23-35.
193. Sandhoff, K.; Harzer, K., Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2013**, *33*, 10195-208.
194. Hein, L. K.; Duplock, S.; Hopwood, J. J.; Fuller, M., Lipid composition of microdomains is altered in a cell model of Gaucher disease. *J Lipid Res* **2008**, *49* (8), 1725-34.
195. Ledesma, M. D.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Schuchman, E. H., Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J Neurochem* **2011**, *116* (5), 779-88.
196. Karasinska, J. M.; Hayden, M. R., Cholesterol metabolism in Huntington disease. *Nat Rev Neurol* **2011**, *7* (10), 561-72.
197. Desplats, P. A.; Denny, C. A.; Kass, K. E.; Gilmartin, T.; Head, S. R.; Sutcliffe, J. G.; Seyfried, T. N.; Thomas, E. A., Glycolipid and ganglioside metabolism imbalances in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **2007**, *27* (3), 265-77.
198. Valencia, A.; Reeves, P. B.; Sapp, E.; Li, X.; Alexander, J.; Kegel, K. B.; Chase, K.; Aronin, N.; DiFiglia, M., Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3-beta accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci Res* **2010**, *88* (1), 179-90.
199. Gudala, K.; Bansal, D.; Muthyala, H., Role of serum cholesterol in Parkinson's disease: a meta-analysis of evidence. *J Parkinsons Dis* **2013**, *3* (3), 363-70.
200. Fallon, L.; Moreau, F.; Croft, B. G.; Labib, N.; Gu, W. J.; Fon, E. A., Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem* **2002**, *277* (1), 486-91.
201. Park, J. Y.; Kim, K. S.; Lee, S. B.; Ryu, J. S.; Chung, K. C.; Choo, Y. K.; Jou, I.; Kim, J.; Park, S. M., On the mechanism of internalization of alpha-synuclein into microglia: roles of ganglioside GM1 and lipid raft. *J Neurochem* **2009**, *110* (1), 400-11.

202. Fabelo, N.; Martín, V.; Santpere, G.; Marín, R.; Torrent, L.; Ferrer, I.; Díaz, M., Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* **2011**, *17* (9-10), 1107-18.
203. Goedert, M.; Spillantini, M. G., A century of Alzheimer's disease. *Science* **2006**, *314* (5800), 777-81.
204. Lusis, A. J., Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407* (6801), 233-41.
205. Rios, F. J.; Ferracini, M.; Pecenin, M.; Koga, M. M.; Wang, Y.; Ketelhuth, D. F.; Jancar, S., Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts. *PLoS One* **2013**, *8* (10), e76893.
206. Garofalo, T.; Giammarioli A. M.; Misasi, R.; Tinari, A.; Manganelli V; Gambardella L.; Pavan, A.; Malorni, W.; Sorice, M., Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ.* **2005**. *12*, 1378–1389.
207. Garofalo, T.; Matarrese, P.; Manganelli, V.; Marconi, M.; Tinari, A.; Gambardella, L.; Faggioni, A.; Misasi, R.; Sorice, M.; Malorni, W., Evidence for the involvement of lipid rafts localized at the ER-mitochondria associated membranes in autophagosome formation. *Autophagy* **2016**, *12*, 1-19.
208. Hayashi, T.; Fujimoto, M., Detergent-Resistant Microdomains Determine the Localization of σ -1 Receptors to the Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Junction. *Molecular Pharmacology* **2010**, *77* (4), 517.
209. Montesinos, J.; Area-Gomez, E., Isolation of mitochondria-associated ER membranes. *Methods Cell Biol.* **2020**;155:33-44.
210. Browman, D. T.; Resek M. E.; Zajchowski, L. D.; Robbins, S. M., Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci.* **2006** Aug 1;119(Pt 15):3149-60.
211. Manganelli, V.; Longo, A.; Mattei, V.; Recalchi, S.; Riitano, G.; Caissutti, D.; Capozzi, A.; Sorice, M.; Misasi, R.; Garofalo, T. Role of ERLINs in the Control of Cell Fate through Lipid Rafts. *Cells.* **2021** Sep 13;10(9):2408.
212. Lucey, B. P.; Nelson-Rees W. A.; Hutchins, G. M., Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med.* **2009** Sep;133(9):1463-7.

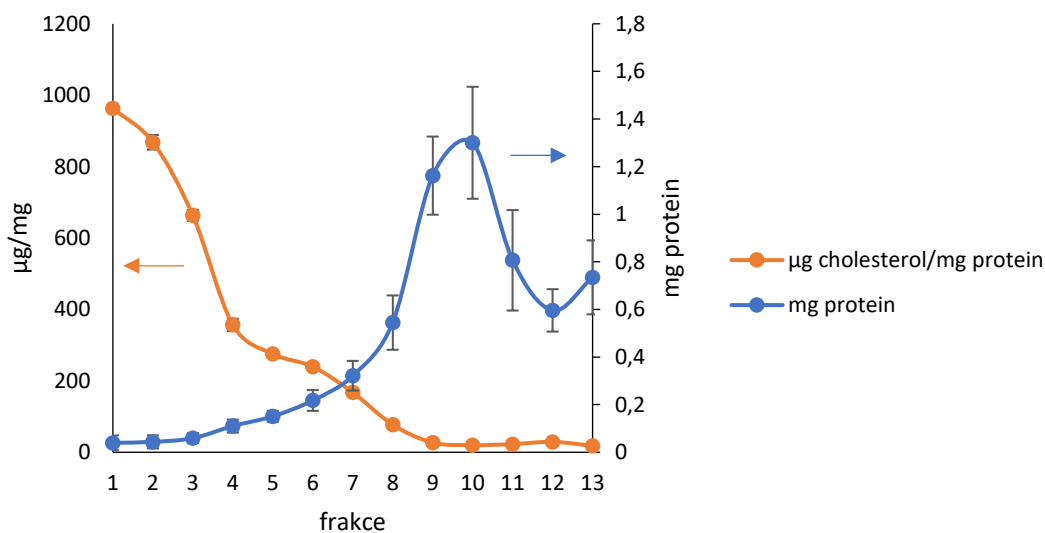
213. Knehr, M.; Poppe, M.; Enulescu, M.; Eickelbaum, W.; Stoehr, M.; Schroeter, D.; Paweletz, N., A Critical Appraisal of Synchronization Methods Applied to Achieve Maximal Enrichment of HeLa Cells in Specific Cell Cycle Phases. *Experimental Cell Research* **1995**, *217* (2), 546-553.
214. Smith P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **1985** Oct;150(1):76-85.
215. Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S. G.; Richmond, W.; Fu, P. C., Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry* **1974**, *20* (4), 470-475.
216. Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* **1959** May;82(1):70-7.
217. Liu, Z. Q.; Mahmood, T.; Yang, P. C., Western blot: technique, theory and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* **2012** Sep;4(9):429-34.
218. Hofmann, D. M.; Böhm, M., Luminescence. In *digital Encyclopedia of Applied Physics*, 2005.
219. Kricka, L. J., Clinical Applications of Chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *500*, 279-286.
220. Vacek, J.; Novák, D.; Zatloukalová, M., Nové směry v elektrochemii biomakromolekul: stručný přehled a diskuse. *Chemické Listy* **2017**, *111*, 430-438.
221. Vacek, J.; Ostatná, V., *Bioelektrochemie*. Univerzita Palackého v Olomouci: 2020.
222. Persaud-Sawin, D. A.; Lightcap, S.; Harry, G. J., Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method. *J Lipid Res* **2009**, *50* (4), 759-67.
223. Graham, J. M., Purification of lipid rafts from cultured cells. *ScientificWorldJournal* **2002**, *2*, 1662-6.
224. Luna, E.; Nebl, T.; Takizawa, N.; Crowley, J., Lipid Raft Membrane Skeletons. 1970; *Membrane Microdomain Signaling* (pp.47-69)
225. Compton, S. J.; Jones, C. G., Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* **1985**, *151* (2), 369-374.

226. Radeva, G.; Sharom, F., Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *The Biochemical journal* **2004**, *380*, 219-30.
227. Sahaf, B.; Heydari, K.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A., Lymphocyte surface thiol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (7), 4001-4005.
228. Turell, L.; Radi, R.; Alvarez, B., The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med* **2013**, *65*, 244-253.

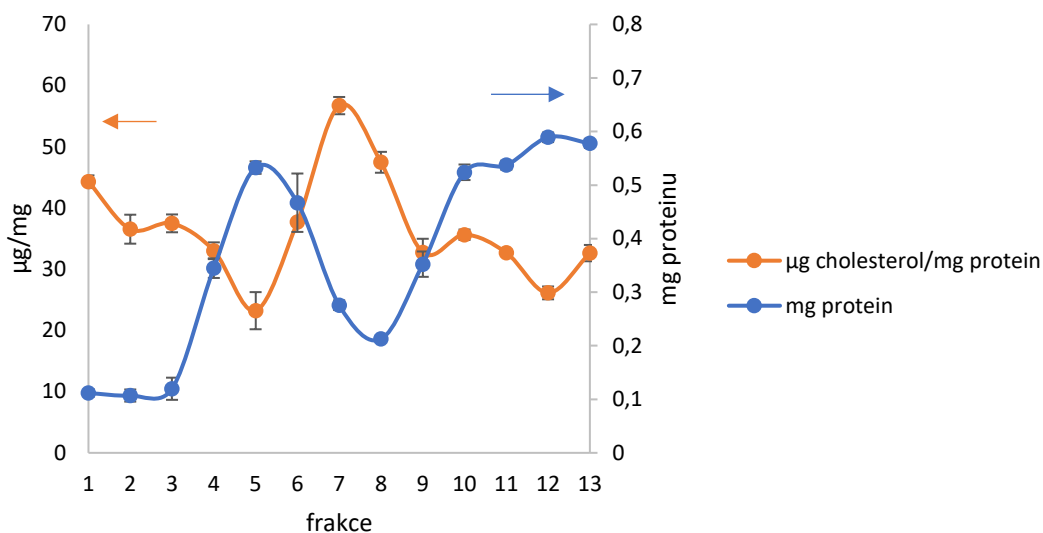
8 Přílohy



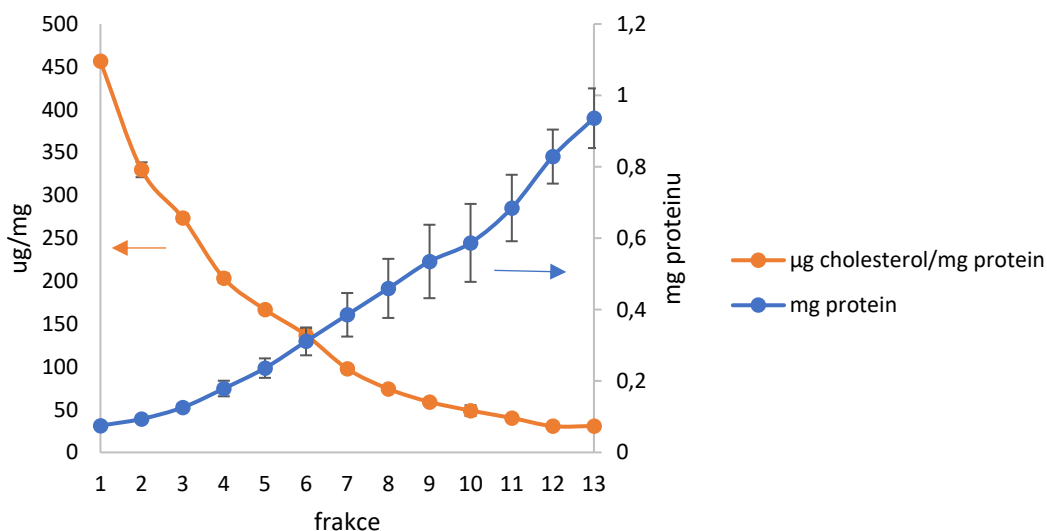
Graf 4: Množství cholesterolu ve frakcích gradientu **Optiprep™** po **4 hodinovém** intervalu separace vyneseno jako závislost μg cholesterolu na mg proteinu (oranžová křivka). Porovnáno s distribucí celkového proteinu (modrá křivka). Měření byla provedena ve třech opakováních ($\pm\text{SD}$).



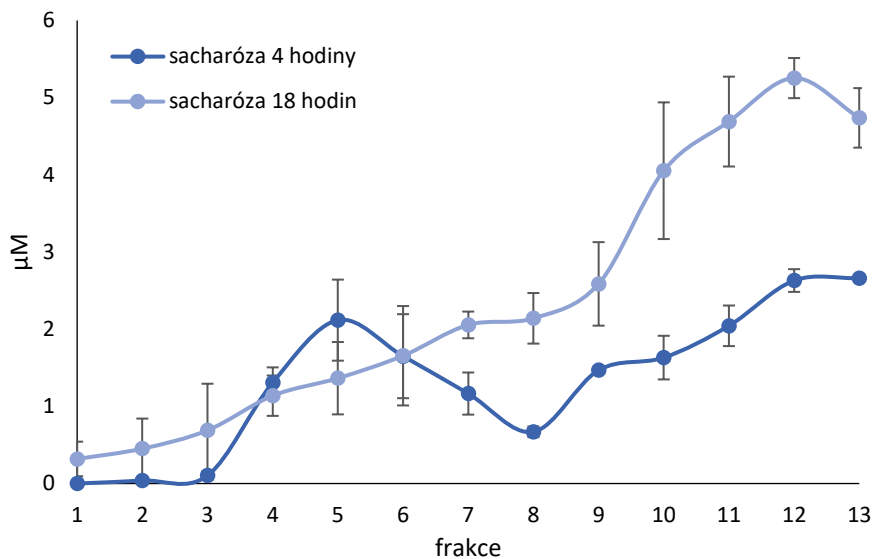
Graf 5: Množství cholesterolu ve frakcích gradientu **Optiprep™** po **18 hodinovém** intervalu separace vyneseno jako závislost μg cholesterolu na mg proteinu (oranžová křivka). Porovnáno s distribucí celkového proteinu (modrá křivka). Měření byla provedena ve třech opakováních ($\pm\text{SD}$).



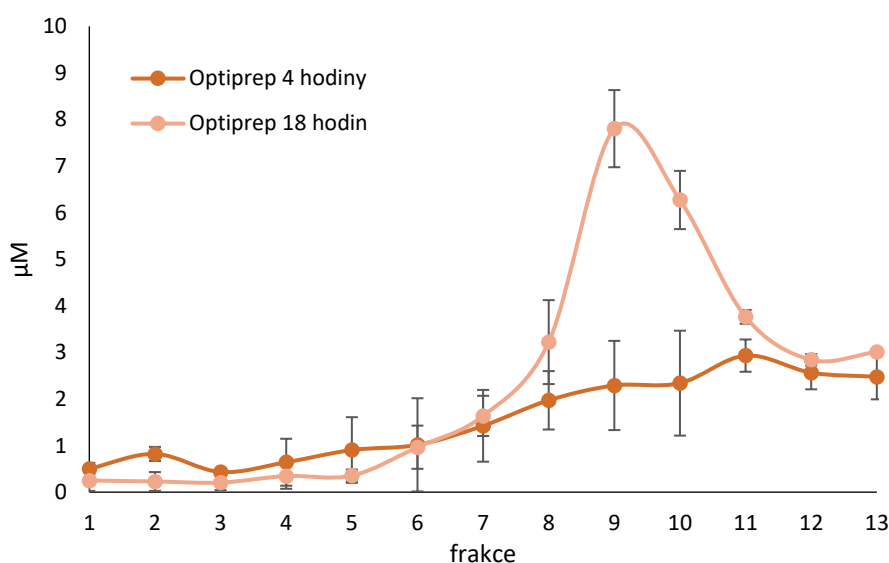
Graf 6: Množství cholesterolu ve frakcích gradientu **sacharózy** po **4 hodinovém** intervalu separace vyneseno jako závislost μg cholesterolu na mg proteinu (oranžová křivka). Porovnáno s distribucí celkového proteinu (modrá křivka). Měření byla provedena ve třech opakováních ($\pm\text{SD}$).



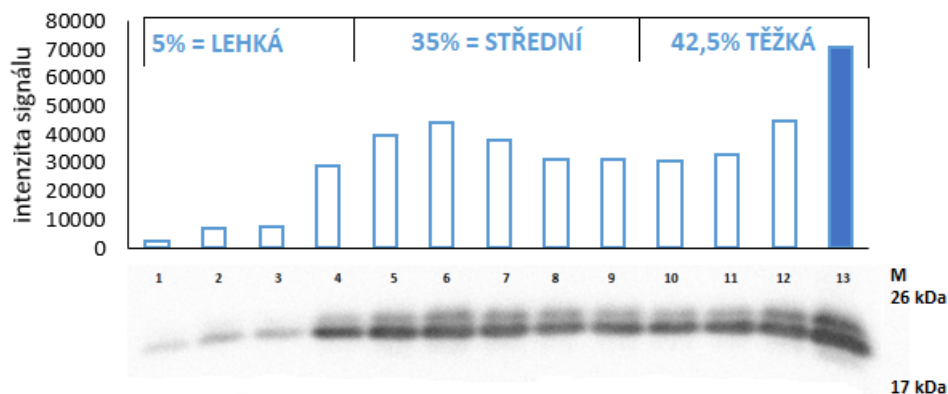
Graf 7: Množství cholesterolu ve frakcích gradientu **sacharózy** po **18 hodinovém** intervalu separace vyneseno jako závislost μg cholesterolu na mg proteinu (oranžová křivka). Porovnáno s distribucí celkového proteinu (modrá křivka). Měření byla provedena ve třech opakováních ($\pm\text{SD}$).



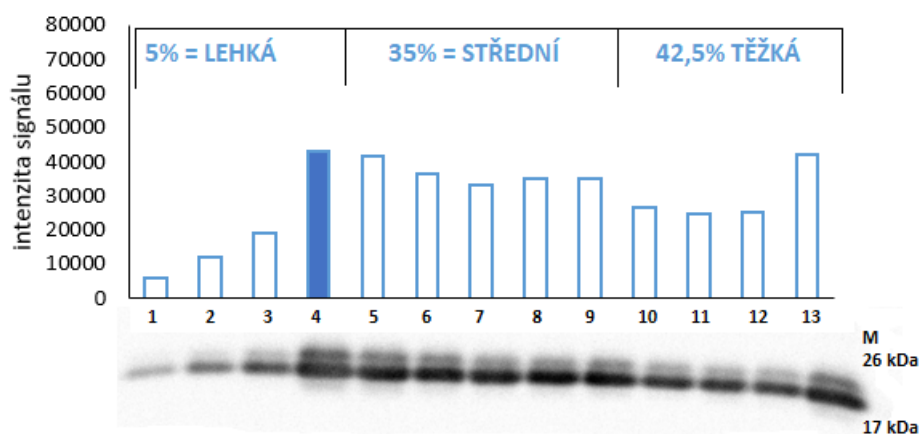
Graf 8: Koncentrace volných thiolových skupin gradientu sacharózy ve dvou časových intervalech separace (4 hodinová – tmavě modrá křivka; 18 hodinové – světle modrá křivka). Měřeno při 412 nm. Měření byla provedena ve třech opakováních (\pm SD).



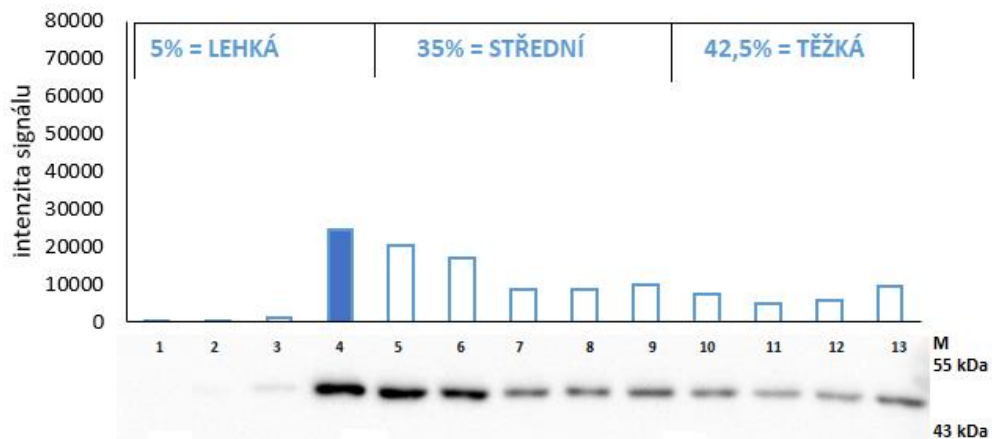
Graf 9: Koncentrace volných thiolových skupin ve frakcích gradientu Optiprep™ ve dvou časových intervalech separace (4 hodinová – tmavě oranžová křivka; 18 hodinová – světle oranžová křivka). Měřeno při 412 nm. Měření byla provedena ve třech opakováních (\pm SD).



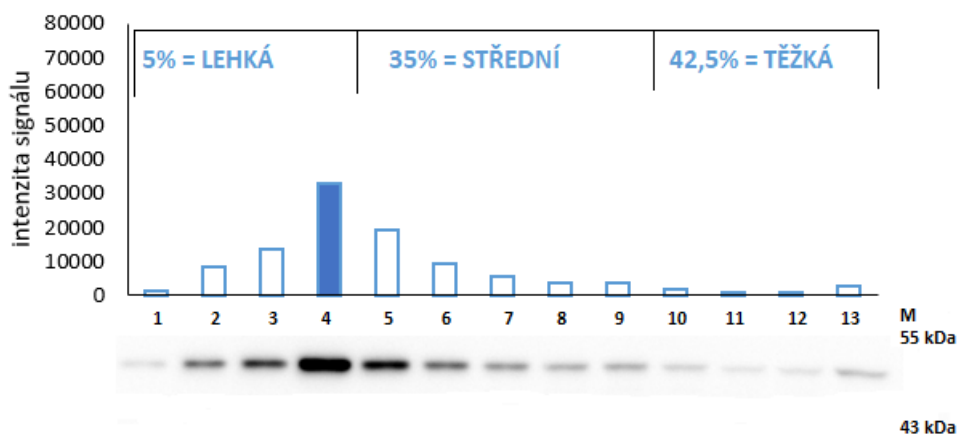
Obrázek 17: Zastoupení kaveolinu-1 (molekulová hmotnost 21, 21 kDa) v gradientu sacharózy po 4 hodinové separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



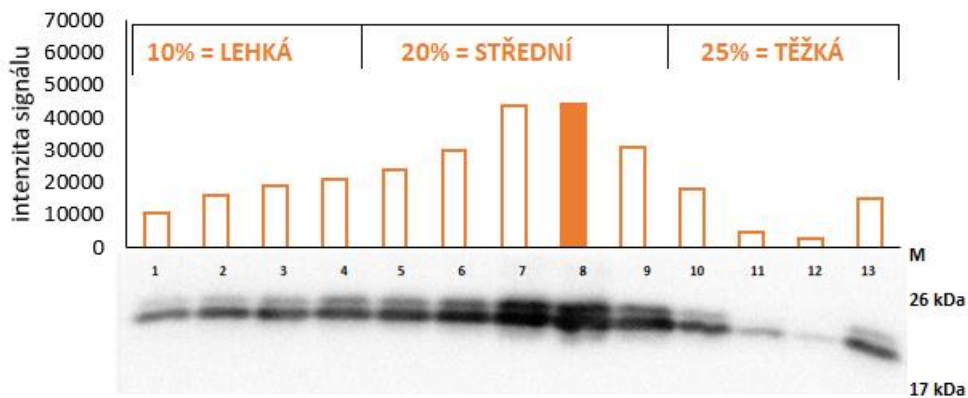
Obrázek 18: Zastoupení kaveolinu-1 (molekulová hmotnost 21, 24 kDa) v gradientu sacharózy po 18 hodinové separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



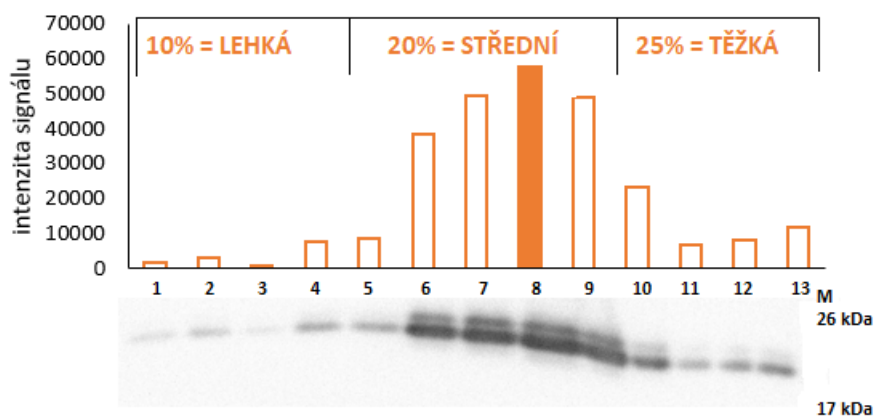
Obrázek 19: Zastoupení flotillinu-1 (molekulová hmotnost 47 kDa) v gradientu **sacharózy** po **4 hodinové** separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



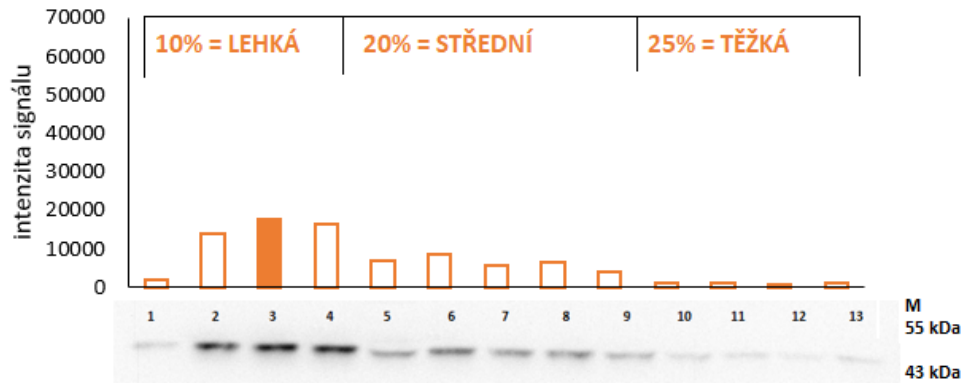
Obrázek 20: Zastoupení flotillinu-1 (molekulová hmotnost 47 kDa) v gradientu **sacharózy** po **18 hodinové** separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



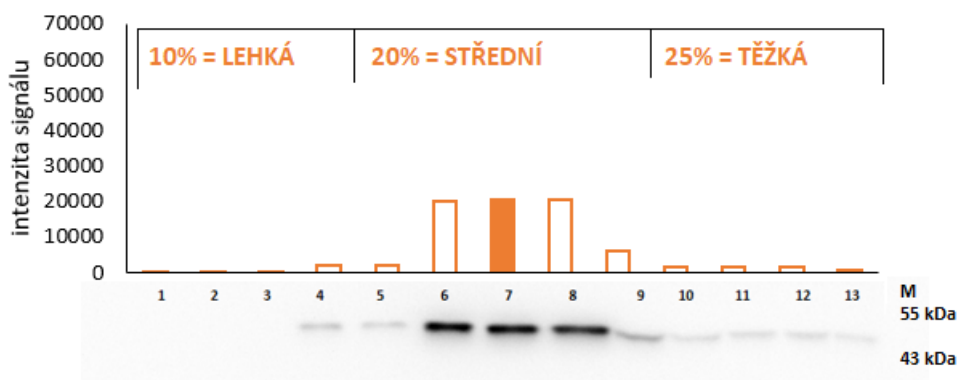
Obrázek 21: Zastoupení kaveolinu-1 (molekulová hmotnost 21, 24 kDa) v gradientu **Optiprep™** po **4 hodinové** separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



Obrázek 22: Zastoupení kaveolinu-1 (molekulová hmotnost 21, 24 kDa) v gradientu **Optiprep™** po **18 hodinové** separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



Obrázek 23: Zastoupení flotillinu-1 (molekulová hmotnost 47 kDa) v gradientu **Optiprep™** po **4 hodinové** separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.



Obrázek 24: Zastoupení flotillinu-1 (molekulová hmotnost 47 kDa) v gradientu **Optiprep™** po **18 hodinové** separaci. Podmínky: primární protilátka 1:1000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 24 hodin při 4 °C; sekundární protilátka 1:5000 v 5% mléce/TBST byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.