

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Kateřina Višněvská

Detekce opioidních receptorů v membránových frakcích mozku

Vazebné studie se specifickými radioligandy

Detections of opioid receptors in plasma membranes

Binding assays with specific radioligands

Diplomová práce

Školitel-konzultant: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze dne

.....

Kateřina Višněvská

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení a věnovaný čas. Dále jsem velice vděčná RNDr. Lence Roubalové, PhD. za trpělivý přístup a cenné rady při výpočtech a metodice. A také děkuji všem doktorandům, kteří mi po celou dobu pomáhali.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantového vědeckého projektu podporovaného GAČR (P207/12/0919).

Obsah

Seznam použitých zkratek	6
Abstrakt.....	8
Abstract.....	10
1. Úvod.....	12
2. Teoretická část	14
2.1. Plasmatické membrány	14
2.1.1. Struktura plasmatických membrán	14
2.1.2. Funkce plasmatických membrán	15
2.2. Receptory	16
2.3. G proteiny	16
2.4. Receptory spřažené s G proteiny, GPCR.....	18
2.4.1. Struktura GPCR.....	18
2.4.2. Interakce GPCR s ligandem a G proteinem.....	20
2.4.3. Tvorba dimerů a oligomerů GPCR.....	20
2.4.4. Desenzitizace GPCR.....	21
2.4.5. Internalizace GPCR	22
2.5. Opioidní receptory	24
2.5.1. Mechanismus účinku opioidních receptorů	25
2.5.2. Desenzitizace, internalizace a tvorba dimerů u opioidních receptorů	27
2.5.3. μ -opioidní receptory, MOR	28
2.5.4. δ -opioidní receptory, DOR	30
2.5.5. κ -opioidní receptory, KOR	32
2.6. Studium vazby receptor – ligand	32
3. Cíle práce	35
4. Praktická část	36
4.1. Materiál a metody	36
4.1.1. Materiál.....	36
4.1.2. Metody.....	39
4.1.2.1. Frakcionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace	39
4.1.2.1.1. Příprava postnukleárního supernatantu (PNS).....	39

4.1.2.1.2.	Izolace plasmatických membrán z kortexu potkana na percollovém gradientu	40
4.1.2.2.	Stanovení proteinů Lowryho metodou	41
4.1.2.3.	Stanovení [³ H]ouabainové vazby v postnukleárním supernatantu a plasmatických membránách ve vzorcích kontrolních zvířat	42
4.1.2.4.	Stanovení vazby [³ H]DAMGO v plasmatických membránách	44
4.1.2.5.	Stanovení vazby [³ H]DAMGO v homogenátu, jaderném sedimentu, postnukleárním supernatantu a dolní mitochondriální frakci	47
4.1.2.6.	Jednobodové stanovení [³ H]DAMGO v plasmatických membránách	50
4.1.2.7.	Stanovení vazby [³ H]DPDPE v plasmatických membránách	52
4.1.2.8.	Jednobodové stanovení [³ H]U-69593 v plasmatických membránách	55
4.1.2.9.	Elektroforéza v prostředí SDS a technika „Western blot“ pro detekci opioidních receptorů MOR, DOR a KOR v plasmatických membránách.....	56
4.2.	Výsledky	59
4.2.1.	Fracionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace	59
4.2.2.	Stanovení proteinů Lowryho metodou	59
4.2.3.	Stanovení [³ H]ouabainové vazby v postnukleárním supernatantu a plasmatických membránách.....	60
4.2.4.	Stanovení vazby [³ H]DAMGO v plasmatických membránách	62
4.2.5.	Stanovení vazby [³ H]DAMGO v homogenátu, jaderném sedimentu, postnukleárním supernatantu a dolní mitochondriální frakci	63
4.2.6.	Jednobodové stanovení [³ H]DAMGO v plasmatických membránách	68
4.2.7.	Stanovení vazby [³ H]DPDPE v plasmatických membránách	70
4.2.8.	Jednobodové stanovení [³ H]U-69593 v plasmatických membránách	72
4.2.9.	Elektroforéza v prostředí SDS a technika „Western blot“ pro detekci opioidních receptorů MOR, DOR a KOR v plasmatických membránách.....	74
4.2.10.	Statistické vyhodnocení	77
5.	Diskuze	80
6.	Závěr	85
	Seznam použité literatury	87

Seznam použitých zkratek

ACI a ACII	izoformy adenylylcyklasy
BSA	z angl. <i>bovine serum albumine</i> , hovězí sérový albumin
C	vzorky plasmatických membrán z kortexu kontrolních potkanů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCR5	chemokinový receptor typu 5
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CHO	z angl. <i>chinese hamster ovary</i> , savčí buňky z křeččích vaječníků
DADLE	agonista δ - opioidních receptorů, [D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enkefalin
DAG	1,2-diacylglycerol
DAMGO	agonista μ - opioidních receptorů, [D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enkefalin
DDPDE	agonista δ - opioidních receptorů, [D-Pen ^{2,5}]-enkefalin
DOR	δ -opioidní receptory
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina, chelatační činidlo
Erk1 a Erk2	rodina MAP kinas regulující extracelulární signál
G proteiny	heterotrimerní proteiny vázající GTP
GDP	guanosindifosfát
GPCR	z angl. <i>G protein coupled receptor</i> , receptor spřažený s G proteinem
GRK	kinasa pro receptor spřažený s G proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HEK-293	z angl. <i>human embryonic kidney cells</i> , buněčná linie pocházející z embryonálních ledvinných buněk
HOM	homogenát mozku potkana
IP ₃	inositoltrifosfát
Jak2	Janusova kinasa
KOR	κ -opioidní receptory
M	vzorky plasmatických membrán z kortexu potkanů ovlivněných morfinem
MAP	z angl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> , mitogenem aktivované proteinkinasy

MIT	mitochondriální dolní frakce
MOR	μ-opioidní receptory
NK1	receptor neurokinin 1
OR	opioidní receptory
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PM	plasmatické membrány
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid, inhibitor proteas
PNS	postnukleární supernatant
Ras, Rho, Arf,	
Rab a Ran	malé G proteiny (monomerické) vázající GTP
SED	jaderný sediment získaný při izolaci plasmatických membrán
SDS	dodecylsírán sodný
SP	selektivní substance ligandu vázající se na receptor NK1
STEM	fosfátový pufr podle <i>Sørensen</i> a
TE	pufrovací roztok obsahující Tris-HCl a EDTA
TM 1-7	transmembránové helixy, receptory spřažené s G-proteiny se skládají ze sedmi transmembránových helixů
U-69593	N-methyl-2-fenyl-N-[(5R,7S,8S)-7-(pyrrolidin-1-yl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]acetamid

Abstrakt

Morfin je významný opioid využívaný v medicíně jako silné analgetikum. Při léčbě chronické bolesti se však při opakovaném podávání rozvíjí tolerance a fyzická závislost. Morfin se váže na všechny tři základní typy opioidních receptorů: μ -OR, δ -OR a κ -OR. Primární a dominantní význam pro vznik drogové závislosti mají receptory μ -OR. Cílem výzkumu farmaceutických firem je proto najít látku s povahou silného agonisty μ -OR, která bude vykazovat stejný analgetický účinek jako morfin, ale nebude vyvolávat drastickou závislost na této droze při dlouhodobém užívání.

V této práci jsme se zaměřili především na studium vazby agonisty DAMGO na μ -opioidní receptory. Tyto receptory jsou primárně zodpovědné za fyziologický účinek morfinu i vznik závislosti na droze. Studium vazby radioaktivně značeného agonisty [3 H]DAMGO bylo provedeno ve frakcích získaných při izolaci plasmatických membrán (PM) z cerebrálního kortexu potkana. Izolace PM byla provedena na hustotním gradientu Percollu. Plasmatické membrány byly připraveny z kontrolních potkanů a potkanů, kterým byly po dobu 10 dnů podávány stoupající dávky morfinu, 10-50 mg/ kg. V izolovaných plasmatických membránách se stanovil počet specifických vazebných míst a afinita vazby [3 H]DAMGO v inkubačním médiu bez iontů. Zjistili jsme, že PM izolované z mozku potkanů vystavených dlouhodobému účinku morfinu, vykazují pokles maximálního počtu vazebných míst B_{\max} pro [3 H]DAMGO na 82 % (*, $p < 0.05$) ve srovnání s kontrolami (100%). Afinita vazebných míst se nezměnila. Dále bylo zjištěno, že inhibiční působení vápenatých iontů na basální hodnoty vazby [3 H]DAMGO v médiu bez iontů (**, $p < 0.01$), nelze detekovat v PM připravených z potkanů adaptovaných na morfin. Dlouhodobá expozice šedé kůry mozku morfinu tedy mění interakci MOR s vápenatými ionty, důležitými inhibitory „vnitřní účinnosti receptoru“ (intrinsic efficiency), tj. schopnosti MOR aktivovat G proteiny a následující stupně této signální kaskády. Při studiu receptorů typu δ (δ -OR) jsme potvrdili nárůst vazby specifického agonisty [3 H]DPDPE v PM připravených z potkanů podáváním morfin. Podobný výsledek byl zaznamenán i u receptorů typu κ (κ -OR). Došlo ke zvýšení vazby specifického agonisty [3 H]U-69593 v plasmatických membránách izolovaných z kortexů potkanů ovlivněných morfinem.

Výsledky mé diplomové práce rozšiřují poznání o adaptačních změnách, které probíhají v organismu při dlouhodobé adaptaci na morfin. Pokles vazebné kapacity μ -OR

je provázen vzestupem vazby na receptorech δ -OR a κ -OR. Tento výsledek lze interpretovat jako kompenzační změnu, která ve svém konečném důsledku způsobuje posun ve smyslu zvýšeného významu δ -OR a κ -OR ve srovnání s μ -OR v mozku potkana. Organismus hledá alternativní cesty jak „obejít“, kompenzovat snížení účinnosti signální dráhy iniciované μ -OR. Výsledky imunodetekce ukázaly, že tato kompenzační změna probíhá při nezměněné hustotě všech typů OR, tedy μ -OR, δ -OR i κ -OR v plasmatických membránách.

Klíčová slova: dlouhodobá adaptace na morfin, potkan, šedá kůra mozková, plasmatická membrána, receptory spřažené s G proteiny, receptory pro opioidy μ -OR, δ -OR, a κ -OR, DAMGO, DPDPE, U-69593, desenzitizace, tolerance, drogová závislost.

Abstract

Morphin is an important opioid drug which is used in medicine as a highly potent analgesic in treatment of both acute and chronic pain, post-traumatic shock and diarrhea. However, in treatment of chronic pain, the serious problem is represented by step-by-step development of decreased sensitivity of physiological response to morphine exposure (tolerance) and, subsequently, the psychological as well as physical dependence on this drug. Opioids interact with three types of opioid receptors: μ -OR, δ -OR and κ -OR. One of primary goals of many pharmaceutical companies is an effort to design more specific and simultaneously potent OR agonists, which would exhibit highly efficacious analgesic effects, but would not develop fast physical dependence in conditions of the long-term usage.

In our work, the primary attention was devoted to μ -OR because these receptors are primarily responsible for physiological effect of morphine and genesis of tolerance and drug dependence. We studied the binding of specific agonist [3 H]DAMGO to plasma membranes (PM) isolated from rat brain cortex of rats adapted to increasing doses of morphine (10-50 mg/kg) for 10 days. PM isolated by centrifugation in Percoll density gradient from morphine-adapted rats exhibited the *decrease* of maximum binding capacity B_{\max} of this radioligand to 82% (*, $p < 0.05$) when compared with PM isolated from control animals (100%). Affinity [3 H]DAMGO binding sites was unchanged. We have also found that inhibitory effect of calcium ions on [3 H]DAMGO binding is removed by adaptation to morphine, i.e. it is not detectable in PM prepared from morphine-treated rats. Thus, the long-term exposition of cerebral cortex to morphine alters sensitivity of μ -OR to calcium, a crucial intracellular secondary messenger and inhibitor of intrinsic efficiency of μ -OR. Contrarily, radioligand binding studies of δ -OR and κ -OR with specific agonists [3 H]DPDPE and [3 H]U-69593 indicated an increase of binding in PM prepared from morphine-adapted rats.

Data presented in this work extend the present knowledge about the molecular mechanism(s) of the long-term adaptation of mammalian organism to morphine. Decrease of μ -OR-agonist binding sites is accompanied by small, however significant increase of δ -OR and κ -OR agonist binding what may be interpreted as morphine-induced shift from (desensitized) μ -OR- to δ -OR and κ -OR-initiated signalling pathway. The immunoblot

analysis of the same membrane preparations indicated that this shift proceeds at unchanged PM density of these receptor molecules. (In Czech)

Keywords: long-term adaptation to morphine, rat, cortex, plasma membrane, G protein coupled receptors, δ -, μ -, κ -opioid receptors, DAMGO, DPDPE, U-69593, desensitization, tolerance, drug dependence.

1. Úvod

Morfin neboli morfium je přírodní alkaloid vyskytující se v mléce nezralých makovic máku setého, které se nazývá *opium*. Název omamné látky pochází od řeckého boha spánku Morphea. Morfin se řadí do skupiny léčiv nazývaných opiáty společně s heroinem a kodeinem. Morfin a kodein jsou neúčinnější složky opia. Morfin působí jako vysoce efektivní analgetikum a jeho účinky jsou až do dnešní doby nenahraditelné. Acetylací morfinu vzniká mnohem účinnější derivát, heroin. Morfin se používá pro utišení akutní i chronické bolesti. Chronicky se nejčastěji podává pacientům trpícím různými formami rakoviny a AIDS; akutní podání morfinu zachraňuje život při vážných úrazech a poraněních [1].

Už ve starověkém Egyptě byly známy silné analgetické účinky morfinu a byl považován za léčivo. Staří Řekové poprvé popsali jev zvaný tolerance a vyvíjející se závislost na droze. Droga byla vnímána ne jenom jako léčivo, ale i jako prostředek k zabíjení. Řecký lékař Dioskúrida Pedania popsal účinky opia jako bolesti zbavující, mírnící kašel a zastavující průjem. Opium bylo předepisováno i osobám s problémy spánku. V 19. století se zvýšilo využití morfinu především ve válečných polních nemocnicích. V této době se také zvýšilo zneužití morfinu a veřejně bylo známo, že je silně návykový. V tomto období se objevuje diacetyl morfinu neboli heroin, který je pětkrát silnější. Heroin se začal používat nejdříve jako léčivo při odvykání závislosti na morfinu, jelikož pacienti po podání heroinu přestali toužit po morfinu. Na přelomu 19. a 20. století byly drogy volně prodejné v lékárnách a drogeriích. Počátkem 20. století se objevuje první snaha o kontrolu obchodu s drogami a zákaz jejich volného prodeje. Masový rozvoj užívání heroinu byl zaznamenán v šedesátých letech 20. století nejprve v USA, později v západní Evropě. Následně byly státy nuceny zakročit proti nelegálnímu obchodu s opiáty a narkotiky a postupně se většina drog začala prodávat pouze na předpis a k léčebným účelům [2].

Thomas Sydenham, průkopník medicíny v 17. století napsal: „*Mezi prostředky, které dal všemohoucí bůh člověku k utišení jeho utrpení, není žádný tak univerzální a efektivní jako opium.*“ Tento citát vyjadřuje podstatu a nenahraditelnost morfinu v medicíně jako důležitého léčiva. Bolest byla vždy léčena jako symptom primárního onemocnění. Tíšení bolesti však může napomoci zotavení a léčbě. Potkanům s rakovinou plic, kterým byl podáván morfin, tumor metastázoval pomaleji, než u potkanů s rakovinou,

kteří nedostávali lék na tišení bolesti. Snížení bolesti nejen uleví pacientovi, ale podporuje i jeho léčbu a rehabilitaci, nepřerušovaný spánek a psychickou podporu. Vyjádřeno známými slovy „bolest zabíjí“ [1].

Bohužel při dlouhodobém podávání opioidů vzniká silná závislost, kterou nelze opomíjet. Morfin a zejména jeho derivát heroin jsou vysoce návykové a zneužívané látky v moderní společnosti. Hlavní roli v drogové závislosti hraje centrální nervový systém. Návyková látka způsobí přechodné změny v mozku. Narkoman musí svoje dávky neustále zvyšovat, protože dochází k desenzitizaci nervových buněk. Tento jev se nazývá tolerance a často se rozvíjí společně s fyzickou závislostí. Při dlouhodobém užívání dochází ke změnám ve složení buněčných membrán a adaptaci organismu na zvyšující se dávky drogy. Závislost na morfinu je psychická i fyzická [1].

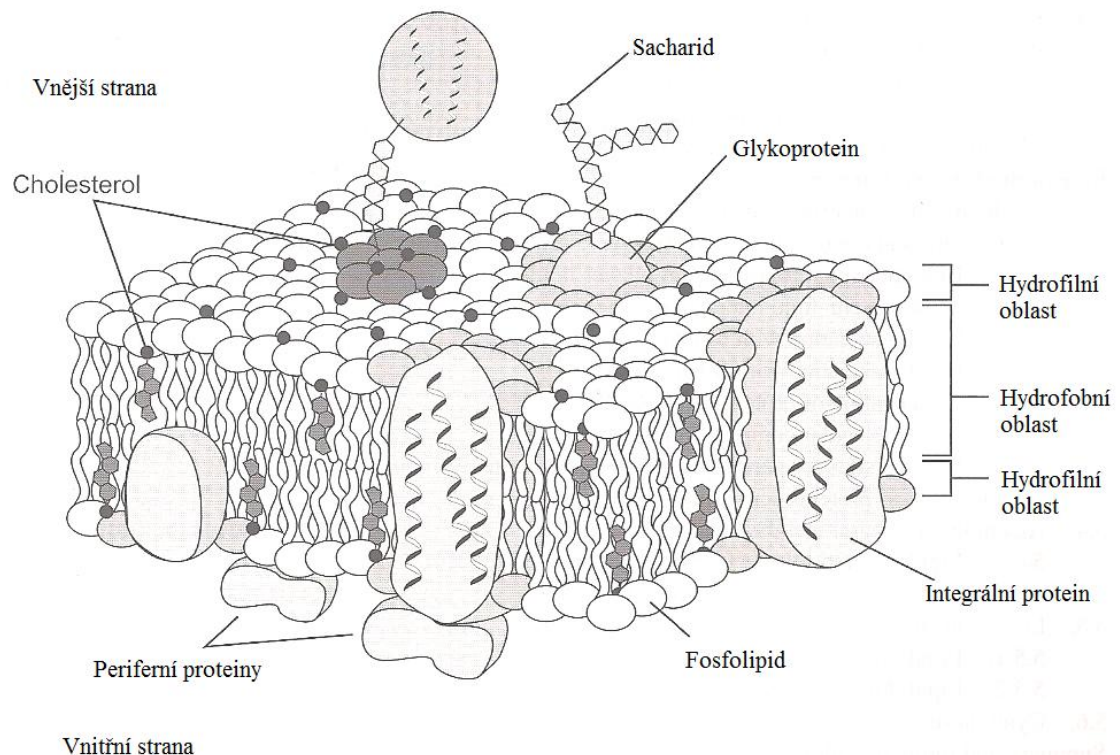
Účinky morfinu jsou pozitivní i negativní, jako léčivo je nezastupitelné, jako droga je jedna z nejnebezpečnějších. Pochopením mechanismu účinku a vzniku závislosti by pomohlo řadě problémů v medicíně. Opravdovým přínosem pro společnost by bylo najít takové analgetikum, jehož účinky by byly stejně silné jako u morfinu a závislost na tomto léčebném přípravku by byla minimální, ne-li žádná. Proto veškeré výzkumy týkající se tohoto alkaloidu jsou velice důležitým a cenným přínosem pro společnost a budoucí vývoj v medicíně.

2. Teoretická část

2.1. Plasmatické membrány

2.1.1. Struktura plasmatických membrán

Lipidy jsou molekuly s rozmanitou strukturou a biologickou funkcí. Primární role lipidů z pohledu funkce buňky je lipidová dvojvrstva buněk a organel. Na Obr. č. 1 je znázorněný model membránové struktury. Zastoupení lipidů se liší podle typu organismu (bakterie, prokaryota, eukaryota). Nejčastěji zastoupené lipidy ve struktuře membrány jsou cholesterol, fosfatidyletanolamin, fosfatidylcholin, sfingomyelin a fosfatidylserin. Obecně glycerolipidy a sfingolipidy jsou běžnou skupinou lipidů v membráně [3].



Obr. č. 1: Struktura plasmatické membrány eukaryotické buňky. Znázorněny integrální proteiny, jejichž nejčastější struktura je α -helix. Periferní proteiny, které interagují s lipidovým povrchem nebo jinými membránovými proteiny. (Převzato a upraveno z [3].)

Plasmatická membrána je tedy lipidová dvojvrstva s hydrofobním jádrem. K lepšímu pochopení fyzikálních vlastností plasmatické membrány přispěl koncept

hydrofobního efektu navržený Waltrem Kauzmannem v roce 1959, který má hlavní úlohu ve sbalování proteinů. Později následovalo popsání hydrofobního efektu Charlesem Tanfordem. Strukturální popis fluidní mozaiky navrhl roku 1972 S. J. Singer. Tento model popisuje proteiny jako volně se pohybující struktury v homogenním moři lipidů. Uspořádání polárních hlaviček diacylglycerolů závisí na přirozeném zastoupení alkylových řetězců a podmínkách rozpouštědla (iontová síla, pH a teplota). Fluidita je funkcí teploty a zastoupení alkylových řetězců. Fluidita uhlovodíkového jádra dvojvrstvy roste se zvyšujícím se počtem nenasatovaných nebo rozvětvených řetězců nebo se zkracující se délkou alkylových řetězců mastných kyselin. Fluidita také roste úměrně s teplotou. Cholesterol významně ovlivňuje vlastnosti lipidové dvojvrstvy. Vzdávající množství cholesterolu narušuje organizaci lipidů. Rozpouštědlo v okolí membrány také ovlivňuje její fyzikální vlastnosti. Ca^{2+} a jiné divalentní ionty interagují s negativním nábojem polárních hlaviček [3].

Plasmatické membrány slouží jako podpora pro procesy integrálních a periferních proteinů. Tyto procesy jsou ovlivněny fyzikálními vlastnostmi lipidových komponent. Každá specializovaná membrána má svou vlastní unikátní strukturu a funkci. V membránách existují různé mikrodomény např. lipidové rafty, lipidové domény a organizované membránové komplexy s vlastním jedinečným složením lipidů [3].

2.1.2. Funkce plasmatických membrán

Buněčná membrána tvoří mechanickou oporu buňky a brání průniku velkých molekul. Plasmatická membrána je selektivně permeabilní pro ionty a organické látky a může regulovat propustnost a transport různých látek [3].

Přenos látek může probíhat bez spotřeby energie neboli pasivním transportem po směru koncentračního gradientu. Mezi pasivní transport patří tzv. usnadněná difúze a osmóza. Tímto mechanismem se přenáší malé molekuly a ionty. Pasivní transport využívají i různé přenašeči, např. acetylcholinový receptor. Druhý způsob transportu je aktivní přenos za spotřeby energie a proti směru koncentračního gradientu. Tento transport zprostředkovávají iontové kanály, specifictí přenašeči a tzv. pumpy. Aktivní transport se dělí na primární a sekundární. Primární aktivní transport využívá energii z hydrolýzy ATP pro přenos proti koncentračnímu gradientu. Sekundární aktivní transport využívá

samovolný tok ve směru jednoho gradientu k přenosu molekul proti druhému koncentračnímu gradientu. Membrána je také schopna endocytózy a exocytózy [4].

Kompartimentace lipidové dvojvstvy má důležitou roli ve funkci buňky. Membránové domény jsou místem integrace, modulace a signalizace. Domény, které obsahují polypeptid kaveolin se nazývají kaveoly a jsou stěžejním místem pro desenzitizaci hormonální odpovědi. Kaveolin také působí inhibujícím efektem na aktivitu heterotrimerního G proteinu [5].

2.2. Receptory

Receptor je organizovaná struktura, která po navázání látky změní svoji konformaci a vyvolá biologickou odpověď. Je to bílkovina, která přenáší signál v metabolických a regulačních drahách nebo v transportních systémech. Vazba látek na receptory může být složena z různých typů interakcí, např. vodíková, iontová vazba, hydrofobní interakce a van der Waalsova interakce nebo kovalentní vazba. Předpokládá se existence domén receptorů, a to domény vázající látku (funkce vazby ligandu) a domény efektorové (funkce přenosu stimulu). Signál z receptoru se může přenést přímo na efektorový protein (nemusí být fyziologickým cílem), nebo na další přenašeče, které jsou součástí signalizačních drah. Regulace receptorů probíhá skrze syntézu receptorů, jejich degradaci, kovalentní modifikaci nebo asociaci s jinými regulačními proteiny [6].

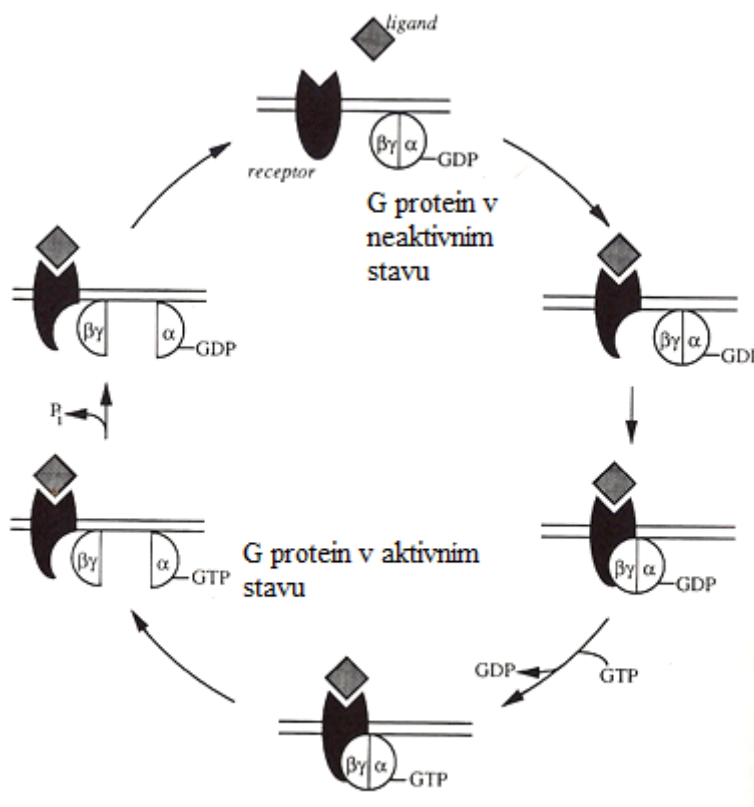
Existuje několik receptorových teorií, které navrhují vysvětlení vazby látek na receptory. Např. okupační nebo frekvenční teorie, inaktivační model. Mezi novější teorie patří např. teorie dvou stavů, kde se zahrnují i konformační změny receptoru [6].

2.3. G proteiny

G proteiny hrají důležitou roli v signalizaci při přenosu biologické odpovědi z receptoru dál na tzv. druhé posly. Na Obr. č. 2 (str. 17) je popsána aktivace a přenos signálu pomocí G proteinu. Inaktivní forma G proteinu obsahuje tři podjednotky α , β , γ a molekulu GDP navázanou na α podjednotku. Navázáním neaktivního G proteinu na receptor oddisociuje GDP a na stejné místo se naváže molekula GTP. G protein se tak stává aktivním, oddisociuje od receptoru a rozdělí se na dvě části: $\beta\gamma$ část a α podjednotka

s GTP molekulou. Aktivní G protein se deaktivuje hydrolyzou GTP pomocí vlastní GTPasové aktivity. α podjednotka s hydrolyzovanou molekulou GDP se zpět naváže na část $\beta\gamma$. Mezi druhé posly spolupracující s G proteiny patří cAMP, cGMP, IP₃, DAG, Ca²⁺ a arachidonová kyselina. Jeden receptor může pravděpodobně interagovat s jedním nebo více G proteiny a jeden G protein může modulovat i více než jeden efektor. Pro studium GTPasové aktivity se využívá radioaktivně značený GTP γ S analog, který nepodléhá hydrolyze a je tak sledována funkce α podjednotky [7].

Aktivace G proteinu receptorem klesá se vzrůstající afinitou α podjednotky k molekule GDP. Účinnost některých agonistů μ -opioidních receptorů klesá právě v důsledku vzrůstající koncentrace GDP a klesající hustotě receptorů (viz dále) [8].



Obr. č. 2: Aktivace a zpětná deaktivace G proteinu. Neaktivní forma G proteinu se naváže na receptor. Následuje vazba GTP místo GDP a α podjednotka s navázaným GTP oddisociuje. Hydrolyza GTP vlastní aktivitou α podjednotky způsobí opětovné navázání podjednotky a reformaci neaktivního stavu G proteinu. (Převzato a upraveno z [7].)

2.4. Receptory spřažené s G proteiny, GPCR

GPCR (G protein coupled receptor) neboli receptory spřažené s G proteiny regulují důležité fyziologické procesy jako neuropřenos a kardiovaskulární funkce. Dysregulace GPCR může vést k patologickým procesům. Je známo, že se tyto receptory účastní mnoha signalizačních drah a proto jsou také velkým zájmem farmaceutického výzkumu [9].

GPCR jsou klasifikovány do více než stovky podrodin podle sekvenční homologie, struktury ligandů a funkce receptoru. Jednotlivé podrodiny se mohou mezi sebou signifikantně lišit. Mezi nejvíce zastoupené podrodiny patří rhodopsinové, kalcitoninové a metabotropní receptory GPCR [10]. Tyto receptory využívají G proteiny jako transduktory přenosu signálu z receptoru na efektorový protein. Mezi efektorové proteiny interagující s G proteiny patří např. adenylycyklasa, fosfolipasa C nebo iontové kanály selektivní pro Ca^{2+} a K^+ [6].

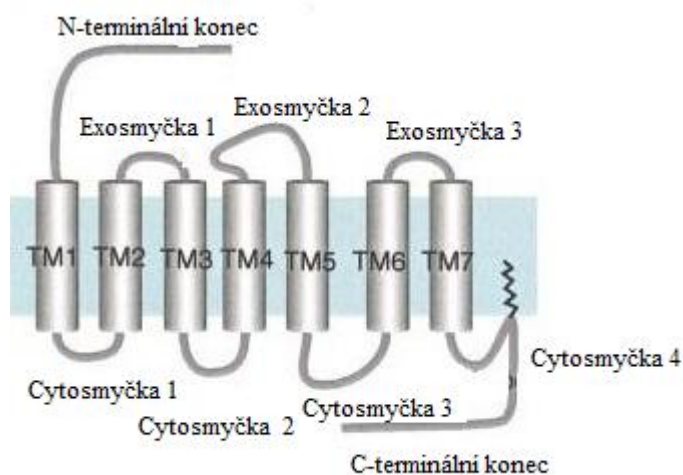
Mutace GPCR byly pozorovány u dědičných nebo somatických onemocnění např. rakoviny nebo neplodnosti. Takto pozměněné receptory ztrácí schopnost vázat ligand nebo vytvářet signál. Na druhou stranu některé mutace mohou mít pozitivní přínos, např. mutace v chemokinovém receptoru CCR5 chrání cílové buňky před virovou infekcí HIV [11]. U β_2 -adrenergických receptorů způsobila cílená mutace v C-terminální části třetí cytoplasmatické smyčky dramatické zvýšení vlivu agonisty na aktivitu receptoru. Tato mutace zvýšila afinitu receptoru k agonistovi, ale ne k antagonistovi [12]. Některé GPCR receptory jsou schopny přenášet signál alternativními signálními molekulami např. Jak2 kinasou, fosfolipasou $\text{C}\gamma$ nebo proteinkinasou C [10].

2.4.1. Struktura GPCR

GPCR receptory se skládají z extracelulárního N-terminálního konce, sedmi α helixů prostupujících membránou a intracelulárního C-terminálního konce. C-terminální konec je palmitoylován na cysteinovém zbytku. Palmitoylace nebo fosforylace na C-terminálním konci hraje úlohu v desenzitizaci a internalizaci receptoru [10]. Domény, které jsou zásadní pro interakci s G proteinem, se lokalizují zejména na třetí a čtvrté cytoplasmatické smyčce a na C-terminálním konci. Analýzy mutací GPCR receptorů poukázaly na důležitou funkci argininových tělísek na helixu TM3 [13]. Přidáním protonu ke kyselé aminokyselině argininu se vytvoří argininová tělíska, která jsou významná

při vazbě receptoru na G protein. Argininová tělíska neinteragují přímo s G proteinem, ale pravděpodobně vyvolají správnou orientaci receptoru ke G proteinu [14].

N-terminální konec může být glykosylován a obsahovat globulární doménu pro vazbu ligandu. Sedm transmembránových helixů je nezbytných pro stabilitu, regulační mechanismy a vazebná místa pro G proteiny nebo jiné signální molekuly. Sedm helixů je propojeno hydrofilními smyčkami. Helixy TM1, TM4 a TM7 jsou hydrofobní. Smyčky prochází membránou proti směru hodinových ručiček a vytváří TM jádro. Stereochemie a geometrická specifita smyček určuje vstup a vazbu ligandu uprostřed kruhového TM jádra GPCR receptoru. Helixy TM1 a TM7 mohou interagovat s dalšími helixy jiných GPCR a vytvářet např. dimery [10]. Obecná struktura GPCR receptoru je znázorněna na Obr. č. 3.



Obr. č. 3: Obecná struktura GPCR (Převzato a upraveno z [10].). GPCR receptor obsahuje sedm transmembránových helixů TM1-7 propojených cytosmyčkami (intracelulární) a exosmyčkami (extracelulární). N-terminální konec se vyskytuje na extracelulární straně membrány, C-terminální konec je orientován na vnitřní straně membrány.

2.4.2. Interakce GPCR s ligandem a G proteinem

Uprostřed TM jádra je vazebné místo pro mediátor, navázáním agonisty dojde ke změně konformace receptorového proteinu a aktivaci G proteinu, G protein dále reaguje s efektorovými proteiny. α podjednotka s navázaným GDP nemá afinitu k efektorovému proteinu. K receptorům spřaženým s G proteiny patří muskarinové acetylcholinové receptory, receptory pro noradrenalin, adrenalin, dopamin, histamin, serotonin, morfin, prostaglandiny, leukotrieny a další. Mezi efektorové proteiny se řadí především adenylcyklasa, fosfolipasa C a proteiny iontových kanálů [15].

Interakce ligandu s receptorem vyžaduje vodíkové vazby, iontové páry a hydrofobní kontakty. Signalizaci lze rozdělit do tří kroků: vznik signálu, transdukce signálu (zprostředkovává G protein) a přenos signálu na cytoplasmatické molekuly [10].

Předpokládá se teorie vzniku ternárního komplexu, která vychází z představy interakce ligandu (agonisty), receptoru a G proteinu. Teorie popisuje agonistu schopného podporovat a stabilizovat vysokoafinitní stav receptoru. GPCR receptor má nízkou afinitu ke G proteinu, po navázání agonisty dojde ke zvýšení afinity mezi GPCR receptorem a G proteinem a k tvorbě ternárního komplexu [12]. Receptory GPCR jsou v rovnováze mezi dvěma stavy (aktivním a neaktivním). Afinita ligandu se posuzuje na základě změny této rovnováhy receptorů. V aktivním stavu receptor aktivuje G protein. Přechod mezi těmito stavy může probíhat i bez agonisty. Agonista má větší afinitu k aktivnímu stavu a inverzní agonista naopak k neaktivnímu stavu. Vazba agonisty je tedy limitována přechody mezi aktivním a neaktivním stavem receptoru [16].

2.4.3. Tvorba dimerů a oligomerů GPCR

Receptory spřažené s G proteiny mohou existovat jako dimery, nebo jako část oligomeru. Mnoho studií naznačilo, že tyto receptory mohou vytvářet heterodimery. Tato dimerizace se pravděpodobně vytváří za určitým účelem. Otázka zní, zda vazba ligandu na receptor ovlivní dimerizaci nebo organizovanost struktury GPCR [17].

U členů rhodopsinové podrodiny bylo odvozeno intradimerové spojení mezi transmembránovými helixy IV a V a nebo organizovaná struktura tvořena interakcemi mezi transmembránovými helixy I a II, pouze příležitostně byl pozorován rhodopsin jako monomer. U metabotropní podrodiny GPCR byla pozorována efektivní signalizace pouze v přítomnosti obou GPCR GABA_BR1 a GABA_BR2 [18].

GPCR se objevují jako dimery již při glykosylaci v endoplasmatickém retikulu. Dimerizace by tedy mohla mít významný vliv na GPCR při dozrávání, v produkci a funkci receptorů [17]. Nejasná je úloha dimerizace GPCR v aktivaci receptoru. U δ -opioidních receptorů se tvoří dimery, ale jejich vznik je závislý na vazbě příslušného agonisty. Studie na buňkách CHO [19] ukazují, že dimerizace δ -opioidních receptorů nehraje základní roli v aktivaci receptoru a G proteinu. Dimerizace bude mít pravděpodobně jinou úlohu ve funkci receptoru, např. jeho specifickou regulaci. V každém případě dimerizace δ -opioidních receptorů vyžaduje intaktní C-terminální konec receptoru. δ -opioidní receptory se tedy patrně vyskytují jako monomery i jako dimery [19]. Některé studie [20] poukazují na to, že vysoká afinita GPCR ke G proteinu a efektivní přenos signálu touto cestou by mohl vyžadovat tvorbu dimerů u adrenergických receptorů [17].

2.4.4. Desenzitizace GPCR

β -arrestin se vyskytuje ve dvou izoformách β -arrestin1 a β -arrestin2. Tento protein hraje stěžejní roli v desenzitizaci a internalizaci receptorů GPCR, viz níže. Vyřazením obou genů pro β -arrestin1 a 2 vyvolalo u myši letalitu již v embryonálním stádiu. Studie, kdy byl vyřazen pouze gen pro β -arrestin2 vykazovaly prodloužený a zesilující analgetický účinek morfinu skrz snížení desenzitizace μ -opioidních receptorů [21]. β -arrestin1 a β -arrestin2 mají 78 procentní identickou strukturu. β -arrestin1 je fosforylován na serinu. Stimulace isoprenalinem vede k rychlé defosforylaci a následné interakci s klatrinem. β -arrestin2 je fosforylován na threoninovém zbytku. Mutace na serinovém nebo threoninovém zbytku na β -arrestin1 nebo 2 nemění jejich vlastnosti v interakci a desenzitizaci receptorů. Další studium a identifikace fosfatas zapojených do těchto procesů by mohla objasnit molekulární mechanismus β -arrestinů a internalizaci zprostředkovanou klatrinovými váčky [22].

Receptory β -adrenergní, α -adrenergní, μ -opioidní receptory, dále endotelinové a dopaminové receptory vykazují vyšší afinitu k β -arrestin2 v porovnání s β -arrestinem1. Vazba výše uvedených receptorů s β -arrestinem je však přechodná a po endocytóze do klatrinových váček β -arrestin oddisociuje. Tyto receptory se řadí do skupiny A. Druhý typ receptorů internalizuje společně s β -arrestinem a řadí se do skupiny B [22]. Internalizované receptory bez β -arrestinu mají tendenci rychlé resenzitizace, recyklace a navrácení do plasmatické membrány. Na rozdíl od receptorů internalizovaných s β -

arrestinem, u kterých resenzitizace probíhá neefektivně a pomalu, nebo nejsou receptory recyklovány [23, 24].

Desenzitizace, neboli slábnutí odpovědi vlivem trvalé stimulace receptoru, je důležitým procesem. Při dlouhodobé stimulaci receptoru agonistou dochází k fosforylaci receptorového proteinu, který tímto ztrácí schopnost aktivovat G protein. Fosforylace přímo mění konformaci receptoru a jeho interakci s G proteinem. Desenzitizace je považována za protiklad aktivace receptorů, protože tlumí signalizaci receptorů. Kinyasy PKA a PKC, GRKs a arrestiny jsou stimulovány druhými posly a patří mezi signalizační molekuly účastníci se desenzitizace. Stimulant zvýší hladinu cAMP, který vyvolá fosforylaci a desenzitizaci GPCR přítomnými PKA a/ nebo PKC (desenzitizace heterologní). Proteinkinasy A a C mohou fosforylovat protein i bez přítomnosti agonisty. Pokud je receptor obsazen agonistou, je fosforylován kinasou pro receptor spřažený s G proteinem (GRK). Následně se váže protein β -arrestin, který zabrání aktivaci G proteinu a vyvolá rozpřažení heterotrimerního G proteinu a receptoru. Tento druh desenzitizace je tzv. homologní. Desenzitizace je vratný proces [25]. Proteinkinasa A má pravděpodobně dvě vazebná místa: na třetí cytosolární smyčce a na C-terminálním konci. Patrně existuje rozdíl mezi těmito vazebnými místy z pohledu funkce. Místo na třetí cytosolární smyčce je potřebné k vyvolání desenzitizace [26].

2.4.5. Internalizace GPCR

GPCR mají schopnost endocytózy (také nazýváno internalizací nebo sekvestrací) [25]. Tyto procesy využívají vezikuly s klatrinovým pláštěm nebo vezikuly bez pláště anebo caveoly [27]. Endocytóza vyvolaná působením agonisty vyžaduje intaktní C-terminální konec receptoru [19]. Druhá a třetí smyčka a C-terminální konec receptoru pravděpodobně interagují s COOH koncem α podjednotky G proteinu, který má uspořádanou specifickou aminokyselinovou sekvenci. Předpokládá se, že $\beta\gamma$ podjednotka také bude interagovat s receptorem [13].

Internalizace přispívá k desenzitizaci receptorů. Internalizovaný receptor se může degradovat v lysozomech [25]. β -arrestin a fosforylace prostřednictvím GRK podporují sekvestraci. β -arrestin se váže přímo, stechiometricky a s vysokou afinitou k váčkům s klatrinovým pláštěm a podporuje tak endocytózu GPCR [28]. Cytoplasmatický β -arrestin1 je konstitutivně fosforylován, v plasmatické membráně je rychle defosforylován

a účastní se procesu internalizace. Přenos β -arrestinu do plasmatické membrány je podporován prostřednictvím vazby agonisty na receptor. Zpětně je β -arrestin1 následně refosforylován [29].

Ve studii Sibley a kol. (1986) předpokládají, že internalizace β_2 -adrenergního receptoru je způsobena fosforylací tohoto receptoru. Po stimulaci agonisty jsou receptory internalizovány do váčků, kde dojde k defosforylaci a tudíž obsahují méně fosfátu, než v plasmatických membránách. Váčky byly také bohaté na fosfátovou aktivitu schopnou defosforylovat tyto receptory. Takto defosforylované adrenergní receptory se mohou navrátit do plasmatické membrány [30]. U intaktních buněk probíhala defosforylace receptorů pouze po konformační změně, která byla indukovaná nízkým pH. Nízké pH je právě v sekvestrovaných vezikulách, které vznikají při internalizaci receptoru po vazbě agonisty [25].

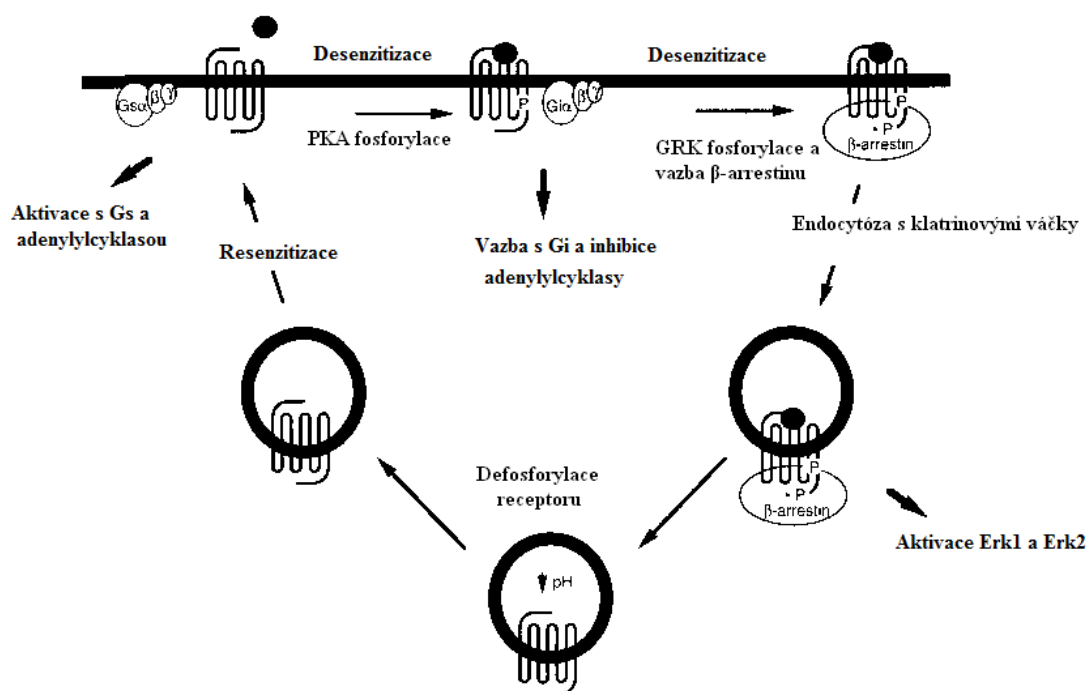
Mezi potenciální inhibitory, které mechanicky brání internalizaci do klatrinových váčků, patří konkavalin A, hypertonická sacharosa, nedostatek vnitrobuněčného draslíku nebo nízká teplota [31].

Kinasa GRK katalyzuje fosforylaci receptoru a následuje vazba β -arrestinu, která iniciuje internalizaci pomocí vezikul s klatrinovým pláštěm. Tyto pochody aktivují MAP kinasy (proteinové kinasy aktivované mitogenem) jako je Erk1 a Erk2 (rodina kinas regulující extracelulární signál), které hrají důležitou roli v mitogenetické signalizaci. MAP kinasy se mohou účastnit i tumorogeneze. Tyto signalizační cesty vyvolají aktivaci drah spojených s proteinem Ras [32].

Malé G proteiny jsou malé monomerní G proteiny vázající GTP. Dělí se na pět podrodin: podrodina Ras GTPasy, Rho GTPasy, Arf GTPasy, Rab GTPasy a Ran GTPasy [33]. Některé malé G proteiny se účastní signalizace receptorů GPCR, zejména jejich endocytózy (např. Arf nebo Rab). Rab GTPasy regulují endocytózu, recyklaci receptorů, nebo jejich transport do lysozomů. Rab GTPasy interagují s C-terminálním koncem GPCR [34].

Na Obr. č. 4 (str. 24) jsou znázorněny jednotlivé procesy popsané výše v textu. Je zřejmé, že GRK kinasy a β -arrestin hrají důležitou roli v signalizaci desenzitizace GPCR a ovlivňují internalizaci. K desenzitizaci dochází pomocí kovalentní modifikace receptoru neboli fosforylaci receptorů, jak již bylo popsáno výše. Dalším účinným snížením počtu

receptorů (z angl. převzato „down-regulace“) je odtržení kooperujících jednotek. K průběhu internalizace napomáhá i shlukování se receptorů na membráně [6].



Obr. č. 4: Desenzitizace, internalizace a resenzitizace β_2 -adrenergního receptoru. (Převzato a upraveno z [25].)

2.5. Opioidní receptory

Opioidní receptory jsou klasifikovány jako receptory spřažené s G proteiny rodiny rhodopsinové. Tyto receptory mohou být aktivovány endogenními látkami (např. endorfíny, enkefaliny, dynorfíny a endomorfíny 1 a 2 [35]) tak i exogenními látkami (např. opiáty). Výzkum prokázal existenci tří genů kódujících tři typy opioidních receptorů, δ -OR, μ -OR a κ -OR [36, 37, 38, 39]. Tyto opioidní receptory mají homologní sekvence shodné asi ze 70 % [40]. U pokusných myši, které měly vypnutý gen pro μ -OR, nebyl pozorován fyziologický efekt morfinu. Takto upravené myši jednoznačně demonstrovaly,

že μ -opioidní receptory fungují jako zprostředkovatele terapeutických, ale i vedlejších účinků (např. závislosti) morfinu a dalších opioidů. Fyziologické působení morfinu je tedy umožněno především prostřednictvím μ -OR [41]. Experimenty založené na homologní rekombinaci a vytvoření odlišných myší s různě vypnutými geny pro opioidní receptory ukazují, že u takto upravených myší se systém adaptoval na příslušnou absenci genu nebo genů. Absence genů neovlivnila expresi ligandů [42]. Každý z opioidních receptorů zastává důležitou funkci. MOR receptory jsou základní pro působení morfinu a spouští řadu mechanismů důležitých pro rozvoj závislosti na opioidech a analgezi [42]. Při dlouhodobém podávání morfia se u pacientů objeví tzv. hyperalgezie, tedy paradoxně zvýšená citlivost k bolestivým podnětům [43]. KOR a DOR receptory zprostředkovávají dysforické a analgetické účinky působením agonistů. DOR pravděpodobně zesilují své účinky prostřednictvím MOR receptorů. Na druhou stranu KOR receptory se zdají být nezávislé na zbylých dvou opioidních receptorech [42].

Existuje vztah mezi množstvím receptorů a aktivací G proteinu. Rozsah stimulovaného G proteinu agonistou byl úměrný hustotě receptorů v membránovém preparátu kortexu a thalamu opice. Kortex a thalamus hrají hlavní úlohu v signalizačních drahách vyvolávající bolest. Podle klesající maximální vazebné kapacity lze opioidní receptory v kortexu mozku opice seřadit takto: KOR > MOR > DOR a dle klesající maximální vazebné kapacity v thalamu takto: MOR > KOR > DOR. Z výsledků studie vyplývá, že množství jednotlivých opioidních receptorů závisí na oblasti CNS opice [44].

Přítomnost sodných iontů snižuje maximální vazebnou kapacitu B_{\max} u opioidních receptorů. Např. ve studii Emmersona a kol., 1994 byla vazba DPDPE ovlivněna sodnými ionty méně než vazba agonistů MOR receptorů. Sodné ionty ovlivňují hodnoty disociační konstanty K_d a maximální vazebné kapacity B_{\max} s klesajícím účinkem MOR > DOR > KOR [45].

2.5.1. Mechanismus účinku opioidních receptorů

Opioidní receptory indukují vzrůst aktivity G proteinů typu G_i/ G_o a inhibují adenylcyklasu v krátkodobém měřítku. Z dlouhodobého pohledu by mohlo docházet k nárůstu této aktivity [46]. Adenylcyklasa je tedy regulována trimerními G proteiny. Jakékoliv signifikantní změně adenylcyklasy by mohla předcházet změna v aktivitě trimerního G proteinu [47]. Ve studii Ujčíková a kol. (2011) byl prokázán nárůst izoforem

adenylylcyklasy ACI a ACII po desetidenním podávání morfinu potkanům. Ostatní izoformy a ukazatelé plasmatických membrán byly nezměněny. Takový nárůst adenylylcyklasy ACI a ACII je pravděpodobně výsledkem dlouhodobého působení morfinu na organismus, protože nárůst těchto izoform se neprojevil u potkanů po podání jednorázové dávky. Po 20 dnech po poslední dávce hladiny ACI a ACII opět klesly, to vypovídá o reversibilní adaptaci organismu na morfin. Nárůst dvou izoform adenylylcyklasy je patrně kompenzačním mechanismem u dlouhodobého působení morfinu [47]. Kromě nárůstu množství adenylylcyklasy byl také pozorován nárůst proteinkinasy A a fosfoproteinů po dlouhodobém působení morfinu [48].

Existují dvě hypotézy popisující mechanismus účinku opioidních receptorů spřažených s G proteiny. Podle homeostatické teorie droga naruší buněčnou homeostázu a to aktivuje syntézu nových signalizačních drah, které působí opačným efektem a homeostázu opět obnoví. Druhá teorie se zabývá primární interakcí drogy s receptorem a specifikuje fenomén desenzitizace na úrovni receptorů. Schopnost receptoru přenášet signál klesá s jeho deaktivací, a tudíž jsou receptory méně citlivé. Tyto dvě hypotézy spolu pravděpodobně korelují. Dlouhodobé nebo opakované stimulování cílové buňky nebo tkáně agonistou pro receptory spřažené s G proteiny indukuje desenzitizaci hormonální odpovědi, která je kompenzována dlouhodobým vzrůstem určitých makromolekul [46]. Opioidy indukují adaptaci opioidních receptorů již zmíněnou desenzitizací a internalizací. Tato receptorová adaptace je regulována agonisty [49].

Agonisty receptorů se mohou lišit podle velikosti disociační konstanty K_d (afinita receptoru) a maximálního počtu vazebných míst B_{max} . Plný agonista vykazuje nízkou disociační konstantu a vysokou maximální vazebnou kapacitu. Částečný agonista má vysokou disociační konstantu a nízkou maximální vazebnou kapacitu a smíšený agonista vykazuje nízké hodnoty jak disociační konstanty, tak i maximální vazebné kapacity. Např. morfin se chová jako plný agonista v experimentech na buňkách a jako částečný agonista v thalamu potkana. Pravděpodobné vysvětlení snížení účinku agonisty je menší množství receptorů v thalamu potkana [50].

2.5.2. Desenzitizace, internalizace a tvorba dimerů u opioidních receptorů

Opioidní receptory podléhají desenzitizaci a rozpražení G proteinu a receptoru jak již bylo popsáno výše u GPCR receptorů. Dalším významným dějem je internalizace a následná resenzitizace nebo degradace. Desenzitizace a internalizace se podílí u opioidních receptorů na fyziologické toleranci a redukci receptorů přítomných na membráně. Potenciální regulace desenzitizace a internalizace by mohla vést k potlačení nepříznivých účinků morfinu. Zejména endocytóza MOR receptorů by mohla redukovat rozvoj tolerance. Agonista, který podporuje endocytózu, snižuje tendenci vytvářet toleranci a závislost. Na druhou stranu tolerance může být výsledkem desenzitizace a „down-regulace“ [51]. Velká schopnost internalizace souvisí s afinitou k β -arrestinu a naopak nízká míra endocytózy je indikátorem aktivace G proteinu. Například fentanyl vyvolává internalizaci, ale morfin působí nízkou mírou endocytózu. Podání morfinu i fentanylu současně se však zvýší účinek internalizace i antinociceptivní účinek. Rozvoj fyzické závislosti by mohl být touto kombinací opioidů potlačen [52].

Dimerizace receptorů byla pozorována i u opioidních receptorů, zmíněno již výše. Jordan a kolektiv sledovali tvorbu heteromerů mezi β_2 -adrenergními a δ - a κ -opioidními receptory. DOR s β_2 -adrenergními receptory společně vyvolaly silnější endocytózu, ale u heteromerů s KOR endocytóza pozorovaná nebyla. Dimerizace opioidních receptorů s adrenergním receptorem nemá vliv na vazbu ligandu nebo signalizaci receptoru, ale ovlivňuje internalizaci a resenzitizaci receptoru [53]. Opioidní receptory mohou vytvářet nejen dimery, ale i oligomery. MOR mohou oligomerizovat mezi sebou, nebo s ostatními GPCR včetně kanabinoidních receptorů a jiných opioidních receptorů [54]. Heterooligomerizace pravděpodobně změní konformaci receptoru MOR. Změna konformace pak způsobí vyšší afinitu receptoru k substrátu a desenzitizaci vyvolanou kinasami a arrestiny [55].

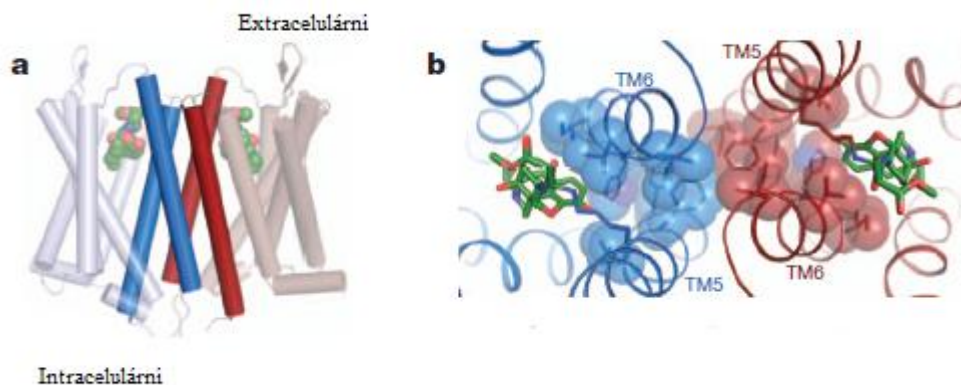
Zajímavou studií jsou experimenty Pfeiffer a kol., kteří zkoumali vznik heterodimeru MOR-NK1 a změny vyvolané působením tohoto heterodimeru. Receptory MOR (inhibitor cAMP přes G_i proteiny) a NK1 (stimulant inositoltrifosfátu přes G proteiny G_q) jsou vysoce exprimovány při depresi, úzkosti a stresu, ale hrají také roli v motivaci ke zneužití drogy. Po působení ligandů DAMGO nebo SP (selektivní substance ligandu vázající se na receptor NK1) byl heterodimer MOR-NK1 kointernalizován

do stejných vezikul. MOR patří do skupiny A receptorů GPCR, jenž mají větší afinitu k β -arrestinu2 a do vezikul se internalizují bez β -arrestinu. Jejich resenzitizace je tak rychlejší. NK1 receptory se řadí do skupiny B, kde se internalizují do vezikul společně s β -arrestinem. Skupina B má stejnou afinitu k β -arrestin1 i 2. Pokud vznikne heterodimer MOR-NK1, receptory MOR se „přepnou“ do skupiny B a heterodimer se internalizuje společně a resenzitizace se zpomalí [56].

2.5.3. μ -opioidní receptory, MOR

MOR jsou členy $G_{i/o}$ rodiny GPCR opioidních receptorů. Pokud jsou MOR aktivovány např. endogenními agonisty, dochází ke katalytické nukleotidové výměně na G_i a G_o . Tato katalýza vede k inhibici adenylylcyklasy, neuronální hyperpolarizaci pomocí aktivace kanálků pro ionty K^+ a uzavření Ca^{2+} kanálků [55]. Signalizace zprostředkovaná G_i proteinem je zodpovědná za analgetický účinek [57].

Určení struktury μ -opioidních receptorů bylo provedeno krystalizací v přítomnosti antagonisty β -funaltrexaminu. MOR tvoří nejspíše dimery nebo také oligomery a to prostřednictvím helixů TM5 a TM6. (viz Obr. 5) Předpokládá se že i DOR by mohly vytvářet heterodimery s MOR prostřednictvím TM5 a TM6 [58].



Obr. č. 5: Struktura vzniku homodimerů mezi MOR receptory prostřednictvím helixů TM5 a TM6. a) struktura TM5 a TM6 (čtyři helixy) interagující mezi sebou. b) náhled z extracelulárního prostoru, kapsa pro navázání ligandu (ligand - zelená molekula), ligand může přímo nebo nepřímo ovlivňovat formování dimeru. (Převzato z [58].)

Různé opioidní ligandy indukují různou odpověď s rozdílnou rychlostí. Morfin neindukuje rychlou internalizaci opioidních receptorů [19]. Vazba agonisty DAMGO na μ -opioidní receptory vyvolala masivní endocytózu těchto receptorů na rozdíl od vazby morfinu, kde endocytóza byla minimální. Pokud bylo přidáno malé množství DAMGO k morfinu, objevila se také enormní endocytóza. Tyto výsledky byly získané jak na buňkách, tak i na potkanech. DAMGO a morfin rozdílně regulují signalizaci receptorů MOR. I když morfin nevyvolává příliš viditelnou endocytózu, podáním současně s agonistou DAMGO dochází k nárůstu endocytózy. Pravděpodobně dochází ke změně poměru relativní aktivity ligandu k receptoru a iniciaci internalizace. Potkani, kterým byl podáván morfin i DAMGO, si nevytvořili žádnou toleranci na morfin během sedmidenního experimentu [51]. Výsledky studie He a kol. také poukázaly na možný vznik homodimerů a oligomerů receptorů MOR [51]. Na druhou stranu není prokázáno, že u člověka bude agonista s vysokou účinností endocytózy vyvolávat nižší toleranci, než agonista s nízkým účinkem endocytózy. Např. ve studii Sittl a kol. byl pacientům podáván fentanyl (vysoká účinnost, průměrně indukující internalizaci) a nebo buprenorphine (nízká účinnost, nevyvolávající internalizaci) a fentanyl inicioval větší toleranci oproti buprenorphinu. Proto není zcela objasněn účinek internalizace související s rozvíjející se tolerancí [59]. Chronická aktivace MOR receptorů způsobí vzrůstající schopnost morfinu indukovat endocytózu MOR receptorů, která je vyvolána pravděpodobně pomocí proteinu dynaminu. Dynamin se účastní signalizačních drah v internalizaci [43].

Regulace MOR receptorů je analogická regulaci β_2 -adrenergním receptorům. Také dochází k fosforylaci MOR receptorů GRK2 kinasou [60], která zvyšuje afinitu β -arrestinu2 k receptorům. Přednostně se pak váže β -arrestin2 a dochází k endocytóze, recyklaci a resenzitizaci receptorů [61]. Studie Bohna a spolupracovníků [62, 63] na myších s vypnutým genem pro β -arrestin2 potvrdila větší antinociceptivní účinek morfinu a receptory MOR byly rezistentní vůči desenzitizaci. V experimentu Termana a kol. použili myši s vypnutým genem pro GRK3 kinasu, a zjistili, že tolerance na fentanyl byla sice snížena, ovšem tolerance na morfin byla nezměněna [64]. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že regulace MOR receptorů závisí především na proteinu β -arrestinu2. Walwyn a kolegové v roce 2007 prokázali, že desenzitizace indukovaná DAMGO může být vyvolána i bez přítomnosti β -arrestinu a to inhibicí pomocí kalciových

kanálků [65]. MAP kinasy Erk 1/2 se také mohou podílet na desenzitizaci MOR receptorů. A pravděpodobně i proteinkinasa C [66].

Výše popsané výsledky experimentů jsou ovšem rozporuplné. Na jednu stranu blokáce β -arrestinu2 interagujícího s MOR receptory inhibuje toleranci na morfin. Na druhou stranu cílená manipulace zesílení endocytózy MOR receptorů oslabuje rozvoj morfinové tolerance [66]. Berger a Whistler přišli s možnými vysvětleními tohoto problému. Jedna interpretace předpokládá, že silná internalizace způsobená agonistou vyvolá menší toleranci, neboť endocytóza podporuje defosforylaci MOR receptorů v endozomech a resenzitizaci těchto receptorů a jejich navrácení do membrány. Protože morfin indukuje internalizaci MOR receptorů slabě, tyto receptory se akumulují v membráně a vyvolávají toleranci. Druhá interpretace předpokládá persistentní signalizaci působením morfinu, která přispívá k sekundární adaptaci. Toto přizpůsobení souvisí s tolerancí a s rozvíjející se fyzickou závislostí. Endocytóza poté přerušuje takovou adaptaci a toleranci [55].

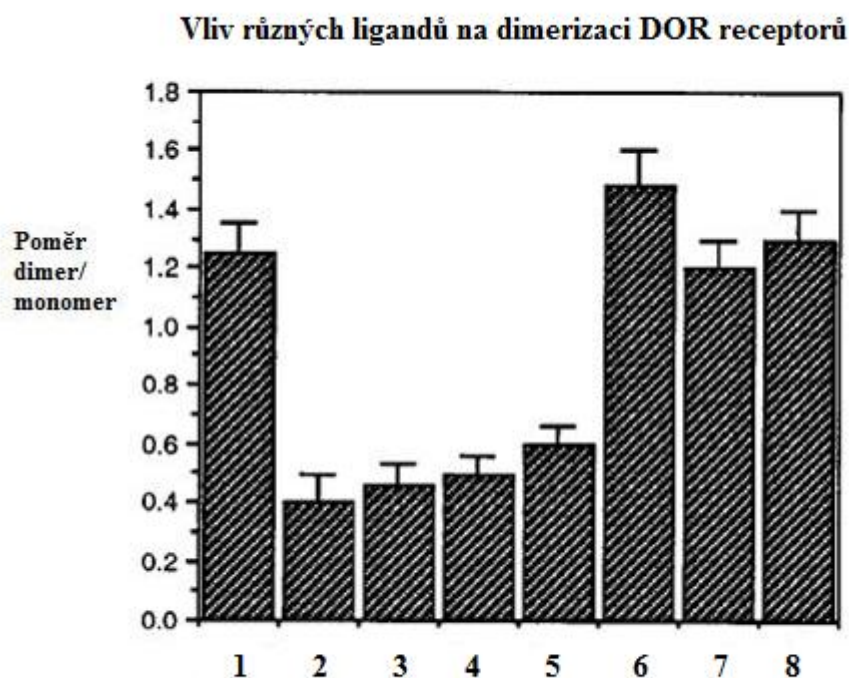
2.5.4. δ -opioidní receptory, DOR

DOR neboli δ -opioidní receptory jsou dalšími členy ze skupiny opioidních receptorů. Struktura δ -opioidních receptorů byla zjištěna krystalizací s antagonistou naltrindolem. Navzdory různorodosti ligandů, všechny exogenní ligandy vykazují stejně zachované určité rysy. Zejména fenolový hydroxyl, který je v těsné blízkosti pozitivního náboje. Tato struktura napodobuje amino-terminální tyrosin u všech endogenních opioidních peptidů [40]. Vazba naltrindolu v krystalové struktuře byla nekovalentní. Vazebné místo, tzv. kapsu receptoru, lze rozdělit na dvě rozdílné části. Nižší část této kapsy je vysoce konzervovaná mezi opioidními receptory. Vyšší část kapsy obsahuje rozdílné zbytky, které poskytují selektivitu. Spodní část kapsy u δ -opioidních receptorů dokáže rozpoznat jádro morfinových sloučenin. Horní část kapsy je odlišná u různých podtypů a bohatá na selektivní determinanty [40].

δ -opioidní receptory mohou tvořit monomery i dimery, jak již bylo uvedeno výše. Studie však odhalily, že při vazbě agonisty DADLE klesá počet dimerů a naopak stoupá množství monomerů. Na rozdíl od agonisty μ -opioidních receptorů DAMGO, který nezměnil poměr monomerů a dimerů δ -opioidních receptorů. Morfin jako agonista také

neměl vliv na změnu poměru dimerů a monomerů. Znázornění ovlivnění dimerů různými agonisty a antagonisty na δ -opioidní receptory je zobrazeno na Obr. č. 6 [19].

Maximální počet vazebných míst u agonisty DOR receptorů DPDPE byl 2,1 krát vyšší u plasmatických membrán izolovaných z kortexů potkanů, kterým byl podáván morfin, oproti vzorkům kontrolních potkanů. Tyto vazby nebyly ovlivněny sodnými ionty, i když mnoho GPCR receptorů je inhibováno v prostředí NaCl. Tato ztráta inhibice v prostředí NaCl je pravděpodobně způsobena narušením rovnováhy mezi aktivními a neaktivními formami molekul receptorů [47].



Obr. č. 6: Vliv agonistů a antagonistů na výskyt dimerů DOR receptorů. CHO buňky s δ -opioidními receptory byly vystaveny působení 10 minut s různými agonisty a antagonisty. Zastoupení dimer/monomer bylo stanoveno z lyzátů buněk pomocí elektroforézy v prostředí SDS a následného elektropřenosu proteinů („Western blot“). 1-žádný ligand; 2-DADLE; 3-DSLET; 4-DPDPE; 5-Etorfin; 6-Morfin; 7-DAMGO; 8-Naloxon. (Převzato a upraveno z [19].)

2.5.5. κ -opioidní receptory, KOR

KOR jsou třetí opioidní receptory, které zprostředkovávají zejména dysforii a analgezi viz výše. Na tyto opioidní receptory se vážou především endogenní opioidy dynorfiny. Několik částečně selektivních agonistů a antagonistů bylo objeveno jako potenciální antidepressiva, anxiolytika a léky proti závislosti [67]. Vysoce zneužívaný halucinogen Salvinorin A byl také určen jako selektivní agonista KOR [68]. Bohužel u mnoha KOR agonistů a antagonistů nebyly dostatečně charakterizovány jejich farmakologické vlastnosti či specifita [67]. Krystalografická data studie struktury KOR předpokládá vznik dimerů KOR. A to propojením přes helixy I, II a VII [69].

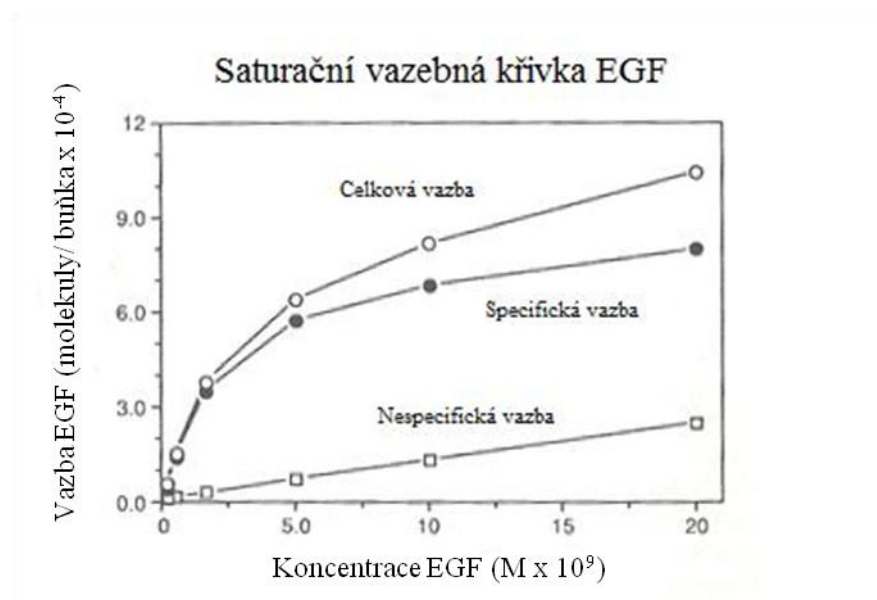
Endogenní opioidy hrají určitou roli v ovlivňování nálad. Exogenní opioidy (např. morfin) ovlivňují aktivaci dopaminového systému. KOR receptory se jeví zajímavým farmaceutickým cílem. Například antagonist KOR receptorů by mohl být užitečným v léčbě depresí, agonista KOR receptorů v léčbě bipolárních poruch a mánií a částečný agonista by se mohl využívat ke stabilizaci nálad. Pravděpodobně hlavním mechanismem ovlivňování nálad je schopnost opioidních receptorů stimulovat inhibiční G proteiny [67]. Závěrem lze říci, že KOR receptory by mohly nalézt využití jako farmaceutický cíl v léčbě různých psychických poruch. Z pohledu závislosti a tolerance vlivem morfinu jsou hlavními receptory zejména DOR a MOR.

2.6. Studium vazby receptor – ligand

Pokud studujeme receptory v izolovaných frakcích plasmatických membrán, můžeme kvantitativně stanovit celkový počet receptorů v daném preparátu a jejich množství vztaženo na mg bílkoviny. Populární experimentální metodou pro stanovení vazby receptor – ligand je vazba radioaktivně značeného ligandu [6]. Saturačním vazebným stanovením změříme množství navázaného radioligandu po dosažení rovnováhy v závislosti na měnící se koncentraci radioligandu. Při jednobodovém stanovení sledujeme množství vazebných míst v preparátu při jedné koncentraci radioligandu. Pro kvantitativní studie se určuje specifická vazba ligandu, která vyjadřuje schopnost vázat se na receptory a afinitu látek k receptorům. Radioaktivně značený ligand soutěží s neznačeným ligandem o aktivní místo na receptoru. Nespecifická vazba je stanovena neznačeným ligandem a je lineární funkcí celkové vazby. Celková vazba je součtem specifické vazby radioligandu

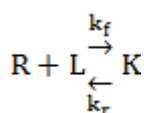
na receptor a nespécifické vazby neznačeného ligandu viz Obr. č. 7. Předpokládá se, že nespécifická vazba je reverzibilní a není satureována [7].

Příprava vzorku v inkubačním médiu a přidání radioligandu se provádí optimálně kolem 4°C, aby se zabránilo signalizaci a internalizaci receptorů a předešlo se degradaci biologického materiálu a struktur. Poté se teplota zvedne na fyziologickou teplotu 37°C nebo na 30°C pouze na určitou dobu, aby mohlo dojít k navázání ligandu [7]. Vazebný pokus je ukončen filtrací a promytí vzorků ledově vychlazeným pufrém. Docílí se tak oddělení vázané a volné radioaktivity. Metoda stanovení specifické vazby radioaktivně značeného ligandu nám tak stanoví vazebnou kapacitu, neboli maximální počet vazebných míst v biologickém preparátu a také afinitu ligandů k receptorům.



Obr. č. 7.: Vazba ligandu. Celková vazba je součet specifické a nespécifické vazby. Tato data pocházejí z vazby epidermálního růstového faktoru (EGF) v myši. (Převzato z [7].)

Schéma rovnováhy, která platí pro reverzibilní reakci mezi volným receptorem, volným ligandem a komplexem ligand-receptor lze zapsat takto:



Kde k_f je konstanta asociace a k_r je konstanta disociace. Chemickou rovnováhu lze vyjádřit rovnovážnou disociační konstantou $K_d = k_r/k_f$. Hodnota rovnovážné disociační konstanty se pro různé systémy pohybuje v rozmezí 10^{-12} M – 10^{-6} M. Čím je rovnovážná disociační konstanta nižší, tím má ligand k receptoru větší afinitu [7]. Rovnovážná disociační konstanta je rovna koncentraci agonisty, při níž jsou receptory právě z poloviny obsazeny. Afinita je pak definována jako $-\log(K_d) = \log(1/K_d)$ [6].

Vazba ligandu na receptor bývá proces většinou exotermický, tzn. $\Delta H^\circ < 0$ a je řízen zpravidla pozitivní změnou entropie $\Delta S^\circ > 0$. Vlastnosti vazby ligandu na receptor mohou být silně ovlivněny pH a přítomností iontů (např. divalentními ionty jako Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+}) [7].

Existují dvě základní grafické znázornění saturačního vazebného experimentu. První způsob grafického znázornění vazby značeného radioligandu v receptorech je přímé fitování experimentálních dat pomocí počítačového programu. Saturační vazebná křivka nám poskytne informaci o hustotě receptorů, afinitě a selektivitě ligandů. Asymptotou k hyperbolické saturační křivce je hodnota B_{\max} . Vazba ligandu na receptor je prakticky analogická rovnici Michaelise – Mentenové [70].

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

B nám značí koncentraci navázaného radioligandu, B_{\max} vyjadřuje maximální počet vazebných míst neboli vazebnou kapacitu a F je koncentrace volného radioligandu. Množství navázaného radioligandu v jakémkoliv čase je dáno pouze počtem receptorů, množstvím přidaného radioligandu a afinitou daného radioligandu k receptoru [70]. Druhý způsob grafického zobrazení vazby radioligandu v receptorech je Scatchardův výnos. Tento výnos je lineární transformací dat získaných z vazebného experimentu [7].

$$B = \frac{B_{\max} \cdot [F]}{[F] + K_d} \quad \text{úpravou dostaneme:} \quad \frac{B}{[F]} = \frac{B_{\max}}{K_d} - \frac{B}{K_d}$$

Vzniklá přímka má směrnici $(-1/K_d)$, ze které získáme disociační konstantu. B_{\max} je vyjádřena jako průsečík s osou x [6].

3. Cíle práce

1. Stanovení čistoty postnukleárního supernatantu a plasmatických membrán izolovaných z kortexu potkana.
2. Studium vazby agonisty na μ -opioidní receptory ve frakcích izolovaných z kortexu potkana. Detekce a analýza množství receptorů v jednotlivých frakcích.
3. Studium vazby agonisty na δ -opioidní receptory v plasmatických membránách izolovaných z kortexu potkana.
4. Studium vazby agonisty na κ -opioidní receptory v plasmatických membránách získaných z kortexu potkana.
5. Imunodetekce δ - , μ -, κ -opioidních receptorů.

Protože μ -opioidní receptory hrají zásadní roli ve fyziologických účincích morfinu (analgezie, tolerance, fyzická závislost) na organismus, je jim v této práci věnována největší pozornost. Detekce vazby agonisty μ -opioidních receptorů v jednotlivých frakcích získaných během izolace plasmatických membrán byla provedena s cílem zjistit úspěšnost metody izolace a zanalyzovat jednotlivé frakce z pohledu velikosti vazby. Dalším cílem bylo studium vazby agonisty na μ -opioidní receptory v plasmatických membránách kortexu potkana v beziontovém prostředí a potenciální ovlivnění této vazby v přítomnosti iontů. Pro úplný náhled fyziologických změn opioidních receptorů v kortexu potkana byly následující cíle práce zaměřeny také na studium vazby agonistů na δ - i κ -opioidní receptory.

4. Praktická část

4.1. Materiál a metody

4.1.1. Materiál

Chemikálie

- [³H]ouabain, Perkin-Elmer, specifická radioaktivita 30 Ci/ mmol
- [³H]DPDPE, Perkin-Elmer, specifická radioaktivita 45 Ci/ mmol
- [³H]DAMGO, American Radiolabeled chemicals ARC, specifická aktivita 50 Ci/ mmol
- [³H]U-69593, GE Healthcare Amersham, specifická aktivita 63 Ci/ mmol
- Ouabain, Sigma
- DPDPE TOCRIS, Bioscience
- naloxon, Sigma
- U-69593, Sigma
- Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth
- Standard BSA, Sigma
- Inkubační médium (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM NaH₂PO₄, pH = 7,4)
- Promývací pufr (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4)
- Percoll®, Sigma
- Folin-Ciocalteu fenolové činidlo, Sigma
- Tris-HCl, STEM, EDTA, TE, TME, PMSF, Na₂CO₃, NaOH, vinan sodno-draselný, CuSO₄, Sigma a Fluka
- tableta complete (koktail inhibitorů proteas), Rocher Diagnostic
- Ethanol, Sigma
- 1 M NaCl, 25 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂
- Standard SDS7B2 (26,6 – 180 kDa), Sigma
- Gely Invitrogen NuPAGE® Novex 4-12% Bis- Tris Gel 1.0 mm, 10 well (invitrogen, NP0321BOX)
- Vzorový pufr 4x: 2,4 ml 1M Tris-HCl, 1 ml glycerolu, 0,8 g SDS, 0,4 ml merkptoethanolu, 1 mg bromfenolové modři, doplnit vodou do 10 ml
- Antioxidant NuPAGE® NP0005, Invitrogen

- MOPS SDS Running pufr 1x: 5,23 g MOPS, 3,03 g Tris, 0,5 g SDS, 0,15 g EDTA, doplnit sterilní deionizovanou vodou na 1000 ml, pH 7,7
- Laemmliho pufr 4x: 2,4 ml 1 M Tris- HCl, pH 6,8, 1 ml glycerolu, 0,8 g SDS, 0,8 g DDT, 1 mg bromfenolové modři, 10 ml deionizované vody, pH 6,8
- Přenosový TGM pufr 4x: 15 g Tris, 14,4 g glycinu, 72 g SDS, 1000 ml methanolu, doplnit destil. vodou do 5000 ml
- Blokovací pufr: 2,5 g sušeného mléka, 50 ml TBS 1x, 50 µl Tween 20,
- Ředící pufr: 0,5 g sušeného mléka, 50 ml TBS 1x, 50 µl Tween 20,
- Promývací pufr: 600 µl Tween 20, 200 ml ředěného TBS pufru 1x
- Nitrocelulóková membrána: Whatman Protran BA 83 (26 02 02495, Koneko)
- Primární protilátka: DOR-1 (sc-7492), Santa Cruz
MOR-1 (sc-15310), Santa Cruz
KOR-1 (sc-9112), Santa Cruz
- Sekundární protilátka: Donkey antirabbit IgG-HRP (NA934V), GE Healthcare UK
Donkey antigoat IgG-HRP (sc-2033), Santa Cruz
- Substrát s křenovou peroxidasou, SuperSignal® West DURA Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific Pierce

Přístroje

- Pístový homogenizátor teflon-sklo Elvehjm-Potter, B. Braun Biotech International
- Centrifuga Hettich Universal 320, Schoeller
- Ultracentrifuga Beckman Optima XL 100K, úhlový rotor Ti 60, výkyvný rotor SW 41
- Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel
- Třepací vodní lázeň, ČSAV
- Spektrofotometr eppendorf BioPhotometer plus
- Aparatura pro diskontinuální elektroforézu XCell SureLock Mini-Cell EI0001, Invitrogen
- Aparatura pro elektropřenos (170-3930, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), BIO-RAD
- Vyvolávací kazeta, Amersham Biosciences (Ap Czech)

- Filmy Kodak 13 x 18 cm, 21-0001, Integros
- Vyvolávací automat OPTIMAX X-Ray Film Processor, Optimax

Vzorky

Experimentální materiál

- Kortexy potkanů usmrcených dekapitací v éterové narkóze, intramuskulárně podáván fyziologický roztok, kontrolní zvířata (C)
- Kortexy potkanů usmrcených dekapitací v éterové narkóze, intramuskulárně podáván morfin (dlouhodobá adaptace) (M) (viz. Tab. č. 1)

Tab. č. 1: Zvyšující se dávky morfinu podávaného potkanům

Den	Dávka morfinu
1.	10 mg/ kg
2.	10 mg/ kg
3.	15 mg/ kg
4.	15 mg/ kg
5.	20 mg/ kg
6.	20 mg/ kg
7.	30 mg/ kg
8.	30 mg/ kg
9.	40 mg/ kg
10.	50 mg/ kg

Vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při -80°C.

4.1.2. Metody

4.1.2.1. Frakcionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace

Použité roztoky

Pufr STEM: 0,25 M sacharosa, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂
na 500 ml: 42,8 g sacharosu, 10 ml 1 M Tris-HCl, 5 ml 100 mM EDTA, 15 ml 100 mM MgCl₂

Pufr TE: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

na 500 ml: 25 ml 1 M Tris-HCl, 5 ml 100 mM EDTA

PMSF 1 mM: 150 µl 200 mM PMSF, 30 ml pufru STEM

tableta complete: tableta rozpuštěna v 1 ml destilované vody

30% Percoll, 100 ml: 39,81 ml Percoll, 110,19 ml pufru STEM

Použité přístroje

Pístový homogenizátor teflon-sklo Elvehjem-Potter, B. Braun Biotech International

Centrifuga Hettich Universal 320, Schoeller

Ultracentrifuga Beckman Optima XL 100K, úhlový rotor Ti 60, výkyvný rotor SW 41

Použité vzorky

Kortexy potkanů usmrčených dekapitací v éterové narkóze, intramuskulárně podáván fyziologický roztok, kontrolní zvířata (C)

Kortexy potkanů usmrčených dekapitací v éterové narkóze, intramuskulárně podáván morfin (dlouhodobá adaptace) (M)

4.1.2.1.1. Příprava postnukleárního supernatantu (PNS)

Rotor centrifugy Schoeller bylo nutné předchladit na 4°C. Práce probíhala v ledové tříšti. Ke vzorku kortexu (5 g vlhké váhy) v odměrném válci bylo přidáno 25 ml 1 mM PMSF naředěného v pufru STEM (150 µl 200 mM PMSF, 30 ml pufru STEM a 500 µl rozpuštěné tablety complete), aby výsledná koncentrace homogenátu byla 20 %. Směs byla

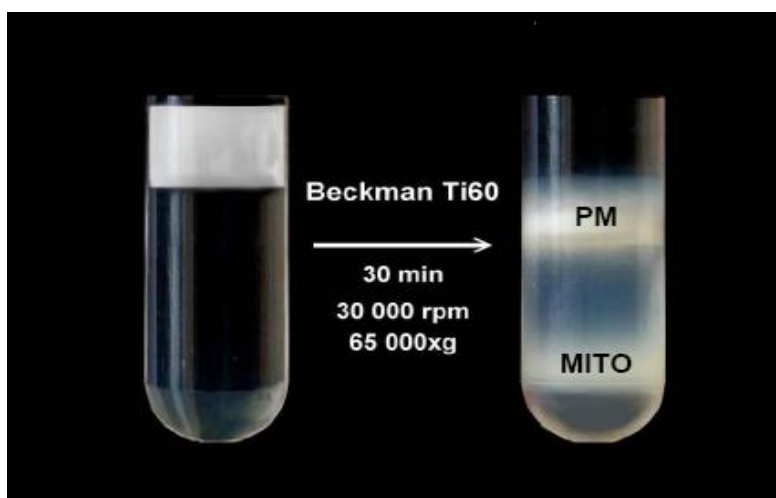
homogenizována 6 minut v homogenizátoru teflon-sklo při teplotě tajícího ledu, aby se zabránilo napěnění vzorku. Do dvou zkumavek byl převeden homogenát o objemu 12,5 ml a centrifugován na centrifuze Hettich Universal 320 při 4 °C (7 minut, 1000 x g). Po centrifugaci bylo odebráno 24 ml postnukleárního supernatantu (PNS). Frakce PNS byla zamrazena v kapalném dusíku a uskladněna při -80°C. V sedimentu (jaderné frakci) a homogenátu se stanovilo množství proteinů podle Lowryho metody a [³H]DAMGO vazba. V odebraném malém množství PNS byly také stanoveny proteiny a vazby [³H]ouabainu a [³H]DAMGO (viz dále).

4.1.2.1.2. Izolace plasmatických membrán z kortexu potkana na percollovém gradientu

Všechny manipulace se vzorky byly prováděny v ledové tříšti. Do šesti kyvet bylo pipetováno 20 ml 30 % Percollu (koloidní částice oxidu křemičitého obalené polyvinyl pyrrolidonem). Postnukleární supernatant byl navrstven po 3 ml na Percoll v kyvetách. Kyvety se předvážíly a vložily do vychlazeného úhlového rotoru Ti 60 (dvojice o stejné hmotnosti naproti sobě). Centrifugace probíhala na ultracentrifuze Beckman při 4°C (30 minut, 65 000 x g).

Po centrifugaci se vytvořily dvě frakce, viz Obr. č. 8 (str. 41). Supernatant nad horní frakcí se opatrně odsál, a z horní frakce (obsahující plasmatické membrány) bylo z každé kyvety odebráno 6 ml do dvou odměrných válců (celkem v každém válci byla frakce o objemu 18 ml). K frakcím ve válcích bylo přidáno 54 ml pufru STEM (zředěno 1:3). Směsi se převedly po 23 ml do kyvet a předvážením se opět upravila hmotnost. Centrifugace na ultracentrifuze Beckman probíhala při 4°C (90 minut, 180 000 x g). Po centrifugaci byl odebrán supernatant. Z gelovitého sedimentu Percollu se odpipetovala vrstva obsahující plasmatické membrány. Plasmatické membrány se resuspendovaly v 1 ml 20 mM TRIS-HCl (pH 7,5) a převedly se do kónických zkumavek. Směs se zvortexovala a ručně zhomogenizovala. Nakonec byla směs rozpipetována po 250 µl do mikrozkušavek, zamrazena v tekutém dusíku a uskladněna při -80°C. V odebraném množství byly stanovovány proteiny podle Lowryho metody, [³H]ouabainová vazba, vazba [³H]DPDPE, [³H]DAMGO a [³H]U-69593 (viz dále).

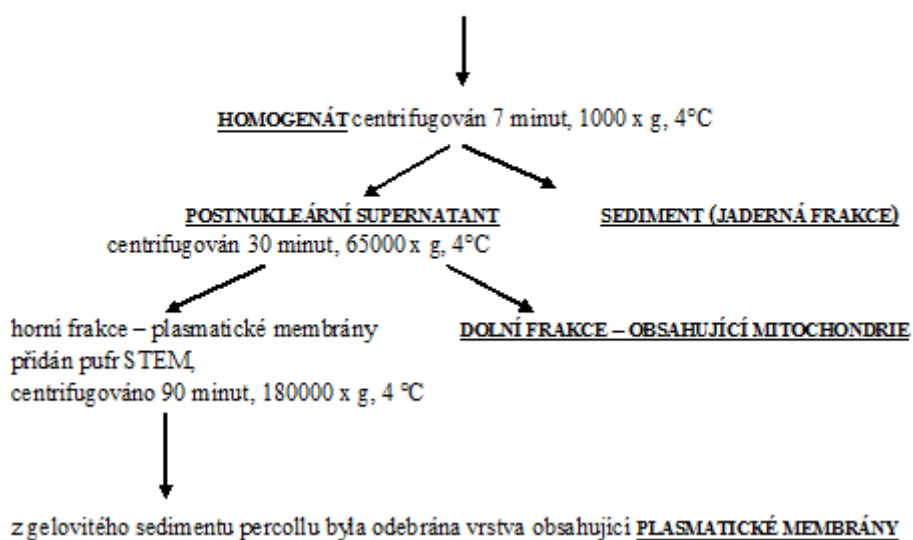
Celkové schéma postupu frakcionace buněčného homogenátu a izolace plasmatických membrán je znázorněno na Obr. č. 9 (str. 41).



Obr. č. 8.: Izolace plasmatických membrán na percollovém gradientu. Horní frakce obsahuje plasmatické membrány, dolní frakce především mitochondrie. (Převzato z [71])

Frakcionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace

vzorek kortexu homogenizován v pufrální směsi (PMSF + STEM + complete)



Obr. č. 9.: Schéma frakcionace buněčného homogenátu popsané výše.

4.1.2.2. Stanovení proteinů Lowryho metodou

Použité roztoky

Roztok A: 2% Na₂CO₃ + 0.1 M NaOH

Roztok B: 2% Na, K – tartate (vínan sodno-draselný)

Roztok C: 1% CuSO₄ · 5 H₂O

Folinovo reagens čerstvě naředěno 1:1 s H₂O

Standard BSA: 1 mg/ ml

Použité přístroje

Spektrofotometr eppendorf BioPhotometer plus

Použité vzorky

homogenát, jaderný sediment, postnukleární supernatant, dolní mitochondriální frakce a plasmatické membrány izolované z kortexu potkanů usmrčených dekapitací v éterové narkóze, intramuskulárně podáván fyziologický roztok nebo morfin

Vzorky byly rozmrazeny při teplotě tajícího ledu. Do deseti připravených zkumavek se napipetovalo množství standardu BSA a H₂O podle Tab. č. 2. Do dalších zkumavek byly pipetovány příslušné vzorky, které se doplnily destilovanou vodou na objem 500 μ l. Následně se do všech zkumavek přidalo 1,5 ml roztoku A + B + C (25 ml A + 0,5 ml B + 0,5 ml C). Po inkubaci 10 – 15 min při laboratorní teplotě se ve 30 s intervalech pipetovalo 150 μ l Folinova reagens. Směs ve zkumavkách byla promíchána. Po 30-ti minutové inkubaci se při laboratorní teplotě změřila absorbance při 720 nm.

Tab. č. 2: Schéma pipetování kalibrační řady standardu BSA (1 mg/ ml) při stanovení proteinů Lowryho metodou

Č.std.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA(μ l)	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200
H ₂ O(μ l)	500	490	480	470	460	450	425	400	350	300

4.1.2.3. Stanovení [³H]ouabainové vazby v postnukleárním supernatantu a plasmatických membránách ve vzorcích kontrolních zvířat

Použité roztoky

Inkubační médium: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM NaH₂PO₄, pH = 7,4

Promývací pufr: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4

Radioaktivně neznačený ouabain: 0.01M ouabain naředěn desetkrát na koncentraci 1 mM

[³H]ouabain: specifická radioaktivita 30 Ci/ mmol = 30. 2,22. 10³ dpm = 66600 dpm
Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth

Použité přístroje

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

Použité vzorky

Vzorek: postnukleární supernatant, koncentrace bílkoviny 33,62 mg/ ml (PNS)

(dávka 50 µl do 0.4 ml inkubačního objemu odpovídá 1,681 mg proteinu/ vzorek)

Vzorek: plasmatické membrány, koncentrace bílkoviny 2,374 mg/ ml (PM)

(dávka 50 µl do 0.4 ml inkubačního objemu odpovídá 0,1187 mg proteinu/ vzorek)

Vzorky postnukleárního supernatantu a plasmatických membrán z šedé kůry mozkové potkana byly rozmrazeny a během pokusu uchovávány v ledové tříšti. Po napipetování vzorků a roztoků dle Tab. č. 3 (kontroly 2 zvoleny jako T3) následovala 90-ti minutová inkubace při 37°C ve vodní lázni. Po promytí Cell Harvestoru ledově vychlazeným promývacím pufrem, byly vloženy skleněné filtry Whatman GF/ B a vzorky po ukončení inkubace přefiltrovány (oddělení vázané a volné radioaktivity). Filtry ze Cell Harvestoru byly vyjmuty a rozebrány do předem označených scintilačních zkumavek.

Tab. č. 3: Pipetovací schéma vzorků pro stanovení [³H]ouabainové vazby. Pro vzorky kontrolních potkanů a pro potkany, kterým bylo podáváno morfin bylo vytvořené samostatné schémata.

Vz. č.	Ozn.	Tkáň	1mM ouabain	[³ H]ouabain	izotopová řada (T ₁ -T ₁₀)
1	Kontr. 1	50 µl	-	-	-
2	Bt10	50 µl	-	350 µl	T10
3	Bt9	50 µl	-	350 µl	T9
4	Bt8	50 µl	-	350 µl	T8
5	Bt7	50 µl	-	350 µl	T7
6	Bt6	50 µl	-	350 µl	T6
7	Bt5	50 µl	-	350 µl	T5
8	Bt4	50 µl	-	350 µl	T4

9	Bt3	50 µl	-	350 µl	T3
10	Bt2	50 µl	-	350 µl	T2
11	Bt1	50 µl	-	350 µl	T1
12	Kontr. 2	-	-	350 µl	T3
13	Kontr. 1	50 µl	5 µl	-	-
14	Nsp10	50 µl	5 µl	350 µl	T10
15	Nsp9	50 µl	5 µl	350 µl	T9
16	Nsp8	50 µl	5 µl	350 µl	T8
17	Nsp7	50 µl	5 µl	350 µl	T7
18	Nsp6	50 µl	5 µl	350 µl	T6
19	Nsp5	50 µl	5 µl	350 µl	T5
20	Nsp4	50 µl	5 µl	350 µl	T4
21	Nsp3	50 µl	5 µl	350 µl	T3
22	Nsp2	50 µl	5 µl	350 µl	T2
23	Nsp1	50 µl	5 µl	350 µl	T1
24	Kontr. 2	-	-	350 µl	T3

Celková radioaktivita vzorků byla stanovena z izotopové koncentrační řady radioizotopu (T₁-T₁₀) viz Tab. č. 4, napipetovaného do připravených scintilačních zkumavek se skleněnými filtry GF/B.

Tab. č. 4: Izotopová koncentrační řada radioaktivně značeného [³H]ouabainu, T₁-T₁₀

T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
c (nM)	37,7	17,3	8,00	3,92	1,74	0,99	0,89	0,23	0,17	0,06

Do všech scintilačních zkumavek bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku Rotiszint. Radioaktivita vzorků byla změřena na scintilačním beta-čítači odd. radiometrie FGÚ AV. Doba měření vzorků byla 5 minut.

4.1.2.4. Stanovení vazby [³H]DAMGO v plasmatických membránách

Použité roztoky

Tris-HCl: 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4

Promývací pufr: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4

Naloxon: 0.001M naloxon naředěn na koncentraci 5. 10⁻⁴ mM

[³H]DAMGO: Specifická radioaktivita 50 Ci/ mmol = 50. 2,22. 10³ dpm = 111000 dpm
Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth

Použité přístroje

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

Použité vzorky

plasmatické membrány kontrolních potkanů, koncentrace bílkoviny 13,2 mg/ ml (C)

plasmatické membrány potkanů ovlivněných morfinem, koncentrace bílkoviny 11,0 mg/ ml (M)

Vzorky byly naředěny tak, aby dávka 20 µl do 0,1 ml inkubačního objemu odpovídala 120 µg proteinu.

Manipulace se vzorky probíhala opět v ledové tříšti. Radioaktivně neznačený naloxon byl naředěn v destilované vodě, vzorky membrán byly ředěny v 50 mM Tris-HCl. Postupně se pipetovala tkáň a roztoky dle Tab. č. 5. Následně se provedla 60-ti minutová inkubace při 30°C ve vodní lázni. Filtry Whatman GF/B byly inkubovány 60 minut v promývacím pufu.

Tab. č. 5: Pipetovací schéma vazby [³H]DAMGO v plasmatických membránách. Vzorky č. 1-24 pipetovány naředěné plasmatické membrány kontrolních zvířat. Vzorky č. 25-48 pipetovány naředěné plasmatické membrány izolované ze zvířat ovlivněných morfinem.

Vz. č.	H ₂ O	Tkáň	5. 10 ⁻⁴ mM naloxon	[³ H]DAMGO	izotopová řada (T ₁ -T ₁₀)
1 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T10
2 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T9
3 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T8
4 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T7
5 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T6
6 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T5
7 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T4
8 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T3
9 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T2

10 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
11 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
12 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
13 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T10
14 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T9
15 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T8
16 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T7
17 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T6
18 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T5
19 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T4
20 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T3
21 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T2
22 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
23 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
24 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
25 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T10
26 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T9
27 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T8
28 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T7
29 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T6
30 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T5
31 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T4
32 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T3
33 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T2
34 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
35 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
36 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
37 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T10
38 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T9
39 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T8
40 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T7
41 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T6
42 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T5
43 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T4
44 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T3
45 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T2
46 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
47 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
48 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1

Celková radioaktivita vzorků byla stanovena z izotopové koncentrační řady radioizotopu (T₁-T₁₀) viz Tab. č. 6, napipetovaného do připravených scintilačních zkumavek se skleněnými filtry GF/B.

Tab. č. 6: Izotopová koncentrační řada radioaktivně značeného [³H]DAMGO, T₁-T₁₀

T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
c (nM)	67,4	37,8	18,7	9,45	4,79	2,47	1,24	0,62	0,32	0,17

Cell Harvester byl nejprve promyt ledově vychlazeným promývacím pufrem, a po ukončení inkubace vzorků byly vzorky na Cell Harvesteru přefiltrovány. Skleněné filtry Whatman GF/B se po filtraci vyjmuly a rozebraly do předem označených scintilačních zkumavek. Do všech scintilačních zkumavek bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita vzorků byla změřena na scintilačním beta-čítači odd. radiometrie FGÚ AV. Doba měření vzorků byla 5 minut.

4.1.2.5. Stanovení vazby [³H]DAMGO v homogenátu, jaderném sedimentu, postnukleárním supernatantu a dolní mitochondriální frakci

Použité roztoky

Tris-HCl: 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4

Promývací pufr: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4

Naloxon: 0.001M naloxon naředěn na koncentraci 5. 10⁻⁴ mM

[³H]DAMGO: Specifická radioaktivita 50 Ci/ mmol = 50. 2,22. 10³ dpm = 111000 dpm

Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth

Použité přístroje

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

Použité vzorky

Tab. č. 7: Vzorky jednotlivých frakcí použité pro stanovení vazby [³H]DAMGO

Frakce	Koncentrace bílkoviny
Homogenát C	26,7 mg/ ml
Homogenát M	29,8 mg/ ml
Jaderný sediment C	53,4 mg/ ml
Jaderný sediment M	58,2 mg/ ml
Postnukleární supernatant C	15,3 mg/ ml
Postnukleární supernatant M	18,6 mg/ ml
Dolní mitochondriální frakce C	7,23 mg/ ml
Dolní mitochondriální frakce M	3,50 mg/ ml

Vzorky byly naředěny, aby dávka 20 μ l do 0,1 ml inkubačního objemu odpovídala 120 μ g proteinu.

Jednotlivé frakce získané během izolace plasmatických membrán (Tab. č. 7) byly naředěny v Tris-HCl na výslednou koncentraci 6 mg/ ml. Neznačený naloxon pro stanovení nespecifické vazby byl naředěn v destilované vodě na koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mM. Se vzorky se pracovalo opět v ledové tříšti. Dle pipetovacího schéma (Tab. č. 8) byly napipetovány příslušné vzorky. Následovala inkubace při 30°C jednu hodinu. Filtry Whatman GF/B byly inkubovány 60 minut v promývacím pufru. Pracovalo se se stejnou izotopovou koncentrační řadou radioaktivně značeného [³H]DAMGO jako u plasmatických membrán (viz. Tab. č. 6; str. 47).

Tab. č. 8: Pipetovací schéma vazby [³H]DAMGO v jednotlivých frakcích (viz Tab. č. 7). Čísla 1-24 pipetovány vzorky z kontrolních zvířat. Čísla 25-48 vzorky zvířat ovlivněných morfinem. Pro každou frakci bylo sestaveno samostatné pipetovací schéma.

Vz. č.	H ₂ O	Tkáň	$5 \cdot 10^{-4}$ mM naloxon	[³ H]DAMGO	izotopová řada (T ₁ -T ₁₀)
1 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T10
2 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T9
3 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T8
4 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T7
5 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T6

6 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T5
7 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T4
8 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T3
9 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T2
10 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
11 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
12 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
13 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T10
14 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T9
15 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T8
16 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T7
17 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T6
18 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T5
19 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T4
20 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T3
21 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T2
22 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
23 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
24 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
25 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T10
26 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T9
27 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T8
28 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T7
29 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T6
30 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T5
31 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T4
32 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T3
33 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T2
34 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
35 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
36 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
37 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T10
38 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T9
39 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T8
40 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T7
41 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T6
42 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T5
43 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T4
44 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T3
45 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T2

46 (M)	20 μ l	20 μ l	10 μ l	50 μ l	T1
47 (M)	20 μ l	20 μ l	10 μ l	50 μ l	T1
48 (M)	20 μ l	20 μ l	10 μ l	50 μ l	T1

Filtrovací přístroj Cell Harvester byl promyt ledově vychlazeným promývacím pufrem a následně byly filtrovány vzorky. Jednotlivé filtry byly rozebrány do scintilačních zkumavek a do každé této zkumavky bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita vzorků byla změřena na scintilačním beta-čítači odd. radiometrie FGÚ AV. Doba měření vzorků byla 5 minut.

4.1.2.6. Jednobodové stanovení [³H]DAMGO v plasmatických membránách

Použité roztoky

Tris-HCl: 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4

1 M NaCl

25 mM CaCl₂

50 mM MgCl₂

Promývací puf: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4

Naloxon: 0.001M naloxon naředěn na koncentraci 5. 10⁻⁴ mM

[³H]DAMGO: Specifická radioaktivita 50 Ci/ mmol = 50. 2,22. 10³ dpm = 111000 dpm

Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth

Použité přístroje

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

Použité vzorky

plasmatické membrány kontrolních potkanů, koncentrace bílkoviny 13,2 mg/ ml (C)

plasmatické membrány potkanů ovlivněných morfinem, koncentrace bílkoviny 11,0 mg/ ml (M)

Vzorky byly naředěny, aby dávka 20 μ l do 0,1 ml inkubačního objemu odpovídala 120 μ g proteinu.

Dle pipetovacího schéma (Tab. č. 9) se napipetovaly vzorky a roztoky do zkumavek připravených v ledové tříšti. Následovala inkubace jednu hodinu při 30°C. Filtry Whatman GF/B byly opět inkubovány 60 minut v promývacím pufru. Měření probíhalo v přítomnosti celkové radioaktivity radioligandu 20 nM. Část měření probíhala po přidání 10 µl 1 M roztoku NaCl.

Tab. č. 9: Pipetovací schéma jednobodového stanovení [³H]DAMGO v plasmatických membránách kontrolních potkanů, analogicky bylo provedeno jednobodové stanovení u plasmatických membrán potkanů ovlivněných morfinem. Koncentrace přidávaných roztoků byly 25 mM CaCl₂; 50 mM MgCl₂; 1 M NaCl a 5 · 10⁻⁴ mM naloxonu.

Vz. C	NaCl	H ₂ O	Tkáň	5 · 10 ⁻⁴ mM naloxon	[³ H]DAMGO 20 nM	ionty 10 µl
1	-	30 µl	20 µl	-	50 µl	-
2	-	30 µl	20 µl	-	50 µl	-
3	-	30 µl	20 µl	-	50 µl	-
4	-	30 µl	20 µl	-	50 µl	-
5	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
6	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
7	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
8	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
9	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
10	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
11	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
12	-	20 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
13	-	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
14	-	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
15	-	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
16	-	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
17	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
18	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
19	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
20	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
21	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺
22	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺
23	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺
24	-	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺

25	10 µl	20 µl	20 µl	-	50 µl	-
26	10 µl	20 µl	20 µl	-	50 µl	-
27	10 µl	20 µl	20 µl	-	50 µl	-
28	10 µl	20 µl	20 µl	-	50 µl	-
29	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
30	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
31	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
32	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Ca ²⁺
33	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
34	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
35	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
36	10 µl	10 µl	20 µl	-	50 µl	Mg ²⁺
37	10 µl	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
38	10 µl	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
39	10 µl	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
40	10 µl	10 µl	20 µl	10 µl	50 µl	-
41	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
42	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
43	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
44	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Ca ²⁺
45	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺
46	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺
47	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺
48	10 µl	-	20 µl	10 µl	50 µl	Mg ²⁺

Po inkubaci vzorků a promytí filtrovacího přístroje byly vzorky přefiltrovány, filtry rozebrány do scintilačních zkumavek, přidán scintilační roztok a takto zpracované vzorky byly změřeny na scintilačním beta-čítači odd. radiometrie FGÚ AV. Doba měření vzorků byla 5 minut.

4.1.2.7. Stanovení vazby [³H]DPDPE v plasmatických membránách

Použité roztoky

Pufr TME: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH = 7,5

Pufr TE: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 7,6

Promývací pufr: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4

Neznačený DPDPE: 0.001M DPDPE naředěn desetkrát na koncentraci 0,1 mM

[³H]DPDPE: Specifická radioaktivita 45 Ci/ mmol = 45. 2,22. 10³ dpm = 99900 dpm

Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth

Použité přístroje

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

Použité vzorky

plasmatické membrány kontrolních potkanů, koncentrace bílkoviny 7,35 mg/ ml (izolace dne 24.11. 2012) (C1)

plasmatické membrány potkanů ovlivněných morfinem, koncentrace bílkoviny 5,35 mg/ ml (izolace dne 24.11. 2012) (M1)

plasmatické membrány kontrolních potkanů, koncentrace bílkoviny 9,8 mg/ ml (izolace dne 14.4. 2011) (C2)

plasmatické membrány potkanů ovlivněných morfinem, koncentrace bílkoviny 10,0 mg/ ml (izolace dne 14.4. 2011) (M2)

Vzorky byly naředěny, aby dávka 20 μ l do 0,1 ml inkubačního objemu odpovídala 120 μ g proteinu.

Manipulace se vzorky se prováděla opět v ledové tříšti. Radioaktivně neznačený DPDPE a použité vzorky byly naředěny v TE pufru. Postupně se pipetovala tkáň a roztoky dle Tab. č. 10. Následně se vzorky nechaly inkubovat 60 minut při 30°C ve vodní lázni. Filtry Whatman GF/B byly inkubovány 60 minut v TME pufru.

Tab. č. 10: Pipetovací schéma vazby [³H]DPDPE v plasmatických membránách, čísla vzorků 1-24 membrány kontrolních potkanů, vzorky č. 25-48 membrány potkanů ovlivněných morfinem.

Vz. č.	H ₂ O	Tkáň	0,1 mM DPDPE	[³ H]DPDPE	izotopová řada (T ₁ -T ₁₀)
1 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T10
2 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T9
3 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T8
4 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T7
5 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T6
6 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T5
7 (C)	30 μ l	20 μ l	-	50 μ l	T4

8 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T3
9 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T2
10 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
11 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
12 (C)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
13 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T10
14 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T9
15 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T8
16 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T7
17 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T6
18 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T5
19 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T4
20 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T3
21 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T2
22 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
23 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
24 (C)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
25 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T10
26 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T9
27 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T8
28 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T7
29 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T6
30 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T5
31 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T4
32 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T3
33 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T2
34 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
35 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
36 (M)	30 µl	20 µl	-	50 µl	T1
37 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T10
38 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T9
39 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T8
40 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T7
41 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T6
42 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T5
43 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T4
44 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T3
45 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T2
46 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1
47 (M)	20 µl	20 µl	10 µl	50 µl	T1

48 (M)	20 μ l	20 μ l	10 μ l	50 μ l	T1
--------	------------	------------	------------	------------	----

Celková radioaktivita vzorků byla stanovena z izotopové koncentrační řady radioizotopu (T₁-T₁₀) viz Tab. č. 11, napipetovaného do připravených scintilačních zkumavek se skleněnými filtry GF/B.

Tab. č. 11: Izotopová koncentrační řada radioaktivně značeného [³H]DPDPE, T₁-T₁₀

T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
c (nM)	57,3	27,5	13,8	6,54	3,36	1,58	0,80	0,41	0,21	0,10

Cell Harvester byl nejprve promyt ledově vychlazeným promývacím puřrem, a po inkubaci vzorků byla provedena jejich filtrace. Skleněné filtry Whatman GF/B se po filtraci vyjmuly a rozebraly do ředem označených scintilačních zkumavek. Do všech scintilačních zkumavek bylo řidáno 5 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita vzorků byla změřena na scintilačním beta-řítači odd. radiometrie FGÚ AV. Doba měření vzorků byla 5 minut.

4.1.2.8. Jednobodové stanovení [³H]U-69593 v plasmatických membránách

Použitě roztoky

Tris-HCl: 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4

25 mM CaCl₂

50 mM MgCl₂

Promývací puřr: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,4

U-59693: neznačený U-59693 naředěn na koncentraci 5. 10⁻⁴ M

[³H]U-69593: Specifická radioaktivita 63 Ci/ mmol = 63. 2,22. 10³ dpm = 139860 dpm

Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, Carl Roth

Použitě přístroje

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

Použité vzorky

plasmatické membrány kontrolních potkanů, koncentrace bílkoviny 13,2 mg/ ml (C)

plasmatické membrány potkanů ovlivněných morfinem, koncentrace bílkoviny 11,0 mg/ ml (M)

Vzorky byly naředěny, aby dávka 20 μ l do 0,1 ml inkubačního objemu odpovídala 120 μ g proteinu.

Postupovalo se obdobně jako u jednobodového vazebného stanovení [³H]DAMGO (viz kapitola 4.1.2.6) v plasmatických membránách. Vzorky a roztoky byly naředěny a pipetovány v ledové tříšti. Inkubace byla opět při 30°C 60 minut. Celková radioaktivita použitého radioligandu činila 30 nM. Pipetovací schéma bylo navrženo podobně jako u jednobodového stanovení [³H]DAMGO v plasmatických membránách ale pouze bez nebo v přítomnosti hořčičných iontů (Tab. č. 9; str. 51-52). Po přefiltrování vzorků byla radioaktivita zachycená na filtrech opět změřena na odd. radiometrie FGÚ AV. Doba měření vzorků byla 5 minut.

4.1.2.9. Elektroforéza v prostředí SDS a technika „Western blot“ pro detekci opioidních receptorů MOR, DOR a KOR v plasmatických membránách

Použité roztoky

Standard SDS7B2 (26.6 – 180 kDa), Sigma

Gely Invitrogen NuPAGE® Novex 4- 12% Bis- Tris Gel 1.0 mm, 10 well (invitrogen, NP0321BOX)

Vzorkový pufr 4x (1 díl SB : 3 díly vzorku): 2,4 ml 1M Tris-HCl, 1 ml glycerolu, 0,8 g SDS, 0,4 ml merkaptoethanolu, 1 mg bromfenolové modři, doplnit vodou do 10 ml Antioxidant NuPAGE® NP0005, Invitrogen

MOPS SDS Running pufr 1x: 5,23 g MOPS, 3,03 g Tris, 0,5 g SDS, 0,15 g EDTA, doplnit sterilní deionizovanou vodou na 1000 ml, pH 7,7

Laemmliho pufr 4x: 2,4 ml 1 M Tris- HCl, pH 6,8, 1 ml glycerolu, 0,8 g SDS, 0,8 g DDT, 1 mg bromfenolové modři, 10 ml deionizované vody, pH 6,8

Přenosový TGM pufr 4x: 15 g Tris, 14,4 g glycinu, 72 g SDS, 1000 ml methanolu, doplnit destil. vodou do 5000 ml

Blokovací pufr: 2,5 g sušeného mléka, 50 ml TBS 1x, 50 µl Tween 20,

Ředící pufr: 0,5 g sušeného mléka, 50 ml TBS 1x, 50 µl Tween 20,

Promývací pufr: 600 µl Tween 20, 200 ml ředěného TBS pufru 1x

Nitrocelulózová membrána: Whatman Protran BA 83 (26 02 02495, Koneko)

Primární protilátka: MOR-1 (sc-15310), Santa Cruz

DOR-1 (sc-7492), Santa Cruz

KOR-1 (sc-9112), Santa Cruz

Sekundární protilátka: Donkey antirabbit IgG-HRP (NA934V), GE Healthcare UK Limited

Donkey antigoat IgG-HRP (sc-2033), Santa Cruz

Substrát s křenovou peroxidasou, SuperSignal® West DURA Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific Pierce

Použité přístroje

Aparatura pro diskontinuální elektroforézu XCell SureLock Mini-Cell EI0001, Invitrogen

Aparatura pro přenos (170-3930, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), BIO-RAD

Vyvolávací kazeta, Amersham Biosciences (Ap Czech)

Filmy Kodak 13 x 18 cm, 21-0001, Integros

Vyvolávací automat OPTIMAX X-Ray Film Processor, Optimax

Použité vzorky

plasmatické membrány kontrolních potkanů, koncentrace bílkoviny 18,5 mg/ ml (C)

plasmatické membrány z potkanů ovlivněných morfinem, koncentrace bílkoviny 14,2 mg/ ml (M)

Tab. č. 12: Příprava vzorků pro elektroforézu v prostředí SDS

vzorek	plasmatické membrány [µl]	Vzorkový pufr [µl]	destilovaná voda [µl]
kontrolní (C)	13,5	25	61,5
morfinové (M)	17,6	25	57,4

nanášené množství 8 µl, 20 µg proteinu/ vzorek

Skla obsahující komerčně připravené gradientové gely, které se vyjmou z obalu a vloží do aparatury, která se následně zalije MOPS SDS Running puforem (naředěn

desetkrát). Dále se připraví vzorky dle Tab. č. 12, (str. 57) a směs vzorků se nechá zahřát na 95°C po dobu tří minut. Standard a připravené vzorky se napipetují do jamek gelů a spustí se elektroforéza při konstantním napětí 200 V přibližně na 50-60 minut.

Po elektroforéze v prostředí SDS následuje metoda tzv. přenosu proteinů (z angl. *Western blot*). Gely se vyjmou ze skel. V přenosovém pufru se uspořádá kazeta pro „Western blot“, molitanové polštářky, filtrační papíry, vyjmuté gely a nitrocelulózová membrána. „Westernový sendvič“ se vytváří pod hladinou a bez vzduchových bublinek. Připravená kazeta se sendvičem se vloží do přenosové aparatury. Takto připravená aparatura se zalije přenosovým pufrům a spustí se při konstantním napětí 100V. Elektropřenos proteinů probíhá asi 60 minut.

Membrány se vyjmou ze sendviče, opláchnou se destilovanou vodou a následuje hodinová inkubace v blokovacím pufru. Primární specifické protilátky se naředily v ředícím pufru (primární protilátka pro MOR a KOR 200 krát a pro DOR 400 krát). Membrány se nechaly inkubovat přes noc v naředěných primárních protilátkách. Poté se opláchly destilovanou vodou a následovala třikrát deseti-minutová inkubace v promývacím pufru. Naředily se sekundární protilátky a membrány se dále inkubovaly v sekundárních protilátkách jednu hodinu. Po inkubaci se membrány opláchly opět destilovanou vodou a promývacím pufrům. Substrát s křenovou peroxidasou se naředil dle návodu a nanest se na membrány. Substrát se nechal působit 1 minutu. Membrány byly zabaleny do fólie a upevněny ve vyvolávací kazetě.

Výsledky imunodetekce byly vyvolány na filmy pomocí vyvolávacího automatu. Membrány se inkubovaly s filmy v různých časových intervalech a byly vybrány nejčitelnější výsledky.

4.2. Výsledky

4.2.1. Frakcionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace

Z buněčného homogenátu byl získán postnukleární supernatant, ze kterého se izolovaly plasmatické membrány. Úspěšnost těchto postupů byla ověřena změřením [³H]ouabainové vazby v postnukleárním supernatantu i plasmatických membránách u kontrolních vzorků a stanovení tak ukazatele čistoty preparátů.

Po změření specifické vazby radioligandu [³H]DAMGO v jednotlivých frakcích u vzorků kontrolních potkanů i potkanů ovlivněných morfinem lze stanovit účinnost izolace plasmatických membrán (viz Obr. č. 14; str. 67). Z hodnot maximálního počtu vazebných míst B_{\max} jednotlivých frakcí se stanoví množství receptorů v každé frakci. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.2.5. uvedené níže (Tab.č. 19; str. 67).

4.2.2. Stanovení proteinů Lowryho metodou

Proteiny byly stanoveny po příslušném naředění ve vzorcích paralelně ke všem probíhajícím měřením. Proteiny se stanovily vždy v triplikátu.

Výsledky byly vyhodnoceny programem GraphPadPrizm. S pomocí nelineární regrese pro polynom 2. řádu $y = ax^2 + bx + c$ byl určen průběh kalibrační křivky, ze kterého se stanovilo množství proteinů ve všech vzorcích viz Tab. č. 13. Jednotlivé hodnoty triplikátů byly zprůměrovány.

Tab. č. 13: Množství proteinů ve vzorcích. Stanovení se provádělo v triplikátech.

Vzorek	množství (mg/ml) kontrolní	množství (mg/ml) morfinové
PNS pro ouabainovou vazbu	33,6	-
PM pro ouabainovou vazbu	2,37	-
PM pro vazbu DPDPE	4,02	6,28
PM pro vazbu DAMGO	5,53	5,59
PNS pro vazbu DAMGO	5,90	5,25
Homogenát pro vazbu DAMGO	4,77	4,29
Jaderný sediment pro vazbu DAMGO	4,21	4,28
Mitochondriální frakce pro vazbu DAMGO	2,65	3,59
Jednobodové stanovení DAMGO	5,76	6,23

Jednobodové stanovení U-69593	5,53	5,59
-------------------------------	------	------

4.2.3. Stanovení [³H]ouabainové vazby v postnukleárním supernatantu a plasmatických membránách

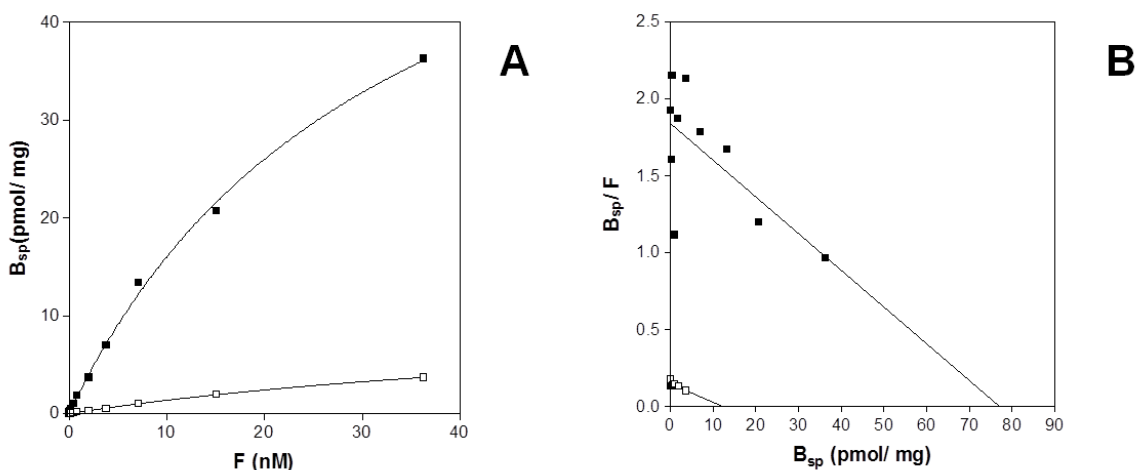
Z měřených hodnot se vypočítala specifická vazba radioligandu na receptory B_{sp} a koncentrace volného radioligandu F.

Grafická znázornění saturačního vazebného pokusu [³H]ouabainu je na Obr. č. 10; str. 61. Saturační křivka byla získána přímým fitováním dat programem GraphPadPrizm (nelineární regrese podle rovnice rektangulární hyperboly), ze Scatchardova výnosu se data vypočítala lineární regresí. Podle saturační vazebné křivky ouabainu byl maximální počet vazebných míst u plasmatických membrán B_{max} = 69,09 pmol/ mg a disociační konstanta K_d = 33,18 nM viz Tab. č. 14. Podle Scatchardova výnosu byla vazebná kapacita v plasmatických membránách B_{max} = 77,19 pmol/ mg a K_d = 41,89 nM. Ze saturační vazebné křivky ouabainu v postnukleárním supernatantu bylo zjištěno B_{max} = 10,59 pmol/ mg a K_d = 67,46 nM. Podle Scatchardova výnosu B_{max} odpovídalo 12,27 pmol/ mg a K_d = 81,84 nM. Rozdíl v hodnotách saturační vazebné křivky postnukleárního supernatantu a Scatchardova výnosu byl pravděpodobně způsoben vysokou koncentrací bílkoviny ve vzorku. Z výsledků na Obr. č. 10 (str. 6+) A lze pozorovat až sedmkrát vyšší čistotu u plasmatických membrán oproti postnukleárnímu supernatantu na základě stanovení [³H]ouabainové vazby jako ukazatele čistoty preparátu.

Tab. č. 14: Výsledná vazebná kapacita a disociační konstanta vazby [³H]ouabainu v plasmatických membránách a postnukleárním supernatantu. Výsledky reprezentují jeden saturační pokus ± SEM.

Vzorky	Saturační vazebná křivka
plasmatické membrány	B _{max} = 69,09 ± 3,71 pmol/ mg K _d = 33,18 ± 3,06 nM
postnukleární supernatant	B _{max} = 10,59 ± 0,49 pmol/ mg K _d = 67,46 ± 0,14 nM

Vazba [³H]ouabainu



Obr. č. 10: Grafické znázornění vazby [³H]ouabainu v plasmatických membránách izolovaných z kortexů kontrolních potkanů. A) Saturační vazebná křivka. B) Scatchardův výnos. ■ Plasmatické membrány □ Postnukleární supernatant

Koncentrace [³H]ouabainu byla v rozpětí 0,06-37,7 nM. Koncentrace neznačeného ouabainu byla $1,25 \cdot 10^{-5}$ M pro stanovení nespecifické vazby. PNS 1,681 mg proteinu/ vzorek; PM 0,1187 mg proteinu/ vzorek.

Statistické vyhodnocení pomocí Studentského t-testu ouabainové vazby stanovilo tento nárůst jako vysoce signifikantní viz Tab. č. 15.

Tab. č. 15: Statistické vyhodnocení [³H]ouabainové vazby v plasmatických membránách a postnukleárním supernatantu kontrolních potkanů.

typ vazby	[³ H]ouabain	
	PM	PNS
B_{max} (pmol/ mg)	69,09	10,59
K_d (nM)	33,18	67,46
95% interval spolehlivosti pro B_{max}	60,52-77,66	9,45-11,72
95% interval spolehlivosti pro K_d	26,13-40,23	57,24-77,69
t- test (nepárový)	B_{max}	
P hodnota	P < 0,001	
signifikance	signifikantní; ***	
t- test (nepárový)	K_d	
P hodnota	P < 0,001	

signifikance	signifikantní; ***
--------------	--------------------

4.2.4. Stanovení vazby [³H]DAMGO v plasmatických membránách

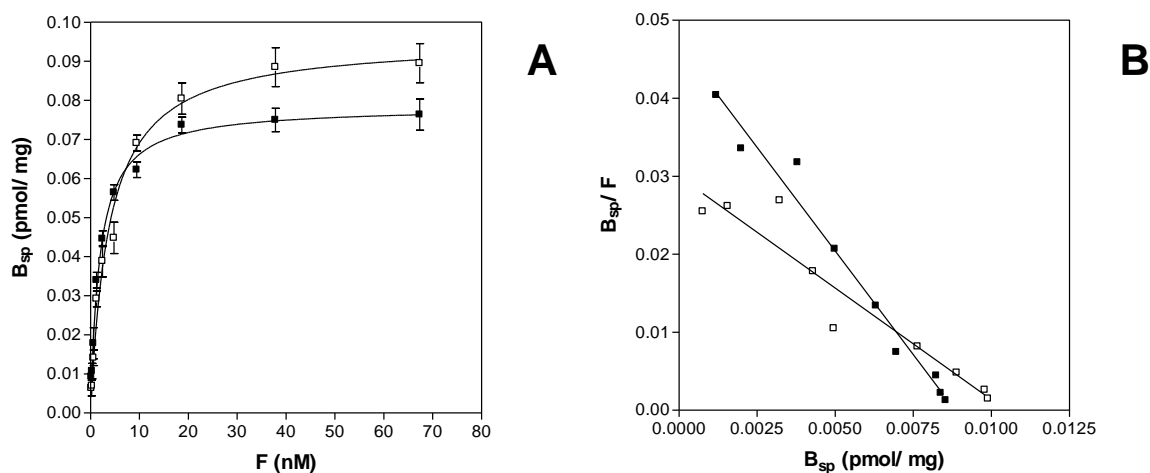
Z měřených hodnot se stejně jako z výsledků s [³H]ouabainem vypočítala B_{sp} (specifická vazba radioligandu na receptory) a F (koncentrace volného radioligandu).

Analogicky se provedlo grafické znázornění saturační vazebné křivky [³H]DAMGO nebo Scatchardův výnos viz Obr. č. 11. V Tab. č. 16 jsou zobrazeny získané hodnoty maximálního počtu vazebných míst B_{max} a disociační konstanty K_d.

Tab. č. 16: Získané hodnoty vazebné kapacity a disociační konstanty vazby [³H]DAMGO v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfinem. Výsledky reprezentují průměr ± SEM. Pokus byl prováděn v duplikátu.

plasmatické membrány	Saturační vazebná křivka
kontrolní vzorky	B _{max} = 0,0955 ± 0,0031 pmol/ mg K _d = 3,83 ± 0,47 nM
morfinové vzorky	B _{max} = 0,0784 ± 0,0013 pmol/ mg K _d = 1,85 ± 0,14 nM

Vazba [³H]DAMGO



Obr. č. 11: A) Saturační vazebná křivka [³H]DAMGO v plasmatických membránách potkana. B) Scatchardův výnos. ■ Plasmatické membrány z kortexů potkanů podávaným morfin □ Plasmatické membrány z kortexů kontrolních potkanů. Koncentrace [³H]DAMGO byla v rozpětí 0,17-67,4 nM. Plasmatické membrány 120 µg proteinu/ assay.

Neznačený naloxon $5 \cdot 10^{-5}$ M pro stanovení nescifické vazby. Vazebný pokus byl prováděn v duplikátu.

Výsledky popisují signifikantní pokles vazebných míst u plasmatických membrán kortexů potkanů ovlivněných morfinem. Disociační konstanta morfinových i kontrolních vzorků se mírně liší, tento rozdíl je však nesignifikantní viz. Tab. č. 17.

Tab. č. 17: Statistické vyhodnocení vazby agonisty [3 H]DAMGO v plasmatických membránách kontrolních potkanů a plasmatických membránách potkanů ovlivněných morfinem.

typ vazby	DAMGO	
	kontrolní	morfinové
B_{max} (pmol/ mg)	0,0955	0,0784
K_d (nM)	3,83	1,85
95% interval spolehlivosti pro B_{max}	0,0884-0,1027	0,0753-0,0815
95% interval spolehlivosti pro K_d	2,75-4,90	1,54-2,16
t- test (nepárový)	B_{max}	
P hodnota	$P < 0,05$	
signifikance	signifikantní; *	
t- test (nepárový)	K_d	
P hodnota	$P > 0,05$	
signifikance	nesignifikantní	

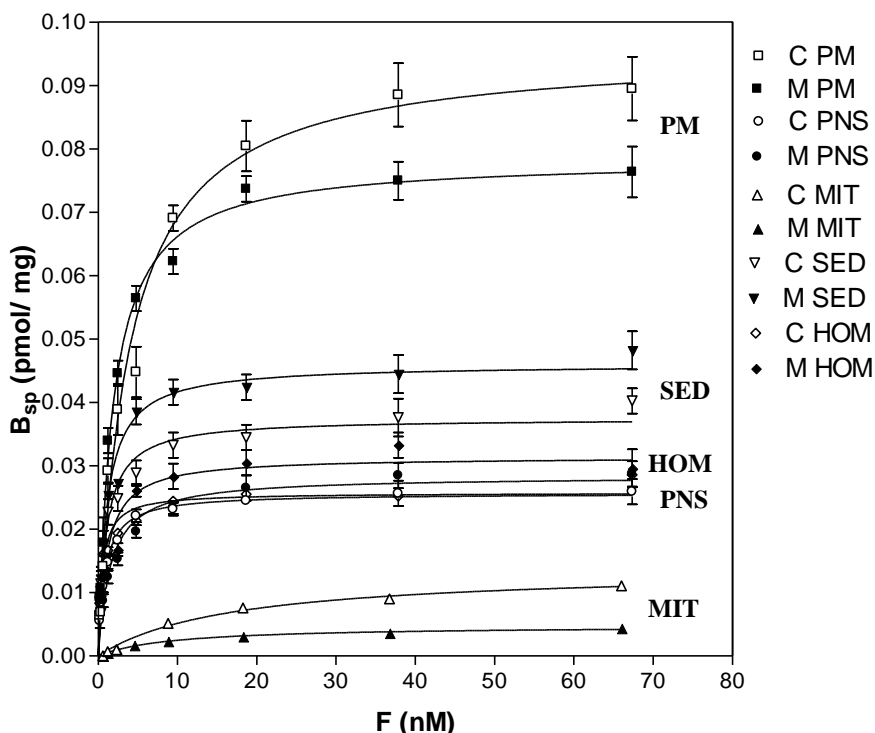
4.2.5. Stanovení vazby [3 H]DAMGO v homogenátu, jaderném sedimentu, postnukleárním supernatantu a dolní mitochondriální frakci

Opět se z měření vypočítá specifická vazebná kapacita B_{sp} a koncentrace volného radioligandu F.

Na Obr. č. 12 (str. 64) jsou znázorněné saturační vazebné křivky všech frakcí získaných při izolaci plasmatických membrán. Pro lepší znázornění jsou dále zobrazeny grafy srovnání saturačních vazebných křivek plasmatických membrán, postnukleárního supernatantu a dolní mitochondriální frakce (Obr. č. 13, str. 66), tudíž frakce získané především z izolace plasmatických membrán na percollovém gradientu.

V Tab. č. 18 jsou zobrazeny výsledné hodnoty B_{\max} a K_d , které byly získány ze saturačních vazebných pokusů.

Vazba [^3H]DAMGO ve všech frakcích



Obr. č. 12: Saturační křivky vazby [^3H]DAMGO ve všech frakcích získaných během frakcionace homogenátu a izolace plasmatických membrán. Koncentrace [^3H]DAMGO byla v rozmezí 0,17-67,4 nM. Jednotlivé frakce obsahovaly vždy 120 μg proteinu/ vzorek. Neznačený naloxon $5 \cdot 10^{-5}$ M pro stanovení nespecifické vazby. Měření probíhalo v duplikátu.

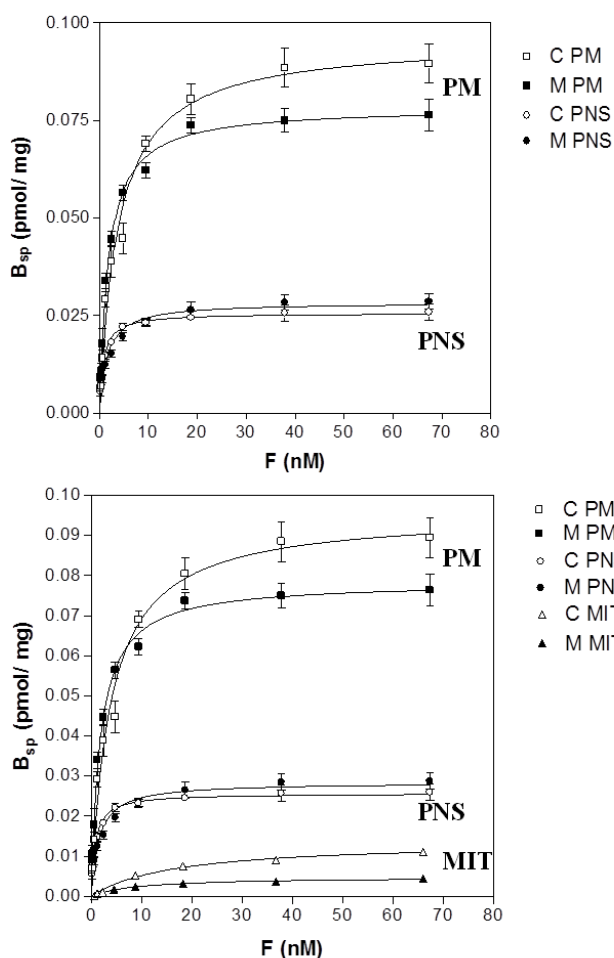
Tab. č. 18: Výsledné hodnoty maximálních vazebných míst a disociačních konstant frakcí získaných během izolace. Hodnoty reprezentují průměr \pm SEM. Pokus byl prováděn v duplikátu.

homogenát	Saturační vazebná křivka
C	$B_{\max} = 0,0257 \pm 0,0009$ pmol/ mg $K_d = 0,499 \pm 0,093$ nM
M	$B_{\max} = 0,0314 \pm 0,0014$ pmol/ mg $K_d = 1,058 \pm 0,233$ nM

jaderný sediment	Saturační vazebná křivka
C	$B_{\max} = 0,0378 \pm 0,0012$ pmol/ mg $K_d = 0,909 \pm 0,146$ nM
M	$B_{\max} = 0,0464 \pm 0,0015$ pmol/ mg $K_d = 1,008 \pm 0,156$ nM
postnukleární supernatant	Saturační vazebná křivka
C	$B_{\max} = 0,0256 \pm 0,0004$ pmol/ mg $K_d = 0,811 \pm 0,067$ nM
M	$B_{\max} = 0,0284 \pm 0,0013$ pmol/ mg $K_d = 1,541 \pm 0,318$ nM
MIT	Saturační vazebná křivka
C	$B_{\max} = 0,0137 \pm 0,0010$ pmol/ mg $K_d = 16,82 \pm 3,19$ nM
M	$B_{\max} = 0,0048 \pm 0,0002$ pmol/ mg $K_d = 9,33 \pm 1,39$ nM

Na Obr. č. 13 (str. 66) je znázorněn jasný rozdíl mezi vazbou agonisty na MOR receptory v plasmatických membránách oproti ostatním frakcím získaných ze vzorků kontrolních zvířat a zvířat ovlivněných morfinem.

Vazba [³H]DAMGO PM, PNS, MIT



Obr. č. 13: Saturační vazebná křivka vazby [³H]DAMGO A) v plasmatických membránách a postnukleárním supernatantu. B) v plasmatických membránách, postnukleárním supernatantu a dolní mitochondriální frakci. Koncentrace [³H]DAMGO byla v rozmezí 0,17-67,4 nM. Jednotlivé frakce obsahovaly vždy 120 μ g proteinu/ vzorek. Neznačený naloxon $5 \cdot 10^{-5}$ M pro stanovení nespecifické vazby. Měření probíhalo v duplikátu.

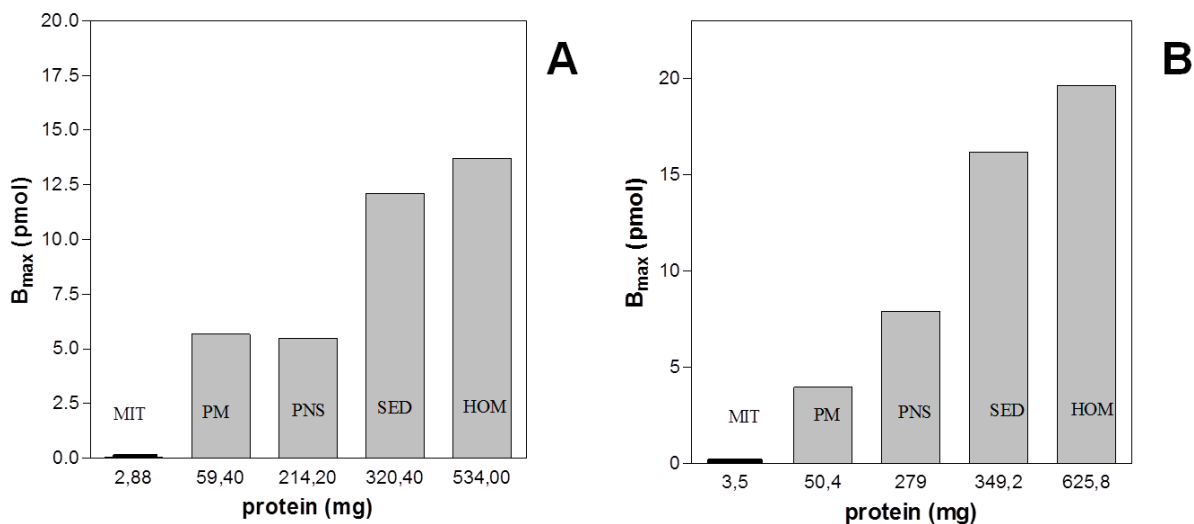
Z výsledků je zřejmé, že izolace plasmatických membrán je nezanedbatelným a důležitým krokem ve studiu vazeb radioligandů na receptory. Ze získaných hodnot maximální vazebné kapacity a zastoupení proteinů ve frakcích lze určit množství receptorů v těchto frakcích. V Tab. č. 19 (str. 67) jsou znázorněná procentuální zastoupení receptorů vztážená na množství bílkoviny ve frakci.

Tab. č. 19: Procentuální množství receptorů v jednotlivých frakcích.

	HOM	SED	PNS	SED + PNS
CTR	100%	88,30%	39,90%	128,20%
MOR	100%	82,40%	40,30%	122,70%
	PNS	PM	MITO	PM + MITO
CTR	100%	103,50%	0,72%	104,22%
MOR	100%	49,90%	0,22%	50,12%

Na obrázku č. 14 je graficky znázorněno celkové množství receptorů v jednotlivých frakcích. Na ose x je vyneseno množství proteinů v mg a na ose y maximální vazebná kapacita vyjádřená v pmolech získaná ze saturačních pokusů jednotlivých frakcí viz Obr. č. 12 (str. 64). Vyšší množství maximální vazby vyjádřené v pmolech v homogenátu a sedimentu odpovídá vyššímu množství bílkoviny v těchto frakcích oproti plasmatickým membránám. Jaderný sediment po důkladné centrifugaci může obsahovat fragmenty plasmatických membrán, nezhomogenizované buňky, kousky tkáně a jádra.

Celkové množství receptorů v různých frakcích



Obr. č. 14: Množství receptorů ve frakcích vyjádřené jako pmol [³H]DAMGO. Hodnoty maximální vazebné kapacity byly vypočteny ze saturačních pokusů v jednotlivých frakcích viz Obr. č. 12. A) vzorky kontrolních potkanů. B) vzorky potkanů podávaným morfinem.

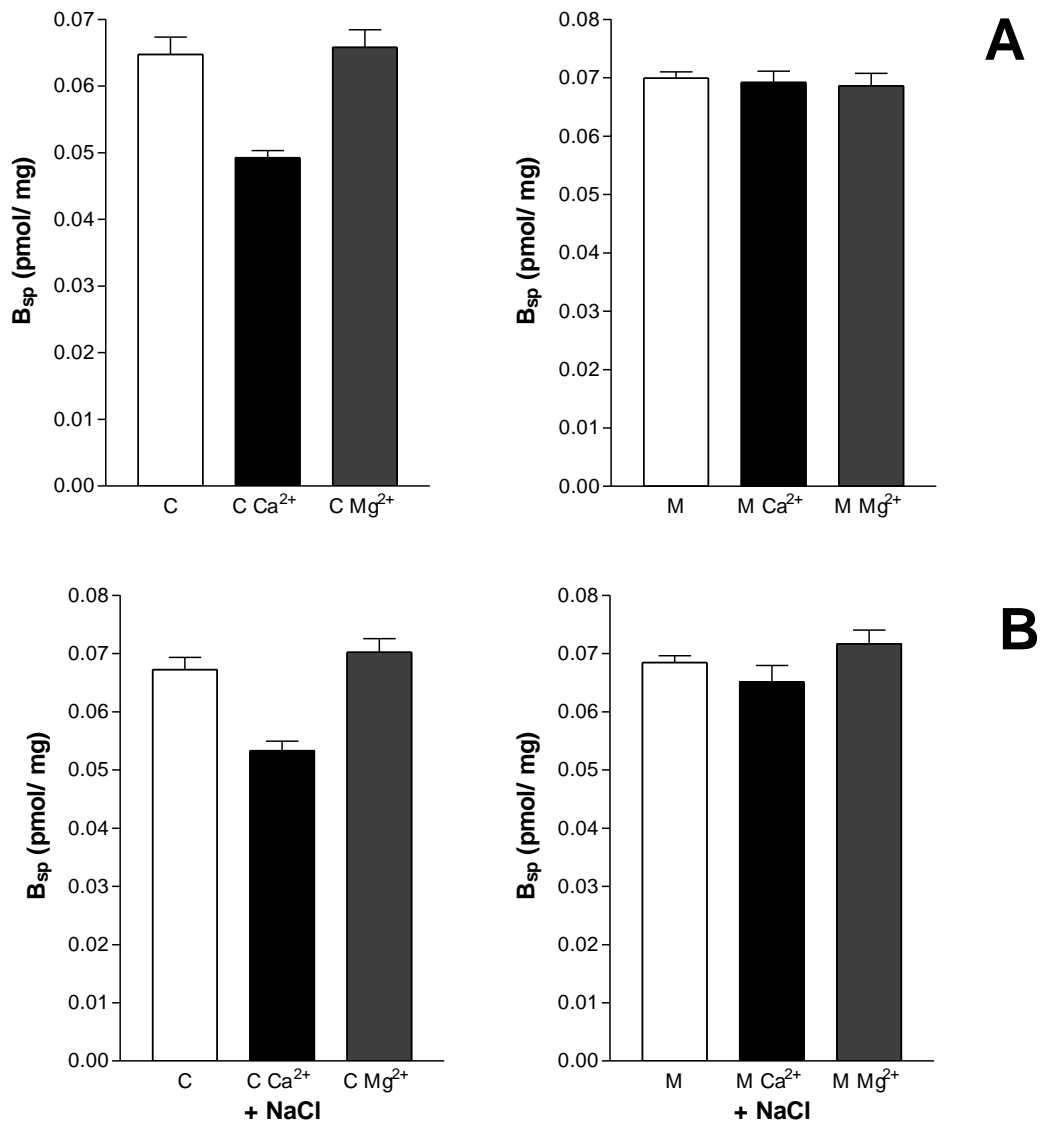
4.2.6. Jednobodové stanovení [³H]DAMGO v plasmatických membránách

Pro podrobnější studium vazby [³H]DAMGO v plasmatických membránách bylo provedeno jednobodové stanovení [³H]DAMGO. Pracovalo se pouze při jedné koncentraci radioligandu, 20 nM. Experiment se prováděl také za přítomnosti různých iontů. V Tab. č. 20 jsou hodnoty specifické vazby radioligandu B_{sp} zprůměrované ze čtyř měření.

Tab. č. 20: Průměrné hodnoty B_{sp} získané z jednobodového vazebného stanovení [³H]DAMGO v plasmatických membránách. Koncentrace radioligandu byla 20 nM. Výsledná koncentrace roztoků byla 2,5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂ 100 mM NaCl. Výsledky reprezentují průměr ± SEM, pokus byl prováděn v tetraplikátu.

PM	-	Ca ²⁺	Mg ²⁺	- +NaCl	Ca ²⁺ + NaCl	Mg ²⁺ + NaCl
C B _{sp} (pmol/ mg)	0,0659 ± 0,0026	0,0495 ± 0,0011	0,0658 ± 0,0027	0,0672 ± 0,0021	0,0533 ± 0,0016	0,0702 ± 0,0023
M B _{sp} (pmol/ mg)	0,0699 ± 0,0011	0,0692 ± 0,0019	0,0686 ± 0,0021	0,0685 ± 0,0012	0,0651 ± 0,0028	0,0717 ± 0,0024

Jednobodové stanovení [³H]DAMGO



Obr. č. 15: Jednobodové stanovení [³H]DAMGO vazby v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfinem. A) vlevo vzorky kontrolních potkanů, vpravo vzorky potkanů ovlivněných morfinem B) + NaCl, vlevo vzorky kontrolních potkanů, vpravo vzorky potkanů ovlivněných morfinem. Koncentrace [³H]DAMGO byla 20 nM. 100 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂. PM obsahovaly 120 μg proteinu/ vzorek. Měření se provádělo v tetraplikátu.

Na Obr. č. 15 je znázorněno inhibiční působení vápenatých iontů na kontrolní vzorky plasmatických membrán. Ze statistického vyhodnocení Studentského t-testu

vyplývá, že pokles vazby u kontrolních plasmatických membrán je signifikantní. Ve vzorcích M je toto inhibiční působení vápníku na vazbu agonisty odstraněno. (Tab. č. 21)

Tab. č. 21: Statistické výsledky vypočtené z jednobodového stanovení [³H]DAMGO.

typ vazby	jednobodové stanovení DAMGO					
	C	M	C + Ca ²⁺	M + Ca ²⁺	C + Mg ²⁺	M + Mg ²⁺
B _{sp} (pmol/ mg)	0.0659	0.0699	0.0495	0.0692	0.0658	0.0686
t- test (nepárový)						
P hodnota	P > 0,05		P < 0,01		P > 0,05	
signifikance	nesignifikantní		signifikantní; **		nesignifikantní	

4.2.7. Stanovení vazby [³H]DPDPE v plasmatických membránách

Z naměřených hodnot se vypočítala specifická vazba radioligandu B_{sp} a koncentrace volného radioligandu F (obdobně jako u vazby [³H]ouabainu a [³H]DAMGO). Měření se provádělo na různých membránách. C1 a M1 jsou plasmatické membrány izolované 24.11. 2012 a plasmatické membrány C2 a M2 jsou izolované 14.4. 2011.

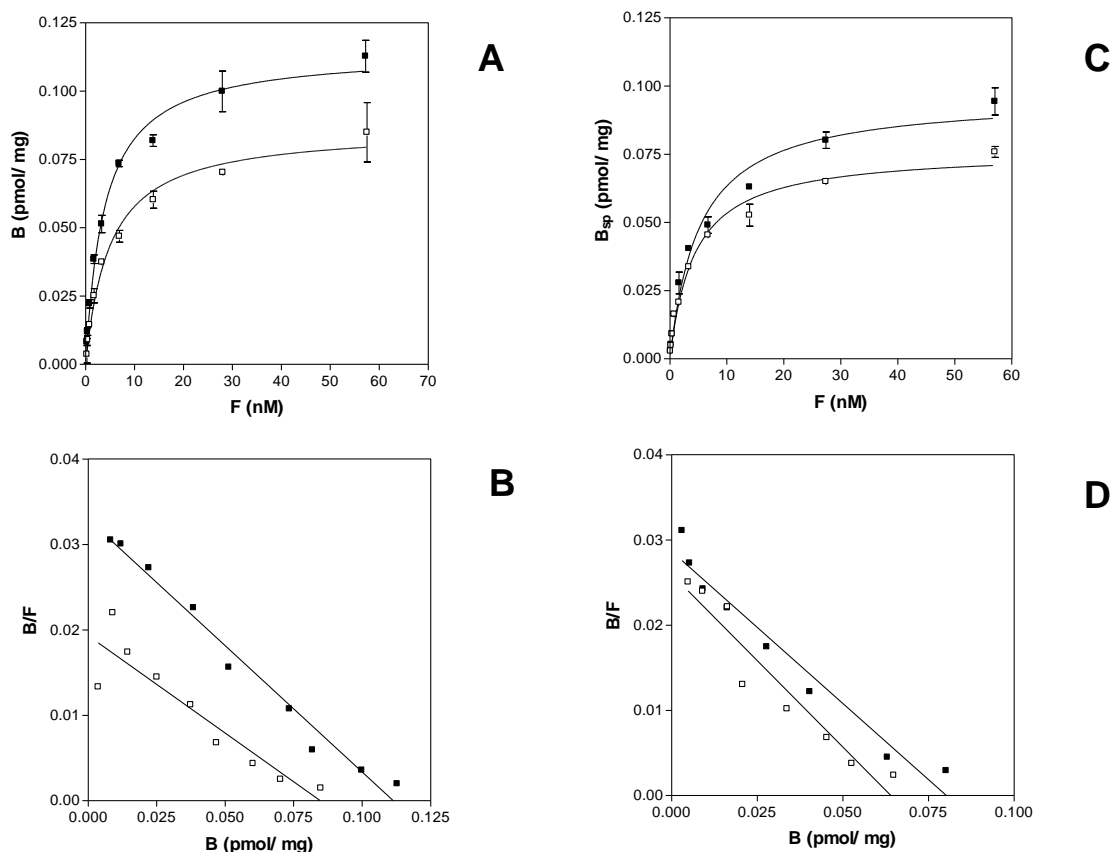
Grafické znázornění vazby [³H]DPDPE na DOR receptory v plasmatických membránách pomocí programu GraphPadPrizm je na Obr. č. 16; str. 71. Vypočítané hodnoty vazebné kapacity a disociační konstanty pro jednotlivé preparáty jsou uvedeny v Tab. č. 22.

Tab. č. 22: Výsledné hodnoty vazebné kapacity a disociační konstanty vazby [³H]DPDPE v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfinem. Hodnoty reprezentují průměr ± SEM. Pokus byl prováděn v duplikátu.

plasmatické membrány	Saturační vazebná křivka
C1 24.11. 2012	B _{max} = 0,0811 ± 0,0080 pmol/ mg K _d = 3,13 ± 1,13 nM
M1 24.11. 2012	B _{max} = 0,1292 ± 0,0050 pmol/ mg K _d = 3,56 ± 0,46 nM

C2 14.4. 2011	$B_{max} = 0,0762 \pm 0,0033 \text{ pmol/ mg}$ $K_d = 4,28 \pm 0,65 \text{ nM}$
M2 14.4. 2011	$B_{max} = 0,0962 \pm 0,0049 \text{ pmol/ mg}$ $K_d = 5,17 \pm 0,89 \text{ nM}$

Vazba [³H]DPDPE; různé plasmatické membrány



Obr. č. 16: Grafické znázornění vazby [³H]DPDPE v plasmatických membránách. A), B) Saturační vazebná křivka a Scatchardův výnos membrán C1 a M1 izolovaných 25.11. 2012. C), D) Saturační vazebná křivka a Scatchardův výnos membrán C2 a M2 izolovaných 14.4. 2011. ■ Plasmatické membrány z kortexů potkanů podávaným morfin □ Plasmatické membrány z kortexů kontrolních potkanů. Koncentrace [³H]DPDPE byla v rozpětí 0,1-57,4 nM. Koncentrace neznačeného DPDPE byla 0,1 mM pro stanovení nespecifické vazby. Koncentrace PM byla 120 mg proteinu/ vzorek. Vazebný pokus se prováděl v duplikátu.

Po zprůměrování získaných hodnot z různých plasmatických membrán byl Studentským t-testem vyhodnocen nárůst vazby agonisty u morfinových vzorků jako signifikantní, hodnota disociační konstanty se nezměnila (viz Tab. č. 23).

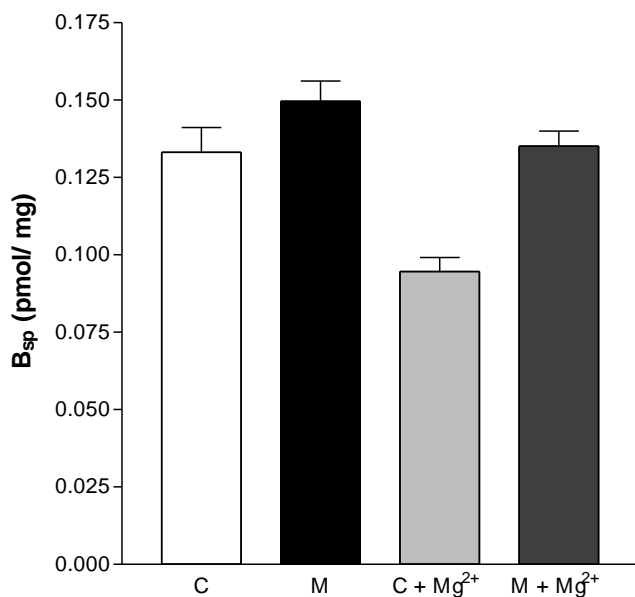
Tab. č. 23: Statistické vyhodnocení vazby [³H]DPDPE v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů podávaným morfin. Statistika byla provedena ze zprůměrovaných hodnot získaných ze saturačních pokusů plasmatických membrán izolovaných 25.11. 2012 i 14.4. 2011.

typ vazby	[³ H]DPDPE	
	C PM	M PM
B _{max} (pmol/ mg)	0,0787	0,1127
K _d (nM)	3,71	4,37
95% interval spolehlivosti pro B _{max}	0,0622-0,1001	0,0849-0,1410
95% interval spolehlivosti pro K _d	2,78-5,81	2,49-7,21
t- test (nepárový)	B _{max}	
P hodnota	P < 0,05	
signifikance	signifikantní; *	
t- test (nepárový)	K _d	
P hodnota	P > 0,05	
signifikance	nesignifikantní	

4.2.8. Jednobodové stanovení [³H]U-69593 v plasmatických membránách

Stejně provedení jako u jednobodového stanovení [³H]DAMGO bylo použito i pro toto stanovení. Rozdíl byl v tom, že měření probíhalo pouze bez a za přítomnosti hořečnatých iontů při koncentraci 30 nM radioligandu [³H]U-69593. Výsledné hodnoty se vynesly do sloupcového grafu viz Obr. č. 17, str. 73. V grafu jsou zobrazeny výsledky bez iontů i výsledky v přítomnosti hořečnatých iontů. V Tab. č. 24; str. 73 jsou pak znázorněny průměrné hodnoty specifické vazby radioligandu [³H]U-69593 v plasmatických membránách kontrolních potkanů i potkanů ovlivněných morfinem.

Jednobodové stanovení [³H]U-69593



Obr. č. 17: Jednobodové stanovení vazby [³H]U-69593 v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfinem. První dva sloupce jsou bez přítomnosti iontů, druhé dva sloupce jsou v přítomnosti hořečnatých iontů. Světlejší barva jsou vzorky kontrolních potkanů, tmavší barvy jsou vzorky izolované z kortexů potkanů ovlivněných morfinem. Koncentrace radioligandu [³H]U-69593 byla 30 nM. Výsledná koncentrace použitého roztoku MgCl₂ byla 5 mM. Koncentrace nezačteného U-69593 byla 5 · 10⁻⁵ M pro stanovení nespecifické vazby. Každé měření bylo provedeno v hexaplikátu.

Tab. č. 24: Průměrné hodnoty specifické vazby agonisty KOR receptorů v kontrolních a morfinových vzorcích plasmatických membránách bez a v přítomnosti hořečnatých iontů. Pokus byl prováděn v hexaplikátu pro beziontové prostředí i pro stanovení v přítomnosti hořečnatých iontů. Výsledky reprezentují průměr ± SEM.

PM	-	Mg ²⁺
C B _{sp} (pmol/ mg)	0,133 ± 0,008	0,095 ± 0,005
M B _{sp} (pmol/ mg)	0,150 ± 0,006	0,135 ± 0,005

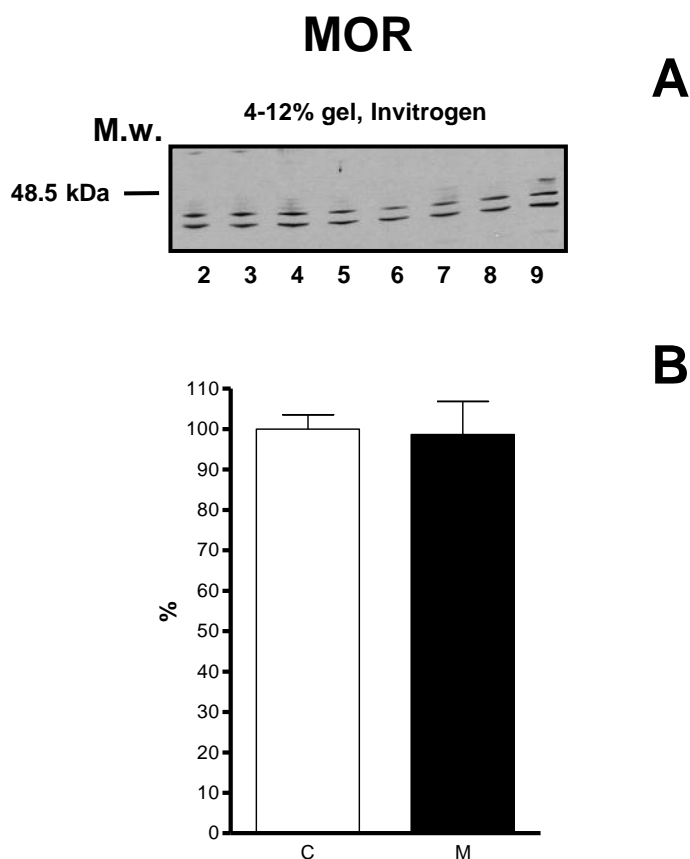
Z pohledu statistiky je nárůst vazby u morfinových vzorků signifikantní a v prostředí hořečnatých iontů je tento nárůst ještě zvýšen. (Tab. č. 25)

Tab. č. 25: Statistické vyhodnocení jednobodového testu [³H]U-69593 v plasmatických membránách z kontrolních potkanů a potkanů, kterým byl podáván morfin.

typ vazby	jednobodové stanovení [³ H]U-69593			
	C	M	C + Mg ²⁺	M + Mg ²⁺
B _{sp} (pmol/ mg)	0.133	0.15	0.095	0.135
t- test (nepárový)				
P hodnota	P < 0,05		P < 0,001	
signifikance	signifikantní; *		signifikantní; ***	

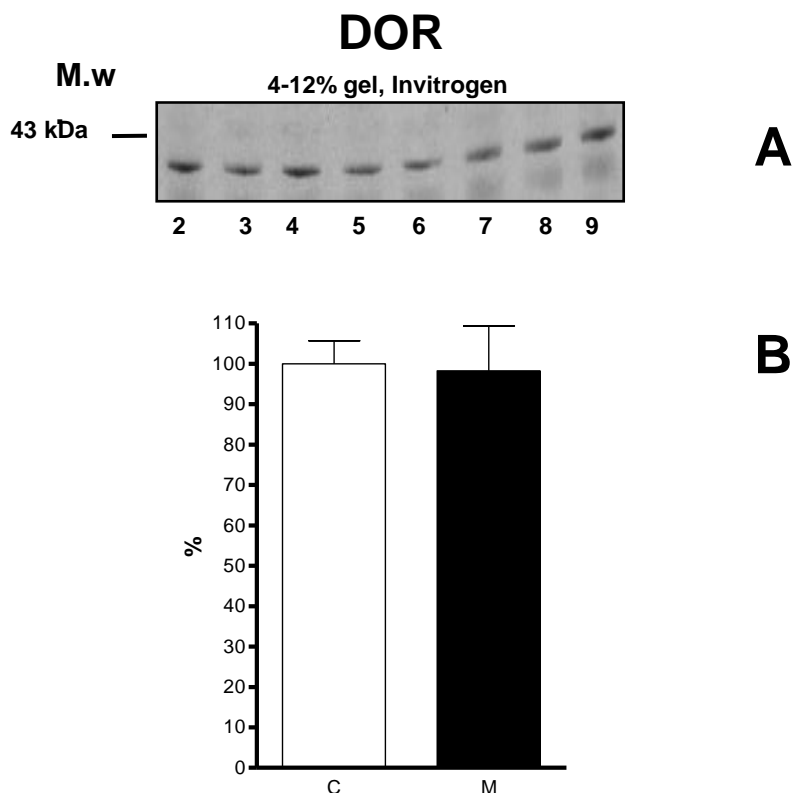
4.2.9. Elektroforéza v prostředí SDS a technika „Western blot“ pro detekci opioidních receptorů MOR, DOR a KOR v plasmatických membránách

Po provedení výše popsaného postupu (kapitola 4.1.2.9; str. 56) byly získané filmy vyhodnoceny pomocí programu Aida Image Analyzer. Číselné hodnoty se dále zpracovaly v programu GraphPadPrizm. Grafickým znázorněním jsou sloupcové grafy s procentuálním zastoupením receptorů MOR, DOR a KOR v plasmatických membránách. Na Obr. č. 18 (str. 75) jsou zobrazeny proužky získané elektroforézou v prostředí SDS a následným elektropřenosem proteinů („Western blot“). Dále je zobrazen graf pro μ-opioidní receptory.



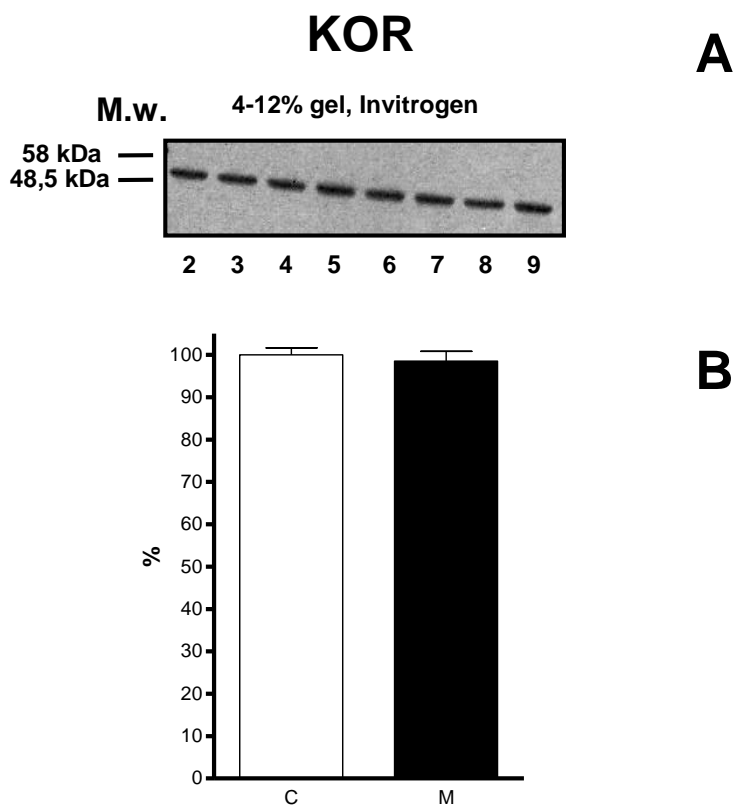
Obr. č. 18: Imunodetekce MOR receptorů v kontrolních a morfinových vzorcích plasmatických membrán. A) experimentálně získané proužky, proužky 2-5 jsou vzorky plasmatických membrán kontrolních zvířat, 6-9 jsou vzorky izolované z potkanů podávaným morfin. B) výsledný graf procentuálního zastoupení MOR receptorů ve vzorcích. Bílý sloupec představuje kontrolní vzorky, černý sloupec morfinové vzorky. Měření se provádělo v tetraplikátu.

Na následujícím obrázku (Obr. č. 19; str. 76) jsou zobrazeny výsledky imunodetekce DOR receptorů. Analogicky nejprve jsou zobrazeny proužky z filmu a dále následuje graf vyjadřující procentuální zastoupení receptorů v plasmatických membránách kontrolních potkanů i potkanů ovlivněných morfinem.



Obr. č. 19: Imunodetekce DOR receptorů ve vzorcích plasmatických membrán kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfinem. A) experimentálně získané proužky, proužky 2-5 jsou kontrolní vzorky, 6-9 jsou morfinové vzorky. B) výsledný graf s procentuálním zastoupením množství receptorů v kontrolních a morfinových vzorcích. Bílý sloupec vyjadřuje kontrolní vzorky, černý sloupec morfinové vzorky. Měření se provádělo v tetraplikátu.

Poslední obrázek znázorňuje KOR receptory (Obr. č. 20; str. 77) opět stejným způsobem. První byla provedena elektroforéza v prostředí SDS, následoval přenos proteinů technikou „Western blot“ a přenesení výsledku na film pomocí vyvolávacího přístroje. Jednotlivé proužky se vyhodnotily v příslušném počítačovém programu a vytvořil se následující sloupcový graf.



Obr. č. 20: Imunodetekce KOR receptorů v kontrolních a morfinových vzorcích získaných z kontrolních zvířat a zvířat podávaným morfin. A) experimentální proužky, proužky 2-5 kontrolní vzorky, proužky 6-9 jsou morfinové vzorky. B) výsledný graf procentuálního zastoupení KOR receptorů v plasmatických membránách kontrolních a morfinových vzorků. Bílý sloupec kontrolní vzorky, černý sloupec morfinové zorky. Měření se provádělo v tetraplikátu.

4.2.10. Statistické vyhodnocení

Získané výsledky z výše uvedených experimentů byly statisticky zpracovány. Byl proveden Studentský t-test a bylo ověřeno, které rozdíly jsou signifikantní. Dále byl uveden interval spolehlivosti 95 % pro vazebnou kapacitu a disociační konstantu viz Tab. č. 26; str. 78, kde jsou statisticky zpracované výsledky saturačních vazeb. U saturační vazby radioligandu DPDPE se výsledky z obou izolovaných membrán zprůměrovaly. Tab. č. 27, str. 78 zobrazuje signifikanci pro jednobodové stanovení v různých

prostředích. Z jednobodového stanovení DAMGO nejsou v Tab. č. 27 uvedeny výsledky v prostředí v NaCl, protože se téměř nelišily od výsledků v prostředí bez chloridu sodného. V poslední Tab. č. 28; str. 79 je uvedeno statistické vyhodnocení imunodetekce opioidních receptorů MOR, DOR a KOR.

Tab. č. 26: Statistické výsledky pro saturační vazby radioligandů

typ vazby	$[^3\text{H}]$ ouabain		$[^3\text{H}]$ DAMGO		$[^3\text{H}]$ DPDPE (průměr)	
	PM	PNS	C PM	M PM	C PM	M PM
B_{\max} (pmol/ mg)	69,09	10,59	0,0955	0,0784	0,0787	0,1127
K_d (nM)	33,18	67,46	3,83	1,85	3,71	4,37
95% interval spolehlivosti pro B_{\max}	60,52-77,66	9,446-11,72	0,0884-0,1027	0,0753-0,0815	0,0622-0,1001	0,0849-0,1410
95% interval spolehlivosti pro K_d	26,13-40,23	57,24-77,69	2,75-4,90	1,54-2,16	2,78-5,81	2,49-7,21
t- test (nepárový)	B_{\max}		B_{\max}		B_{\max}	
P hodnota	P < 0,001		P < 0,05		P < 0,05	
signifikance	signifikantní; ***		signifikantní; *		signifikantní; *	
t- test (nepárový)	K_d		K_d		K_d	
P hodnota	P < 0,001		P > 0,05		P > 0,05	
signifikance	signifikantní; ***		nesignifikantní		nesignifikantní	

Tab. č. 27: Statistické výsledky jednobodových vazebných stanovení radioligandů

typ vazby	jednobodové stanovení $[^3\text{H}]$ DAMGO						jednobodové stanovení $[^3\text{H}]$ U-69593			
	C	M	C + Ca^{2+}	M + Ca^{2+}	C + Mg^{2+}	M + Mg^{2+}	C	M	C + Mg^{2+}	M + Mg^{2+}
B_{sp} (pmol/ mg)	0.0659	0.0699	0.0495	0.0692	0.0658	0.0686	0.133	0.15	0.095	0.135
t- test (nepárový)										
P hodnota	P > 0,05		P < 0,01		P > 0,05		P < 0,05		P < 0,001	
signifikance	nesignifikantní		signifikantní; **		nesignifikantní		signifikantní; *		signifikantní; ***	

Tab. č. 28: Statistické vyhodnocení výsledků z imunodetekce MOR, DOR, KOR receptorů

typ vazby	MOR		DOR		KOR	
	C	M	C	M	C	M
B _{sp} (%)	100 %	99 %	100 %	98 %	100 %	99 %
t- test (nepárový)						
P hodnota	P > 0,05		P > 0,05		P > 0,05	
signifikance	nesignifikantní		nesignifikantní		nesignifikantní	

5. Diskuze

Přírodní alkaloid morfin se váže na opioidní receptory společně s dalšími exogenními a endogenními opioidy. Silné analgetické účinky morfinu jsou v medicíně cenným nástrojem při léčbě bolesti. Bohužel vznik tolerance a silná závislost na tomto alkaloidu je problémem, který vyžaduje další studium. Doposud nebyla nalezena taková látka, která by měla tak silné analgetické účinky jako morfin, ale zároveň by nevyvolávala závislost. Současný výzkum se zaměřil zejména na μ -opioidní receptory, které zprostředkovávají hlavní fyziologické účinky morfinu a hrají roli v rozvíjení závislosti na droze [41, 42]. Proto i tato práce se zabývala především μ -opioidními receptory a vazbou agonisty DAMGO právě na tyto receptory.

Po desetidenní aplikaci morfia potkanům, byly izolovány plasmatické membrány kortexu potkana z biologického materiálu. Ve studii [5] byly studovány různé typy izolací plasmatických membrán. Izolace v přítomnosti neiontového detergentu Triton X100 způsobila kompletní inhibici agonistou stimulované GTPasové aktivity a vazby GTP γ S. Membrány získané bez přítomnosti detergentů vykazovaly vyšší aktivitu a bylo pozorováno spřažení receptoru s G proteinem [5]. Proto byl pro izolaci zvolen percollový gradient a nepoužil se neiontový detergent Triton X100, který by mohl narušit membrány a domény citlivé k detergentům. Také nebyl aplikován ultrazvuk.

Po úspěšné izolaci plasmatických membrán byla stanovena jejich čistota v přítomnosti triciem značeného ouabainu. Ouabain je glykosid, který se řadí mezi kardiotonické deriváty [72]. Tento srdeční glykosid je inhibitorem pumpy Na⁺/K⁺ATPasy. Sodno-draselná pumpa je hojně zastoupená v plasmatických membránách, a proto stanovení vazby radioaktivně značeného ouabainu poskytuje informace o čistotě membrán. Měření ouabainové vazby se provádělo v izolovaných plasmatických membránách i v postnukleárním supernatantu kontrolních vzorků, aby se porovnala čistota v obou preparátech. Výsledky 4.2.3. jasně ukazují, že ve vzorcích plasmatických membrán je ouabainová vazba výrazně vyšší oproti postnukleárnímu supernatantu. Z těchto výsledků vyplývá, že preparát plasmatických membrán je téměř sedmkrát čistší (***, P < 0,001) než postnukleární supernatant vzhledem k velikosti vazby specifického ukazatele čistoty. Izolace plasmatických membrán z postnukleárního supernatantu je tedy podstatným

krokem k získání čistého preparátu pro následující studium vazeb radioligandů na opioidní receptory.

Následující část práce byla zaměřena na μ -opioidní receptory a sledování vazby agonisty [^3H]DAMGO v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů podávaným morfin v beziontovém prostředí. U saturační vazebné křivky byl pozorován pokles maximálního počtu vazebných míst v morfinových vzorcích oproti kontrolním. Toto snížení vazby u morfinových vzorků bylo stanoveno jako pokles na 82 % oproti kontrolám (100 %). Úbytek byl statisticky vyhodnocen jako signifikantní (*, $P < 0,05$). Disociační konstanta K_d nevykazovala signifikantní změnu, tudíž se afinita vazebných míst pravděpodobně nezměnila. Pokles vazebných míst u μ -opioidních receptorů v přítomnosti agonisty DAMGO by mohla vyvolat endocytóza, která byla pozorována také ve studii [51], popsáno v kapitole 2.5.3. μ -opioidní receptory, MOR viz výše.

Kromě studia receptorů v plasmatických membránách jsme se zaměřili i na vazbu agonisty DAMGO na MOR receptory v jednotlivých frakcích získaných při izolaci plasmatických membrán. Jednotlivé frakce jsou zobrazeny na Obr. č. 9; str. 41. Z grafického znázornění saturační vazby v jednotlivých frakcích lze vyčíst jasný rozdíl v množství vazebných míst u plasmatických membrán oproti ostatním frakcím (Obr. č. 12; str. 64 a Obr. č. 13; str. 66) Dále bylo vypočteno procentuální zastoupení receptorů v jednotlivých frakcích (Tab. č. 19; str. 67) z pohledu 100 % zastoupení receptorů v homogenátu a nebo 100 % množství receptorů v postnukleárním supernatantu. Pokud bylo 100 % množství receptorů v homogenátu, lze pozorovat vyšší procentuální zastoupení receptorů v jaderném sedimentu oproti postnukleárnímu supernatantu. Na druhou stranu podle Obr. č. 14; str. 67 má jaderný sediment dvojnásobné množství bílkovin na rozdíl od postnukleárnímu supernatantu, a proto množství receptorů se může zdát vyšší. Jaderný sediment obsahuje nezhomogenizované buňky, jádra včetně jaderných bílkovin a může obsahovat i fragmenty plasmatických membrán. U druhého výpočtu, kde byl postnukleární supernatant počítán jako 100 % zastoupení receptorů, lze vidět jasný rozdíl v celkovém množství receptorů v plasmatických membránách ve srovnání s mitochondriální frakcí. Pokles celkového počtu receptorů v plasmatických membránách připravených z kortexů potkanů podávaným morfin lze vysvětlit jako zvýšené odbourávání („down-regulace“) MOR vlivem dlouhodobé expozice organismu vysokým dávkám morfinu. Změny v plasmatické membráně začínají jako zvýšený převod receptorů do endosomů [51] s tím,

že se při opakovaném a dlouhodobém dráždění ještě více oslabí recyklační cesta k plasmatické membráně (která je u MOR inherentně nízká), dochází k ubiquitinylation receptoru a konečně hydrolytické degradaci MOR v lysosomech. Důvodem pro zvýšenou degradaci MOR může být rovněž přepolování signálních morfinem-ovlivňovaných signálních kaskád z MOR na DOR a KOR. Nepotřebné MOR jsou odbourány. Závěrem lze říci, že izolace plasmatických membrán bez neiontových detergentů je důležitým purifikačním krokem, který je třeba provést před zahájením vazebných pokusů s radioligandy s cílem zvýšit specifickou vazbu na receptor při vztažení na mg membránových bílkovin.

Pro podrobnější a detailnější studium MOR receptorů a vazby agonisty DAMGO bylo provedeno jednobodové stanovení s vazbou [³H]DAMGO v plasmatických membránách kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfinem, viz výsledky kapitola 4.2.6. Měření se provádělo bez NaCl a v přítomnosti 100 mM NaCl, protože sodné ionty vyvolávají inhibici vazby. Podle Emmersona a jeho spolupracovníků [45] přítomnost sodných iontů snižuje maximální vazebnou kapacitu u opioidních receptorů. Dále byl experiment prováděn v přítomnosti vápenatých nebo hořečnatých iontů. V prostředí s vápenatými ionty se u kontrolních plasmatických membrán projevila inhibice vazby neboli snížení počtu vazebných míst pro agonistu DAMGO na 69 % v porovnání s kontrolními vzorky plasmatických membrán v beziontovém prostředí (100 %) (**, $P < 0,01$). U morfinových vzorků se žádná inhibice neprojevila. U vzorků zvířat, kterým byl podáván morfin, se změnila citlivost vápenatých iontů k receptoru. Možné přizpůsobení ligandu, tak aby se vázal na receptor, mohou ovlivňovat ionty jako Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} . Tyto ionty jsou obsaženy v signifikantní koncentraci v extracelulární tekutině. Studie poukazují, že tyto ionty mohou regulovat interakci ligandu a receptoru u opioidních receptorů [73, 74]. Existuje tzv. vápníková hypotéza: 1. navázáním vápenatého iontu na ligand se aktivuje jeho konformace pro vazbu na receptor. 2. po navázání ligandu na receptor vznikne ternární komplex (ion-ligand-receptor), který zprostředkovává signální transdukcii. Ligand se váže na vápenaté ionty v nepolárním rozpouštědle a transportuje tyto ionty přes membránu [75]. U MOR receptorů tedy pravděpodobně dochází k ovlivnění ligandu vápenatými ionty. Vápenaté ionty také snižují schopnost receptoru aktivovat G protein. Tato inhibice je však jiná než u sodných iontů. U vzorků plasmatických membrán z potkanů podáváním morfin je inhibice vápníkem potlačena. Jedno z vysvětlení

nasvědčuje ovlivnění opioidních receptorů morfinem a tudíž změně interakce mezi receptorem a vápenatými ionty. Hořečnaté ionty by měly vazbu radioliogandů podporovat. U MOR receptorů hořečnaté ionty neovlivňují vazbu agonisty významně, protože se vazba v přítomnosti hořečnatých iontů téměř nelišila od vazby bez iontů. Na rozdíl od KOR receptorů, kde významnější změna pozorována byla (viz dále). Již při studiu saturační vazby agonisty DAMGO jsou signifikantní změny menšího rozsahu a proto předpokládáme, že u jednovazebného stanovení se tyto relativně malé změny nemusí projevit.

Další úsek experimentů se zabýval vazbou radioaktivně značeného agonisty DPDPE na δ -opioidní receptory. Pokus se prováděl na dvou typech plasmatických membrán získaných z odlišných experimentálních potkanů. (výsledky 4.2.7.) Cílem bylo zopakovat výsledky vazby triciem značeného DPDPE z práce Ujčíkové a spolupracovníků [47] a porovnat různé plasmatické membrány. Výsledky 4.2.7. popisují nárůst vazby radioaktivně značeného agonisty u membrán izolovaných z kortexů potkanů ovlivněných morfinem v porovnání s kontrolními vzorky. V Tab. č. 22, str 70 jsou uvedeny hodnoty maximálního počtu vazebných míst B_{max} a disociační konstanty K_d . V předešlé práci [47] je uveden nárůst vazebné kapacity B_{max} u morfinových plasmatických membrán (2,1 krát vyšší) oproti kontrolním vzorkům. Z hodnot získaných našimi experimenty byl spočítán nárůst u morfinových vzorků 1,6 krát u membrán z 24.11. 2012 a 1,3 krát u membrán z 14.4. 2011. U vazby [3 H]DPDPE v plasmatických membránách z potkanů ovlivněných morfinem byl tedy nárůst na 130 % - 160 % (*, $P < 0,05$). Hodnota disociační konstanty zůstala nezměněna. Zvýšení vazebné kapacity u morfinových vzorků se mírně lišilo mezi membránami z různým datem izolace. Důvodem, proč se nárůst liší mezi jednotlivými preparáty plasmatických membrán může být opětovné zmrazení a rozmrazení preparátů. Z toho vyplývá, že pro přesnější stanovení vazby agonisty v plasmatických membrán je důležitá jejich intaktnost. Vazba agonisty, na rozdíl od vazby antagonisty, je citlivá k jakémukoliv narušení plasmatických membrán a možnému rozpřažení receptorů s G proteiny. Významné rozdíly mezi různými preparáty PM mohou být rovněž způsobeny různým chovem zvířat (Charles River, Fyziologický ústav AV ČR, Velaz), nutričními podmínkami a ročním obdobím. V každém případě zvýšení množství vazebných míst pro agonistu DOR receptorů může být způsobeno kompenzační reakcí která je následkem

desenzitizace MOR receptorů a poklesem počtu vazebných míst MOR receptorů v plasmatických membránách.

Dalším cílem práce bylo změřit vazbu agonisty U-69593 κ -opioidních receptorů v plasmatických membránách kortexu potkana. Pro tento experiment jsme zvolili opět jednobodové vazebné stanovení v přítomnosti jednotné koncentrace radioligandu 30 nM a +/- v prostředí hořečnatých iontů. Výsledkem byl nárůst specifické vazby radioligandu u morfinových vzorků oproti kontrolním. Tento nárůst byl také rozdílný v přítomnosti hořečnatých iontů oproti beziontovému prostředí. V prostředí bez iontů hořčíku sice byly hodnoty vazebné kapacity radioligandu vyšší, ale rozdíl mezi kontrolními a morfinovými vzorky byl menší. Nárůst u morfinových vzorků byl 113 % (*, $P < 0,05$) ve srovnání s kontrolami (100 %). V prostředí hořčíku byl rozdíl vazby mezi morfinovými a kontrolními vzorky plasmatických membrán signifikantně významnější, nárůst u plasmatických membrán izolovaných z potkanů ovlivněných morfinem dosahoval 142 % (***, $P < 0,001$). Hořečnaté ionty sice snížily specifickou vazbu agonisty na KOR receptory, ale zároveň zvětšily rozdíl těchto specifických vazeb mezi plasmatickými membránami kontrolních zvířat a zvířat ovlivněných morfinem. Předpokládá se jistá regulace KOR receptorů těmito ionty. Závěrem lze říci, že pokles maximálního počtu vazebných míst u MOR receptorů, je nejen kompenzován nárůstem vazebné kapacity u KOR receptorů, ale zároveň i nárůstem vazby u KOR receptorů. Tyto fyziologické změny by mohly být odpovědí organismu na dlouhodobé podávání morfinu a adaptací živého systému na zvyšující se dávky tohoto opioidu.

Na závěr práce byla provedena elektroforéza v prostředí SDS a „Western blot“ všech tří typů opioidních receptorů. Z výsledků získaných z vyhodnocených proužků bylo zjištěno, že nedochází k žádné změně v množství přítomných receptorů v plasmatických membránách z kortexů kontrolních a morfinových experimentálních zvířat. To potvrzuje fakt, že se neliší hustota receptorů u plasmatických membrán vzorků kontrolních i morfinových, pravděpodobně dochází ke změně vazby, ať už snížením nebo zvýšením vazby v důsledku desenzitizace a endocytózy.

6. Závěr

Diplomová práce byla rozdělena do několika částí. První část se zaměřila na izolaci plasmatických membrán z mozku potkana (intramuskulárně podáván morfin nebo fyziologický roztok). Porovnali jsme vazbu triciem značeného ouabainu v postnukleárním supernatantu a v plasmatických membránách u kontrolních vzorků. Ouabain jako ukazatel čistoty preparátů jasně detekoval plasmatické membrány téměř sedmkrát čistším preparátem než postnukleární supernatant.

Následující část diplomové práce byla nejobsáhlejší. Zabývali jsme se μ -opioidními receptory, které hrají nejdůležitější roli v působení morfia. Nejdříve jsme stanovili saturační vazebnou křivku radioaktivně značeného agonisty DAMGO v plasmatických membránách kontrolních i morfinových v beziontovém prostředí a zaznamenali jsme pokles vazebné kapacity u morfinových vzorků na 82 % (*, $p < 0,05$) a zároveň se disociační konstanta významně nelišila. Podrobnou analýzou jednotlivých frakcí získaných při izolaci se nám podařilo prokázat podstatu kroku frakcionace homogenátu a izolace membrán jako nedílnou součást studia vazeb radioligandů v mozku potkana. Celkové množství receptorů a saturační vazebné křivky frakcí jasně ukazují čistotu plasmatických membrán a výskyt MOR receptorů.

Jednobodovým vazebným stanovením při jednotné koncentraci [3 H]DAMGO jsme studovali vliv vápenatých a hořečnatých iontů na vazbu agonisty na MOR receptory a to v prostředí +/- chloridu sodného. V přítomnosti hořečnatých iontů žádná změna pozorována nebyla. Vápenaté ionty způsobily snížení specifické vazby u plasmatických membrán kontrolních potkanů na 69 % vzhledem ke kontrolním vzorkům v beziontovém prostředí (100 %) (**, $P < 0,01$). U preparátů z potkanů podáváním morfin však tato inhibice byla potlačena. Vliv iontů na vazbu ligandu na receptor a ovlivnění přenosu signálu u μ -opioidních receptorů by mohlo být zajímavým předmětem dalšího studia.

V další části práce jsme zopakovali výsledky vazby agonisty DPDPE opět značeného triciem v plasmatických membránách kontrolních i morfinových vzorků z předešlého roku. Podařilo se nám znovu prokázat nárůst vazebné kapacity u plasmatických membrán izolovaných z potkanů ovlivněných morfinem. I když tento nárůst byl menší oproti výsledkům starších experimentů, byl významný (*, $P < 0,05$). Důvodem rozdílného nárůstu vazby agonisty pro DOR receptory u morfinových vzorků jsou odlišné plasmatické membrány, které byly již několikrát rozmrazeny a opět zamrazeny. Tento

výsledek poukazuje na citlivost plasmatických membrán k vnějším vlivům a na důležitost intaktности plasmatických membrán pro přesnější stanovení dat z experimentů.

Posledním opioidním receptorem, který jsme studovali v této práci, byl κ -opioidní receptor. Provedli jsme jednobodové vazebné stanovení při konstantní koncentraci radioaktivně značeného agonisty KOR receptorů a to jak v prostředí bez iontů tak v přítomnosti hořčičných iontů. V obou případech došlo k nárůstu vazebné kapacity u plasmatických membrán izolovaných z kortexů potkanů podávaným morfinem oproti kontrolním potkanům. Bez iontů byl nárůst vazby u morfinových vzorků na 113 % (*, $P < 0,05$). Hořčičné ionty tento nárůst ještě více zesílily (142 % , ***, $P < 0,001$). Vliv hořčičku na κ -opioidní receptory je zřejmý na rozdíl od μ -opioidních receptorů, kde se žádná výrazná změna neprojevila. Budoucí výzkum κ -opioidních receptorů by se mohl zaměřit na zkoumání vlivu i dalších iontů na tyto receptory. κ -opioidní receptory by mohly být také předmětem dalšího studia vlivu léčiv (např. antidepresiv a jiných psychofarmak), která se také pravděpodobně vážou na tyto receptory a spouští určitou signalizační dráhu [67].

Závěrem práce jsme si potvrdili výskyt δ - , μ - , κ -opioidních receptorů ve vzorcích plasmatických membránách kontrolních potkanů i potkanů ovlivněných morfinem metodou imunodetekce, neboli v prvním kroku elektroforézou v prostředí SDS a následnou technikou „Western blot“. U všech třech typů opioidních receptorů nedošlo ke změně zastoupení těchto receptorů v kontrolních a morfinových vzorcích. Všechny imunodetekční výsledky vykazovaly stejné množství receptorů v obou plasmatických membránách, tedy jak v membránách kontrolních potkanů, tak u potkanů ovlivněných morfinem.

Seznam použité literatury

- 1) Walwyn W.M., Miotto K. A., Evans Ch. J.: Drug. Alcohol Depend. 108, 156-165 (2010)
- 2) <http://www.historie-drog.apu.cz/index.html>, (5.3 2013)
- 3) Dowhan W., Bogdanov M., Mileykovskaya E.: Functional roles of lipids in membranes v knize Biochemistry of lipids, Lipoproteins and Membranes, 5th edition; Elsevier, Amsterdam (The Netherlands), Oxford (UK), str. 2-12 (2008)
- 4) Obšil T. *Biofyzikální chemie I*, přednáška na PřF UK, katedra fyzikální a makromol. chemie, Praha (2012)
- 5) Bouřová L., Kostrnová A., Hejnová L., Moravcová Z., Moon H., Novotný J., Milligan G., Svoboda P.: Journal of Neurochemistry 85, 34-49 (2003)
- 6) Štefl B.: Obecná farmakologie, Skriptum PřF UK Praha, str. 8-26 (2005)
- 7) Lauffenburger D. A., Linderman J. J.: Cell Surface Receptor/ Ligand Binding Fundamentals; Signal Transduction v knize Receptors; Oxford University Press, New York (USA), str. 9-15, 24-30, 185-187 (1993)
- 8) Selley D. R., Strasser R. H., Benovic J. L., Daniel K., Lefkowitz R. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 9408-9412 (1998)
- 9) Magalhaes A. C., Dunn H., Ferguson S. SG.: British Journal of Pharmacology 165, 1717-1736 (2012)
- 10) Ji T. H., Grossmann M., Ji I.: The Journal of Biological Chemistry 273, 17299-17302 (1998)
- 11) Liu R., Paxton W. A., Choe S., Ceradini D., Martin S. R., Horuk R. M., MacDonald M. E., Stuhlmann H., Koup R. A., Landau N. R.: Cell 86, 367-377 (1996)
- 12) Lefkowitz R. J., Cotecchia S., Samana P., Costa T.: Trends in Pharmacological Sciences 14, 303-307 (1993)
- 13) Wess J.: FASEB Journal 11, 346-354 (1997)

- 14) Scheer A., Fanelli F., Costa T, Benedetti P. G., Cotechia S.: EMBO Journal 15, 3566-3578 (1996)
- 15) Lullmann H., Mohr K., Hein L.: Atlas farmakologie, Grada Praha (2007)
- 16) Gether U., Kobilka B. K.: The Journal of Biological Chemistry 273, 17979-17982 (1998)
- 17) Milligan G.: Molecular Pharmacology 66, 1-7 (2004)
- 18) Marshall F. H., Jones K. A., Kaupmann K., Bettler B.: Trends in Pharmacological Sciences 20, 396-399 (1999)
- 19) Cvejic S., Devi L. A.: The Journal of Biological Chemistry 272, 26959-26964 (1997)
- 20) Hebert T. E., Moffett S., Morrello J. P., Loisel T. P., Bichet D. G., Barret C., Bouvier M.: The Journal of Biological chemistry 271, 16384-16392 (1996)
- 21) Bohn L. M., Lewkowitz R. J., Gainetdinov K. P., Peppel K., Caron M. G., Lin F-T.: Science 286, 2495-2497 (1999)
- 22) Shenoy S. K., Lefkowitz R. J.: Biochemical Journal 375, \$ 503-515 (2003)
- 23) Ferguson S. S. G.: Pharmacological Reviews 53, 1-24 (2001)
- 24) Luttrell L. M.: Molecular Biotechnology 39, 239-264 (2008)
- 25) Lefkowitz R. J.: The Journal of Biological Chemistry 273, 18677-18680 (1998)
- 26) Hausdorff W. P., Marc G. C., Lefkowitz R. J.: The FASEB Journal 4, 2881-2889 (1990)
- 27) Claing A., Laporte S. A., Caron M. G., Lefkowitz R. J.: Neurobiology 66, 61-79 (2002)
- 28) Goodman O. B., Jr, Krupnick J. G., Santini F., Gurevich V. V., Penn R. B., Gagnon A. W., Keen J. H., Benovic J. L.: Nature 383, 447-450 (1996)
- 29) Lin F-T., Krueger K. M., Kendall H. E., Daaka Y., Fredericks Z. L., Pitcher J. A., Lefkowitz R. J.: The Journal of Biological Chemistry 272, 31051-31057 (1997)

- 30) Sibley D. R., Strasser R. H., Benovic J. L., Daniel K., Lefkowitz R. J.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83, 9408-9412 (1986)
- 31) Luttrell L. M.: Molecular Biotechnology 39, 239-264 (1997)
- 32) Gutkind J. S.: The Journal of Biological Chemistry 273, 1839-1842 (1998)
- 33) Takai Y., Sasaki T., Matozaki T.: Physiological Reviews 81, 153-207 (2001)
- 34) Magalhaes A. C., Dunn H., Ferguson S. S. G.: British journal of Pharmacology 165, 1717-1736 (2012)
- 35) Alt A., Mansour A., Akil H., Medzihradsky F., Traynor J. R., Woods J. H.: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 286, 282-288 (1998)
- 36) Evans C. J., Keith D. E. Jr., Morrison H., Magendzo K., Edwards R. H.: Science 258, 1952-1955 (1992)
- 37) Kieffer B. L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Hirth C. G.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 12048-12052 (1992)
- 38) Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley JA, Yu L.: Molecular Pharmacology 44, 8-12 (1993)
- 39) Whistler J. L., von Zastrow M.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 9914-9919 (1998)
- 40) Granier S., Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Weis W. I., Kobilka B. K.: Nature 485, 400-405 (2012)
- 41) Kieffer B. L.: Trends in Pharmacological Sciences 20, 19-26 (1999)
- 42) Kieffer B. L., Gavériaux-Ruff C.: Progress in Neurobiology 66, 285-306 (2002)
- 43) Patierno S., Anselmi L., Jaramillo I., Scott D., Garcia R., Sternini C.: Gastroenterology 140, 618-626 (2011)
- 44) Ko M. C. H., Lee H., Harrison C., Clark M. J., Song H. F., Naughton N. N., Woods J. H., Traynor J. R.: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 306, 179-186 (2003)

- 45) Emmerson P. J., Liu M.-R., Woods J. H., Medzihradsky F.: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 271, 1630-1637 (1994)
- 46) Bouřová L., Vošahlíková M., Kagan D., Dlouhá K., Novotný J., Svoboda P.: Medical Science Monitor (2010)
- 47) Ujčíková H., Dlouhá K., Roubalová L., Vošahlíková M., Kagan D., Svoboda P.: Biochimica et Biophysica Acta 1810, 1220-1229 (2011)
- 48) Nestler E. J., Alreja M., Aghajanian G. K.: Brain Research Bulletin 35, 521-528 (1994)
- 49) Fábrián G., Bozó B., Szikszay M., Horváth G., Coscia C. J., Szöcs M.: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 302, 774-780 (2002)
- 50) Selley D. E., Liu Q., Childers S. R.: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 285, 496-505 (1998)
- 51) He L., Fong J., von Zastrow M., Whistler L.: Cell 108, 271-282 (2002)
- 52) Silva-Moreno A., Gonzales-Espinosa C., León-Olea M., Cruz S. L.: European Journal of Pharmacology 674, 239-247 (2011)
- 53) Jordan B. A., Trapaidze N., Gomes I., Nivarthi R., Devi L. A.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 343-348 (2001)
- 54) Wang D., Sun X., Bohn L. M., Sadeé W.: Molecular Pharmacology 67, 2173-2184 (2005)
- 55) Berger A. c., Whistler J. L.: Annals of Neurology 67, 559-569 (2010)
- 56) Pfeiffer M., Kirscht S., Stumm R., Koch T., Wu D., Laugsch M., Schröder H., Höllt V., Schulz S.: The Journal of Biological Chemistry 278, 51630-51637 (2003)
- 57) Raffa R. B., Martinez R. P., Conelly C. D.: European Journal of Pharmacology 258, R5-R7 (1994)
- 58) Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Mathiesen J. M., Sunahara R. K., Pardo L., Weis W. I., Kobilka B. K., Granier S.: Nature 485, 321-326 (2012)
- 59) Sittl R., Nuijten M., Poulsen Nautrup B.: Clinical Therapeutics 28, 1144-1154 (2006)

- 60) Wang D., Surrat C. K., Sadée W.: *Journal of Neurochemistry* 75, 763-771 (2000)
- 61) von Zastrow M., Svingos A., Haberstock-Debic H., Evans C.: *Current Opinion in Neurobiology* 13, 348-353 (2003)
- 62) Bohn L. M., Gainetdinov R. R., Lin F.-T., Lefkowitz R. J., Caron M. G.: *Nature* 408, 720-723 (2000)
- 63) Bohn L. M., Lefkowitz R. J., Caron M. G.: *The Journal of Neuroscience* 22, 10494-10500 (2002)
- 64) Terman G. W., Jin W., Cheong Y.-P., Lowe J., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Chavkin C.: *British Journal of Pharmacology* 141, 55-64 (2004)
- 65) Walwyn W., Evans C. J., Hales T. G.: *The Journal of Neuroscience* 27, 5092-5104 (2007)
- 66) Dang V. C., Christie M. J.: *British Journal of Pharmacology* 165, 1704-1716 (2012)
- 67) Carlezon Jr W. A., Béguin C., Knoll A. T., Cohen B. M.: *Pharmacology and Therapeutics* 123, 334-343 (2009)
- 68) Roth B. L., Baner K., Westkaemper R., Siebert D., Rice K. C., Steinberg S., Ernsberger P., Rothman R. B.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11934-11939 (2002)
- 69) Wu H., Wacker D., Katritch V., Mileni M., Han G. W., Vardy E., Liu W., Thompson A. A., Huang X.-P., Carrol I., Mascarella S. W., Westkaemper R. B., Mosier P. D., Roth B. L., Cherezov V., Stevens R. C.: *Nature* 485, 327-332 (2012)
- 70) Dvořák Z., http://inovace-mbb.upol.cz/files/vyukovy-portal/bunecna_biologie_2/kbb-bb2_03.pdf, (27.3.2013)
- 71) Bouřová L., Stohr J., Lisý V., Rudajev V., Novotný J., Svoboda P.: *Medical Science Monitor* 15, 111-122 (2009)
- 72) Sandtner W., Egwolf B., Khalili-Araghi F., Sánchez-Rodríguez J. E., Roux B., Bezanilla F., Holmgren M.: *The Journal of Biological Chemistry* 286, 38177-38183 (2011)

- 73) Kinouchi K., Standifer K.M., Pasternak G. W.: *Biochemical Pharmacology* 40, 382-384 (1990)
- 74) Pasternak G. W., Snowman A. M., Snyder S. H.: *Molecular Pharmacology* 11, 735-744 (1975)
- 75) Anathanarayanan V. S., Kerman A.: *Molecular and Cellular Endocrinology* 246, 53-59 (2006)

