

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program – Biochemie

Studijní obor – Biochemie



Kristína Cechová

## Funkční aktivita opioidních receptorů v membránových doménách

## Functional activity of opioid receptors in membrane domains

Bakalářská práce

Konzultant: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

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

Praha, 2014 Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

**Prohlášení:**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Svobody DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 15. 8. 2014

.....

Kristína Cechová

**Poděkování:**

Chtěla bych tímto poděkovat doc. RNDr. Petru Svobodovi DrSc. za odborné vedení a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Ujčíkové, Ph.D., Ing. Kateřině Stolařové a Mgr. Dmytrovi Kaganovi za veškerou pomoc a prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za cenné rady při sepisování této práce.

## Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
2.1. MORFIN.....	10
2.2. STRUKTURA OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ.....	10
2.3. FUNKCE, AKTIVITA A SIGNÁLNÍ SYSTÉM OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ.....	13
2.3.1. <i>Inhibice /superaktivace adenylylcyklasy</i> .....	13
2.3.2. <i>Ovlivnění iontových kanálů</i> .....	14
2.4. REGULAČNÍ PROCESY: DESENZITIZACE, INTERNALIZACE, DOWNREGULACE.....	16
2.4.1. <i>Desenzitizace</i> .....	17
2.4.2. <i>Internalizace</i> .....	18
2.4.3. <i>Downregulace</i> .....	19
2.5. MEMBRÁNOVÉ MIKRODOMÉNY.....	19
<b>3. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>23</b>
<b>4. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>24</b>
4.1. MATERIÁL A METODY .....	24
4.1.1. <i>Materiál</i> .....	24
4.1.2. <i>Metody</i> .....	25
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>30</b>
5.1. <i>STANOVENÍ BÍLKOVINY METODOU PODLE LOWRYHO</i> .....	30
5.2. <i>DETEKCE μ-OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ</i> .....	30
5.3. <i>DETEKCE KAVEOLINŮ</i> .....	34
<b>6. DISKUZE.....</b>	<b>37</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>39</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>40</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylylcyklasa/y
AMK	aminokyselina/y
AMP	adenosinmonofosfát
AP-2	adaptorový protein 2
Arr3	arrestin 3
Asp	asparagová kyselina
BSA	„bovine serum albumine“ – hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
DOR	$\delta$ –opioidní receptor /y
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kinasa /y
Glu	glutamová kyselina
GPCR/s	receptor/y spřažený s G-proteiny
HRP	„horseradish peroxidase“ – křenová peroxidasa
JNK	Jun N-terminální kinasa/y
KO	knock-out/vypnutý gen kódující např. sledovaný protein u pokusných zvířat
KOR	$\kappa$ -opioidní receptor/y
MAPK	„mitogen activated kinase“ – kinasa aktivovaná mitogenem
MOPS	4-morfolinpropansulfonová kyselina
MOR	$\mu$ -opioidní receptor/y
OR	opioidní receptor/y
P	anorganický fosfát
PBS	fosfátový pufr s NaCl
PKA	protein kinasa A
PKC	protein kinasa C
PMFS	fenylmethylsulfonyl fluorid
PTX	pertussis toxin

RAVE	relative activity versus endocytosis /relativní aktivita versus endocytosa
SDS	dodecylsulfát sodný
STEM	fosfátový pufr podle Sørensen
TBS	Tris pufr s NaCl
TM	transmembránový

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem vlivu podávání morfinu laboratorním potkanům na zastoupení  $\mu$ -opioidních receptorů a kaveolinů v jejich mozkovém kortexu. Účinek morfinu je vyvolán vazbou na opioidní receptory, především podtypu  $\mu$ . Jeho dlouhodobé působení má za následek snížení funkčnosti a množství těchto receptorů v rámci vzniku tolerance a závislosti.

Kaveoliny jsou proteiny nezbytné pro utváření membránových mikrodomén kaveol. Dnes je známo, že jejich přítomnost není omezena na kaveoly a také jejich funkce je pravděpodobně na těchto doménách nezávislá (mohou se účastnit regulace signálních drah, transportu lipidů, aj.). Funkce kaveolinů v mozkových buňkách však dosud není přesně známa.

V experimentální části byly metodou „Western blot“ detekovány proteiny kaveolin-1 a kaveolin-2 v kortexech potkanů po desetidenní aplikaci morfinu a v kortexech kontrolních zvířat. Zaznamenán byl signifikantní nárůst množství kaveolinu-1 ve vzorcích z morfinem ovlivněných potkanů ve srovnání s kontrolními, menší nárůst množství kaveolinů-2 byl vyhodnocen jako nesignifikantní. Množství  $\mu$ -opioidních receptorů u morfinem ovlivněných zvířat oproti kontrolám signifikantně pokleslo, po deseti dnech tak byly zaznamenány změny odpovídající dlouhodobé adaptaci.

V literatuře je uváděno zvýšení množství kaveolinu-1 v mozkové tkáni poškozené neurodegenerativními procesy (Gaudreault SB, Blain JF, Gratton JP, Poirier J. 2005. *J Neurochem* 92: 831-9). Protože je známo, že dlouhodobé působení morfinu také způsobuje neurodegenerativní změny, je možné spekulovat, že námi pozorované zvýšení množství kaveolinu-1 odpovídá těmto změnám.

**Klíčová slova:** receptory opioidů, biologické membrány, lipidové rafty, kaveoliny, morfin

## **ABSTRACT**

In this Thesis, we examined the influence of morphine administration to the laboratory rats on the amount of  $\mu$ -opioid receptors and caveolins in their cerebral cortex. Effect of morphine is known to be caused by its binding to opioid receptors, in particular to the  $\mu$  subtype, and a long-term exposure to morphine reduces the functionality and number of these receptors as part of the resulting tolerance and addiction.

Caveolins are proteins essential for formation of the membrane microdomains of caveolae, although it is known today that presence of these proteins is not limited to caveolae and their function is probably independent of these domains (they may participate in the regulation of cell signaling pathways, lipid transport, etc.). The function of caveolins in brain cells is not precisely known yet.

In the experimental part of this work, we used the Western blot method to estimate the presence of caveolin-1 and caveolin-2 in the cerebral cortex of the rats after ten-days morphine application and in control animals. A significant increase of caveolin-1 was observed after morphine treatment as compared to control animals; a smaller, non-significant increase of caveolin-2 was also found. The amount of  $\mu$ -opioid receptors in morphine affected animals was significantly decreased compared to controls. Thus, the changes corresponding to the long-term adaptation were observed already after ten days.

**Key words:** opioid receptors, biological membranes, lipid rafts, caveolins, morphine



## 1. ÚVOD

Před asi dvěma dekádami let byla plasmatická membrána považovaná za jednotnou dvojnou vrstvu fosfolipidů s náhodně distribuovanými membránovými proteiny. Dnes je známo, že plasmatická membrána může obsahovat organizované struktury - lipidové rafty a kaveoly (Sprenger R. R. a kol., 2006). Kaveoly byly první popsané mikrodomény plasmatické membrány. Mají tvar baňky a jsou bohaté na sfingolipidy, cholesterol i různé signální molekuly. Kaveoly se účastní regulace rozmanitých buněčných funkcí, jako je např. exo- a endocytóza, membránové lešení, transmembránový přenos signálu a regulují i mnoho signálních kaskád (Stern C. M., Mermelstein P. G., 2010). Kaveoly se vyznačují obsahem pro ně typických proteinů - kaveolinů. Byly identifikovány tři členy kaveolinové rodiny, kaveolin-1, kaveolin-2 a kaveolin-3 (Trushina E. a kol., 2006).

V buňkách centrálního nervového systému (CNS) je výskyt kaveol omezen na gliové buňky a astrocyty. V neuronech nebyly identifikovány kaveoly, ale i tak jsou v nich přítomny všechny tři typy kaveolinů. Předpokládá se, že kaveoliny mohou regulovat nitrobuňčnou signalizaci a funkce nervového systému (Stern C. M., Mermelstein P. G., 2010). Kaveoly a kaveoliny mohou ovlivňovat i signální dráhu vedoucí přes receptory spřažené s G -proteiny (GPCRs) (Allen J. A. a kol., 2009; Zhao H., Loh H. H., Law P. Y., 2006). Do rodiny GPCRs patří i opioidní receptory (OR).

Opioidní receptory jsou transmembránové proteiny, které se nacházejí především v centrální nervové soustavě (CNS), ale jsou přítomny i v jiných periferních tkáních savčího organismu (Janecka A., Fichna J., Janecki T., 2004). Klasifikované byly čtyři podtypy opioidních receptorů:  $\mu$ -opioidní receptory (MOR),  $\delta$ -opioidní receptory (DOR),  $\kappa$ -opioidní receptory (KOR) a opioidní receptor like-1 (ORL1) (Al Hasani R., Bruchas M. R., 2011). V buňkách, v kterých byly nalezeny kaveoly, se OR soustřeďují právě do těchto membránových mikrodomén (Zhao H., Loh H. H., Law PY., 2006). Opioidní receptory byly objeveny v roce 1973 při snaze o vysvětlení účinků morfinu. Candace Pertová použila radioaktivně značený morfin k lokalizaci místa účinku morfinu. Ukázalo se, že morfin se váže na specifická místa v mozku, neboli „morfinové receptory“ (později opioidní receptory). Morfin je fyziologicky aktivní složkou opia, neboli šťávy máku setého, je to tedy látka nevlastní tělu. Výskyt specifického receptoru pro cizorodou látku je velice nepravděpodobný. Bylo tak zahájeno hledání molekul tělu vlastních, které by na tyto

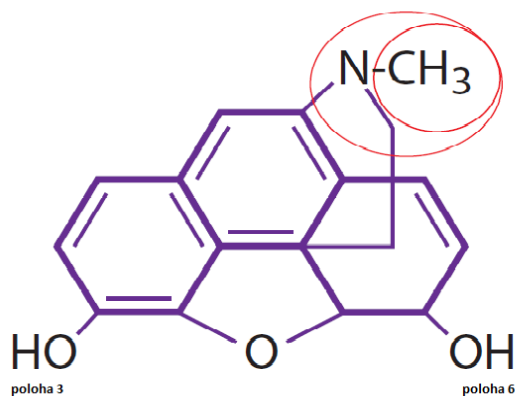
receptory působily. Objevené byly „endogenní morfiny“ neboli endorfíny a později i jiné opioidní peptidy. Opioidy jsou obecně látky působící na opioidní receptory, opiáty jsou přírodní látky jako např. morfin nebo kodein (Satoh M., Minami M., 1995; Trescot A. M. a kol., 2008).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Morfin

Morfin je přírodní alkaloid, který dostal svůj triviální název podle řeckého Boha spánku Morpheia. Byl izolován Friedrichem W. A. Sertürnerem na počátku devatenáctého století. Od té doby až po dnešek je morfin jedním z nejúčinnějších léků proti bolesti (Brownstein M. J., 1993; Hameed H., Hameed M., Christo P. J., 2010).

Uhlíkový skelet molekuly morfinu je podobný fenantrenu. Hydroxylové skupiny v poloze 3 a 6 mohou být esterifikovány, acetylovány aj. Například heroin má tyto skupiny acetylované (diacetylmorfin). Důležitý pro analgetické účinky morfinu je terciární dusík. Převedením terciárního dusíku na kvartérní se snižují analgetické účinky. Morfin je opticky aktivní molekula a pouze levotočivý isomer je analgetikum (Trescot A. M. a kol., 2008).



Obr. č. 1: Strukturální vzorec morfinu (převzaté z Trescot A. M. a kol., 2008).

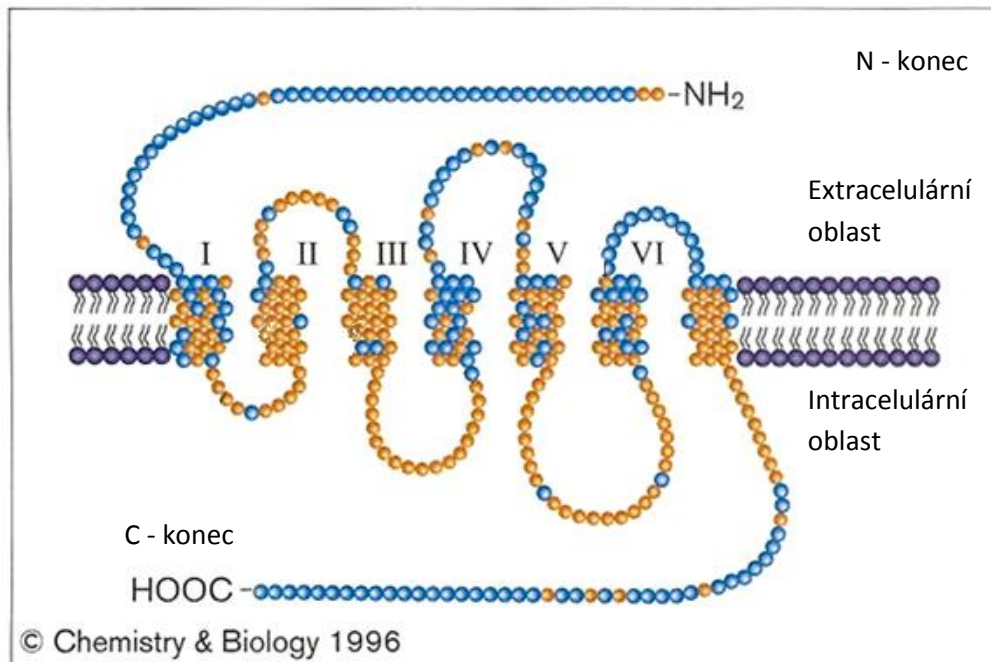
### 2.2. Struktura opioidních receptorů

Opioidní receptory jsou členy rodiny GPCRs, strukturně podobné rhodopsinu. G-proteiny, s kterými jsou OR asociovány, mají strukturu trimeru tvořenou dvěma podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta\gamma$ .  $\alpha$ -podjednotka je vázána s GDP, který je při aktivaci

vyměněn za GTP. Nastane disociace trimeru na  $\alpha$ -podjednotku s navázaným GTP a  $\beta\gamma$ -podjednotkový komplex, obě složky jsou aktivní v regulaci signalizace či jiných dějů (Pierce K. L., Premont R. T., Lefkowitz R. J., 2002). GPCRs obsahují sedm transmembránových domén spojených relativně krátkými extracelulárními a intracelulárními smyčkami. Amino-konec (N-konec) GPCRs je na extracelulární straně plasmatické membrány a bývá glykosylován. Je také důležitý pro vazbu ligandu. Karboxylový konec těchto receptorů je orientován dovnitř buňky a je významný při interakci s G-proteiny.

extracelulární

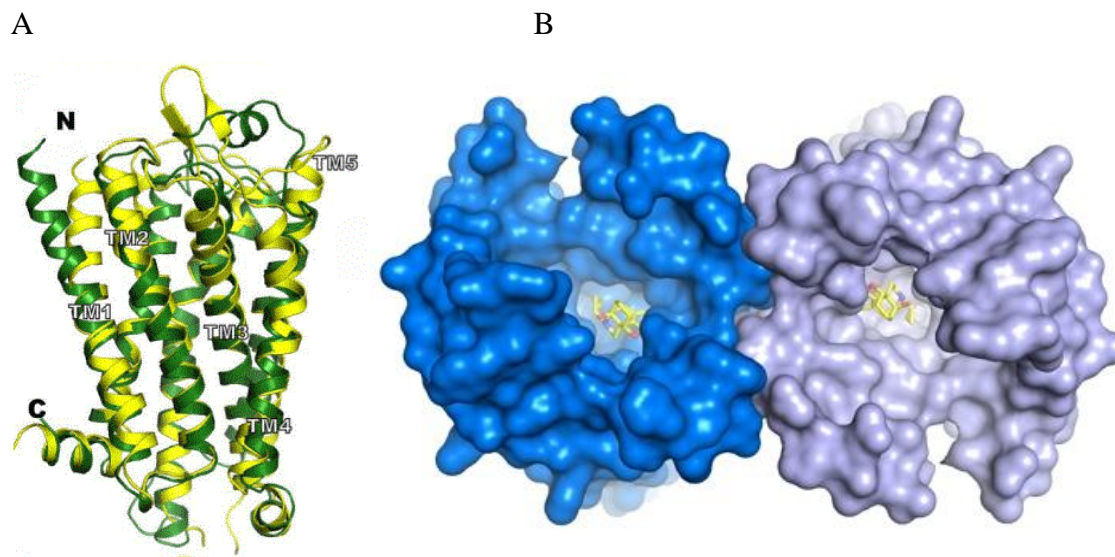
Velikost  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -receptorů a rhodopsinového receptoru je celkem podobná: 398, 372, 380 a 348 aminokyselin (AMK). Rhodopsin i opioidní receptory mají z velké části konzervovanou strukturu AMK, což pravděpodobně hraje roli intracelulární torové struktury. Podobnost v aminokyselinových sekvencích mezi opioidními receptory je dost výrazná;  $\mu$ - a  $\delta$ - receptory jsou identické z 62%,  $\mu$ - a  $\kappa$ - receptory z 61% a  $\delta$ - a  $\kappa$ - receptory jsou identické z 57% (Blake A. D., Bot G., Reisine T., 1996). Podobnost ve struktuře naznačuje obr. č. 2 na str. 12.



Obr. č. 2: Porovnání předpokládaných aminokyselinových sekvencí klonovaných myšičích  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\kappa$  opioidních receptorů. Extracelulární a intracelulární oblast značí orientaci receptoru v membráně. Modré kuličky znázorňují rozdílné AMK v rámci tří typů receptorů, oranžové kuličky shodné AMK. Římské číslice určují sedm transmembránových segmentů (převzaté a upravené z Blake A. D., Bot G., Reisine T., 1996).

N- a C- terminální regiony jsou nejvíce různorodé, co se týče aminokyselinových sekvencí, jak je vidět i na obr. č. 2. Naopak sekvence transmembránových domén je spíše konzervativní v rámci všech typů opioidních receptorů. Sedm TM domén je uspořádaných tak, že vytvářejí centrální místo, neboli váček, pro vazbu ligandu. Ohyby ve struktuře TM domén, často díky přítomnosti prolinu, přispívají k tvaru vazebného váčku jednotlivých receptorů. Extracelulární smyčky jednotlivých receptorů jsou též poměrně variabilní. Druhá extracelulární smyčka receptorů KOR je odlišná od MOR a DOR zvýšenou frekvencí výskytu kyselých AMK (Asp a Glu), vytváří se tak kyselé ohraničení vazebného váčku a ligandy pro KOR mají proto bazický charakter (Cox B. M., 2012). Také se ukázalo, že nahrazení kyseliny asparagové asparaginem či glutamovou kyselinou v druhé TM doméně MOR snižuje afinitu morfinu k receptoru (Minami M., Satoh M., 1995). Z toho vyplývá, že různé opioidní receptory mají rozdílnou afinitu k různým ligandům. Struktura vazební kapsy pro ligand a interní vazebné interakce jsou zásadní pro afinitu k ligandu.

OR můžou vytvářet dimery, homodimery (např. MOR – MOR) nebo také heterodimery (MOR – DOR), ale i jiné oligomery (Cox B. M., 2012) - obr. č. 3 (B).



Obr. č. 3: (A) Krystalografická struktura myšního MOR, TM1-5 označují transmembránové segmenty (probrané a upravené z Perez - Aguilar J. M., 2012). (B) Dimer MOR vizualizace struktury vazebného váčku na základě krystalografické studie (převzaté a upravené z Manglik A. a kol., 2012).

### 2.3. Funkce, aktivita a signální systém opioidních receptorů

Opioidní receptory (OR) jsou prototypem receptorů spřažených s inhibičními G-proteiny ( $G_{i/o}$  proteiny). Signalizace OR je účinně blokována pertussis toxinem (PTX), což je bakteriální toxin (*Bordetella pertussis*), který inaktivuje  $\alpha$ -podjednotku  $G_{i/o}$  proteinů. Přenos signálu OR je spojen s inhibicí adenylcyklyasy a  $Ca^{2+}$  iontových kanálů, ale také se stimulací  $K^+$  iontových kanálů. Známe je, že OR regulují i mitogen-aktivační proteinkinasovou (MAP kinasovou) kaskádu. (Obr. č. 4, str. 12) Ovlivňují také aktivitu fosfolipasy C a výlev neurotransmiterů (obr. 4, str. 16) (Law P. Y., Wong Y. H., Loh H. H., 2000).

Z pohledu analgetických účinků i vzniku závislosti na morfiu má z opioidních receptorů největší význam MOR. Studie na „knock-out“ (KO) myších ukazují, že morfin se s nejvyšší afinitou váže k  $\mu$ -opioidním receptorům kódovaných MOR-1 genem. Všechny fyziologické reakce na přítomnost morfinu, zahrnující analgezi i toleranci, chybí u myší, které měly gen MOR-1 vypnutý (MOR-1 KO-myší) (Waldhoer M., Bartlett S. E., Whistler J. L., 2004; Contet C., Kieffer B. L., Befort K., 2004; Williams J. T. a kol. 2013).

#### 2.3.1. Inhibice /superaktivace adenylcyklyasy

Při interakci agonisty (jako je morfin) s OR dochází za účasti disociované  $\alpha$ - $G_{i/o}$  podjednotky k inhibici aktivity adenylcyklyasy (AC). Snížená aktivita AC vede k poklesu intracelulární koncentrace cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu), který má úlohu buněčného druhého posla. Za nepřítomnosti opioidů je hladina cAMP zvýšená, což pozitivně ovlivňuje aktivitu proteinkinasy A (PKA), která zvyšuje vyplavování neurotransmiterů. Opioidní inhibice adenylcyklyasy tak vede přes PKA ke zlepšenému uvolňování neurotransmiterů (Corbett A. D. a kol., 2006).

Nový pohled na inhibici AC přinesl objev, že  $G_z$  protein, člen podrodiny inhibičních G-proteinů, je nesenzitivní vůči PTX. Je schopen inhibovat akumulaci cAMP po aktivaci receptorů. Podobnosti mezi  $G_{\alpha_{i/o}}$  a  $G_{\alpha_z}$  podjednotkami naznačují, že je možné nahrazení  $G_{\alpha_z}$  za  $G_{\alpha_{i/o}}$  podjednotku při opioidy indukovaném přenosu signálu. Studie v této oblasti ukazují, že díky  $G_{\alpha_z}$  podjednotce mohou opioidní receptory využít PTX-nesenzitivní signální přenos a tím inhibovat adenylcyklyasu (Law P. Y., Wong Y. H., Loh H. H., 2000).

Superaktivace adenylylcyklasy je fenomén, který nastává při dlouhodobé aktivaci opioidních receptorů. Při tomto ději dochází k nárůstu a fosforylaci isoform AC, začíná i její syntéza de novo. Je to kompenzační proces dlouhodobé inhibice. V závislosti na proteinové fosforylaci Whistler a von Zastrow navrhuji „RAVE“ teorii jako základ pro adenylylcyklasovou superaktivaci (Zhao H., Loh H. H., Law P. Y., 2006). RAVE teorie, neboli „relative activity versus endocytosis“, je teorií, která se snaží o potenciální vysvětlení vzniku závislosti a tolerance jako výsledek vztahu mezi aktivitou agonisty a endocytosou MOR (He L. a kol., 2002; von Zastrow M., 2010). Podle této teorie je opioidní agonista, který nevyvolává rapidní endocytosu receptorů, více návykový a způsobuje větší adenylylcyklasovou superaktivaci. Tato teorie tedy předpokládá, že např. metadon zapříčiňuje menší adenylylcyklasovou superaktivaci a je tak méně návykový oproti morfinu pro svou větší schopnost vyvolat endocytózu opioidních receptorů (Martini L., Whistler J. L., 2007; Finn A. K., Whistler J. L., 2001). Studie Kreeka a kol. však naznačují, že metadon je stejně návykový jako morfin (Kreek M. J. a kol., 2000). Jiný názor (Law P. Y. a kol., 2005) založený na studiích DOR svědčí o tom, že receptorová internalizace vyžaduje disociaci receptorových oligomerů na monomery, a proto se receptory nepřesouvají do nitra buňky během dlouhodobého působení agonisty. U DOR velikost adenylylcyklasové superaktivace vykazovala závislost na koncentraci receptorů (Zhao H., Loh H. H., Law P. Y., 2006). Ve studiích Ujčíkové a kol. byl prokázán nárůst isoform adenylylcyklázy I a II v počtu molekul po 10 denním podávání morfinu, ale nárůst ostatních isoform adenylylcyklasy nebyl zaznamenán. Po 20 dnech od poslední dávky morfinu se hladiny adenylylcyklas I a II upravily (Ujčíková H. a kol., 2014). Dlouhodobé podávání agonisty jako je morfin vyvolává procesy závislosti (viz níže), které souvisí také se superaktivací adenylylcyklasy a ovlivněním hladiny cAMP. Superaktivitu je také možné chápat jako určitou formu adaptace buňky/organismu na změnu. Změněná je tak funkční aktivita opiátových receptorů na úrovni adenylylcyklasy a cAMP.

### **2.3.2. Ovlivnění iontových kanálů**

#### **2.3.2.1. Vápníkové kanály**

Výsledkem působení agonistů na OR je také redukce buněčné excitability a vyplavování neurotransmiterů přes inhibiční napětově-řízených kalciových kanálů. Inhibice

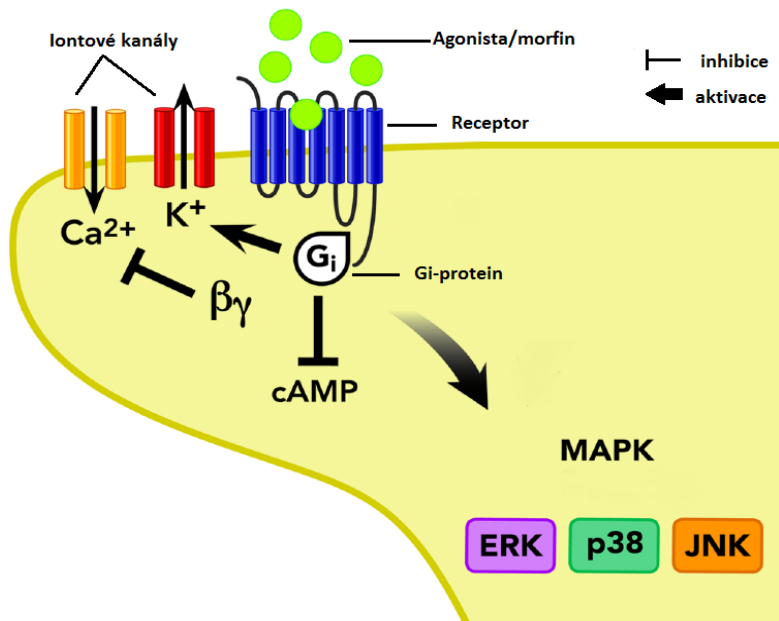
Ca<sup>2+</sup> kanálů účinkem opioidů je také blokována PTX, což indikuje účast G<sub>i/o</sub> proteinů (Minami M., Satoh M., 1995). Bylo zjištěno, že spíše než α<sub>i/o</sub> podjednotka G-proteinu inhibuje Ca<sup>2+</sup> kanály dimer podjednotek β a γ. I když je za inhibici kalciových kanálů zodpovědná Gβγ podjednotka, Gα<sub>i/o</sub> podjednotka hraje určitou roli v účinnosti tohoto děje. Nejpersvědčivější důkaz pochází z Gα<sub>i/o</sub> KO („knock out“ = vypnutý gen) studií. V neuronech získaných z Gα<sub>i/o</sub> KO-myší je schopnost opioidních agonistů inhibovat Ca<sup>2+</sup> kanály významně narušena (Law P. Y., Wong Y. H., Loh H. H., 2000). Ovlivňování Ca<sup>2+</sup> kanálů se děje také díky spřažení κ-opioidních receptorů a kalciových kanálů. Tato interakce způsobuje redukcí vodivosti Ca<sup>2+</sup> kanálů (Minami M., Satoh M., 1995).

#### **2.3.2.2. Draslíkové kanály**

Dalším výsledkem působení opioidů je hyperpolarizace buněčné membrány způsobená nárůstem vodivosti draslíkových kanálů. Aktivace K<sup>+</sup> kanálů vzniká po stimulaci μ-, δ-, κ-opioidních receptorů a je možné ji blokovat PTX. To indikuje zapojení G<sub>i/o</sub> proteinů do tohoto procesu (Minami M., Satoh M., 1995).

#### **2.3.2.3. MAP-kinasa**

Velký počet GPCR reguluje buněčné události jako je růst a diferenciací stimulací MAP kinázové kaskády. MAP-kinasy („mitogen activated protein kinase“) jsou extracelulárním signálem regulované kinasy (ERKs), Jun N-terminální kinasy (JNK) a p38 kinasy. Mitogenní signály z GPCR jsou často přenášeny podél ERK. Stimulace opioidy z ERK-1 a ERK-2 byla poprvé prokázána u μ-opioidních receptorů. Stimulace ukázala ligandovou selektivitu, závislost na dávce agonisty a citlivost PTX, což značí zainteresování G<sub>i/o</sub> proteinu na aktivaci MAP-kinázy. Všechny základní typy OR stimulují ERK-1 a ERK-2. Účinnou podjednotkou G<sub>i/o</sub> je dimer βγ (Law P. Y., Wong Y. H., Loh H. H., 2000).

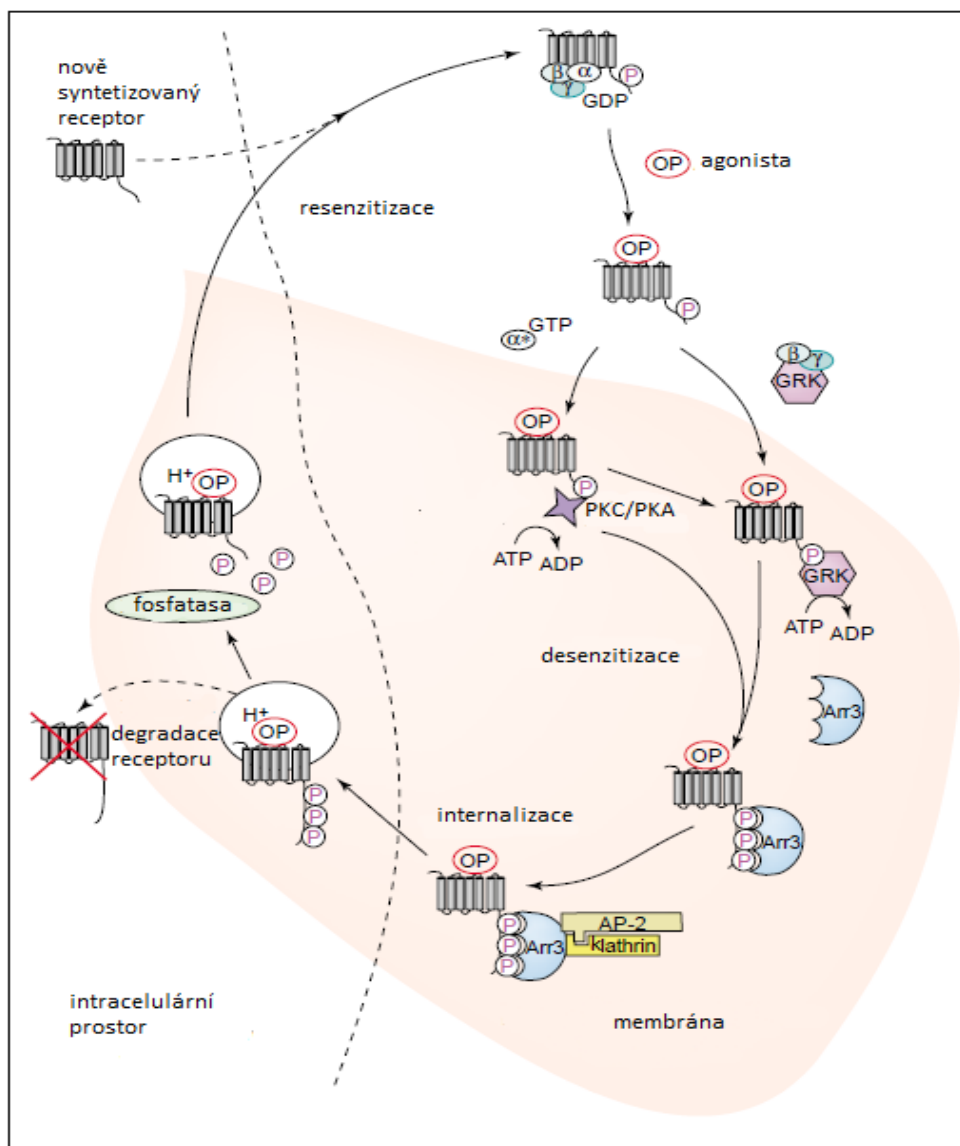


Obr. č. 4: Přehled signálních drah OR (převzato a upraveno z Al-Hasani R., Bruchas M. R., 2011).

#### 2.4. Regulační procesy: desenzitizace, internalizace, downregulace

Morfín i jiné opioidní deriváty jsou využívány v medicínské praxi především pro své analgetické účinky. Limitací pro jejich dlouhodobé užívání je fyziologická tolerance, neboli rapidní pokles analgetických účinků, a fyzická a psychická závislost. Navzdory mnoha výzkumům zůstává přesný buněčný mechanismus podstaty vzniku tolerance a závislosti neobjasněny (Walhoer M., Bartlett S. E., Whistler J. L., 2004; Baily C. P., Connor M., 2005). Desenzitizace, internalizace, downregulace a tolerance jsou pojmy, s kterými se často setkáváme v odborné literatuře při snaze o vysvětlení složitého principu těchto jevů. Souhrn těchto procesů je uveden na obrázku č. 5 str. 17.





Obr. č. 5: Přehled drah regulace MOR. Mechanismus drah aktivace a internalizace nebyl doposud definován. Předpokládá se, že MOR je fosforylován a následnou vazbou na arrestin je funkčně desenzitizován. OR jsou pravděpodobně fosforylovány prostřednictvím kinas. Role PKA, PKC a CaM proteinkinasy v receptorové desenzitizaci a/nebo funkce GRK však zatím nejsou přesně známy. Přibližně 80% endocytovaných MOR je recyklováno a zbylých 20% je degradováno v lyzozomech. AP-2 = adaptorový protein 2, Arr3 = arrestin 3, P = fosfát (převzaté a upravené z Bailey C. P., Connor M., 2005).

#### 2.4.1. Desenzitizace

Opakovaná expozice opioidních receptorů (OR) vlivem agonistů vede k postupné ztrátě funkce (přenosu signálu) OR, tedy k desenzitizaci (Chaturvedi K. a kol., 2001; Koch T., Hollt V., 2008). Mechanismus desenzitizace OR zahrnuje agonistem aktivovanou

fosforylaci GPCRs členem rodiny G-protein asociovaných receptorových kinas (GRK). GRK zabezpečují interakci s arrestinem, která rozruší vazbu mezi heterotrimerním G-proteinem a GPCRs/OR (Chaturvedi K. a kol., 2001). Fosforylace OR závislá na agonistovi vyvolá změnu konformace receptoru a tím zvýší afinitu k cytosolickému  $\beta$ -arrestinu (Koch T., Hollt V., 2008). Přerušení spojení G-proteinu s GPCRs a zapojení endocytózy vede k receptorové internalizaci (viz níže).

Desenzitizace bývá na úrovni receptorové signalizace dělena na homologní a heterologní. U homologní desenzitizace je snížení efektu způsobeno účinkem agonisty přes specifický receptor, kinasou je GRK. Při heterologní desenzitizaci vede snížení efektu vyvolaného agonistou ještě přes další receptory, které sdílejí signalizační dráhu a za fosforylaci jsou zodpovědné především PKC a PKA (protein kinasy C a A) (Williams J. T. a kol., 2013). Na fosforylaci/desenzitizaci se však můžou podílet i CaM kinasa II ( $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoldulin-dependentní protein kinasa II) a MAP kinasy (Law P. Y., Wong Y. H., Loh H. H., 2000).

#### **2.4.2. Internalizace**

Komplex receptoru a arrestinu vede přes klathrin-dependentní dráhu k translokaci receptoru z membrány do nitra buňky a následné endocytose. Interakce receptoru a arrestinu je závislá na obsahu cholesterolu, což naznačuje úlohu membránových domén i v této dráze (Williams J. T. a kol., 2013). Receptory můžou být následně resenzitizovány, kdy je jejich funkce obnovena a jsou vráceny do membrány, nebo mohou být označené pro degradaci (downregulace). Endocytosa receptorů je závislá na daném agonistovi. Například agonista DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>-N-MePhe<sup>4</sup>-Gly-ol]-enkefalin) vyvolává rapidní endocytosu MOR, zatímco interakce MOR s morfinem neprokázala detekovatelné vyvolání endocytosy. Početné publikace uvádějí, že internalizace MOR hraje důležitou roli při rozvoji tolerance u dlouhodobého užívání opioidů (Koch T., Hollt V., 2008; Bailey C. P., Connor M., 2005; Chaturvedi K. a kol., 2001). Internalizace se tedy jeví jako klíčový proces při vzniku tolerance a závislosti a je předmětem mnoha výzkumů a hypotéz (teorie RAVE aj).

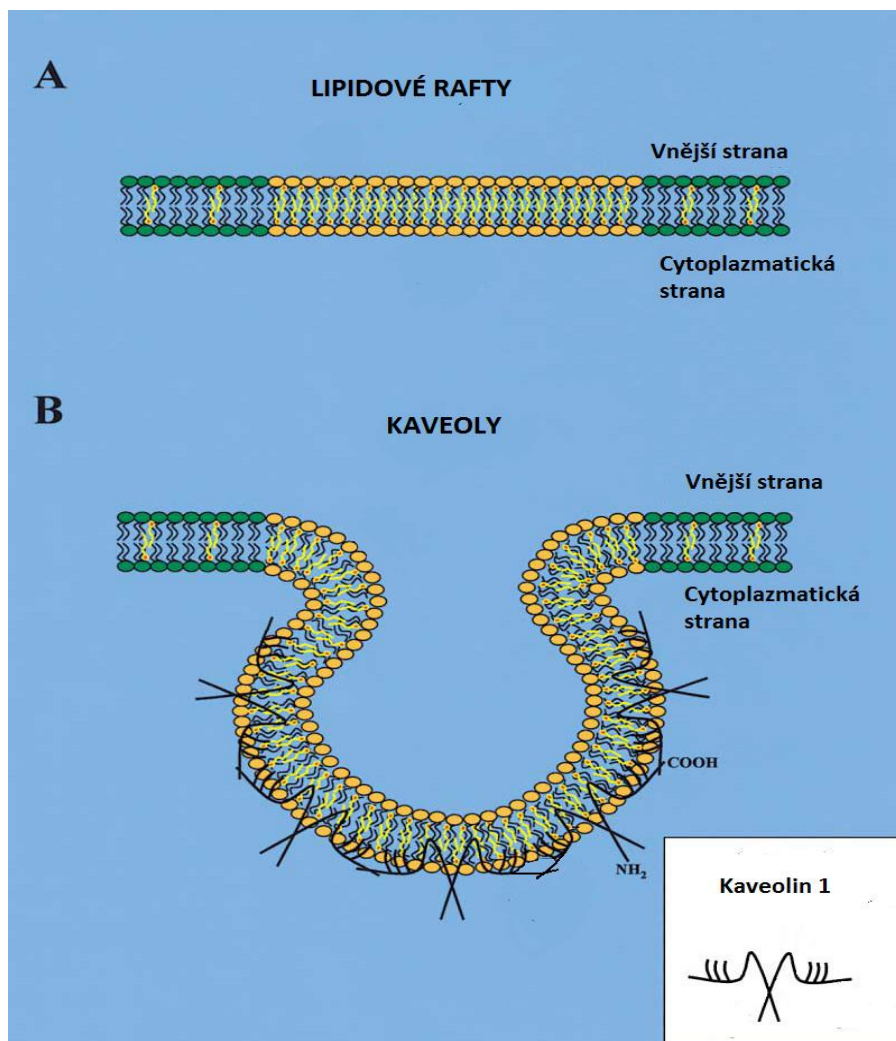
### **2.4.3. Downregulace**

Downregulace (negativní regulace) opioidních receptorů po chronickém podávání opioidů je dlouhodobý adaptační proces, který může vést k degradaci internalizovaných OR a/nebo k snížení receptorové syntézy a tím k sníženému počtu funkčních receptorů. Downregulace vyžaduje vyšší dávky a delší čas než desenzitizace, jsou to tedy dva nezávislé buněčné adaptační procesy (Koch T., Hollt V., 2008) Chronické vystavení MOR opioidům vyvolává funkční regulační procesy, které vedou ke ztrátě funkce MOR a ke znemožnění aktivace receptorů (Williams J. T. a kol., 2013).

### **2.5. Membránové mikrodomény**

Lipidové rafty a kaveoly jsou označovány jako (mikro-)domény plasmatické membrány. Tyto membránové domény jsou bohaté na glykosfingolipidy, sfingomyelin, cholesterol aj. Obsahem cholesterolu regulují fluiditu membránové fosfolipidové dvojvrstvy a organizují membránové proteiny. Typickou vlastností lipidových mikrodomén je jejich resistance vůči neiontovým detergentům jako je např. Triton X-100 (Galbiati F., Razani B., Lisanti M. P., 2001).

Kaveoly vlastně reprezentují specializované sety lipidových raftů s morfologicky odlišnou strukturou, tvarem připomínajícím baňku nebo řecké písmeno omega –  $\Omega$ , velikosti 50-100 nm (obr. č. 6 str. 20) (Sprenger R. a kol., 2006; Head B. P., Insel P. A., 2006). Kaveoly jsou typické obsahem kaveolinů, integrálních membránových proteinů. Známé jsou kaveolin-1 (Cav-1), kaveolin-2 (Cav-2) a kaveolin-3 (Cav-3). Kaveolin-1 tvoří kaveolární „plášť“ (Stan R. V., 2005; Head B. P., Insel P. A., 2006; Cameron P. L. a kol., 1997). Všechny tři typy kaveolinů však byly nalezeny i v nekaveolární oblasti plasmatické membrány, která kaveoly obsahuje, ale také v těch buněčných membránách, u kterých nebyla prokázána přítomnost kaveol (Head B. P., Insel P. A., 2006). Kaveoly byly identifikovány ve většině savčích buněk kromě neuronů, lymfocytů, monocytů, tkání makrofágů a některých epitelových buněk (Cameron P. L., 1997; Schwab W. a kol., 1999).



Obr. č. 6: Schéma strukturálních odlišností lipidových raftů (A) a kaveol (B). Oranžově znázorněná část je bohatá na sfingomyeliny, cholesterol a glykosfingolipidy. Zeleně znázorněné oblasti mají vysoký podíl v zastoupení fosfolipidů (fosfatidylserin, fosfatidylcholin). (B) Po integraci proteinu Cav-1 do oblasti s vysokým podílem cholesterolu a sfingomyelinů se vytvoří malé baňkovité invaginace – kaveoly (převzaté a upravené z Galbiati F., Razani B., Lisanti M. P., 2001).

Lipidové rafty a kaveoly selektivně participují na regulaci rozmanitých buněčných funkcí, jako např. exo- a endocytóza, membránové lešení, transport cholesterolu nebo transmembránová transdukce signálu, a regulují i mnoho GPCR signálních kaskád. (Allen J. A. a kol., 2009). V mikrodoménách byly lokalizovány různé signální proteiny, GPCRs (také MOR), adenylylcyklasa,  $\alpha$ - a  $\beta\gamma$ -podjednotky G-proteinů, různé protein kinasy aj. (Zhao H., Loh H. H., Law P. Y., 2006). Kaveolin-1 a kaveolin-2 interagují s  $G\alpha$  podjednotkou, mají však odlišné vlivy na GTPasovou aktivitu. Cav-2 aktivuje GTP

hydrolysu, zatímco Cav-1 GTP ji inhibuje (Schlegel A. a kol., 1998). Ovlivňují tak signální kaskády spojené s G-proteiny.

Signální dráha vedoucí přes aktivaci opioidních receptorů patří k těm drahám, které jsou asociovány s G-proteiny, konkrétněji  $G_{i/o}$  proteiny. Jak již bylo zmíněno,  $\mu$ -opioidní receptor stimulovaný morfinem aktivuje  $G_{\alpha_{i/o}}$  podjednotku, která inhibuje adenylcyklasu a ve výsledku ovlivňuje hladinu cAMP v buňce. MOR i  $G_{\alpha_{i/o}}$  podjednotka se v kaveolách nachází, avšak kaveoly nebyly nalezeny v neuronech, v nichž má naopak MOR intenzivní zastoupení. Zároveň bylo také zjištěno, že kaveoly prostřednictvím Cav-1 neovlivňují odpověď cAMP, generovanou přes MOR a  $G_{i/o}$ . Ukázalo se, že kaveoliny participují na protekci a přenosu proteinů do a z plazmatické membrány. Navzdory jejich jménu je možné kaveoliny označit za proteiny, které uspořádávají signální a jiné proteiny v kaveolách i nekaveolárních regionech, jako jsou neurony a leukocyty (Head B. P., Insel P. A., 2006). Jak již bylo zmíněno, původně byly kaveoliny spojovány jen s přítomností kaveol. Více výzkumných skupin prokázalo, že kaveolin-1 je tvořený i v neuronech a lymfocytech (Trushina E. a kol., 2006; Stern C. M., Mermelstein P. G., 2010; Bu J. a kol., 2003; Jasmin J. F. a kol., 2009). Cav-1 byl nalezen především v hipokampálních neuronech. Mikrodomény participují na signalizaci OR tím, že jsou bohaté na lipidy jako sfingolipidy, cholesterol aj. Cholesterol má v lipidových raftech a kaveolách důležitou roli, protože jeho redukcí jsou kaveoly rozrušovány (Huang P. a kol., 2007). Cholesterol reguluje i transkripci kaveolinů (Head B. P., Insel P. A., 2006). Studie Yu Qui a kol.  $\mu$ -opioidních receptorů poukazují na jeho důležitost v procesu internalizace těchto receptorů (Qui Y. a kol., 2011). Jejich funkce je regulována vazbou na cholesterol v TM doménách a změna ve viskozitě membrány moduluje přenos signálu spuštěného vazbou opioidu na opioidní receptory (Emmerson P. J. a kol., 1999). Zhao, Loh a Law navrhuje, že soustředění MOR v kaveolách je nevyhnutné pro superaktivaci adenylcyklasy (Zhao H., Loh H. H., Law P. Y., 2006). Kromě kompartmentace signálních molekul mají tak kaveoly funkci i ve stabilitě a regulaci signalizace OR. Cholesterol stabilizuje MOR ve stavu vysoké afinity, ale odstranění cholesterolu má různý efekt na aktivaci MOR (Williams J. T. a kol., 2013; Levitt E. S. a kol., 2009).

Lokalizace MOR v mikrodoménách se ukázala být selektivní v závislosti na navázaném ligandu. Bez přítomnosti agonisty byly  $\mu$ -opioidní receptory lokalizovány v mikrodoménách. Navázání agonisty etorfinu indukovalo translokaci MOR ven

z membránových mikrodomén. Interakce etorfinu nejdříve způsobila disociaci  $\mu$ -opioidních receptorů a  $G\alpha_{i/o}$  podjednotky, a pak navázání na  $\beta$ -arrestin. Etorfin tedy indukuje ERK fosforylaci jen přes  $\beta$ -arrestin závislou dráhu. Navázání morfinu na MOR neindukuje translokaci receptoru z domén. Narušení komplexu MOR s  $G\alpha_{i/o}$  podjednotkou vede k translokaci receptoru, lokalizace v mikrodoménách je proto zásadní pro signalizaci přes G-proteiny, kterou indukuje morfin. Ten aktivuje ERK jen prostřednictvím G-protein závislé dráhy. Signalizační dráha indukovaná různými agonisty je tedy závislá na lokalizaci MOR vně/uvnitř membránových mikrodomén (Zheng H. a kol., 2008).

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je přispět k objasnění funkce kaveolinů a vlivu morfinu na  $\mu$ -opioidní receptory. Experimentální část byla zaměřena na detekci množství  $\mu$ -opioidních receptorů a kaveolárních proteinů kaveolinu-1 a kaveolinů-2 s využitím metody „Western blot“ a zaznamenání potenciálních změn v množství stanovovaných proteinů v potkaních kortexech po dlouhodobém vystavení účinku morfinu.

## 4. PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1. Materiál a metody

#### 4.1.1. Materiál

##### Přístroje

- Elvehjm-Potterův pístový homogenizátor (teflon-sklo), B Braun Biotech International
- Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen
- Spektrofotometr BioPhotometer Plus, Eppendorf
- Elektroforetická aparatura XCell SuperLock Mini-Cell EI0001, Invitrogen
- Blotovací aparatura 170-3930, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad
- Vyvolávací přístroj OPTIMAX X-Ray Film Processor, Optimax
- Termoblok BBD2, Grand Boekel
- Třepačka MiniMix 3D, Enduro

##### Chemikálie a roztoky

- Morfin sulfát, Sigma
- Tris-HCl, STEM, EDTA, PMSF, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, vinan sodno-draselný, CuSO<sub>4</sub>, Sigma a Fluka
- Pufr STEM: (0,25M sacharóza, 1mM EDTA, 1M Tris-HCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, pH = 7,6)
- COMPLETE tableta, směs inhibitorů proteas, Rocher Diagnostic
- Fysiologický roztok (0,9% NaCl)
- PBS pufr: (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O)
- Lowryho roztoky A (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1M NaOH), B (2% vinan sodno-draselný), C (1% CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O)
- Folinovo-Ciocalteuovo fenolové reagens, Sigma
- Standard BSA, Sigma
- Laemmliho pufr 4x koncentrovaný (1M Tris-HCl, glycerol, SDS, DTT, H<sub>2</sub>O, bromfenolová modř)
- Gel pro elektroforézu Nu-PAGE (4-12% Bis-Tris gel), Novex<sup>®</sup> Invitrogen
- Elektroforetický pufr MOPS SDS: (5,23 g MOPS, 3,03 g Tris, 0,5 g SDS, 0,15 g EDTA, doplněno vodou na 1000 ml)
- Antioxidant Nu-PAGE<sup>®</sup> NP0005, Invitrogen
- Standard molekulových hmotností (SDS7B2), Sigma



- TBS pufr 10x koncentrovaný: (45 ml 4M NaCl, 12 ml 1M Tris-HCl, 63 ml H<sub>2</sub>O)
- Blotovací TMG pufr 4x: (15 g Tris, 72 g glycin, 1000 ml methanol, 5000 ml H<sub>2</sub>O)
- Blokovací pufr: (2,5 g sušené mléko, 50 ml TBS pufr, 50 µl Tween 20)
- Ředící pufr: (0,5 g sušené mléko, 50 ml TBS pufr, 50 µl Tween 20)
- Promývací pufr: (200 ml TBS pufr, 600 µl Tween 20)
- Protilátka primární kaveolin-2 (H-96) (rabbit, sc-7942), Santa Cruz
- Protilátka sekundární IgG-HRP (Donkey anti-rabbit NA934V), GE Healthcare
- Protilátka primární MOR 1 (C -20), sc-7488, Santa Cruz Biotechnology
- Protilátka primární kaveolin-1 (C13630-050, rabbit), Transduction Laboratories
- Pozitivní kontrola kaveolin-1 (Human endothelial lysate), Transduction Laboratories
- Protilátka sekundární IgG-HRP (goat-antirabbit, sc-2004), Santa Cruz biotechnology
- Chemiluminiscenční substrát s křenovou peroxidasou, SuperSignal<sup>®</sup> West DURA, Thermo Scientific Pierce

#### Přísušenství

- Autoradiografická kazeta, Hypercassette RPN 13642, 18x24 cm, Amersham Biosciences UK
- Film 13x18 (Medical X-Ray film blue), Afga
- Nitrocelulózová membrána, Whatman Protran BA 83, Koneko

### **4.1.2. Metody**

#### **4.1.2.1. Příprava vzorků**

##### **Aplikace morfinu – desetidenní**

Morfin byl podáván potkanům injekčně do svalů po dobu deseti dnů, dávka byla postupně zvyšována podle rozpisu v tabulce č. 2. Kontrolním potkanům byl stejným způsobem podáván fyziologický roztok.

Tab. č. 1: Počet a váha potkanů (samci Wistar, +90, C – kontrola, M – podání morfinu).

	Počet	Váha (g)
Před aplikací (20. 11. 2013)	15 C + 15 M	420
Po aplikací (1. 12. 2013)	15 C + 12 M	500

Tab. č. 2: Rozpis aplikace morfinu během deseti dnů.

Den	Morfin/fysiologický roztok (μl)	Koncentrace roztoku morfia (mg/ml)	Dávka (mg/kg)
1	265	10	10
2	265	10	10
3	400	10	15
4	400	10	15
5	256	20	20
6	256	20	20
7	400	20	30
8	400	20	30
9	350	30	40
10	350	30	40

Potkani byli usmrceni dekapitací v etherové narkóze během 24 hodin po poslední dávce. Pitvu a odběr kortexů vykonal Mgr. Dmytro Kagan.

Odebraná tkáň (vlhká váha):

Kortexy kontrolních potkanů, hmotnost 15 g.

Kortexy potkanů ovlivněných morfinem, hmotnost 14 g.

Kortexy byly následně zmrazeny tekutým dusíkem a uloženy při - 80°C.

#### 4.1.2.2. Homogenizace kortexů a frakcionace buněčného homogenátu

Příprava homogenátu: vzorky byly rozmrazeny na ledu. Práce probíhala na ledové tříšti. Ke dvěma gramům (vlhká váha) vzorků bylo přidáno 10 ml 1mM PMSF naředěného v pufru STEM s rozpuštěnou tabletou COMPLETE. Koncentrace homogenátu tak byla 20%. Homogenizace probíhala po dobu 7 minut Elvehjm-Potterovým pístovým homogenizátorem.

Příprava postnukleárního supernatantu (PNS): rotor centrifugy byl předem vychlazen na 4°C. Objem homogenátu 9,5 ml (cca 0,5 ml bylo odebráno pro stanovení bílkovin) byl rozdělen na 2 stejné díly a centrifugován po dobu 7 minut. Následně bylo

odebráno 9 ml PNS. Bylo odebráno 5  $\mu$ l PNS pro stanovení bílkovin Lowryho metodou, zbytek byl zmražen tekutým dusíkem a uchován při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.2.3. Stanovení množství proteinů Lowryho metodou

Podle tab. č. 3 bylo do deseti zkumavek pipetováno dané množství standardu BSA. Do tří jiných zkumavek byly vždy pipetovány vzorky (3  $\mu$ l homogenát, 3  $\mu$ l PNS) a následně doplněny destilovanou vodou na objem 500  $\mu$ l. Do všech zkumavek pak bylo přidáno 1,5 ml roztoku A + B + C (25 ml A + 0,5 ml B + 0,5 ml C). Roztoky byly ponechány 10 – 15 min při laboratorní teplotě. Následně se do všech zkumavek pipetovalo 150  $\mu$ l Folinova reagens ve 20sekundových intervalech. Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla proměřovaná absorbance při 595 nm ve 20sekundových intervalech.

Tab. č. 3: Rozpis pipetování kalibrační řady standardu BSA (1 mg/ml) pro stanovení obsahu bílkovin Lowryho metodou.

Standard č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA ( $\mu$ l)	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200
H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	500	490	480	470	460	450	425	400	350	300
BSA ( $\mu$ g)	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200

#### 4.1.2.4. Detekce $\mu$ -opioidních receptorů (MOR), kaveolinu-1 (Cav-1) a kaveolinu-2 (Cav-2) metodou „Western blot“ – elektroforetická technika v prostředí SDS

##### Detekce MOR

Tab. č. 4: Schéma přípravy vzorků pro elektroforézu v SDS pro  $\mu$ -opioidní receptor.

Vzorek	PNS ( $\mu$ l)	Vzorkový pufr ( $\mu$ l)	Destilovaná voda
PNS C	10,0	50,0	140,0
PNS M	8,8	50,0	141,2

Konečná koncentrace vzorků byla 1  $\mu$ g/ml.

Na gel bylo nanášeno 20  $\mu$ l roztoků vzorků (C, M) a 3  $\mu$ l standardu.

- Primární protilátka MOR-1 (sc-7488), ředění 1:200, Santa Cruz
- Sekundární protilátka (Donkey antirabbit IgG-HRP (NA934V)), ředění 1:40000, GE Healthcare UK Limited

### Detekce Cav -1

Tab. č. 5: Schéma přípravy vzorků pro elektroforézu v SDS pro kaveolin-1.

Vzorek	PNS (μl)	Vzorkový pufr (μl)	Destilovaná voda
PNS C	5,04	25,00	69,96
PNS M	4,40	25,00	70,60

Konečná koncentrace vzorků byla 1 μg/ml.

Na gel bylo nanášeno 10 μl roztoků vzorků (C, M), 3 μl standardu a 5 μl pozitivní kontroly.

- Primární protilátka kaveolin-1 ((C13630-050) rabbit), ředění 1:5000, Transduction Laboratories
- Sekundární protilátka IgG-HRP (goat-antirabbit), ředění 1:40000, sc-2004, Santa Cruz biotechnology
- Pozitivní kontrola kaveolin-1 (Human endothelial lysate), Transduction Laboratories

### Detekce Cav-2

Tab. č. 6: Schéma přípravy vzorků pro elektroforézu v SDS pro kaveolin-2.

Vzorek	PNS (μl)	Vzorkový pufr (μl)	Destilovaná voda
PNS C	5,04	25,00	69,96
PNS M	4,40	25,00	70,60

Konečná koncentrace vzorků byla 1 μg/ml.

Na gel bylo nanášeno 10 μl roztoků vzorků (C, M) a 3 μl standardu.

- Protilátka primární kaveolin-2 (H-96) (rabbit, sc-7942), ředění 1:200, Santa Cruz
- Sekundární protilátka (Donkey antirabbit IgG-HRP (NA934V)), ředění 1:40000 GE Healthcare UK Limited

## **Pracovní postup elektroforézy v prostředí SDS a metody „Western blot“ pro detekci MOR, Cav-1, Cav-2**

Vzorky byly rozmrazeny na ledu. Po přípravě vzorků k elektroforéze byly inkubovány při teplotě 95°C po dobu 3 minut. Následně byly promíchány na vortexu a uloženy na led. Vzorky a standard (případně pozitivní kontrola) byly pipetovány do jamek v elektroforetickém gelu zalitém pufrem pro elektroforézu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 50 – 70 minut.

Po ukončení elektroforézy následovala technika přenosu proteinu na nitrocelulózovou membránu tzv. „Western blot“. Gely byly vyjmuty z plastových obalů a ve vaničce pod hladinou blotovacího/přenosového pufru byl připraven „sendvič“ v blotovací kazetě v sestavě: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Po vytěsnění vzduchu byly kazety umístěny do aparatury pro přenos s blotovacím pufrem. Přenos probíhal při napětí 100 V a po dobu 60 minut.

Následně se membrány vyjmuly, propláchly destilovanou vodou a vložily do blokovacího pufru na 1 hodinu. Následovala inkubace s naředěnou (podle návodu) primární protilátkou v prostředí ředícího pufru. Membrány se inkubovaly přes noc v chladové místnosti.

Ředící pufr s primární protilátkou byl na druhý den odstraněn a membrány byly promyty destilovanou vodou. Následně byly membrány promývány ještě třikrát v promývacím pufru, vždy po dobu 10 minut. Pak byly umístěny do ředícího pufru, který obsahoval naředěnou (podle návodu) sekundární protilátku, inkubace trvala 1 hodinu. Po inkubaci byly membrány znova promývané destilovanou vodou a pak třikrát promývacím pufrem vždy 10 minut. Následně se membrány jemně osušily filtračním papírem a byl nanesen chemiluminiscenční substrát (připraven podle návodu), který se nechal působit 1 minutu. Poté byl odsát filtračním papírem a membrány byly umístěny do fólie ve vyvolávací kazetě. Díky chemiluminiscenci byly experimentální výsledky „překopírovány“ z membrány na citlivý film. Užitím vyvolávacího automatu byly výsledky na filmu zobrazeny. Doba inkubace filmu s membrány se liší pro dosažení zřetelných dat.

## 5. VÝSLEDKY

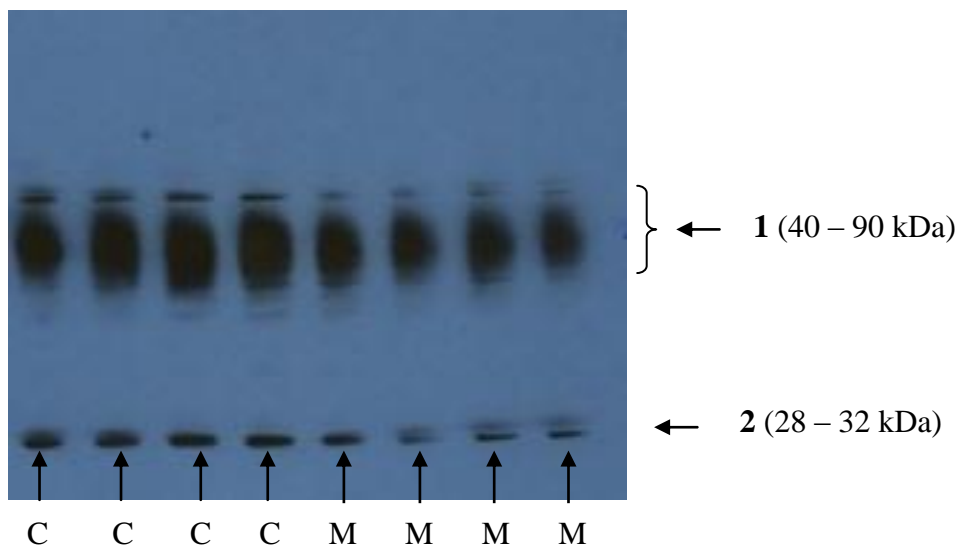
### 5.1. Stanovení bílkoviny metodou podle Lowryho

Množství proteinů ve vzorcích bylo stanoveno vždy ve třech paralelních ředěních. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí výpočetního programu *GraphPadPrism*. Průběh kalibrační křivky byl určen nelineární regresí s polynomem druhého stupně, s odpovídající rovnicí  $y = ax^2 + bx + c$ . Z tří hodnot absorbance pro dané ředění byl stanoven průměr.

Tab. č. 7: Přehled obsahu bílkovin v jednotlivých vzorcích, stanoveno Lowryho metodou.

	Množství (mg/ml), kontrolní	Množství (mg/ml) ovlivněné morfinem
Homogenát kortexů	43,18 ± 0,05(7%)	47,20 ± 0,03(4%)
PNS	19,83 ± 0,03(5%)	22,70 ± 0,04(6%)

### 5.2. Detekce $\mu$ -opioidních receptorů

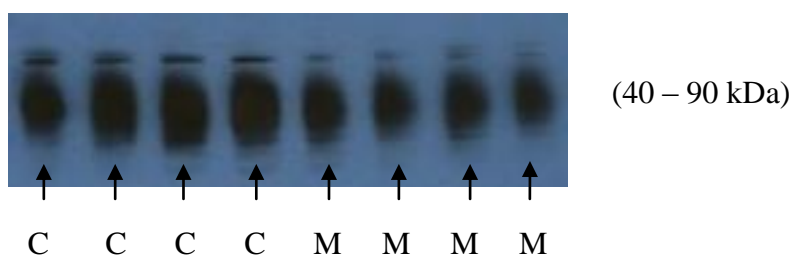


Obr. č. 7: Experimentální výsledky imunodetekce  $\mu$ -opioidního receptoru (MOR). Písmenem „C“ jsou označeny vzorky z kontrolních zvířat, „M“ označuje vzorky z potkanů ovlivněných morfinem. Difúzní proužky označené (1) na filmu odpovídají glykosylovanému monomeru MOR, (2) deglykosylovanému monomeru MOR.

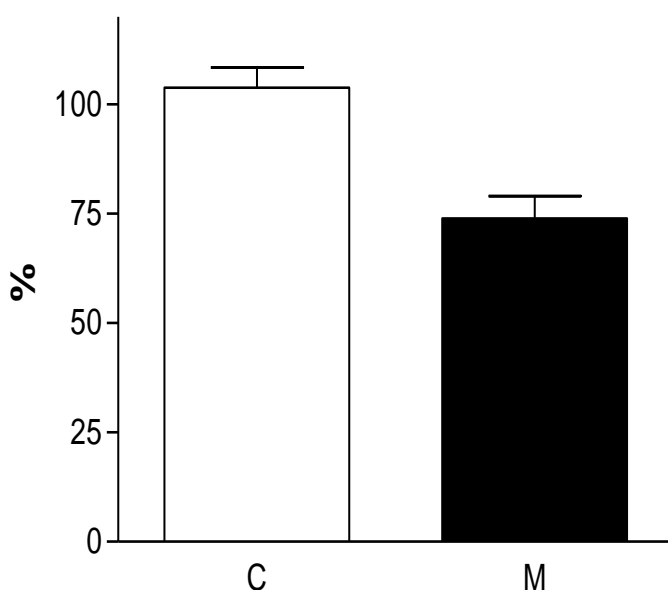
Na obrázku č. 7 na předešlé straně je výřez z filmu, na který byly přeneseny experimentální výsledky imunodetekce  $\mu$ -opioidních receptorů (metoda stanovení viz kapitola 4.1.2.4.). Proužky v prvních čtyřech (zleva) pomyslných sloupcích odpovídají množství  $\mu$ -opioidních receptorů ve vzorcích z kontrolních zvířat, druhá čtveřice sloupců s proužky reprezentuje zastoupení těchto receptorů v morfinem ovlivněných potkanech. Molekulová hmotnost glykosylovaného monomeru se pohybuje v rozmezí 40 – 90 kDa a jeho proužek má difuzní charakter, který je dán mírou glykosylace. Grafické vyhodnocení zastoupení této formy receptoru je na obr. č. 8, str. 32. Hmotnost deglykosylovaného monomeru MOR je přibližně 28 – 32 kDa a proužek je „zaostřen“. Zastoupení této formy je blíže popsáno na obr. č. 9, str. 33. Uvedené hmotnosti MOR odpovídají molekulovým hmotnostem monomeru  $\mu$ -opioidního receptoru v mozcích potkanů a byly určeny porovnáním se standardem molekulových hmotnosti BSA. Získané proužky byly pro jednotlivé formy receptorů vyhodnoceny pomocí počítačového programu *AidaImageAnalyzer* a následně graficky zpracovány v programu *GraphPadPrism*, ve kterém bylo provedeno i statistické vyhodnocení změn, použitý byl Studentův t-test s 95% intervalem spolehlivosti.

### (1) MOR – glykosylovaný

A



B



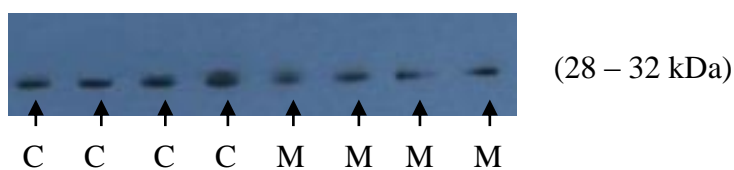
Obr. č. 8: (A) Výsledky imunodetekce glykosylované formy monomeru  $\mu$ -opioidních receptorů (MOR). Proužky „C“ odpovídají vzorkům z kontrolních zvířat, proužky „M“ vzorkům z potkanů ovlivněných morfinem. (B) Graf zastoupení glykosylovaného monomeru MOR v procentech. Zastoupení v kontrolních vzorcích je označeno písmenem „C“ - bílý sloupec. Vzorkům z potkanů, kterým byl podáván morfin, odpovídá černý sloupec „M“.

Část „A“ obr. č. 8 přibližuje výsledek imunodetekce  $\mu$ -opioidních receptorů (výřez z obr. č. 7, str. 30), konkrétně glykosylované formy, která má charakter difúzních proužků. Z grafu (část „B“) na tomto obrázku je zřejmé, že nastal pokles množství glykosylovaných monomerů tohoto receptoru ve vzorcích z morfinem ovlivněných potkanů oproti kontrolním, a to přibližně o 25%. Statistickým vyhodnocením byla procentuální změna množství uznaná jako signifikantní.

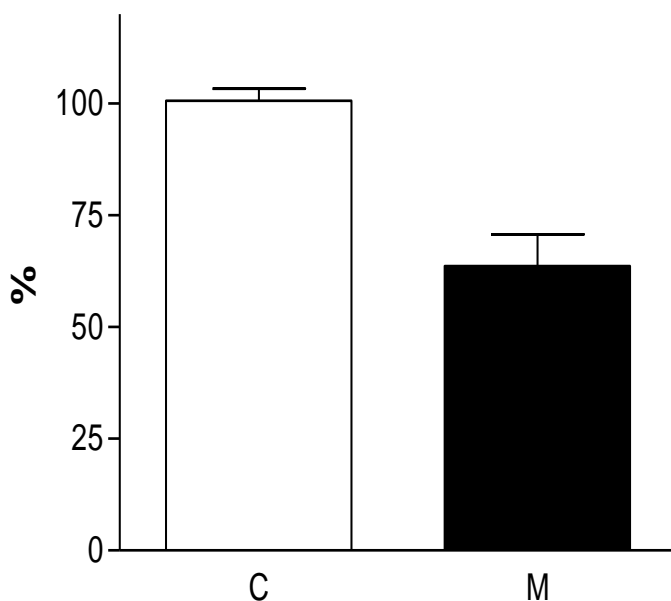


## (2) MOR – deglykosylovaný

A



B



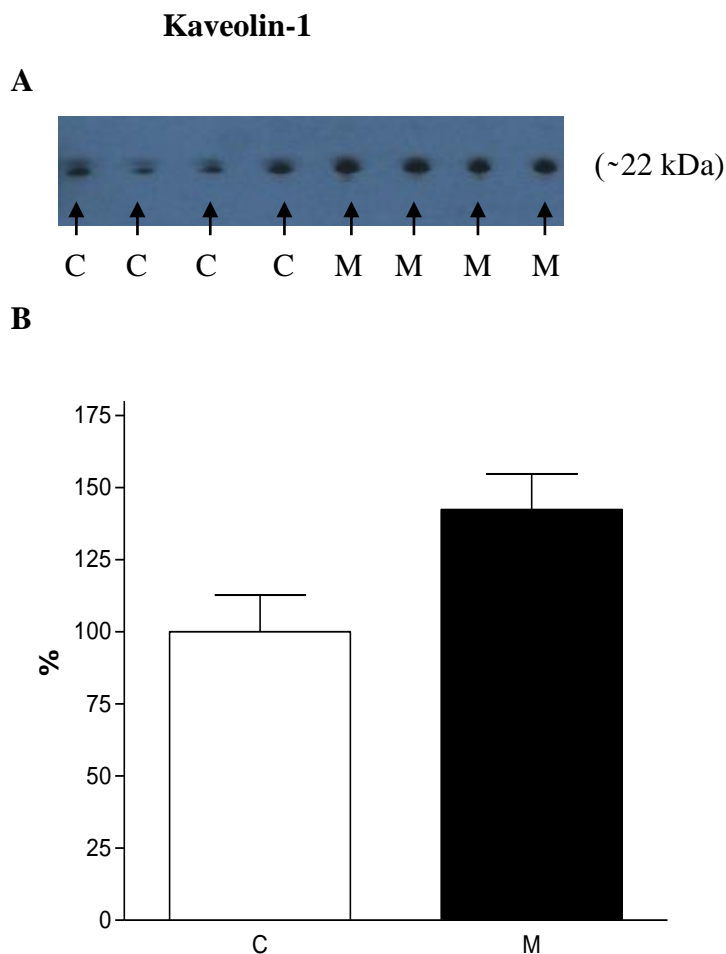
Obr. č. 9: (A) Množství deglykosylovaných monomerů  $\mu$ -opioidních receptorů (MOR) stanovené metodou „Western blot“. Proužky označeny jako „C“ odpovídají vzorkům z kontrolních zvířat, proužky označeny jako „M“ representují vzorky z potkanů ovlivněných morfinem. (B) Procentuální grafické vyjádření zastoupení monomerů MOR v kontrolách je označeno „C“ (bílý sloupec) a ve vzorcích od morfinem ovlivněných potkanů „M“ (černý sloupec).

První část obrázku 9 (A) je výřez z obrázku č. 7 na straně 30 a přibližuje výsledné stanovení množství minoritní monomerní deglykosylované formy  $\mu$ -opioidních receptorů (MOR). Je patrné, že ve čtveřici proužků označených písmenem „M“ je receptorů méně (proužky jsou menší a méně výraznější) než v první čtveřici označených písmenem „C“. Proužky „M“ odpovídají vzorkům z potkanů, kterým byl podáván morfin. Grafické zpracování (B) prokázalo, že nastal úbytek deglykosylovaných  $\mu$ -opioidních receptorů a to

ještě výraznější než u její glykosylované formy (obr. 8, str. 32). Statisticky je tato změna signifikantní.

### **5.3. Detekce kaveolinů**

Následující obrázky jsou typickou ukázkou výřezů z filmů, na které byly přeneseny výsledky stanovení kaveolinů použitím metody „Western blot“ (viz kapitola 4.1.2.4.). Detekováno bylo zastoupení proteinů kaveolin-1 (Cav-1) a kaveolin-2 (Cav-2) ve vzorcích potkaních kortexů ovlivněných morfinem a vzorcích kortexů kontrolních zvířat. Měření bylo provedeno vždy v tetraplikátu daného vzorku a celkem bylo zopakováno ještě dvakrát. Molekulová hmotnost proteinů, byla určena srovnáním s molekulovými hmotnostmi standardu a v případě kaveolinu-1 byla potvrzena pozitivní kontrolou. Na vyhodnocení výsledků byl použitý počítačový program *AidaImageAnalyzer*. Graf procentuálního zastoupení pro oba proteiny byl vytvořen programem *GraphPadPrism*, ve kterém bylo uděláno i statistické vyhodnocení. Signifikance zaznamenaných změn byla ověřena pomocí Studentova t-testu. Interval spolehlivosti byl 95%.

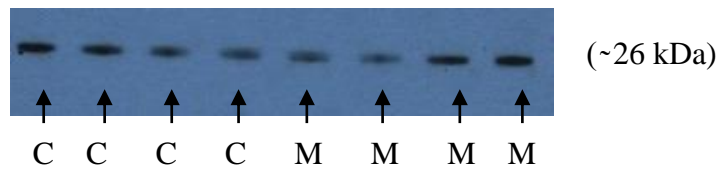


Obr. č. 10: Experimentálně získané výsledky imunodetekce kaveolinu-1. Proužky označeny písmenem „C“ patří vzorkům z kontrolních potkanů, „M“ jsou vzorky z potkanů, kterým byl podáván morfin. (B) Grafické vyhodnocení části „A“ - bílý sloupec označen písmenem „C“ vyjadřuje procentuální zastoupení Cav-1 v kontrolních potkanech, černý sloupec označen jako „M“ procentuální zastoupení Cav-1 v potkanech ovlivněných morfinem.

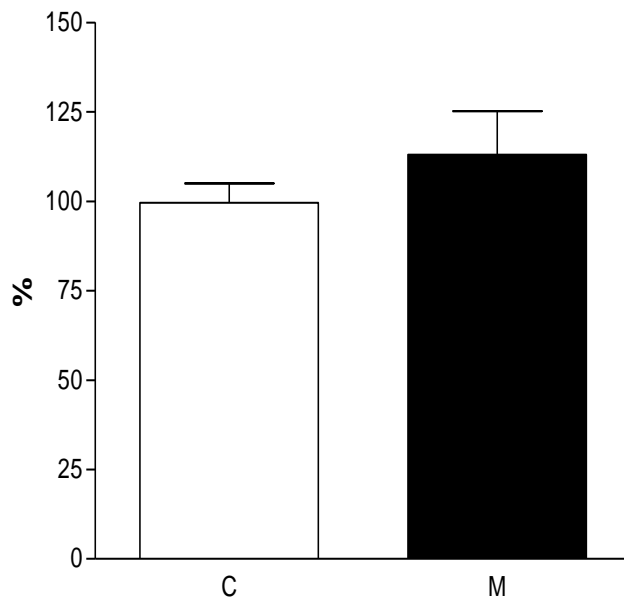
Na obrázku č. 10 (A) je výsledek jednoho z třech stanovení množství kaveolinu-1. Graf na tomto obrázku (B) je vyhodnocením všech třech nezávislých pokusů a je zjevné, že nastal procentuální nárůst množství kaveolinu-1 u morfinem ovlivněných zvířat ve srovnání s kontrolními zvířaty, a to asi o 45%. Statisticky byla tato změna vyhodnocena jako signifikantní.

## Kaveolin-2

**A**



**B**



Obr. č. 11: Výsledek imunodetekce kaveolinu-2. Proužky označeny písmenem „C“ odpovídají vzorkům z kontrolních potkanů, „M“ jsou vzorky získané z potkanů, kterým byl podáván morfin. (B) Grafické zpracování experimentálních dat (proužků) Cav-2 v kontrolách – bílý sloupec označen „C“, a ve vzorcích ovlivněných morfinem – černý sloupec označen „M“.

Část (A) obr. č. 11 je reprezentativní výsledek imunodetekce kaveolinu-2. Celkově byly provedeny tři měření, jejichž grafické zpracování vyjadřuje procentuální zastoupení tohoto proteinu ve zkoumaných vzorcích. Na grafu je vidět mírný nárůst v kvantitě kaveolinu-2 u morfinem ovlivněných zvířat. Změna však byla statisticky vyhodnocena jako nesignifikantní.

## 6. DISKUZE

Je známo, že působení morfinu na organismus je spojeno s internalizací (endocytickou dráhou)  $\mu$ -opioidních receptorů (MOR). Dlouhodobým působením morfinu se snižuje účinnost internalizační dráhy a receptory podléhají degradaci (downregulaci) (He L. a kol., 2002). To se může projevit snížením počtu MOR (Koch T., Hollt V., 2008). Také výsledky této práce potvrzují úbytek MOR ve vzorcích postnukleárního supernatantu kortexů potkanů, kterým byl podáván morfin. Ve srovnání s kontrolními vzorky pokleslo množství glykosylované formy (60 – 90 kDa) asi o 25 %. Při použití metody „Western blot“ mají příslušné proužky (viz obr. č. 8 na str. 32) difúzní charakter v důsledku různé míry glykosylace, a tedy rozdílné molekulové hmotnosti (Huang P., Liu-Chen L. Y., 2009). Ještě výraznější kvantitativní pokles po podávání morfia byl pozorován pro minoritní deglykosylovanou formu monomeru MOR (28 – 32 kDa). Nepřítomnost glykosylace způsobí, že proužek je „zaostřen“ (obr. č. 9 str. 33). Pokles počtu receptorů je spojován se vznikem morfinové závislosti a tolerance (Koch T., Hollt V., 2008).

Detekce proteinů kaveolin-1 a kaveolin-2 byla stejně jako pro  $\mu$ -opioidní receptor provedena metodou „Western blot“. Množství kaveolinu-1 bylo ve vzorcích z morfinem ovlivněných potkanů signifikantně zvýšené oproti vzorkům z kontrolních zvířat (obr. č. 10 str. 35). Také množství kaveolinu-2 se ve srovnání s kontrolními zvířaty po aplikaci morfia mírně zvyšuje (obr. 11, str. 36), tato změna však byla vyhodnocena jako nesignifikantní. Je možné, že statistická nevýznamnost tohoto výsledku je pouze důsledkem menšího objemu dat (celkem 12 hodnot ze tří nezávislých pokusů) a že by se v rozsáhleji koncipovaném experimentu také tento nárůst ukázal jako signifikantní.

Dlouhodobé vystavení organismu účinkům morfinu může vést k neurodegenerativním změnám, apoptose neuronů a mikroglíí (Mao J. a kol., 2002; Hu S. a kol., 2002). Studie Gaudreaultové a spolupracovníků (Gaudreault S. B. a kol., 2005) uvádí, že dochází ke zvýšené produkci kaveolinu-1 v posttraumatických neuronech pravděpodobně proto, že poškozené neurony ho potřebují k nastolení homeostázy cholesterolu, který je důležitý při přestavbě membrány a pro obnovení synapse. Naznačuje to, že kaveolin-1 by mohl ovlivňovat neuroplasticitu a mít tak úlohu v neurodegenerativních procesech (Gaudreault S. B. a kol., 2005). Podle jiné práce (Niesman I. R. a kol., 2014) jsou kaveoliny regulátory signálu pro přežití neuronů a glií při zranění mozku. Tito autoři našli u „knock out“ myši bez kaveolinu-1 a kaveolinu-3 mnohem

rozsáhlejší léze na mozku v porovnání s kontrolními zvířaty. Je tedy možné předpokládat, že nalezené zvýšení množství kaveolinu-1 v kortexech potkanů po dlouhodobé adaptaci na morfin signalizuje poškození nervové tkáně, a následnou kompenzační reakci vůči působení morfinu. Na základě pouze kvantitativní změny je odvážné vyslovit jednoznačný závěr. Tato skutečnost však naznačuje, že by mohl existovat vztah mezi množstvím kaveolinu-1 a účinkem morfinu.

## 7. ZÁVĚR

Podávání morfia po dobu deseti dnů vedlo ke snížení množství  $\mu$ -opioidních receptorů v buňkách kortexu potkanů ve srovnání s kontrolními zvířaty. Tato změna je v souladu se změnami pozorovanými při vzniku tolerance a závislosti na morfinu.

Odlišný vliv má podávání morfia na množství kaveolinů. Byl zaznamenán signifikantní nárůst množství kaveolinu-1 u morfinem ovlivněných potkanů v porovnání s kontrolou a menší, nesignifikantní nárůst množství kaveolinu-2. Není mi známa žádná publikovaná práce, která by se zabývala vzájemným vztahem množství kaveolinu-1 a účinkem morfinu v potkaním kortexu/mozku. Proto ověření tohoto poznatku a jeho rozšíření by mělo být předmětem dalších studií.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Al-Hasani R, Bruchas MR. *Anesthesiology* 115: 1363-81
2. Allen JA, Yu JZ, Dave RH, Bhatnagar A, Roth BL, Rasenick MM. 2009. *Mol Pharmacol* 76: 1082-93
3. Bailey CP, Connor M. 2005. *Curr Opin Pharmacol* 5: 60-8
4. Blake AD, Bot G, Reisine T. 1996. *Chem Biol* 3: 967-72
5. Brownstein MJ. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5391-3
6. Bu J, Bruckner SR, Sengoku T, Geddes JW, Estus S. 2003. *J Neurosci Res* 72: 185-90
7. Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. 1997. *J Neurosci* 17: 9520-35
8. Contet C, Kieffer BL, Befort K. 2004. *Curr Opin Neurobiol* 14: 370-8
9. Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ. 2006. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S153-62
10. Cox BM. *Mol Pharmacol* 83: 723-8
11. Emmerson PJ, Clark MJ, Medzihradsky F, Remmers AE. 1999. *J Neurochem* 73: 289-300
12. Finn AK, Whistler JL. 2001. *Neuron* 32: 829-39
13. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. 2001. *Cell* 106: 403-11
14. Gaudreault SB, Blain JF, Gratton JP, Poirier J. 2005. *J Neurochem* 92: 831-9
15. Gaudreault SB, Dea D, Poirier J. 2004. *Neurobiol Aging* 25: 753-9
16. Gioiosa L, Raggi C, Ricceri L, Jasmin JF, Frank PG, et al. 2008. *Behav Brain Res* 188: 255-62
17. Hameed H, Hameed M, Christo PJ. *Curr Pain Headache Rep* 14: 96-104
18. He L, Fong J, von Zastrow M, Whistler JL. 2002. *Cell* 108: 271-82
19. Head BP, Insel PA. 2007. *Trends Cell Biol* 17: 51-7
20. Hu S, Sheng WS, Lokensgard JR, Peterson PK. 2002. *Neuropharmacology* 42: 829-36
21. Huang P, Liu-Chen LY. 2009. *Front Biosci (Elite Ed)*1: 220-7
22. Huang P, Xu W, Yoon SI, Chen C, Chong PL, et al. 2007. *Brain Res* 1184: 46-56
23. Chaturvedi K, Bandari P, Chinen N, Howells RD. 2001. *J Biol Chem* 276: 12345-55



24. Janecka A, Fichna J, Janecki T. 2004. *Curr Top Med Chem* 4: 1-17
25. Jasmin JF, Yang M, Iacovitti L, Lisanti MP. 2009. *Cell Cycle* 8: 3978-83
26. Kieffer BL, Evans CJ. 2002. *Cell* 108: 587-90
27. Koch T, Holtt V. 2008. *Pharmacol Ther* 117: 199-206
28. Kreek MJ, Levran O, Reed B, Schlussman SD, Zhou Y, Butelman ER. *J Clin Invest* 122: 3387-93
29. Law PY, Wong YH, Loh HH. 2000. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389-43030.  
Law PY, Erickson-Herbrandson LJ, Zha QQ, Solberg J, Chu J, Sarre A, Loh HH. 2005. *J Biol Chem* 280: 1152 -64
31. Levitt ES, Clark MJ, Jenkins PM, Martens JR, Traynor JR. 2009. *J Biol Chem* 284: 22108-22
32. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, et al. *Nature* 485: 321-6
33. Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. 2002. *J Neurosci* 22: 7650-61
34. Martini L, Whistler JL. 2007. *Curr Opin Neurobiol* 17: 556-64
35. Minami M, Satoh M. 1995. *Neurosci Res* 23: 121-45
36. Niesman IR, Schilling JM, Shapiro LA, Kellerhals SE, Bonds JA, et al. *J Neuroinflammation* 11: 39
37. Perez-Aguilar JM, Saven JG, Liu R. 2012. *J Anesth Clin Res* 3: 218
38. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. 2002. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639-50
39. Qiu Y, Wang Y, Law PY, Chen HZ, Loh HH. *Mol Pharmacol* 80: 210-8
40. Satoh M, Minami M. 1995. *Pharmacol Ther* 68: 343-64
41. Schlegel A, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Mehta P, et al. 1998. *Cell Signal* 10: 457-63
42. Schwab W, Hempel U, Funk RH, Kasper M. 1999. *Histochem J* 31: 315-20
43. Sprenger RR, Fontijn RD, van Marle J, Pannekoek H, Horrevoets AJ. 2006. *Biochem J* 400: 401-10
44. Stan RV. 2005. *Biochim Biophys Acta* 1746: 334-48
45. Stern CM, Mermelstein PG. *Cell Mol Life Sci* 67: 3785-95
46. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. 2008. *Pain Physician* 11: S133-53
47. Trushina E, Du Charme J, Parisi J, McMurray CT. 2006. *Behav Brain Res* 172: 24-32

48. Ujcikova H, Brejchova J, Vosahlikova M, Kagan D, Dlouha K, Sykora J, Merta L, Drastichova Z, Novotny J, Ostasov P, Roubalova L, Parenti M, Hof M, Svoboda P. 2014. *Physiol Res* 63: S165-76
49. von Zastrow M. *Drug Alcohol Depend* 108: 166-71
50. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. 2004. *Annu Rev Biochem* 73: 953-90
51. Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, et al. *Pharmacol Rev* 65: 223-54
52. Zhao H, Loh HH, Law PY. 2006. *Mol Pharmacol* 69: 1421-32
53. Zheng H, Chu J, Qiu Y, Loh HH, Law PY. 2008. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9421-6
54. Zou W, Wang HX, Liu J, Zhang H, An LJ. 2006. *Sheng Li Xue Bao* 58: 429-34

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámky