

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Studium membránových receptorů pomocí vazby
radioligandů**

**The study of membrane receptors by radioligands
binding**

Bc. Alexandra Rejhová

Diplomová práce
2011

Školitel-konzultant: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.
Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

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

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

Bc. Alexandra Rejhová

V Praze, dne 27. 4. 2011

.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení práce. Dále děkuji RNDr. Lence Roubalové, PhD. za trpělivou pomoc s výpočty a programem GraphPad Prism a Ing. Martinu Chmátalovi, CSc. za pomoc při experimentální práci a spoustu cenných informací.

ABSTRACT

Drug addiction, opiates respectively, is a social problem which seriousness is currently on the rise. One of key elements causing addiction is tolerance to increasing doses of drug causing abstinence syndrome during withdrawal and craving.

Opioid receptors are members of a large group of receptors coupled with heterotrimeric G-proteins (GPCR), whose properties can be investigated using agonist-stimulated binding [³⁵S]GTPγS. Many extracellular signals are transferred into a cell through GPCR. Opioid receptor agonists inhibit the activity of adenylyl cyclase and are coupled with G-protein group Gi/Go. This work is devoted to the study of changes in isolated plasma membranes of rat forebrain containing opioid receptors of healthy subjects with membranes acquired from morphine addicted subjects. The rats were long-term morphine treated in increasing doses, to develop the dependency. The comparison is done firstly by binding of [³H]ouabain to Na,K-ATPase, which proves to be a negative standard of changes, secondly by binding [³⁵S]GTPγS to G-proteins, thereby providing the functional activity of G-protein in stimulating the binding by the agonist of δ-opioid receptors DADLE or agonist of μ-opioid receptors DAMGO. Furthermore, it has been studied the influence of prostaglandin E1 on binding [³⁵S]GTPγS after long-term stimulation by morphine and identified the effect of little potentiation of binding DAMGO by the influence of PGE1 after long-term morphine stimulation.

(In Czech)

ABSTRAKT

Závislost na drogách, resp. opioidech, je celospolečenským problémem, jehož závažnost je v současné době na vzestupu. Se zneužíváním návykových látek je spojen také fenomén tolerance ke zvyšující se dávce a abstinenční syndrom způsobený vysazením drogy a bažení po droze (tzv. *craving*).

Receptory pro opioidy patří do velké skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR), jejichž vlastnosti lze zkoumat metodou agonistou-stimulovanou vazbou [³⁵S]GTPγS. Mnoho extracelulárních signálů je zprostředkováno do buňky prostřednictvím GPCR. Agonisté opioidních receptorů inhibují aktivitu adenylylcyklyasy a jsou spřaženy

s G-proteiny skupiny G_i/G_o . Tato práce je věnována studiu změn izolovaných plasmatických membrán obsahujících opioidní receptory z předního mozku potkanů zdravých jedinců s plasmatickými membránami získanými z jedinců, kterým bylo dlouhodobě podáváno morfium ve zvyšujících se dávkách tak, aby vznikla závislost. Srovnávání je prováděno jednak pomocí vazby [^3H]ouabainu na Na,K-ATPasu, která se projeví jako negativní standard změn, jednak pomocí vazby [^{35}S]GTP γ S na G-protein, čímž je stanovena funkční aktivita G-proteinu při stimulaci vazby agonistou δ -opioidních receptorů DADLE nebo agonistou μ -opioidních receptorů DAMGO. Dále byl zkoumán vliv prostaglandinu E1 na vazbu [^{35}S]GTP γ S po dlouhodobé stimulaci morfiem a zjištěn efekt mírné potenciace vazby DAMGO vlivem PGE1 po dlouhodobé stimulaci morfiem.

OBSAH

1. ÚVOD	10
1.1. Molekulární struktura membrán.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. Membránové receptory	11
2.1.1. Receptory spřažené s G-proteiny.....	12
2.1.2. Opioidní receptory	14
2.1.3. G-proteiny, dělení podle tříd.....	16
2.1.4. Adenylylcyklasa	19
2.2. Na,K- ATPasa	20
2.3. Ouabain	22
2.4. Princip vazby radioligandu	
- charakterizace receptoru pomocí přímé vazebné studie	23
3. CÍL PRÁCE	25
4. PRAKTICKÁ ČÁST	26
4.1. Materiál	26
4.1.1. Chemikálie.....	26
4.1.2. Přístroje.....	26
4.1.3. Vzorky	27
4.2. Metody	27
4.2.1. Frakcionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace	27
4.2.1.1. Příprava post- nukleárního supernatantu (PNS)	28
4.2.1.2. Izolace plasmatických membrán mozků na Percollovém gradientu	28
4.2.2. Izolace membránových domén - flotace v hustotním gradientu sacharosy.....	29
4.2.3. Stanovení proteinů – Lowryho metoda.....	31
4.2.4. Stanovení ouabainové vazby	32
4.2.4.1. Stanovení ouabainové vazby- matematický rozbor.....	32
4.2.4.2. Stanovení ouabainové vazby- postup	34
4.2.5. Agonistou stimulované stanovení vazby [³⁵ S]GTPγS	37
4.3. Výpočty a výsledky.....	42
5. DISKUSE	65
6. ZÁVĚR	70
Seznam použité literatury	72

Seznam zkratek

AC	adenylylcyklasa
ADP	adenosin difosfát
ATP	adenosin trifosfát
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumine</i>)
CTR	vzorky pocházející od kontrolní skupiny potkanů
DADLE	agonista δ - opioidních receptorů, [D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enkefalin
DAMGO	agonista μ - opioidních receptorů, [D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enkefalin
DOR-Gi	stabilně transfekované linie buněk HEK-293 které exprimují fúzní konstrukt δ -opioidního receptoru s G α_i 1 proteinem
DTT	dithiotreitol, redoxní činidlo
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina, chelatační činidlo (váže např. Mg ²⁺)
G-proteiny	trimerní GTP-vazebné proteiny
GDP	guanosin difosfát
GPCR	z angl. <i>G-protein coupled receptors</i> , receptory spřažené s G-proteiny
GRK	kinasa regulující cyklus G-proteinu
GTP	guanosin trifosfát
[³ H]ouabain	triciem značený ouabain
HEK-293	z angl. <i>human embryonic kidney cells</i> , buněčná linie pocházející z embryonálních ledvinných buněk, používané pro transfekci a následnou expresi požadovaného proteinu
HEPES	pufrovací roztok, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanosulfonová
MOR	vzorky pocházející od potkanů, jimž bylo dlouhodobě podáváno morfium
NSP	nespecifická vazba
PEI	polyethylenimin, impregnační činidlo použité pro zesílení vláken skelného filtru GF/C

Percoll. m.	percollové membrány, membrány vzniklé separací na gradientu Percollu
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PM	plasmatické membrány
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid, inhibitor proteas
RGS	regulátory G-proteinové signalizace
SEM	standardní chyba průměru
STEM	fosfátový pufr podle <i>Sørensen</i> a
TE	pufrovací roztok obsahující pufr Tris-HCl a EDTA
μ, δ, κ - OR	opioidní receptory μ, δ a κ
7TM	sedmitransmembránové receptory, většinou takto značíme receptory spřažené s G-proteiny

Základní pojmy

agonista	váže se na specifický receptor, čímž jej aktivuje
antagonista	váže se na specifický receptor, čímž blokuje odpověď vyvolanou vazbou agonisty, inhibuje funkci agonisty
radioligand	radioaktivně značená látka vázající se na receptor
desensitizace	utlumení, pokles intenzity nebo ztráta funkce receptoru vlivem opakovaného nebo prodlouženého (chronického) působení primárního signálu receptoru; ztráta afinity agonisty k receptoru
down-regulace	snížení počtu membránových receptorů na povrchu buňky, internalizace do buňky, po určité době zpětné vynesení na povrch anebo degradace
tolerance	v souvislosti s opioidy: pro dosažení stejného účinku je třeba podávat stále vyšší dávky
drogová závislost	silná, nutková a opakující se patologická potřeba aplikovat si drogu; definovatelná pojmy jako bažení po droze (tzv. <i>craving</i>), zvyšování tolerance, abstinenční příznaky po vysazení
percollové membrány	purifikované plasmatické membrány získané izolací na percollovém gradientu

1. ÚVOD

1.1. Molekulární struktura membrán

Živé buňky mají svůj vnitřní prostor oddělen od vnějšího prostředí plasmatickou membránou. Strukturu membrán rozlišujeme na mikroskopickou strukturu, submikroskopickou strukturu (elektronovým mikroskopem rozlišitelná vnitřní organizace membrány) a molekulární strukturu (makromolekuly biopolymerů a jiné molekuly tvořící funkční a strukturní komponenty membrány) (1). Subcelulární orgány jsou membránou ohraničeny, některé obsahují dokonce dvojistou membránu (u eukaryot- mitochondrie, jádro). Membrány obsahující transportní proteiny zodpovídají za selektivní transport různých látek do buňky či do buněčných kompartmentů. Struktura membrán je stabilizována převážně hydrofobními interakcemi a vyznačuje se fluidním charakterem, hovoříme o tzv. modelu fluidní mozaiky. Součástí membrán jsou i tzv. membránové domény neboli rafty (2). Membránové domény jsou oblasti s vyšším obsahem cholesterolu a sfingolipidů.

Z hlediska molekulární struktury jsou membrány složeny z orientované dvojvrstvy fosfolipidů a dalších chemických komponent- molekul lipidů a proteinů, sacharidů, či cholesterolu. Z lipidů jsou v membránách obsaženy fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, sfingomyelin, fosfatidylinositol a cholesterol (3).

Proteiny obsažené v membránách jsou co do jejich funkce velmi různorodé, mohou to být molekuly enzymů (např. adenylcyklasa), transportní proteiny, či receptorové proteiny. Některé proteiny obsažené v membránách lze snadno z membrány oddělit (např. cytochrom c z mitochondriálních membrán, který je v kontaktu pouze s polární „hlavou“ lipidů), nazýváme je periferní membránové proteiny. Naopak, proteiny pevněji vázané v membráně označujeme jako integrální proteiny (prostupují dvojvrstvou fosfolipidů, jsou v kontaktu i s hydrofobními konci). Tyto jsou však na rozdíl od periferních proteinů téměř nerozpustné ve vodě. Integrální proteiny obsahují více apolárních aminokyselin než proteiny cytoplasmy, a většina integrálních proteinů má globulární strukturu s α -helikální konformací (2).

Sacharidy jsou v membránách obvykle vázány na další složky, na proteiny (glykoproteiny) nebo lipidy (glykolipidy). Nejčastěji zastoupenými monosacharidy

v membránách jsou L-fukosa, manna, glukosa, galaktosa, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin a sialová kyselina.

Jak již bylo výše uvedeno, z hlediska strukturních modelů je membrána popisována jako mozaika molekul lipidů a globulárních proteinů (4, 5, 6). Fosfolipidy jsou uspořádány do molekulární dvojvrstvy představující vlastní matrix membrány. Do této dvojvrstvy jsou vloženy molekuly integrálních proteinů, které mohou buď být pouze z jedné strany různě hluboko zanořeny či procházet celou dvojvrstvou (penetrující proteiny). Pozice proteinu je určena hydrofobními interakcemi. Hydrofilní proteiny jsou vázány na hydrofobní integrální proteiny nebo tvoří periferní proteiny. Některé proteiny se váží na sebe navzájem protein-proteinovými interakcemi, čímž vytvářejí agregáty, volně plovoucí v matrixi fosfolipidové dvojvrstvy a vytvářejí tzv. tekutou mozaiku (1).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Membránové receptory

Již počátkem minulého století byl Paulem Ehrlichem formulován model selektivního rozpoznávání prostředí povrchem buněk pomocí specifických membránových receptorů (7). Plasmatická membrána je schopna díky membránovým receptorům přenosu účinku různých látek (např. hormony, neurotransmitery, antigeny, růstové faktory, toxiny, lektiny), které jsou schopny vyvolat specifickou biochemickou odpověď. Po vazbě ligandu na receptor (cytoplasmatický, jaderný apod.), dochází ke konformační změně receptoru a aktivaci následné signální dráhy. Hlavními vlastnostmi membránových receptorů jsou tedy jednak specifické rozlišení a vazba daného ligandu, a dále přenos informace do nitra buňky (resp. kompartmentu), a vyvolat odpověď.

Membránové receptory jsou umístěny na povrchu membrány (buněčné, či membrány buněčných kompartmentů) a zprostředkují interakci buňky s extracelulárním prostorem, respektive s cytoplasmou (v případě membrány buněčných kompartmentů). Úloha buněčných membránových receptorů spočívá především v selektivním rozpoznávání ligandů z extracelulárního prostoru, a přenosu této informace do intracelulárního prostoru. Receptory jsou nekovalentními hydrofobními silami asociovány s membránou a

předpokládá se, že většina receptorů jsou integrální proteiny. Hydrofobní částí jsou membránové receptory zakotveny v membráně, zatímco hydrofilní část obsahující rozpoznávací místo je volně exponována do extracelulárního prostoru.

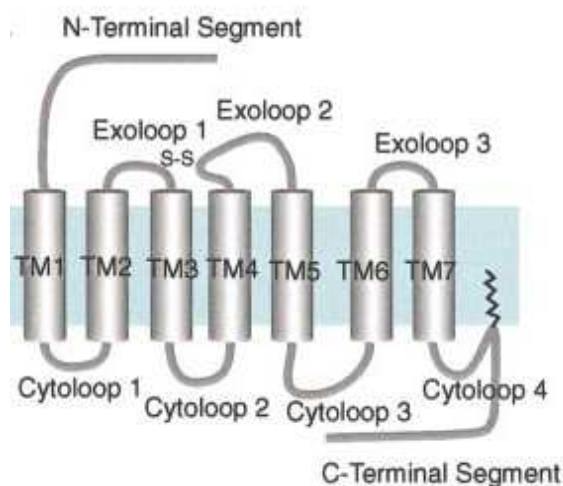
Základní typy přenosu signálu dělíme podle mechanismu přenosu signálu do několika skupin: 1) efektor (enzym) je integrální součástí receptorové molekuly (tyrosinkinasové receptory); 2) efektor (iontový kanál) je spřažen s receptorem, receptorový protein je integrální součástí iontového kanálu (ligandem řízené iontové kanály- z angl. *ligand-gated ion channels*); 3) efektor je spřažen s receptorem pomocí přenašeče (receptory funkčně spřažené s trimerními GTP-vazebnými proteiny (GPCR) (8). Právě poslední zmiňovanou skupinou receptor- efektorových systémů se nyní budeme zabývat.

2.1.1. Receptory spřažené s G-proteiny

Receptory funkčně spřažené s trimerními GTP- vazebnými proteiny (z angl. *G-protein coupled receptors*, GPCR) jsou největší skupinou membránových receptorů zodpovědných za přenos signálu. Současné zdroje uvádí, že jsou kódovány asi jedním procentem savčího genomu a jejich počet se odhaduje okolo tisíce (9, 10). Receptory spřažené s G-proteiny dělíme do 100 podrodin podle sekvenční homologie, struktury ligandů a funkce (11). Možná dysfunkce těchto receptorů, například vlivem mutace, může způsobit neschopnost přenosu signálu či vazby ligandu, a v konečném důsledku může být příčinou četných onemocnění (8). GPCR receptory jsou cílovými místy terapeutického účinku více než poloviny prodávaných léčiv (8). Zprostředkovávají signál mnoha signálních molekul, hormonů, či nervových mediátorů (12).

Obecná struktura receptorů spřažených s G-proteiny je u všech G-proteinů obdobná- obsahují jediný polypeptidový řetězec, jenž sedmkrát prostupuje dvojvrstvu fosfolipidů (viz obr. 1, str. 13). Struktura receptorů spřažených s G-proteiny obsahuje následující části: N-terminální konec, který ční do extracelulárního prostoru, sedm transmembránových helixů, tři extracelulární a tři intracelulární smyčky, které je spojují a C-terminální konec v intracelulárním prostoru. Je-li C-terminální konec palmitoylován na cysteinu, tvoří se čtvrtá intracelulární smyčka (11). Helixy prostupující membránou jsou tvořeny 20- 27

aminokyselinami (11). Na N-terminálním konci a extracelulárních smyčkách dochází k vazbě ligandu a glykosilaci, C-konec může být posttranslačně modifikován palmitoylací či fosforylací (11). Obecně můžeme receptory spřažené s G-proteiny nazývat také sedmitransmembránové (7TM) receptory, jelikož většina 7TM receptorů přenáší signál prostřednictvím heterotrimerních G-proteinů.



Obr. 1: Obecná struktura GPCR: TM1-TM7 znázorňují transmembránové úseky helixů umístěných v membráně buňky; v horní části obrázku je znázorněn N-terminální segment, v dolní části obrázku je C-terminální segment; dále vidíme v horní části obrázku 3 extracelulární smyčky, v dolní části obrázku 4 intracelulární (cytoplasmatické) smyčky. Přejato z (11).

Sedm transmembránových úseků je pravděpodobně výhodný počet pro vytvoření vhodné funkční konformace, tzv. jádra (z angl. *TM core*). Předpokládá se, že transmembránové úseky jsou v membráně upořádané do kruhu, do jehož středu se u některých GPCR váže ligand. Jednotlivé úseky helixů jsou vzájemně vázány nekovalentními vazbami- vodíkovými a disulfidickými můstky (11).

Název 7TM vychází ze strukturního uspořádání sedmi transmembránových helixů (13). Tyto receptory lze též nazývat heptahelikální nebo serpentinové. 7TM receptory lze dělit do tří základních skupin podle sekvenční podobnosti aminokyselin podle Pierce a kol. (13). Nejrozsáhlejší skupinou je skupina **A**, která zahrnuje receptory pro světlo

(rhodopsin), adrenalin (adrenergní receptory) a olfaktorické receptory (receptory pro čichové vjemy). Skupina **B** má 25 členů, obsahuje receptory pro peptidové hormony gastrointestinálního traktu, hormon uvolňující kortikotropin, kalcitonin a parathormon. Receptory této skupiny aktivují adenylylcyklasu prostřednictvím G-proteinu třídy G_s . Do skupiny **C** řadíme metabotropní glutamátové receptory, $GABA_B$ receptory, „*calcium-sensing*“ receptor (CaSR) a chuťové receptory (13).

Jediné receptory, jejichž krystalické struktury byly dosud popsány, jsou rhodopsin a beta-adrenergní receptor (14, 77). Poměrně nedávno bylo zjištěno, že GPCR mohou vytvářet dimery (15), a heterodimerizace byla u některých popsána jako klíčová pro signalizaci a vazbu agonistů (16).

Receptory spřažené s G-proteiny přenášejí signál prostřednictvím G-proteinů. Některé receptory této skupiny jsou schopné přenosu signálu i prostřednictvím alternativních signálních molekul, např. pomocí Jak2 kinasy, fosfolipasy $C\gamma$ nebo proteinkinasy C (11).

2.1.2. Opioidní receptory

Opioidní receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny, do skupiny A (17). Ligandy těchto receptorů jsou endogenní mozkové opioidy či exogenní látky-přírodní alkaloidy (morfium, opium, kodein), polysyntetické opioidy (heroin) nebo plně syntetické opioidy (fentanyl, metadon), zneužívané jako návykové látky (17). Akutní intoxikace opioidy se projevuje euforií, ospalostí, snížením dechové frekvence a poklesem tělesné teploty (17). Zmíněné návykové látky vyvolávají psychickou či fyzickou závislost, projevující se po vysazení látky abstinenčním syndromem, dochází též k vývoji tolerance na drogu- závislý musí zvyšovat dávku.

Receptory pro opioidy dělíme do tří skupin: μ , δ a κ - opioidní receptory (μ , δ a κ -OR). Tyto receptory aktivují G-proteiny především z třídy G_i/G_o (17), které inhibují adenylylcyklasu. V této práci se zabývám δ -opioidními receptory, které stimulují vazbou agonisty DADLE-[D-Ala²,D-Leu⁵]-enkefalin a μ -opioidními receptory, jež jsou stimulovány vazbou DAMGO-[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-enkefalin. Antagonisté opioidních receptorů jsou využívány klinicky jako látky potlačující abstinenční syndrom drogově závislých pacientů neboť působí jako kompetitivní inhibitory určitých opioidních

receptorů (18). V současnosti existují látky s vlastností specifických agonistů i antagonistů, působících selektivně na jednotlivé typy opioidních receptorů (18).

Pro experimentální účely, týkající se funkční analýzy G-proteinů spřažených s δ -opioidními receptory, se mohou použít stabilně transfekované HEK-293 buňky, které exprimují fúzní konstrukt δ -opioidního receptoru s $G\alpha_1$ proteinem. Tuto linii nazýváme DOR-Gi (19, 20). Výhodou těchto buněk je snadná manipulace a množení buněk a tak nejsme limitováni množstvím na rozdíl od buněk pocházejících z modelových zvířat.

S dlouhodobým působením opioidů na opioidní receptory jsou spjaty pojmy tolerance (vůči analgetickému efektu), snížení počtu určitých membránových receptorů na povrchu membrány (tzv. „down-regulace“) a desensitizace (nebo též desenzibilizace), tj. utlumení, pokles intenzity nebo ztráta funkce signální dráhy iniciované receptorem vlivem opakovaného nebo prodlouženého (chronického) působení primárního signálu receptorů, snížení či ztráta afinity agonisty k receptoru (18, 21). Mechanismus desensitizace probíhá v případě GPCR jako rychlé funkční rozpřažení receptorů od G-proteinů fosforylací daného receptoru proteinkinasou C (PKC), proteinkinasou A (PKA) nebo třídou kinas spřažených s G-proteiny (*G-protein coupled kinases*, GRKs) (13, 22). Fenomén desensitizace je klíčovým pro pochopení dlouhodobého působení některých látek na organismus, jako např. získání resistance vůči lékům či vznik závislosti a tolerance (23).

V minulých letech byla zjištěna pozoruhodná skutečnost. Zkoumaná zvířata byla vystavena opakovanému podávání opioidů (morfia), přičemž byly poté zkoumány mechanismy signalizace G-proteinů. Opioidní receptory obvykle adenylcyklasu inhibují, neboť jsou spřaženy s G-proteiny třídy G_i/G_o . Vlivem opakovaného dlouhodobého podávání morfia však byla zjištěna vazba G-proteinu třídy G_s na μ -opioidní receptor. Tato vazba byla pravděpodobně způsobena sníženou efektivitou vazby μ -opioidních receptorů ke G-proteinům třídy G_i/G_o vlivem desensitizace (24-27). Výsledkem záměny G_i/G_o za G_s (tzv. *switch*) byla stimulační kaskáda vlivem aktivace adenylcyklasy G-proteinem třídy G_s (27). Tento efekt záměny G_i/G_o za G_s a spojenou toleranci a závislost lze zmírnit velmi nízkou dávkou naloxonu (antagonistou μ -opioidních receptorů, nízkou afinitu má i k δ a κ -OR) (27). Dále bylo prokázáno, že podjednotky $G\beta\gamma$, pocházející z G-proteinu typu G_s interagují s AC2 a AC4, a že komplex $G\beta\gamma$ společně s podjednotkou $G\alpha$ (pocházející též z G_s) přispívají k excitačnímu efektu opioidních receptorů po dlouhodobém podávání morfia (27, 28). Je však důležité si uvědomit, že k záměně G_i/G_o za G_s (*switch*) dochází pravděpodobně právě po dlouhodobém a opakovaném podávání morfia, na nějž vznikla

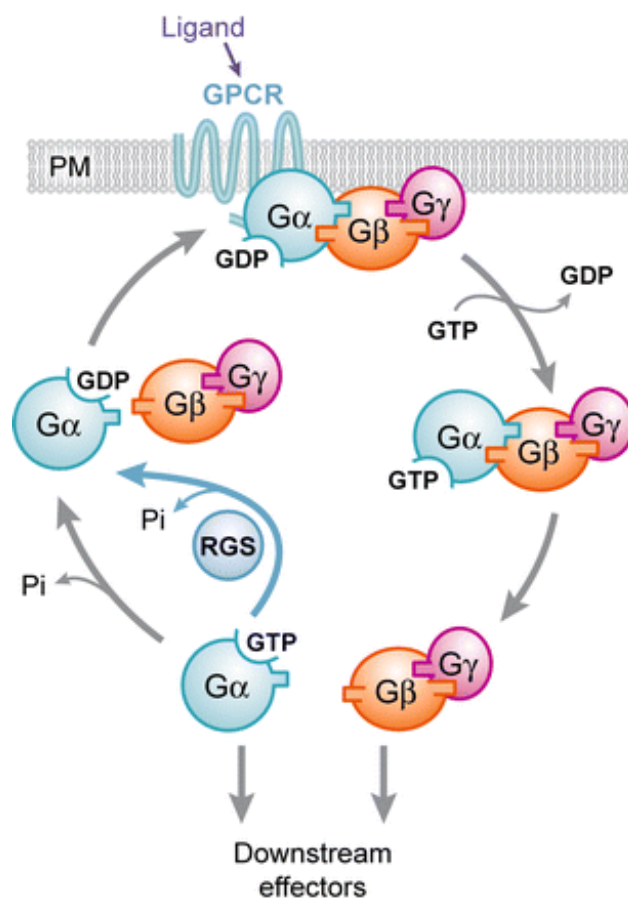
závislost. V rozporu tedy není Sharma a kol., kteří došli k závěru, že morfiu a další opioidy inhibují aktivitu adenylylcyklasové aktivity, což ale nejspíše platí pro krátkodobé anebo jednorázové podání morfia (skupina pracovala s buněčnými liniemi neuroblastomových a gliomových buněk *in vitro*) (29). Tato skupina zjistila, že zatímco morfiu při krátkodobém podávání inhibuje adenylylcyklasovou aktivitu, prostaglandin E1 (PGE1, ligand prostaglandinových receptorů, patřících do skupiny GPCR, jsou spřaženy s G-proteiny třídy G_s) naopak aktivitu AC zvyšuje, což se projeví nárůstem hladiny cAMP (29). Nelze srovnávat zdravé a nádorové buňky, a proto je tato práce také zaměřena na studium vlivu PGE1 a DAMGO na opioidní receptory poté, co mozková tkáň byla *in vivo* vystavena dlouhodobému (10 dní) vlivu morfia.

2.1.3. G-proteiny, dělení podle tříd

Heterotrimerní GTP-vazebné proteiny neboli G-proteiny mají funkci přenašeče signálu mezi membránovým receptorem a efektem (adenylylcyklasa, fosfolipasa C, iontové kanály pro K⁺ a Ca²⁺) (8). G-proteiny jsou složeny ze tří podjednotek, α , β , γ (podle snižující se molekulární hmotnosti) (8). Odlišnosti G α podjednotek určují třídu a funkci G-proteinu. Dlouho se spekulovalo o možné funkci komplexu G $\beta\gamma$, až v poslední době bylo prokázáno, že tento komplex aktivuje některé iontové kanály (30). Kromě heterotrimerních G-proteinů existují i monomerní G-proteiny s obdobnou funkcí. Jsou to malé GTPasy s molekulovou hmotností 20-25 kDa, které nejsou přímo spřažené s GPCR. Tyto malé G-proteiny mají důležitou funkci v mnoha buněčných procesech, jako je buněčný růst, dělení, diferenciace, translace, sekrece neurotransmiterů, intracelulární vezikulární transport či internalizace receptorů (31-33).

V roce 1971 přišel Martin Rodbell na myšlenku, že v adenylylcyklasovém systému regulační GTP-protein funkčně spojuje receptory s efekty, přičemž po aktivaci adenylylcyklasy dochází k tvorbě cyklického adenosin monofosfátu cAMP (34). Další možností je aktivace fosfolipasy C prostřednictvím G-proteinu, která poté působí na membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, který je štěpen na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trisfosfát (inositolfosfolipidová dráha) (12). V obecném případě pro receptory spřažené s GPCR probíhá takováto signální kaskáda následovně: V neaktivním (basálním)

stavu má G-protein ve vysokoafinním místě $G\alpha$ podjednotky navázaný GDP (31). Po navázání substrátu, který je označován jako 1. posel (*first messenger*) (tj. hormon, ligand), na receptor v membráně, dojde k výměně GTP za GDP na $G\alpha$ -podjednotce a G-protein se rozpadá na $G\alpha$ a komplex $G\beta\gamma$. Tímto dějem je heterotrimerní G-protein aktivován. Komplex $G\alpha$ -podjednotka-GTP se poté váže na efektor (adenylylcyklasa, fosfolipasa C, cyklická GMP fosfodiesterasa apod. (13)), který redukuje 2. posly (*second messenger*, např. cAMP, ionty Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , diacylglycerol, inositol 1,4,5 trifosfát).



Obr. 2: Model aktivačního cyklu G-proteinu: V klidovém stavu je G-protein tvořen podjednotkami α , β , γ a má navázaný GDP. Po navázání ligandu na receptor dojde k výměně GDP za GTP a disociaci G-proteinu na podjednotky $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ komplex (aktivace), nyní působí na efektor. Poté dojde působením vnitřní GTPasové aktivity k hydrolyze GTP na GDP (či působením regulátorů G-proteinové signalizace, RGS) a k reasociaci dimerního G-proteinu (deaktivace). Přejato z (76).

Tito druzí poslové jsou vnitrobuněčné molekuly, díky nimž dochází k biochemické odpovědi buňky. Kupříkladu cAMP způsobuje ve většině buněk mimo jiné aktivaci proteinkinasy A, která může zpětně ovlivňovat aktivaci G-proteinů. K hydrolýze GTP dojde uvolněním anorganického fosfátu působením enzymu GTPasy (vnitřní GTPasová aktivita α podjednotky G-proteinu), a z GTP se stává GDP. Tímto krokem dojde k deaktivaci G-proteinu. Deaktivovaná podjednotka $G\alpha$ poté asociuje s heterodimerem $G\beta\gamma$ (35, 36). G-proteiny tedy zprostředkovávají přenos signálu mezi receptorem a efektoem. Cyklus aktivace a deaktivace je ve zjednodušené formě znázorněn na obr. 2., str. 17.

Cyklus aktivace G-proteinů může být ovlivněn vazbou RGS proteinů (regulátory G-proteinové signalizace), které vazbou na $G\alpha$ - podjednotku G-proteinu uspíší rozklad GTP, čímž G-protein deaktivují (37).

Buněčná signalizace receptoru může být dále ovlivněna tzv. desensitizací (18). Dále může dojít k vazbě molekuly arrestinu, jež oddělí receptor od G- proteinu (tzv. *uncoupling*), ke shlukování receptorů na povrchu buňky a k jejich internalizaci (nebo též endocytóza, přenos do nitra buňky), kde jsou vázány na endosomy. V tomto stádiu mohou setrvat, nebudou-li zpět zabudovány do buněčné membrány jako plně funkční receptory s navázaným G-proteinem (tzv. inserce). V opačném případě nastane degradace receptoru (tzv. „down-regulace“) (8, 38).

Třídy G-proteinů

G-proteiny klasifikujeme na základě struktury a funkčních vlastností jejich $G\alpha$ podjednotek (38). Je známo asi dvacet různých $G\alpha$ podjednotek, které jsou podle své aminokyselinové sekvence rozděleny do čtyř tříd- G_s/G_{olf} , G_i/G_o , G_q/G_{11} a $G_{12/13}$ (40-42). Dále bylo identifikováno pět $G\beta$ podjednotek a dvanáct $G\gamma$ podjednotek (31). $G\alpha$ podjednotka se skládá ze dvou domén- G domény (tu obsahují všechny proteiny s GTPasovou aktivitou) a helikální domény (je specifická pro všechny heterotrimerní G-proteiny), které svírají štěrbinu vázající guaninové nukleotidy (31).

Do třídy G_s/G_{olf} řadíme G_{α_s} a $G_{\alpha_{olf}}$ proteiny. $G_s\alpha$ obsahuje čtyři izoformy, G_{α_s1} , G_{α_s2} , G_{α_s3} , G_{α_s4} . $G_s\alpha$ protein je exprimován v různých tkáních, $G_{\alpha_{olf}}$ se naproti tomu vyskytuje pouze v čichovém epitelu. Oba proteiny aktivují adenylcyklu, G_{α_s} navíc stimuluje otevírání Ca^{2+} kanálů a K^+ kanálů závislých na Ca^{2+} (39). Oba proteiny jsou citlivé vůči cholera toxinu, který katalyzuje ADP ribosilaci specifických zbytků argininu,

následkem je inhibice vnitřní GTPasové aktivity $G\alpha$ podjednotek, jejich permanentní aktivace a zvýšená aktivita adenylylcyklasy (39).

Do třídy G_i/G_o patří tři $G\alpha_i$ proteiny- $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, dva $G\alpha_o$ proteiny- $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, transduciny $G\alpha_{t1}$, $G\alpha_{t2}$ (proteiny světločivného epitelu sítnice), gustducin $G\alpha_g$ (protein chuťového epitelu) a $G\alpha_z$ protein. Tyto proteiny se ve velkém množství vyskytují v mozkové tkáni (38). $G\alpha_i$ inhibují adenylylcyklasu, předpokládá se aktivace K^+ kanálů, inhibice Ca^{2+} kanálů, aktivace fosfolipasy C a modulace aktivity fosfolipasy A (39). $G\alpha_o$ proteiny inhibují adenylylcyklasy, aktivují neuronové K^+ kanály, inhibují Ca^{2+} kanály a předpokládá se aktivace fosfolipasy C (39). $G\alpha_t$ proteiny se vyskytují pouze v sítnici oka a aktivují fosfodiesterasu v retinálních tyčinkách a čípcích. U gustducinu $G\alpha_g$ se předpokládá aktivace fosfodiesterasy v chuťovém epitelu a u proteinu $G\alpha_z$, který se vyskytuje v cytoplazmě neuronů (43) se předpokládá inhibice adenylylcyklasy (39). V případě nakažení pertusis toxinem dojde k ADP ribosilaci specifických cysteinových zbytků u této třídy s výjimkou $G\alpha_z$ proteinu, inaktivace α podjednotek je dána neschopností zaměnit GDP za GTP (39).

Třída G_q/G_{11} obsahuje pět členů- $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$. Všechny proteiny této třídy aktivují fosfolipasu $C\beta$ (44, 45). Exprese $G\alpha_q$ a $G\alpha_{11}$ není tkáňově specifická, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$ se naopak vyskytují pouze v pojivových a epiteliálních tkáních a v buňkách myelomu (31).

Proteiny třídy $G_{12/13}$ - $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ jsou exprimovány v různých tkáních. Oba proteiny jsou resistantní vůči bakteriálním toxinům. Proteiny $G_{12/13}$ aktivují transportní systém pro Na^+/H^+ ionty (46).

2.1.4. Adenylylcyklasa

Adenylylcyklasa (AC) je významným efektoem eukaryotického přenosu signálu. Je to enzym katalyzující vznik cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) z ATP, který funguje jako tzv. „druhý posel“. cAMP přenáší extracelulární signály do buňky a aktivuje proteinkinasu A (PKA), jež fosforylací určitých proteinů reguluje jejich aktivitu (31).

Dosud bylo identifikováno devět savčích genů kódujících membránově vázané adenylylcyklasy a jeden gen pro rozpustnou formu (31). Membránově vázané AC jsou

velké 120- 140 kDa. Jejich struktura je složena ze dvou intracelulárních domén M1 (obsahující intracelulární N-konec) a M2, přičemž každou z domén tvoří šest transmembránových α - helixů. Obě domény jsou spojeny cytoplasmatickou smyčkou C1. Po doméně M2 následuje druhá cytoplasmatická smyčka, C2, obsahující intracelulární C-konec (31). Domény C1 a C2 tvoří katalytické místo, vázající ATP, jež je přeměňováno na cAMP.

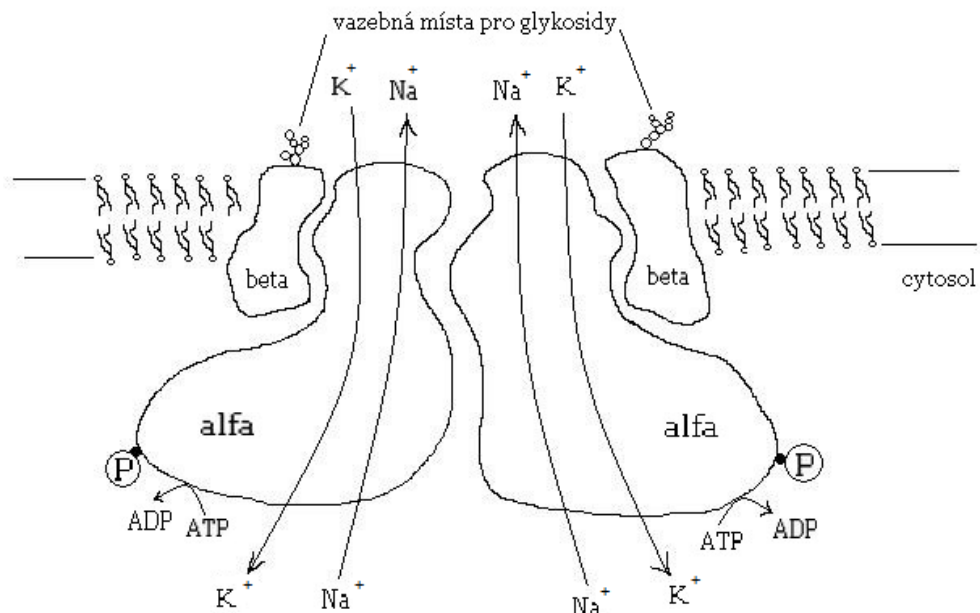
Na základě aminokyselinové sekvence, a z ní vyplývajících funkčních vlastností, dělíme adenylylcyklasy rozdělit do pěti podrodin (47, 48). V současné době je známo deset izoform AC. Devět izoform adenylylcyklasy je membránově vázaných (AC1-AC9), desátá izoforma (sAC) je nejvíce odlišná, neboť je rozpustná a nachází se v cytosolu. Všech devět membránově vázaných AC bylo lokalizováno v mozku. Některé izoformy AC, především AC3 a AC5 jsou exprimovány jen v určitých oblastech, zatímco AC2, AC4 a AC7 jsou více rozšířené v celé CNS (49).

Regulace adenylylcyklasové aktivity probíhá v závislosti na dané izoformě. $G\alpha_s$ proteiny stimulují aktivitu všech savčích membránově vázaných izoform adenylylcyklas (50, 51), $G\alpha_i$ proteiny inhibují jen některé izoformy adenylylcyklas- AC1, AC5, AC6 (52, 53). $G\alpha_o$ inhibují AC1 (48, 53). $G\beta\gamma$ aktivuje AC2, AC4, AC7 a inhibuje AC1 a AC8 (54-56).

2.2. Na,K-ATPasa

ATPasy jsou transportní proteiny plasmatické membrány. Membránové ATPasy katalyzují aktivní transport sodných, draselných, vápenatých, vodíkových a dalších iontů (57). Transport těchto iontů probíhá proti koncentračnímu gradientu (za spotřeby ATP). Reakce membránových ATPas je reverzibilní, tj. za určitých experimentálních podmínek je elektrochemický gradient iontů převáděn na chemickou energii ve formě ATP, což ale platí pouze pro ATPasy typu F_1F_0 - např. mitochondriální ATPasa. Většina ATPas buněčné membrány je typu E_1E_2 , u nichž by zvrát reakčních podmínek nastal jen za extrémních podmínek, a nedošlo by k vlastní syntéze ATP (57). Nejvýznamnější ATPasou buněčné membrány je Na,K-ATPasa. Na, K-ATPasa byla objevena v roce 1957 dánským vědcem J. C. Skou, který za její objev obdržel v roce 1997 Nobelovu cenu (58).

Na,K-ATPasa (viz obr. 3, str. 21) je integrální membránový lipoprotein, je aktivována sodnými a draselnými ionty a inhibována ouabainem. Vyskytuje se v plasmatických membránách živočišných buněk (58) a katalyzuje aktivní transport sodných a draselných iontů přes plasmatickou membránu (38). Mechanismus katalytické činnosti Na,K-ATPasy lze popsat jako cyklicky spřažený proces Na-dependentní fosforylace s K-dependentní defosforylací enzymu (57). Během jednoho reakčního cyklu za spotřeby jedné molekuly ATP dochází k transportu 3 Na⁺ do extracelulárního prostoru a 2 K⁺ do intracelulárního prostoru buňky, jedná se o elektrogenní transport. Fosforylace alfa podjednotky proteinového řetězce probíhá tak, že fosfátová skupina reaguje s karboxylovou skupinou acylfosfátu na postranním řetězci glutamátu. Fosforylace je Na⁺ a Mg⁺ dependentní. Defosforylací aktivují K⁺ ionty za vzniku fosfátové skupiny a anhydridu kyseliny glutamové (58).



Obr. 3: Schematické znázornění Na,K-ATPasy: Hlavní část katalytické podjednotky α je umístěna na cytosolární straně membrány. Na α podjednotce probíhá štěpení ATP, a podjednotky pumpují sodné ionty do extracelulárního prostoru a draselné ionty do intracelulárního prostoru. Na vnější straně membrány se nachází vazebná místa pro kardioglykosidy (ouabain) na β podjednotkách. Upraveno dle (58).

Na,K-ATPasa je aktivní v přítomnosti fosfolipidů, zejména fosfatidylserinu (58). Výsledkem aktivity Na,K-ATPasy je vznik jednoho negativního náboje na vnitřní straně buněčné membrány, čímž se enzym podílí na udržování klidového membránového potenciálu (58). Na činnost Na,K-ATPasy v buňce se spotřebuje asi 30% celkové energie buňky (58).

Enzym Na,K-ATPasa je ze strukturního hlediska heterodimerem, skládajícím se ze dvou nekovalentně vázaných podjednotek- alfa (95- 110 kDa) a beta (okolo 47 kDa) (57, 58). Podjednotka alfa má čtyři isoformy (α_1 , α_2 , α_3 , α_4) a obsahuje aktivní centrum enzymu a vazebná místa pro ATP, ADP, volný fosfát a sodné a draselné ionty (59-63). Protkává membránu a skládá se ze 7 hydrofobních segmentů procházejících membránou (58). Podjednotka beta je glykoprotein zodpovědný za transport a začlenění alfa podjednotky do plasmatické membrány, má tři isoformy (β_1 , β_2 , β_3) (64-69).

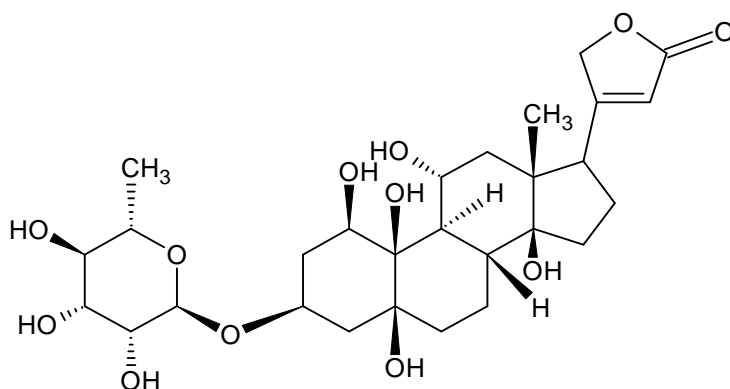
Na,K-ATPasa specificky váže kardioaktivní glykosidy, což jsou přírodní alkaloidy s významným účinkem na myokard- působí zvýšení síly a frekvence stahu srdečního svalu. Jedním z takových kardioglykosidů, které jsou specificky vázány Na,K-ATPasou, je ouabain (57). Ouabain se jako další kardioglykosidy (do této skupiny látek patří také např. digitonin) váže na Na,K-ATPasu, blokuje její aktivitu zvyšováním intracelulárních hladin sodíku a kalcia a vyvíjí silný pozitivní inotropní efekt na myokard (38).

2.3. Ouabain

Ouabain (G-strofantin), jehož struktura je znázorněna na obr. 4, str. 23, je kardioglykosid, přírodní alkaloid s klinicky významným efektem na myokard. Jak již bylo řečeno, má pozitivní inotropní efekt (zvýšení síly stahu) a chronotropní efekt (zvýšení frekvence stahu). Dále snižuje tepovou frekvenci a zvyšuje intracelulární hladinu vápníku. Je specifickým inhibitorem Na,K-ATPasy, inhibuje aktivní transport sodných a draselných iontů. Vazebné místo pro ouabain je lokalizováno na alfa podjednotce Na,K-ATPasy na vnější straně buněčné membrány. Vazba ouabainu na Na,K-ATPasu probíhá ve stechiometrii 1:1.

Existují dva typy ouabainové vazby, tzv. ATP+Mg+Na dependentní ouabainová vazba, tj. měří se v přítomnosti ATP a hořečnatých iontů, a Mg+Pi dependentní vazba, měří se v přítomnosti anorganického fosfátu a hořečnatých iontů (57).

S pomocí radioaktivně značených derivátů daného ligandu je možné určit množství vazebných míst receptoru pro daný ligand (57). Naměřená radioaktivita ve vzorku, při známé specifické radioaktivitě, udává přímo počet vazebných míst. Jedná-li se o specifický ligand, kdy nespecifická vazba je zanedbatelná, a je známa stechiometrie vazby čili počet vazebných míst na receptoru, pak počet receptorů je dán počtem vazebných míst. Vazebné studie s [³H] ouabainem tedy určují, díky specifické inhibici Na,K-ATPasy a známé stechiometrii 1:1 počet molekul Na,K-ATPasy (57). Tyto vazebné studie jsou používány ke stanovení čistoty plasmatických membrán, které jsme izolovali.



Obr. 4: Struktura ouabainu

2.4. Princip vazby radioligandu- charakterizace receptoru pomocí přímé vazebné studie

Pojmem receptor označujeme specifické místo na membráně, kde se váží různé biochemicky aktivní látky, ligandy. Ligand (agonista, antagonist) vázající se na receptor musí mít dvě základní vlastnosti. Zaprvé, musí mít afinitu k danému receptoru, tedy musí být schopen s receptorem tvořit vazebný komplex (70). Zadruhé, ligand musí mít

schopnost vyvolat v molekule receptoru určité změny vedoucí k přenosu signálu (tvorba druhých posílů, biochemická odpověď buňky) (70). Receptory umožňují přenos nervového vzruchu mezi dvěma buňkami, současně jsou také místem regulačních procesů činnosti a funkce buňky (18). Charakterizace biochemických vlastností receptorů je stále v popředí zájmu neurochemie (18).

Receptor má dvě základní definiční vlastnosti: schopnost specificky rozlišit a vázat daný hormon či nervový přenašeč- specifická vazebná kapacita, a schopnost přenést informaci do nitra buňky a vyvolat biologickou odpověď- vnitřní aktivita receptoru. Přímá charakterizace receptoru vychází ze schopnosti receptoru vázat ligand. Pro tuto charakterizaci receptoru se využívá radioaktivní značení daného ligandu.

Biologická odpověď závisí na počtu a koncentraci receptorů a koncentraci ligandu, hovoříme o počtu okupovaných receptorů (18). Tato tzv. okupační teorie je podobná teorii Michaelise- Mentenové pro enzymovou kinetiku, stanovující rychlost reakce.

Grafickým vyjádřením velikosti vazby v závislosti na zvyšující se koncentraci radioligandu je obvykle hyperbola, kterou nazýváme saturační křivka. Ze saturační křivky získáváme rovnovážnou disociační konstantu K_d , pro niž platí, že při rovnováze reprezentuje koncentraci radioligandu, při které je právě polovina receptorů obsazena ligandem. Disociační konstanta je obdobou Michaelisovy konstanty K_M . Provádíme-li saturační vazebný experiment, získanou hyperbolu označujeme jako saturační křivku (vazebnou izotermu), na ose y je vynesena celková vazba označovaná B_{tot} , přičemž asymptotou k hyperbolické saturační křivce je B_{max} - maximální vazebná kapacita (maximální počet vazebných míst). Na ose x vynášíme hodnoty volné radioaktivity, tedy nenavázaného ligandu, kterou označujeme F. Celková vazba je dána součtem vazby specifické B_{sp} , tj. vazby radioligandu na specifický receptor, a vazby nespecifické B_{nsp} čili vazby na ostatní místa na plasmatické membráně. Konkrétní matematický rozbor je uveden v kapitole metody- Stanovení ouabainové vazby na str. 28.

3. CÍL PRÁCE

1) Vazba [³H]ouabainu jako ukazatel obsahu plasmatických membrán ve frakcích buněčného homogenátu mozku, stanovení ouabainové vazby ve frakcích sacharosového gradientu

2) Vazba [³H]ouabainu jako negativního standardu změn plasmatické membrány vlivem dlouhodobé expozice morfia

První dva úkoly této práce se týkají vazby triciovaného analoga kardioglykosidu ouabainu, který se váže na Na,K-ATPasu. Prvním cílem bylo zjistit, jakým způsobem lze zvýšit výtěžnost bílkovin při filtraci na přístroji *Cell Harvester* v jednotlivých frakcích buněčného homogenátu mozku potkana. Buněčný homogenát byl získán dělením na percollovém gradientu a poté na sacharosovém gradientu. Druhým cílem mé práce bylo ověřit, zda dochází ke změnám Na,K-ATPasy po dlouhodobé expozici skupiny potkanů morfiem, cílem bylo porovnat výslednou specifickou vazbu [³H]ouabainu v obou skupinách vzorků.

3) Analýza percollového gradientu frakcí buněčné linie DOR-Gi pomocí vazby [³⁵S]GTP γ S

Cílem třetí části je analyzovat frakce percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, (stabilně transfekované HEK-293 buňky exprimující fúzní konstrukt δ -opioidního receptoru s G α_1 proteinem) a zjistit pomocí vazby [³⁵S]GTP γ S na G-protein, které frakce obsahují nejvíce plasmatických membrán, resp. δ -opioidní membránové receptory. Vazba byla stimulována agonistou δ -opioidních receptorů DADLE.

4) Studium vlivu DAMGO a PGE1 na opioidní receptory cortexu potkana pomocí vazby [³⁵S]GTP γ S, vliv dlouhodobé expozice morfia

Úkolem poslední části práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňují aktivitu adenylylcyklasy DAMGO a PGE1, nejprve každý zvlášť a poté oba dohromady, v zdravé mozkové tkáni (kontrolní vzorky) a cortexech potkanů, jež byli vystaveni dlouhodobým účinkům morfia (agonista μ -opioidních receptorů, též se váže na δ -OR i κ -OR). Cílem bylo též zjistit, zda skutečnost, že již vznikla závislost na morfiu nějakým způsobem ovlivňuje účinek DAMGO (agonista μ -opioidních receptorů, ve zdravé tkáni spřažený s G-proteiny typu G_i/G_o, inhibuje adenylylcyklasu) či PGE1 (spřažený s G-proteiny typu G_s, stimuluje adenylylcyklasu).

4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

- [³H]-ouabain, Perkin-Elmer, specifická radioaktivita 30 Ci/mmol
- [³⁵S]GTP γ S (*Stock solution*), Perkin-Elmer, specifická radioaktivita 1250 Ci/mmol
- DADLE [D-Ala², D-Leu⁵]-enkefalin, Sigma-Aldrich
- DAMGO [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]- enkefalin, Sigma- Aldrich
- PGE1, Sigma
- Percoll®, Sigma
- Folin-Ciocalteu fenolové činidlo, Sigma
- Standard BSA, Sigma-Aldrich
- Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus, P-Lab
- NaCl, MgCl₂, kyselina askorbová, BDH
- GDP, DTT, HEPES, Sigma- Aldrich
- Ethanol, Sigma-Aldrich
- Sacharosa, Fluka
- PEI- Sigma-Aldrich
- Tris-HCl, STEM, EDTA, TE, PMSF, Na₂CO₃, NaOH, vinan sodno-draselný, CuSO₄ . 5 H₂O, Sigma a Fluka.

4.1.2. Přístroje

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

Centrifuga Hettich, typ Universal 320R, Brandel

Ultracentrifuga Beckman Optima XL 100K, úhlový rotor Ti 70, výkyvný rotor SW 41

Eppendorf Bio-Photometer

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, ČSAV

4.1.3. Vzorky

Experimentální materiál:

- 1) Cortexy potkanů kmene Wistar usmrcených dekapitací v éterové narkóze.
- 2) Cortexy potkanů kmene Wistar usmrcených dekapitací v éterové narkóze - dlouhodobá adaptace na morfium- srovnání s kontrolními zvířaty (podáván fyziologický roztok)- 1,2 den- 10 mg; 3,4 den- 15 mg; 5,6 den- 20 mg; 7,8 den- 30 mg; 9 den- 40 mg; 10 den- 50 mg morfia/kg hmotnosti, podáváno intraperitoneálně.

4.2. Metody

4.2.1. Frakcionace buněčného homogenátu s pomocí diferenční centrifugace

Použitá metoda je podle (71).

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

1 mM PMSF: 250 µl 200 mM PMSF, 50 ml pufru STEM

30% Percoll, 150 ml: 45 ml Percoll, 105 ml pufru STEM

Použité přístroje

homogenizátor (pístový homogenizátor teflon-sklo)

Centrifuga Hettich, typ Universal 320R

Ultracentrifuga Beckman Optima XL 100K, úhlový rotor Ti 70, výkyvný rotor SW 41

Eppendorf Bio-Photometer

4.2.1.1. Příprava post-nukleárního supernatantu (PNS)

Před započítím experimentu bylo nutné předchladit rotor Hettich. Rotor na 15 ml kónické zkumavky se chladil 30 min při 4°C. Ke každému vzorku cortexu v odměrném válci bylo přidáno 5 ml 1 mM PMSF v pufru STEM (250 µl 200 mM PMSF, 50 ml pufru STEM), aby výsledná koncentrace homogenátu byla 10%. Směs byla převedena do pístového homogenizátoru teflon-sklo, homogenizována 7 minut při teplotě tajícího ledu tak, aby nedošlo k napěnění vzorku. Do 6 kónických zkumavek bylo napipetováno po 5 ml homogenátu, který byl centrifugován 10 minut při 3000 rpm (1000xg) a 4 °C na centrifuze Hettich. Po centrifugaci byly odebrány 4 ml postnukleárního supernatantu, PNS. Frakce PNS byla zamrazena v kapalném dusíku a uložena do -80°C. Sediment (jaderná frakce) se dále nezpracovával.

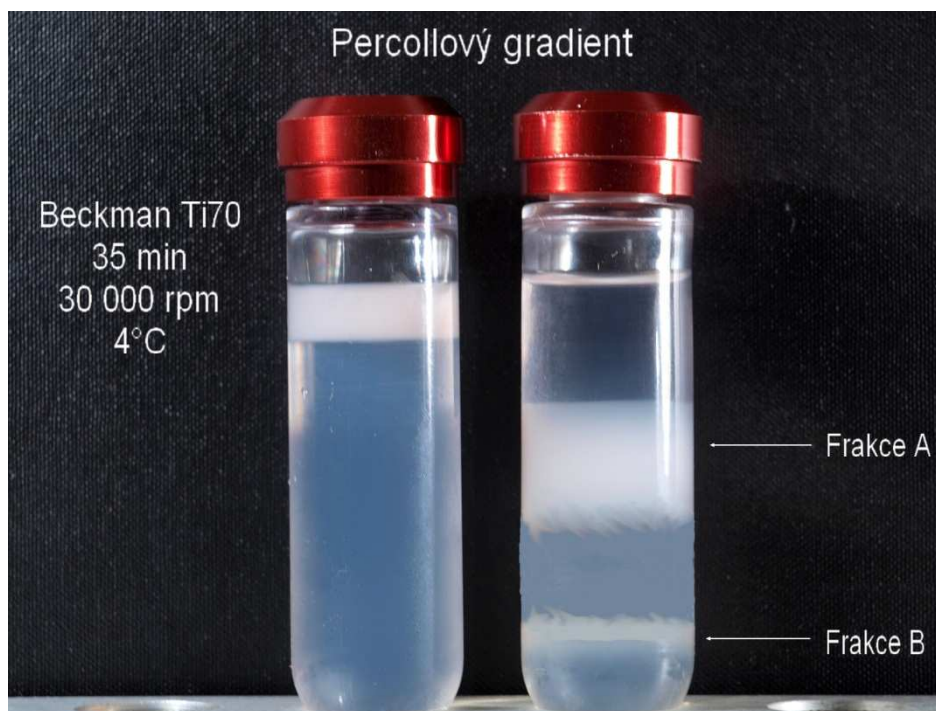
4.2.1.2. Izolace plasmatických membrán mozků na Percollovém gradientu

Dělení na percollovém gradientu

Připravili jsme si 6 kyvet a do každé jsme přidali 20 ml 30% Percollu. Pracovali jsme při teplotě tajícího ledu. Postnukleární supernatant jsme opatrně navrstvili po 3 ml na Percoll (koloidní částice oxidu křemičitého obalené polyvinyl pyrrolidonem) v kyvetách, zbylý postnukleární supernatant jsme zamrazili v kapalném dusíku a uskladnili při -80°C. Kyvety jsme předvážili, aby vždy protilehlé dvojice měly stejnou hmotnost. Poté jsme je vložili do vychlazeného úhlového rotoru Ti 70 (dvojice o stejné hmotnosti naproti sobě). Centrifugovali jsme na ultracentrifuze Beckman 35 minut při 30 000 rpm (65 000xg) a 4°C.

Supernatant nad frakcí A jsme opatrně odsáli. Z frakce A (viz obr. 5, str. 29) obsahující plasmatické membrány, jsme z každé kyvety odebrali po 6 ml do odměrných válců, zředili jsme v poměru 1:3, čili přidali jsme 18 ml pufru STEM (0,25 M sacharosa, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, celkem 6x 24 ml). Směsi jsme převedli z odměrných válců do kyvet, opět předvážili a upravili hmotnost tak, aby protější dvojice v rotoru Ti 70 měly stejnou hmotnost. Centrifugace na ultracentrifuze Beckman probíhala 90 minut při 50 000 rpm (180 000xg) a 4°C. Po centrifugaci jsme odstranili supernatant. Z gelovitého sedimentu Percollu jsme odebrali vrstvu obsahující plasmatické membrány.

Membrány jsme resuspendovali v 650 μ l pufru TE a převedli do kónických zkumavek. Směs jsme promíchali na vortexu a poté ji převedli do homogenizátoru a ručně homogenizovali. Nakonec jsme homogenát rozpipetovali po 250 μ l do mikrozkušavek a zamrazili v tekutém dusíku a uskladnili při -80°C . V odebraném malém množství byly druhý den stanovovány proteiny podle Lowryho metody (viz níže).

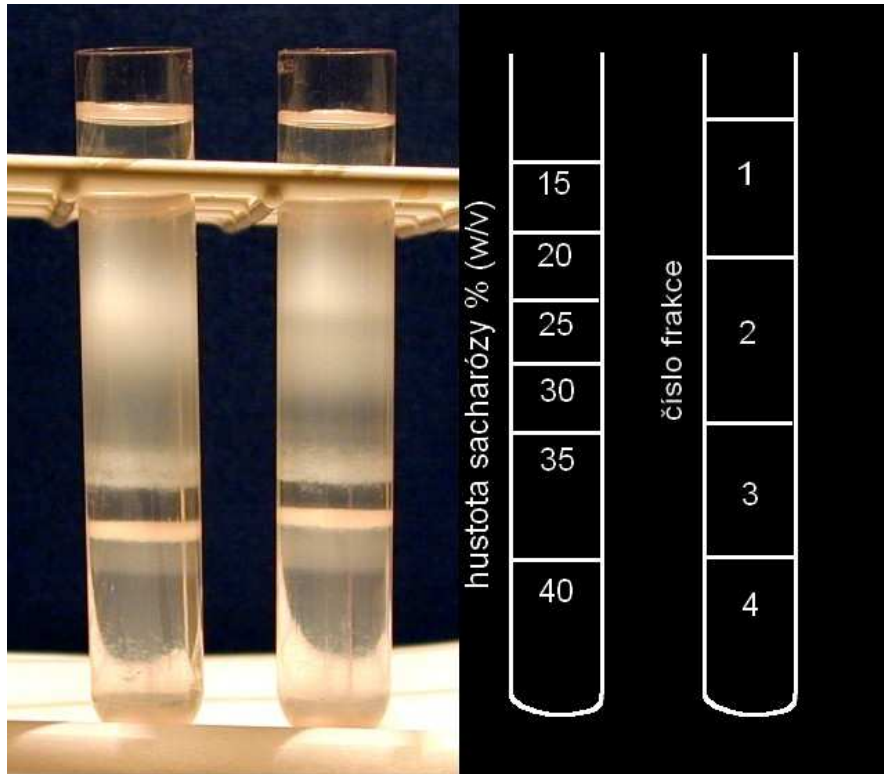


Obr. 5: Percollový gradient- vznik frakcí, frakce A- supernatant obsahující mj. plasmatické membrány, frakce B- mitochondrie

4.2.2. Izolace membránových domén - flotace v hustotním gradientu sacharosy

Flotace v hustotním gradientu sacharosy je založena na schopnosti dělení různých částic homogenátu podle jejich hustoty. Výchozím materiálem pro flotaci v hustotním gradientu sacharosy byly percollové membrány, vzniklé izolací z postnukleárního supernatantu na Percollu. Před započítím samotného experimentu jsme namočili plastové

kyvety přes noc do destilované vody. V experimentu jsme použili roztoky sacharósy o koncentracích 15, 20, 25, 30, 35 a 80 % (hm.).



Obr. 6: Flotace percollových membrán na sacharosovém gradientu, napravo jsou čísla označeny frakce, které jsme sbírali- frakce 2 obsahuje lehké vezikuly, frakce 3 obsahuje plasmatické membrány

Vzorek percollových membrán byl při teplotě tajícího ledu rozpuštěn a poté pomocí pístového homogénizátoru ručně zhomogenizován. Použili jsme dvě kyvety- v jedné byl obsažen vzorek a ve druhé- vyvažovací- byla místo vzorku použita destilovaná voda. Do kyvet jsme napipetovali nejprve 2 ml 80% sacharósy a 2 ml homogenátu, resp. 2 ml destilované vody. Poté jsme opatrně vrstvěli jednotlivé koncentrace sacharósy na sebe v tomto pořadí: 35, 30, 25, 20, 15 % sacharósa a dbali na to, aby se jednotlivé vrstvy nespíjaly. Jednotlivé vrstvy byly patrné při pohledu proti světlu.

Centrifugace probíhala 24 hodin na ultracentrifuze Beckman, při 38000 rpm (188 000xg) a 4°C. Použit byl výkyvný rotor SW 41. Po centrifugaci byly patrné jasně

ohraničené frakce (odshora kyvety ke dnu): frakce 1, frakce 2 (lehké vesikuly), frakce 3 (plasmatické membrány), frakce 4 (viz obr. 6, str. 30). Frakce byly odebrány každá zvlášť do konické zkumavky a zamrazeny při -80°C . Poté byly v jednotlivých frakcích stanoveny proteiny dle Lowryho metody.

4.2.3. Stanovení proteinů – Lowryho metoda

Metoda stanovení obsahu proteinů ve vzorku byla použita podle Lowry a kol. (72).

Na Lowryho metodu je nutné mít připraveny tři roztoky o následujícím složení. Roztok A se připraví rozpuštěním 2 g NaOH a 10 g Na_2CO_3 v 0,5 l destilované vody. Roztok B obsahuje 2% vinan sodno-draselný, roztok C je 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Dále je potřeba čerstvě naředit Folin- Cioccalteau fenolové činidlo 1:1 (v/v) s destilovanou vodou. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 1 mg/ml.

Tabulka 1: Kalibrační řada standardů s BSA

č. zk.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H₂O (μl)	500	490	480	470	460	450	425	400	350	300
BSA (μl)	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200

Vzorky membrán, ve kterých stanovujeme proteiny, bylo třeba nejprve šetrně rozpustit při teplotě tajícího ledu. Měli jsme dvě sady zkumavek- jedna představuje kalibrační řadu s BSA (viz tabulka 1) a druhá sada obsahuje vzorky. Do označených zkumavek jsme nejprve pipetovali destilovanou vodu a poté BSA dle tabulky 1. Do dalších zkumavek, tj. zkumavek se stanovovaným vzorkem jsme pipetovali 490 μl H₂O a 10 μl stanovovaného vzorku proteinů. Smísili jsme roztoky A+B+C: 50 ml A, 1 ml B, 1 ml roztoku C v daném pořadí a do všech zkumavek (včetně kalibrační řady) jsme pipetovali 1,5 ml daného roztoku. Poté jsme ponechali zkumavky stát 15 minut při laboratorní teplotě. Připravili

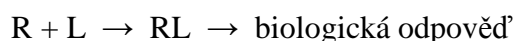
jsme si Folinovo činidlo v poměru s destilovanou vodou 1:1, které poskytuje s tyrosylovými zbytky bílkovin modrofialové zbarvení, jehož intenzita se stanoví pomocí měření absorbance. Do každé zkumavky jsme napipetovali 150 μ l vždy ve stejném časovém intervalu (20 sekund). Všechny zkumavky jsme promíchali na vortexu. Zkumavky byly poté ponechány 30 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byla proměřena absorbance kalibrační řady a vzorků, vždy v daném časovém intervalu (20 sekund) na spektrofotometru EppendorfBio Photometer při 595nm. Pro vyhodnocení výsledků jsme použili program GraphPad Prism a pomocí nelineární regrese pro polynom 2. řádu $y = ax^2 + bx + c$ jsme určili tvar kalibrační křivky, pomocí níž jsme zjistili hodnoty koncentrací námi stanovovaných vzorků

4.2.4. Stanovení ouabainové vazby

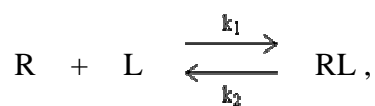
4.2.4.1. Stanovení ouabainové vazby- matematický rozbor

Při přímé vazebné studii používáme radioaktivně značený ligand- v tomto případě triciem značený ouabain ($[^3\text{H}]$ ouabain). Po vazbě radioligandu na receptor měříme množství navázané radioaktivity a stanovujeme počet vazebných míst a afinitu ligandu pro receptor tj. schopnost ligandu s receptorem tvořit vazebný komplex. Počet vazebných míst udává množství receptorů ve vzorku.

Interakce ligandu s receptorem probíhá podle zjednodušeného schématu:



Vycházíme ze zákona o působení aktivních hmot:



kde R je receptor, L je ligand, RL je komplex receptor-ligand. Při rovnováze platí, že rychlost asociace je rovna rychlosti disociace:

$$[R] \cdot [L] \cdot k_1 = [R.L] \cdot k_2 ,$$

z čehož plyne

$$\frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{k_2}{k_1} = K_d$$

kde k_1 je rychlostní konstanta asociace ($M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), k_2 rychlostní konstanta disociace (min^{-1}) a K_d rovnovážná disociační konstanta (M), která vyjadřuje koncentraci radioligandu v rovnováze, kdy je obsazena polovina receptorů.

Rovnice charakterizující interakci ligandu (hormonu) a receptoru je formálně obdobná rovnici Michaelise-Mentenové:

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

tzv. saturační vazebná křivka (vazebná izoterma)

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

kde B je koncentrace radioligandu navázaného na receptory (buňky, membrány), F je koncentrace volného radioligandu, B_{max} je maximální vazebná kapacita, tj. maximální počet vazebných míst (množství receptorův daném vzorku), K_d je disociační konstanta receptoru vyjadřující afinitu receptoru. Pro celkovou koncentraci radioligandu T platí:

$$T = B + F$$

Maximální počet vazebných míst v daném vzorku a afinitu receptoru lze vypočítat 1) z linearizované formy rovnice- Scatchardův výnos, anebo 2) přímým fitováním experimentálních bodů -nelineární regresí pomocí např. programu GraphPad Prism.

Scatchardův výnos ve tvaru pro rovnici přímky ($y = a - bx$):

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} \cdot B$$

Lineární regresí získáme B_{max} - průsečík přímky Scatchardova výnosu s osou x. Disociační konstantu vazebné reakce získáme vydělením hodnoty B_{max} průsečíkem přímky Scatchardova výnosu s osou y, tj. podílem vázané a volné radioaktivity:

$$K_d = \frac{B_{max}}{\frac{B}{F}}$$

4.2.4.2. Stanovení ouabainové vazby- postup

Vzorek: 50-100 μ g (membrány, frakce gradientu)

Izotop: [3 H]ouabain (Perkin-Elmer, specifická radioaktivita 30 Ci/mmol,

Inkubační médium: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 x ředěné

Promývací pufr: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,4 (25 ml 1M Tris-HCl, 2,5 ml 1M MgCl₂, doplněno do 5 l destilovanou vodou)

Scintilační roztok: Rotiszint Ecoplus (P-Lab)

Vazba [3 H]ouabainu na Na,K-ATPasu byla stanovena podle metody Svobody a kol. (73).

Stanovení vazby [3 H]ouabainu bylo použito: 1) jako ukazatele obsahu plasmatických membrán ve frakcích buněčného homogenátu mozku; 2) jako negativního standardu změny plasmatické membrány vlivem dlouhodobé expozice morfia.

Během prvního úkolu jsme stanovovali saturační vazebnou křivku ouabainu v rozsahu izotopové řady a provedli jsme Scatchardův výnos. Dále byla stanovena

ouabainová vazba ve frakcích vzniklých dělením percollových membrán na sacharosovém gradientu, přičemž byly zkoumány možnosti zvýšení výtěžnosti proteinů (z angl. *recovery*) při filtraci na filtračním přístroji *Cell Harvester* vzhledem k původnímu obsahu proteinů ve vzorku percollových membrán. Pro zvýšení výtěžnosti byly všechny vzorky zředěny na poloviční koncentraci. Dále jsme v pokusu zkoušeli impregnaci GF/C filtru pomocí 0,2% polyethyleniminu (PEI) pro snížení nespecifické vazby. V závěru byly použity oba postupy současně.

Druhým úkolem bylo zjistit, zda dojde ke změně Na,K-ATPasy poté, co byla skupina potkanů kmene Wistar vystavena účinku morfia při zvyšujících se dávkách. Vzorky plasmatických membrán mozkové tkáně získané od této skupiny potkanů byly srovnávány se vzorky získanými od kontrolní skupiny potkanů, které byl podáván intraperitoneálně fyziologický roztok (byli tedy stresováni stejným způsobem, ale bez podání morfia).

Nejprve bylo nutné připravit si inkubační médium, 50 mM Tris-HCl o pH 7,4, které bylo 200 x zředěno. Dále byl připraven promývací pufr- 50 mM Tris-HCl a 5 mM MgCl₂ o pH 7,4. Bylo smícháno 25 ml 1M Tris-HCl a 2,5 ml 1M MgCl₂, tato směs byla doplněna do 5 l destilovanou vodou. Promývací roztok byl skladován v chladové místnosti. Před použitím byl roztok umístěn do velké nádoby obsahující směs vody a drceného ledu.

Tabulka 2: Řada o klesající koncentraci izotopem značeného ouabainu, T₁- T₁₀ je označení zkumavek

T	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀
c (nM)	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	1,95	0,97

Vzorek, membránové frakce (50-100 µg proteinu ve vzorku), ve kterém stanovujeme ouabainovou vazbu, byl rozpouštěn při teplotě tajícího ledu. Mezitím byl označen potřebný počet zkumavek a scintilačních lahvíček. Pro stanovení celkové radioaktivity radioligandu byl do tří scintilačních lahvíček vložen kulatý filtr ze skelných vláken Whatman GF/C (z výsledku se stanoví průměrná hodnota) a napipetováno 50 µl [³H]-ouabainu. Byla zapnuta vodní lázeň s třepačkou a nastavena na 30°C. Rozpuštěné vzorky byly důkladně promíchány na vortex mixéru.

Do zkumavek bylo napipetováno 350 μl izotopem značeného ouabainu: a) izotopová řada o klesající koncentraci radioligandu při stanovení saturační křivky (viz tabulka 2, str. 31), tímto způsobem byl proveden experiment 1, b) [^3H]ouabain o dané koncentraci při tzv. „one-point assay“, a 100 μl daného vzorku či destilované vody (kontrola).

Při experimentu č. 2 jsme pipetovali nejprve u vzorků pocházejících od kontrolní skupiny potkanů (CTR) 450 μl [^3H]ouabainu o klesající koncentraci (koncentrační řada viz tabulka 2, str. 35), 9 μl vody, 41 μl suspenze; u vzorků pocházejících od potkanů, jimž bylo dlouhodobě podáváno morfiu (MOR) 450 μl [^3H]ouabainu o klesající koncentraci, 12 μl vody a 38 μl membránové suspenze. Zkumavky obsahující MOR a CTR byly stanovovány v duplikátech. Pro nescifickou vazbu byl použit neznačený ouabain o výsledné koncentraci 10^{-4} M. Bylo pipetováno: u CTR 450 μl [^3H]ouabainu o klesající koncentraci, 4 μl vody, 5 μl ouabainu neznačeného, 41 μl suspenze; u MOR 450 μl [^3H]ouabainu o klesající koncentraci, 7 μl vody, 5 μl neznačeného ouabainu, 38 μl membránové suspenze. Koncentrace použitých membránových suspenzí byla u CTR 1,33 mg/ml a u MOR 1,57 mg/ml.

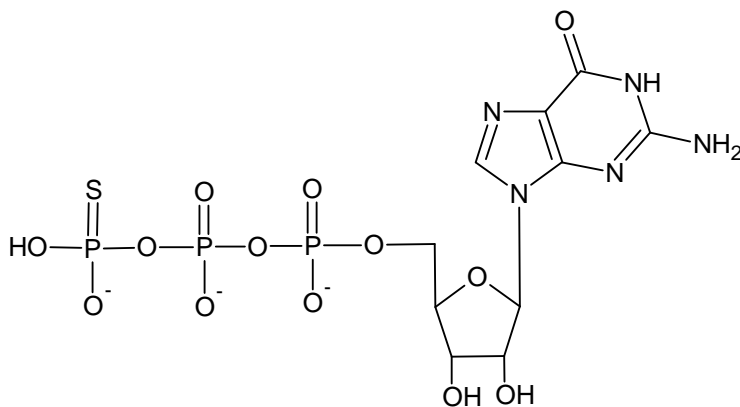
Vzorky byly inkubovány po dobu 90 minut při 30°C . Během probíhající inkubace byl promyt filtrační přístroj (*Cell-Harvester*) vychlazeným pufrem (inkubační médium) Tris-HCl a vložen filtr GF/C. Inkubace byla poté ukončena přidáním 3 ml ledově vychlazeného promývacího pufru pomocí filtračního přístroje. Dále byly zkumavky ještě dvakrát promyty 5 ml vychlazeného pufru. Následnou filtrací vznikly kruhové filtrační zóny na GF/C filtru. Tyto zóny byly pomocí pinzety postupně vyjímány a vkládány do scintilačních lahvíček. Do všech scintilačních lahvíček, včetně těch na stanovení celkové radioaktivity, bylo poté přidáno 5 ml scintilačního roztoku Rotiszint EcoPlus (komplexní směs na bázi diizopropyl naftalenu). Vzorky byly ustáleny 1 hodinu před vlastním měřením radioaktivity metodou kapalně scintigrafie. Doba měření vzorků byla 5 minut. Získaná data byla analyzována pomocí programu GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

4.2.5. Agonistou stimulované stanovení vazby [³⁵S]GTPγS

Funkční aktivita G-proteinu byla měřena pomocí agonistou stimulované vazby [³⁵S]GTPγS (74, 75).

Agonistou membránových receptorů je stimulována vazba radioaktivního analoga původního GTP, [³⁵S]GTPγS (struktura tohoto analoga viz obr. 7), na G-protein. V našem případě se jedná o δ-opioidní receptory a agonistu DADLE nebo μ-opioidní receptory a DAMGO. Při vazbě za konstantní koncentrace agonisty i izotopu, tzv. „one point assay“, zkoumáme změnu funkční aktivity G-proteinu před a po přidání agonisty.

Před přidáním agonisty, tj. basal, se na G-proteiny naváže GDP (obsažený v roztoku 2x MIX nebo ještě dodaný zvlášť) nebo [³⁵S]GTPγS, přičemž tyto kompetují o vazebné místo na G-proteinu. V přítomnosti agonisty je aktivován receptor a následně také G-protein. Na jeho α podjednotce dojde k záměně GDP za radioaktivní nehydrolyzovatelný analog GTP, [³⁵S]GTPγS. GTPasa není schopna hydrolyzovat [³⁵S]GTPγS, a proto G-protein zůstává v aktivovaném stavu.



Obr. 7: Strukturální vzorec GTPγS

Na přípravu roztoků jsme používali sterilizovanou, deionizovanou- vysoce čistou vodu připravenou filtračním systémem od firmy Millipore nebo redestilovanou vodu.

10x koncentrovaný mix (10x MIX)

10x koncentrovaný mix byl připraven podle tabulky 3.

Tabulka 3: Navážky a výsledné koncentrace chemikálií potřebných k přípravě 100 ml roztoku 10x MIX

Název	Navážka	Finální koncentrace
HEPES	4,77 g	200 mM
MgCl ₂	0,61 g	30 mM
NaCl	5,84 g	1 M
Kyselina askorbová	35,3 mg	2 mM
DTT	154,3 mg	10 mM

Promývací roztok

Promývací roztok se používá pro ukončení vazebné reakce a promytí radioaktivity vázané na filtru. Nejprve bylo potřeba připravit 0,5 M roztok HEPES a 1 M roztok MgCl₂.

Promývací roztok o objemu 5 litrů a pH 7,4 byl poté připraven z těchto výchozích roztoků. Bylo odměřeno 20 ml 0,5 M HEPES a smícháno s 750 μ l 1M roztoku MgCl₂. Do 5 litrů byla směs doplněna redestilovanou vodou. Promývací roztok byl skladován v chladové místnosti. Před použitím byl roztok umístěn do velké nádoby obsahující směs vody a drceného ledu.

GDP

Pro experiment je zapotřebí roztok GDP, který je skladován v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Připravený zásobní roztok 10⁻² M GDP byl před započítím pokusu naředěn na 200 μ M.

Agonista

Pro experiment byly použity agonisté DADLE, agonista δ - opioidních receptorů a DAMGO, agonista μ -opioidních receptorů DAMGO, které jsou komerčně vyráběné. Byly smíchány s vodou na výslednou koncentraci 10⁻⁴ M. Oba roztoky skladujeme v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

Membránová suspenze

Suspenze plasmatických membrán byla dle potřeby příslušného experimentu naředěna.

2x koncentrovaný mix (2x MIX) s izotopem

2x MIX byl připraven tak, že jako 1/5 výsledného objemu byl použit původní roztok 10x MIX a byl přidán [³⁵S]GTP γ S v takovém množství, aby v 50 μ l výsledného roztoku bylo obsaženo cca 100 až 200 tisíc dpm. Roztok izotopu [³⁵S]GTP γ S byl doplněn vodou na požadovaný objem (podle rozsahu experimentu- počtu zkumavek).

Vazebný experiment

Před započítáním experimentu je potřeba filtrační přístroj promýt (stejný postup provádíme před započítáním experimentů, přecházíme-li z jednoho typu izotopu na druhý), aby nedošlo k případnému zvyšování radioaktivity pozadí. Promývání provádíme tak, že do sady 24 zkumavek vstříkneme pomocí stříčky 70% ethanol, cca do dvou třetin objemu. Po přefiltrování přes filtrační papír poté filtrujeme 10x destilovanou vodou (destilovanou vodu napouštíme zhruba do 1/2objemu zkumavek). Postup ještě jednou zopakujeme. Po promytí kontaktní plochy přístroje otřeme buničinou s ethanolem a vložíme GF/C filtr Whatman (tloušťka 260 μ m, velikost pórů 1,2 μ m).

Vzorek membrán a další roztoky byly rozpouštěny při teplotě tajícího ledu (jsou vloženy v polystyrenové vaničce naplněné vodou s ledovou tříští). Byl připraven potřebný počet zkumavek, popsán a vloženy do ledu. Zkumavky byly ve dvou sadách- jedna sada obsahovala místo agonisty pouze vodu- nazýváme ji basal, druhá sada zkumavek obsahovala agonistu DADLE- tuto sadu nazýváme stimul. Dále byly připraveny a očíslovány scintilační lahvičky o stejném počtu jako zkumavky plus tři další na celkovou radioaktivitu („totály“). Do těchto tří lahviček byl pomocí pinzety vložen kruhový GF/C filtr a napipetováno 50 μ l roztoku 2x MIX.

Do jednotlivých zkumavek bylo v experimentu č. 3 (analýza frakcí percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi) napipetováno následující: (v daném pořadí): basal: 40 μ l redestilované vody, 50 μ l 2x MIX, 10 μ l frakce 1-22; stimul: 30 μ l vody, 10 μ l DADLE, 50 μ l 2x MIX, 10 μ l vzorků frakce 1-22. Pipetovali jsme 2x v témže schématu, tj. každá zkumavka měla svůj duplikát.

Pipetovací schéma experimentu č. 4 (studium vlivu PGE1 a DAMGO na opioidní receptory) je uvedeno v tabulce 4, str. 41. Celkový počet zkumavek byl 48, každá zkumavka měla hexaplikát.

Zkumavky byly inkubovány po dobu 30 minut v lázni o teplotě 30°C. Poté byla vazebná reakce zastavena přidáním cca 3 ml ledově vychlazeného promývacího roztoku. Následnou filtrací pomocí filtračního přístroje *Cell Harvester* byl roztok přefiltrován přes GF/C filtr ze skelných vláken. Poté byly zkumavky ještě 2x promyty cca 5 ml téhož promývacího roztoku.

Vzniklé kruhové filtrační zóny byly z filtru vyjmuty pomocí pinzety a vloženy do označených scintilačních lahvíček. Do všech scintilačních lahvíček bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku Rotiszint EcoPlus. Lahvičky byly opatřeny šroubovacím víčkem a byly ponechány stát 1 hodinu v digestoři. Poté byly odneseny na měření radioaktivity pomocí metody kapalné scintigrafie. Data byla analyzována pomocí programu GraphPad Prism.

Tabulka 4: Pipetovací schéma experimentu č. 4

č. frakce		obsah vzorku	DAMGO 10^{-4} (M)	GDP $2 \cdot 10^{-4}$ (M)	PGE1 10^{-4} (M)	H ₂ O	2xMIX
1	CTR	20 μ l	-	10 μ l	-	20 μ l	50 μ l
2	CTR	20 μ l	-	10 μ l	-	20 μ l	50 μ l
3	CTR	20 μ l	-	10 μ l	-	20 μ l	50 μ l
4	CTR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	-	10 μ l	50 μ l
5	CTR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	-	10 μ l	50 μ l
6	CTR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	-	10 μ l	50 μ l
7	CTR	20 μ l	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l
8	CTR	20 μ l	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l
9	CTR	20 μ l	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l
10	CTR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	50 μ l
11	CTR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	50 μ l
12	CTR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	50 μ l
13	MOR	20 μ l	-	10 μ l	-	20 μ l	50 μ l
14	MOR	20 μ l	-	10 μ l	-	20 μ l	50 μ l
15	MOR	20 μ l	-	10 μ l	-	20 μ l	50 μ l
16	MOR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	-	10 μ l	50 μ l
17	MOR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	-	10 μ l	50 μ l
18	MOR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	-	10 μ l	50 μ l
19	MOR	20 μ l	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l
20	MOR	20 μ l	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l
21	MOR	20 μ l	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	50 μ l
22	MOR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	50 μ l
23	MOR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	50 μ l
24	MOR	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	-	50 μ l

4.3. Výpočty a výsledky

1) Vazba [³H]ouabainu jako ukazatele obsahu plasmatických membrán v buněčném homogenátu mozku, stanovení ouabainové vazby ve frakcích sacharosového gradientu

Byla stanovena saturační vazebná křivka ouabainu (graf 1, str. 44) v rozsahu izotopové řady, a proveden Scatchardův výnos (graf 2, str. 44). Koncentrace proteinu ve vzorku bylo 0,05 mg/ml. Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Hodnoty vazby [³H]ouabainu, B_{sp} je označení pro radioaktivitu specifické vazby, F značí koncentraci volného radioligandu

č.m.	$B_{sp\emptyset}$ (dpm)	$B_{sp\emptyset}$ (pmol)	$B_{sp\emptyset}$ (pmol/mg)	F (dpm)	F (pmol)	F (nM)	$B_{sp\emptyset}/F$ (ml/mg)
T10	1127	0,1692	0,3384	1652	0,0248	0,062	5,458
T10	1140	0,1712	0,3424	1645	0,02471	0,061775	5,542
T9	2101	0,03155	0,631	3113	0,04675	0,116875	5,398
T8	3937	0,05912	1,1824	5316	0,07983	0,199575	5,924
T7	9151	0,1374	2,748	10491	0,15752	0,3938	6,978
T6	17795	0,2672	5,344	22238	0,3339	0,83475	6,401
T5	32917	0,4943	9,886	56696	0,8513	2,12825	4,645
T4	59422	0,8922	17,844	116634	1,7513	4,37825	4,075
T3	83476	1,2534	25,068	264004	3,96402	9,91005	2,529
T2	132280	1,9862	39,724	589056	8,84468	22,1117	1,796
T1	198145	2,9752	59,504	1183255	17,7666	44,4165	1,339
T1	181690	2,7281	54,562	1267631	19,0335	47,58375	1,146

Pro výpočet je nutné znát přepočtový koeficient mezi jednotkami Ci a dpm (z angl. *desintegrations per minute*, tj. rozpady za minutu). Specifická radioaktivita zásobního roztoku [³H]ouabainu byla 30 Ci/mmol:

$$1\text{mmol} \Rightarrow 30\text{ Ci} = 30 \cdot 3,7 \cdot 10^{10}\text{ dps} = 30 \cdot 3,7 \cdot 10^{10} \cdot 60\text{ dpm} = 6,66 \cdot 10^{13}\text{ dpm} = 666 \cdot 10^{11}\text{ dpm}$$

$$1\text{pmol} \Rightarrow 30 \times 3,7 \times 10 \times 60 = 66600\text{ dpm}$$

Množství radioligandu v pmol tedy vypočteme z naměřených dat v jednotkách dpm dělením tímto koeficientem, čímž jej vztáhneme na mg proteinu.

Dále byl porovnáván výpočet rovnovážné disociační konstanty K_d ze saturační vazebné křivky ouabainu (graf 1) a výpočet K_d ze Scatchardova výnosu (graf 2).

Výpočet K_d ze Scatchardova výnosu:

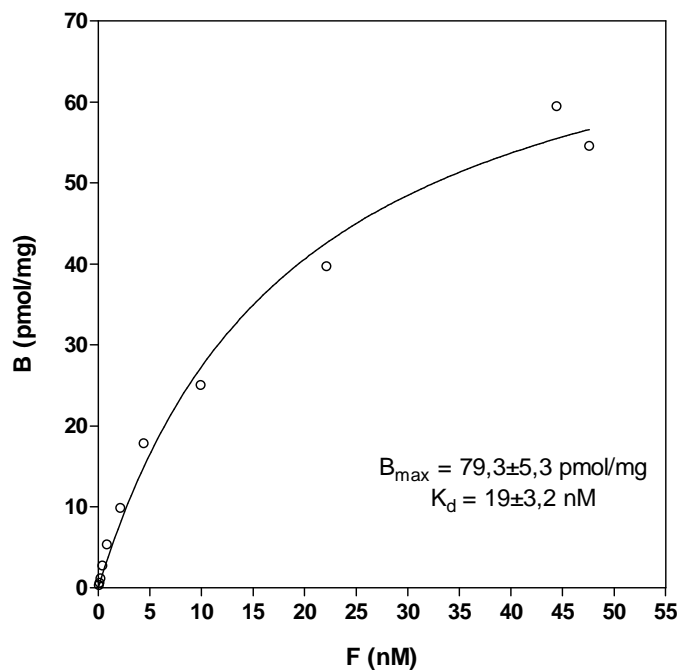
$$B_{\max} = 66,4\text{ pmol/mg}$$

$$K_d = \frac{B_{\max}}{\frac{B}{F}} = 66,4 : 5,87 = \underline{11,31\text{ nM}}$$

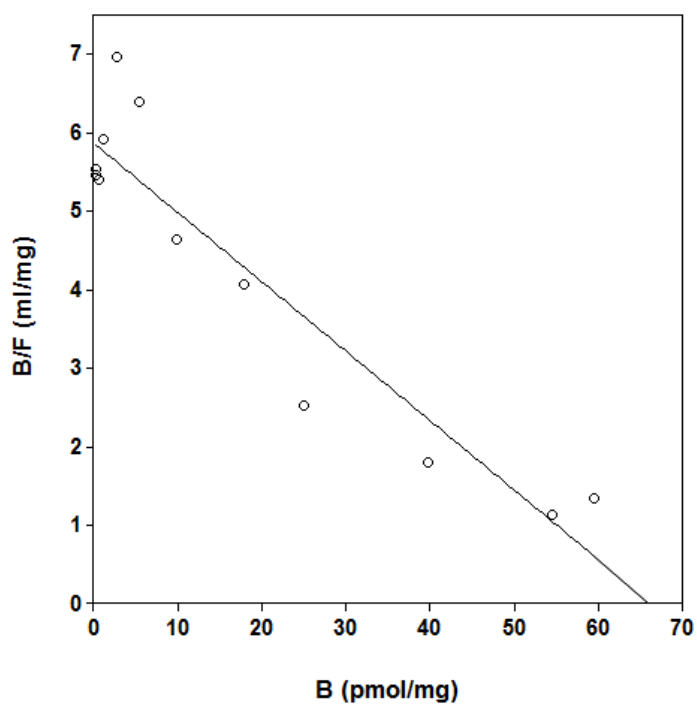
Stanovení K_d ze saturační vazebné křivky ouabainu pomocí nelineární regrese:

$$B_{\max} = \underline{79\text{ pmol/mg}}$$

$$K_d = \underline{19\text{ nM}}$$



Graf 1: Saturační vazebná křivka ouabainu s uvedenými hodnotami B_{\max} a K_d , B značí celkovou koncentraci vázaného radioligandu, F je koncentrace volného radioligandu.



Graf 2: Scatchardův výnos, B je celková vazba, B/F je poměr celkové koncentrace vázaného a volného radioligandu

Dalším úkolem v první fázi experimentů bylo stanovit koncentraci proteinů ve frakcích sacharosového gradientu pomocí Lowryho metody. Frakce vznikly flotací percollových membrán v hustotním gradientu sacharosy. Vzniklé frakce byly čtyři, a s těmi jsme pracovali triplikátech, a dále triplikáty čtyř frakcí, které neobsahovaly protein (kontroly), tj. celkem 24 zkumavek. Vzorku či vody jsme do zkumavek pipetovali po 50 μ l. Dále jsme pracovali s kalibrační řadou deseti zkumavek a také jsme stanovovali obsah proteinů v percollových membránách (tedy vzorku ještě před rozdělením na sacharosovém gradientu), v 5 a 10 μ l, opět v triplikátech.

Výsledné hodnoty koncentrací v mg/ml zobrazuje tabulka 6.

Tabulka 6: Naměřené hodnoty koncentrací ve frakcích sacharosového gradientu

		c (mg/ml)		c (mg/ml)
Vzorek	Frakce 1	0,33	Frakce 2	1,15
	Frakce 3	2,67	Frakce 4	0,67
Kontrola	Frakce 1	0,39	Frakce 2	0,27
	Frakce 3	0,17	Frakce 4	0,05
Percoll. m.		7,71		

Při stanovování ouabainové vazby ve frakcích vzniklých flotací na sacharosovém gradientu nás zajímalo, jak zvýšit výtěžnost proteinů (*recovery*) - při filtraci na Cell Harvestoru, jelikož původní data poukazovala na příliš nízký výtěžek (41 %, Tabulka 8a, str. 46, 8b, str. 47) vzhledem k očekávané teoretické hodnotě (73,8 %, Tabulka 7, str. 46). Byly použity dva přístupy: 1) zředění všech vzorků na 0,25 mg/ml (25 μ g ve 100 μ l, tj. *assay*), Tabulka 10a, str. 48, 10b, str. 49), 2) impregnace GF/C filtru pomocí 0,2 % PEI (polyethylenimin), čímž se sníží nespecifická vazba, což pozitivně ovlivní retenci radioligandu na filtru (Tabulka 9a, str. 47, 9b, str. 48). V závěru byly použity oba postupy současně (Tabulka 11a, str. 49, 11b, str. 50).

Vzorky byly ředěny destilovanou vodou do celkového objemu 600 μ l.

Tabulka 7: Výtěžnost proteinů po flotaci percollových membrán

	Koncentrace proteinu (mg/ml)	V_{frakce} (ml)	Celkový protein (mg/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	7,71	2	15,42	100
Frakce 1	0,33	2	0,66	4,3
Frakce 2	1,15	3,5	4,03	26,1
Frakce 3	2,67	1,5	4,01	26,0
Frakce 4	0,67	4,0	2,68	17,4
Celkem				73,8

Tabulka 8a: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- koncentrace bílkoviny 0,05 mg/assay

	Vazba (pmol/mg)	Celkový protein (mg/frakce)	Celk. vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	8,36	15,42	128,9	100
Frakce 1	0,12	0,66	0,076	0,06
Frakce 2	4,82	4,025	19,38	15
Frakce 3	4,69	4,005	18,80	14,6
Frakce 4	5,43	2,68	14,55	11,3
Celkem				41

Tabulka 8b: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- koncentrace bílkoviny 0,05 mg/assay

	V_{vzorku} (μl /assay)	Vazba (pmol/assay)	V_{proteinu} ředění/frakce	Celk. vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	100	0,42	308,4x	129	100
Frakce 1	100	0,004	20x	0,08	0,06
Frakce 2	100	0,55	35x	19,4	15
Frakce 3	100	1,25	15x	18,8	14,5
Frakce 4	100	0,36	40x	14,5	11,3
Celkem					40,86

Tabulka 9a: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- impregnace filtru GF/C 0,2% PEI, koncentrace bílkoviny 0,05 mg/assay

	Vazba (pmol/mg)	Celk. protein (mg/frakce)	Celk. vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	6,19	15,4	95,5	100
Frakce 1	0,08	0,66	0,053	0,06
Frakce 2	4,76	4,025	19,16	20,07
Frakce 3	4,13	4,005	16,54	17,3
Frakce 4	4,59	2,68	12,3	12,9
Celkem				50,3

Tabulka 9b: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- impregnace filtru GF/C 0,2% PEI koncentrace bílkoviny 0,05 mg/assay

	V_{proteinu} (μl /assay)	Vazba (pmol/assay)	V_{proteinu} ředění/frakce	Celk. vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	100	0,31	20x 15,42	95,6	100
Frakce 1	100	0,003	20x	0,05	0,06
Frakce 2	100	0,55	35x	19,2	20,06
Frakce 3	100	1,1	15x	16,5	17,3
Frakce 4	100	0,31	40x	12,3	12,9
Celkem					50,3

Tabulka 10a: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- koncentrace bílkovin 0,025 mg/assay

	Protein (mg/assay)	Vazba (pmol/mg)	Celk. protein (mg/frakce)	Vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	0,025	6,79	15,42	105	100
Frakce 1	0,025	0,047	0,66	0,031	0,03
Frakce 2	0,025	4,93	4,025	19,8	19
Frakce 3	0,025	9,81	4,005	36,2	39,3
Frakce 4	0,025	3,94	2,68	10,6	10,1
Celkem					68,4

Tabulka 10b: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán koncentrace bílkoviny 0,025 mg/assay

	V_{proteinu} (μl /assay)	Vazba (pmol/assay)	V_{proteinu} ředění/frakce	Vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	100	0,17	20x 30,84	104,7	100
Frakce 1	100	0,0012	20x 1,32	0,031	0,03
Frakce 2	100	0,12	35x 4,6	19,8	18,9
Frakce 3	100	0,25	15x 10,68	39,3	37,5
Frakce 4	100	0,098	40x 2,68	10,6	10,1
Celkem					66,5

Tabulka 11a: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- impregnace filtru GF/C 0,2% PEI a současné naředění proteinu, koncentrace bílkoviny 0,025mg ve vzorku

	Protein (mg/assay)	Vazba (pmol/mg)	Celk. protein (mg/frakce)	Celk. vazba (pmol/frakce)	Procent a (%)
Percoll. m	0,025	6,7	14,5	97	100
Frakce 1	0,025	0,49	0,059	0,029	0,03
Frakce 2	0,025	5,34	3,91	20,9	21,5
Frakce 3	0,025	8,62	4,16	35,8	37,0
Frakce 4	0,025	4,67	2,42	11,3	11,6
Celkem					70,1

Tabulka 11b: Výtěžnost ouabainové vazby po flotaci percollových membrán- impregnace filtru GF/C 0,2% PEI a současné naředění proteinu

	V_{proteinu} (μl /assay)	Vazba (pmol/assay)	V_{proteinu} ředění/frakce	Celk. vazba (pmol/frakce)	Procenta (%)
Percoll. m	100	0,22	20x 25,4	110,5	100
Frakce 1	100	0,0012	20x 1,092	0,027	0,02
Frakce 2	100	0,16	35x 4,14	22,58	20,4
Frakce 3	100	0,27	15x 9,824	40,32	36,5
Frakce 4	100	0,16	40x 2,036	13,45	12,2
Celkem					69,1

Shrnutím k získaným výsledkům lze říci následující:

- 1) Celková výtěžnost (*recovery*) bílkovin percollových membrán po flotaci byla 73,8 %.
- 2) Celková výtěžnost (*recovery*) ouabainové vazby percollových membrán (0,05 mg ve vzorku) po flotaci byla 41 %.
- 3) Celková výtěžnost (*recovery*) ouabainové vazby percollových membrán (0,05 mg ve vzorku) s impregnací filtru 0,2 % PEI po flotaci byla 50,3 %.
- 4) Celková výtěžnost (*recovery*) ouabainové vazby percollových membrán (0,025 mg ve vzorku) bez impregnace filtru po flotaci byla 66,5- 68,4 %.
- 5) Celková výtěžnost (*recovery*) ouabainové vazby percollových membrán (0,025 mg ve vzorku) s impregnací filtru 0,2 % PEI po flotaci byla 69,1 -70,1 %.

2) Vazba [³H]ouabainu jako negativního standardu změn plasmatické membrány vlivem dlouhodobé expozice morfia

Jak již bylo uvedeno, cílem druhého úkolu bylo zjistit, zda dojde ke změně Na,K-ATPasy mozkové tkáně potkanů po expozici účinku morfia při zvyšujících se dávkách. Vzorky byly srovnávány se vzorky získanými od kontrolní skupiny potkanů. Přehled dávek morfia: 1,2 den- 10 mg; 3,4 den- 15 mg; 5,6 den- 20 mg; 7,8 den- 30 mg; 9 den- 40 mg; 10 den- 50 mg morfia/kg hmotnosti. Opět byl použit triciovaný ouabain o celkové radioaktivitě 30 Ci.

Naměřené hodnoty celkové vazby B_{tot} kontrolních vzorků (CTR) s hodnotami nespecifické vazby (NSP), tj. vazby na ostatní místa plasmatické membrány kromě specifického receptoru, a vzorků plasmatických membrán potkanů vystavených dávkám morfia (MOR) s hodnotami nespecifické vazby (NSP) zobrazují tabulky č. 12 a 13 (str. 52). První dvě a poslední dvě zkumavky dané série obsahují tentýž vzorek- hodnoty byly poté zprůměrovány, výsledkem bylo deset hodnot.

Tabulka 12: Hodnoty celkové vazby B_{tot} kontrolních vzorků, hodnoty celkové nespecifické vazby NSP a hodnoty specifické vazby B_{sp}

Celková vazba CTR		Celková vazba NSP-CTR		Specifická vazba CTR
č. vzorku	B_{tot} (dpm)	č. vzorku	B_{tot} (dpm)	B_{sp} (dpm)
1	481,5	61	88	393,5
2	402	62	103	299
3	854,5	63	107	747,5
4	1531,5	64	202	1329,5
5	2865	65	193	2672
6	6194,5	66	338	5856,5
7	11805,5	67	549	11256,5
8	20012	68	1021	18991
9	35277	69	2372	32905
10	48214,5	70	3950	44264,5
11	77204,5	71	7602	69602,5
12	72649	72	8230	64419

Tabulka 13: Hodnoty celkové vazby B_{tot} vzorků plasmatických membrán potkanů vystavených dávám morfia- MOR

Celková vazba MOR		Celková vazba NSP- MOR		Specifická vazba MOR
č. vzorku	B_{tot} (dpm)	č. vzorku	B_{tot} (dpm)	B_{sp} (dpm)
25	428	49	70	358
26	411	50	59	352
27	826	51	91	735
28	1509	52	111	1398
29	2875	53	168	2707
30	6261	54	314	5947
31	10337	55	715	9622
32	20196	56	1037	19159
33	33299	57	2012	31287
34	51146	58	4387	46759
35	67288	59	7422	59866
36	67665	60	6987	60678

Tabulka č. 14 uvádí hodnoty celkové radioaktivity ve 450 μ l (měřili jsme radioaktivitu pouze 100 μ l, naměřené hodnoty byly násobeny 4,5x).

Tabulka č. 14: Hodnoty celkové radioaktivity ve 450 μ l

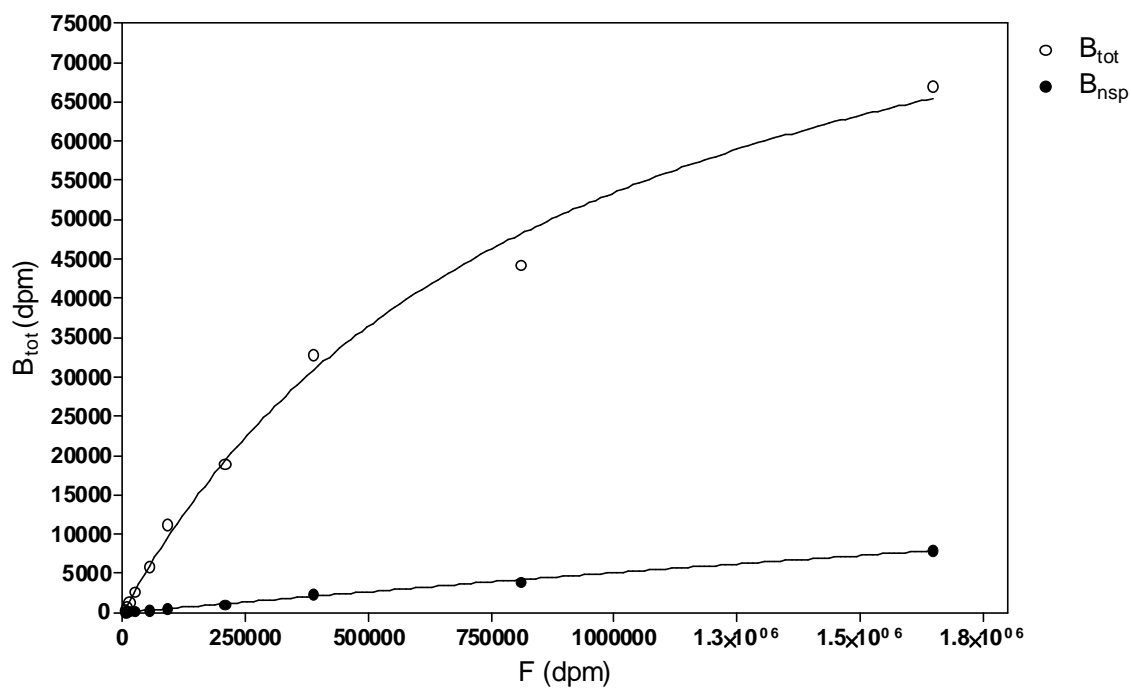
č. vzorku	TOTAL RA (dpm)
73	3510
74	6984
75	13370
76	25862
77	58775
78	100251
79	225779
80	419679
81	853232
82	1714676

Následující tabulka 15 uvádí vypočtené hodnoty pro koncentraci volného radioligandu (tu lze vypočítat $B_{tot} - B_{sp}$) a vzorků od morfiem exponovaných potkanů (F CTR, F MOR), přepočet z jednotek dpm na nM, specifickou vazbu vztaženou na miligram proteinu a podíl hodnot B/F kontrol a vzorků od morfiem exponovaných potkanů.

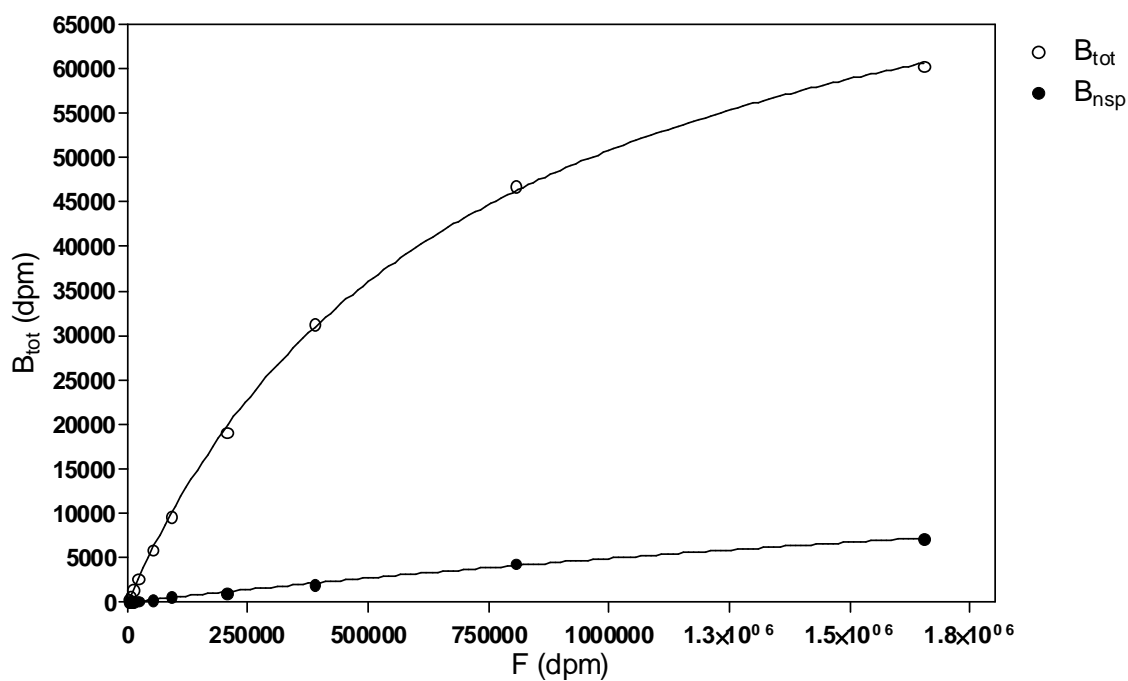
Tabulka 15: Hodnoty volného radioligandu F kontrolní skupiny a MOR skupiny, specifická vazba kontrolní a MOR skupiny vyjádřená v pmol/mg proteinu

F CTR (dpm)	F MOR (dpm)	F CTR (nM)	F MOR (nM)	B CTR (pmol/mg)	B MOR (pmol/mg)
3164	3155	0,10	0,09	0,13	0,14
6237	6249	0,19	0,19	0,27	0,29
12040	11972	0,36	0,36	0,49	0,55
23190	23155	0,70	0,70	0,98	1,07
52918	52828	1,59	1,59	2,14	2,35
88995	90630	2,67	2,72	4,12	3,80
206788	206620	6,21	6,20	6,95	7,57
386774	388393	11,61	11,66	12,05	12,36
808967	806473	24,29	24,22	16,21	18,48
1647665	1654404	49,48	49,68	24,54	23,82

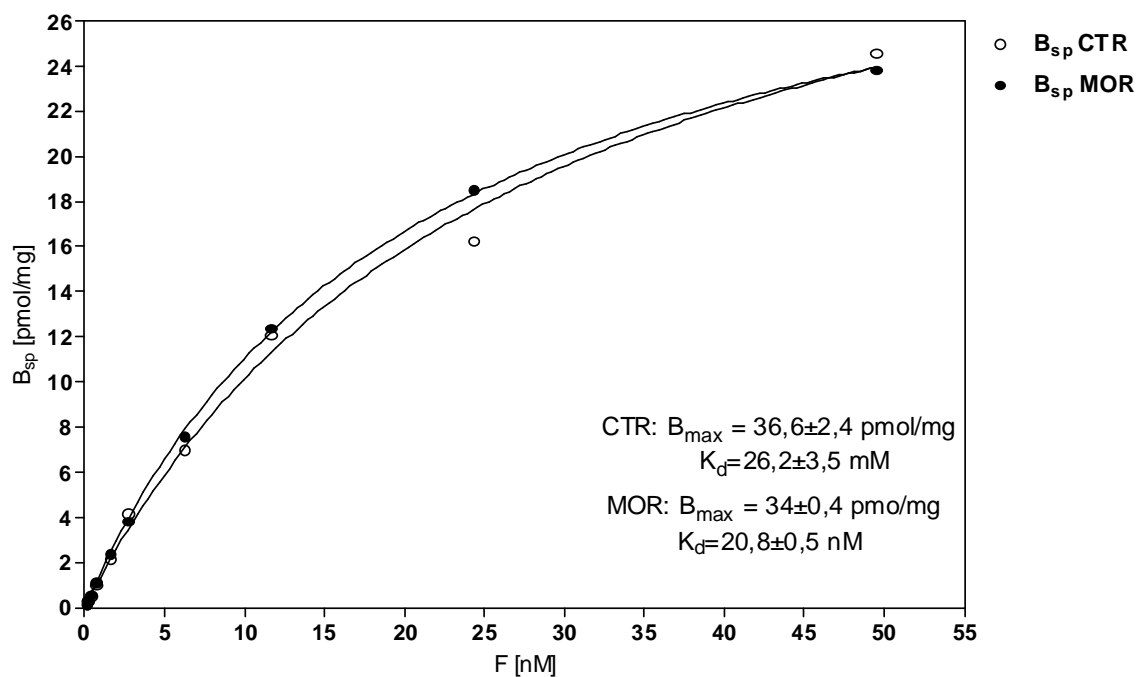
Následující grafy 3 a 4 na str. 54 uvádějí celkovou a nespecifickou vazbu [³H]ouabainu ve vzorcích membrán kontrolních, resp. morfiu exponovaných zvířat, vyjádřenou v jednotkách dpm. Graf 5 na str. 55 srovnává křivky specifické vazby CTR a MOR [³H]ouabainu v jednotkách pmol přepočtenou na mg bílkoviny. Hodnoty maximální vazebné kapacity a disociační konstanty pro obě saturační vazebné křivky jsou uvedeny v grafu.



Graf 3: Celková (B_{tot}) a nescifická vazba (B_{nsp}) [3H]ouabainu v kontrolních vzorcích CTR



Graf 4: : : Celková (B_{tot}) a nescifická vazba (B_{nsp}) [3H]ouabainu v morfiem ovlivněných vzorcích MOR



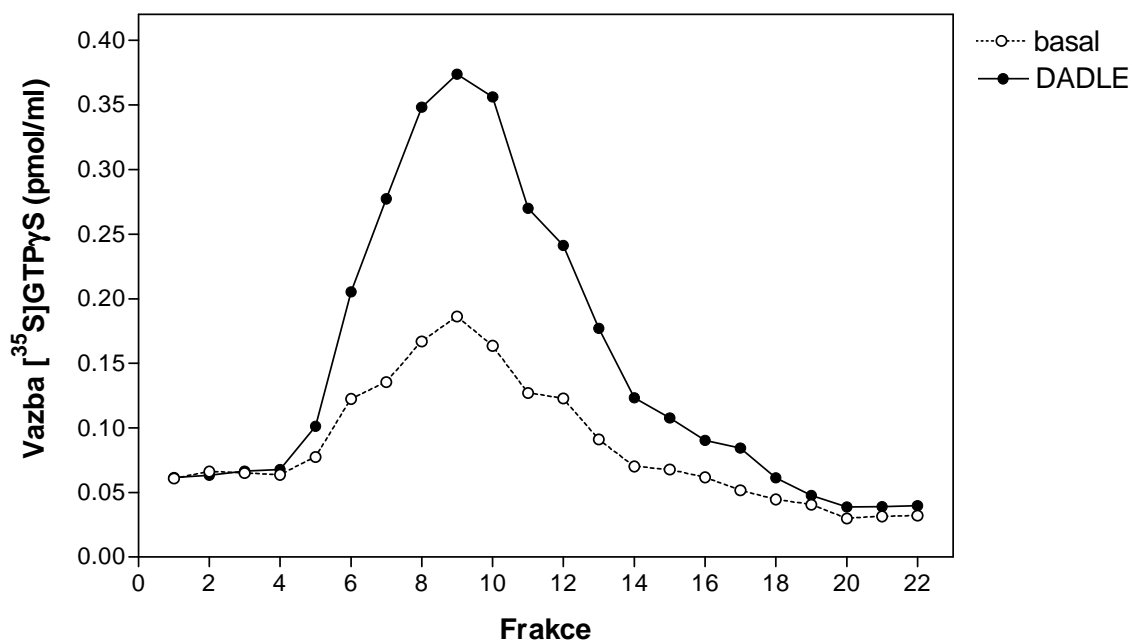
Graf 5: Specifická vazba [3 H]ouabainu ve vzorcích kontrolních (B_{sp} CTR) a exponovaných morfiem (B_{sp} MOR)- srovnání obou křivek, uvedeny hodnoty B_{max} a K_d obou křivek

3) Analýza percollového gradientu frakcí buněčné linie DOR-Gi pomocí vazby [³⁵S]GTPγS

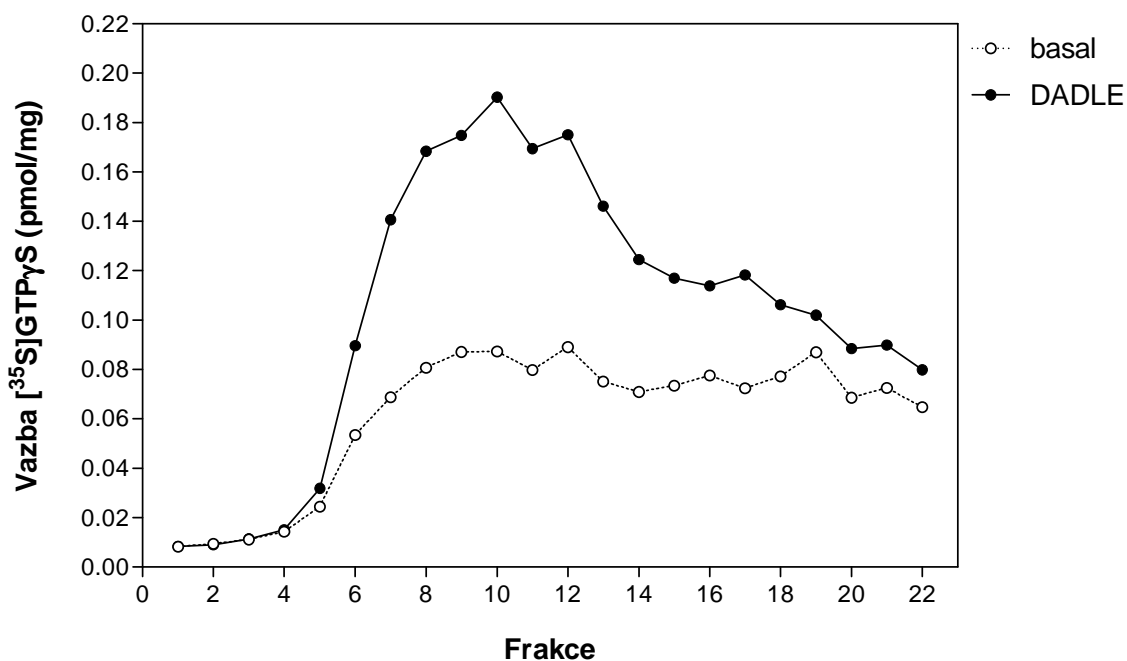
Cílem tohoto úkolu bylo zjistit, jaké frakce percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi obsahují nejvíce plasmatických membrán. To bylo možné zjistit pomocí vazby [³⁵S]GTPγS na G-protein spřažený s δ-opioidním receptorem, který byl stimulován vazbou agonisty DADLE. Ve frakci s vyšším obsahem plasmatických membrán jsme předpokládali nárůst celkové vazby.

Na percollovém gradientu došlo k rozdělení percollových membrán, viz postup výše. Gradient byl odebírán po 1 ml, výsledkem bylo 22 frakcí, které byly použity jako výchozí vzorek experimentu. Měření probíhalo a) bez přítomnosti agonisty DADLE, tj. basal, kdy se na G-proteiny ve frakci obsahující plasmatické membrány navázal GDP (obsažený v roztoku 2x MIX) nebo [³⁵S]GTPγS, přičemž oba vzájemně kompetují o vazebné místo na G-proteinu, b) po přidavku DADLE, kdy GDP byl zaměněn za radioaktivní nehydrolyzovatelný analog GTP, tj. [³⁵S]GTPγS. Tento analog již GTPasa není schopna hydrolyzovat, a proto G-protein setrvává v aktivovaném stavu.

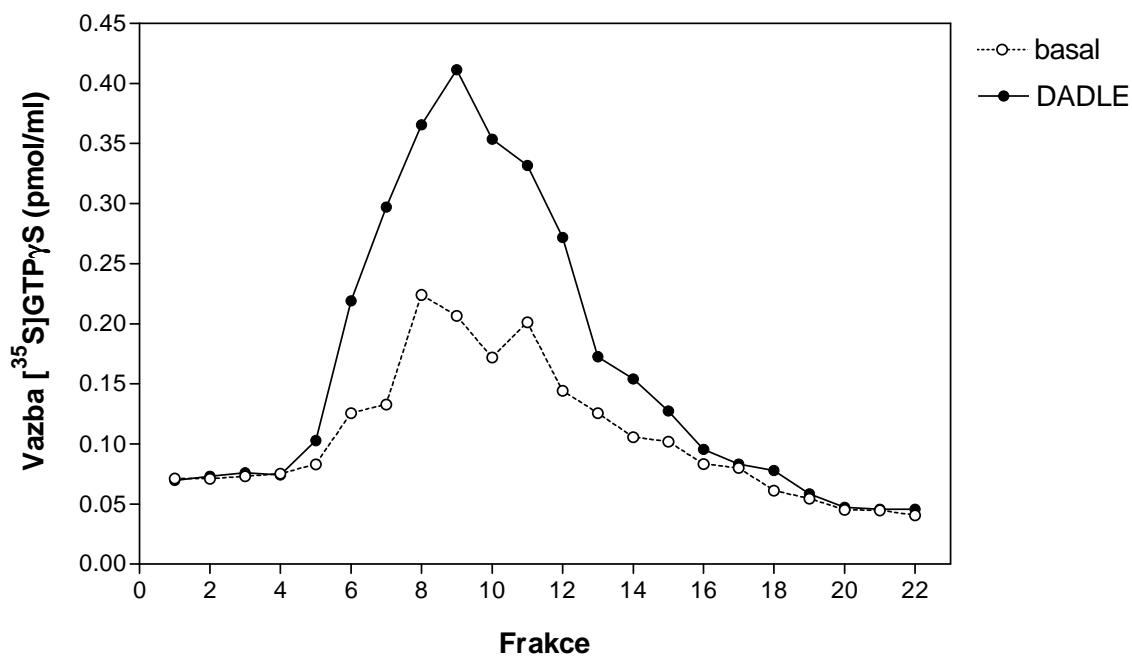
Následující grafy ukazují srovnání dvou experimentů různých vzorků percollového gradientu. Grafy č. 6 a 7 na str. 57 znázorňují srovnání vazby [³⁵S]GTPγS ve frakcích percollového gradientu u prvního experimentu bez přidání agonisty δ-opioidních receptorů- tj. basal, a po přidání agonisty DADLE, kdy došlo ke zvýšení vazby [³⁵S]GTPγS na G-protein. Graf č. 6 (str. 57) znázorňuje přepočtení vazby [³⁵S]GTPγS na 1 ml frakce, graf č. 7 (str. 57) zobrazuje přepočet vazby [³⁵S]GTPγS na 1 mg proteinu vzorku. Obdobně grafy 8 a 9 (str. 58) zobrazují totéž u druhého experimentu. Grafy 10 a 11 (str. 59) znázorňují srovnání basálních hodnot v přepočtu na ml frakce, respektive mg proteinu. Grafy 12 a 13 (str. 60) znázorňují srovnání hodnot po přidání agonisty DADLE, obdobným způsobem jako v předchozích případech.



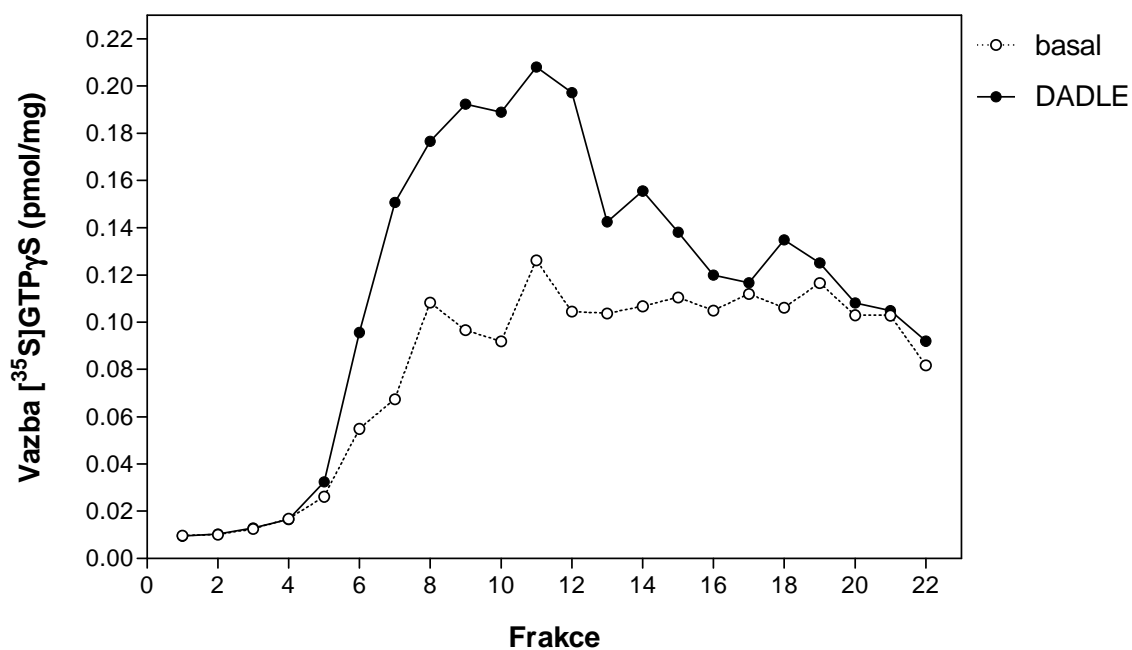
Graf 6: Srovnání profilu bazální vazby (basal) a vazby stimulované (DADLE) ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočten na ml frakce- experiment I



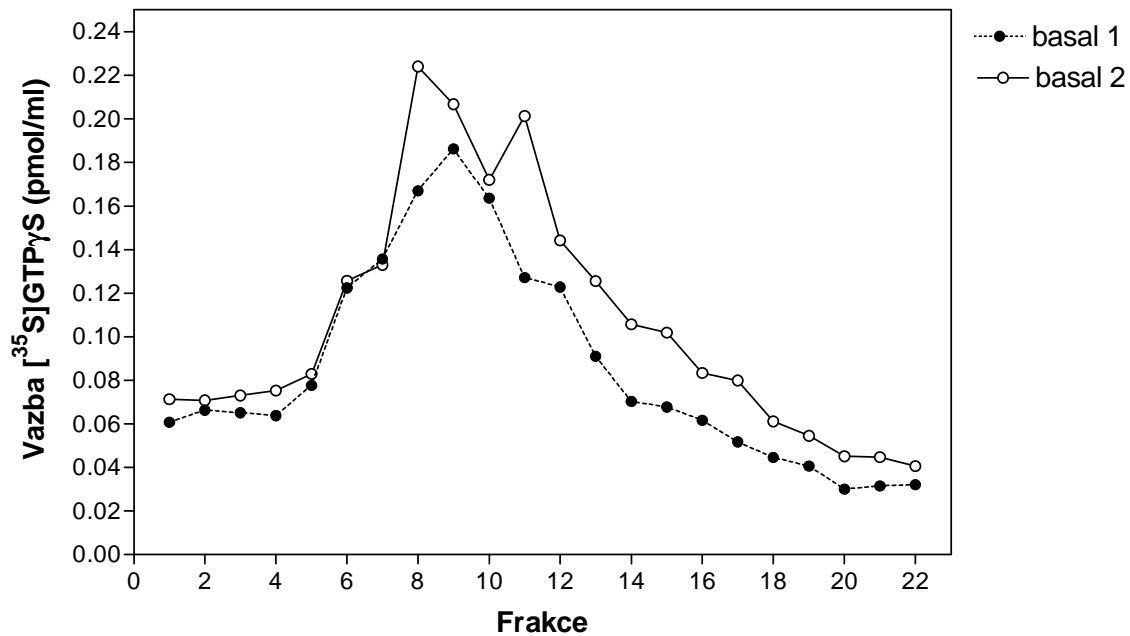
Graf 7: Srovnání profilu bazální vazby (basal) a vazby stimulované (DADLE) ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočten na mg proteinu- experiment I



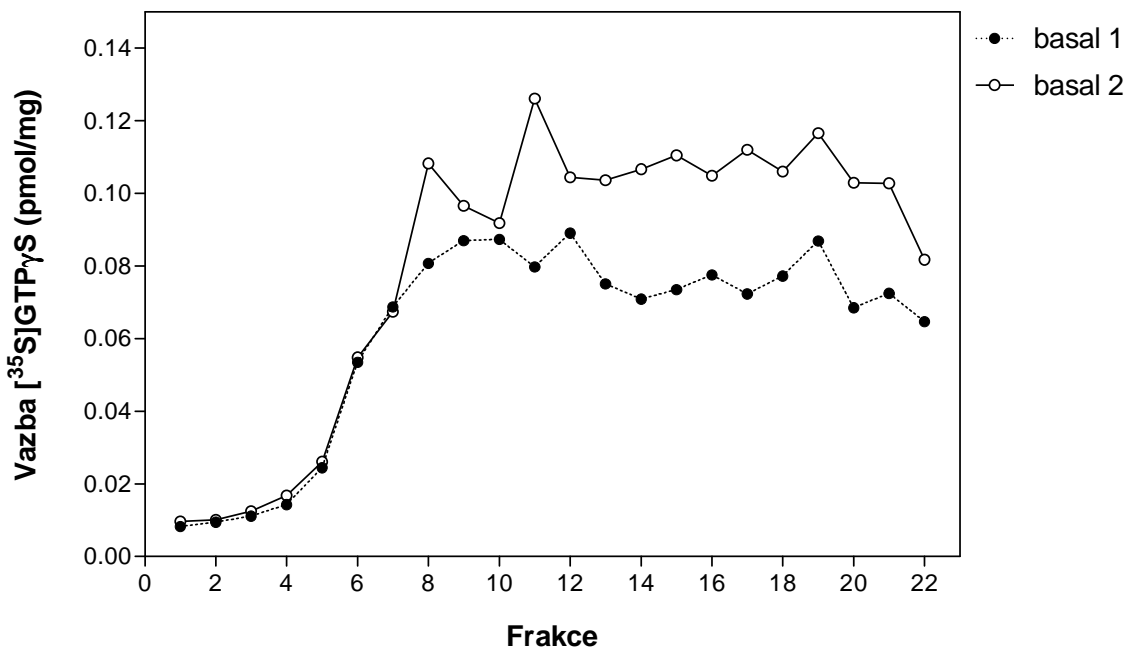
Graf 8: Srovnání profilu bazální vazby (basal) a vazby stimulované (DADLE) ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočten na ml frakce- experiment II



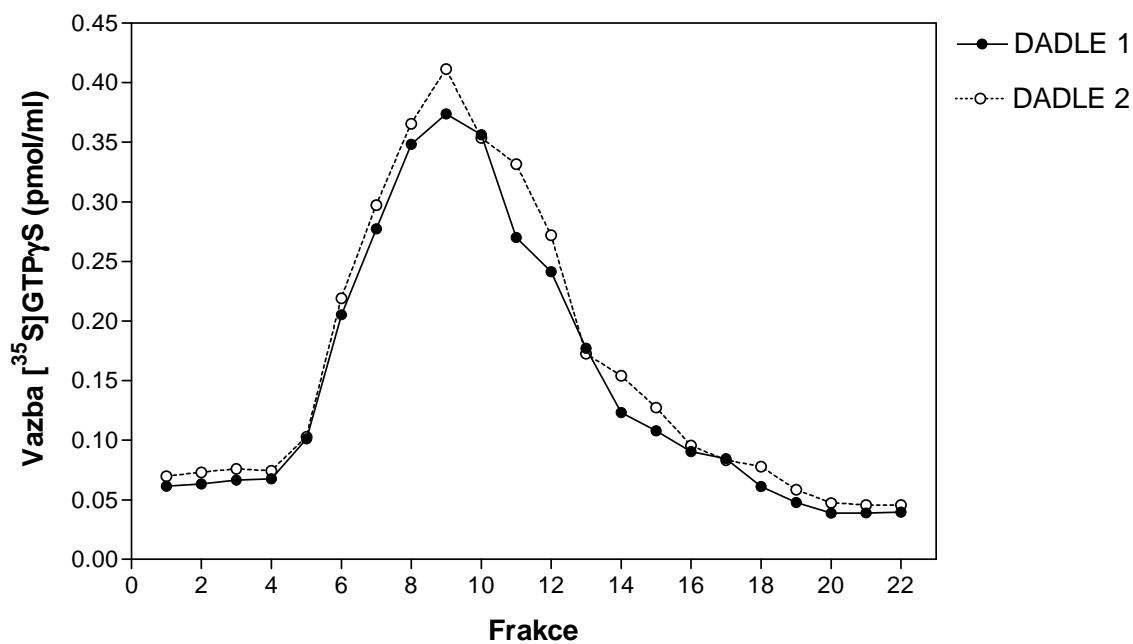
Graf 9: Srovnání profilu bazální vazby (basal) a vazby stimulované (DADLE) ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočten na mg frakce experiment- II



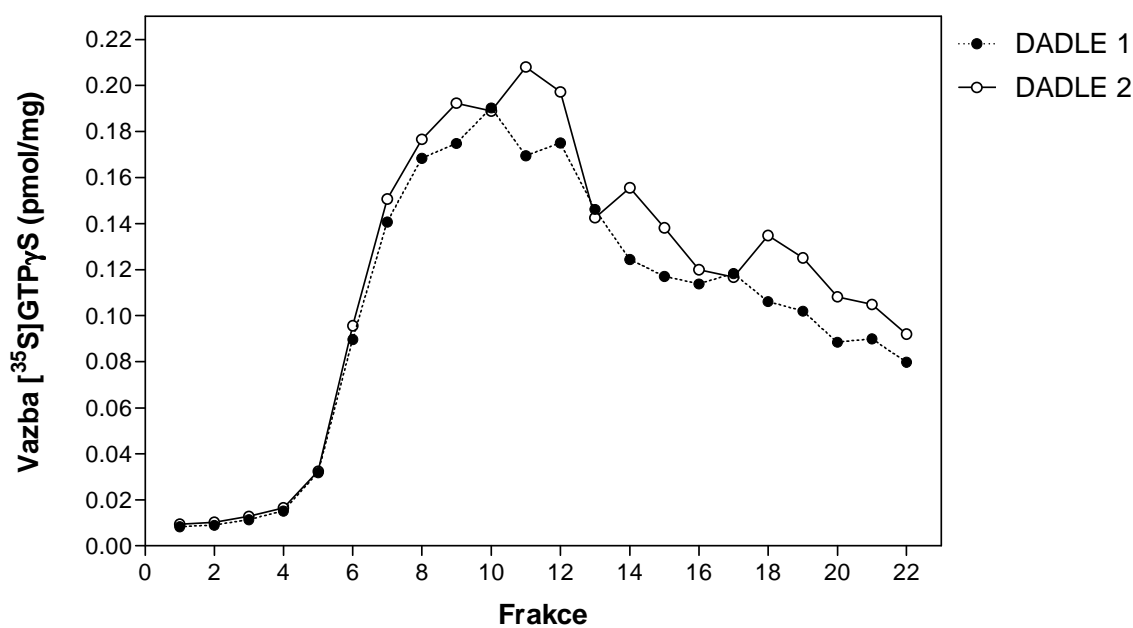
Graf 10: Srovnání profilu bazální vazby z experimentů I a II ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočteno na ml frakce



Graf 11: Srovnání profilu bazální vazby z experimentů I a II ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočteno na mg proteinu



Graf 12: Srovnání profilu stimulované vazby agonistou DADLE z experimentů I a II ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočteno na ml frakce

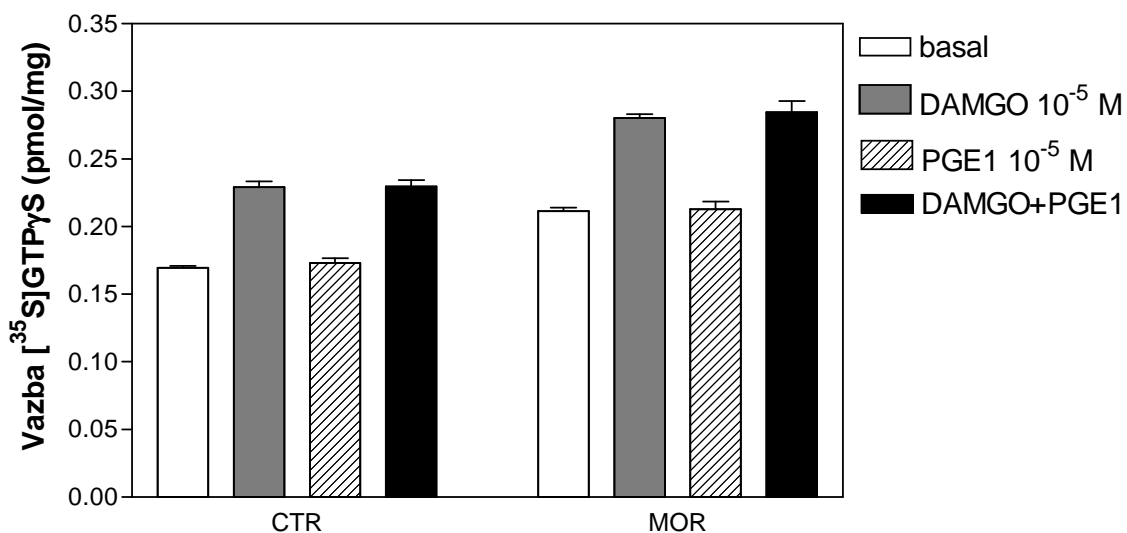


Graf 13: Srovnání profilu stimulované vazby agonistou DADLE z experimentů I a II ve frakcích percollového gradientu buněčné linie DOR-Gi, přepočteno na mg proteinu

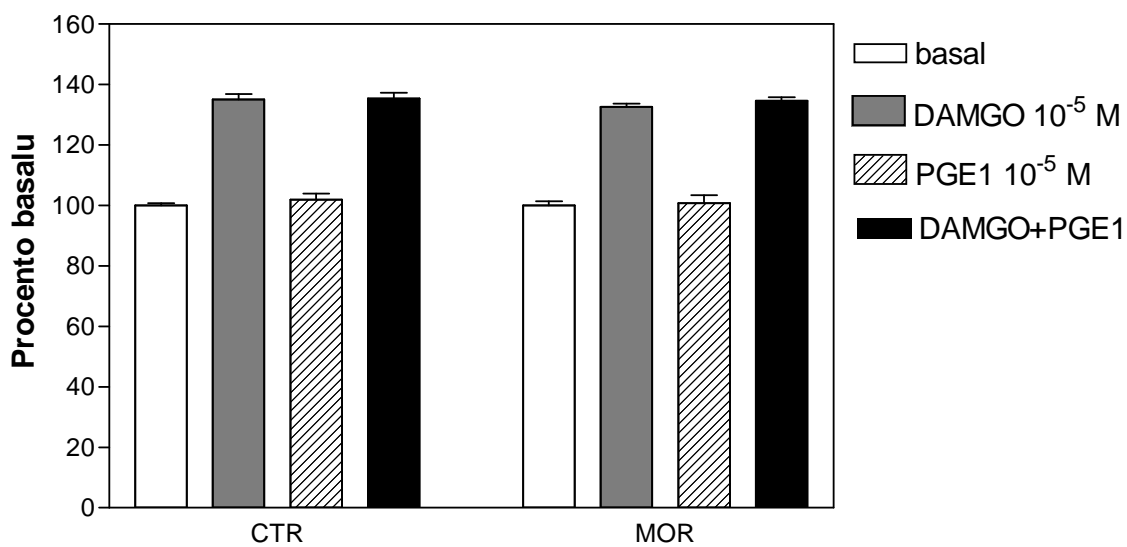
4) Studium vlivu DAMGO a PGE1 na opioidní receptory cortexu potkana pomocí vazby [³⁵]GTPγS, vliv dlouhodobé expozice morfia

Výchozím materiálem byly cortexy potkanů, jimž bylo podáváno morfium obdobně jako tomu bylo u experimentu č. 2. Dávky morfia: 1,2 den- 10 mg; 3,4 den- 15 mg; 5,6 den- 20 mg; 7,8 den- 30 mg; 9 den- 40 mg; 10 den- 50 mg morfia/kg váhy. Vzorky byly srovnávány se vzorky získanými od kontrolní skupiny potkanů. Izolované membrány byly uchovávány v -80 °C. Před experimentem byly membrány čerstvě naředěny na koncentraci 0,5 mg/ml. Dále byly použity roztoky prostaglandinu E1 (PGE1) v ethanolu o koncentraci 10⁻⁴ M, DAMGO o koncentraci 10⁻⁴ M a GDP o koncentraci 0,5 a 0,2 mM. GDP o různé koncentraci bylo použito pro dvě varianty tohoto experimentu. Pipetovací schéma tohoto experimentu je uvedeno v tabulce 4. Obě varianty experimentu (s 0,5 a 0,2 mM GDP) obsahovaly kontrolní vzorky a vzorky ze zvířat vystavených dlouhodobému podávání morfia. Pokus byl měřen v hexaplikátech a byla měřena bazální vazba (basal), tj. bez přídavku DAMGO či PGE1, poté pouze s přídavkem DAMGO, pouze PGE1 a na závěr oba ligandy současně.

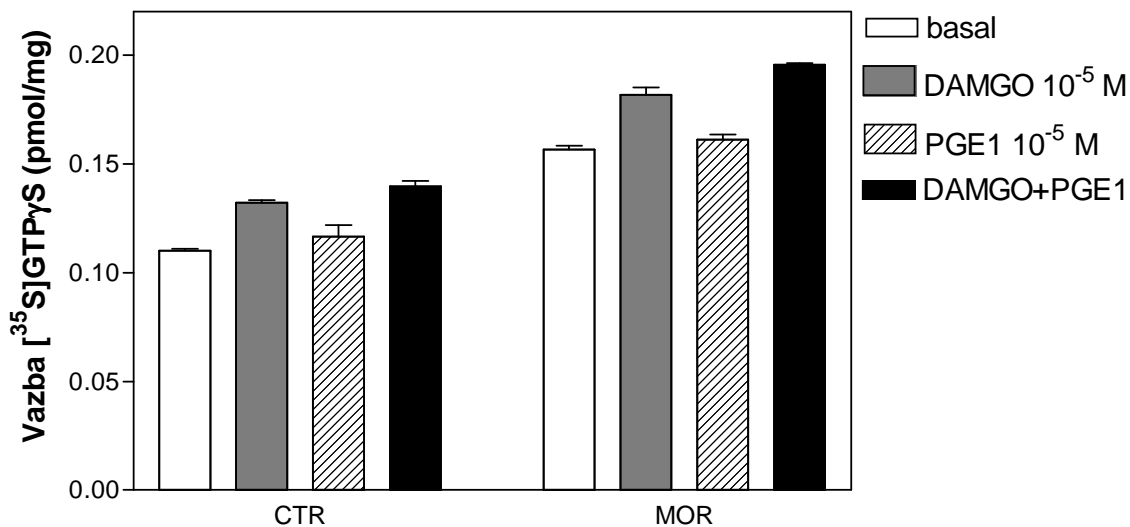
V následujících sloupcových grafech je na ose y vynesena vazba [³⁵]GTPγS v pmol/mg proteinu. Sloupce jsou doplněny standardní chybou průměru (z angl. *standard error of mean*, SEM), které jsou číselně uvedeny v tabulkách č. 16, 17, 18 a 19 (str. 64). Grafy č. 14 a 15 (str. 62) znázorňují vazbu [³⁵]GTPγS při výsledné koncentraci 50 μM GDP, grafy č. 16 a 17 (str. 63) znázorňují vazbu [³⁵]GTPγS při výsledné koncentraci 20 μM GDP.



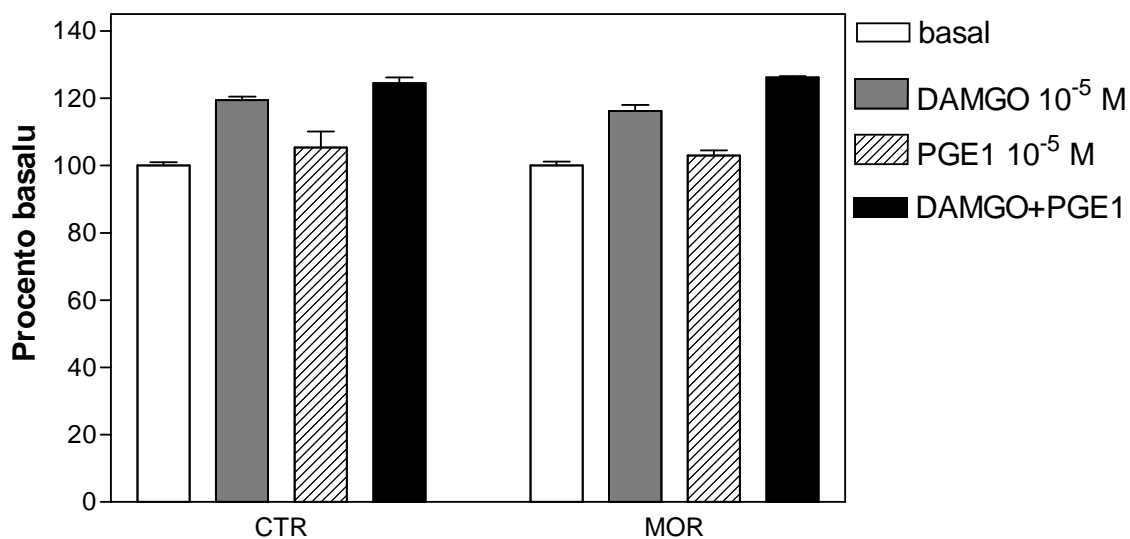
Graf 14: Vazba [³⁵]GTPγS v pmol/mg proteinu, s 50 μM GDP, legenda vpravo uvádí složení variant experimentu a výslednou koncentraci ligandů



Graf 15: Vazba [³⁵]GTPγS vyjádřená v procentech basalu, s 50 μM GDP, legenda vpravo uvádí složení variant experimentu a výslednou koncentraci ligandů



Graf 16: Vazba [³⁵]GTPγS v pmol/mg proteinu, s 20 μM GDP, legenda vpravo uvádí složení variant experimentu a výslednou koncentraci ligandů



Graf 17: Vazba [³⁵]GTPγS vyjádřená v procentech basalu, s 20 μM GDP, legenda vpravo uvádí složení variant experimentu a výslednou koncentraci ligandů

Tabulka č. 16: Hodnoty vazby [³⁵S]GTPγS ± SEM v 50 μM GDP

Vazba [³⁵ S]GTPγS	Basal (pmol/mg)	DAMGO 10 ⁻⁵ M (pmol/mg)	PGE1 10 ⁻⁵ M (pmol/mg)	DAMGO+PGE1 (pmol/mg)
CTR	0,170±0,001	0,230±0,004	0,170±0,003	0,230±0,005
MOR	0,210±0,003	0,280±0,003	0,210±0,006	0,280±0,003

Tabulka č. 17: Hodnoty vazby [³⁵S]GTPγS ± SEM v 50 μM GDP

Vazba [³⁵ S]GTPγS	Basal (%)	DAMGO 10 ⁻⁵ M (%)	PGE1 10 ⁻⁵ M (%)	DAMGO+PGE1 (%)
CTR	100±1	135±2	102±2	135±2
MOR	100±2	133±1	101±3	135±1

Tabulka č. 18: Hodnoty vazby [³⁵S]GTPγS ± SEM v 20 μM GDP

Vazba [³⁵ S]GTPγS	Basal (pmol/mg)	DAMGO 10 ⁻⁵ M (pmol/mg)	PGE1 10 ⁻⁵ M (pmol/mg)	DAMGO+PGE1 (pmol/mg)
CTR	0,110 ±0,001	0,130±0,001	0,120±0,005	0,140±0,003
MOR	0,160±0,002	0,180±0,003	0,160±0,002	0,200±0,001

Tabulka č. 19: Hodnoty vazby [³⁵S]GTPγS ± SEM v 20 μM GDP

Vazba [³⁵ S]GTPγS	Basal (%)	DAMGO 10 ⁻⁵ M (%)	PGE1 10 ⁻⁵ M (%)	DAMGO+PGE1 (%)
CTR	100±1 %	119±1 %	105±5 %	126±2 %
MOR	100±1 %	116±2 %	103±1 %	125±0 %

5. DISKUSE

1) Vazba [³H]ouabainu jako ukazatel obsahu plasmatických membrán ve frakcích buněčného homogenátu mozku, stanovení ouabainové vazby ve frakcích sacharosového gradientu

V daném experimentu jsme stanovovali rovnovážnou disociační konstantu K_d a maximální počet vazebných míst B_{max} ze saturační vazebné křivky [³H]ouabainu a porovnávali s hodnotami získanými po linearizaci dat ze Scatchardova výnosu. Dále jsme se snažili zvýšit výtěžnost ouabainové vazby při frakcionaci pomocí sacharosového gradientu.

Vypočtené hodnoty B_{max} (79 a 65 pmol/mg) a rovnovážné disociační konstanty receptoru K_d (11,32 nM a 19 nM), stanovené ze saturační vazebné křivky ouabainu pomocí nelineární regrese a ze Scatchardova výnosu jsou v poměrně dobré shodě. Drobná odchylka obou hodnot může být způsobena tím, že lineární transformace dat do tvaru Scatchardova výnosu je zatížena určitou chybou.

Co se týká druhé části úkolu, lze říci následující. K významnému navýšení výtěžnosti (*recovery*) ouabainové vazby, o cca 27 %, dochází při naředění vzorků plasmatických membrán na poloviční koncentraci jejich původní hodnoty v pokuse, tj. z 0,050 mg ve 100 μ l vzorku (*assay*) na 0,025 mg ve 100 μ l vzorku (*assay*) (viz Tabulka 10 a, str. 48, 10b, str. 49). Při tomto postupu jsme dosáhli vhodného množství plasmatických membrán pro splnění podmínky maximálně 10% „vyvázání“ radioaktivity z její celkové hodnoty vnesené do pokusu, které leží v lineární části saturační vazebné křivky. Splnění této podmínky je významné z hlediska použitelnosti uvedených matematických vztahů pro výpočet zejména K_d a B_{max} a z hlediska dobré reprodukovatelnosti výsledků. K nárůstu výtěžku dochází též při impregnaci GF/C filtru 0,2% polyethyleniminem, o necelých 10 % při koncentraci proteinu 0,05 mg ve 100 μ l vzorku (*assay*). Při použití nižší koncentrace 0,025 mg ve 100 μ l vzorku (*assay*) již k významnějšímu nárůstu výtěžnosti při impregnaci filtru 0,2% PEI nedochází.

2) Vazba [³H]ouabainu jako negativního standardu změn plasmatické membrány vlivem dlouhodobé expozice morfia

Pro naše účely byly použity purifikované plasmatické membrány izolované z tkáně předního mozku potkanů, jimž bylo po dobu 10 dnů podáváno morfium, a srovnávány s plasmatickými membránami pocházejícími z kontrolní skupiny pokusných zvířat. U všech zvířat vystavených působení morfia se podle provedených behaviorálních testů plně rozvinula závislost (22).

Jak již bylo uvedeno, Na,K-ATPasa je používána jako ukazatel (*marker*) čistoty plasmatických membrán. V tomto experimentu jsme se soustředili na to, zda bude Na,K-ATPasa nějakým způsobem ovlivněna ve vzorku plasmatických membrán pocházejícím od potkanů s plnou závislostí na morfiu. Předpokládali jsme, že vazba [³H]ouabainu v obou vzorcích membrán, tj. množství Na, K-ATPasy by se nemělo změnit (negativní standard změn).

Z grafu 7 (str. 52) vyplývá, že hodnoty specifické vazby a celkový průběh obou křivek vzorků kontrolních (CTR) i těch, které byly získány ze zvířat, jimž bylo podáváno morfium (MOR), jsou obdobné: $B_{\max} = 36,6 \pm 2,4$ pmol/mg, $K_d = 26,2 \pm 3,5$ nM pro CTR a $B_{\max} = 34,0 \pm 0,4$ pmol/mg, $K_d = 20,8 \pm 0,5$ nM pro MOR. Nedošlo tedy k signifikantním změnám Na,K-ATPasy vlivem dlouhodobého podávání morfia.

3) Analýza percollového gradientu frakcí buněčné linie DOR-Gi pomocí vazby [³⁵S]GTP γ S

Abychom zjistili, které frakce percollového gradientu obsahují plasmatické membrány, stanovili jsme aktivitu G-proteinu spřaženého s δ -opiátovými receptory, pomocí měření vazby [³⁵S]GTP γ S bez přítomnosti agonisty DADLE- tj. basal (bazální vazba) a v přítomnosti DADLE, tj. stimulovaná vazba.

Grafy č. 6-13 (str. 57- 60) znázorňují profily gradientů, získaných ze dvou různých frakcionací buněk DOR-Gi. Grafy 6, 7 (str. 57) a 8, 9 (str. 58) znázorňují profily bazální a stimulované vazby, nejprve v přepočtu na ml frakce a poté na mg obsaženého proteinu. Jak je z grafů patrné, shoda profilů obou gradientů je lepší v případě přepočtu vazby na ml frakce, profily mají strmější nárůst i pokles s viditelnou nejvyšší hodnotou. Další grafy, 10, 11 (str. 59) a 12 a 13 (str. 60) obsahují srovnání basálních hodnot obou experimentů a

srovnání profilu stimulované vazby agonistou DADLE. Průběh profilu basalu 2 se mírně liší od průběhu basalu 1, u stimulované vazby mají profily podobný průběh. Odlišný průběh může být dán poněkud rozdílným rozebíráním gradientu na jednotlivé frakce, které se provádí manuálně. Nicméně, shoda v profilech obou gradientů je poměrně dobrá a z grafů vyplývá, že nejvyšší stimulace vazby [³⁵S]GTPγS agonistou DADLE je ve frakcích 8., 9., 10., a 11. Proto lze říci, že nejvyšší obsah plasmatických membrán lze nejjistěji očekávat ve frakcích 6- 12.

Podíváme-li se znovu na obr. 5, str. 29, uvidíme v kyvetě vpravo oblast označenou jako frakce A. Tato frakce by měla obsahovat tzv. percollové (purifikované plasmatické) membrány. Z této části gradientu je odebíráno 6 ml pro další postup izolace membrán. Náš experiment tedy potvrdil, že při izolaci a purifikaci na percollovém gradientu je skutečně odebíráno správné množství i správná část - frakce percollového gradientu, která obsahuje plasmatické membrány. Možné by tedy bylo odebírat ještě 1 ml 12. frakce, která podle našich výsledků obsahuje ještě zbytkové množství plasmatických membrán.

4) Studium vlivu DAMGO a PGE1 na opioidní receptory cortexu potkana pomocí vazby [³⁵]GTPγS, vliv dlouhodobé expozice morfia

Pro experiment byly použity purifikované plasmatické membrány, izolované z předního mozku potkanů (metodika podle (71)), jimž bylo po dobu 10 dnů podáváno morfiu ve zvyšujících se dávkách až do 50 mg/kg hmotnosti, přičemž tato zvířata byla plně závislá na morfiu (MOR) (22). Uvedené vzorky plasmatických membrán byly srovnávány s plasmatickými membránami pocházejícími z potkanů z kontrolní skupiny (CTR).

Jak již bylo výše uvedeno, z literatury vyplývá zjištění, že vlivem opakovaného dlouhodobého (chronického) podávání morfia může dojít k vazbě G-proteinu třídy G_s na μ-opioidní receptor. Tato vazba je pravděpodobně způsobena sníženou afinitou vazby μ-opioidních receptorů ke G-proteinům třídy G_i/G_o (se kterými jsou za standardních podmínek ve zdravé tkáni spřaženy) vlivem desensitizace (24-27). Záměnou G-proteinu třídy G_i/G_o za G_s (tzv. *switch*) může dojít k následné aktivaci adenylylcyklasy (27).

Z jiného zdroje víme, že prostaglandin E1 (PGE1), ligand prostaglandinových receptorů, patřících do skupiny GPCR, které jsou spřaženy s G-proteiny třídy G_s naopak aktivitu AC zvyšuje, což se projeví nárůstem hladiny cAMP (29). Zajímalo nás tedy,

jakým způsobem se změní vazba [³⁵S]GTPγS vlivem DAMGO a PGE1 po dlouhodobém podávání morfia.

U mozkové tkáně byla pozorována vysoká bazální aktivita G-proteinů a tedy i bazální vazba [³⁵S]GTPγS je vysoká. Tyto vysoké hodnoty bazální aktivity G-proteinů je třeba snížit pomocí kompetitoru vazby GDP, díky čemuž je možné lépe detekovat změny vazby např. při stimulaci agonistou. Bez použití GDP není možné detekovat signifikantní rozdíl mezi celkovou stimulovanou a bazální hodnotou vazby (22). Z tohoto důvodu byl použit GDP ve výsledné koncentraci 50 a 20 μM, přičemž z výše uvedených grafů vyplývá, že nižší použitá koncentrace GDP, 20 μM, umožňuje lépe pozorovat vliv DAMGO a zejména PGE1, změny jsou zřetelnější, tato koncentrace je tedy optimální pro pozorování vlivů morfia na opioidní receptory.

Z grafů vyplývá, že bazální vazba [³⁵S]GTPγS je vyšší u vzorků pocházejících od potkanů, jimž bylo dlouhodobě podáváno morfium (MOR) než u vzorků pocházejících od kontrolních zvířat (CTR), a to v obou případech měření: u 50 μM GDP je rozdíl o 0,04 pmol/mg a u 20 μM GDP je to 0,05 pmol/mg. Důvodem je pravděpodobně fakt, že morfium stimuluje aktivitu G-proteinu (vazbu [³⁵S]GTPγS na G-protein).

Nyní budeme diskutovat výsledky experimentu při použití 50 μM koncentrace GDP. Ke zvýšení vazby [³⁵S]GTPγS vzhledem k basalu (0,170 pmol/mg u CTR a 0,210 pmol/mg u MOR) došlo podle očekávání po stimulaci μ-opioidních receptorů agonistou DAMGO (o 0,06 pmol/mg v CTR a o 0,07 pmol/mg v MOR, tj. výsledné hodnoty byly 0,230 pmol/mg u CTR- stimulace 135 % a 0,280 pmol/mg u MOR- stimulace 133 %). PGE1 nemá na vazbu žádný vliv, hodnoty odpovídají v obou sadách vzorků hodnotám basalu. Působí-li oba ligandy společně, pozorovali jsme zvýšení vazby, nicméně pouze v číselném rozsahu vazby DAMGO, lze tedy předpokládat, že PGE1 nemá na vazbu vliv. Zhodnotíme-li výsledné hodnoty při přepočtu na procenta, kdy basální vazbu pokládáme za 100%, lze konstatovat, že DAMGO stimuluje opioidní receptor o 2 % méně u MOR vzorků plasmatických membrán než u CTR. Tento efekt je pravděpodobně možné přičíst vlivu desensitizace μ-opioidních receptorů vlivem dlouhodobé expozice morfiu.

Při použití 20 μM koncentrace GDP došlo opět ke zvýšení vazby [³⁵S]GTPγS vzhledem k basalu při stimulaci receptorů agonistou DAMGO (hodnoty basalu- 0,110 pmol/mg u CTR, 0,160 pmol/mg u MOR), nárůst je v obou případech o 0,02 pmol/mg proteinu. Přídavek samotného PGE1 prakticky nemá na vazbu vliv. Zajímavou skutečností

je, že došlo k dalšímu nárůstu vazby za současného působení DAMGO i PGE1 (z 0,110 na 0,140 pmol/mg, tedy o 0,03 pmol/mg v CTR), tím spíše, že k větší vazbě došlo ve vzorcích exponovaných morfiem (z 0,160 na 0,2 pmol/mg proteinu, tedy o 0,04 pmol/mg v MOR). Pro doplnění zhodnotíme výsledné hodnoty přepočtené na procenta basalu: DAMGO stimuluje opioidní receptor o 3% méně u MOR (o 16 % více vůči basalu) než u CTR (o 19 % více vůči basalu), pravděpodobně se jedná o výsledek desenzitizace μ -opioidních receptorů vlivem dlouhodobého působení morfia. U PGE1 pozorujeme také mírný nárůst stimulace vazby (o 5 % více u CTR vůči basalu, o 3 % více vůči basalu u MOR), přičemž u MOR došlo ke snížení vazby o 2 % vůči CTR. Současné působení obou ligandů zvyšuje vazbu o 26 % basalu u CTR a o 25% u MOR.

Zdá se, že PGE1 mírně potencuje účinek DAMGO ve vzorcích plasmatických membrán dlouhodobě vystavených účinkům morfia. Pro důsledné ověření této skutečnosti bude zapotřebí dalších experimentů, které jsme z časových důvodů již nemohli provést.

Otázkou je, jakým způsobem a proč k danému jevu dochází. Možným vysvětlením by mohla být teorie záměny G_i/G_o (které jsou v normálním stavu spřaženy s opioidními receptory) za G_s (tzv. *switch*) vlivem dlouhodobého působení morfia (73). Tak by mohlo docházet k stimulační reakci adenylcyklasy G-proteinem třídy G_s (73). K této reakci by mohla také přispívat podjednotka $G\beta\gamma$, pocházející z G-proteinu typu G_s , která interaguje s adenylcyklasou typu 2 a 4. Nicméně pro průkaznější tvrzení této teorie by bylo potřeba provést také dodatečné měření hladin cAMP.

6. ZÁVĚR

Cílem jednotlivých souborů experimentů v této práci bylo především studium vlivu opioidů, jmenovitě morfia, na opioidní receptory či Na,K-ATPasu a charakterizace schopnosti opioidních receptorů aktivovat trimerní G-proteiny typu G_i/G_o v předním mozku potkana po dlouhodobém působení této návykové látky. Studium opioidních membránových receptorů bylo prováděno pomocí vazby radioligandů. Vazba triciovaného ouabainu na Na,K-ATPasu byla použita jako ukazatel čistoty plasmatických membrán. Druhým používaným radioligandem byl [^{35}S]GTP γ S, který se váže na $G\alpha$ podjednotku G-proteinu namísto GTP. Díky [^{35}S]GTP γ S je možné studovat funkční aktivitu G-proteinu, neboť [^{35}S]GTP γ S není hydrolyzovatelný vnitřní GTPasovou aktivitou $G\alpha$ podjednotky G-proteinu. Práce se též zabývala optimalizací používané metodiky.

Získané výsledky lze shrnout do několika bodů:

1) Byla změřena saturační vazebná křivka [^3H]ouabainu v buněčném homogenátu mozkové tkáně potkana. Základní vazebné parametry tohoto markeru plasmatických membrán - B_{\max} (maximální počet vazebných míst) a K_d (rovnovážná disociační konstanta) byly určeny jednak přímým fitováním získaných dat (nelineární regrese) a jednak lineární regresí ze Scatchardova výnosu. Oba postupy výpočtu vedly k poměrně dobré shodě výsledků. Naše výsledky při zjišťování možnosti zvýšení výtěžnosti ouabainové vazby vedou k závěru, že optimální množství proteinů je 0,025 mg při celkovém objemu 100 μl vzorku v jedné zkumavce, vyšší množství proteinu vede ke snížení výtěžnosti vazby. Impregnace filtru GF/C 0,2 % polyethyleniminem nevede k významnějšímu zvýšení výtěžnosti ouabainové vazby.

2) Bylo zjištěno, že nedochází k žádným signifikantním změnám Na,K-ATPasy ve vzorcích plasmatických membrán mozku potkanů po předchozím dlouhodobém intraperitoneálním podávání morfia. Tato skutečnost byla prokázána stanovením vazby [^3H]ouabainu a srovnáním výsledných saturačních křivek změřených ve vzorcích membrán potkanů, jimž bylo podáváno morfium, se vzorky kontrolních zvířat.

3) Pomocí vazby [^{35}S]GTP γ S stimulované agonistou DADLE bylo změřen profil frakcí percollového gradientu buněk linie DOR-Gi. Z výsledků měření vyplývá, že plasmatické membrány jsou obsaženy téměř výlučně ve frakcích 8., 9., 10. a 11., což odpovídá předpokladu a potvrzuje správnost použité metody pro izolaci a purifikaci

plasmatických membrán z buněčného homogenátu. Z metodologického hlediska je vhodné odebírat frakce 6-12 po rozdělení na percollovém gradientu, pro minimalizaci ztrát a zajištění co nejvyššího výtěžku plasmatických membrán.

4) Pomocí vazby [³⁵S]GTPγS bylo zjištěno, že za přítomnosti 20μM GDP prostaglandin E1 mírně potencuje účinek DAMGO ve vzorcích cortexu potkanů dlouhodobě vystavených účinkům morfia. Toto zjištění podporuje teorii Wanga a Burnse (73, 74) o dlouhodobém působení morfia na opioidní receptory.

Seznam použité literatury

- 1) Nečas, O.: Struktura membrán, v knize Plasmatická membrána a buněčná funkce (Haškovec, C. a spol.), Academia, Praha, str. 43-62 (1978)
- 2) Kolektiv autorů: Biochemie Základní kurs, skriptum PŘF UK, Praha, str. 178-180 (2005)
- 3) Alberts, B. a kol.: Struktura membrán, v knize Základy buněčné biologie, Espero Publishing, Ústí nad Labem, překlad z angl. originálu Essential cell Biology, Garland Publishing Inc., New York, str. 347- 369 (1998)
- 4) Singer, S. J.: The molecular organization of biological membranes, v knize Structure and function of biological membranes (Rothfield, L. I.), Academic Press, New York-London, str. 146-222, (1971)
- 5) Singer, S. J., Nicolson, G. L.: Science 175, 720-731 (1972)
- 6) Bretscher, M S., Raff, M. C.: Nature 258, 43-49 (1975)
- 7) Haškovec, C: Plasmatická membrána a příjem informačních signálů z prostředí, v knize Plasmatická membrána a buněčná funkce (Haškovec, C. a spol.), Academia, Praha, str. 111-120 (1978)
- 8) Hynie, S., Klenerová, V.: Psychiatrie 6, 15-20 (2002)
- 9) Marinnisen, M J., Gutkind, J. S.: Trends Pharmacol Sci 22, 368-376 (2001)
- 10) Lefkowitz, R. J.: Trends Pharmacol Sci 25, 413-422 (2004)
- 11) Tae, H. J., Grossmann, M., Inhae, J.: J Biol Chem 273, 17299-17302 (1998)
- 12) Alberts, B. a kol.: Komunikace mezi buňkami, v knize Základy buněčné biologie, Espero Publishing, Ústí nad Labem, překlad z angl. originálu Essential cell Biology, Garland Publishing Inc., New York, str. 482-511 (1998)
- 13) Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J.: Nat Rev Moll Cell Biol 3, 639-650 (2002)
- 14) Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M.: Science 289, 739-745 (2000)
- 15) Milligan, G.: Mol Pharmacol 66, 1-7 (2004)
- 16) Devi, L. A.: Trends Pharmacol Sci 22, 532-537 (2001)
- 17) Fišar, Z. a kol.: Psychostimulancia, v knize Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie, Grada Publishing, Havlíčkův Brod, str. 186-188 (2009)

- 18) Novotná, R.: Molekulární neurobiologie, skriptum PŘF UK, Praha, str. 160-170 (1994)
- 19) Bouřová, L., Kostrnová, A., Hejnová, L., Moravcová, Z., Moon, H.E., Novotný, J., Milligan, G., Svoboda, P.: *J Neurochem* 85, 34-49 (2003)
- 20) Novotný, J.: Fyziologické regulace transmembránových signálních systémů řízených primárními G-proteiny, Teze doktorské disertační práce, Fyziologický ústav AV ČR, Praha, str. 19-23 (2005)
- 21) Sim, L. J., Selley, D. E., Dworkin, S. I., Childers, S. R., *J Neurosci* 16, 2684-2692 (1996)
- 22) Bouřová, L., Vošahlíková, M., Kagan, D., Novotný, J., Svoboda, P: *Med Sci Monit* 16, 260-270 (2010)
- 23) Durchánková, D: Úloha palmitoylace v signalizaci zprostředkované G-proteiny třídy $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ a její vliv na lokalizaci $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$ v buněčné membráně, Doktorská disertační práce, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, Praha, str. 36-38, (2007)
- 24) Gintzler, A. R., Chakrabarti, S.: *Neurobiol* 21, 21-33 (2001)
- 25) Crain, S. M., Shen, K. F.: *Brain Res* 575, 13-24 (1992)
- 26) Crain, S. M., Shen, K. F.: *Pain* 84, 121-131 (2000)
- 27) Wang, H. Y., Friedman, E., Olmstead, M. C., Burns, L. H.: *Neuroscience* 135, 247-261 (2005)
- 28) Wang, H. Y., Burns, L. H.: *J Neurobiol* 66, 1302-1310 (2006)
- 29) Sharma, S. K., Nirenberg, M., Klee, W. A.: *Proc Nat Acad Sci USA* 72, 590-594 (1975)
- 30) Dascal, N.: *Trends Endocrinol Metab* 12, 391-398 (2001)
- 31) Stöhr, J.: G proteiny a adenylylcykláza v mozkové kůře potkana během ontogeneze, Doktorandská dizertační práce, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, Praha, str. 19-30 (2007)
- 32) Hall, A.: *Science* 249, 635-640 (1990)
- 33) Sprang, S. R.: *Annu Rev Biochem* 66, 639-678 (1997)
- 34) Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Krans, H. M.: *J Biol Chem* 246, 1877-1882 (1987)
- 35) Helmreich, E. J., Hofmann, K. P.: *Biochim Biophys Acta* 1286, 285-322 (1996)
- 36) Morris A. J., Malbon, C. C.: *Physiol Rev* 79, 1373-1430 (1999)
- 37) Neubig, R. R., Siderowski, D. P.: *Nat Rev Drug Discov* 1, 187-197 (2002)

- 38) Svoboda, P., Teisinger, J., Novotný, J., Bouřová, L., Drmota, T., Hejnová, L., Moravcová, Z., Lisý, V., Rudajev, V., Stöhr, J., Vokurková, A., Švandová, I., Durchánková, D.: *Physiol Res* 53, 141-152 (2004)
- 39) Fišar, Z. a kol.: Nitrobuněčný přenos signálu, v knize Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie, Grada Publishing, Havlíčkův Brod, str. 111-135 (2009)
- 40) Simon, M. I., Strathmann, M P., Gautam, N.: *Science* 252, 802-808 (1991)
- 41) Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X. N., Amatruda, T. T., Korenberg, J. R., Trask, B. J., de Jong, P., Reed R. R., Simon, M. I.: *Nat Genet* 1, 85-91 (1992)
- 42) Yokoyama, S., Starmer W. T.: *J Mol Evol* 35, 230-238 (1992)
- 43) Hinton, D. R., Blanks, J. C., Fong, H. K., Casey, P. J., Hildebrandt, E., Simons, M. I.: *J Neurosci* 10, 2763-2770 (1990)
- 44) Hepler, J. R., Kozasa, T., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C., Gilman, A. G.: *J Biol Chem* 268, 14367-14375 (1993)
- 45) Kozasa, T., Hepler, J. R., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C., Gilman, A. G.: *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9176-9180 (1993)
- 46) Dhanasekaran, N., Prasad, M V., Wadsworth, C. J., Dermott, J. M., van Rossum, G.: *J Biol Chem* 269, 11802-11806 (1994)
- 47) Krupinsky, J., Lehman, T. C., Frankenfield, C. D., Zwaagstra, J. C., Watson, P. A.: *J Biol Chem* 267, 24858-24862 (1992)
- 48) Sunahara, R. K., Taussig, R.: *Mol Interv* 2, 168-184 (2002)
- 49) Chern, Y.: *Cell Signal* 12, 195-204 (2000)
- 50) Jones, D. T., Masters, S. B., Bourne, H. R., Reed, R. R.: *J Biol Chem* 265, 2671-2676 (1990)
- 51) Klemke, M., Pasolli, H. A., Kehlenbach, R. H., Offermanns, S., Schultz, G., Huttner, W. B.: *J Biol Chem* 275, 33633-33640 (2000)
- 52) Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J. A., Gilman, A. G.: *Science* 261, 218-221 (1993)
- 53) Taussig, R., Tang, W. J., Hepler, J R., Gilman, A. G.: *J Biol Chem* 269, 6093-6100 (1994)
- 54) Gao, B. N., Gilman, A. G.: *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10178-10182 (1991)
- 55) Tang, W. J., Gilman, A. G.: *Science* 254, 1500-1503 (1991)
- 56) Taussig, R., Quarmby, L. M., Gilman, A. G.: *J Biol Chem* 268, 9-12 (1993)

- 57) Teisinger, J.: Chemická modifikace sodno-draselné ATPasy, korelace mezi strukturou a funkcí: Kandidátská disertační práce, Fyziologický ústav AV ČR, Praha, str. 2-10 (1991)
- 58) Novotná, R.: Molekulární neurobiologie, skriptum PŘF UK, Praha, str. 84-87 (1994)
- 59) Shull, G. E., Greeb, J., Lingrel, J. B.: *Biochemistry* 25, 8125-8132 (1986)
- 60) Herrera, V. L. M., Emanuel, J. R., Ruiz-Opazo, N., Levenson, R., Nadal-Ginard, B.: *J Cell Biol* 105, 1855-1865 (1987)
- 61) Orłowski, J., Lingrel, J. B.: *J Biol Chem* 263, 10436-10442 (1988)
- 62) Takeyasu, K., Lemas, V., Fambrough D. M.: *Am J Physiol* 259, 619-630 (1990)
- 63) Blanco, G., Melton, R. J., Sanchez, G., Mercer, R. W.: *Biochemistry* 38, 13661-13669 (1999)
- 64) Geering, K., Beggah, A., Good, P. a spol.: *J Cell Biol* 133, 1193-1204 (1996)
- 65) Shull, G. E., Lane, L. K., Lingrel, J. B.: *Nature* 321, 429-431 (1986)
- 66) Orłowski, J., Lingrel, J. B.: *J Biol Chem* 263, 10436-10442 (1988)
- 67) Martin-Vasalo, P., Dackowski, W., Emanuel, J. R., Levenson, R.: *J Biol Chem* 264, 4613-4618 (1989)
- 68) Shyjan, A. W., Levenson, R.: *Biochemistry* 28, 4531- 4535 (1989)
- 69) Malik, N., Canfield, V. A., Beckers, M. C., Gros, P., Levenson, R.: *J Biol Chem* 271, 22754- 22758 (1996)
- 70) Svoboda, P.: *Chem listy* 77, 257-275 (1983)
- 71) Bouřová, L., Stöhr, J., Lisý, V., Rudajev, V., Novotný, J., Svoboda, P.: *Med Sci Monit* 15, 111-122 (2009)
- 72) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J Biol Chem* 193, 265- 275 (1951)
- 73) Svoboda, P., Amler, E., Teisinger, J.: *J Membr Biol* 104, 211-221 (1988)
- 74) Fong, C. W., Bahia, D. S., Rees, S., Milligan, G.: *Mol Pharmacol* 54, 249-257 (1998)
- 75) Fong, C.W., Milligan, G.: *Biochem J* 342, 457-463 (1999)
- 76) Li, L., Wright, S. J., Krystofova, S., Park, G., Borkovich, K. A.: *Annu Rev Microbiol* 61, 423-452 (2007)
- 77) Rasmussen, S. G. F., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., Kobilka, B. K.: *Nature* 450, 383-387 (2007)

