

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



**Beta-adrenergní signalizace v myokardu potkana při dlouhodobém  
podávání morfinu**

**Beta-adrenergic signaling in the rat myocardium under long-term morphine treatment**

**Radka Moravcová**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Novotný DSc.

Praha 2013

## **Prohlášení**

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

V Praze, 6.5.2013

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému DSc. za odborné metodické vedení diplomové práce a za cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu z laboratoře za zodpovězení nesčetných dotazů a za vytvoření velmi příjemného prostředí pro uskutečnění této práce. Velké poděkování patří také celé mé rodině, a to nejen za pochopení a podporu při sepisování této práce, ale i během celého studia.

## 1. Abstrakt

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv nízkých dávek (0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 1 mg/kg na den po dobu 28 dní + 7 dní abstinence) a vysokých dávek (10 mg/kg na den po dobu 10 dní) morfinu na signalizaci, která je zprostředkována receptory spřaženými s G-proteiny (GPCRs) v myokardu potkana. Mezi významné receptory z této skupiny patří opioidní receptory (OR) a hlavně  $\beta$ -adrenergní receptory ( $\beta$ -AR).

Nejpočetnějšími OR v srdeční tkáni jsou  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR. Výsledky studie těchto dvou OR v této diplomové práci naznačují, že v myokardu po ovlivnění morfinem nedochází k významným změnám v expresi  $\delta$ -OR ani  $\kappa$ -OR při podání žádné ze studovaných dávek.

Srdeční tkáň obsahuje všechny tři dosud známé typy  $\beta$ -AR ( $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR a  $\beta_3$ -AR). Důraz byl v diplomové práci kladen hlavně na studium exprese  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR, neboť bylo zjištěno, že právě tyto dva podtypy  $\beta$ -AR se podílejí na většině signalizačních drah ovlivňujících kardiovaskulární systém. Použitím techniky imunoblotu nebyly nalezeny žádné výraznější změny v expresi  $\beta_1$ -AR a exprese  $\beta_2$ -AR se poněkud snížila po použití dávky 10 mg/kg po dobu 10 dní. Senzitivnější saturační vazebné pokusy s použitím neselektivního  $\beta$ -antagonisty [ $^3$ H]CGP 12177 odhalily významný nárůst specifické vazby při podání morfinu v dávce 1 mg/kg/den po dobu 28 dní a po následné 7-denní abstinenci byl detekován naopak významný pokles. Signalizace těchto dvou podtypů receptorů se liší na úrovni G-proteinů. Zatímco  $\beta_1$ -AR působí svůj účinek pouze přes  $G_{\alpha_s}$  proteiny,  $\beta_2$ -AR se mohou spřahovat i s pertusis toxin citlivými  $G_{\alpha_i}$  proteiny. Při detekci  $G_{\beta}$ ,  $G_{\alpha_{i1/2}}$ , a  $G_{\alpha_{q/11}}$  proteinů nebyla nalezena žádná významná změna v jejich expresi působením morfinu, pouze u  $G_{\alpha_{i3}}$  podjednotky došlo ke zvýšení exprese.

Pomocí čtyř různých solubilizačních činidel (Triton X-100, CHAPS, cholát sodný, uhličitan sodný) se podařilo izolovat membránové mikrodomény. Ve vzorcích tkáně kontrolních zvířat i u zvířat po podání morfinu (10 mg/kg/den) byla pozorována výrazně odlišná membránová lokalizace  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR. Zatímco  $\beta_1$ -AR byly přítomny jak v supernatantu (solubilizované proteiny) tak v peletě (lipidové rafty),  $\beta_2$ -AR byly přítomny téměř výhradně v peletě.

**Klíčová slova:**  $\beta$ -adrenergní receptor, G-protein, GPCRs, morfin

## 2. Abstract

The aim of this dissertation was to evaluate the effect of low doses (0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 1 mg/kg per day for 28 days + 7 days of abstinence) and high doses (10 mg/kg per day for 10 days) of morphine on transmembrane signaling mediated by G-protein coupled receptors (GPCRs) in the rat myocardium. Opioid receptors (OR) and mainly  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) belong to the most important receptors of this receptor family.

$\delta$ -OR and  $\kappa$ -OR are the most numerous OR in the myocardium. Results of the present work indicated that there are no significant changes in the expression of these two receptor subtypes after any studied doses of morphine.

There are three subtypes of  $\beta$ -AR ( $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR and  $\beta_3$ -AR) represent in the myocardial tissue. Here we studied the expression of  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR, because these two major subtypes of  $\beta$ -AR regulate through their signaling pathways functioning of the cardiovascular system. Our immunoblot analysis did not reveal any changes in the expression of  $\beta_1$ -AR, but the expression of  $\beta_2$ -AR was significantly decreased after treatment with morphine at the dose of 10 mg/kg for the 10 days. More sensitive saturation binding experiments with the nonselective  $\beta$ -antagonist [ $^3$ H]CGP 12177 indicated a significant increase in specific binding after treatment with morphine (1 mg/kg/day for 28 days) and, by contrast, there was a marked decrease after 7 days of drug withdrawal.  $\beta$ -AR are known to differ in their coupling to G-proteins. While  $\beta_1$ -AR exert their effect only through  $G\alpha_s$  proteins,  $\beta_2$ -AR can additionally couple to pertussis toxin sensitive  $G\alpha_i$  proteins. We did not observe any significant change in the expression of  $G\beta$ ,  $G\alpha_{i1/2}$ , and  $G\alpha_{q/11}$  proteins in samples after morphine exposure, but  $G\alpha_{i3}$  subunit was increased.

We succeeded to isolate detergent-resistant microdomains (DRMs) by four different solubilizing agents (Triton X-100, CHAPS, sodium cholate, sodium carbonate). Tissue samples of control animals and those treated with morphine (10 mg/kg/day) showed different membrane localization of  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR. Whereas  $\beta_1$ -AR were present in the supernatant (solubilized proteins) as well as in the pellet (DRMs),  $\beta_2$ -AR were present almost exclusively in DRMs.

**Keywords:**  $\beta$ -adrenergic receptor, G-protein, GPCRs, morphine

### 3. Obsah

1. Abstrakt a klíčová slova .....	1
2. Abstract and keywords .....	2
3. Obsah .....	3
4. Seznam zkratk .....	5
5. Úvod .....	7
6. Literární přehled .....	8
6.1 Heterotrimerní G-proteiny .....	8
6.2 Receptory spřažené s G-proteiny .....	10
6.2.1 Signalizace přes receptory spřažené s G-proteiny .....	11
6.2.2 Regulace G-proteinové signalizace .....	13
6.2.3 Opioidní receptory .....	15
6.2.4 Adrenergní receptory .....	15
6.3 Adrenergní signalizace v myokardu .....	16
6.4 Morfin a jeho působení na GPCRs signalizaci .....	19
7. Cíle diplomové práce .....	22
8. Materiál a metody .....	23
8.1 Laboratorní zvířata .....	23
8.2 Homogenizace a frakcionace myokardu .....	23
8.2.1 Roztoky .....	23
8.2.2 Pracovní postup .....	24
8.3 Stanovení proteinů .....	25
8.3.1 Roztoky .....	25
8.3.2 Pracovní postup .....	25
8.4 SDS-PAGE elektroforéza .....	26
8.4.1 Roztoky .....	26
8.4.2 Pracovní postup .....	27
8.5 Western blotting a imunodetekce .....	29
8.5.1 Roztoky .....	29
8.5.2 Pracovní postup .....	29
8.6 Analýza dat .....	30
8.7 Vazebné pokusy .....	31
8.7.1 Roztoky .....	31
8.7.2 Pracovní postup .....	31

9. Výsledky .....	34
9.1 Studium exprese GPCRs, G-proteinů a AC V/VI v myokardu potkana pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blottingu .....	34
9.2 Studium exprese $\beta_1$ - a $\beta_2$ -AR a $\beta$ -arrestinu v membránových mikrodoménách v kontrolních vzorcích myokardu potkana a ve vzorcích po podání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg/den) pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blottingu .....	43
9.3 Stanovení množství a afinity $\beta$ -AR ve vzorcích postnukleárního supernatantu (PNS) a porovnání vazby $\beta$ -AR v plazmatických membránách kontrolních vzorků myokardu a vzorků plazmatických membrán ovlivněných morfinem za pomoci specifického radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177 .....	49
10. Diskuse .....	52
11. Závěr .....	57
12. Literatura .....	58

#### 4. Seznam zkratek

AC	adenylyl cyclase	adenylylcykláza
AGS	receptor-independent activators of G-protein signaling	aktivátory G-proteinové signalizace
AKAP	A-kinase anchor protein	A-kinázu vážící protein
AP-2	AP2 adaptor protein	klatrinový adaptorový protein 2
ARF 6	ADP-ribosylation factor 6	ADP-ribosylační faktor 6
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenergic receptor	$\beta$ -adrenergní receptor
cAMP	cyclic 3',5'-adenosine monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	central nervous system	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol	diacylglycerol
$\delta$ -OR	delta opioid receptor	delta opioidní receptor
ECM	extracellular matrix	extracelulární matrix
GABA	gamma-aminobutyric acid	kyselina gama-aminomáselná
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor	inhibitory disociace GDP
GDP	guanosine-5'-diphosphate	guanosindifosfát
GEF	guanine nucleotide exchange factor	výměnný faktor guaninových nukleotidů
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
G-proteiny	heterotrimeric G-proteins	heterotrimerní vazebné proteiny guaninových nukleotidů
GPCRs	G-protein-coupled receptors	receptory spřažené s G-proteiny
GRKs	G-protein-coupled receptor kinases	kinázy receptorů spřažených s G-proteiny
GTP	guanosine-5'-triphosphate	guanosintrifosfát
GTPáza	GTP hydrolase enzyme	GTP fosfohydroláza
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin	5-hydroxytryptamín, serotonin
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate	inositoltrifosfát
kDa	kilodalton	kilodalton
$\kappa$ -OR	kappa opioid receptor	kappa opioidní receptor



MAGI-2	membrane-associated guanylate kinase inverted-2 protein	membránově vázaná guanylátkináza 2 obsahující PDZ a WW (2 tryptofany obsahující) domény
mito-K <sub>ATP</sub>	mitochondrial ATP-sensitive potassium channel	mitochondriální ATP-dependentní draslíkový kanál
μ-OR	mu opioid receptor	mu opioidní receptor
NDPK	nucleoside diphosphate kinase	nukleosiddifosfát kináza
NHERF	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor	regulační faktor Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> výměníku
OR	opiod receptors	opiodní receptory
ORL-1	opiod receptor-like 1 receptor	receptor typu 1 podobný opiodním receptorům
PDZ motiv	PSD-95/disc large/ZO-1 homology domain	PSD-95/disc large/ZO-1 homologní doména
PI3K	phosphoinositide-3-kinase	fosfoinositol-3-kináza
PKA	cAMP-dependent protein kinase	proteinkináza A
PKB (Akt)	protein kinase B	proteinkináza B
PKC	protein kinase C	proteinkináza C
PLB	phospholamban	fosfolamban
PLC	phospholipase C	fosfolipáza C
PSD-95	post-synaptic density 95	protein postsynaptické density 95 kDa
RGS	regulators of G-protein signaling	regulátory G-proteinové signalizace
Rho	small signaling G-protein	monomerní G-protein
SERCA pumpa	sarcoplazmic/endoplazmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase pump	Ca <sup>2+</sup> ATPázová pumpa sarkoplazmatického retikula

## 5. Úvod

Je velmi dobře známo, že morfin je schopný svým působením přes příslušné receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) ovlivňovat G-proteinovou signalizaci a tím i aktivitu adenylycyklázy, ústředního enzymu tvorby cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). cAMP má v buňce mnoho významných signalizačních funkcí; účastní se například ovlivňování metabolismu glukózy, učení, paměti a buněčného růstu.

Jedním z nejrozšířenějších a nejdůležitějších buněčných GPCRs je  $\beta$ -adrenergní receptor ( $\beta$ -AR), který hraje významnou roli nejen v regulaci kardiovaskulárního systému, ale také například v mobilizaci zásobního tuku, zvýšení jaterní glykogenolýzy a glukoneogeneze. Dosud neexistuje mnoho informací týkajících se možného účinku morfinu na srdeční  $\beta$ -ARs. Ve své práci jsem se proto zabývala tím, jak působí podávání nízkých či vysokých dávek morfinu na myokard potkana. V myokardu se exprimují hlavně podtypy  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -AR. Existuje řada důkazů, že tyto dva podtypy receptorů mohou ovlivňovat odlišné signalizační dráhy, a mohou se lišit již svými interakcemi s G-proteiny. Byla prokázána i rozdílná lokalizace  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -AR v rámci buněčné membrány. Porozumění  $\beta$ -AR signalizaci je velmi důležité, neboť tato signalizace patří mezi jeden z klíčových regulačních systémů srdce a své uplatnění má i při regulaci srdečních arytmií či při srdečním selhání.

## 6. Literární přehled

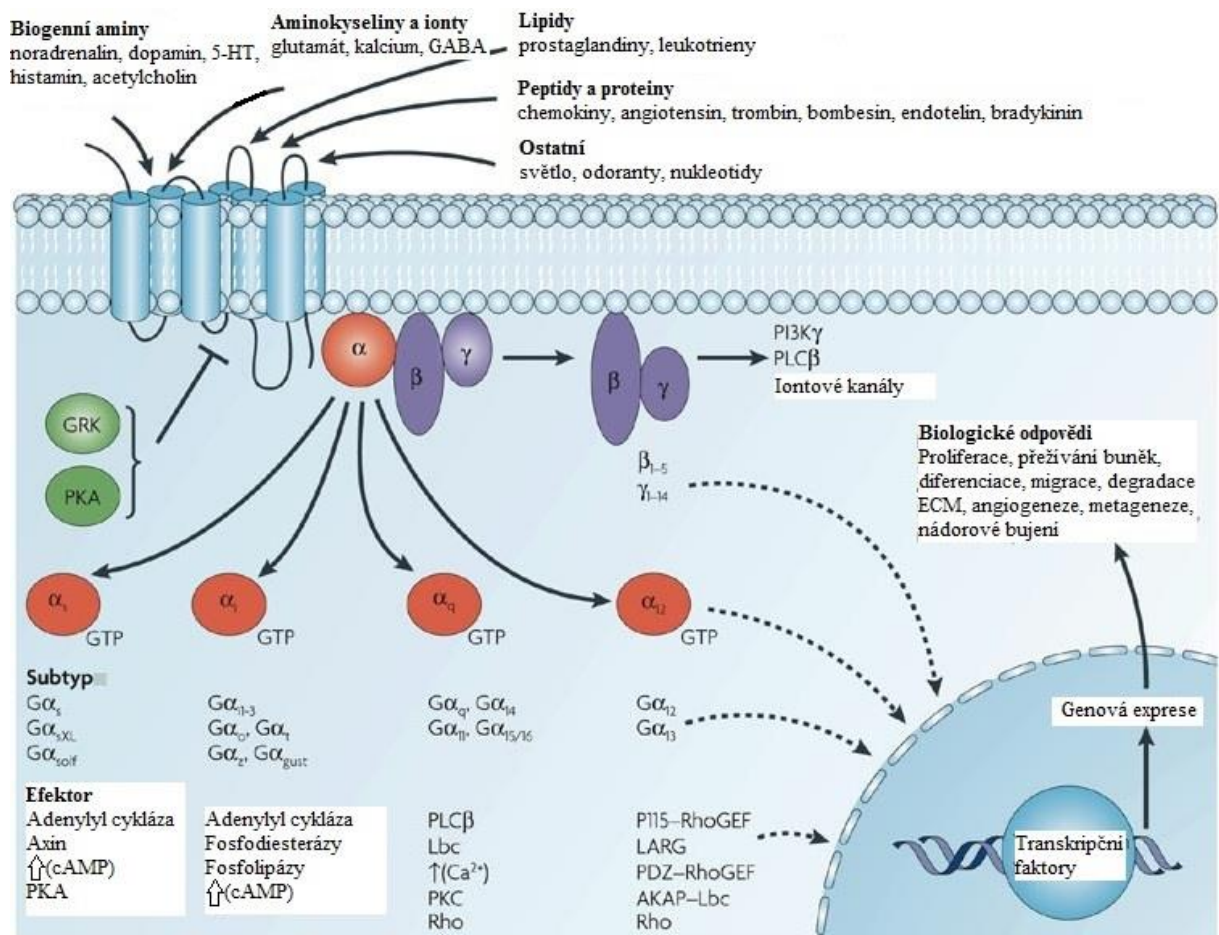
### 6.1 Heterotrimerní G-proteiny

Heterotrimerní vazebné proteiny guaninových nukleotidů, zkráceně G-proteiny, fungují jako transduktory signálů v buňce. Přenášejí signál z obrovské škály receptorů na efektorové systémy. Efektorovými systémy mohou být například iontové kanály nebo enzymy, které mění rychlost produkce, výlevu nebo degradace intracelulárních druhých posílů (například cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), inositoltrifosfát (IP<sub>3</sub>)). Tyto regulační proteiny byly identifikovány teprve v 70. letech 20. století (Milligan and Kostenis, 2006).

Heterotrimerní G-proteiny se skládají ze tří různých podjednotek –  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Ke každé z těchto podjednotek existuje několik isoform. Například bylo identifikováno 16 genů pro  $\alpha$  podjednotky, 5 pro  $\beta$  podjednotky a 11 genů pro  $\gamma$  podjednotky G-proteinů. Některé z těchto proteinů mají ještě navíc různé sestřihové varianty nebo jsou různě modifikovány. Kdyby všechny možné kombinace podjednotek G-proteinů vedly ke vzniku funkčního heterotrimeru, bylo by tak možno rozlišit více než 1000 variant G-proteinů. Zdá se, že podjednotková heterogenita hraje důležitou roli jak ve formování funkčního trimeru, tak v signalizaci heterotrimerních G-proteinů (Hildebrandt, 1997).

#### G $\alpha$ podjednotky

Alfa podjednotky heterotrimerních G-proteinů jsou proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 39-52 kDa. V dnešní době je známo asi 20  $\alpha$  podjednotek G-proteinů, přičemž 16 z nich jsou produkty různých genů a zbytek představují jejich sestřihové varianty. Alfa podjednotky byly rozděleny na základě podobnosti aminokyselinové sekvence do čtyř tříd (Obr. 1). Třídy byly označeny následovně:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$  a  $\alpha_{12}$  a  $\alpha_{13}$ . G $\alpha_s$  podjednotky byly pojmenovány podle své schopnosti stimulovat adenylylcyklázu (AC), do této třídy patří podjednotky  $\alpha_s$  a  $\alpha_{olf}$ . Naproti tomu podjednotky patřící do třídy  $\alpha_i$  byly nazvány podle schopnosti prvního z jejich členů inhibovat aktivitu AC. Tato třída zahrnuje podjednotky  $\alpha_{i-1}$ ,  $\alpha_{i-2}$ ,  $\alpha_{i-3}$ ,  $\alpha_o$ ,  $\alpha_t$ ,  $\alpha_{t2}$  a  $\alpha_z$ . Podjednotky ze třídy  $\alpha_q$  aktivují fosfolipázu C (PLC) a řadí se sem  $\alpha_q$ ,  $\alpha_{11}$  a  $\alpha_{16}$ . Poslední třída je tvořena podjednotkami  $\alpha_{12}$  a  $\alpha_{13}$  a o jejich funkci se toho ještě stále mnoho neví. Podjednotky G $\alpha_t$  a G $\alpha_{olf}$  jsou vysoce buněčně specifické, ostatní G $\alpha$  podjednotky jsou široce exprimovány ve všech buněčných typech (Neer, 1994; Neves et al., 2002).



Obr. 1: Třídy  $\alpha$  podjednotek G-proteinů, jejich podtypy a efektorové molekuly. Nejrůznější ligandy používají receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) ke stimulaci membránových, cytoplasmatických i jaderných molekul (upraveno podle Dorsam and Gutkind, 2007).

Vysvětlivky: 5-HT = 5-hydroxytryptamín, GABA = kyselina gama-aminomáselná, PI3K = fosfoinositol-3-kináza, PLC = fosfolipáza C, GRK = kináza GPCRs, PKA nebo PKC = protein kináza A nebo C, RhoGEF (p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF, a LARG) = výměnný faktor guaninových nukleotidů pro Rho (malá GTPáza), AKAP = protein kotvící A-kinázu, ECM = extracelulární matrix.

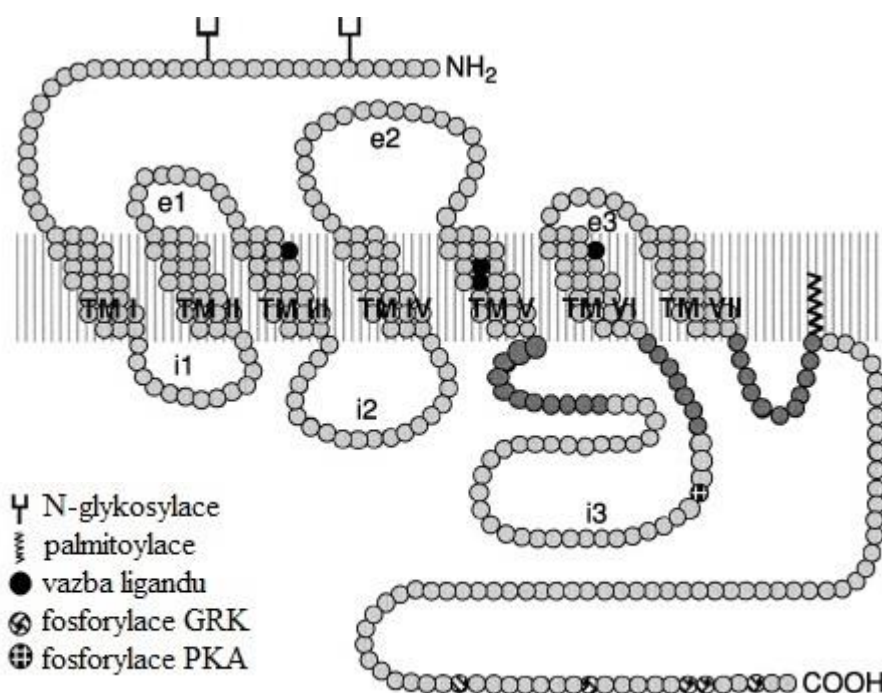
### G $\beta\gamma$ podjednotky

Podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$  spolu tvoří funkční komplexy. Tyto dimery mají po disociaci od  $\alpha$  podjednotky v buňce srovnatelnou roli při signalizaci jako  $\alpha$  podjednotky. Bylo popsáno přinejmenším 5  $\beta$  a 12  $\gamma$  podjednotek G-proteinů, ne všechny jejich kombinace však v buňkách mohou vznikat (Milligan and Kostenis, 2006). Mezi efektory G $\beta\gamma$  podjednotek patří především fosfoinositol-3-kináza (PI3K), některé izofomy AC, PLC, vápníkové kanály a kinázy receptorů spřažených s G-proteiny (GRKs) (Salazar et al., 2007).

## 6.2 Receptory spřažené s G-proteiny

Rodina receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs) se nachází pouze u eukaryot a obsahuje konzervovanou strukturu 7 transmembránových  $\alpha$ -helixů (Rockman et al., 2002). V lidském genomu bylo identifikováno více než 1000 typů receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs). Většina z nich jsou receptory senzorké, například chuťové nebo olfaktorické receptory. Přibližně 400 až 500 z GPCRs rozpoznává nonsenzorké ligandy, jako jsou různé hormony, neurotransmitery či parakrinní faktory. Pro více než 200 GPCRs jsou známy endogenní ligandy (Wettschureck and Offermanns, 2005).

Na molekulární úrovni všechny GPCRs sdílejí stejnou architekturu (Obr. 2). Jeden polypeptidový řetězec tvoří v membráně 7  $\alpha$ -helikálních transmembránových domén, spojených 3 extracelulárními a 3 intracelulárními smyčkami. N-konec se nachází v extracelulárním prostoru, naproti tomu C-konec je v cytosolu (Tikhonova and Costanzi, 2009). Nejvýznamnější rozdíly ve struktuře GPCRs se nacházejí v místech vazby ligandu a v oblastech extracelulárních smyček (Rosenbaum et al., 2009).



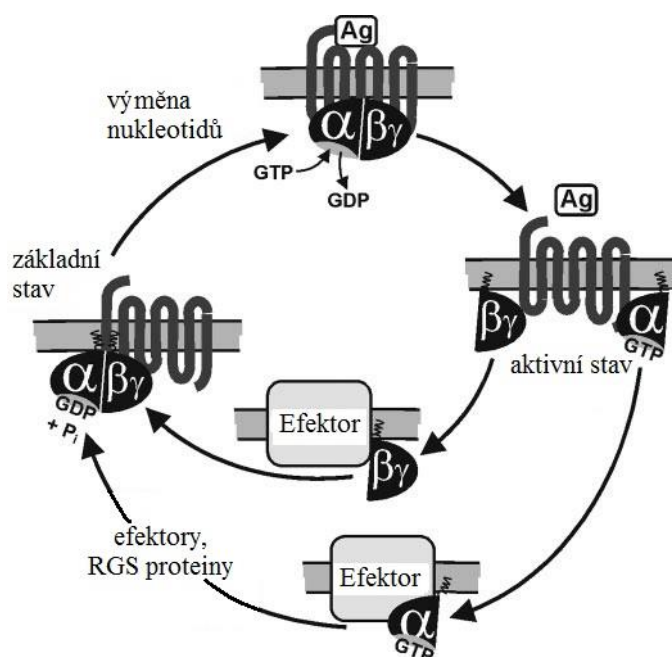
Obr. 2: Struktura receptorů spřažených s G-proteiny. Předpokládané znázornění heptahelikální struktury  $\beta_2$ -AR. Sedm transmembránových domén (TM I – TM VII) je propojeno 3 extracelulárními (e1-3) a 3 intracelulárními (i1-3) smyčkami. Uvedeny jsou také přibližné pozice posttranslačních modifikací, N-glykosylace na extracelulárním N-konci a palmitoylace na intracelulárním C-konci. Znázorněny jsou i části řetězce, které se účastní vazby ligandu (např. adrenalinu) a předpokládaná místa fosforylace PKA a GRK (upraveno podle Gesty-Palmer and Luttrell, 2004).

Každý receptor může mít různý počet konformačních stavů, které jsou stabilizovány v závislosti na typu navázaného ligandu a jeho účinnosti. Poněkud odlišným způsobem ovlivňuje daný receptor plný agonista, jiným parciální či inverzní agonista. Také vazba strukturně odlišných agonistů na tentýž receptor může znamenat vznik různých konformačních stavů daného receptoru, neboť dojde k rozrušení odlišných nekovalentních intramolekulárních interakcí ve struktuře receptoru (Kobilka and Deupi, 2007).

GPCRs hrají klíčovou roli v signální transdukcii v srdci. Slouží jako cíle pro mnoho látek používaných pro léčbu kardiovaskulárních chorob. Z těchto receptorů jsou v srdci důležité zejména adrenergní a cholinergní muskarinové receptory, neboť se účastní homeostatické regulace kardiovaskulárního systému (Rockman et al., 2002).

### **6.2.1 Signalizace přes receptory spřažené s G-proteiny**

Dráhy zahrnující aktivaci G-proteinů představují nejrozšířenější způsob signalizace u savců. Serpentinový receptor je aktivován extracelulárním podnětem, a díky konformační změně tohoto receptoru je signál dále přenesen na heterotrimerní G-proteiny (Engelhardt and Rochais, 2007). Aby byly aktivované receptory s efekty dynamicky propojeny, podstupují heterotrimerní G-proteiny cyklus aktivace a deaktivace (Wettschureck and Offermanns, 2005). V inaktivním stavu je na  $\alpha$  podjednotce G-proteinu navázáno GDP a tato podjednotka je spojena s  $\beta\gamma$  komplexem. Po konformační změně GPCR dochází na  $\alpha$  podjednotce příslušného G-proteinu k výměně GDP za GTP, čímž dojde k aktivaci tohoto G-proteinu a následné disociaci  $\alpha$  podjednotky a  $\beta\gamma$  dimeru. Jak  $\alpha$  tak  $\beta\gamma$  podjednotky poté aktivují rozličné signalizační kaskády. Jelikož  $\alpha$  podjednotka G-proteinů je GTPáza, následně rychle iniciuje svou vlastní deaktivaci prostřednictvím hydrolýzy GTP (Obr. 3). Právě cyklus aktivace a deaktivace G-proteinů je předmětem regulace prostřednictvím proteinů z rodiny RGS (regulátory G-proteinové signalizace), které zvyšují GTPázovou aktivitu  $\alpha$  podjednotky a tím negativně regulují signalizaci (Engelhardt and Rochais, 2007).



Obr. 3: Mechanismus působení G-proteinů. Navázáním agonisty (Ag) na receptor dojde k výměně GDP za GTP na  $\alpha$  podjednotce G-proteinu a následnému rozpadu G-proteinu na  $\alpha$  podjednotku a  $\beta\gamma$  dimer. Tyto podjednotky ovlivňují funkci různých efektorových molekul. Samovolná hydrolýza GTP na GDP může být urychlena pomocí různých efektorů a proteinů regulujících G-proteinovou signalizaci (RGS).  $G\alpha$  podjednotka s GDP pak znovu reasociuje s  $G\beta\gamma$  dimerem (upraveno podle Wettschureck and Offermanns, 2005).

### Aktivace G-proteinů nezávisle na aktivaci GPCRs

Všeobecně je uznáván způsob aktivace G-proteinů prostřednictvím aktivovaných GPCRs, ale existují i práce, které dokazují, že G-proteiny mohou být v určité míře aktivovány i nezávisle na aktivaci GPCRs. Skupina proteinů, které dokáží aktivovat G-proteiny nezávisle na GPCRs, byla nazvána termínem aktivátory G-proteinové signalizace (AGS proteiny). Tyto proteiny přímo interagují jak s  $\alpha$  podjednotkami G-proteinu, tak s  $\beta\gamma$  dimery, čímž jsou schopny zahájit G-proteinovou signalizaci nezávisle na aktivaci GPCRs a jako partneři podjednotek G-proteinů zastávat rozmanité funkce související s buněčným dělením, diferenciací a strukturou organel (Engelhardt and Rochais, 2007).

Na základě mechanismu, kterým AGS aktivují G-proteiny, byly tyto proteiny rozděleny do 3 skupin. Skupina I je tvořena pouze proteinem AGS1, který působí aktivaci G proteinů shodně s GPCRs, funguje tedy jako guanin nukleotid výměnný faktor (GEF). Pro skupinu II (AGS3-6) je charakteristická přítomnost G-proteinového regulačního motivu (GPR motiv), který stabilizuje konformaci  $G\alpha$  s navázaným GDP, funguje tedy jako inhibitor disociace podjednotek G-proteinů (GDI). Členové skupiny III (AGS2,7,8) na rozdíl

od předchozích dvou skupin interagují výhradně s G $\beta\gamma$  dimery. Úloha AGS7 a 8 nebyla ještě stanovena, zatímco AGS2 nejspíše reguluje funkci molekulárního motoru dyneinu (Blumer et al., 2005; Blumer et al., 2007).

Další způsob aktivace heterotrimerních G-proteinů je uskutečňován prostřednictvím fosforylace histidinu 266 na G $\beta$  podjednotce pomocí nukleosiddifosfátkinázy B (NDPK B). Tento enzym přenáší fosfát z nukleotridifosfátu, především z ATP, přes histidin 118 ve své struktuře na histidin 266 ve struktuře G $\beta$  podjednotky. Následně je přenesen vysoce energetický fosfát na GDP, dochází tak k lokálnímu utváření GTP, které se váže na příslušné G $\alpha$  podjednotky a tím je aktivuje. Takto může být aktivována určitá subpopulace G-proteinů, které tvoří komplexy s NDPK B (Cuello et al., 2003; Kimura et al., 2003; Wieland, 2007).

## 6.2.2 Regulace G-proteinové signalizace

Jak již bylo zmíněno výše, G-proteiny a GPCRs jsou součástí velmi rozšířených signalizačních drah v savcích buňkách (Hildebrandt, 1997). Je proto velmi důležité, aby byly tyto dráhy účinně a rychle modulovány.

### Regulace na úrovni receptorů

Důležitým mechanismem, pomocí kterého dochází k regulaci GPCRs, je desenzitizace. Je to proces, jenž nastává v řádech sekund až minut po stimulaci receptoru a je popisován jako ztráta schopnosti receptoru reagovat na další stimulaci agonistou, čímž dochází k zabránění další aktivace efektorů. Desenzitizace nastává prostřednictvím downregulace receptorů, tj. úbytku jejich počtu z buněčné membrány, nebo „rozpřažením“ receptoru a G-proteinu prostřednictvím fosforylace tohoto receptoru na serinových a treoninových zbytcích a následnou vazbou  $\beta$ -arrestinu, který stericky brání dalšímu spřažení receptoru s G-proteinem a způsobuje jeho endocytózu (Salazar et al., 2007). Fosforylace může být řízena buď kinázami aktivovanými druhými posly (např. PKA), které stimulují receptory nezávisle na tom, zda jsou či nejsou obsazeny ligandem. Jedná se v tomto případě o desenzitizaci heterologní nebo také „non-agonist-specifickou“. Druhým typem fosforylace, ke které dochází po aktivaci receptorů ligandy, je fosforylace řízená kinázami receptorů spřažených s G-proteiny (GRKs), a ta souvisí s desenzitizací homologní, „pro agonistu specifickou“ (Lemaire and Rockman, 2004; Lohse et al., 1996; Myslivecek and Trojan, 2003). Třetím procesem, který indukuje agonista navázáním na receptor, je receptorová sekvestrace, při níž jsou receptory z buněčného povrchu přemístěny do endozomů, kde jsou buď degradovány nebo defosforylovány a recyklovány zpět do buněčné membrány (Lohse et al., 1996; Hausdorff et al., 1989).



Hlavními spouštěči internalizace a endocytózy receptorů jsou GRKs a  $\beta$ -arrestiny. Účastní se iniciace důležitého procesu recyklace receptorů.

Dosud bylo klonováno 6 členů GRK rodiny (GRK1-GRK6), které spolu sdílí velkou sekvenční podobnost. Jsou to serin/treoninové proteinkinázy, které sestávají z 3 domén: N-koncové, katalytické a C-koncové domény. Odlišnosti v jejich struktuře jsou patrné hlavně v oblasti C-terminální domény, tedy v oblasti, která slouží k ukotvení GRK k membráně. Od drozofily po savce mají všechny domény GRK vysoce konzervované struktury, což naznačuje velmi důležitou úlohu GRKs u mnoha druhů (Inglese et al., 1993). Ke zjištění významnosti GRKs v interakci GPCRs s  $\beta$ -arrestiny byl použit konjugát  $\beta$ -arrestinu se zeleným fluorescenčním proteinem ( $\beta$ arr-GFP). Pomocí konfokální mikroskopie bylo sledováno, jak tento konjugát odpovídá na ligandem zprostředkovanou receptorovou aktivaci a fosforylaci GRKs. Tyto experimenty prokázaly rozhodující roli GRKs v regulaci GPCRs pomocí  $\beta$ -arrestinu (Barak et al., 1997).

$\beta$ -Arrestiny jsou cytosolické multifunkční adaptorové proteiny, které se neúčastní pouze desenzitizace GPCRs, ale interagují s klatriny a jejich adaptorovými proteiny a způsobují internalizaci GPCRs umístěním těchto receptorů do klatrinových váčků. Je známo, že heterotrimerní klatrinový adaptorový protein (AP-2) zprostředkovává internalizaci mnoha typů proteinů plazmatické membrány. Laporte se spolupracovníky zjistili, že by se tento adaptorový protein mohl účastnit také endocytózy GPCRs, neboť po vazbě ligandu dochází k asociaci  $\beta$ 2-adaptinu, podjednotky AP-2, s  $\beta$ -arrestinem. Komplex GPCRs,  $\beta$ -arrestinu a AP-2 pak spustí propojování triskelionů a tvorbu váčků (Laporte et al., 1999). Tato vědecká skupina dále odhalila specifická místa v C-koncové doméně  $\beta$ -arrestinu, která slouží k interakci s AP-2 proteiny (Laporte et al., 2000).

Dalším mechanismem, kterým  $\beta$ -arrestin iniciuje endocytózu GPCRs, je aktivace malého GTP-vazebného proteinu, ADP-ribosylačního faktoru 6 (ARF 6). V tomto případě  $\beta$ -arrestin slouží jako lešení pro vazbu jednak výměnného faktoru guaninových nukleotidů (GEF), tak i ARF 6 s navázaným GDP, čímž podporuje výměnu GDP za GTP na ARF 6, a tím i jeho aktivaci v blízkosti receptoru. Celý tento proces je vlastně pod kontrolou receptoru, neboť pouze díky navázání agonisty na GPCRs dojde k aktivaci ARF 6 a jeho disociaci od  $\beta$ -arrestinu a ke spuštění endocytického procesu (Clainig et al., 2001).

### **Regulace na úrovni G-proteinů**

Regulátory G-proteinové signalizace (RGS) patří do velké rodiny tvořené přinejmenším 25 proteiny, které se liší strukturou, způsobem exprese i funkcí. Sdílí spolu 120 AA homologickou doménu (RGS doménu), pomocí níž urychlují spuštění

GTPázové aktivity  $\alpha$  podjednotky heterotrimerních G-proteinů, čímž negativně regulují signalizaci prostřednictvím GPCRs. Navíc většina těchto proteinů funguje také jako efekторы G-proteinové signalizace,  $G\beta\gamma$  scavengery nebo scaffolding proteiny pro signalizační komplexy (Wieland and Mittmann, 2003).

### 6.2.3 Opioidní receptory

V padesátých letech 20. století, pozorováním vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou morfinu a dalších přírodních či syntetických sloučenin, které s morfinem sdílely jeho analgetický účinek, byla navržena existence opioidních receptorů (OR), s kterými tyto látky interagují. Klonováním a sekvenováním proteinů bylo zjištěno, že existují 3 základní typy OR:  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -OR. Další receptor, ORL-1 (opioid receptor like receptor), jehož endogenním ligandem je nociceptin/orfanin FQ, sdílí podobnost s třemi předchozími OR, ale na rozdíl od nich se účastní spíše zvýšení vnímavosti k bolestivým podnětům než analgezie (Calo et al., 2000; Calo et al., 2002).

Trvalo téměř 20 let, než vědci objevili endogenní opioidní peptidy, které tyto receptory běžně aktivují. V 70. letech byly objeveny enkefaliny a endorfíny, které vykazovaly poměrně nízkou selektivitu a účinnost k  $\mu$ -OR, a následně i endomorfín-1 a endomorfín-2, které naopak dávaly přednost vazbě na  $\mu$ -OR (Horvath, 2000).

Všechny typy OR patří mezi GPCRs. Distribuce  $\mu$ -,  $\kappa$ - a  $\delta$ -OR v rámci centrálního nervového systému (CNS) byla objasněna. V některých oblastech, například v zadních kořenech míšních, jsou exprimovány jak  $\mu$ -, tak  $\kappa$ - i  $\delta$ -OR. Naproti tomu v jiných oblastech CNS, jako jsou talamická jádra, je exprimován pouze  $\mu$ -OR (Pleuvry, 2005). Také v periferních tkáních byla zjištěna rozdílná distribuce OR. Všechny tři typy OR byly široce exprimovány v tenkém i tlustém střevu, nadledvinách, ledvinách, plicích, slezině, varlatech, vaječnicích a děloze. V žaludku byly detekovány pouze  $\delta$ - a  $\kappa$ -OR. V srdci byly převážně detekovány transkripty pro  $\delta$ -OR, v menší míře také pro  $\kappa$ -OR. Pro  $\mu$ -OR nebyl na srdci detekován žádný signál (Ventura et al., 1992; Wittert et al., 1996). Některé studie ale dokazují, že i  $\mu$ -OR se na membránách myocytů nacházejí, a to jak na sarkolemálních tak i intracelulárních membránách (Head et al., 2005).

### 6.2.4 Adrenergní receptory

V roce 1948 byly Ahlquistem klasifikovány adrenergní receptory (AR) do dvou skupin:  $\alpha$ -AR, jako receptory, které po aktivaci agonistou působily stimulačně na krevní cévy, docházelo tedy ke kontrakci hladkého svalstva, a  $\beta$ -AR pro receptory, které měly po stimulaci agonistou inhibiční, dilatační účinek na krevní cévy (Xiao et al., 1999b).

V dnešní době je známo 9 podtypů AR, které byly rozlišeny pomocí selektivních ligandů a díky použití technik klonování do tří skupin -  $\alpha_1$ -AR,  $\alpha_2$ -AR a  $\beta$ -AR. Každá skupina je reprezentována 3 členy. Pro  $\alpha_1$ -AR jsou známy podtypy  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - a  $\alpha_{1D}$ -AR,  $\alpha_2$ -AR skupina zahrnuje  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -,  $\alpha_{2C}$ -AR a skupina  $\beta$ -AR je tvořena  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - a  $\beta_3$ -AR (Philipp and Hein, 2004).  $\alpha_1$ -Adrenergní receptory se účastní regulace krevního tlaku. Působí přes  $G\alpha_q$  proteiny, aktivují tedy enzym PLC, který hydrolyzuje membránový fosfoinositol-4,5-bisfosfát, a tím generuje druhé posly diacylglycerol (DAG) a inositol-(1,4,5)-trisfosfát ( $IP_3$ ) a spouští vápníkovou signalizaci.  $\alpha_2$ -AR mají nezastupitelnou roli v mnoha fyziologických procesech v rámci kardiovaskulárního a také centrálního nervového systému. Působí přes  $G\alpha_i$  proteiny, čímž inhibují AC a účastní se kontrakce hladkého svalstva.  $\beta_1$ -AR je nejpočetnějším podtypem AR v srdci, představuje tam 75-80 % celkového množství  $\beta$ -AR a má velmi důležitou roli v regulaci srdeční kontraktility. V srdci se nacházejí také  $\beta_2$ -AR, ale vzhledem k jejich nižšímu počtu ve srovnání s  $\beta_1$ -AR je jejich význam za normálních fyziologických podmínek poněkud menší. Naproti tomu  $\beta_3$ -AR hrají mnohem významnější roli v tukové tkáni než v srdci (Lemaire and Rockman, 2004; Rockman et al., 2002).

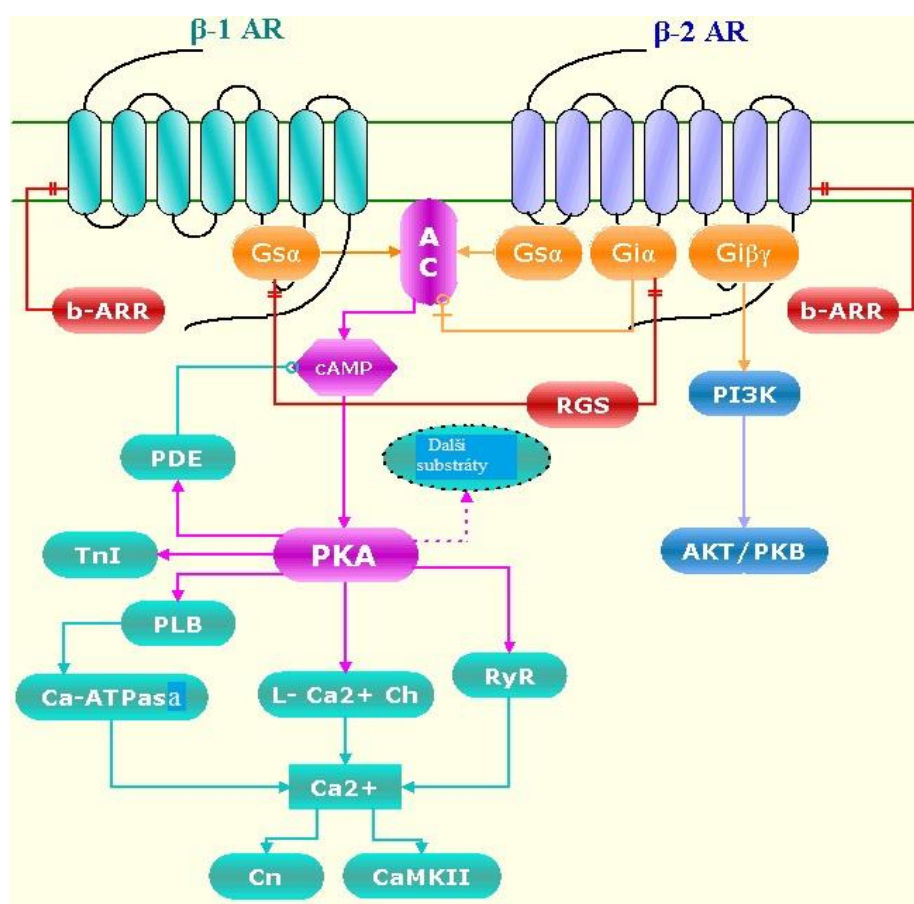
### 6.3 Adrenergní signalizace v myokardu

Existuje několik receptorových systémů v srdci, které se podílí na regulaci kontraktility a srdeční frekvence. Jednu skupinu tvoří receptory, které působí přes  $G\alpha_s$  protein na AC ( $\beta$ -AR, serotoninové receptory, histaminergní receptory), další signalizační kaskádu spouštějí receptory spřahující se s  $G\alpha_i$  proteinem a ovlivňující AC (muskarinové a adenosinové receptory) a v neposlední řadě signalizační dráhy v srdci vedou přes  $G\alpha_{q/11}$  podjednotky G-proteinů a řídí signalizaci přes PLC a PKC ( $\alpha_1$ -AR, endotelinové receptory a receptory pro angiotensin II) (Brodde et al., 2006).

Stimulace adrenergních receptorů katecholaminy (adrenalinem a noradrenalinem) představuje nejvýznamnější regulační mechanismus kardiovaskulárního systému (Xiao et al., 1999b). Přestože  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR odpovídají v srdečních myocytech na stejné stimuly - zprostředkovávají fyziologické odpovědi na hormon adrenalin (A, epinefrin) a neurotransmitter noradrenalin (NA, norepinefrin) - jejich signalizační kaskády se značně liší.

Všechny tři typy  $\beta$ -AR po navázání katecholaminů působí v cílové tkáni přes stimulační G protein ( $G\alpha_s$ ) na adenylylcyklázu (AC). To vede k tvorbě cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje intracelulární proteinkinázu A (PKA). PKA pak fosforyluje buněčné proteiny, včetně kalciových kanálů typu L (Obr. 4). Díky tomu dochází k zvýšenému vtoku kalciových ( $Ca^{2+}$ ) iontů do cytosolu a zvýšené kontrakci.

Adrenergní stimulace myocytů podporuje také diastolickou relaxaci, neboť návrat  $\text{Ca}^{2+}$  z cytosolu do sarkoplasmatického retikula je regulován fosforylovaným fosfolambanem (PLB). Fosfolamban je membránový protein sarkoplasmatického retikula, který ve své nefosforylované podobě inhibuje vychytávání  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí SERCA pumpy (ATPáza endoplazmatického retikula svalových buněk). Je známo, že navzdory vyššímu poměru  $\beta_1$ -AR ku  $\beta_2$ -AR v lidském srdci, jsou  $\beta_2$ -AR mnohem efektivněji funkčně spřaženy s AC než  $\beta_1$ -AR. Stimulací AC působí oba dva typy AR pozitivní inotropní (zvyšuje se síla srdeční kontrakce a s ní i srdeční výdej) a pozitivní chronotropní (ovlivnění srdeční frekvence, její zvýšení) efekt (Brodde and Michel, 1999; Rohrer et al., 1996; Xiao et al., 1999a; Xiao et al., 1999b).



Obr. 4: Signalizační dráhy  $\beta$ -AR v srdci. G-proteiny a efektorové molekuly zapojené v  $\beta$ -AR signalizaci v myokardu (upraveno podle <sup>[1]</sup>).

Vysvětlivky: AC = adenylcykláza, b-ARR =  $\beta$ -arrestin, TnI = troponin I, PDE = fosfodiesteráza, PLB = fosfolamban, CaMKII = kalcium/kalmodulin dependentní proteinkináza II, Cn = kalcineurin, RGS = regulátory G-proteinové signalizace, RyR = ryanodinové receptory.

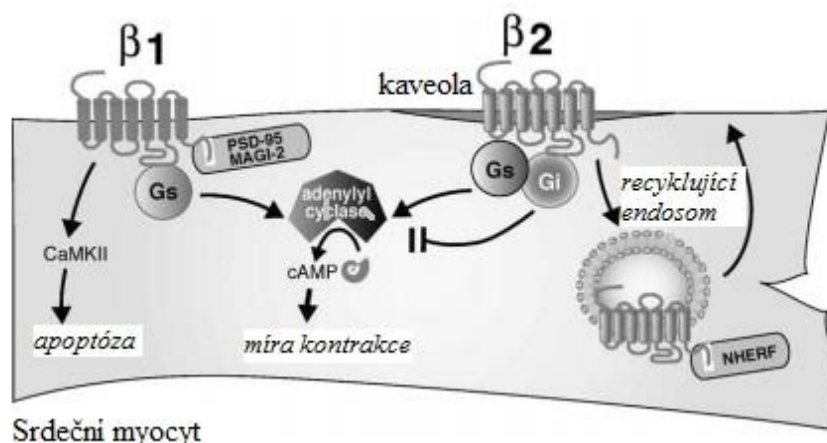
Mimo to  $\beta_2$ -AR mohou v srdci působit také přes  $\alpha_i$  podjednotku G-proteinů. Stimulaci  $\beta_2$ -AR v izolovaných myocytech novorozeneých myší byl způsoben počáteční nárůst kontraktility následován jejím poklesem. Když se k takto reagujícím myocytům přidal pertusis toxin, který inaktivuje  $G_i/G_o$  proteiny, tento negativní chronotropní účinek byl odstraněn (Devic et al., 2001).

Zda bude  $\beta_2$ -AR aktivovat  $G\alpha_s$  či  $G\alpha_i$  signalizační dráhu s největší pravděpodobností záleží na agonistovi, který se na tento receptor naváže. Bylo zjištěno, že fenoterol stimuluje především  $G\alpha_s$ , zatímco po působení terbutalinu, salbutamolu a zinterolu došlo k stimulaci jak  $G\alpha_s$ , tak  $G\alpha_i$  signalizace (Xiao et al., 2003).

$\beta$ -AR signalizace hraje velkou roli také v regulaci apoptózy myocytů. Bylo zjištěno, že stimulace  $\beta_1$ -AR zvyšuje apoptózu kardiomyocytů prostřednictvím  $G\alpha_s$ , AC, PKA a cAMP-dependentní signalizace, zatímco  $\beta_2$ -AR inhibuje apoptózu spouštěním dráhy přes  $G\alpha_i$  podjednotku G-proteinů.  $\beta_2$ -AR mohou tedy díky své schopnosti aktivovat  $G\alpha_s$  i  $G\alpha_i$  proteiny modulovat buněčnou smrt a buněčné přežívání. Zhu se spolupracovníky v roce 2001 odhalili signalizaci, která po aktivaci  $G\alpha_i$  proteinu vede právě k buněčnému přežívání. Účastní se jí  $G\beta\gamma$ , PI3K a Akt (PKB), což je důležitý enzym bránící apoptóze (Zhu et al., 2001). Aktivace  $G\alpha_i$  buďto pomocí agonistů muskarinového receptoru nebo stimulací  $\beta_2$ -AR má tedy antiapoptotický účinek a mohla by být využita jako terapeutický cíl při patofyziologiích srdce (Communal et al., 1999).

$\beta$ -AR se neliší pouze signalizačními dráhami, které ovlivňují, ale také svou membránovou (subbuněčnou) lokalizací (Obr. 5). Je to dáno odlišnou asociací subtypů  $\beta$ -AR s intracelulárními signalizačními a scaffolding proteiny. Interakce mezi C-koncem  $\beta_1$ -AR a proteinem PSD-95 (protein postsynaptické density o 95 kDa, obsahující PDZ motiv (PSD-95/disc large/ZO-1 homologní doména)) je zodpovědná za to, že tento receptor zůstává na povrchu membrány a spřahuje se pouze s G-proteiny z rodiny  $\alpha_s$  (Xiang et al., 2002a). Naproti tomu C-terminální PDZ motiv  $\beta_2$ -AR je potřebný pro aktivaci  $Na^+/H^+$  výměnného regulačního faktoru (NHERF) a pro recyklaci internalizovaných receptorů na plasmatickou membránu (Philipp and Hein, 2004). Navíc,  $\beta_2$ -AR jsou v membráně přítomny ve vysoké koncentraci v kaveolách, na sfingolipidy a cholesterol bohatých oblastech plasmatické membrány intracelulárně lemované proteinem kaveolínem, zatímco  $\beta_1$ -AR se nacházejí spíše v nekaveolárních oblastech membrány (Xiang et al., 2002b). V kaveolách jsou funkčně spojeny GPCRs, G-proteiny, efektorové kinázy a enzymy, což svými výzkumy potvrdili Ostrom se svými spolupracovníky a Rybin s kolegy na příkladu  $\beta$ -AR a AC V/VI (Ostrom et al., 2000; Rybin et al., 2000). V srdečních myocytech bylo dále popsáno, že  $\beta_3$ -AR

se také mohou funkčně spřahovat jak s  $G_s$ , tak s  $G_i$  proteiny, přičemž převažuje signalizace přes inhibiční G-protein (Devic et al., 2001).



Obr. 5: Membránová lokalizace podtypů  $\beta$ -AR a jejich signalizace v srdečním myocyty. PSD-95, MAGI-2 a NHERF jsou proteiny, které obsahují PDZ doménu, která reaguje s C-koncem  $\beta$ -AR a tím předurčuje způsob jejich signalizace, rozložení na membráně i úlohu v buněčné smrti (upraveno podle Philipp and Hein, 2004).

#### 6.4 Morfin a jeho působení na GPCRs signalizaci

Morfin je alkaloid přirozeně se vyskytující v opiu. Nejen jeho blahodárné, ale také nežádoucí účinky vyplývají z jeho působení na opioidní receptory. Při jeho užívání se rychle vyvíjí tolerance a s ní související návykovost. Morfin je v medicíně používán jako analgetikum nebo jako látka pro výrobu dalších opioidů. Dochází však i k jeho zneužívání jako drogy.

Schopnost opioidů působit protektivně byla popsána v řadě studií na nervovém systému i v myokardu (Murphy et al., 2006). Bylo zjištěno, že morfin a ostatní agonisté OR vyvolávají své protektivní účinky odlišnými signalizačními dráhami, v závislosti na délce podávání. Akutní působení morfinu aktivuje  $G\alpha_i$  proteiny a inhibuje tak aktivitu AC a tím snižuje intracelulární množství cAMP. Naproti tomu chronicky podávaný morfin aktivuje signalizaci zahrnující PKA,  $\beta_2$ -AR a  $G\alpha_s$  proteiny (Peart and Gross, 2006).

Kim se svými spolupracovníky popsali, že morfin může chránit primární astrocyty od apoptózy způsobené oxidem dusnatým (NO) a peroxynitritem signalizační dráhou zahrnující G-proteiny a PI3K (Kim et al., 2001).

Murry se spolupracovníky v roce 1986 jako první popsali protektivní účinek ischemického preconditioningu, když experimentálně ověřili, že krátká období ischemie chrání myokard před následným trvalým ischemickým poškozením (Murry et al., 1986).

Studie Schultze a jeho kolegů potvrzují, že opioidy také mohou chránit srdce před ischemickým poškozením. Zapojení OR v ischemickém preconditioningu bylo experimentálně zjištěno použitím naloxonu, neselektivního antagonisty OR, který blokoval kardioprotekci navozenou krátkými obdobími ischemie. Kromě toho tato výzkumná skupina dále objasnila, že morfin, neselektivní agonista OR, může napodobovat kardioprotektivní účinek ischemického preconditioningu, který je antagonizován naloxonem. Výsledky jejich další studie ukázaly, že při ischemickém preconditioningu a/nebo morfinem indukované kardioprotekci v potkaním myokardu jsou zapojeny  $\delta$ -OR (Schultz et al., 1997). Navíc výzkumnou skupinou vedenou Bellem bylo dokázáno, že  $\delta$ -OR je exprimován i v lidském srdci a jeho stimulace má stejný kardioprotektivní účinek na ischemii (Bell et al., 2000).

V srdeční tkáni jsou však exprimovány  $\delta$ -OR dvou podtypů:  $\delta_1$ -OR a  $\delta_2$ -OR, stejně tak i  $\mu$ -OR a  $\kappa$ -OR. Proto Schultz dále zkoumal, zda mají na ischemickém preconditioningu podíl oba podtypy  $\delta$ -OR, či pouze jeden z nich. Použitím selektivních antagonistů jednotlivých receptorů došel Schultz se spolupracovníky k závěru, že důležitou roli při kardioprotektivním účinku ischemického preconditioningu v myokardu potkana hraje  $\delta_1$ -OR (Schultz et al., 1998).

Peart se spolupracovníky v roce 2010 provedli experiment, který prokázal, že opioidní preconditioning ochraňuje před ischemií, je zprostředkován působením agonistů na  $\delta$ -OR a dále spouští signalizaci přes PI3K nezávisle na PKA (Peart et al., 2011).

Jsou také známy kardioprotektivní účinky endogenních opioidů (Takasaki et al., 1999).

Stejně tak jako preconditioning je svými blahodárnými účinky na srdce znám i postconditioning. Jako první prokázal jeho zapojení v kardioprotekci Zhao se spolupracovníky v roce 2003, kdy po dlouhém období ischemie následované krátkými opakovanými přerušeními na počátku reperfuze došlo ke snížení poškození myokardu, které bylo srovnatelné s účinkem preconditioningu (Zhao et al., 2003).

Zdá se, že morfinová kardioprotekce vyvolaná preconditioningem nebo postconditioningem je zprostředkována odlišnými signalizačními dráhami. Jak již bylo psáno výše, morfinový preconditioning nastává prostřednictvím ovlivnění  $\delta$ -OR. Naproti tomu morfinový postconditioning je veden přes  $\kappa$ -OR a konečným efektozem je mito- $K_{ATP}$  kanál (Chen et al., 2008).

Jsou zde určité náznaky, že opioidy mohou modulovat funkci  $\beta$ -AR v myokardu (Kindman et al., 1991). Na základě toho, že opioidní receptory se spřahují s  $G\alpha_i$  proteiny a  $\beta$ -AR s  $G\alpha_s$  proteiny se předpokládá, že působení opioidních peptidů by mohlo mít

modulační účinek na  $\beta$ -AR signalizaci (Xiao et al., 1997). Bylo zjištěno, že dlouhodobé podávání vysokých dávek agonistů OR podstatně mění expresi významného enzymu signalizační dráhy GPCRs, adenylylcyklázy (AC) (Zhao et al., 2006). Fenomén této tzv. supersenzitizace byl nedávno popsán u myokardiální AC (Skrabalova et al., 2012).

Další studie potvrzují funkční propojení  $\beta$ -AR systému a opioidního systému v srdci (Xiao et al., 1997). Během stimulace sympatiku dochází na nervových myokardiálních zakončeních k výlevu noradrenalinu společně s opioidními peptidy. Tento mechanismus působí modulačně na myocyty tím, že inhibuje přílišný výlev  $\text{Ca}^{2+}$ . Funkční propojení těchto dvou signalizačních systémů má velký fyziologický, ale i patofyziologický význam (Pepe et al., 2004). Po dlouhodobém působení morfinu a následné abstinenci dochází ke zvýšení výlevu noradrenalinu v CNS (Fuentealba et al., 2000) i v myokardu potkana (Rabadan et al., 1997; Rabadan et al., 1998).



## 7. Cíle diplomové práce

I) studium exprese OR a vybraných proteinů  $\beta$ -adrenergní signalizace ( $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR, G-proteiny,  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -AR, AC V/VI) v myokardu potkana po podání různých dávek morfinu pomocí SDS-PAGE elektroforézy a imunoblotu

II) identifikace  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -AR a  $\beta$ -arrestinu v membránových mikrodoménách ve vzorcích kontrol a při podání 10 mg/kg morfinu pomocí SDS-PAGE elektroforézy a imunoblotu

III) stanovení množství a afinity  $\beta$ -AR ve vzorcích postnukleárního supernatantu pomocí saturačních vazebných experimentů a porovnání vazby  $\beta$ -AR v plazmatických membránách kontrolních vzorků myokardu a vzorků plazmatických membrán ovlivněných morfinem za pomoci specifického radioligandu [ $^3$ H] CGP 12177

## 8. Materiál a metody

### 8.1 Laboratorní zvířata

K pokusu byli použiti samci potkanů kmene Wistar, kterým byly podávány různé dávky morfinu po různě dlouhou dobu. Tabulka č. 1 ukazuje 5 skupin potkanů použitých v experimentu. První skupinu tvořila zvířata kontrolní, kterým nebyl podáván morfin, ale pouze fyziologický roztok. Následujícím skupinám byly podávány nižší dávky morfinu (0,1 mg/kg a 1 mg/kg za den) po dobu 28 dnů a vyšší dávky (10 mg/kg za den) po dobu 10 dnů. Po usmrcení byla zvířatům vyjmuta srdce a rozdělena na levou komoru, pravou komoru a síně. K dalšímu zpracování byly použity pouze levé komory.

Tab. 1: Schema podávání morfinu a získaný biologický materiál

	C	M0,1	M1	M1R	M10
Dávka morfinu	-	0,1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg
Délka podávání morfinu/+ následná abstinence (dny)	-	28/0	28/0	28/7	10/0
Hmotnost LV (g)	6,98	7,40	7,68	8,00	6,50
Počet LV	13	14	14	14	19

C = kontrolní skupina, M = skupiny, kterým byl podáván morfin, M1R = skupina po vysazení morfinu po podání poslední dávky (abstinence 1 týden), LV = levé komory

### 8.2 Homogenizace a frakcionace myokardu

#### 8.2.1 Roztoky

Tab. 2: Roztoky použité při homogenizaci tkáně

Pufr TME	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA
Homogenizační pufr TMES	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 250 mM sacharóza
18% Percoll	

### 8.2.2 Pracovní postup

Tkáň levých komor byla nastříhána a naředěna v homogenizačním pufru TMES (1 g nastříhané tkáně + 4 ml pufru). Aby nedošlo k rozštěpení proteinů v průběhu homogenizace, byl k homogenátu přidán inhibitor proteáz Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Takto zpracovaná tkáň byla homogenizována přístrojem Ultra-Turrax po dobu 15 sekund a následně pomocí sklo-teflonového homogenizátoru (10x posun pístu nahoru a dolů). Vzniklá směs byla centrifugována na centrifuze (Hettich Universal R30) po dobu 10 minut při 4°C rychlostí 2 100 rpm (600 x g). Supernatant byl odebrán a pelet byl opět resuspendován v pufru TMES a rehomogenizován Ultra-Turraxem a sklo-teflonovým homogenizátorem. Homogenát byl opět stočen rychlostí 2 100 rpm (600 x g), při 4°C, po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán a spojen s předchozím, část této suspenze byla rozpipetována (postnukleární supernatant), část ponechána na stanovení obsahu proteinů, část byla použita dále v pokusu pro izolaci membránových mikrodomén a 3 ml postnukleárního supernatantu (PNS) byly navrstveny na percollový gradient pro oddělení plazmatických membrán a mitochondrií.

Gradientová centrifugace probíhala po dobu 15 minut při 26 000 rpm (60 000 x g) s použitím rotoru Ti50.2 v centrifuze Beckman-Coulter. Následně byly postupně odebrány vrstvy cytosolu (CYT), plazmatických membrán (PM) a mitochondrií (MITO). PM a MITO byly naředěny puftrem TME a centrifugovány po dobu 1 hodiny při 40 000 rpm (150 000 x g). Po stočení byl odsát supernatant jak ze vzorku MITO, tak PM a pelet byl resuspendován opět v pufru TME. Takto připravené vzorky byly rozpipetovány a byl odebrán alikvot pro stanovení proteinů. CYT byl centrifugován při 300 000 x g/60 min v centrifuze Beckman-Coulter a supernatant byl rozpipetován do eppendorfek, včetně alikvotu pro stanovení proteinů ve vzorcích.

Pelet vzniklý po oddělení PNS byl dále resuspendován v pufru TME a sonikován ve zkumavce umístěné na ledu ultrazvukem (2x 10 sekund). Všechny vzniklé vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -80°C v mrazáku.

K izolaci membránových mikrodomén z frakce PNS byly použity 4 různé solubilizační roztoky: Triton X-100 (Tx), CHAPS, cholát sodný (CHOL) a uhličitán sodný (U). Ke každé frakci PNS o objemu 2,5 ml byl přidán jeden z těchto roztoků o výsledné 1% koncentraci v poměru 1:1. Následně byly směsi inkubovány na ledu po dobu 1 hodiny a poté centrifugovány centrifugou (Beckman-Coulter) při 128 000 x g po dobu 1 hodiny při 4°C za účelem oddělení solubilizovaných proteinů a detergent-rezistentních lipidových domén. Vzniklý supernatant byl odebrán v alikvotech, zamražen tekutým dusíkem a uložen při -80°C v mrazáku. Peleta byla dále resuspendována v 1 ml TME a homogenizována

sklo-teflonovým homogenizátorem při 1 200 rpm (10x pohyb pístu nahoru/dolů) a alikvotována pro následnou analýzu.

### 8.3 Stanovení proteinů – BCA metoda

Celkové množství proteinů ve vzorcích připravených homogenizací a frakcionací levých komor bylo stanoveno kolorimetrickou metodou BCA (bicinchoninic acid assay).

#### 8.3.1 Roztoky

Tab. 3: Roztoky použité ke kvantifikaci proteinů

Činidlo A	8 g monohydrátu uhličitanu sodného 1,6 g vlnanu sodného doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O upravit na pH 11,25
Činidlo B	4 g BCA (bicinchoninová kyselina) doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
Činidlo C	0,4 g pentahydrátu síranu měďnatého doplnit do 10 ml H <sub>2</sub> O

**Pracovní roztok:** 1 díl činidla C, 25 dílů činidla B, 26 dílů činidla A

#### 8.3.2 Pracovní postup

Do mikrotitrační destičky byly podle následující tabulky (Tab. 4) napipetovány standardy (BSA) a vzorky. Vzorky byly předem naředěny destilovanou vodou v poměru 1:99 a po 100 µl pipetovány v triplicátech do jamek mikrotitrační destičky. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl pracovního roztoku a mikrotitrační destička byla inkubována 30 minut při 60°C. Vzorky byly spektrofotometricky změřeny pomocí přístroje Synergy HT při vlnové délce 562 nm a vyhodnoceny programem Gen 5.

Tab. 4: Ředící řada pro standardy - vytvoření kalibrační křivky

Standardy		BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>BSA</b> (0,1 µg/µl)	µl	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
<b>BSA</b> (1 µg/µl)	µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
<b>H<sub>2</sub>O</b>	µl	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

BL = blank, BSA = bovinní serumalbumin

## 8.4 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky postnukleárního supernatantu byly dále použity k pokusu. Pro rozdělení proteinů byly připraveny ve většině případů standardní SDS-polyakrylamidové gely. Pro rozdělení G<sub>11/2</sub>-proteinů byly použity 12% gely v přítomnosti močoviny.

### 8.4.1 Roztoky

Tab. 5: Roztoky pro standardní SDS-PAGE elektroforézu

30% akrylamid - 0,8% N,N'-methylenbisakrylamid	30 g akrylamidu 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
Buffer 1 (pH 8,8)	18,17 g Tris-HCl doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
Buffer 2 (pH 6,8)	6,05 g Tris-HCl doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
Running Buffer, 10x koncentrovaný (promývací pufr)	30,3 g Tris-HCl 141,1 g glycinu 10 g SDS doplnit do 1 000 ml H <sub>2</sub> O
Laemmliho pufr 4x koncentrovaný (sample loading buffer)	2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml glycerolu 0,8 g SDS (dodecylsulfát sodný) 0,8 g DTT (dithiothreitol) 1 mg bromfenolové modři doplnit do 10 ml H <sub>2</sub> O

Tab. 6: Roztoky použité pro ureovou SDS-PAGE elektroforézu

9M urea	270,27 g urea doplnit do 500 ml H <sub>2</sub> O
30% akrylamid - 0,15% N,N'-methylenbisakrylamid - urea	30 g akrylamidu 0,15 g N,N'-methylenbisakrylamidu 66,7 ml 9M urea doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
Buffer 1 (pH 8,8) - urea	18,17 g Tris-HCl 66,7 ml 9M urea doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
Sample loading buffer - urea, 2x koncentrovaný	500 µl 1M Tris-HCl (pH 6,8) 3 g urea 500 mg SDS 600 mg DTT 1 mg bromfenolové modři doplnit do 10 ml H <sub>2</sub> O

#### 8.4.2 Pracovní postup

Vzorky PNS byly nejprve naředěny vzorkovým pufrům na konečnou koncentraci 2 µg/µl. Následně byly povařeny po dobu 3 minuty při 95 °C. Byly připraveny SDS-polyakrylamidové dělicí gely podle tabulek č. 7 a č. 8 a poté zaostřovací gel podle tabulky č. 9.

Tab. 7: Složení 10% dělicího SDS-polyakrylamidového gelu

8 ml H <sub>2</sub> O
5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) - buffer 1
6,7 ml 30% akrylamidu s 0,8% N,N'-methylen bisakrylamidem
200 µl 10% SDS
8 µl TEMED
90 µl 10% APS

*Tab. 8:* Složení 12% ureového gelu

---

6,8 ml 6M urea
5 ml buffer 1 - urea
8 ml 30% Ac - Bis - urea
200 $\mu$ l 10% SDS
34,5 $\mu$ l 10% APS
2,3 $\mu$ l TEMED

---

*Tab. 9:* Složení 4% zaostřovacího gelu

---

6 ml H <sub>2</sub> O
2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) - buffer 2
1,3 ml 30% akrylamidu s 0,8% N,N'-methylen bisakrylamidem
100 $\mu$ l 10% SDS
8 $\mu$ l TEMED
90 $\mu$ l 10% APS

---

Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V přibližně po dobu 1 hodiny. Dále byly proteiny přeneseny z gelů na nitrocelulosovou membránu v blotovacím pufru.

## 8.5 Western blotting a imunodetekce

### 8.5.1 Roztoky

Tab. 10: Roztoky potřebné na Western blotting a imunodetekci

TBS Buffer (pH 8), 10x koncentrovaný	21,03 g NaCl 2,9 g Tris doplnit do 240 ml H <sub>2</sub> O
TGM Buffer (blotovací pufr)	15 g Tris 72 g glycinu 1 000 ml methanolu doplnit do 5 000 ml H <sub>2</sub> O
Blocking buffer (blokovací pufr)	2,5 g mléka 50 ml TBS pufru 50 µl Tween 20
Diluting buffer (ředící pufr)	0,5 g mléka 50 ml TBS pufru 50 µl Tween 20
Washing buffer (oplachovací pufr)	100 ml TBS pufru 900 ml H <sub>2</sub> O 3 ml Tween 20

### 8.5.2 Pracovní postup

Gel po provedeném elektroforetickém rozdělení proteinů byl přiložen na nitrocelulózovou membránu a pomocí blotovacího zařízení byly proteiny přeneseny působením elektrického proudu na tuto membránu. Western blotting probíhal po dobu 1 hodiny při konstantním napětí 100 V. Poté byla membrána vyjmuta z blotovacího zařízení, opláchnuta krátce vodou a 1 hodinu inkubována v blokovacím pufru na třepačce při laboratorní teplotě. Po blokování byla membrána přenesena do zředěného roztoku primární protilátky (Tab. 11) v ředícím pufru a inkubována do druhého dne při 4°C na třepačce. Druhý den byla membrána důkladně propláchnuta vodou a 3x 10 minut byla promývána oplachovacím pufrům. Následně byla membrána inkubována v sekundárních protilátkách značených křenovou peroxidázou naředěných v ředícím pufru po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opět důkladně promyta vodou a promývána oplachovacím pufrům 3x 10 minut. Po promytí oplachovacím pufrům byla membrána



inkubována 1 minutu se substrátovým roztokem pro křenovou peroxidázu (Pierce Super Signal). Nakonec byla membrána exponována na film a vyvolána.

Tab. 11: Seznam protilátek užitých pro imunoblot

<b>primární protilátka</b>	<b>katalogové číslo</b>	<b>ředění</b>	<b>sekundární protilátka</b>	<b>ředění</b>
$\kappa$ -OR	sc-9112	1 000x	Anti-R	40 000x
$\delta$ -OR	sc-9111	1 000x	Anti-R	40 000x
$\beta_1$ -AR	sc-568	3 000x	Anti-R	40 000x
$\beta_2$ -AR	sc-569	2 000x	Anti-R	40 000x
AC V/VI	sc-590	1 000x	Anti-R	40 000x
G $\beta$	sc-378	10 000x	Anti-R	40 000x
G $\alpha_{i3}$	-	3 000x	Anti-R	40 000x
G $\alpha_{i1/2}$	-	5 000x	Anti-R	40 000x
G $\alpha_{q/11}$	-	3 000x	Anti-R	40 000x
$\beta$ -arrestin 1/2	sc-28869	3 000x	Anti-R	40 000x

sc = Santa Cruz Biotechnology, Anti-R = sekundární protilátky proti králičím proteinům (anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase-linked (GE Healthcare UK))

## 8.6 Analýza dat

Výsledky SDS-PAGE elektroforézy a Western blottingu byly hodnoceny programem ImageQuant. Grafy byly vytvořeny z dat vyjádřených jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří nezávislých pokusů v programu GraphPad Prism 6. K určení statistické významnosti posloužily jednorozměrná ANOVA a t-test.

## 8.7 Vazebné pokusy

Ve vazebných pokusech byly použity vzorky plazmatických membrán (PM) nebo postnukleárního supernatantu (PNS).

### 8.7.1 Roztoky

Tab. 12: Roztoky pro vazebné pokusy

Inkubační médium (pH 7,4)	50mM Tris-HCl 10mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 1mM kyselina askorbová doplnit do 1 l H <sub>2</sub> O
Promývací pufr (pH 7,4)	50mM Tris-HCl 10mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O doplnit do 5 l H <sub>2</sub> O

**Specifická aktivita radioligandu:** 66 600 dpm

### 8.7.2 Pracovní postup

Pro stanovení počtu receptorů a jejich afinity byly ve vazebných pokusech použity vzorky PNS a plazmatických membrán, které jsou bohaté na receptory. Byly provedeny tři druhy pokusů, a to saturační pokusy, závislost vazby radioligandu na množství tkáně a jednobodové stanovení.

### Saturační pokusy

Saturačními vazebnými pokusy byla změřena specifická vazba receptoru ve vzorcích PNS při 6 různých koncentracích radioligandu. Koncentrace radioligandu byly vytvořeny polovičním ředěním v inkubačním médiu a byly následující: 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM a 0,125 nM. Jako radioligand byl použit [<sup>3</sup>H]CGP 12177, což je neselektivní antagonist  $\beta$ -AR. Pokus byl prováděn v triplicátech. Zkumavky s celkovou vazbou obsahovaly 300  $\mu$ l inkubačního média, 100  $\mu$ l radioligandu a 100  $\mu$ l tkáně naředěné tak, aby koncentrace ve 100  $\mu$ l inkubačního média činila 200  $\mu$ g proteinů. Do zkumavek pro měření nespecifické vazby bylo v duplikátech pipetováno 200  $\mu$ l inkubačního média, 100  $\mu$ l radioligandu, 100  $\mu$ l tkáně a 100  $\mu$ l 1mM L-propranololu. Poté byly zkumavky inkubovány při teplotě 37°C po dobu 1 hodiny ve vodní lázni pro dosažení rovnovážného stavu specifické vazby radioligandu. Reakce byla ukončena filtrací obsahu zkumavek

přes GF/C filtry, které byly předtím inkubovány v 0,3% roztoku polyethyleneiminu. Filtry se zadrženou radioaktivitou byly zality 4 ml scintilačního roztoku RotiZcint a provedeno měření kapalnou scintilační spektrometrií na scintilačním počítači (Packard).

### Závislost vazby radioligandu na množství tkáně

Aby bylo vybráno nejlepší ředění tkáně pro jednobodové stanovení, byla změřena závislost vazby radioligandu na množství tkáně ve vzorcích plazmatických membrán. Tkáň byla naředěna tak, aby v dávce bylo 100 µg proteinů ve 100 µl inkubačního média. Tabulka č. 13 ukazuje schéma, podle kterého byly jednotlivé objemy pipetovány do zkumavek. V tomto pokusu byl použit 10 µM L-propranolol a izotop o koncentraci 2 nM. Další postup byl shodný s protokolem saturačních pokusů.

Tab. 13: Dávkovací schéma

	tkáň (µg na zkumavku)	izotop (µl)	inkubační médium (µl)	L-propranolol (µl)
celková vazba	50	100	350	-
nespecifická vazba	50	100	250	100
celková vazba	75	100	325	-
nespecifická vazba	75	100	225	100
celková vazba	100	100	300	-
nespecifická vazba	100	100	200	100
celková vazba	150	100	250	-
nespecifická vazba	150	100	150	100

### Jednobodové stanovení

Jednobodové stanovení slouží ke stanovení množství vázaného radioligandu v jedné jeho koncentraci.

Pro jednobodové stanovení byly opět použity vzorky PM, které byly naředěny na koncentraci 100 µg/100 µl, dále 10 µM L-propranolol, 2 nM koncentrace izotopu [<sup>3</sup>H]CGP 12177 a inkubační médium. Jednotlivé celkové a nespecifické vazby pro všechny vzorky PM byly pipetovány v tripletech podle tabulky č. 14. Zkumavky byly opět poté inkubovány při 37°C a jejich obsah přefiltrován přes GF/C filtry.

Pokus byl zopakován 4x, naměřená radioaktivita byla vyhodnocena v programu Microsoft Excel a GraphPad Prism 6.

Tab. 14: Dávkovací schéma

	tkáň ( $\mu\text{g}$ na zkumavku)	izotop ( $\mu\text{l}$ )	inkubační médium ( $\mu\text{l}$ )	L-propranolol ( $\mu\text{l}$ )
celková vazba	100	100	300	-
nespecifická vazba	100	100	200	100

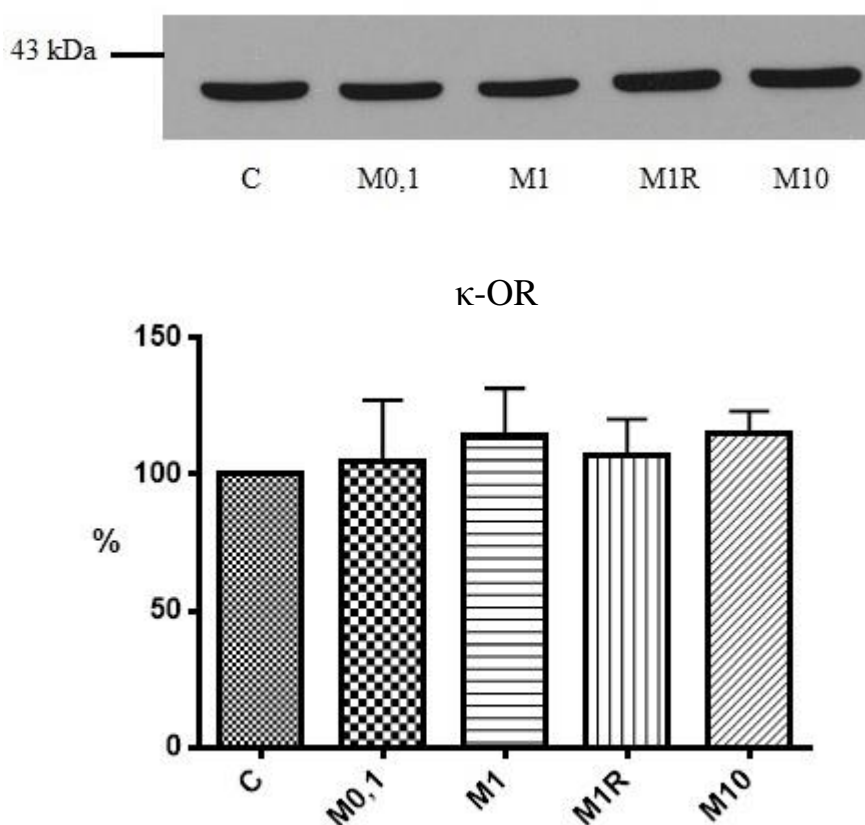
## 9. Výsledky

### 9.1 Studium exprese GPCRs, G-proteinů a AC V/VI v myokardu potkana pomocí SDS-PAGE a Western blottingu

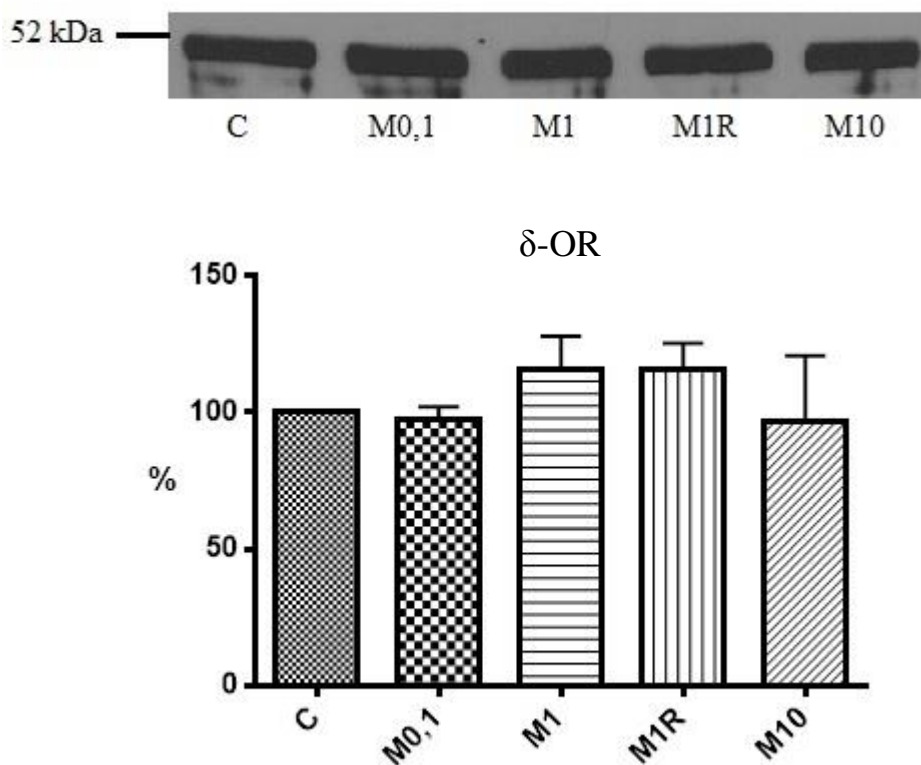
I) Pomocí metod SDS-PAGE a Western blottingu byla studována exprese následujících GPCRs a G-proteinů v myokardu potkana po podání různých dávek morfinu:  $\kappa$ -OR,  $\delta$ -OR,  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR, G $\beta$ , G $\alpha_{i1/2}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\alpha_{q/11}$ .

#### Expresa $\kappa$ -OR a $\delta$ -OR

V srdeční tkáni se podařilo pomocí SDS-PAGE elektroforézy a Western blottingu detekovat jak  $\kappa$ -OR (Graf 1), tak  $\delta$ -OR (Graf 2). Žádný ze zkoumaných receptorů nevykazoval statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) v expresi v myokardech potkanů ovlivněných nižšími či vyššími dávkami morfinu v porovnání s kontrolní skupinou.



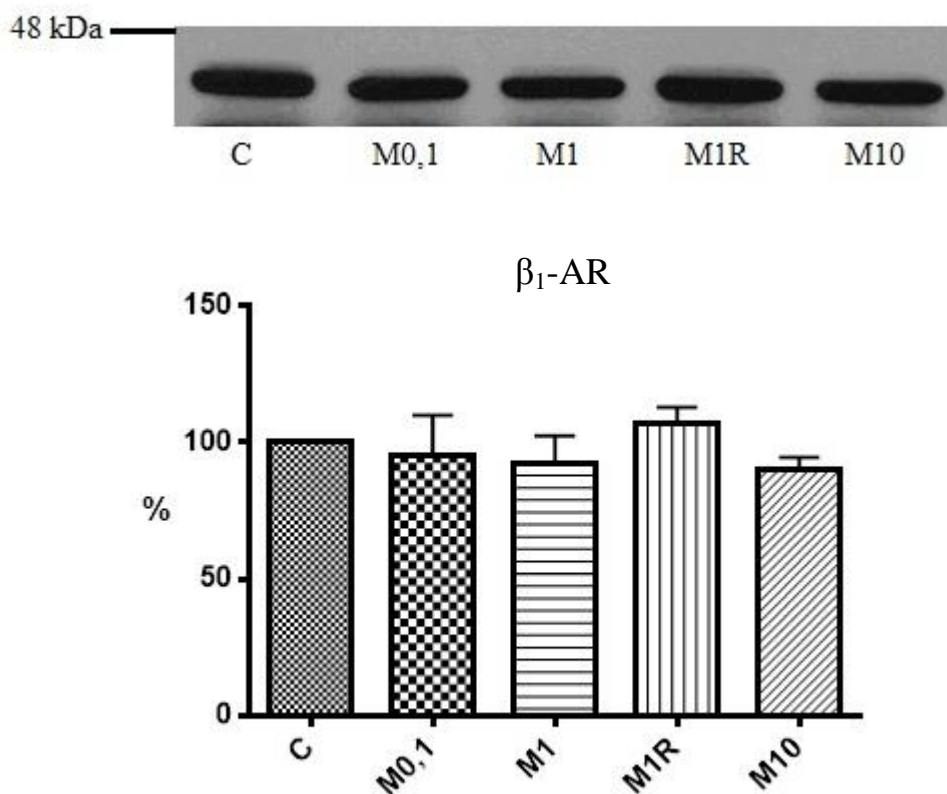
*Graf 1:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $\kappa$ -OR. Vyhodnocení exprese  $\kappa$ -OR po podání různých dávek morfinu vztažených ke kontrolní skupině. Statistická významnost byla zamítnuta na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $\kappa$ -OR v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).



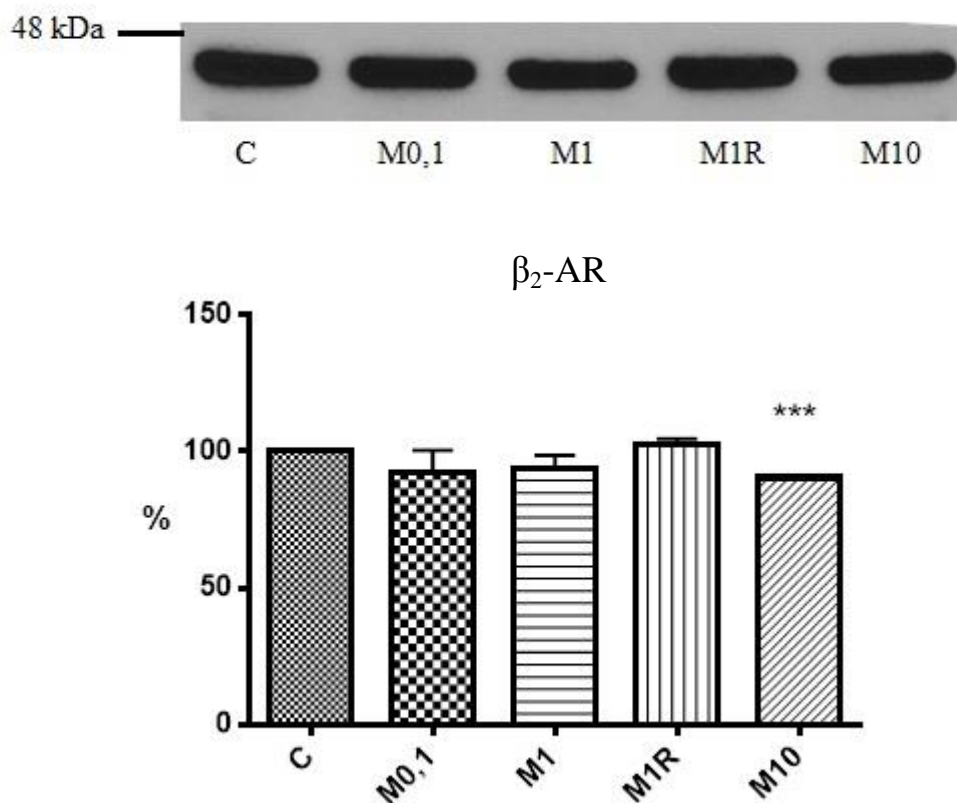
*Graf 2:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $\delta$ -OR. Vyhodnocení exprese  $\delta$ -OR po podání nízkých (0,1 mg/kg nebo 1 mg/kg za den) a vysokých (10 mg/kg za den) dávek morfinu vztahených ke kontrolní skupině. Statistická významnost byla zamítnuta na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $\delta$ -OR v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).

### Expresa $\beta_1$ -AR a $\beta_2$ -AR

Ve zpracovaných vzorcích ze srdcí potkanů ovlivněných nízkými (0,1 mg/kg nebo 1 mg/kg za den) a vysokými (10 mg/kg za den) dávkami morfinu u kontrolních zvířat byla detekována exprese  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -AR. V případě  $\beta_1$ -AR (Graf 3) nebyla zjištěna žádná signifikantní změna v expresi tohoto receptoru v žádném z analyzovaných vzorků, naproti tomu exprese  $\beta_2$ -AR (Graf 4) byla po podání dávky morfinu 10 mg/kg/den vyhodnocena jako statisticky snižená na hladině významnosti  $p < 0,05$ .



Graf 3: Imunoblot a grafické znázornění exprese  $\beta_1$ -AR. Procentuální vyhodnocení exprese  $\beta_1$ -AR pro čtyři různé dávky morfinu vztahované ke kontrolní skupině. Vyhodnocením bylo zjištěno, že žádná z použitých dávek morfinu nevyvolává ve vztahu ke kontrolní skupině žádnou statisticky významnou změnu v expresi  $\beta_1$ -AR na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $\beta_1$ -AR v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).

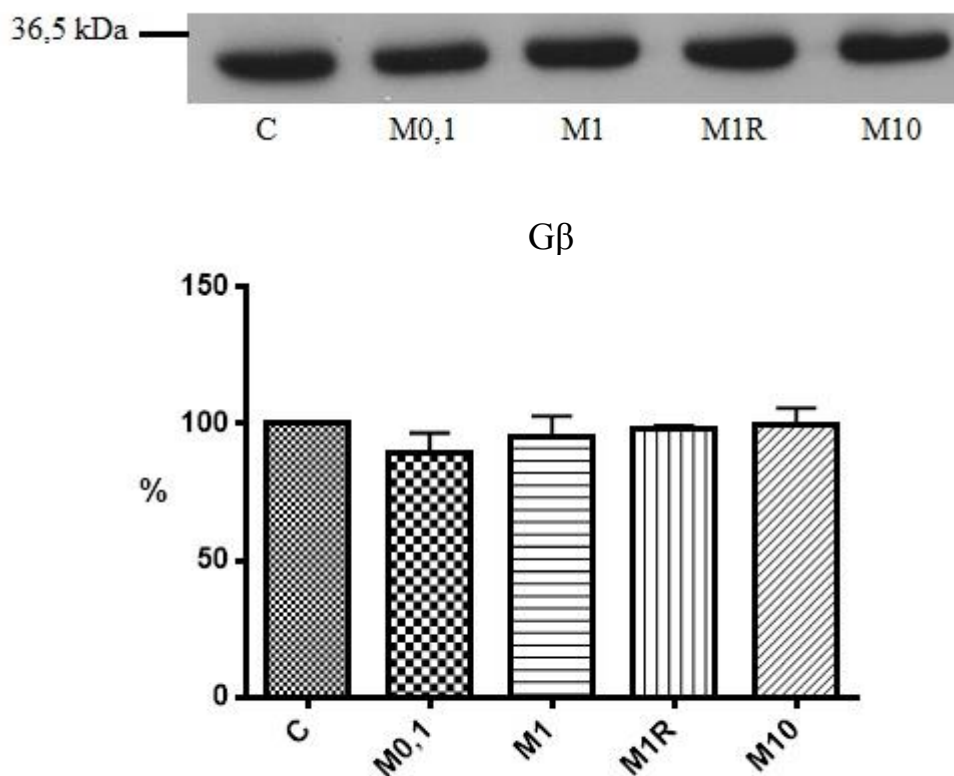


*Graf 4:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $\beta_2$ -AR. Vyhodnocením exprese  $\beta_2$ -AR u kontrolní skupiny a u skupin ovlivněných morfinem bylo zjištěno, že dávka 10 mg/kg morfinu podávaných po dobu 10 dní signifikantně snížila expresi tohoto receptoru oproti kontrolní skupině. Ostatní analyzované morfinové dávky nevyvolaly statisticky významnou změnu v expresi tohoto proteinu. Statistická významnost byla hodnocena na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $\beta_2$ -AR v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).

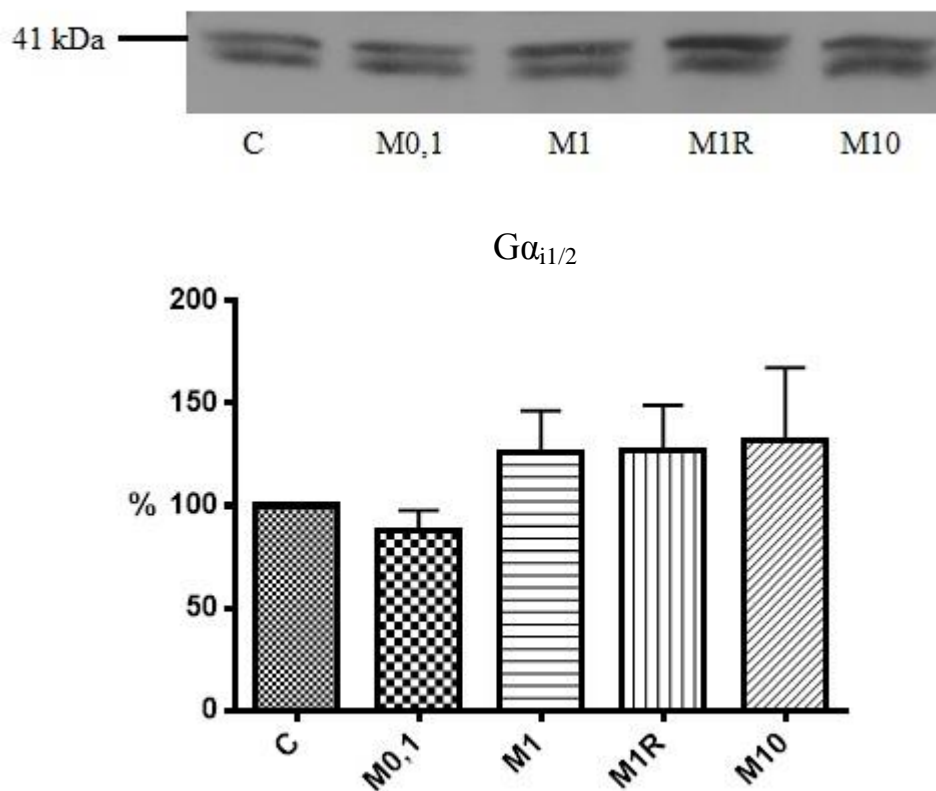


### Expresa vybraných G-proteinů

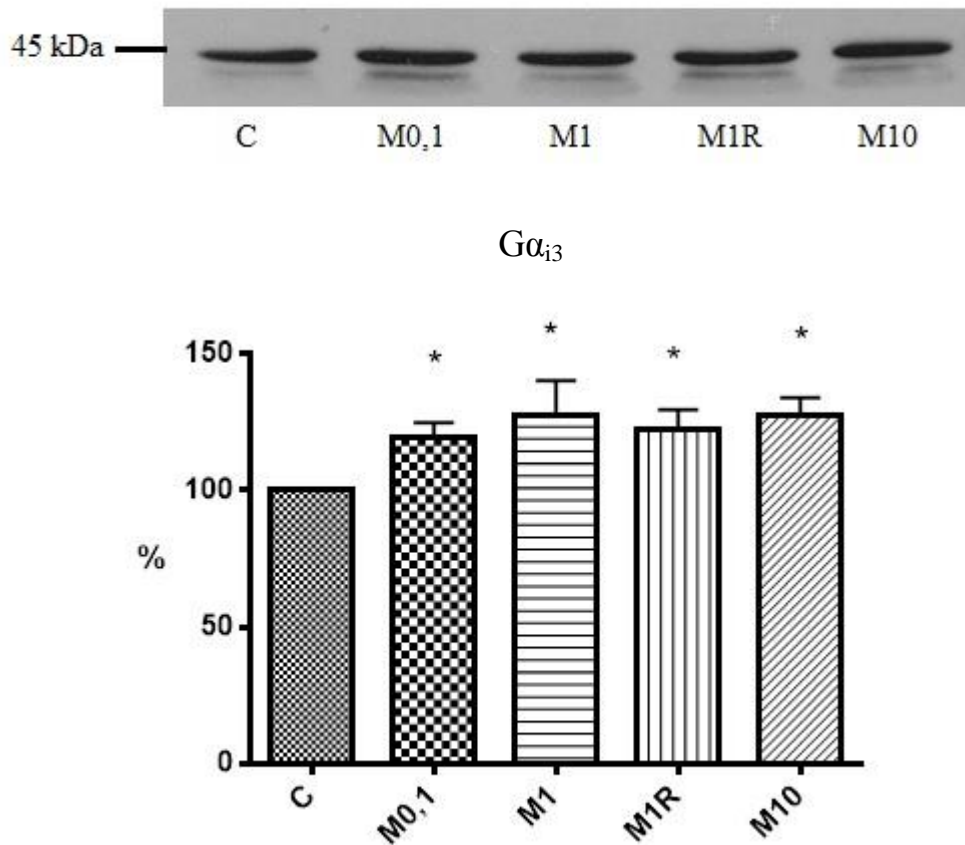
Další molekuly, které byly v rámci  $\beta$ -AR a OR signalizace studovány, jsou G-proteiny. Expresa  $G\alpha_s$  proteinu se bohužel nezdařila, nejspíše v důsledku velké nescifčnosti komerčních protilátek. Naproti tomu, v našich vzorcích byla detekována exprese proteinů  $G\beta$  (Graf 5),  $G\alpha_{q/11}$  (Graf 8) a dvou inhibičních G-proteinů:  $G\alpha_{i1/2}$  (Graf 6) a  $G\alpha_{i3}$  (Graf 7).



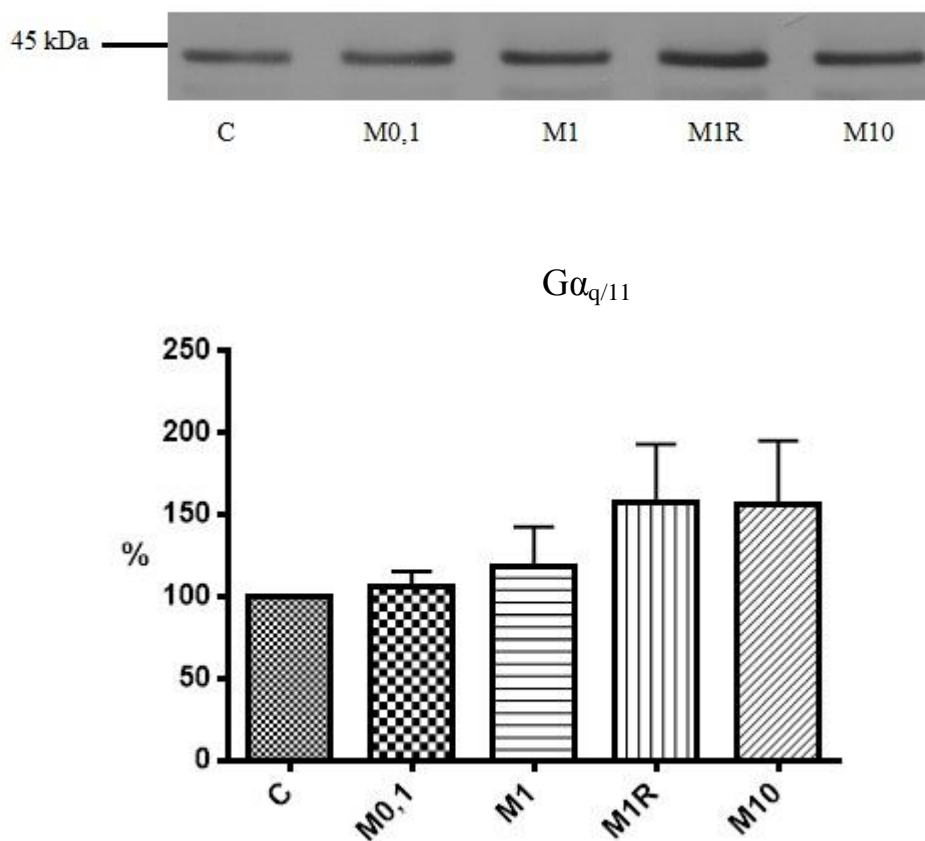
*Graf 5:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $G\beta$  podjednotky G-proteinů. Vztažením každé z morfinových skupin ke kontrolní skupině bylo vyhodnoceno, že exprese  $G\beta$  podjednotky nebyla v rámci žádné z morfinových skupin v porovnání s kontrolou nijak výrazně změněna. Statistická významnost byla zamítnuta na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $G\beta$  v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).



*Graf 6:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $G\alpha_{i1/2}$  podjednotky G-proteinů.  $G\alpha_{i1}$  i  $G\alpha_{i2}$  podjednotky mají shodnou molekulární hmotnost. Z toho důvodu byly pro rozdělení těchto dvou proteinů použity ureové gely, které umožnily jejich samostatnou detekci. Při vyhodnocení byla exprese obou proteinů pro jednoduchost hodnocena společně. Z grafu by se dalo vyčíst, že ve vzorcích ze tří posledních morfinových skupin byla mírně zvýšena hladina těchto proteinů, statistickým testem nebylo však toto zvýšení vyhodnoceno jako signifikantní na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $G\alpha_{i1/2}$  v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).



*Graf 7:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $G\alpha_{i3}$  podjednotky G-proteinů. Na rozdíl od podjednotky  $G\alpha_{i1/2}$ , v případě  $G\alpha_{i3}$  podjednotky došlo k signifikantnímu zvýšení v expresi tohoto proteinu v rámci všech morfinem ovlivněných skupin. Statistická významnost byla hodnocena na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $G\alpha_{i3}$  v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).

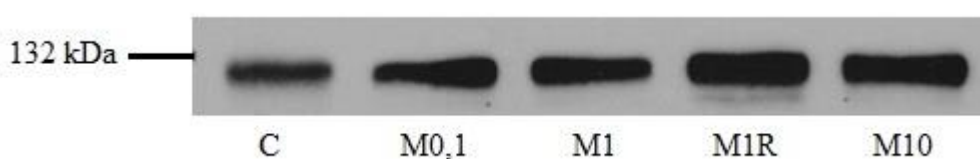


*Graf 8:* Imunoblot a grafické znázornění exprese  $G\alpha_{q/11}$  podjednotky G-proteinů. V případě tohoto proteinu bylo oproti kontrolním vzorkům patrné mírné zvýšení exprese v jednotlivých morfinových skupinách. Tyto změny však nebyly statisticky významné na hladině  $p < 0,05$  z důvodu velkých odchylek od průměru. Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese  $G\alpha_{q/11}$  v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).

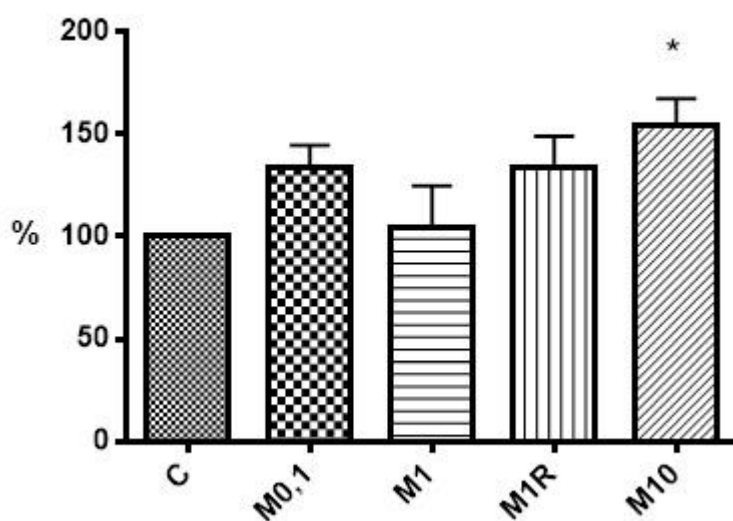
II) Studium exprese AC V/VI v myokardu potkana po podání nižších a vyšších dávek morfinu metodami SDS-PAGE a Western blotting.

#### Exprese AC V/VI

Metodou imunoblotu byl zkoumán jeden z ústředních enzymů G-proteinové signalizace, AC. AC V a VI jsou nejběžnější podtypy tohoto enzymu v srdci. AC V/VI (Graf 9) byla detekována ve vzorcích kontrolních potkanů i morfinem ovlivněných potkanů a při nejvyšší dávce morfinu (10 mg/kg za den, 10 dní) došlo k signifikantní změně v expresi tohoto enzymu.



#### AC V/VI

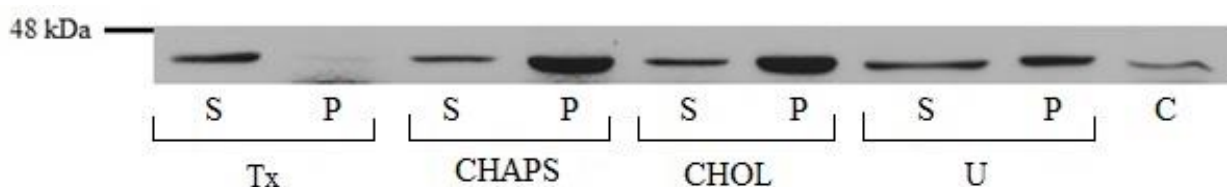


Graf 9: Imunoblot a grafické znázornění exprese AC V/VI. V porovnání oproti kontrolním vzorkům vykazoval tento enzym zvýšenou expresi po podání jak nižších (0,1 mg/kg nebo 1 mg/kg za den), tak vyšších (10 mg/kg za den) dávek morfinu. Ale pouze v případě dávky 10 mg/kg byla změna v expresi AC V/VI vyhodnocena jako signifikantně zvýšena. Statistická významnost byla hodnocena na hladině  $p < 0,05$ . Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese AC V/VI v morfinových vzorcích oproti kontrole (C).

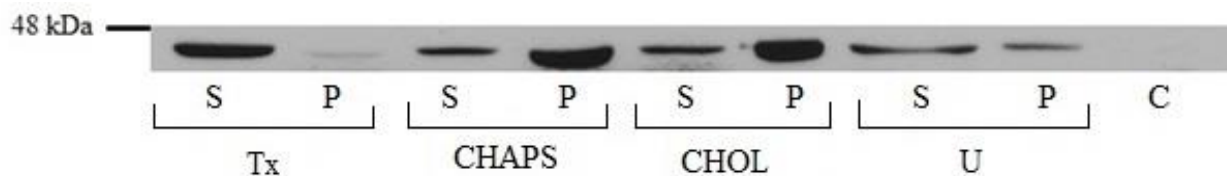
## 9.2 Studium exprese $\beta_1$ - a $\beta_2$ -AR a $\beta$ -arrestinu v membránových mikrodoménách v kontrolních vzorcích myokardu potkana a ve vzorcích po podání vysokých dávek morfinu (10 mg/kg za den) pomocí SDS-PAGE a Western blottingu

I) Imunoblotsy (a, b) a grafické znázornění (Graf 10) exprese  $\beta_1$ -AR v membránových mikrodoménách (P) a frakci solubilizovaných proteinů (S) u vzorků získaných z kontrolních potkanů (a) a potkanů po podání dávky morfinu 10 mg/kg/den (b). Po podání morfinu v dávce 10 mg/kg za den nedocházelo k signifikantním změnám v distribuci tohoto receptoru v rámci membrány po použití námi vybraných detergentů.  $\beta_1$ -AR byl lokalizován jak v detergent-rezistentních lipidových doménách, tak ve frakci solubilizovaných proteinů.

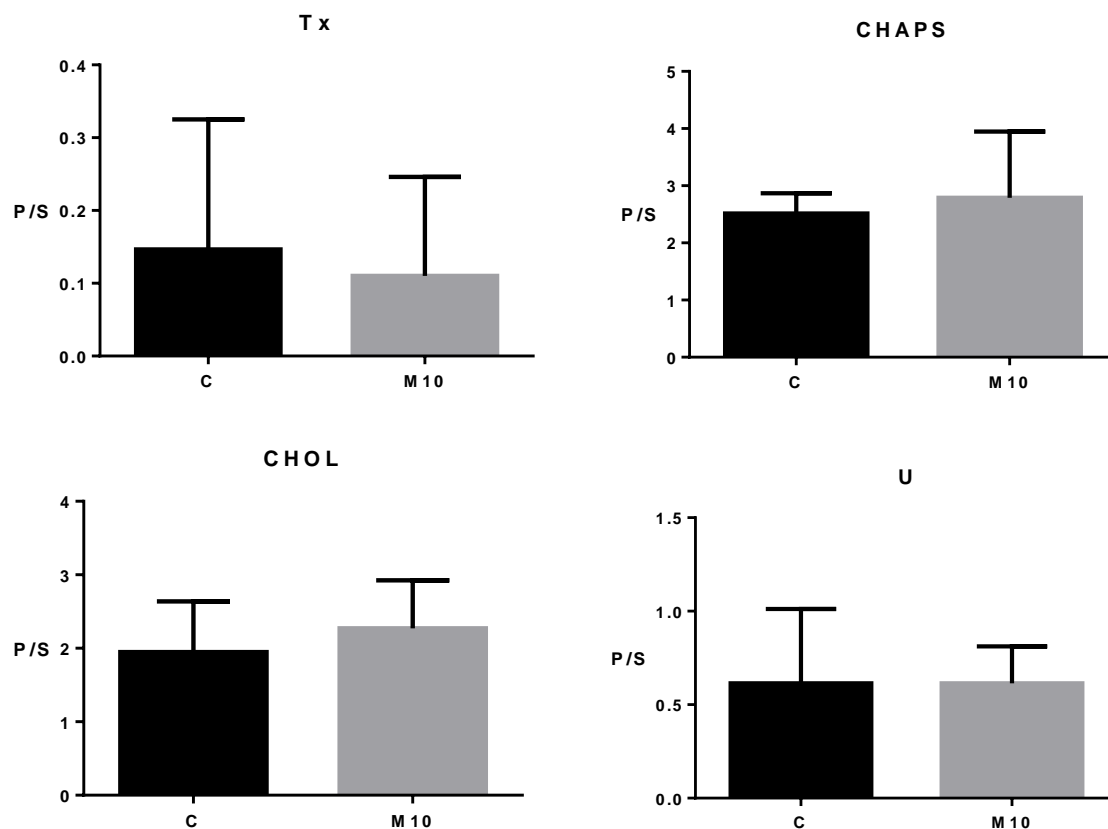
(a) C  $\beta_1$ -AR



(b) M10  $\beta_1$ -AR



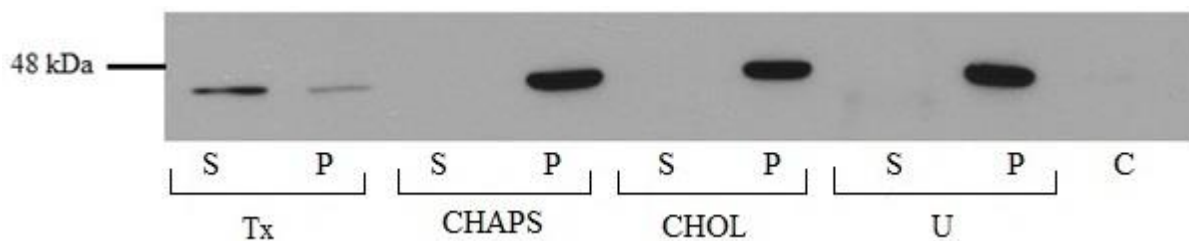
Tx = Triton X-100, CHOL = cholát sodný, U = uhličitan sodný, S = solubilizované proteiny, P = detergent-rezistentní lipidové domény, C = kontrolní vzorek PNS mozku.



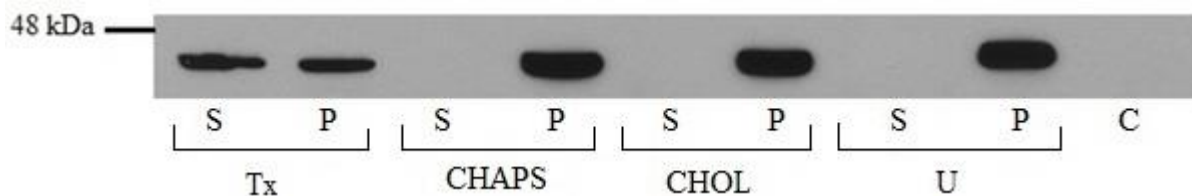
*Graf 10:* Grafické znázornění exprese  $\beta_1$ -AR v membránových mikrodoménech u kontrolních (C) a morfinem (M10 = 10 mg/kg/den) ovlivněných zvířat po použití čtyř různých detergentů. Na ose y je znázorněna relativní úroveň exprese  $\beta_1$ -AR vyjádřená poměrem imunochemického signálu detergent-rezistentních lipidových domén (P, pelet) a solubilizovaných proteinů (S, supernatant). Statistická významnost byla zamítnuta na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

II) Immunoblotsy (a, b) a grafické znázornění (Graf 11) exprese  $\beta_2$ -AR v membránových mikrodoménách (P) a frakci solubilizovaných proteinů (S) u vzorků získaných z kontrolních potkanů (a) a potkanů po podání dávky morfinu 10 mg/kg/den (b). Po podání morfinu v dávce 10 mg/kg za den docházelo ve všech vzorcích ke zvýšení signálu tohoto receptoru. Při použití detergentu Triton X-100 a CHAPS se množství  $\beta_2$ -AR v morfinem ovlivněných vzorcích zvýšilo statisticky významně. Také docházelo ke změnám v distribuci tohoto receptoru v rámci buněčné membrány. Po použití detergentů CHAPS, CHOL a U byl  $\beta_2$ -AR přítomen výhradně v detergent-rezistentních lipidových doménách a to jak ve vzorcích kontrolních, tak morfinových.

(a) C  $\beta_2$ -AR

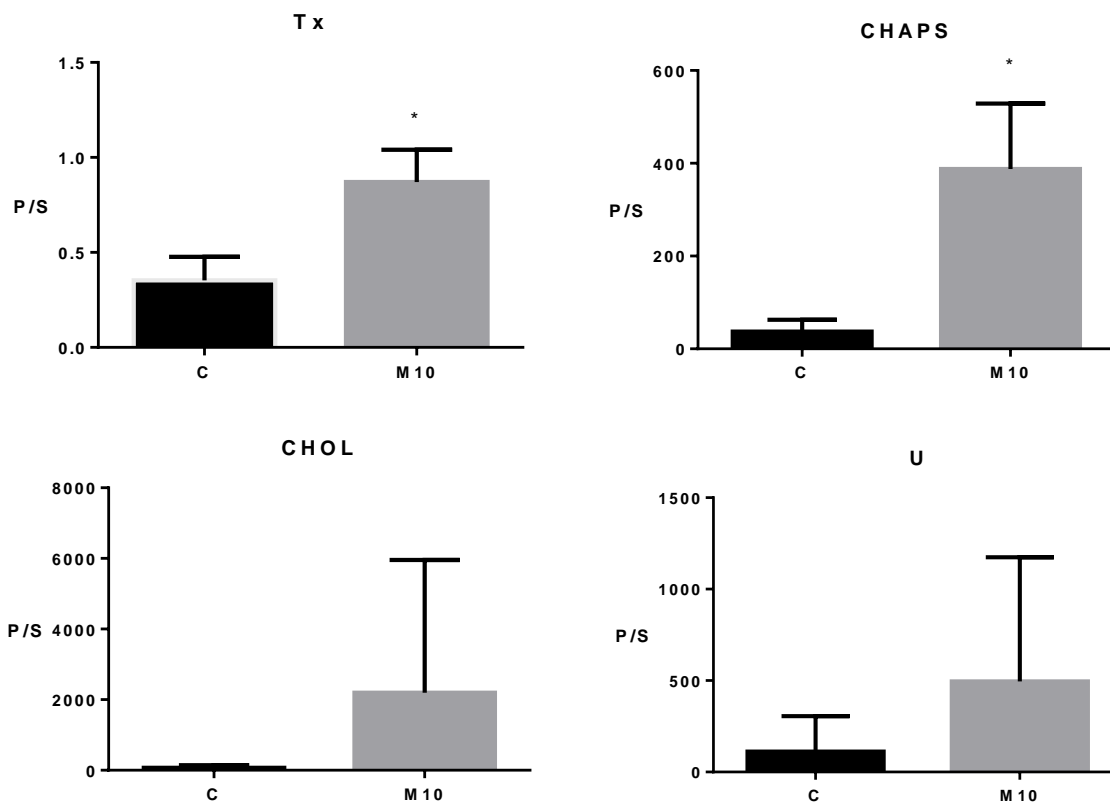


(b) M10  $\beta_2$ -AR



Tx = Triton X-100, CHOL = kyselina cholová, U = uhličitan sodný, S = solubilizované proteiny, P = detergent-rezistentní lipidové domény, C = kontrolní vzorek PNS mozku.

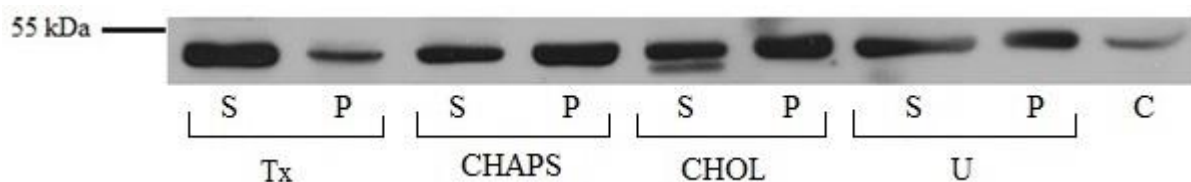




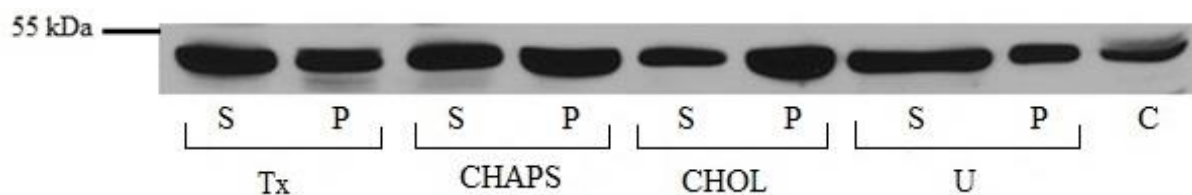
*Graf 11:* Grafické znázornění exprese  $\beta_2$ -AR v membránových mikrodoménách u kontrolních (C) a morfinem (M10 = 10 mg/kg/den) ovlivněných zvířat po použití čtyř různých detergentů. Na ose y je znázorněna relativní úroveň exprese  $\beta_2$ -AR vyjádřená poměrem imunochemického signálu detergent-rezistentních lipidových domén (P, pelet) a solubilizovaných proteinů (S, supernatant). Statistická významnost byla měřena na hladině  $p < 0,05$ .

III) Immunoblotsy (a, b) a grafické znázornění (Graf 12) exprese  $\beta$ -arrestinu v membránových mikrodoménách (P) a frakci solubilizovaných proteinů (S) u vzorků získaných z kontrolních potkanů (a) a potkanů po podání dávky morfinu 10 mg/kg/den (b). Po podání morfinu v dávce 10 mg/kg za den nedocházelo k signifikantním změnám v distribuci tohoto receptoru v rámci membrány po použití námi vybraných detergentů.  $\beta$ -arrestin byl lokalizován jak v detergent-rezistentních lipidových doménách, tak ve frakci solubilizovaných proteinů.

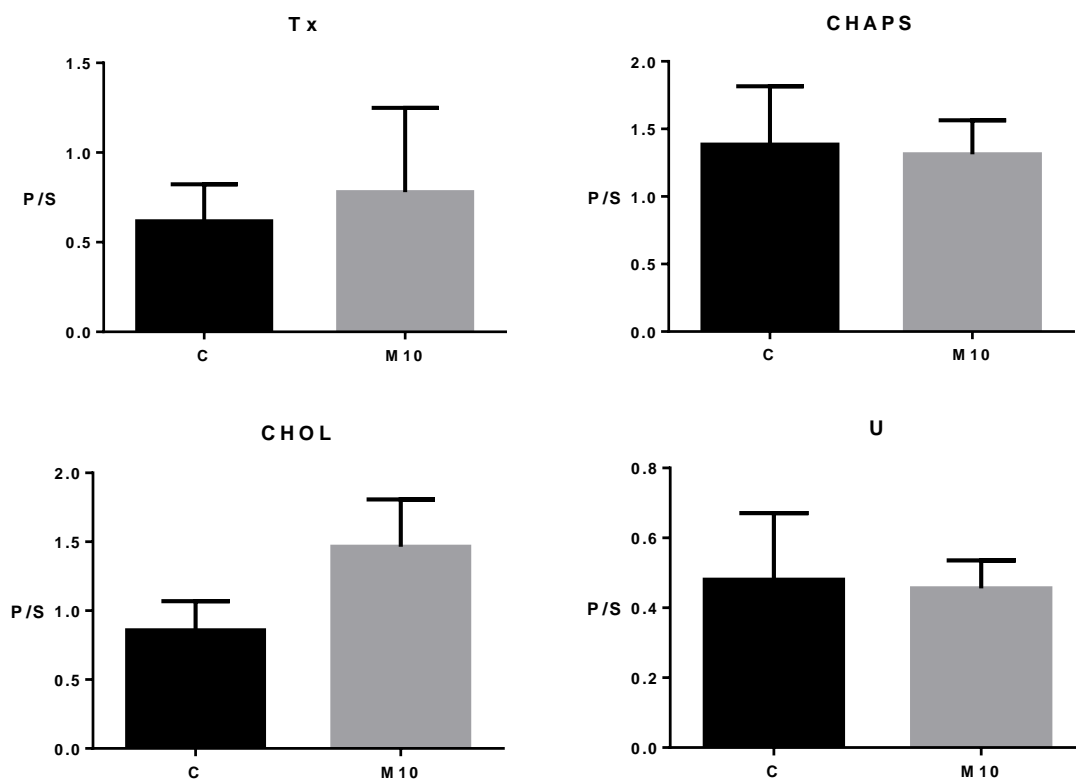
(a) C  $\beta$ -arrestin 1/2



(b) M10  $\beta$ -arrestin 1/2



Tx = Triton X-100, CHOL = kyselina cholová, U = uhličitan sodný, S = solubilizované proteiny, P = detergent-rezistentní lipidové domény, C = kontrolní vzorek PNS mozku.

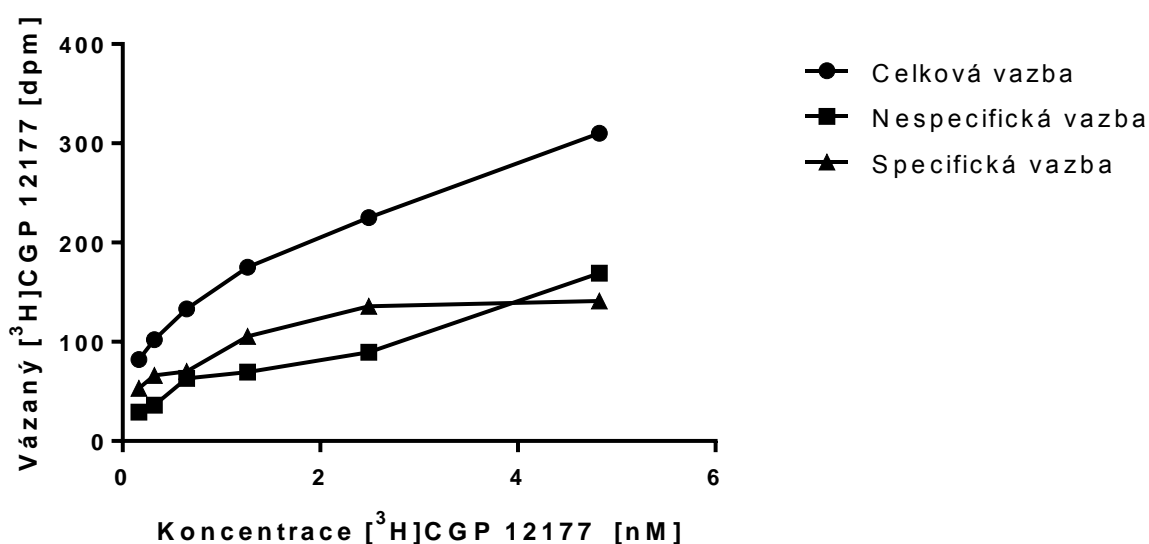


*Graf 12:* Grafické znázornění exprese  $\beta$ -arrestinu v membránových mikrodoménách u kontrolních (C) a morfinem (M10 = 10 mg/kg/den) ovlivněných zvířat po použití čtyř různých detergentů. Na ose y je znázorněna relativní úroveň exprese  $\beta$ -arrestinu vyjádřená poměrem imunochemického signálu detergent-rezistentních lipidových domén (P, pelet) a solubilizovaných proteinů (S, supernatant). Statistická významnost byla zamítnuta na hladině  $p < 0,05$ .

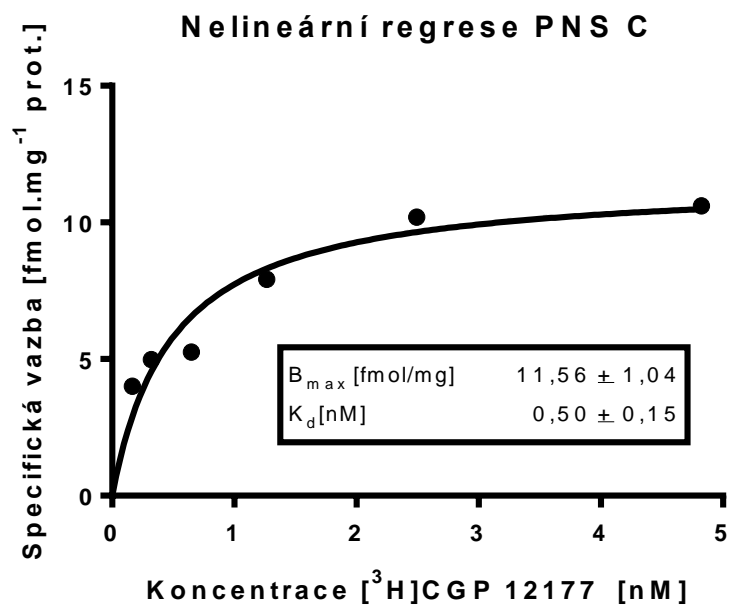
### 9.3 Stanovení množství a afinity $\beta$ -AR ve vzorcích postnukleárního supernatantu (PNS) a porovnání vazby $\beta$ -AR v plazmatických membránách kontrolních vzorků myokardu a vzorků plazmatických membrán ovlivněných morfinem za pomoci specifického radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177

Jako citlivější metoda než imunoblot byly pro zjištění distribuce  $\beta$ -AR použity saturační vazebné experimenty. Byla zkoumána závislost vazby radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177 na množství proteinů (receptorů) ve vzorku, neboli na množství vazebných míst ( $B_{max}$ ), a jejich afinitě ( $K_d$ ).

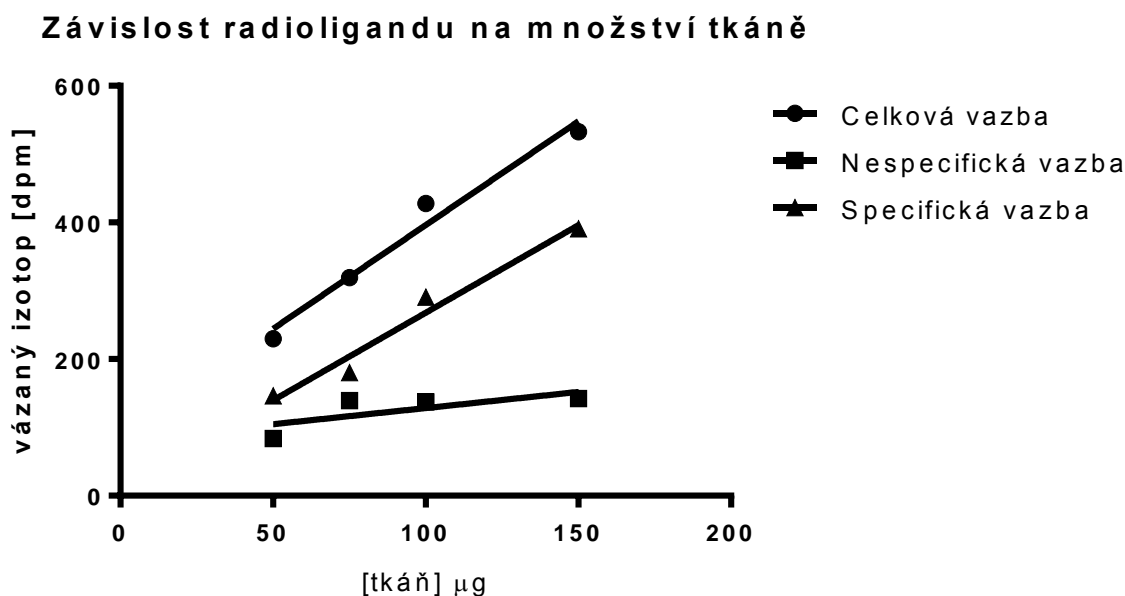
Saturačními vazebnými experimenty bylo ve vzorcích PNS u kontrolní skupiny potkanů měřeno množství specificky vázaného radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177 v závislosti na jeho rostoucí koncentraci (Grafy 13 a 14). Graf 15 zobrazuje závislost vazby radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177 na množství tkáně ve vzorcích PM kontrolních potkanů.



Graf 13: Vazebná křivka znázorňující celkovou, specifickou a nescifickou vazbu [ $^3$ H]CGP 12177 ve vzorcích PNS kontrolních skupin potkanů. Vyhodnocení experimentu bylo provedeno v programu Microsoft Excel, graf byl vytvořen v programu GraphPad Prism 6. Specifická vazba odpovídá rozdílu průměrných hodnot vazby celkové a nescifické. Na ose x je znázorněna nanomolární koncentrace ligandu [ $^3$ H]CGP 12177 a na ose y celková, specifická a nescifická vazba ligandu [ $^3$ H]CGP 12177 v počtech přeměn za minutu (dpm).



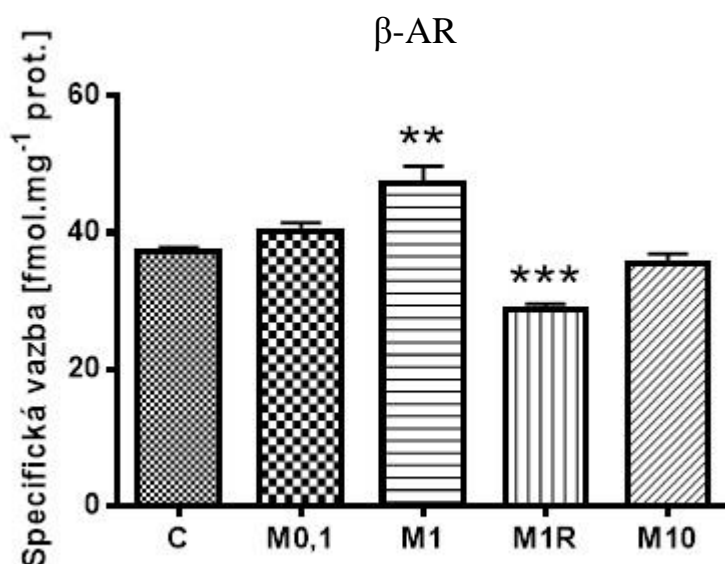
Graf 14: Saturační vazebná křivka znázorňující specifickou vazbu  $[^3\text{H}]\text{CGP 12177}$  ve vzorcích PNS u kontrolních potkanů (C). Parametry  $B_{max}$  a  $K_d$ , které určují množství a afinitu  $\beta\text{-AR}$  ve vzorku za pomoci specifického radioligandu, byly hodnoceny nelineární regresí pomocí programu GraphPad Prism 6.



Graf 15: Grafické znázornění závislosti vazby radioligandu  $[^3\text{H}]\text{CGP 12177}$  na množství tkáně v kontrolních vzorcích PM. Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 6. Z naměřených hodnot bylo pro další experimenty vyhodnoceno jako vhodné ředění tkáně  $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ .

## Porovnání vazby $\beta$ -AR v plazmatických membránách kontrolních vzorků myokardu a vzorků plazmatických membrán ovlivněných morfinem za pomoci specifického radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177

Graf 16 znázorňuje porovnání exprese  $\beta$ -AR ve vzorcích PM pomocí saturačních vazebných pokusů s použitím neselektivního ligandu  $\beta$ -AR [ $^3$ H]CGP 12177. Znárodněny jsou průměry hodnot ze čtyř nezávislých vazebných pokusů. Ve všech čtyřech pokusech došlo k signifikantnímu zvýšení vazby při podání dávky 1 mg/kg za den po dobu 28 dní. Naproti tomu ta samá dávka následovaná 7 dny abstinence byla statisticky vyhodnocena jako signifikantně snižená. Statistická významnost byla určena na hladině  $p < 0,0001$ .



*Graf 16:* Jednobodové stanovení. Grafické znázornění průměrů hodnot získaných ze čtyř nezávislých vazebných pokusů s použitím vzorků PM připravených z LV kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných čtyřmi různými dávkami morfinu. Výsledky byly vyhodnoceny programem GraphPad Prism 6. Na ose y je znázorněna specifická vazba ligandu [ $^3$ H]CGP 12177 k  $\beta$ -AR.

## 10. Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv mají čtyři různé dávky morfinu (0,1 mg/kg za den po dobu 28 dní; 1 mg/kg za den po dobu 28 dní; 1 mg/kg za den po dobu 28 dní + následná abstinence 7 dní; 10 mg/kg za den po dobu 10 dní) na GPCRs (OR a  $\beta$ -AR) a G-proteiny v myokardu potkana. V rámci opioidního systému byla zkoumána exprese  $\kappa$ -OR a  $\delta$ -OR, neboť tyto dva subtypy OR patří mezi nejvíce se vyskytující OR v myokardu. U  $\beta$ -AR systému jsme se zaměřili na expresi  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR. V rámci této práce byly dále předmětem studia i G-proteiny, které interagují s GPCRs a společně tvoří jedny z nejrozšířenějších a nejvýznamnějších signalizačních drah v buňkách.  $G\alpha_s$  podjednotku se bohužel v rámci této práce nepodařilo detekovat, s největší pravděpodobností v důsledku malé specificity námi použité protilátky. Mezi podjednotky G-proteinů, jejichž exprese se nám podařila detekovat, patří  $G\alpha_{i1/2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  a  $G\beta$ . V souvislosti s těmito dvěma signalizačními systémy byla také studována exprese enzymu AC, důležité efektorové molekuly pro stimulační i inhibiční  $G\alpha$  podjednotky heterotrimerních G-proteinů.

Námi detekovaný  $\kappa$ -OR a  $\delta$ -OR nevykazovaly žádné změny v expresi ve vzorcích PNS z levých komor myokardu po podání morfinu. Nedocházelo ani k významným změnám v expresi  $\beta_1$ -AR. Exprese  $\beta_2$ -AR se významně snížila při použití dávky 10 mg/kg/den. Když jsme zvolili citlivější metodu a stanovili vazbu  $\beta$ -AR v našich vzorcích pomocí neselektivního ligandu [ $^3$ H]CGP 12177, při podání dávky morfinu 1 mg/kg/den po dobu 28 dní bylo detekováno významné zvýšení specifické vazby. Naproti tomu ta samá dávka morfinu (1 mg/kg/den po dobu 28 dní) následovaná 7 dny abstinence významně snížila specifickou vazbu. Podařilo se nám prokázat rozdílnou distribuci  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR v rámci buněčné membrány. Zatímco  $\beta_1$ -AR se vyskytovaly jak ve frakci detergent-rezistentních lipidových domén, tak ve frakci solubilizovaných proteinů,  $\beta_2$ -AR byl lokalizován téměř výhradně ve vzorcích obsahujících detergent-rezistentní lipidové domény. U  $\beta_2$ -AR dokonce došlo k významnému zvýšení množství tohoto receptoru v rámci detergent-rezistentních lipidových mikrodomén izolovaných detergenty Triton X-100 a CHAPS po podání dávky 10 mg/kg/den morfinu po dobu 10 dní oproti kontrolní skupině potkanů.  $\beta$ -arrestin, důležitý regulační faktor GPCRs, se vyskytoval v obou frakcích – ve frakci bohaté na lipidové mikrodomény i ve frakci solubilizovaných proteinů a nedocházelo k významným změnám v jeho lokalizaci při srovnání kontrolních a morfinem ovlivněných vzorků.

Opioidní receptory i  $\beta$ -adrenergní receptory patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (Knapp et al., 1995; Salazar et al., 2007). Po podání morfinu nedocházelo k významnému zvýšení či snížení v expresi  $G\beta$ ,  $G\alpha_{q/11}$ , ani  $G\alpha_{i1/2}$  podjednotek

heterotrimerních G-proteinů. Rozdíl v expresi byl detekován pouze u  $G\alpha_{i3}$  podjednotky, u které docházelo ve všech zkoumaných dávkách morfinu k signifikantnímu zvýšení.

Morfin se může vázat na všechny tři typy OR. Nejhojněji je v srdeční tkáni zastoupen  $\delta$ -OR, zatímco exprese  $\mu$ -OR v srdeční tkáni nebyla prokázána (Wittert et al., 1996). Proto v rámci této práce byly studovány pouze  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR. Exprese těchto dvou receptorů se v myokardu potkanů při dlouhodobém podávání morfinu v nízkých dávkách po dobu 28 dní neměnila. Nedošlo ke změnám v expresi ani při podávání vysoké dávky morfinu po dobu 10 dní. To by mohlo být vysvětleno tak, že žádná z analyzovaných dávek morfinu nespouštěla v buňkách desenzitizaci těchto opioidních receptorů nebo dokonce jejich internalizaci. Desenzitizace je významným regulačním mechanismem všech receptorů spřažených s G-proteiny, tedy i opioidních receptorů. Předchází jí dlouhodobá aktivace receptoru příslušným ligandem a jeho následná fosforylace. Pokud je receptor fosforylován nespécifickou kinázou, dochází ke spuštění tzv. heterologní desenzitizace (Hausdorff et al., 1989; Mysliveček and Trojan, 2003). Při homologní desenzitizaci fosforyluje specifická kináza receptorů spřažených s G-proteiny (GRK) pouze receptory, které jsou aktivovány ligandem a je aktivována tzv. homologní desenzitizace. Následně dojde k vazbě  $\beta$ -arrestinu, což je proces, který přímo vede k „rozpřažení“ receptoru od příslušného G-proteinu (Ferguson, 2001). Po desenzitizaci jsou receptory endocytovány ve váčcích do intracelulárního prostoru, odkud mohou být následně recyklovány do buněčné membrány (resenzitizace), či jsou připraveny k degradaci (downregulace). Tyto procesy mohou přímo přispět k toleranci snižováním počtu receptorů na povrchu buňky. Naše úvaha by mohla být podpořena studiemi na buněčných kulturách, které prokazují, že působení morfinu neinicuje desenzitizaci a internalizaci receptoru (Whistler and Zastrow, 1998). Keith se svými spolupracovníky zkoumali vliv enkefalinů, etorfinu a morfinu na indukci desenzitizace  $\mu$ - a  $\delta$ -OR. Zatímco působení endogenních opioidů a etorfinu vyvolávalo internalizaci  $\mu$ - a  $\delta$ -OR, působení morfinu nespouštělo internalizaci těchto dvou receptorů ani při koncentracích, které silně inhibovaly adenylycyklázu (Keith et al., 1996). Naše výsledky tedy potvrzují dřívější studie, kdy podání morfinu na receptorové úrovni nejspíše nevedlo k iniciaci složitých a velmi energeticky náročných procesů, jako jsou desenzitizace a internalizace.

$\beta$ -Adrenergní systém je jeden z nejvýznamnějších regulačních systémů v srdci. Byly zde nalezeny  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR a  $\beta_3$ -AR (Gauthier et al., 1996). Srdeční tkáň tedy exprimuje odlišné podtypy  $\beta$ -AR, které mají poněkud odlišné role v ovlivňování srdečních funkcí a při srdečním selhání (Lohse et al., 2003). Převládajícím podtypem těchto receptorů v myokardu jsou  $\beta_1$ -AR. Tvoří tam až 80 % všech  $\beta$ -AR (Rockman et al., 2002).



Opioidy mohou modulovat funkci  $\beta$ -AR v myokardu. Při aktivaci sympatických nervových zakončení v srdci dochází k společnému uvolnění endogenních opioidů a noradrenalinu. Všechny typy  $\beta$ -AR se spřahují se stimulační podjednotkou G-proteinu. OR tak svým spřažením s  $\alpha_i$  podjednotkou G-proteinů antagonizují pozitivní účinky  $\beta$ -AR systému na srdeční činnost (Pepe et al., 2004). O působení morfinu na katecholaminergní systém je známo, že vyvolává zvýšení množství katecholaminů a to jak v mozkové tkáni (Fuentealba et al., 2000), tak v srdeční (Rabadan et al., 1997). Naše experimenty při použití techniky imunoblot nenaznačily žádné signifikantní rozdíly v expresi  $\beta_1$ -AR v porovnání morfinových vzorků se vzorkem kontrolním. Naproti tomu,  $\beta_2$ -AR vykazoval statisticky významně sníženou expresi po podání 10 mg/kg/den po dobu 10 dní v porovnání se vzorkem kontrolním, což nekorespondovalo se zvýšenou distribucí tohoto receptoru v detergent-rezistentních membránových mikrodoménách při použití detergentu Triton X-100 a CHAPS po podání téže dávky. Při použití cholátu a uhličitanu byl také pozorován mírný nárůst v množství  $\beta_2$ -AR v membránových mikrodoménách po podání 10 mg/kg/den morfinu po dobu 10 dní, který však nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Tento určitý rozpor mezi výsledky stanovení receptorů bychom nejspíše mohli částečně vysvětlit použitím různých typů vzorků a odlišných metod jejich detekce. Zajímavé bylo zjištění obrovského rozdílu v distribuci  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR v rámci většinové fáze plazmatické membrány a membránových mikrodoménách. Zatímco  $\beta_2$ -AR se preferenčně nacházejí v oblastech bohatých na kaveolin, lokalizace  $\beta_1$ -AR není v rámci membrány nijak rozlišena (Philipp and Hein, 2004). V membránových mikrodoménách dochází k tvorbě signalizačních komplexů tvořených receptory, G-proteiny a jejich efektorů (Okamoto et al., 1998). Po působení ligandu (morfinu) dochází k přenosu signálu prostřednictvím komplexů OR s příslušnými G-proteiny na efektorové proteiny. Je možné se domnívat, že stimulace vysokými dávkami morfinu mohla vyvolat zvýšené uvolňování katecholaminů, a že se buňky myokardu s touto situací vyrovnaly poněkud odlišnou expresí  $\beta_2$ -AR. Podání vysoké dávky morfinu mohlo tedy indukovat adaptační procesy spojené se změnou genové exprese membránových receptorů. Můžeme ale pouze spekulovat o tom, zda a proč by se to buňce mělo vyplatit. Aplikace 10 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní neměla vliv na expresi  $\beta$ -arrestinu, proteinu hrajícímu roli v regulačních procesech spojených s recyklací či degradací receptorů, a zřejmě nevyvolala desensitizaci a internalizaci  $\beta$ -AR. Citlivější metoda saturačních vazebných pokusů ukázala signifikantní zvýšení v počtu receptorů po podání dávky 1 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní. U té samé dávky následované týdnem abstinence překvapivě docházelo k významnému poklesu v expresi těchto receptorů. Zvýšený počet  $\beta$ -AR byl pozorován také ve studii Ammera a Schulze, kteří pozorovali vzrůst  $\beta_2$ -AR

spojený se stimulací AC po chronickém podání morfinu na buněčných kulturách (Ammer and Schulz, 1997). Již dříve bylo prokázáno vazebnými pokusy s radioligandy, že po chronickém podávání morfinu se zvýšil počet  $\beta$ -AR v mozkové tkáni u potkanů. Po následující abstinenci docházelo k poklesu v počtu těchto receptorů (Moises and Smith, 1987). K obdobným výsledkům se došlo i v další studii (Ackerman et al., 1994). Nárůst a následný pokles v počtu  $\beta$ -AR po dlouhodobém podávání morfinu by mohl být následkem kompenzačních adaptací postsynaptického systému na změny v obratu noradrenalinu, které jsou doprovodným jevem při opiátové abstinenci.

Studium signalizace na úrovni G-proteinů zatím zůstává v literatuře kontroverzní. Některé studie prováděné na CNS ukazují, že dlouhodobé podávání morfinu vedlo k významným změnám v expresi určitých podjednotek G-proteinů, ale pouze v příslušných oblastech CNS. V nucleus accumbens docházelo po dlouhodobé aplikaci morfinu a následných 2 hodinách od poslední aplikace k zvýšení v expresi  $G\alpha_i$  podjednotky a k poklesu v expresi  $G\alpha_s$  podjednotky. Po 48 hodinách od poslední aplikace morfinu docházelo k nárůstu exprese také podjednotek  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$ ,  $G\alpha_{11}$  a  $G\alpha_o$ . V amygdale a prefrontálním kortexu naproti tomu nedocházelo k významným změnám v expresi  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$ ,  $G\alpha_{11}$ , ani  $G\alpha_s$  či  $G\alpha_i$  podjednotek (Nalepa et al., 2007). Podobné výsledky jsou pozorovány i v další práci (Fabian et al., 2002). Jiné studie ale nezaznamenaly žádnou změnu v expresi G-proteinů po dlouhodobém působení morfinu (Skrabalova et al., 2012). Ani z našich výsledků nemůžeme jasně říci, zda po dlouhodobém podávání morfinu dochází či nedochází ke změně v expresi  $G\alpha$  proteinů. Zatímco exprese  $G\beta$  podjednotky zůstala po působení morfinu nezměněná pro všechny analyzované dávky, exprese  $G\alpha$  podjednotek se značně lišila. Docházelo k rozdílům dokonce i u dvou studovaných  $G\alpha_i$  podjednotek.  $G\alpha_{i3}$  podjednotka vykazovala signifikantní zvýšení pro každou z morfinových dávek, naproti tomu u  $G\alpha_{i1/2}$  podjednotky se neprokázalo signifikantní zvýšení, ačkoli byl pozorován mírný nárůst v její expresi po podání morfinu. Stejný výsledek jsme zaznamenali i pro  $G\alpha_{q/11}$  podjednotku. Tyto rozporuplné výsledky by se daly přičíst relativně málo přesné metodě imunoblotu. Pro rozhodnutí, zda příslušné podjednotky G-proteinů mění svou expresi ve vzorcích myokardu po podání morfinu, by bylo třeba pokusy ještě zopakovat a vyvarovat se velkým odchýlkám od průměru.

Adenylylcykláza (AC) je enzym, který přeměňuje ATP na cAMP. cAMP poté aktivuje cAMP dependentní protein kinázu (PKA), která řídí mnoho důležitých procesů v buňce. Je známo 9 izoforem AC s vysokou tkáňovou specificitou. V srdci dominují izoformy AC V a AC VI, které jsou si ze všech izoforem strukturně nejpodobnější (Hanoune et al., 1997; Katsushika et al., 1992). Je známo, že akutní aktivace receptorů spřahujících se s  $G\alpha_{i/o}$

proteiny snižuje koncentraci intracelulárního cAMP, zatímco dlouhodobé působení agonistů (v případě opioidních receptorů hlavně morfinu) zvyšuje koncentraci cAMP. Tomuto fenoménu se říká heterologní senzitivace AC a byl poprvé použit pro vysvětlení tolerance a vzniku abstinčního syndromu po chronickém působení opioidů. Mohl by být mechanismem, kterým se buňky adaptují na dlouhotrvající aktivaci inhibičních receptorů (Watts, 2002). V našem experimentu docházelo k signifikantnímu zvýšení exprese AC pouze po podání 10 mg/kg/den morfinu po dobu 10 dní. Ve studii provedené Ammerem a Schulzem (Ammer and Schulz, 1997) zároveň spolu s heterologní senzitivací AC docházelo k zvýšenému nárůstu v počtu  $\beta_2$ -AR (o 40 %), což se nám pro tuto dávku morfinu nepodařilo prokázat ani pomocí imunoblotů, ani pomocí saturačních vazebných pokusů. Změnu v množství či afinitě  $\beta$ -AR nezaznamenala ani nedávná studie (Skrabalova et al., 2012). Můžeme se domnívat, že senzitivace AC byla způsobena signifikantně zvýšenou expresí  $G\alpha_{i3}$  podjednotky inhibičních G-proteinů a potenciálně také změnou počtu receptorů spřahujících se s touto podjednotkou nebo účinností tohoto spřažení. Tato představa však zůstává prozatím pouze v hypotetické rovině.

## 11. Závěr

Výsledky této diplomové práce naznačují, že dlouhodobé působení nízkých i vysokých dávek morfinu ovlivňuje signalizaci receptorů spřažených s G-proteiny v myokardu potkana. Po podávání dávky morfinu 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní byla pozorována zvýšená exprese pouze u  $G\alpha_{i3}$  heterotrimerního G-proteinu. Ke změnám v expresi docházelo také v případě podávání morfinu v dávkách 1 mg/kg/den po dobu 28 dní a u stejné dávky následované 7 dny abstinence, kdy jsme pomocí saturačních vazebných pokusů zaznamenali změny v počtu  $\beta$ -AR. Prvotní vzrůst v počtu těchto receptorů a následný pokles při vysazení morfinu bychom mohli vysvětlit aktivací adaptačních mechanismů postsynaptického systému, která byla vyvolána změnami v obratu katecholaminů. Největší změny se však projevily po chronickém podávání morfinu v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dní. Zaznamenali jsme zvýšení denzity  $\beta_2$ -AR v lipidových mikrodoménách. Docházelo k signifikantnímu zvýšení exprese  $G\alpha_{i3}$  podjednotky G-proteinů, která by mohla hrát klíčovou roli v procesu heterologní senzitivace AC V/VI. Z výsledků této práce bychom tedy mohli usuzovat na propojení opioidního a  $\beta$ -adrenergního systému v myokardu. V oblasti této problematiky bude ještě potřeba provést řadu studií, neboť  $\beta$ -adrenergní systém je jeden z klíčových regulátorů srdečních funkcí. Porozumění účinkům morfinu na  $\beta$ -adrenergní signalizaci v srdeční tkáni by mohlo pomoci odpovědět na řadu otázek spojených se srdečními patofyziologiemi.

## 12. Literatura

- Ackerman, J. M., M. D. Womble, and H. C. Moises. 1994. Multiple effects of long-term morphine treatment on postsynaptic beta-adrenergic-receptor function in hippocampus - an intracellular analysis. *Brain Research* 656 (2):309-318.
- Ammer, H., and R. Schulz. 1997. Chronic morphine treatment increases stimulatory beta-2 adrenoceptor signaling in A431 cells stably expressing the mu opioid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280 (1):512-520.
- Barak, L. S., S. S. G. Ferguson, J. Zhang, and M. G. Caron. 1997. A beta-arrestin green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* 272 (44):27497-27500.
- Bell, S. P., M. N. Sack, A. Patel, L. H. Opie, and D. M. Yellon. 2000. Delta opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle. *Journal of the American College of Cardiology* 36 (7):2296-2302.
- Blumer, J. B., M. J. Cismowski, M. Sato, and S. M. Lanier. 2005. AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (9):470-476.
- Blumer, J. B., A. V. Smrcka, and S. M. Lanier. 2007. Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacology & Therapeutics* 113 (3):488-506.
- Brodde, O. E., H. Bruck, and K. Leineweber. 2006. Cardiac adrenoceptors: Physiological and pathophysiological relevance. *Journal of Pharmacological Sciences* 100 (5):323-337.
- Brodde, O. E., and M. C. Michel. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews* 51 (4):651-689.
- Calo, G., R. Guerrini, A. Rizzi, S. Salvadori, and D. Regoli. 2000. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *British Journal of Pharmacology* 129 (7):1261-1283.
- Calo, G., A. Rizzi, R. Bigoni, R. Guerrini, S. Salvadori, and D. Regoli. 2002. Pharmacological profile of nociceptin/orphanin FQ receptors. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29 (3):223-228.
- Chen, Z. L., T. Z. Li, and B. X. Zhang. 2008. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Journal of Surgical Research* 145 (2):287-294.
- Claing, A., W. Chen, W. E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz. 2001. beta-arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta(2)-adrenergic receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 276 (45):42509-42513.

- Communal, C., K. Singh, D. B. Sawyer, and W. S. Colucci. 1999. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis - Role of a pertussis toxin-sensitive G proteins. *Circulation* 100 (22):2210-2212.
- Cuello, F., R. A. Schulze, F. Heemeyer, H. E. Meyer, S. Lutz, K. H. Jakobs, F. Niroomand, and T. Wieland. 2003. Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and G beta subunits - Complex formation of NDPK B with G beta gamma dimers and phosphorylation of His-266 in G beta. *Journal of Biological Chemistry* 278 (9):7220-7226.
- Devic, E., Y. Xiang, D. Gould, and B. Kobilka. 2001. beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Molecular Pharmacology* 60 (3):577-583.
- Dorsam, R. T., and J. S. Gutkind. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* 7 (2):79-94.
- Engelhardt, S., and F. Rochais. 2007. G proteins - More than transducers of receptor-generated signals? *Circulation Research* 100 (8):1109-1111.
- Fabian, G., B. Bozo, M. Szikszay, G. Horvath, C. J. Coscia, and M. Szucs. 2002. Chronic morphine-induced changes in mu-opioid receptors and G proteins of different subcellular loci in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302 (2):774-780.
- Ferguson, S. S. G. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews* 53 (1):1-24.
- Fuentealba, J. A., M. I. Forray, and K. Gysling. 2000. Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of norepinephrine in the rat bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Neurochemistry* 75 (2):741-748.
- Gauthier, C., G. Tavernier, F. Charpentier, D. Langin, and H. LeMarec. 1996. Functional beta(3)-adrenoceptor in the human heart. *Journal of Clinical Investigation* 98 (2):556-562.
- Gesty-Palmer D. and Louis M. Luttrell. 2004. G Protein-Coupled Receptors. *In: Editor-in-Chief: Luciano Martini, Editor(s)-in-Chief, Encyclopedia of Endocrine Diseases, Elsevier New York, 2004:331-343.*
- Hanoune, J., Y. Pouille, E. Tzavara, T. S. Shen, L. Lipskaya, N. Miyamoto, Y. Suzuki, and N. Defer. 1997. Adenylyl cyclases: Structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology* 128 (1-2):179-194.
- Hausdorff, W. P., M. Bouvier, B. F. Odowd, G. P. Irons, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. 1989. Phosphorylation sites on 2 domains of the beta-2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 264 (21):12657-12665.

- Head, B. P., H. H. Patel, D. M. Roth, N. C. Lai, I. R. Niesman, M. G. Farquhar, and P. A. Insel. 2005. G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280 (35):31036-31044.
- Hildebrandt, J. D. 1997. Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochemical Pharmacology* 54 (3):325-339.
- Horvath, G. 2000. Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous mu-opioid receptor agonists. *Pharmacology & Therapeutics* 88 (3):437-463.
- Inglese, J., N. J. Freedman, W. J. Koch, and R. J. Lefkowitz. 1993. Structure and mechanism of the g-protein-coupled receptor kinases. *Journal of Biological Chemistry* 268 (32):23735-23738.
- Katsushika, S., L. Chen, J. I. Kawabe, R. Nilakantan, N. J. Halnon, C. J. Homcy, and Y. Ishikawa. 1992. Cloning and characterization of a 6th adenylyl cyclase isoform - type-v and type-vi constitute a subgroup within the mammalian adenylyl cyclase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (18):8774-8778.
- Keith, D. E., S. R. Murray, P. A. Zaki, P. C. Chu, D. V. Lissin, L. Kang, C. J. Evans, and M. vonZastrow. 1996. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *Journal of Biological Chemistry* 271 (32):19021-19024.
- Kim, M. S., Y. P. Cheong, H. S. So, K. M. Lee, T. Y. Kim, Oh Jaymin, Y. T. Chung, Y. Son, B. R. Kim, and R. Park. 2001. Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). *Biochemical Pharmacology* 61 (7):779-786.
- Kimura, N., N. Shimada, Y. Ishijima, M. Fukuda, Y. Takagi, and N. Ishikawa. 2003. Nucleoside diphosphate kinases in mammalian signal transduction systems: Recent development and perspective. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 35 (1):41-47.
- Kindman, L. A., R. E. Kates, and R. Ginsburg. 1991. Opioids potentiate contractile response of rabbit myocardium to the beta-adrenergic agonist isoproterenol. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 17 (1):61-67.
- Knapp, R. J., E. Malatynska, N. Collins, L. Fang, J. Y. Wang, V. J. Hruby, W. R. Roeske, and H. I. Yamamura. 1995. Molecular-biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *Faseb Journal* 9 (7):516-525.
- Kobilka, B. K., and X. Deupi. 2007. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (8):397-406.
- Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron. 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta(2)-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry* 275 (30):23120-23126.

- Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. G. Ferguson, M. G. Caron, and L. S. Barak. 1999. The beta(2)-adrenergic receptor/beta arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7):3712-3717.
- Lemaire, A., H. A. Rockman, 2004. The role of G-protein-coupled receptors in heart failure. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 1 (1):37-43.
- Lohse, M. J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen. 2003. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circulation Research* 93 (10):896-906.
- Lohse, M. J., C. Krasel, R. Winstel, and F. Mayor. 1996. G-protein-coupled receptor kinases. *Kidney International* 49 (4):1047-1052.
- Milligan, G., and E. Kostenis. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* 147:S46-S55.
- Moises, H. C., and C. B. Smith. 1987. Changes in cortical beta-adrenergic-receptor density and neuronal sensitivity to norepinephrine accompany morphine-dependence and withdrawal. *Brain Research* 400 (1):110-126.
- Murphy, G. S., J. W. Szokol, J. H. Marymont, M. J. Avram, and J. S. Vender. 2006. Opioids and cardioprotection: The impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 20 (4):493-502.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, and K. A. Reimer. 1986. Preconditioning with ischemia - a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 (5):1124-1136.
- Myslivecek, J., and S. Trojan. 2003. Regulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in the heart. *General Physiology and Biophysics* 22 (1):3-14.
- Nalepa, I., A. Zelek-Molik, A. Bielawski, A. Roman, and J. Vetulani. 2007. Does the presence of morphine counteract adaptive changes in expression of G-protein alpha subunits mRNA induced by chronic morphine treatment? *Pharmacological Reports* 59 (1):34-45.
- Neer, E. J. 1994. G-proteins - critical control points for transmembrane signals. *Protein Science* 3 (1):3-14.
- Neves, S. R., P. T. Ram, and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296 (5573):1636-1639.
- Okamoto, T., A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane". *Journal of Biological Chemistry* 273 (10):5419-5422.
- Ostrom, R. S., J. D. Violin, S. Coleman, and P. A. Insel. 2000. Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: Colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Molecular Pharmacology* 57 (5):1075-1079.



- Peart, J. N., and G. J. Gross. 2006. Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291 (4):H1746-H1753.
- Peart, J. N., L. E. S. Hoe, G. J. Gross, and J. P. Headrick. 2011. Sustained Ligand-Activated Preconditioning via delta-Opioid Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336 (1):274-281.
- Pepe, S., O. W. V. van den Brink, E. G. Lakatta, and R. P. Xiao. 2004. Cross-talk of opioid peptide receptor and beta-adrenergic receptor signalling in the heart. *Cardiovascular Research* 63 (3):414-422.
- Philipp, M., and L. Hein. 2004. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* 101 (1):65-74.
- Pleuvry, B. J. 2005. Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 6 (1):30-34.
- Rabadan, J. V., M. V. Milanias, and M. L. Laorden. 1997. Effects of chronic morphine treatment on catecholamines content and mechanical response in the rat hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280 (1):32-37.
- Rabadan, J. V., M. V. Milanias, and M. L. Laorden. 1998. Changes in right atrial catecholamine content in native rats and after naloxone-induced withdrawal. *British Journal of Anaesthesia* 80 (3):354-359.
- Rockman, H. A., W. J. Koch, and R. J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415 (6868):206-212.
- Rohrer, D. K., K. H. Desai, J. R. Jasper, M. E. Stevens, D. P. Regula, G. S. Barsh, D. Bernstein, and B. K. Kobilka. 1996. Targeted disruption of the mouse beta 1-adrenergic receptor gene: Developmental and cardiovascular effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (14):7375-7380.
- Rosenbaum, D. M., S. G. F. Rasmussen, and B. K. Kobilka. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459 (7245):356-363.
- Rybin, V. O., X. H. Xu, M. P. Lisanti, and S. F. Steinberg. 2000. Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae - A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275 (52):41447-41457.
- Salazar, N. C., J. Chen, and H. A. Rockman. 2007. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1768 (4):1006-1018.
- Schultz, J. E., A. K. Hsu, and G. J. Gross. 1998. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta(1)- but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation* 97 (13):1282-1289.

- Schultz, J. J., A. K. Hsu, and G. J. Gross. 1997. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta) opioid receptor in the intact rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (8):2187-2195.
- Skrabalova, J., J. Neckar, L. Hejnova, I. Bartonova, F. Kolar, and J. Novotny. 2012. Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacological Reports* 64 (2):351-359.
- Takasaki, Y., R. A. Wolff, G. L. Chien, and D. M. Van Winkle. 1999. Met(5)-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via delta-opioid receptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 277 (6):H2442-H2450.
- Tikhonova, I. G., and S. Costanzi. 2009. Unraveling the Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors Through NMR Spectroscopy. *Current Pharmaceutical Design* 15 (35):4003-4016.
- Ventura, C., H. Spurgeon, E. G. Lakatta, C. Guarnieri, and M. C. Capogrossi. 1992. Kappa-opioid and delta-opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and ca<sup>2+</sup> release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circulation Research* 70 (1):66-81.
- Watts, V. J. 2002. Molecular mechanisms for heterologous sensitization of adenylyl cyclase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302 (1):1-7.
- Wettschureck, N., and S. Offermanns. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews* 85 (4):1159-1204.
- Whistler, J. L., and M. von Zastrow. 1998. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17):9914-9919.
- Wieland, T. 2007. Interaction of nucleoside diphosphate kinase B with heterotrimeric G protein beta gamma dimers: consequences on G protein activation and stability. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 374 (5-6):373-383.
- Wieland, T., and C. Mittmann. 2003. Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics* 97 (2):95-115.
- Wittert, G., P. Hope, and D. Pyle. 1996. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218 (3):877-881.
- Xiang, Y., E. Devic, and B. Kobilka. 2002a. The PDZ binding motif of the beta(1) adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277 (37):33783-33790.
- Xiang, Y., V. O. Rybin, S. F. Steinberg, and B. Kobilka. 2002b. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta(2)-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277 (37):34280-34286.

- Xiao, R. P., P. Avdonin, Y. Y. Zhou, H. P. Chen, S. A. Akhter, T. Eschenhagen, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch, and E. G. Lakatta. 1999a. Coupling of beta(2)-adrenoceptor to G(i) proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circulation Research* 84 (1):43-52.
- Xiao, R. P., H. P. Cheng, Y. Y. Zhou, M. Kuschel, and E. G. Lakatta. 1999b. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circulation Research* 85 (11):1092-1100.
- Xiao, R. P., S. Pepe, H. A. Spurgeon, M. C. Capogrossi, and E. G. Lakatta. 1997. Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 272 (2):H797-H805.
- Xiao, R. P., S. J. Zhang, K. Chakir, P. Avdonin, W. Z. Zhu, R. A. Bond, C. W. Balke, E. G. Lakatta, and H. P. Cheng. 2003. Enhanced G(i) signaling selectively negates beta(2)-adrenergic receptor (AR)- but not beta(1)-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation* 108 (13):1633-1639.
- Zhao, H., H. H. Loh, and P. Y. Law. 2006. Adenylyl cyclase superactivation induced by long-term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid rafts and is independent of receptor internalization. *Molecular Pharmacology* 69 (4):1421-1432.
- Zhao, Z. Q., J. S. Corvera, M. E. Halkos, F. Kerendi, N. P. Wang, R. A. Guyton, and J. Vinter-Johansen. 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285 (2):H579-H588.
- Zhu, W. Z., M. Zheng, W. J. Koch, R. J. Lefkowitz, B. K. Kobilka, and R. P. Xiao. 2001. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4):1607-1612.

[1] [http://ar.db.bjmu.edu.cn/signal/ARsingal\\_beta.htm](http://ar.db.bjmu.edu.cn/signal/ARsingal_beta.htm) (20.4.2013)