

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie

a

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.



**Morfiem navozené změny membránových a solubilních bílkovin
frontální mozkové kůry potkana**

Mgr. Hana Ujčíková

Doktorandská dizertační práce

2014

Školitel: **Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.**

FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR

Biochemie membránových receptorů

Ráda bych poděkovala především svému školiteli **Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc.** za odborné vedení, pomoc a veškerou podporu, kterou mi poskytl během mé práce na Fyziologickém ústavu AV ČR v.v.i. a Přírodovědecké fakultě UK.

Dále děkuji Doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DrSc. a všem svým kolegům z oddělení Biochemie membránových receptorů za pomoc při experimentální práci a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Mé poděkování patří také Mgr. Adamu Eckhardtovi, Ph.D. za odbornou pomoc při proteomické analýze.

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

V Praze dne

.....
Mgr. Hana Ujčíková

ABSTRACT

The aim of this Ph.D. thesis was to analyze the morphine-induced changes of frontal brain cortex protein composition in rats exposed to increasing doses of morphine (10-50 mg/kg) for prolonged period of time (10 days).

The first part of this work was oriented to the analysis of the phenomenon of hypersensitization/superactivation of adenylyl cyclase (AC), which is regarded as one of the crucial molecular mechanisms causing drastic pathological consequences of drug addiction. The increase of AC activity represents a “compensatory” response and is functionally related to the desensitization of G protein response to prolonged morphine exposure of target cells.

The clear desensitization of μ -OR- and δ -OR-stimulated G protein response by morphine was demonstrated in our laboratory by analysis of the dose-response curves of DAMGO and DADLE-stimulated, high-affinity [35 S] GTP γ S binding in plasma membranes isolated from frontal brain cortex of rats exposed to morphine according to the same protocol as that used in this Ph.D. thesis (10-50 mg/kg, 10 days). The κ -OR-stimulated [35 S] GTP γ S binding was unchanged.

It has been determined the amount of *all* AC isoforms (AC I-IX) in plasma membranes (PM) isolated from control and morphine-treated rats which were sacrificed 24 hours since the last dose of morphine. This has been performed by the immunoblot analysis using the specific antibodies oriented against AC I-IX. The results indicated the specific up-regulation of AC I (8x) and AC II (2.5x) in plasma membrane fraction isolated by centrifugation in Percoll[®] density gradient; the amount of AC III-IX was unchanged. The parallel analysis of the same PM samples indicated unchanged level of all the major classes of trimeric G proteins ($G\alpha_{i1}/G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$, $G\alpha_s$, $G\beta$) and of the prototypical plasma membrane marker Na, K-ATPase. Importantly and surprisingly, the specific increase of AC I and AC II was not detected in PM isolated from rats exposed to morphine for 10 days but sacrificed 20 days since the last dose. Thus, the morphine-induced increase of AC I and AC II faded away 20 days after drug withdrawal.

The drug-induced hypersensitization of AC I and AC II was fully reversible.

The second part of this work was oriented to the 2D electrophoretic resolution, immunoblot and proteomic analysis of post-nuclear supernatant (PNS) and Percoll-purified PM fractions, which were prepared from control (group –M10) and morphine-treated (group +M10) rats.

In the **PNS**, about 440 protein spots were recognized by silver staining and PDQuest analysis of gels in the both types of PNS. Staining by colloidal Coomassie blue G-250 indicated the total number of 200 spots. Ten of them exhibiting the largest morphine-induced change were selected, excised from the 2D gel and analyzed by MALDI-TOF MS/MS. The identified proteins were of cytoplasmic, cell membrane, endoplasmic reticulum and mitochondrial origin and 9 of them were significantly increased. Four of 9 up-regulated proteins were functionally related to the state of oxidative stress; the 2 proteins were related to the apoptotic cell death.

We could therefore conclude that the frontal brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine can not be regarded as adapted to morphine.

In the **PM** fraction analyzed by LC-MS/MS, the significantly up (↑)- or down (↓)-regulated proteins were of *plasma membrane* (Brain acid soluble protein 1, ↓2.1x; Gβ subunit 1, ↓2.0x), *myelin membrane* (MBP, ↓2.5x), *cytoplasmic* (Alpha-internexin, ↑5.2x; DPYL2, ↑4.9x; Ubiquitin hydrolase L1, ↓2.0x; 60S ribosomal protein L12, ↑2.7x; KCRB, ↓2.6x; SIRT2, ↑2.5x; Peroxiredoxin-2, ↑2.2x; Septin-11, ↑2.2x; TERA, ↑2.1x; SYUA, ↑2.0x; Coronin-1A, ↓5.4x) and *mitochondrial* (Glutamate dehydrogenase 1, ↑2.7x; SCOT1, ↑2.2x; Prohibitin, ↑2.2x; Aspartate aminotransferase, ↓2.2x) origin. Surprisingly, the immunoblot analysis of the same PM resolved by 2D electrophoresis indicated that the “active” pool of Gβ subunit (↓2.0x), represented just a minor fraction of the total signal of Gβ detected in 2D gels. The total signal of Gβ subunits was decreased 1.2x only; the major signal of Gβ subunits was unchanged. Likewise, the immunoblots of Gβ after resolution by 1D SDS-PAGE in 10% w/v acrylamide/0.26% w/v bis-acrylamide or 4-12% gradient gels (Invitrogen) indicated no change of this protein.

The “active”, minority pool of trimeric Gβ subunits responding to chronic morphine exposure of frontal rat brain cortex, was thus clearly recognized.

Keywords: morphine, long-term exposure, adenylyl cyclase isoforms (I-IX), frontal brain cortex, isolated plasma membranes, post-nuclear supernatant, proteomic analysis, oxidative stress, Gβ subunit

ABSTRAKT

Cílem této dizertační práce bylo analyzovat změny indukované morfiem ve složení proteinů frontální mozkové kůry potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia po dobu 10 dní (10-50 mg/kg).

První část práce byla zaměřena na fenomén superaktivace/hypersenzitizace adenylylcyklázy (AC), který je považován za jeden z klíčových molekulárních mechanismů podílejících se na vzniku patologických důsledků drogové závislosti. Vzestup aktivity AC představuje *kompensační* odezvu funkčně spojenou se snížením odpovědi G proteinů vlivem dlouhodobé expozice morfiu.

Výsledky naší pracovní skupiny již dříve prokázaly desenzitizaci odpovědi G proteinů při stimulaci opioidních receptorů (OR) agonisty DAMGO (μ -OR) a DADLE (δ -OR). Funkční aktivita G proteinů byla měřena pomocí vazby [35 S] GTP γ S ve frakcích plazmatických membrán (PM) izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia podle stejného protokolu, jaký je uveden v této práci (10-50 mg/kg, 10 dní). κ -OR-stimulovaná vazba [35 S] GTP γ S se nezměnila.

Byl stanoven obsah *všech typů* izoforem AC (AC I-IX) ve frakcích PM izolovaných z potkanů ovlivněných morfiem a kontrolních zvířat usmrcených 24 hodin po aplikaci poslední dávky. Imunoblotová detekce byla provedena s využitím specifických protilátek orientovaných proti AC I-IX. Byl zjištěn vzestup AC I (8x) a AC II (2,5x) ve frakcích PM izolovaných v perkolovém gradientu (Percoll[®]); množství AC III-IX se nezměnilo. Paralelní analýza stejných vzorků PM indikovala nezměněnou hladinu všech hlavních tříd G proteinů ($G\alpha_{i1}/G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$, $G\alpha_s$, $G\beta$) a stejný byl i obsah standardu plazmatických membrán Na, K-ATPázy. Překvapivé bylo zjištění, že specifický vzestup AC I a AC II nebyl detekován ve frakcích PM izolovaných z potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia, ale usmrcených 20 dní po aplikaci poslední dávky. Vzestup AC I a AC II se tak po 20 dnech od vysazení drogy vrátil zpět na původní hladinu v porovnání s kontrolními vzorky.

Hypersenzitizace AC I a AC II indukovaná morfiem se projevila jako plně reverzibilní.

Druhá část práce byla zaměřena na 2D elektroforetické rozlišení, imunoblotovu a proteomickou analýzu postnukleárního supernatantu (PNS) a frakcí PM izolovaných v perkolovém gradientu z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních zvířat (skupina -M10).

Barvení stříbrem a analýza pomocí softwaru PDQuest rozlišila celkem 440 proteinových spotů ve vzorcích PNS. Barvení koloidní Coomassie blue G-250 indikovalo 200 proteinových spotů, z nichž bylo vybráno 10 nejvíce signifikantně rozdílných proteinových skvrn pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS/MS. Analyzované proteiny byly lokalizovány v cytoplazmě, buněčné membráně, endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. 9 z 10 proteinů změněných vlivem morfia signifikantně vzrostlo, 4 z 9 proteinů zvýšené hladiny bylo funkčně vázaných na genezi oxidativního stresu, 2 proteiny byly spojeny s apoptózou.

S ohledem na spektrum změn indukovaných morfiem je patrné, že mozek potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám této drogy není plně adaptován.

Vzorky PM byly analyzovány pomocí LC-MS/MS a signifikantně zvýšená (↑) či snížená (↓) hladina bílkovin byla lokalizována v *plazmatické membráně* (membránový neuronální protein 1, ↓2,1x; Gβ podjednotka 1, ↓2,0x), *myelinové membráně* (MBP, ↓2,5x), *cytoplazmě* (alfa-internexin, ↑5,2x; DPYL2, ↑4,9x; ubikvitin hydroláza L1, ↓2,0x; 60S ribozomální protein L12, ↑2,7x; KCRB, ↓2,6x; SIRT2, ↑2,5x; peroxiredoxin-2, ↑2,2x; septin-11, ↑2,2x; TERA, ↑2,1x; SYUA, ↑2,0x; koronin-1A, ↓5,4x) a *mitochondriích* (glutamát dehydrogenáza 1, ↑2,7x; SCOT1, ↑2,2x; prohibitin, ↑2,2x; aspartát aminotransferáza, ↓2,2x). 2D imunoblotová analýza stejných vzorků PM překvapivě stanovila, že pokles Gβ podjednotky indukovaný morfiem (2x) představoval snížení pouze „aktivní“ minoritní části z výsledné oblasti Gβ detekované specifickou protilátkou. Celkový signál klesl pouze nepatrně (1,2x), majoritní signál Gβ se nezměnil. Toto zjištění korespondovalo s výsledkem imunoblotové detekce po rozlišení 1D SDS-PAGE (10% w/v akrylamid/0,26% bisakrylamid nebo 4-12% gradientový gel, Invitrogen), které také nepotvrdilo žádnou změnu.

Pokles Gβ podjednotky indukovaný morfiem, který byl detekován proteomickou analýzou, korespondoval se změnou pouze „aktivní“ minoritní části z celkové signálu Gβ.

Klíčová slova: morfium, dlouhodobá expozice, izoformy adenylylcyklázy (I-IX), frontální mozková kůra, izolované plazmatické membrány, postnukleární supernatant, proteomická analýza, oxidativní stres, Gβ podjednotka

OBSAH

1.	Úvod	15
2.	Cíle dizertační práce	17
3.	Literární přehled	18
3.1.	Receptory spřažené s G proteiny (GPCRs, G-protein coupled receptors).....	18
3.1.1.	Struktura a klasifikace GPCRs.....	18
3.1.2.	Přenos signálu.....	22
3.1.3.	Opioidní receptory (OR).....	24
3.2.	Klasifikace trimerních GTP-vazebných proteinů.....	25
3.2.1.	Klasifikace $G\alpha$ podjednotek.....	26
3.2.2.	$\beta\gamma$ podjednotky.....	27
3.2.3.	Posttranslační modifikace G proteinů.....	29
3.3.	Adenylylcykláza jako prototypický efektor G proteinů.....	31
3.3.1.	Struktura adenylylcyklázy.....	31
3.3.2.	Regulace adenylylcyklázy.....	32
3.4.	Proteom a proteomika.....	35
3.4.1.	Elektroforéza.....	36
3.4.1.1.	2D elektroforéza.....	36
3.4.2.	Chromatografie.....	38
3.4.3.	Hmotnostní spektrometrie.....	39
3.4.3.1.	Kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie.....	41
4.	Materiál a metody	44
4.1.	Materiál	44
4.1.1.	Chemikálie.....	44
4.1.2.	Protilátky.....	44
4.1.3.	Expozice potkanů kmene Wistar zvyšujícím se dávkám morfia.....	44
4.2.	Metody	45
4.2.1.	Příprava postnukleárního supernatantu (PNS) a izolace frakcí plazmatických membrán (PM) z frontální mozkové kůry potkanů.....	45
4.2.2.	Stanovení koncentrace bílkovin.....	45
4.2.3.	SDS-polyakrylamidová elektroforéza.....	46
4.2.4.	NuPAGE systém.....	47
4.2.5.	Imunobloting.....	48
4.2.6.	Příprava vzorků pro izoelektrickou fokusaci.....	49
4.2.7.	Izoelektrická fokusace-dělení proteinů v prvním rozměru.....	50
4.2.8.	Ekvilibrace stripů a SDS-PAGE-dělení proteinů ve druhém rozměru.....	50
4.2.9.	Barvení stříbrem.....	51
4.2.10.	Barvení koloidní Coomassie Blue G-250.....	52
4.2.11.	Hodnocení gelů.....	53
4.2.12.	MALDI-TOF MS/MS.....	53
4.2.13.	LC-MS/MS.....	54
5.	Výsledky	56
5.1.	Vzestup obsahu adenylylcyklázy I a II ve frakcích plazmatických membrán.....	56

	indukovaný morfiem	
5.2.	Nezměněná hladina Na, K-ATPázy.....	56
5.3.	Nezměněná hladina trimerních G proteinů.....	57
5.4.	Identifikace proteinů PNS připraveného z frontální mozkové kůry kontrolních..... potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; <i>analýza pomocí MALDI-TOF</i> <i>MS/MS</i>	57
5.5.	Identifikace proteinů PM izolovaných z frontální mozkové kůry kontrolních..... potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; <i>analýza pomocí LC-MS/MS</i>	59
6.	Diskuze	79
6.1.	Vzestup obsahu adenylylcyklázy I a II ve frakcích plazmatických membrán..... indukovaný morfiem	79
6.2.	Identifikace proteinů PNS připraveného z frontální mozkové kůry kontrolních..... potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; <i>analýza pomocí MALDI-TOF</i> <i>MS/MS</i>	82
6.3.	Identifikace proteinů PM izolovaných z frontální mozkové kůry kontrolních..... potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; <i>analýza pomocí LC-MS/MS</i>	84
7.	Závěr	88
8.	Seznam použité literatury	89
	Příloha-publikace	105

SEZNAM PUBLIKACÍ A JINÁ ČINNOST

Původní práce:

Ujčíková, H., Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Svoboda, P., 2011. Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 1220-1229. IF = 3,848

Ujčíková, H., Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P., 2013. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine, *Proteome Sci* **12**:11. IF = 2,42

Přehledný článek:

Ujčíková, H., Brejchová, J., Vošahlíková, M., Kagan, D., Dlouhá, K., Sýkora, J., Merta, L., Drastichová, Z., Novotný, J., Ostašov, P., Roubalová, L., Hof, M., Svoboda, P., 2014. Opioid-receptor (OR) signaling cascades in rat cerebral cortex and model cell lines: the role of plasma membrane structure, *Physiol Res* **63**, S165-S176. IF = 1,531

Ostatní publikace:

Dlouhá, K., Kagan, D., Roubalová, L., **Ujčíková, H.** Svoboda, P., 2013. Plasma membrane density of GABAB-R1a, GABAB-R1b, GABA-R2 and trimeric G-proteins in the course of postnatal development of rat brain cortex. *Physiol Res* **62**, 547-559. IF = 1,531

Abstrakta z konferencí:

H. Ujčíková, K. Dlouha, L. Roubalova, M. Vosahlikova, D. Kagan and P. Svoboda: Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term exposure of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. **PhD Student Workshop, 15.3.-17.3. 2011, Třešť, Czech Republic**

H. Ujčíková, A. Eckhardt, D. Kagan, L. Roubalova, P. Svoboda: Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. **PhD meeting, 22.10.-24.10. 2013, Třešť, Czech Republic**

Pracovní cesta:

Návštěva profesora Ernesta Carafoliho, **17.11.-25.11. 2012, Benátský institut molekulární medicíny a katedra Biochemie Univerzity v Padově, Itálie**

Přednáška:

Prezentace výsledků Ph.D. studia, **27.10.-3.11. 2013, Univerzita Padova, Itálie** (pracovní skupina profesora Ernesta Carafoliho a profesora Giuseppe Zanottiho)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC I-IX	izoformy adenylcyklázy I-IX
Ac-Bis	akrylamid/bisakrylamid
ACN	acetonitril
APS	persíran amonný
ATP	adenozin-5'-trifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CaM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CBB	Coomassie brilliant blue
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CNS	centrální nervová soustava
Cy	cyaninové barvivo
DADLE	agonista δ -OR, [D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enkefalin
DAG	1,2-diacylglycerol
DAMGO	agonista μ -OR, [D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enkefalin
DIGE	diferenční gelová elektroforéza
DOR	δ -opioidní receptor
DTT	ditiotritol
ECL	extracelulární smyčka
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ESI	elektrosprej (electrospray ionization)
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
G protein	trimerní GTP-vazebný protein
GABA _B R	receptor typu B pro kyselinu γ -aminomáselnou
GDP	guanosin-5'-difosfát
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny
GTP	guanosin-5'-trifosfát
GRK	kináza pro receptor spřažený s G proteinem
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonová
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
Hz	hertz, jednotka frekvence
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát

ICAT	metoda izotopově rozdílných afinitních značek (isotope-coded affinity tag)
ICL	intracelulární smyčka
IF	izoelektrická fokusace
InsP3	inozitoltrifosfát
IPG	imobilizovaný gradient pH
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantitation
KOR	κ -opioidní receptor
LC	kapalinová chromatografie
MALDI-TOF	ionizace laserem za účasti matrice v kombinaci s analyzátozem doby letu TOF (time-of-flight)
MAP	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MOPS	kyselina 3-morfolinopropan-1-sulfonová
MOR	μ -opioidní receptor
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	podíl hmotnosti a náboje
Nd:YAG	typ pevnolátkového laseru (neodymium-doped yttrium aluminum garnet)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOP-OR (ORL-1)	nociceptinový receptor (opiate receptor-like 1)
OR	opioidní receptor
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PDI	protein disulfid-izomeráza
Percoll [®]	koloidní částice obalené polyvinylpyrrolidonem
pI	izoelektrický bod
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PM	frakce plazmatických membrán
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
PNS	postnukleární supernatant
Q	kvadrupól (quadrupole)
RGS	regulátory signalizace G proteinů
ROS	reaktivní formy kyslíku

sAC	solubilní adenylylcykláza
SDS	dodecylsulfát sodný
SELDI	laserová desorpce/ionizace usnadněná povrchem
SILAC	stable isotope labelling by amino acids in cell culture
SIRT2	NAD-dependentní deacetyláza sirtuin-2
STEM	fosfátový pufr podle <i>Sørensen</i> a
TBS	trisový pufr
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	tetrametyletylendiamin
TOF	analyzátor doby letu (time-of-flight)
TM	transmembránový α -helix
TRH-R	receptor pro thyreoliberin
Tris	2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol
Tween 20	polyoxyetylen sorbitanmonolaurát
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie

1. ÚVOD

Komunikace mezi buňkou a okolím se uskutečňuje pomocí membránových receptorů, což jsou z funkčního hlediska proteiny, které jsou schopny specificky rozpoznat signál přicházející z vnějšího prostředí, přenést jej do nitra buňky a vyvolat biologickou odpověď. Tímto signálem mohou být hormony, nervové přenašeče a růstové faktory. Vazba agonisty navozuje konformační změnu molekuly receptoru spřaženého s G proteiny (GPCR), která se přenáší na trimerní G protein (Svoboda a kol., 2004).

Heterotrimerní GTP-vazebný protein se v klidovém stavu skládá z α podjednotky s navázaným GDP a komplexu $\beta\gamma$. Interakce mezi aktivovaným receptorem a G proteinem vede k výměně GDP na α podjednotce za GTP, disociaci od receptoru a rozpadu na volnou α podjednotku a $\beta\gamma$ komplex. Ve většině případů je dalším nositelem signálu volná α podjednotka, která aktivuje širokou škálu efektorů (adenylylcyklázy, fosfolipázy C, fosfolipázy A₂, fosfodiesterázy a řadu iontových kanálů), kteří dále regulují intracelulární koncentraci sekundárních přenašečů (cAMP, cGMP, DAG, InsP₃, Ca²⁺, Na⁺, K⁺, DAG, NO, kyselina arachidonová). V posledních letech se však ukazuje, že významnou funkční roli plní i volné $\beta\gamma$ podjednotky.

Soubor mechanismů, které vedou k utlumení biologické odpovědi na daný hormon a chrání buňky před nadměrnou stimulací, se nazývá desenzitizace. Předmětem dlouhodobého výzkumu naší skupiny je studium buněčných a molekulárních mechanismů desenzitizace, která nastává při účinku hormonů působících přes GPCRs. Vedle receptorového mechanismu desenzitizace (fosforylace, sekvestrace, internalizace) existuje další mechanismus probíhající na úrovni trimerních G proteinů. Dlouhodobá stimulace cílových buněk vede k přenosu těchto regulačních bílkovin do nitra buněk, dochází k internalizaci. Internalizace G proteinů probíhá ve formě solubilizace (uvolnění z buněčné membrány do rozpustné buněčné fáze) a také jako přenos do frakce malých měchýřků (vezikulů). Přenos G proteinů do nitra buněk je však mnohem pomalejší (hodiny) než internalizace receptorů (minuty); (Svoboda a Novotný, 2002).

Opioidní receptory (OR) patří do rodopsinové rodiny receptorů spřažených s G proteiny (μ -OR, δ -OR, κ -OR, NOP-OR). Stimulují G proteiny inhibičního typu $G_{\alpha_{i/o}}$, které jsou citlivé k pertussis toxinu. Tyto proteiny (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{o1} , G_{o2}) jsou hojně zastoupené v mozku a inhibují aktivitu adenylylcyklázy. Jejich efektozem mohou být také iontové kanály. Morfium působí jako jedno z nejúčinnějších analgetik a váže se na všechny typy OR. Opakovaná expozice zvířat morfiu vede k rozvoji tolerance k droze (stavu

snížené senzitivity k droze), psychické a fyzické závislosti (Contet a kol., 2004). Psychická závislost je spojena s tendencí ke zvyšování dávek a nepříjemnými pocity při abstinenci (Preston a kol., 1991). Při výzkumu opiodních receptorů a účinků morfia ve frontální mozkové kůře potkanů jsme prokázali, že stav dlouhodobé závislosti na morfiu vede ke snížení odpovědi trimerních G proteinů třídy Gi/Go na stimulaci MOR a DOR agonisty (Bouřová a kol., 2010). Je zřejmé, že výzkum mechanismů účinků opiátů je prakticky významný, protože se stále zvyšuje počet narkomanů a právě fenomén desenzitizace vede k tomu, že pro vyvolání stejné odpovědi musí být podána vyšší a vyšší dávka.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této dizertační práce je stanovení změn indukovaných morfiem ve složení membránových a solubilních bílkovin frontální mozkové kůry potkanů samců kmene Wistar, kteří byli vystaveni zvyšujícím se dávkám morfia po dobu 10 dní.

První část práce je zaměřena na:

- stanovení obsahu *všech izoform enzymu adenylylcyklázy (AC I-IX)* ve frakcích PM, které byly izolovány z frontální mozkové kůry potkanů usmrčených **24 hodin** po aplikaci poslední dávky morfia
- stanovení obsahu adenylylcyklázy ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů, kteří byli vystaveni zvyšujícím se dávkám morfia, ale byli usmrceni **20 dní** po podání poslední dávky
- stanovení obsahu všech hlavních tříd trimerních G proteinů a standardu plazmatických membrán Na, K-ATPázy

Druhá část práce je zaměřena na:

- detekci kvantitativních změn indukovaných morfiem ve frakcích postnukleárního supernatantu (PNS) a PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů a následnou proteomickou analýzu PNS a frakcí PM
- detekci G β podjednotky
- proteomickou analýzu podjednotek G β

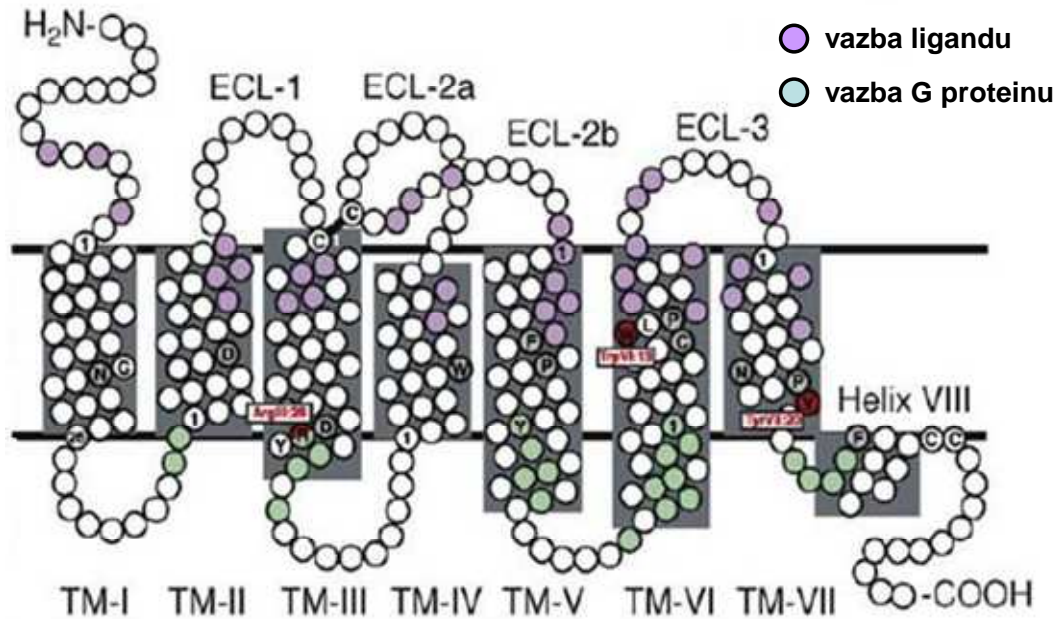
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Receptory spřažené s G proteiny (G-protein coupled receptors, GPCRs)

Receptory spřažené s G proteiny (heptahelikální, serpentinové receptory) jsou největší a nejlépe prostudovanou rodinou či skupinou membránových receptorů, která je kódována více než 800 geny (Fredriksson a kol., 2003). Řídí široké spektrum fyziologických odpovědí cílových tkání (srdeční činnost, kontraktilita hladkých svalů dýchacího traktu, cévní stěny, metabolické přeměny v játrech a řadu dalších fyziologických procesů) a jsou proto potenciálním cílem mnoha léků. Tato rodina zahrnuje receptory pro různé druhy ligandů (ionty, biogenní aminy, peptidy, lipidy, fotony apod.). Řada GPCRs byla objevena na základě sekvenční homologie, a tak u spousty z nich není dosud identifikován jejich ligand. Tyto receptory se označují jako sirotčí (orphan receptors) a jsou předmětem zájmu velkých farmaceutických firem. Znalost jejich fyziologické funkce by mohla pomoci při hledání nových léčiv s přesně definovaným účinkem (Tang a kol., 2012).

3.1.1. Struktura a klasifikace GPCRs

Struktura GPCRs je i přes řadu rozmanitých ligandů poměrně uniformní. Charakteristickým rysem je 7 transmembránových α helixů (7TM), které jsou spojeny třemi N-koncovými extracelulárními a třemi C-koncovými intracelulárními hydrofilními smyčkami. Vysoce konzervovaný disulfidický můstek z extracelulárního konce TM-III dělí druhou extracelulární smyčku na ECL-2a a ECL-2b. Vazebné místo pro ligand je tvořeno z extracelulárních smyček a extracelulárních konců TM helixů (obr. č. 1). Vazebné místo pro G protein obecně vytváří intracelulární smyčky a intracelulární konce TM helixů (Nygaard a kol., 2009). Jednotlivé typy GPCRs mají odlišně dlouhou N-koncovou extracelulární a C-koncovou intracelulární oblast (Pierce a kol., 2002).



Obr. č. 1: Serpentinový model heptahelikálního receptoru. TM-1-TM-7: transmembránové α -helixy, ECL-1-ECL-3: extracelulární smyčky. Převzato a upraveno podle Nygaard a kol., 2009.

Nejčastější způsob třídění receptorů spřažených s G proteiny je dělení na šest rodin (A-F); (Davies a kol., 2008).

Rodina A je neobsáhlejší skupinou. Řadí se zde receptory pro rodopsin, adrenergní receptory, TRH-R, opioidní receptory a také skupina receptorů pro odoranty. Charakteristickým znakem jsou vysoce konzervované aminokyseliny (na obr. č. 2 jsou některé označeny červeným kroužkem) a disulfidický můstek spojující ECL-1 a ECL-2. Většina receptorů má C-terminální konec palmitoylován na cysteinovém zbytku. Tato modifikace slouží jako membránová kotva (obr. č. 2); (George a kol., 2002; Pierce a kol., 2002).

Rodina B má jen okolo 25 členů. Patří zde receptory pro gastrointestinální hormony (sekretin, glukagon, vazoaktivní intestinální peptid), hormon uvolňující somatotropin, kortikotropin uvolňující hormon, kalcitonin a parathormon. Typickým znakem této rodiny je dlouhý N-konec, který obsahuje několik cysteinů tvořících síť disulfidických můstků. Chybí palmitoylace na C-terminálním konci (obr. č. 2); (George a kol., 2002; Pierce a kol., 2002).

Rodina C je také poměrně malá, zahrnuje metabotropní glutamátový receptor, GABA_BR-1, GABA_BR-2, kalcium senzitivní receptor a některé chuťové receptory. Charakteristický je dlouhý N- a C-konec. Vazebná doména pro ligand je lokalizovaná na N-konci. Třetí intracelulární smyčka je krátká a velmi konzervovaná (obr. č. 2); (George a kol., 2002; Pierce a kol., 2002).

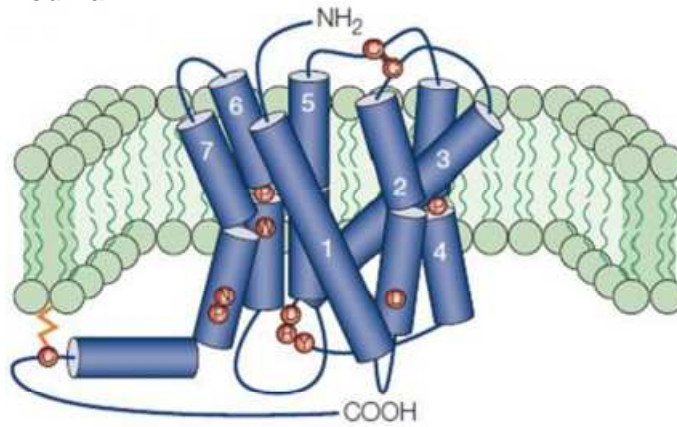
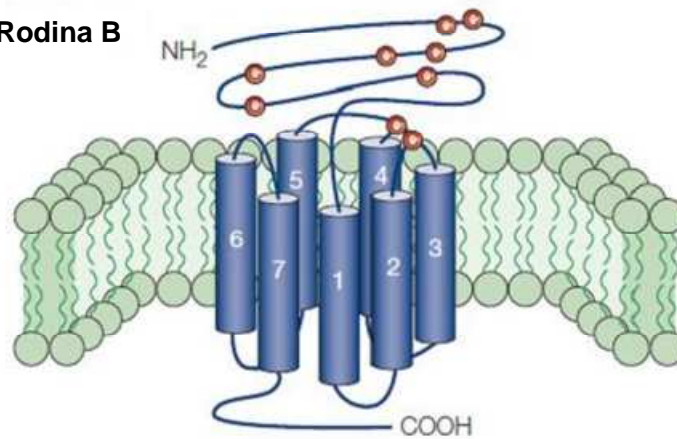
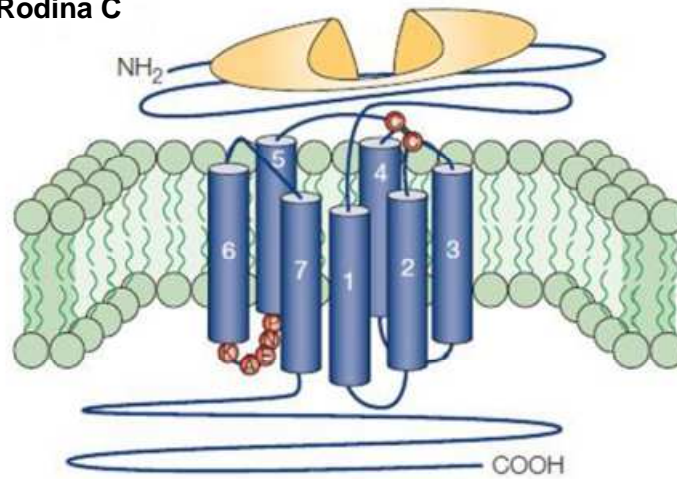
Rodina D zahrnuje feromonové receptory pro a-faktor (STE3) a α -faktor (STE2) u kvasinek

Rodina E zahrnuje receptory cAMP

Rodina F zahrnuje receptory Frizzled/smoothened

Rodina A, B, C a F je přítomná v těle savců, rodina D byla prokázána pouze u kvasinek a receptory rodiny E pouze v organismu *Dictyostelium* (Davies a kol., 2008).

Druhý typ dělení receptorů (GRAFS) je do následujících skupin: G-glutamátové, R-rodopsinové, A-adhezní, F-frizzled/taste2 a sekretinové (Fredriksson a kol., 2003). Tento systém charakterizuje pouze lidské GPCRs podle fylogenetické příbuznosti.

Rodina A**Rodina B****Rodina C**

Obr. č. 2: Klasifikace GPCRs (rodina A, B, C). Převzato a upraveno podle George a kol., 2002.

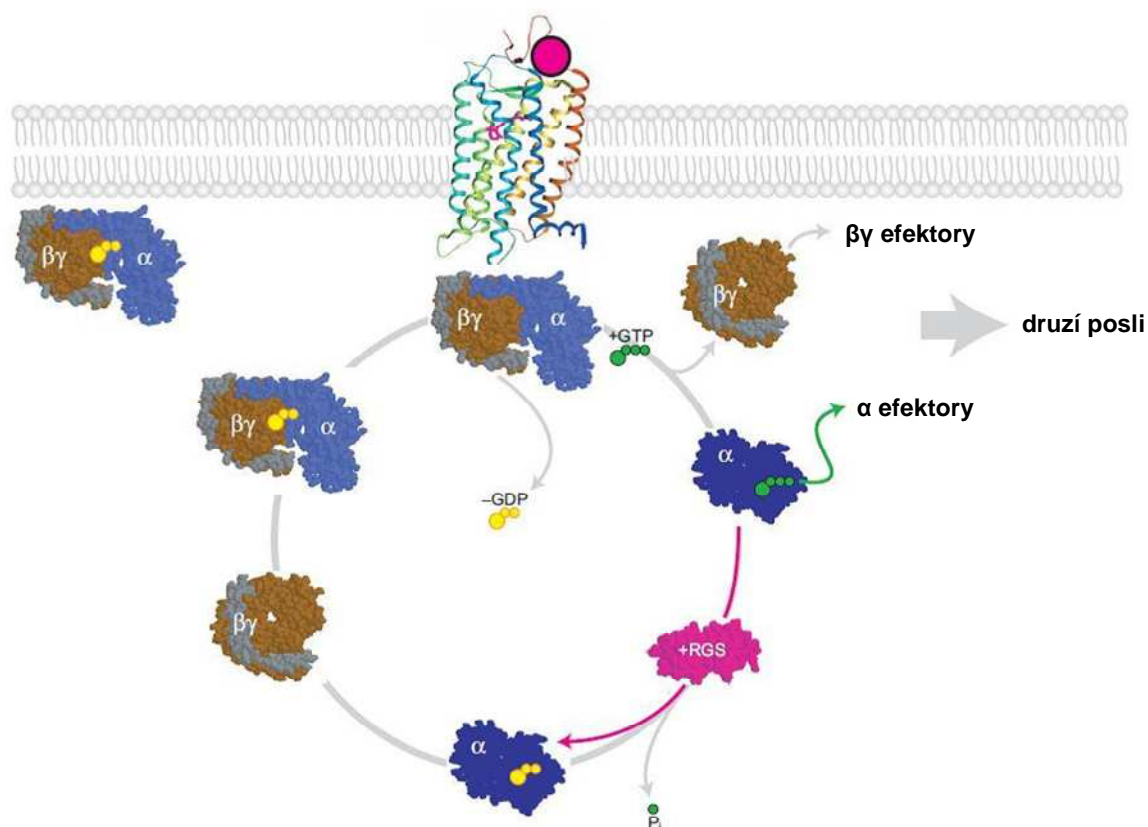
3.1.2. Přenos signálu

Vazba ligandu (agonisty) navozuje v GPCRs konformační změnu, která se přenáší na sousední bezprostředně navazující molekulu GTP-vazebný protein (G protein), který se v klidovém stavu skládá ze tří podjednotek: α podjednotky s GTPázovou aktivitou a komplexu $\beta\gamma$. Interakce mezi aktivovaným receptorem a G proteinem vede k výměně pevně vázaného GDP za GTP. Výměna GDP za GTP znamená, že se v molekule G proteinu objevuje další permanentní negativní náboj, což je významná energetická změna, která destabilizuje proteinovou strukturu. Dochází k rozpadu oligomerního komplexu na volné podjednotky α a $\beta\gamma$. Obě vzniklé podjednotky aktivují nezávisle na sobě intracelulární efektory, jejichž prostřednictvím jsou spuštěny různé signální kaskády (obr. č. 3). Spuštění jedné kaskády může velmi rychle předcházet aktivaci z funkčního hlediska následující kaskády. Ve většině známých příkladů je dalším nositelem signálu volná α podjednotka, která aktivuje adenylylcyklázy, fosfolipázy C a A2, iontové kanály, fosfodiesterázy. Významnou funkční roli plní i volné $\beta\gamma$ podjednotky, které modulují působení volných α podjednotek (Tang a Gilman, 1991) a mohou mít také přímý aktivační nebo inhibiční vliv na efekторы (McCudden a kol., 2005).

Aktivovaný stav G proteinu ukončí hydrolýza GTP pomocí vnitřní GTPázové aktivity α podjednotky na GDP a anorganický fosfát. Hydrolýza vede k obnovení G proteinového komplexu, který je tak znovu připraven na příchod dalšího stimulu. Rychlost obnovy heterotrimeru je ovlivněna nejen vlastní GTPázovou aktivitou α podjednotky, ale roli zde hrají také RGS proteiny, které urychlují štěpení GTP na GDP (Pierce a kol., 2002). Aktivovatelnost heterotrimerního G proteinu prostřednictvím GPCRs však nemůže být nekonečná, za fyziologického stavu je úroveň buněčné signalizace regulována souborem mechanismů zvaných **desenzitizace**. Tento vratný proces znamená snížení biologické odpovědi při dlouhodobém či opakovaném podávání hormonu či drogy obecně. Můžeme rozlišit homologní a heterologní typ desenzitizace. Při homologní desenzitizaci je snížena odpověď pouze na ten hormon, který vyvolává primární stimulaci. Při heterologním typu desenzitizace dochází k poklesu i v účinku ostatních hormonů-receptorů.

V řádu sekund či minut dochází po vazbě agonisty na receptor k jeho fosforylaci. Při nízkém stupni saturace receptoru jsou aktivní proteinkinázy A a C, které jsou schopny fosforylovat i volné receptory a mohou se proto podílet na vzniku heterologní desenzitizace. Jedná se o zpětnovazebnou regulaci, protože tyto kinázy jsou aktivovány právě pomocí GPCRs. Substrátem kinázy pro receptor spřažený s G proteinem (GRK) je

receptor s navázaným agonistou. Aktivita GRK se proto významně uplatňuje až při vysokém stupni saturace receptoru ve smyslu homologní desenzitizace. Okamžitě po fosforylaci následuje vazba β -arrestinu a funkční rozpřažení od G proteinu. Přenos informačního signálu je tak přerušen. Krátce po ukončení aktivace se objevuje frakce volných receptorů, které po shluknutí (sekvestraci) setrvávají určitou dobu na povrchu buněčné membrány. Za několik málo minut dochází k jejich přenosu do nitra buňky - **internalizaci**. Internalizovaná forma receptorů se hromadí ve frakci lehkých vezikulů (endozomů). Tento stav je přechodem mezi jejich úplnou degradací v lyzozomech a recyklováním zpět k povrchu buňky (Svoboda a kol., 2004). Většina receptorů je následně defosforylována proteinfosfatázami přítomnými v endozomálních vezikulech a transportována zpět k povrchu, kde obnovuje plně funkční kontakt s G proteinem. Dlouhodobá stimulace či vysoké dávky hormonu vedou k navázání ubikvitinu na komplex receptoru s β -arrestinem a přenosu do lyzozomů, kde dochází k proteolytické degradaci receptoru. Tímto způsobem klesá celkový počet příslušných receptorů v buňce (**down-regulace**).



Obr. č. 3: Cyklus G proteinů. α podjednotka (modrá); β podjednotka (hnědá); γ podjednotka (šedá); GDP (žlutě) s dvěma malými kroužky reprezentujícími dva fosfáty; GTP (zeleně) s třemi malými kroužky reprezentujícími tři fosfáty; RGS (růžově)-regulátory signalizace G proteinů. Převzato a upraveno podle Preininger a Hamm, 2004.

3.1.3. Opioidní receptory (OR)

Opioidní receptory patří do rodopsinové rodiny receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs, rodina A); (Kieffer a kol., 1992; Manglik a kol., 2012). Nachází se hlavně v CNS, ale i na periférii. Jsou aktivovány endogenními opioidními peptidy (endorfiny, enkefaliny, dynorfiny, endomorfíny) i exogenními ligandy (opiáty); (Contet a kol., 2004). OR tvoří 7 transmembránových α helixů spojených 3 extracelulárními (ECL) a 3 intracelulárními smyčkami (ICL). ECL s N-koncem, který je často glykosylovaný, zodpovídají za vazbu ligandu, intracelulární C-koncová část je zapojena do signalizace. První a druhou ECL spojuje disulfidický můstek. Mezi klasické OR patří: μ -OR (MOR, pojmenován podle morfia, zprostředkovává supraspinální analgezií, zúžení zornice oka, útlum dýchání, euforii, depresi, závislost), δ -OR (DOR, pojmenován podle chámovodu - angl. deferens, zprostředkovává velmi silnou spinální analgezií, útlum dýchání) a κ -OR (KOR, pojmenován podle ketocyklazocinu, zprostředkovává spinální analgezií, dysforii, sedaci);

(Waldhoer a kol., 2004). Tyto receptory vykazují homologii 60 % v rámci aminokyselinové sekvence, nejvíce jsou si podobné v transmembránové oblasti (73-76 %), nejméně v extracelulární části (34-40 %); (Minami a Satoh, 1995). Řadí se k nim také NOP-OR (pojmenován podle nociceptinu, dříve označován jako ORL-1), který vyazuje vysoký stupeň homologie s klasickými OR (Mollereau a kol., 1994, Corbett a kol., 2006). Farmakologické studie prokázaly, že každá skupina má několik receptorových podtypů, které mohou být výsledkem alternativního sestřihu mRNA, posttranslačních modifikací či dimerizací receptorů. Všechny čtyři typy OR jsou schopny tvořit homomerní i heteromerní receptorové komplexy (George a kol., 2002; Milligan, 2004). Dimery se mohou tvořit mezi dvěma OR i mezi opioidním a neopiodním typem receptoru (např. δ -OR a β_2 -adrenoreceptorem). Funkční vlastnosti oligomerních komplexů se mohou podobat monomerní formě receptoru, v jiných případech vzniká nový receptor s vlastnostmi odlišnými od původních monomerů (Jordan a Devi, 1999).

OR stimulují G proteiny inhibičního typu $G\alpha_{i/o}$, možná je ale i interakce s α podjednotkami G_s či G_z (Hendry a kol., 2000). Dochází k inhibici adenylylcyklázy, která vede k poklesu cAMP v buňce a snížení aktivity proteinkinázy A. $\beta\gamma$ podjednotky stimulují aktivitu dovnitř usměřňujících K^+ kanálů (GIRKs) a fosfolipázy C. Jejich působením dochází také ke snížení vtoku Ca^{2+} do buňky, protože inhibují napětově řízené Ca^{2+} kanály (Waldhoer a kol., 2004; McCudden a kol., 2005).

3.2. Klasifikace trimerních GTP-vazebných proteinů

GTP-vazebné proteiny (G proteiny) jsou regulační buněčné bílkoviny aktivované pomocí GTP, které zprostředkovávají přenos signálu mezi širokou škálou membránových receptorů a efektorů (adenylylcyklázy, fosfolipázy, fosfodiesterázy a řadu iontových kanálů). Tvoří komplex složený ze tří podjednotek: α (39-52 kDa), β (35-39 kDa) a γ (6-8 kDa). Dnes je známo 16 genů kódujících α podjednotky, 5 genů kódujících β podjednotky a 12 genů kódujících γ podjednotky. Nositel GTPázové aktivity je α podjednotka, β a γ podjednotky spolu tvoří stabilní dimer $\beta\gamma$, který disociuje jen za silně denaturujících podmínek v přítomnosti močoviny. Klasifikace G proteinů je založena na struktuře a funkčních vlastnostech α podjednotek, na které se kovalentně váží bakteriální toxiny a ovlivňují tak jejich funkci. G proteiny jsou klasifikovány do čtyř tříd, které se označují jako G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ a $G_{12/13}$. Tento přehled byl vypracován na základě citací: Jones a kol., 1990; Tang a Gilman, 1991; Dhanasekaran a Dermott, 1996; Milligan

a kol., 1996; Hildebrandt, 1997; Nürnberg a kol., 1999; McCudden a kol., 2005; Arshavsky a kol., 2002; Ellis, 2004; Myung a kol., 2006. Přehled klasifikace a tkáňové distribuce $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$ podjednotek je uvedena v tabulkách č. 1 a 2.

3.2.1. Klasifikace $G\alpha$ podjednotek

Třída G_s

Mezi členy této třídy patří $G\alpha_{s(s\text{-short})}$, $G\alpha_{s(l\text{-long})}$, $G\alpha_{s(xl)}$, $G\alpha_{s(xxl)}$ a $G\alpha_{olf}$. $G\alpha_s$ proteiny stimulují všechny izoformy adenylylcyklázy (AC I-IX) a jsou citlivé na choleroový toxin (produkovaný *Vibrio cholerae*), který působí permanentní aktivaci α podjednotky chemickou modifikací argininu 201. Díky alternativnímu sestřihu vznikají z jednoho genu pro $G\alpha_s$ čtyři izoformy, které se vzájemně liší délkou řetězce aminokyselin a jsou exprimovány v různých tkáních. $G\alpha_{olf}$ je protein čichového epitelu a je velmi podobný $G\alpha_s$.

Třída G_i/o

Do této třídy patří nejvíce zástupců: $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_{o3}$, $G\alpha_{t(r\text{-rod})}$, $G\alpha_{t(c\text{-cone})}$, $G\alpha_{gust}$ a $G\alpha_z$. Specifickým znakem proteinů této třídy je citlivost k pertussis toxinu (produkovaný *Bordetella pertussis*). $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ jsou produkty separátních genů a všechny inhibují adenylylcyklázu. $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_{o3}$ vznikají alternativním sestřihem jednoho genu a nachází se ve velkém množství v mozku. Jejich efektozem (v různých tkáních) může být adenylylcykláza, fosfolipázy i iontové kanály. $G\alpha_t$ (transducin) je obsažen v sítnici a přenáší světelný signál z rodopsinu na fosfodiesterázu. $G\alpha_{t(r)}$ je exprimován v tyčinkách, $G\alpha_{t(c)}$ v čípcích oka. $G\alpha_{gust}$ (gustducin) je G protein chuťového epitelu, který se nachází také v kartáčových buňkách gastrointestinálního traktu. $G\alpha_z$ je exprimován v neurosekrečních buňkách i krevních destičkách a není citlivý k pertussis toxinu.

Třída $G_q/11$

Patří zde $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15/16}$. Zástupci této třídy aktivují fosfolipázu typu C. Na rozdíl od G_i proteinů nejsou citlivé k pertussis toxinu. Proteiny $G\alpha_q$ a $G\alpha_{11}$ jsou téměř všudypřítomné. $G\alpha_{14}$ se nachází ve varlatech, slezině, ledvinách a hematopoetických buňkách. $G\alpha_{15/16}$ je exprimován v hematopoetických buňkách. $G\alpha_{16}$ je lidskou izoformou $G\alpha_{15}$ a je označován jako *promiskuitní* protein, který může působit jako univerzální přenašeč mezi širokou škálou membránových receptorů a fosfolipázou C.

Třída G12/13

Tato třída zahrnuje pouze 2 zástupce: $G\alpha_{12}$ a $G\alpha_{13}$. Znalost funkce není příliš jasná, stejně jako receptorová specifita. Byla prokázána jejich aktivace receptory pro kyselinu lysosfosfatidovou, tromboxan (typ A2), endotelin, prostaglandiny (typ EP3) a bradykinin. Regulují MAP kinázovou dráhu a ovlivňují výměnu Na^+/H^+ iontů.

Třída	Zástupci	Tkáňová distribuce
Gs	$G\alpha_{s(s-short)}, G\alpha_{s(l-long)}^1$	všude
	$G\alpha_{s(xl)}, G\alpha_{s(xxl)}^1$	mozek
	$G\alpha_{olf}$	čichový epitel, mozek, varlata, slinivka
Gi	$G\alpha_{i1}$	všude, převážně mozek
	$G\alpha_{i2}$	všude
	$G\alpha_{i3}$	všude, převážně mimo mozek
	$G\alpha_{o1}, G\alpha_{o2}, G\alpha_{o3}$	mozek, srdce?
	$G\alpha_{t(r-rod)}$	sítnice-tyčinky
	$G\alpha_{t(c-cone)}$	sítnice-čípky
	$G\alpha_{gust}$	chuťové pohárky, kartáčové buňky GI ² traktu
Gq	$G\alpha_q$	všude
	$G\alpha_{11}$	všude (kromě krevních destiček)
	$G\alpha_{14}$	varlata, hematopoetické buňky, slezina, ledviny
	$G\alpha_{15/16}$	hematopoetické buňky
G12	$G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$	všude

Tabulka č. 1: Klasifikace a tkáňová distribuce $G\alpha$ podjednotek.

¹ s-krátká, l-dlouhá, xl/xxl-extra dlouhá izoforma $G\alpha_s$

² GI-gastrointestinální

Převzato a upraveno podle Nürnberg a kol. 1999; Ellis, 2004.

3.2.2. $\beta\gamma$ podjednotky

Stabilní $\beta\gamma$ komplex, který nevykazuje vlastní enzymatickou aktivitu, byl původně považován pouze za pasivní komponentu G proteinu sloužící k upevnění α podjednotky k membráně. Nové údaje však ukázaly na aktivní roli tohoto heterodimeru v přenosu signálu. Stejně jako α podjednotky, lze i $G\beta$ a $G\gamma$ podjednotky rozdělit do několika tříd podle příbuznosti aminokyselinové sekvence. Rodinu $G\beta$ tvoří pět členů: $G\beta_1$, $G\beta_2$,

$G\beta_{3(s\text{-short})}$, $G\beta_{3(l\text{-long})}$, $G\beta_4$ a $G\beta_{5(s\text{-short})}$, $G\beta_{5(l\text{-long})}$. γ podjednotky můžeme klasifikovat do 4 rodin zahrnujících celkem 12 členů:

Rodina 1: $G\gamma_1$, $G\gamma_9$, $G\gamma_{11}$

Rodina 2: $G\gamma_5$, $G\gamma_{10}$

Rodina 3: $G\gamma_2$ ($G\gamma_6$), $G\gamma_3$, $G\gamma_4$, $G\gamma_7$, $G\gamma_8$ ($G\gamma_{olf}$), $G\gamma_{12}$

Rodina 4 : $G\gamma_{13}$

$\beta\gamma$ dimer stimuluje AC II, AC IV a AC VII v přítomnosti aktivované $G\alpha_s$ a má inhibiční vliv na AC I. Aktivuje MAP kinázovou dráhu, působí na fosfolipázu C a některé iontové kanály. Přímá účast $\beta\gamma$ podjednotek v přenosu signálu znamená rozšíření možností hormonální regulace. Dá se předpokládat, že funkční vlastnosti G proteinu složeného z identických α podjednotek, ale různých β či γ podjednotek, budou různé. Všeobecně lze říci, že většina $G\beta$ podjednotek může tvořit dimer s většinou $G\gamma$ podjednotek. Řada těchto variant spojení ale nemá funkční význam nebo ani nevzniká. Například $G\beta_2$ dimeruje s $G\gamma_2$, ne však s $G\gamma_1$. $G\beta_3$ netvoří komplex s $G\gamma_1$ ani $G\gamma_2$, zatímco $G\beta_1$ dimeruje s $G\gamma_1$ i $G\gamma_2$. Roli v kombinatorice podjednotek hraje i tkáňová specifita. Nejčastějším typem dimeru v sítnici oka je $G\beta_1\gamma_1$, zatímco v mozku je to $G\beta_1\gamma_2$.

Podjednotka	Zástupci	Tkáňová distribuce
Gβ	Gβ ₁	všude
	Gβ ₂	všude
	Gβ _{3(s-short)} ¹	krevní destičky?
	Gβ _{3(l-long)} ¹	všude
	Gβ ₄	všude, převážně mozek, plíce, placenta
	Gβ _{5(s-short)} ²	mozek
	Gβ _{5(l-long)} ²	sítnice
Gγ	Gγ ₁	sítnice-tyčinky
	Gγ ₂ (Gγ ₆)	všude, převážně mozek
	Gγ ₃	mozek, varlata
	Gγ ₄	všude
	Gγ ₅	všude, převážně placenta, játra
	Gγ ₇	všude, převážně mozek, brzlík
	Gγ ₈ (Gγ _{olf})	mozek, čichový epitel
	Gγ ₉	sítnice-čípky
	Gγ ₁₀	všude, převážně mozek, placenta
	Gγ ₁₁	všude (kromě mozku)
	Gγ ₁₂	všude
	Gγ ₁₃	všude, převážně mozek, čichový a jazykový epitel

Tabulka č. 2: Klasifikace a tkáňová distribuce Gβ a Gγ podjednotek.

¹ s-krátká, l-dlouhá izoforma Gβ₃

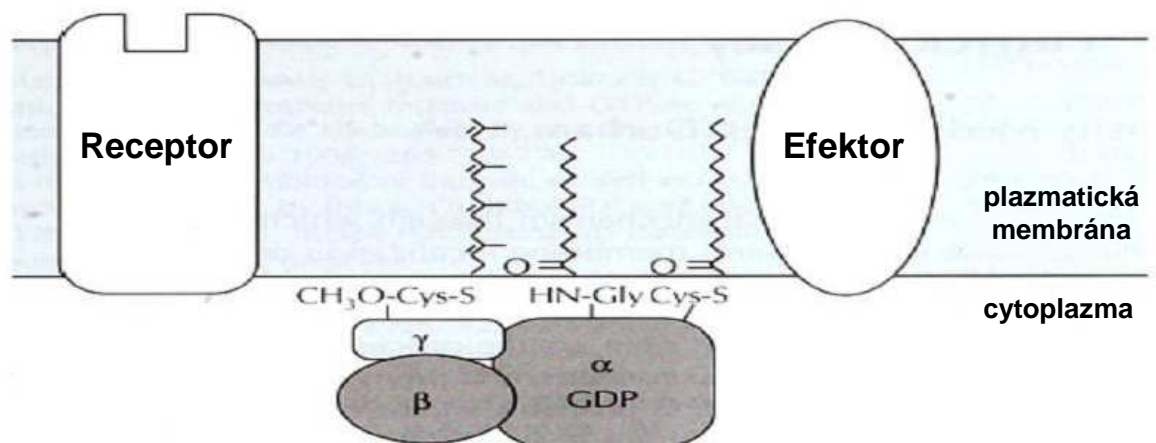
² s-krátká, l-dlouhá izoforma Gβ₅

Převzato a upraveno podle Nürnberg a kol. 1999; Ellis, 2004.

3.2.3. Posttranslační modifikace G proteinů

Posttranslační úpravy jsou chemické nebo fyzikální modifikace probíhající na polypeptidovém řetězci po skončení jeho syntézy na ribozomu. Gα podjednotky jsou modifikovány kovalentní vazbou zbytků kyseliny myristové a palmitové na jejich N-konci. Vazba myristátu ke koncovému glycinu je ireverzibilní a přispívá k asociaci α podjednotky s plazmatickou membránou. α podjednotka transducinu (α_t) je modifikována kromě myristátu také třemi dalšími méně hydrofobními zbytky mastných kyselin (Neubert a kol., 1992). Palmitoylací, která je reverzibilní, dochází k připojení palmitátu pomocí thioesterové vazby na cystein blízko N-konce (obr. č. 4). Dynamická modifikace α podjednotky palmitátem je jedním z mechanismů regulace buněčné lokalizace proteinu

a tím i regulace jeho funkce v signalizaci (Wedegaertner a kol., 1995). C-koncová část všech $G\gamma$ podjednotek obsahuje aminokyselinovou sekvenci CAAX, která určuje prenylací proteinu. Geranylgeranyltransferáza rozpoznává tento sekvenční motiv a přenáší geranylgeranylovou skupinu na C-koncový cysteinový zbytek. V případě $G\gamma_{11}$, $G\gamma_8$ ($G\gamma_{olf}$) a $G\gamma_{11}$ dochází k farnesylovači cysteinového zbytku pomocí farnesyltransferázy (McCudden a kol., 2005). Lipidová modifikace γ podjednotek je nezbytná pro správnou funkci $\beta\gamma$ dimeru. Prenylace umožňuje asociaci $\beta\gamma$ komplexu s α podjednotkou, receptorem a také efektoem (Casey 1994). Zatím nejsou známy žádné lipidové modifikace β podjednotek (Wedegaertner a kol., 1995). Funkce β podjednotek může být ovlivněna mono-ADP-ribosylací, která snižuje efektivitu $\beta\gamma$ komplexu v inhibici AC I (Lupi a kol., 2000).



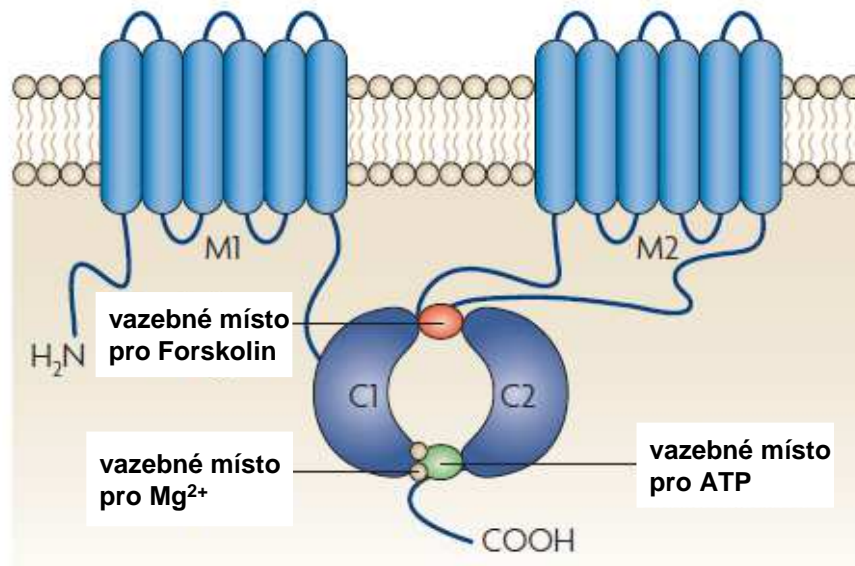
Obr. č. 4: Tři typy lipidových modifikací G proteinů: palmitoylace a myristoylace na N-konci α podjednotky s navázaným GDP; prenylace na C-koncovém cysteinovém zbytku γ podjednotky. Převzato a upraveno podle Casey, 1994.

3.3. Adenylylcykláza jako prototypický efektor G proteinů

Adenylylcykláza (AC) je významný membránově vázaný enzym katalyzující přeměnu ATP na cAMP, což je jeden z nejrozšířenějších sekundárních posílů, který aktivuje proteinkinázu A a hraje klíčovou roli v signálních drahách hormonů, neurotransmiterů, odorantů a chemokinů (Tang a Hurley, 1998). V současné době je známo devět savčích membránově vázaných a jedna rozpustná izoforma AC (Krupinski a kol., 1992; Hanoune a Defer, 2001; Pierre a kol., 2009).

3.3.1. Struktura adenylylcyklázy

Struktura adenylylcyklázy se podobá nějakému iontovému kanálu či přenašeči. Všechny izoformy AC tvoří krátký intracelulární N-konec, dvojice šesti transmembránových domén (M1 a M2) a dvě cytoplazmické domény (C1 a C2), každá o hmotnosti přibližně 40 kDa. Na rozhraní mezi doménou C1 a C2 se nachází katalytické aktivní místo (Tang a Gilman., 1995). Pro správnou katalytickou funkci je třeba dosáhnout určité vzájemné konformace obou domén. Krystalická struktura ukázala, že vazebné místo pro forskolin a ATP se nachází v hydrofobní kapse mezi doménami (Tesmer a kol. 1997; Zhang a kol., 1997); (obr. č. 5).



Obr. č. 5: Struktura adenylylcyklázy. M1, M2-dvojice šesti transmembránových domén, C1, C2-dvojice cytoplazmických domén. Převzato a upraveno podle Pierre a kol., 2009.

3.3.2. Regulace adenylcyklázy

V sedmdesátých letech minulého století byl z kořenů rostliny *Coleus forskohlii* izolován diterpen forskolin, který aktivuje všechny izoformy AC, kromě AC IX a solubilní adenylcyklázy (sAC); (Seamon a kol., 1981; Patel a kol., 2001). Všechny membránově vázané izoformy AC jsou stimulovány prostřednictvím $G\alpha_s$. Na základě aminokyselinových sekvencí a biochemických vlastností mohou být jednotlivé izoformy tohoto enzymu rozděleny do pěti skupin (Patel a kol., 2001, Watts a Neve, 2005).

Skupina AC I, AC III a AC VIII

Je pro ni charakteristická aktivace Ca^{2+} a kalmodulinem (Krupinski a kol., 1992; Cali a kol., 1996). Funkce AC I a AC VIII je přímo inhibovaná $G\beta\gamma$ podjednotkami a také $G\alpha_o$ (v případě AC VIII se jedná o možnou inhibici). Pro stimulaci AC III Ca^{2+} /kalmodulinem je nutná přítomnost guanylylimidodifosfátu nebo forskolinu (Choi a kol., 1992). Aktivita AC I a AC III je stimulována také fosforylací proteinkinázou C (PKC).

Skupina AC II, AC IV a AC VII

Tyto izoformy jsou stimulovány také $G\beta\gamma$ podjednotkami v přítomnosti aktivované $G\alpha_s$ (Tang a Gilman, 1991). Proteinkináza C stimuluje AC II a AC VII, zatímco na AC IV má inhibiční vliv (Watson a kol., 1994; Lai a kol., 1999).

Skupina AC V a AC VI

Tyto izoformy jsou exprimovány ve velkém množství v srdci. Jsou přímo inhibovány α podjednotkami G_i proteinů. Přestože AC V a AC VI není inhibována pomocí $G\beta\gamma$ podjednotek in vitro, u transfekovaných buněk bylo prokázáno snížení jejich aktivity především pomocí $\beta_1\gamma_2$. Silný inhibiční efekt má také již submikromolární koncentrace Ca^{2+} . Proteinkináza A (PKA) snižuje aktivitu obou izoform, zatímco proteinkináza C aktivuje AC V a inhibuje AC VI (Kawabe a kol., 1994; Simonds, 1999).

AC IX

Čtvrtá skupina zahrnuje pouze AC IX, která je jako jediná ze všech známých izoform necitlivá k diterpenu forskolinu a je regulována kalcineurinem (Paterson a kol., 1995). Inhibiční efekt vykazují Ca^{2+} ionty.

Solubilní AC (sAC)

Tato izoforma se vyskytuje především ve varlatech a není aktivována α podjednotkami Gs ani forskolinem. sAC je přímo stimulována bikarbonátem (Chen a kol., 2000).

Přehled jednotlivých izoforem AC, tkáňové distribuce, funkce a regulátorů jejich aktivity (G proteiny, PKA, PKC, Ca^{2+}/CaM , Ca^{2+}) je uveden v tabulce č. 3.

AC ^a	Tkáňová distribuce	Regulace G proteiny	PKA ^b	PKC ^c	Ca ²⁺ /CaM ^d	Ca ²⁺	Funkce
AC I	mozek, sítnice	stimulována G α_s inhibována G $\beta\gamma$ inhibována G α_o		↑	↑	↓	učení, paměť, synaptická plasticita
AC II	mozek, kosterní svalstvo, plíce, srdce	stimulována G α_s stimulována G $\beta\gamma$ ¹		↑			
AC III	mozek, čichový epitel	stimulována G α_s		↑	↑	↓	čich
AC IV	mozek, srdce, ledviny, játra, plíce, hnědá tuková tkáň, děloha	stimulována G α_s stimulována G $\beta\gamma$ ¹		↓			
AC V	srdce, mozek, ledviny, játra, plíce, děloha, nadledviny, hnědá tuková tkáň	stimulována G α_s inhibována G $\beta\gamma$ ² inhibována G α_i ³	↓	↑		↓	
AC VI	všude	stimulována G α_s inhibována G $\beta\gamma$ ² inhibována G α_i ³	↓	↓		↓	
AC VII	všude, výrazně exprimována v mozku	stimulována G α_s stimulována G $\beta\gamma$ ¹		↑			drogová závislost
AC VIII	mozek, plíce (varlata, nadledviny, děloha, srdce)	stimulována G α_s inhibována G $\beta\gamma$ inhibována G α_o ?			↑		učení, paměť, synaptická plasticita
AC IX	mozek, kosterní svalstvo	stimulována G α_s				↓	
sAC	varlata						kapacitace spermií

Tabulka č. 3: Přehled funkce, tkáňové distribuce a regulace izoforem adenylylcyklázy. Převzato a upraveno podle Simonds, 1999 a Sunahara a Taussig, 2002.

↑- stimulační vliv; ↓- inhibiční vliv

¹ stimulace $G\beta\gamma$ v přítomnosti aktivované $G\alpha_s$

² inhibiční efekt prokázán pouze u transfekovaných buněk

³ $G\alpha_i$ rodina ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ a $G\alpha_z$)

^a izoformy adenylcyklázy

^b PKA, proteinkináza A

^c PKC, proteinkináza C

^d Ca^{2+} /CaM, regulace Ca^{2+} a kalmodulinem

3.4. Proteom a proteomika

Proteom lze definovat jako soubor bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce či tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce a změny lokalizace (**prote**inový komplement **genomu**); (Wilkins a kol., 1995). Odráží aktuální metabolický stav dané buňky a je ovlivňován změnami podmínek v okolním prostředí (Collinsová a Jiráček, 2004). Proteomika je velmi rychle se rozvíjející obor, který usiluje o kvantitativní a kvalitativní porovnání jednotlivých proteomů za různých podmínek. Kromě identifikace bílkovin se zaměřuje také na zjištění jejich funkčních a strukturních vlastností.

Proteomika se významně uplatňuje v medicíně (studium příčin a mechanismů chorob), farmacii (vývoj léčiv), potravinářství (kvalita a bezpečnost potravin), průmyslu, ochraně životního prostředí a zemědělství (Chmelík, 2005). Existuje celá řada rozdílných přístupů k proteomickému studiu, mezi nejčastěji používané podle Chmelík (2005) patří:

- a) **Analytická proteomika** – hlavním cílem je identifikace jednotlivých bílkovin (stanovení molekulové hmotnosti, pořadí aminokyselin a určení posttranslačních modifikací) pomocí kombinace separačních metod a hmotnostní spektrometrie
- b) **Strukturní proteomika** – poskytuje kompletní informace o bílkovinách a jejich interakcích, zabývá se studiem struktury bílkovin s použitím krystalografie, NMR, MS a řady dalších technik
- c) **Funkční proteomika** – charakterizuje funkční celky nebo soubory bílkovin na základě společné funkce, studuje komplexní životní procesy
- d) **Expresní/diferenční (srovnávací) proteomika** – kvantitativně porovnává expresi mezi různými proteomy
- e) **High-throughput proteomika** – je zaměřena na rychlé získání velkého množství informací o bílkovinách, využívá metod s vysokou účinností: např. 2D elektroforézu, kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii s ionizací MALDI nebo elektrosprejem (ESI)
- f) **High-coverage proteomika** – zabývá se získáváním údajů o sekvenci aminokyselin s cílem stanovení pořadí co nejvyššího počtu aminokyselinových zbytků v bílkovině
- g) **Bottom-up proteomika** – klasický přístup, tzn. izolace bílkoviny, její enzymová hydrolýza a MS analýza peptidových štěpů
- h) **Shotgun proteomika** – směs bílkovin je enzymově rozštěpena, vzniklé peptidy jsou separovány a analyzovány tandemovou MS

- i) **Top-down proteomika** – izolace bílkoviny ze směsi a MS analýza fragmentací molekuly

Mezi základní metody, o které se proteomika opírá, patří **elektroforéza, chromatografie a hmotnostní spektrometrie**.

3.4.1. Elektroforéza

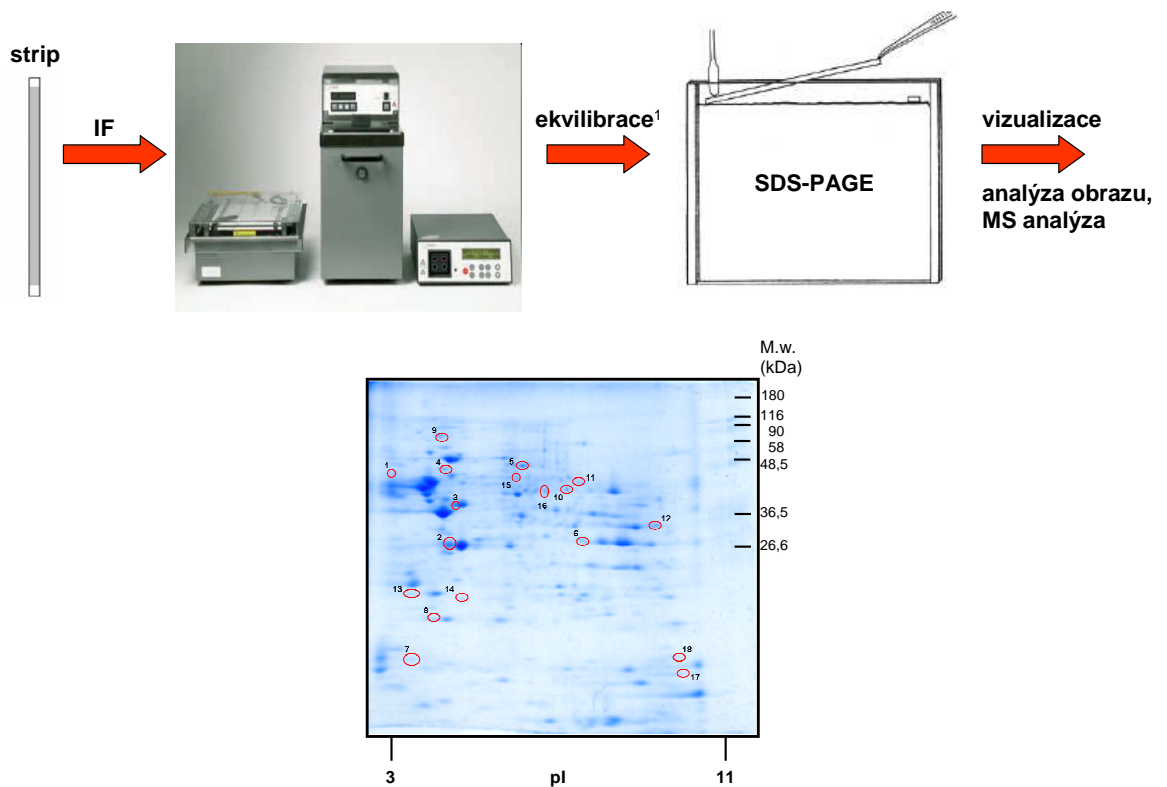
Tato separační elektromigrační metoda je založena na rozdílné pohyblivosti částic v elektrickém poli. Ve třicátých letech 20. století švédský biochemik Arne Tiselius, nositel Nobelovy ceny z roku 1948, separoval v roztoku mezi elektrodami proteiny krevního séra a popsal metodu pohyblivého rozhraní (dnes známou jako **zónová elektroforéza**). Kromě **papíru** se jako nosné médium využíval **škrobový gel** (Smithies 1955). **Agarový gel** byl později nahrazen čistou agarózou, která se dodnes uplatňuje zejména při dělení nukleových kyselin. V roce 1959 použili Raymond s Weintraubem **polyakrylamidový gel**, který separuje molekuly podle jejich náboje i velikosti (Raymond a Weintraub, 1959). Podle způsobu provedení můžeme rozlišit **polyakrylamidovou elektroforézu (PAGE) nativní, SDS-PAGE, dvojrozměrnou a kapilární. Kapilární elektroforéza** využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k dělení látek uvnitř křemenné kapiláry (Jorgenson a Lukacs, 1983). Zahrnuje celou rodinu elektromigračních separačních metod: kapilární zónovou elektroforézu (CZE), kapilární izotachoforézu (CITP), kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF), kapilární gelovou elektroforézu (CGE), afinitní kapilární elektroforézu (ACE), micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii (MEKC) a kapilární elektrochromatografii (CEC); (Kašička, 1997).

3.4.1.1. 2D elektroforéza

Tato nejpoužívanější proteomická separační metoda dělí proteiny nejprve podle jejich izoelektrického bodu pI a poté ve směru kolmém ke směru fokusace podle jejich molekulové hmotnosti. Poprvé byla popsána Patrickem O'Farrelem v roce 1975, který detekoval na gelu více než 1000 proteinových skvrn lyzátu *E.coli* (O'Farrel, 1975). V roce 1982 se metoda vylepšila zavedením imobilizovaných gradientů pH (IPG), které zjednodušily průběh izoelektrické fokusace (Bjellqvist a kol., 1982). Jednou z nejčastějších metod vizualizace proteinů je barvení pomocí koloidní Coomassie brilliant blue G-250 (CBB), které detekuje 10-30 ng proteinu/mm² bez ztrát při odbarvování, je plně kvantitativní a kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (Fountoulakis a kol., 1999). Umožňuje však detekovat pouze majoritní složky proteinové směsi. V roce 1979 zavedli

Switzer a kol. detekci bílkovin stříbrem, která je založena na redukci dusičnanu stříbrného na kovové stříbro (Switzer a kol., 1979). Tato metoda je vysoce citlivá, detekuje již 0,5 ng proteinu/mm², není však plně kvantitativní, protože ionty stříbra se váží pouze na některé aminokyselinové zbytky (Shevchenko a kol., 1996; Gharahdaghi a kol., 1999; Sinha a kol., 2001). V současné době se stále více uplatňují fluorescenční metody barvení proteinů, které tvoří rodinu SYPRO: Sypro Ruby, Sypro Orange, Sypro Red, Sypro Tangerine s citlivostí 0,5-4 ng/mm². Fluorescenční barviva jsou dobře kvantitativní a kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (Berggren a kol., 2000; Candiano a kol., 2004). Nabízí stejnou citlivost jako barvení stříbrem, mají však široký dynamický rozsah. Pro kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení proteomických map se využívají softwary, např. PDQuest od firmy Bio-Rad či ImageMaster od firmy GE Healthcare. Z principu 2D elektroforézy vychází tzv. diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE, 2D difference gel electrophoresis), která je založena na značení vzorků jedním ze tří fluoroforů s různými spektrálními charakteristikami (Cy2, Cy3 a Cy5), což umožňuje současnou separaci až tří proteinových vzorků v jednom gelu. Následně jsou vzorky spojeny a jako jediný směsný vzorek rozděleny 2D elektroforézou. Gel pak při skenování při různých vlnových délkách poskytne 3 různé obrazy (Ünlü a kol., 1997; Tomancová a kol., 2009).

2D elektroforéza je schopna rozlišit více než 5000 proteinů, dokáže separovat jednotlivé izofomy i posttranslačně modifikované proteiny. Mezi její nevýhody patří množství směsných spotů obsahujících různé proteiny se stejným izoelektrickým bodem a molekulovou hmotností. Problematická je často v analýze hydrofobních a membránových proteinů, proteinů s molekulovou hmotností nad 150 kDa a bílkovin s extrémními hodnotami pI (Petrák, 2005).



Obr. č. 6: Schéma 2D elektroforézy. ¹ ekvilibrace (redukce, alkylace) – pro zlepšení přenosu proteinů ze stripu do gelu; IF, izoelektrická fokusace.

3.4.2. Chromatografie

Chromatografie je metoda sloužící k separaci látek obsažených ve zkoumané směsi a také kvalitativní a kvantitativní analýze směsi. Mezi hlavní chromatografické procesy patří sorpce, distribuce mezi minimálně dvěma fázemi, difuze a přenos hmoty (Janák, 2011). V proteomice je často využívanou metodou separace peptidů vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC (high performance liquid chromatography). Tento pojem zavedl již v roce 1966 Csaba Horváth (Horvath a kol., 1967; Guiochon, 2005). Stacionární fáze v HPLC je tvořena velmi malými částicemi pravidelného tvaru, které vyplňují kolonu, což vede ke zvýšení odporu náplně kolony a průtok mobilní fáze musí být zajištěn vysokým tlakem. Zvyšují se také nároky na čerpadla a materiál chromatografických kolon, které musí být odolné vůči působení vysokého tlaku. Kapalinovou chromatografii lze provozovat na kolonách s mikrolitrovými až nanolitrovými průtoky s přímým propojením s hmotnostními spektrometry. Nanokapalinová chromatografie může být také realizována na bázi mikrofluidických čipů. Tyto systémy jsou často označovány jako μ -TAS (Micro Total Analysis System); (Smejkal a Foret, 2012). UPLC (ultra performance liquid

chromatography) je označení pro ultraúčinnou kapalinovou chromatografii s krátkými chromatografickými kolonami, která přináší řadu výhod v porovnání s klasickou HPLC: zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti a také zkrácení doby analýzy (Benešová a kol., 2012). Zmenšování vnitřního průměru kolon snižuje spotřebu stacionární/mobilní fáze a redukuje se také množství vzorku, který má být nadávkován na separační kolonu.

Princip	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografie
rozdělování	kapalina plyn kapalina kapalina	kapalina kapalina kapalina kapalina	kapalinová rozdělovací plynová rozdělovací papírová rozdělovací tenkovrstvá rozdělovací
superkritické fluidum	superkritická kapalina	pevná látka	superkritická fluidní
adsorpce	plyn kapalina kapalina	pevná látka pevná látka pevná látka	plynová adsorpční kapalinová adsorpční tenkovrstvá adsorpční
molekulové síto (omezená difuze)	kapalina	mikroporézní	gelová permeační
chemisorpce	kapalina kapalina	iontoměnič strukturně selektivní	iontově-výměnná afinitní
elektrický tok	kapalina kapalina	pevná látka kapalina	kapilární elektrochromatografie elektrokinetická

Tabulka č. 4: Principy a hlavní typy chromatografie. Převzato a upraveno podle Janák, 2011.

3.4.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Hmotnostní spektrometr tvoří iontový zdroj, analyzátor a detektor, který zaznamenává intenzitu vybraných iontů vznikajících v iontovém zdroji. Přímá ionizace molekul vzorku však vede k nadměrné fragmentaci, a proto se začala používat matrice, která absorbuje energii laseru. Další často využívanou měkkou ionizační technikou je ionizace elektrosprejem (ESI).

MALDI-TOF MS

Ke stanovení vyšších molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s analyzátorem doby letu (TOF, time-of-flight). Matrix, která je smíchána se směsí peptidů, předá energii laseru šetrnou formou peptidům ve vzorku, aniž by došlo k jejich nežádoucí fragmentaci. Změřená doba letu iontů je závislá na jejich náboji a hmotnosti (Domon a Aebersold, 2006). Výsledkem analýzy je přesné zjištění molekulových hmotností jednotlivých peptidů, které se porovnávají s databází teoretických molekulových vah peptidů, které by vznikly štěpením všech známých bílkovin proteázou, nejčastěji trypsinem. Srovnávání experimentálních dat s primárními sekvencemi proteinů v dostupných databázích se označuje jako peptidové mapování (Henzel a kol., 1993; Petrák, 2005; Tomancová a kol., 2009). Pomocí tandemové hmotností spektrometrie (MS/MS) lze získat informaci o aminokyselinové sekvenci jednoho nebo více peptidů (Petrák, 2005).

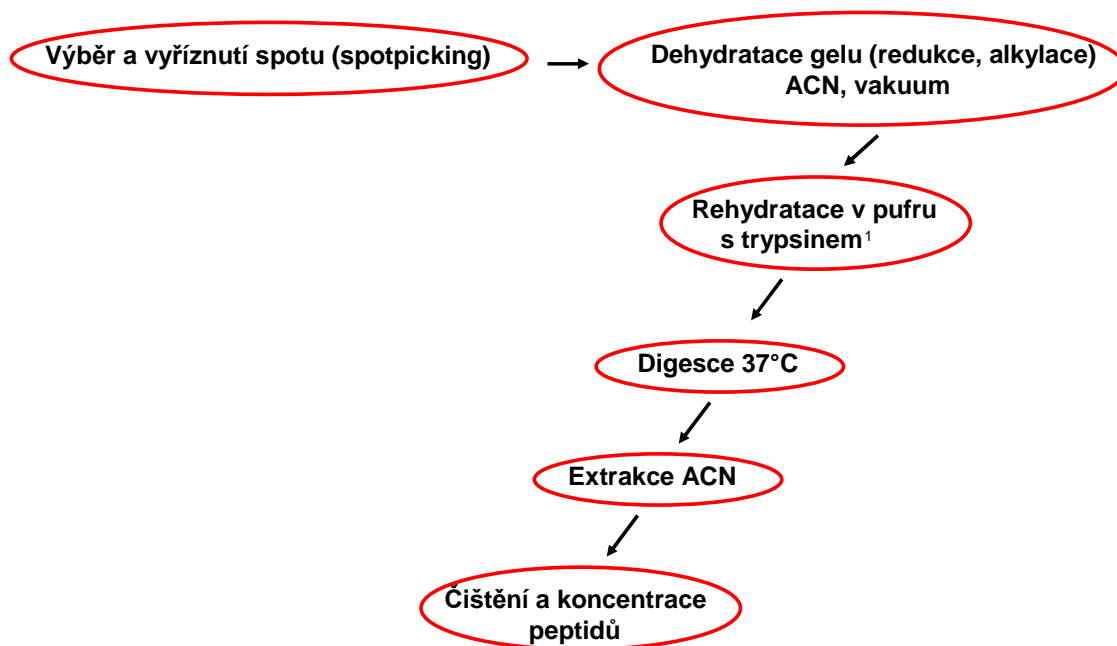
SELDI-TOF MS

K analýze peptidů a malých bílkovin je určena laserová desorpce/ionizace usnadněná povrchem (SELDI, surface enhanced laser desorption/ionization), která využívá aktivní interakce s chromatografickým povrchem vzorkovací destičky (čipu). Malé množství vzorku se na čip váže pomocí adsorpce, elektrostatických či afinitních interakcí (Templin a kol., 2003; Vorderwülbecke a kol., 2005; Tomancová a kol., 2009). Navázané peptidy jsou přímo na čipu ionizovány a analyzovány (analyzátor typu TOF). Výsledkem analýzy pomocí SELDI je komplexní proteinový profil, ve kterém jednotlivým proteinům či peptidům odpovídají píky o přesně změřené molekulové hmotnosti (Petrák, 2005). Výhodou této metody je především nízká spotřeba výchozího materiálu a zpracování velkého počtu vzorků. K nevýhodám patří menší citlivost pro proteiny s molekulovou hmotností nad 20 kDa (Tomancová a kol., 2009).

ESI-MS

Ionizace elektrosprejem (ESI, electrospray ionization) je ionizační technika, která pracuje za atmosférického tlaku, spektrum této metody je však omezeno na ionogenní a polární molekuly. Roztok ze separační kapiláry vstupuje do iontového zdroje, kde dochází vlivem silného elektrického pole k oddělení kationtů a aniontů. V závislosti na polaritě pole jsou ionty vypuzeny z kapiláry. Po překonání povrchového napětí dochází ke vzniku

elektrospreje. Počáteční vzniklé kapičky jsou působením sušícího plynu zmenšovány, čímž dochází ke zvětšování povrchového náboje. Po překročení kritické hodnoty povrchového náboje na kapičce dochází působením coulombických explozí ke vzniku menších kapiček až jednotlivých iontů. Spojení ESI-MS s kapalinovou chromatografií je často využíváno v proteomice, zejména díky schopnosti ESI vytvářet vícenásobně nabitě ionty (Norková a kol., 2013).



Obr. č. 7: Příprava vzorků z gelu pro identifikaci MS. ¹ štěpení proteázou, nejčastěji trypsinem; ACN, acetonitril.

3.4.3.1. Kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie poskytuje neúplné informace o kvantitě proteinů. Proto byly vyvinuty metody kvantifikace, které využívají hmotnostní spektrometrie a současně umožňují také identifikaci kvantifikovaných proteinů (Tomancová a kol., 2009).

ICAT

ICAT je metoda izotopově rozdílných afinitních značek (isotope-coded affinity tag), která spočívá v označení dvou vzorků lehkou a těžkou formou ICAT vázající se na proteiny obsahující cystein. Označené proteinové vzorky jsou následně smíchány a enzymaticky štěpeny. Před MS analýzou jsou označené peptidy afinitně separovány

od neoznačených pomocí kapalinové chromatografie na kolonách s mikrolitrovými průtoky (Gygi a kol., 1999). Díky odlišné molekulové hmotnosti značek lze analyzované peptidy v hmotnostním spektru kvantifikovat. Výhodou metody je kvantifikace proteinů s extrémními hodnotami pI a membránově vázaných proteinů (Han a kol., 2001). Nevýhodou je neschopnost ICAT činidla vázat se na proteiny neobsahující cystein.

SILAC

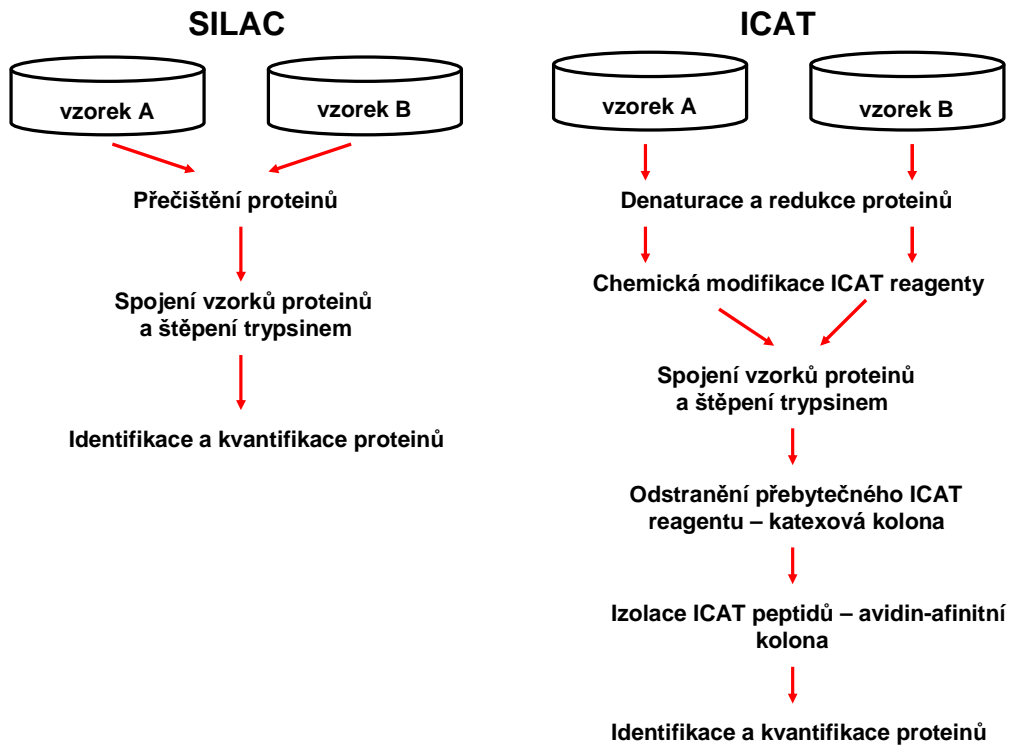
SILAC (stable isotope labelling by amino acids in cell culture) je metabolické značení, které využívá začleňování izotopově rozdílných aminokyselin (např. argininu či leucinu) do sekvence proteinů během jejich syntézy v průběhu kultivace buněk. Buňky se pěstují na dvou typech živných médií, kdy jedno obsahuje lehkou formu aminokyselin a druhé těžkou (Ong a kol., 2002). Po extrakci buněk z média jsou vzorky spojeny, štěpeny trypsinem a vzniklé fragmenty jsou analyzovány LC-MS/MS. Metabolická inkorporace stabilního izotopu byla v posledních letech rozšířena o částečné označení např. drozofily, myši či potkana (Gouw a kol., 2010).

iTRAQ

iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) je metoda, která využívá čtyř až osmi izobarických značek o stejné molekulové hmotnosti. Tyto značky obsahují tři základní oblasti: reaktivní, balanční (vyrovnávací) a reportérovou (Ross a kol., 2004). Proteinové vzorky jsou označeny, smíchány a analyzovány pomocí LC-MS/MS. Celková hmotnost značek se neliší, ale rozdílná je hmotnost reportérových iontů, které se při MS analýze ze značek odštěpují. Poměry intenzit jednotlivých reportérových iontů odpovídají relativnímu množství proteinu ve srovnávaných vzorcích (Aggarwal a kol., 2006; Tomancová a kol., 2009).

Proteinové čipy

Proteinové čipy (protein arrays) jsou podobné DNA či RNA čipům. Podle navázaných molekul na povrchu čipu se dělí na proteinové (na svém povrchu mají navázané definované malé proteiny) nebo protilátkové (s navázanými protilátkami pro vybrané proteiny); (Tomancová a kol., 2009). Na povrch čipů s imobilizovanými protilátkami je aplikován proteinový vzorek. Proteiny, které se vážou na odpovídající protilátky, mohou být detekovány přímo na čipu hmotnostní spektrometrií (SELDI-TOF-MS); (Collinsová a Jiráček, 2004).



Obr. č. 8: Schématické znázornění a porovnání metod SILAC a ICAT. Převzato a upraveno podle Ong a kol., 2002.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

Inhibitor proteáz byl zakoupen od firmy Roche Diagnostic, nitrocelulósová membrána od firmy Whatman, akrylamid, bis-akrylamid a Coomassie Blue G-250 byly získány od firmy Serva. IPG stripy, Pharmalyt buffer a sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou pocházely od firmy GE Healthcare. Všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v nejvyšší dostupné čistotě.

4.1.2. Protilátky

$G\alpha_i$ a $G\alpha_o$ proteinové podjednotky byly detekovány pomocí primárních protilátek popsány v publikacích Gierschik a kol., 1986; Goldsmith a kol., 1987; Backlund a kol., 1988. Výroba králičího polyklonálního antiséra anti- $G\alpha_{i1}/G\alpha_{i2}$, anti- $G\alpha_{i3}$, a anti- $G\alpha_o$ byla provedena podle Mitchell a kol., 1989; Mullaney a Milligan, 1990; Mullaney a kol., 1993. Tyto protilátky byly dříve použity v naší laboratoři Ihnatových a kol., 2002. Králičí polyklonální protilátky $G\beta$ (T-20, sc-378), Prohibitin (H-80, sc-28259), AC I (V-20, sc-586), AC II (C-20, sc-587), AC III (C-20, sc-588), AC IV (C-20, sc-589), AC V/VI (C-17, sc-590), AC VII (M-20, sc-1966), AC VIII (C-17, sc-32131), AC IX (N-18, sc-8576) a Na, K-ATPáza (H-300, sc-28800) byly zakoupeny od firmy Santa Cruz Biotechnology.

4.1.3. Expozice potkanů kmene Wistar zvyšujícím se dávkám morfia

Samci kmene Wistar (220-250 g) byli usmrceni dekapitací v éterové narkóze. Potkanům bylo podáváno morfium intramuskulární aplikací podle následujícího protokolu: 10 mg/kg (den 1. a 2.), 15 mg/kg (den 3. a 4.), 20 mg/kg (den 5. a 6.), 30 mg/kg (den 7. a 8.), 40 mg/kg (den 9.) a 50 mg/kg (den 10.). Potkani, kterým bylo aplikováno morfium, byli usmrceni 24 hodin (skupina +M10) nebo 20 dní (skupina +M10/-M20) po poslední dávce drogy paralelně s kontrolními potkany, kterým byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl. Při akutní expozici morfiu byli potkani usmrceni 24 hodin po aplikaci jednotlivých dávek (10-50 mg/kg); (skupina +M1) paralelně s kontrolními zvířaty (skupina -M1).

4.2. Metody

4.2.1. Příprava postnukleárního supernatantu (PNS) a izolace frakcí plazmatických membrán (PM) z frontální mozkové kůry potkanů

Ke vzorku kortexu byl přidán STEM pufr obsahující 250 mM sacharózu, 20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM kyselinu etylendiamintetraoctovou (EDTA, pH 7,6) a čerstvě připravený 1 mM PMSF se směsí inhibitorů proteáz. Homogenizace probíhala na ledu v homogenizátoru teflon-sklo po dobu 6 minut (2 g vlhké váhy/10 ml). Homogenát byl dále centrifugován v centrifuze Hettich Universal (1200 x g, 7 min, 4 °C). Výsledný PNS byl zamražen v kapalném dusíku a uskladněn v -80 °C.

Do kyvet bylo pipetováno 20 ml 30% perkolu (Percoll[®], Sigma), na který byl navrstven PNS. Kyvety byly vloženy do rotoru Ti70 ultracentrifugy Beckman (65 000 x g, 30 min, 4 °C). Centrifugace vedla k vytvoření 2 viditelných vrstev: mitochondrií (spodní vrstva) a PM (horní vrstva); (Bouřová a kol., 2009). Horní vrstva frakcí PM byla odebrána, resuspendována ve STEM pufru (1:3) a centrifugována na centrifuze Beckman (rotor Ti70, 175 000 x g, 90 min, 4 °C). Z gelovitého sedimentu perkolu se odebrala vrstva PM, která byla dále resuspendována v 1 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7,5). Směs byla vortexována, ručně homogenizována a zamražena v tekutém dusíku v mikrozkušnicích (á 250 µl) v -80 °C.

4.2.2. Stanovení koncentrace bílkovin

Bílkoviny byly stanoveny modifikovanou metodou podle Lowryho (Lowry a kol., 1951). Byla připravena kalibrační řada s použitím BSA jako standardu (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 a 200 µl BSA o koncentraci 1mg/ml). Do zkumavek bylo pipetováno 5 µl postnukleárního supernatantu nebo frakcí plazmatických membrán a doplněno deionizovanou vodou do objemu 500 µl. Měření koncentrace vzorků jsme prováděli v triplicátech. Poté bylo přidáno do každé zkumavky 1,5 ml roztoku A+B+C v poměru 50:1:1 (roztok A: 2% Na₂CO₃ + 0,1 N NaOH; roztok B: 2% Na,K-tartát; roztok C: 1% CuSO₄.5H₂O) a inkubováno 10-15 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 150 µl Folinova činidla (ředěno vodou v poměru 1:1) v intervalu 30 s a ihned promícháno. Inkubace probíhala 30 minut při laboratorní teplotě. Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena na spektrometru Perkin-Elmer MBA 2000 při vlnové délce 700 nm.

4.2.3. SDS-polyakrylamidová elektroforéza

Pro elektroforetické dělení bílkovin byla použita metoda standardní SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE), která probíhala v aparatuře Mini Protean II (Biorad) nebo v aparatuře Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences). Mezi umytá a odmaštěná skla byl nalit separační gel (dle charakteru vzorku) - viz tabulka č. 5 a 6 a ihned převrstven směsí nasyceného butanolu ve vodě. Po polymeraci byl gel opláchnut vodou a převrstven zaostřovacím gelem – viz tabulka č. 7.

separační gel %	10	12
voda	8 ml	6,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5 ml	5 ml
30% Ac-Bis	6,7 ml	7,3 ml
10% SDS	200 µl	200 µl
10% APS	90 µl	90 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Tabulka č. 5: Složení separačního gelu (20 ml, 10x8 cm).

separační gel %	10	12
voda	20,8 ml	17,4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	13 ml	13 ml
30% Ac-Bis	17,4 ml	20,8 ml
10% SDS	520 µl	520 µl
10% APS	235 µl	235 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tabulka č. 6: Složení separačního gelu (52 ml, 18x16 cm).

zaostřovací gel	10 ml	20 ml
voda	6 ml	12 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml	5 ml
30% Ac-Bis	1,3 ml	2,6 ml
10% SDS	100 µl	200 µl
10% APS	90 µl	180 µl
TEMED	8 µl	16 µl

Tabulka č. 7: Složení zaostřovacího gelu.

Vzorky postnukleárního supernatantu či plazmatických membrán byly solubilizovány ve vzorkovém pufru o následujícím složení:

Vzorkový pufr 4*

2,4 ml 1 M Tris (pH 6,8)

1 ml glycerolu

0,8 g SDS

0,8 g DTT nebo 0,4 ml merkaptoetanolu

1,0 mg bromfenolové modři

doplnit vodou do 10 ml

Vzorky byly zahřívány 3 minuty při teplotě 95 °C a pipetovány do jednotlivých jamek v gelu. Gely byly umístěny do elektroforetické vany a přelity elektroforetickým pufrem 1*:

Elektroforetický pufr 10*

30,3 g Tris

141,1 g glycinu

10 g SDS

doplnit vodou do 1000 ml

Elektroforéza probíhala 45 minut při 200 V v aparatuře Mini Protean II či 17 hodin při 15 mA v aparatuře Hoefer SE 600.

4.2.4. NuPAGE systém

Frakce plazmatických membrán byly také děleny pomocí NuPAGE systému od firmy Invitrogen. Vzorky byly solubilizovány v NuPAGE LDS vzorkovém pufru 4* s přídavkem NuPAGE redukčního činidla 1* podle instrukcí výrobce. Vzorky byly zahřívány 10 minut při 70°C a pipetovány v množství 10 µg na jamku NuPAGE 4-12% či 10% Bis-Tris polyakryamidového gelu. K elektroforéze byl použit elektroforetický pufr NuPAGE 10*:

NuPAGE 10* - elektroforetický pufr

52,3 g MOPS

30,3 g Tris

5 g SDS

1,5 g EDTA

doplnit vodou do 1000 ml

Do prostoru mezi gely bylo pipetováno 500 μ l NuPAGE antioxidantu. Elektroforéza probíhala 60 minut při 200 V.

4.2.5. Imunobloting

Pro přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu, na které pak probíhala jejich detekce, byla použita technika „mokrého“ Western blotu. Přenos probíhal 1 hodinu při konstantním napětí 100 V v zařízení od firmy Bio-Rad. Blotovací kazety byly vloženy do blotovacího pufru:

Blotovací pufr

3 g Tris

14,4 g glycinu

0,25 g SDS

200 ml metanolu

doplnit vodou do 1000 ml

Po přenosu byla membrána blokována alespoň 30 minut v čerstvě připraveném blokovacím pufru:

Blokovací pufr

5 g nízkotučného mléka

10 ml TBS pufru 10* pH 8,0 (84,12 g NaCl, 11,6 g Tris, doplnit vodou do 960 ml)

100 μ l Tween 20

doplnit vodou do 100 ml

Poté byla membrána přenesena do roztoku čerstvě připraveného ředícího pufru, který obsahoval rozpuštěnou primární protilátku.

Ředící pufr

1 g nízkotučného mléka

10 ml TBS pufru 10*

100 μ l Tween 20

doplnit vodou do 100 ml

Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc ve 4 °C. Poté byly membrány důkladně promyty v promývacím pufru po dobu 3*10 minut a inkubovány 1 hodinu v ředícím pufru obsahujícím sekundární protilátku s křenovou peroxidázou.

Promývací pufr

3 ml Tween 20

100 ml TBS pufru 10*

doplnit vodou do 1000 ml

Po inkubaci se sekundární protilátkou byly membrány opět promyty v promývacím pufru po dobu 3*10 minut. Proteiny byly detekovány pomocí chemiluminiscence, která byla zaznamenána na filmy KODAK či AGFA. Vyvolané bloty byly skenovány pomocí skeneru Astra 610P UMAX a kvantitativně analyzovány pomocí programu Aida.

4.2.6. Příprava vzorků pro izoelektrickou fokusaci

Ke vzorkům postnukleárního supernatantu (400 µg-2 mg) či frakcím plazmatických membrán byl přidán 100% vychlazený aceton v poměru 1:3. Vzorky byly umístěny do - 20 °C a ponechány přes noc. Ráno byly centrifugovány (16000 x g, 20 min, 4 °C), supernatant byl odlit a k peletu byla přidána 6% TCA. Precipitace probíhala 90 minut na ledu v lednici. Po centrifugaci (16000 x g, 10 min, 4 °C) byl supernatant odlit a peleta promyta 400 µl 96% ledovým etanolem. Vzorky byly ponechány 1 hodinu při pokojové teplotě. Směs byla centrifugována (16000 x g, 10 min, 4 °C) a zbývající peleta byla solubilizována 3 hodiny při laboratorní teplotě ve 250 µl čerstvě připraveného vzorkového pufru o následujícím složení:

Vzorkový pufr (složení pro 2D elektroforézu)

420,7 mg močoviny

152,2 mg thiomčoviny

40 mg CHAPS

10 mg DTT

10 µl 1 % amfolinů

1 mg bromfenolové modři

doplnit vodou do 1 ml

Po solubilizaci byly vzorky krátce stočeny na malé centrifuze, čímž byly odstraněny případné shluky proteinů, které vedou ke špatné fokusaci vzorku, a napipetovány do jednotlivých žlábků rehydratační vaničky (Immobiline DryStrip Reswelling Tray). Na vzorky ve vaničce byly přeneseny stripy (proužky gelů na plastových nosičích), ve kterých je vytvořen imobilizovaný gradient pH (Immobiline

DryStrip, 3-11 NL, 13 cm) – gelovou stranou směrem dolů. Pomocí jehly byly odstraněny bubliny mezi gelem stripu a vzorkem a stripy byly zality minerálním olejem kvůli ochraně před vysycháním. Rehydratace (absorpce vzorku do gelu stripu) probíhala přes noc v uzavřené vaničce (10-20 hodin).

4.2.7. Izoelektrická fokusace – dělení proteinů v prvním rozměru

Izoelektrická fokusace je proces dělení bílkovin podle jejich izoelektrického bodu pI. Na gel stripu je aplikováno elektrické napětí, proteiny migrují ke katodě či anodě podle svého náboje až do chvíle, kdy pH v gelu odpovídá pI proteinu (pH, kdy je molekula elektroneutrální). Po rehydrataci vzorků byly na aparaturu Multiphore II (Amersham Biosciences) přeneseny stripy gelem nahoru tak, aby bazický konec směřoval ke katodě a kyselý konec k anodě. Na konce stripů byly položeny elektrodové papírky, které byly napuštěny destilovanou vodou. Po přiložení elektrod byl prostor fokusátoru zalit 200 ml minerálního oleje. Po zapojení chlazení na 15 °C (MultiTemp III, Amersham Biosciences) byl nastaven zdroj EPS 3501XL na program pro izoelektrickou fokusaci:

napětí	volthodiny
150 V	1 Vh
150 V	750 Vh
500 V	500 Vh
3500 V	10 kVh
3500 V	32 kVh
500 V	3000 Vh

Tabulka č. 8: Schéma programu pro izoelektrickou fokusaci.

Izoelektrická fokusace probíhala celkově cca 24 hodin. Poté byly stripy buď ihned použity nebo uloženy do Petriho misek a umístěny v mrazícím boxu při – 20 °C.

4.2.8. Ekvilibrace stripů a SDS-PAGE – dělení proteinů ve druhém rozměru

Byly připraveny dva ekvilibrační roztoky, z nichž první obsahoval 1% ditiotritol a druhý 2,5% jodacetamid se špetkou bromfenolové modře. Stripy byly opláchnuty od minerálního oleje a promyty nejprve v 6 ml ekvilibračního roztoku s ditiotritolem za mírného třepání po dobu 15 minut. Poté byly promyty v 6 ml ekvilibračního roztoku s jodacetamidem opět po dobu 15 minut za mírného třepání.

Ekvilibrační roztok

25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

75 ml 99 % glycerolu

5 g SDS

90 g močoviny

0,0075 g EDTA

doplnit vodou do 250 ml

Pro dělení ve druhém rozměru 2D elektroforézy byla použita SDS-polyakrylamidová elektroforéza, která probíhala v aparatuře Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences). Byl použit 10 či 12 % gel o složení viz tabulka č. 6. Gel byl převrstven vodným roztokem butanolu a ponechán tuhnout alespoň 2 hodiny. Po polymeraci byl na povrch gelu promytého od butanolu vložen ekvilibrovaný strip, k jehož jednomu konci byl přiložen kousek filtračního papírku s napipetovaným standardem molekulových hmotností – 5 μ l (Sigma).

Strip byl přelit rozehrátou 0,5% agarózou (Sigma). Po 15 minutách byla aparatura zapojena ke zdroji EPS 3501XL. Elektroforéza probíhala za intenzivního chlazení ve dvou fázích:

- a) 20 minut při 20 mA
- b) 4 hodiny při 90 mA (pro 4 gely v sérii)

Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy čelo dosáhlo výšky 1 cm od spodního okraje skel.

4.2.9. Barvení stříbrem

Po proběhnutí elektroforézy byly gely ponechány 1 hodinu na třepačce ve 150 ml fixačního roztoku :

Fixační roztok

400 ml etanolu

100 ml kyseliny octové

500 ml vody

Barvení stříbrem probíhalo pomocí kitu ProteoSilverTM Plus Silver Stain Kit (Sigma) podle následujícího protokolu doporučeného výrobcem:

- a) promývání ve 100 ml 30 % etanolu po dobu 10 minut
- b) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 10 minut
- c) promývání ve 100 ml roztoku, který obsahuje 1 ml senzitivační emulze
- d) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 10 minut
- e) opakované promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 10 minut
- f) promývání ve 100 ml roztoku, který obsahuje 1 ml emulze s obsahem dusičnanu stříbrného
- g) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 1 minuty
- h) promývání ve 100 ml roztoku, který obsahuje 5 ml vyvíjecí emulze I a 0,1 ml vyvíjecí emulze II po dobu 3-7 minut podle potřeby
- i) přidání 5 ml stop emulze do roztoku, který obsahuje vyvíjecí emulzi I a II, inkubace 5 minut
- j) promývání ve 200 ml deionizované vody po dobu 15 minut

Poté se gely mohou uchovávat krátkodobě v deionizované vodě nebo se umístí na 20 minut do sušícího roztoku a vysuší mezi listy celofánu na sušičce (75 minut, 80 °C).

Sušící roztok

250 ml metanolu

30 ml glycerolu

720 ml vody

4.2.10. Barvení koloidní Coomassie Blue G-250

Gely se po proběhnutí elektroforézy umístí nejprve do fixačního roztoku po dobu 45 minut:

Fixační roztok (pro barvení CBB G-250)

500 ml metanolu

70 ml kyseliny octové

430 ml vody

Poté se nechají inkubovat v **barvicí směsi roztoku A+B** alespoň 12 hodin. K žádanému odbarvení se gely promyjí za mírného třepání několikrát destilovanou vodou. Uchovávají se zatavené ve fólii v 1% kyselině octové. Při koloidním barvení nedochází díky přítomnosti síranu amonného ke ztrátám proteinů při odbarvování.

Roztok A

0,6 g CBB G-250

49,4 ml vody

Roztok B

18,8 ml 85 % kyseliny orthofosforečné

80 g (NH₄)₂SO₄

101,2 ml vody

Na 1 gel (200 ml) se smíchá 40 ml metanolu + 10 ml roztoku A + 40 ml roztoku B + 110 ml vody.

4.2.11. Hodnocení gelů

Gely barvené stříbrem či koloidní Coomassie Blue G-250 byly skenovány a hodnoceny pomocí softwaru PDQuest (Bio-Rad, verze 7.3.1.). Po oříznutí obrázků gelů a nastavení vyhovujících kritérií bylo odečteno pozadí a vytvořen tzv. master gel, který je společným průnikem všech bodů zobrazených při analýze 2D map kontrolních a morfiem ovlivněných vzorků, čímž byly vyloučeny skvrny přítomné pouze ojediněle na některých 2D mapách. Bylo provedeno automatické přiřazování odpovídajících si proteinových skvrn (spotů) na různých gelech v jedné sadě – tzv. matching, který byl ověřen manuální kontrolou a korekcí detekovaných spotů. Gely byly rozděleny do replikačních skupin, které tvořily alespoň 4 zástupci dané skupiny (kontrola/morfium), a byly vyhodnoceny kvantitativní změny. Hodnoty integrálních absorbancí, které se lišily alespoň dvakrát, byly považovány za signifikantní.

4.2.12. MALDI-TOF MS/MS

Analýza bílkovin PNS pomocí MALDI-TOF MS/MS probíhala podle metodiky popsané v publikaci Drastichová a kol., 2010. Vybrané proteinové spoty byly vyříznuty skalpelem z 2D gelů barvených koloidní Coomassie blue G-250, umístěny do mikrozkuhavek a přelity 100 µl pufru o složení: 50 mM hydrogenuhličitan amonný, 50% acetonitril (ACN), 50 mM DTT. Vzorky byly sonikovány 5 minut, po 15 minutách byl supernatant odlit a ke kouskům gelu bylo přidáno 100 µl pufru o složení: 50 mM hydrogenuhličitan sodný, 50% ACN, 50mM jodacetamid. Vzorky byly sonikovány 5 minut, po 25 minutách byl supernatant odstraněn a ke vzorkům bylo opět přidáno 100 µl pufru o složení: 50 mM hydrogenuhličitan amonný, 50% ACN, 50 mM DTT, sonikace probíhala 5 minut z důvodu odstranění přebytečného jodacetamidu. Poté byl supernatant odlit a ke vzorkům bylo přidáno 100 µl ultračisté vody pro HPLC. Voda byla odstraněna a vzorky byly sonikovány s přídatkem 100 µl ACN po dobu 5 minut. Poté byl ACN odlit a mikrozkuhavky se vzorky byly ponechány několik minut otevřené z důvodu evaporace

zbytků ACN. Ke vzorkům bylo přidáno 5 ng trypsinu rozpuštěného v 10 µl 50 mM hydrogenuhličitanu amonného. Vzorky byly inkubovány při 37 °C přes noc. Poté k nim byla přidána 1% kyselina trifluoroctová a 30% ACN. Vzorky byly sonikovány 10 minut a poté bylo 0,5 µl nanášeno na MALDI destičku a ponecháno do úplného zaschnutí. Vzorky byly měřeny pomocí 4800 MALDI TOF/TOF analyzátoru (Applied Biosystems/MDS Sciex) s Nd:YAG laserem (355 nm, frekvence 200 Hz). Hmotnostní spektra byla generována pomocí 4000 Series Explorer V 3.5.3. (Applied Biosystems/MDS Sciex) a pro zpracování dat byl použit Mascot v. 2.1 (Matrix Science). Byla prohledávána databáze NCBI verze 20100614, *Rattus norvegicus*. Tolerance hmotnostní detekce: 120 ppm, fixní modifikace: karbamidometylace, další modifikace: oxidace metioninu.

4.2.13. LC-MS/MS

Analýza frakcí PM pomocí LC-MS/MS probíhala podle metodiky popsané v publikacích Shevchenko a kol., 2006; Ujčíková a kol., 2014. Vybrané proteinové spoty byly vyříznuty skalpelem z 2D gelů barvených koloidní Coomassie blue G-250, umístěny do mikrozkušavek a odbarveny inkubací ve 100 µl pufru obsahujícím 100 mM hydrogenuhličitan amonný/acetonitril (ACN) v poměru 1:1 za mírného třepání na třepačce po dobu 1 hodiny. Poté byly kousky gelů dehydratovány v 500 µl ACN a po jeho odstranění byly sušeny ve vakuové centrifuzě. Ke vzorkům bylo dále přidáno 100 µl 10 mM DTT rozpuštěného ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném a kousky gelů byly redukovány při 56 °C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok DTT nahrazen stejným objemem 55 mM jodacetamidu rozpuštěného ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 45 minut ve tmě. Dále byly promyty 100 µl 100 mM hydrogenuhličitanu amonného a dehydratovány přidáním 500 µl ACN. Poté byl supernatant odstraněn a kousky gelů byly sušeny ve vakuové centrifuzě. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl pufru s trypsinem (20 µg/ml) rozpuštěným v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném. Suché kousky gelů byly umístěny do chladu, aby nabobtnaly. Poté byly vzorky sonikovány 5 minut a inkubovány přes noc při 37 °C. Supernatant byl odlit do nové mikrozkušavky a štěpení probíhalo ještě jednou stejným způsobem. K tryptickým peptidům bylo přidáno 150 µl extrakčního pufru (5% kyselina mravenčí/ACN v poměru 1:2) a následovala sonikace po dobu 15 minut. Roztok byl centrifugován a supernatant byl odebrán do nové mikrozkušavky. Extrakce byla ještě jednou zopakována a druhý extrakt byl spojen s předchozím. Po lyofilizaci byly vysušené extrakty zamrazeny v -80 °C.

Vysušené proteinové extrakty byly rozpuštěny ve 20 μ l 1% kyseliny mravenčí, centrifugovány (10 000 x g, 5 min, 4 °C) a supernatant byl přelit do inzertu ve vialkách. Aparatura určená pro analýzu vzorků byla tvořená chromatografem Proxeon Easy-nLC (Proxeon) spojená s maXis Q-TOF hmotnostním spektrometrem (Bruker Daltonics). Softwary pro kontrolu nLC-MS/MS zařízení byly HyStar 3.2 a micrOTOF-control 3.0. Data byla zpracována programy ProteinScape 2.0 a DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics).

3 μ l vzorku byly nastříknuty na kolonu (NS-AC-11-C18 Biosphere C18, velikost částic: 5 μ m, velikost pórů: 12 nm, délka: 20 mm, vnitřní průměr: 75 μ m) s předkolonou NS-MP-10 Biosphere C18 (velikost částic: 5 μ m, velikost pórů: 12 nm, délka: 20 mm, vnitřní průměr: 100 μ m), obě byly vyrobeny firmou NanoSeparations (Nizozemsko).

Separace peptidů probíhala při laboratorní teplotě formou lineárního gradientu mezi mobilní fází A (voda) a B (acetonitril), obě obsahovaly 0,1% kyselinu mravenčí. Separace byla zahájena promýváním systému 5% mobilní fází B, následovala gradientová eluce na 30 % B za 70 minut, poté další gradientová eluce na 50 % B po 10 minutách a poté zvýšení na 100 % B po 8 minutách. Eluce 100 % B trvala 2 minuty. Nakonec byla kolona promývána 5% mobilní fází B po dobu 2 minut. Průtoková rychlost byla 0,25 μ l/min.

Parametry analýzy byly následující: napětí ESI +4,5 kV, skenovací rychlost 1,3 Hz, sušící plyn (N_2), průtok sušícího plynu 1 l/min, teplota sušícího plynu 160 °C, tlak rozprašovacího plynu 0,4 bar, rozsah skenování 100-2200 m/z . Jako referenční jednomocný ion byl použit $C_{24}H_{19}F_{36}N_3O_6P_3$ (m/z 1221.9906). Celá LC-MS/MS analýza byla provedena v duplikátech. Zpracování dat probíhalo pomocí softwaru ProteinScape. Proteiny byly identifikovány na základě shody tandemových hmotnostních spekter s databází proteinů SwissProt za pomoci softwaru MASCOT (<http://www.matrixscience.com>); *Rattus norvegicus*. Čím je vyšší MASCOT skóre proteinu, tím je vyšší pravděpodobnost jeho identifikace. Aby byl protein validní, musí mít skóre alespoň 60. Tolerance hmotnostní detekce byla nastavena na \pm 10 ppm pro MS analýzu a \pm 0,05 Da pro MS/MS analýzu. Mezi možné modifikace aminokyselin byla zvolena: karbamidometylace cysteinu, hydroxylace lysinu a prolinu, fosforylace serinu, treoninu a tyrosinu a oxidace metioninu. Náboj monoizotopického peptidu byl nastaven na 1+, 2+ a 3+, pro odstranění falešně pozitivních výsledků byla vybrána volba *Peptide Decoy*.

5. VÝSLEDKY

5.1. Vzestup obsahu adenylylcyklázy I a II ve frakcích plazmatických membrán indukovaný morfiem

Množství adenylylcyklázy I a II bylo nejprve detekováno ve frakcích plazmatických membrán izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia (10-denní adaptace, 10-50 mg/kg, viz kapitola Materiál a metody). Kvantitativní analýza 32 imunoblotů s množstvím bílkoviny 50 µg nebo 100 µg prokázala signifikantní rozdíl. Obsah AC I v membránách izolovaných z potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) vzrostl až 8x vzhledem ke kontrole (skupina -M10); (obr. č. 9, panel A), $p < 0.001$. Obsah AC II indikoval výrazný vzestup až 2,5x v porovnání s kontrolními vzorky (obr. č. 10, panel A), $p < 0.01$. Zvýšená hladina AC I a AC II se překvapivě neprojevila ve vzorcích PM izolovaných z potkanů vystavených morfiu po dobu 10 dní, ale byli usmrceni 20 dní po aplikaci poslední dávky (skupina +M10/-M20). Kontrolním potkanům byla po dobu 10 dní podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M10/-M20); (obr. č. 9 a 10, panel B). Lze tak předpokládat, že vzestup AC I a AC II je plně reverzibilní a také specifický, protože hladina obsahu AC III, IV, V/VI, VII, VIII a IX zůstala nezměněna (obr. č. 11 a 12). Stejně tak krátkodobá akutní expozice morfiu, při níž byli potkani usmrceni 24 hodin po aplikaci jednotlivých dávek (10-50 mg/kg); (skupina +M1), nevyvolala u AC I a AC II vzestup vzhledem ke kontrole (skupina -M1); (obr. č. 13 a 14).

5.2. Nezměněná hladina Na, K-ATPázy

Další část našich experimentů byla orientována na analýzu jiných membránově vázaných signálních molekul. Ve stejných vzorcích PM, které byly použity na detekci všech izoform AC, byl stanoven obsah Na, K-ATPázy. Na, K-ATPáza je prototypický standard plazmatických membrán, který by neměl být ovlivněn působením morfia. Kvantitativní analýza signálu 3 imunoblotů potvrdila nezměněnou hladinu tohoto membránově vázaného proteinu ve vzorcích PM potkanů, kteří byli usmrceni 24 hodin i 20 dní po podání poslední dávky (obr. č. 15, panel A a B).

5.3. Nezměněná hladina trimerních G proteinů

Kvantitativní stanovení bylo doplněno analýzou obsahu G proteinů ve frakcích PM použitých k detekci AC a Na, K-ATPázy. Náš předchozí výsledek prokázal, že dlouhodobá expozice potkanů zvyšujícím se dávkám morfia vede ke snížení odpovědi trimerních G proteinů třídy Gi/Go na stimulaci agonisty μ -OR a δ -OR. Účinnost κ -OR se nezměnila (Bouřová a kol., 2010). Kvantitativní analýza 3 imunoblotů ukázala nezměněný obsah α a β podjednotek trimerních G proteinů: $G\alpha_{i1}/G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$, $G\alpha_s$ a $G\beta$ (obr. č. 16). Změna funkční aktivity nemusí tedy nutně znamenat změnu v membránové hustotě G proteinů.

5.4. Identifikace proteinů PNS připraveného z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; analýza pomocí MALDI-TOF MS/MS

Vzorky PNS (600 μ g) byly precipitovány 100% ledovým acetonem a 6% TCA, solubilizovány ve vzorkovém pufru a fokusovány na stripech s imobilizovaným gradientem pH 3-11. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v aparatuře Hoefer SE 600. Obarvené naskenované gely byly rozděleny do replikačních skupin, které tvořily 4 zástupci dané skupiny (kontrola/morfium) a byly vyhodnoceny kvantitativní změny pomocí programu PDQuest. Hodnoty integrálních absorbancí, které se lišily alespoň dvakrát, byly považovány za signifikantní. Barvení stříbrem pomocí kitu ProteoSilverTM Plus Silver Stain Kit (Sigma) rozlišilo celkem 440 proteinových spotů (obr. č. 17, levý panel). Barvení koloidní Coomassie blue G-250 pro MS analýzu rozlišilo 200 proteinových spotů, z nichž bylo vybráno 10 pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS/MS (obr. č. 17, pravý panel). Seznam identifikovaných změněných proteinů spolu s jejich buněčnou lokalizací a charakterizací je uveden v tabulkách č. 9 a 10.

Spot	Označení proteinu	Název proteinu	Skóre proteinu	Počet příraz. peptidů	[%] Pokrytí sekvence	MH ^a (kDa)	pI ^b	Násobek změny
1	gij148747414	guanin deamináza	278	28	68	51,4	5,5	↑2,5
2	gij17105370	V-ATPáza, mozková izoforma	601	40	72	56,9	5,6	↑2,6
3	gij1352384	protein disulfid-izomeráza A3	277	24	36	57,0	5,9	↑3,4
4	gij40254595	dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2	273	26	40	62,7	6,0	↑3,6
5	gij149054470	N-etylmaleimid senzitivní fúzní protein, izoforma CRA_a	246	32	32	80,6	6,1	↑2,0
6	gij42476181	malát dehydrogenáza, mitochondriální prekurzor	604	27	62	36,1	8,9	↑1,4
7	gij62653546	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	458	21	48	36,0	8,4	↑1,6
8	gij202837	aldoláza A	599	28	74	39,7	8,3	↑1,3
9	gij31542401	kreatin kináza typ-B	287	21	47	43,0	5,3	↓0,86
10	gij40538860	akonitát hydratáza, mitochondriální prekurzor	348	32	41	86,1	7,9	↑1,26

Tabulka č. 9: Proteomická analýza PNS připraveného z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem.

^a Teoretická hodnota molekulové hmotnosti.

^b Teoretická hodnota izoelektrického bodu.

Název proteinu	Změna (závislost vs. kontrola)	Subcelulární lokalizace	Funkční kategorie	Charakteristika proteinu - PNS
guanin deamináza	vzestup	cytoplazma	metabolismus	purinový metabolismus, degradace guaninu (Paletzki, 2002)
V-ATPáza, mozková izoforma	vzestup	buněčná membrána	transport	protonový transport za spotřeby ATP, vakuolární acidifikace (Toei a kol., 2010)
protein disulfid-izomeráza A3	vzestup	lumen endoplazmatického retikula	buněčný vývoj a regulace	up-regulace tohoto proteinu způsobuje apoptózu, (Tanaka a kol., 2000), změněná hladina zaznamenána během neurodegenerativních procesů (Conn a kol., 2004)
dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2	vzestup	cytoplazma	neuronální vývoj a regulace	neuronální vývoj, (Kim a kol., 2005), pohyb buněk, jeden z hlavních činitelů v kontrole oxidativního stresu (Drabik a kol., 2007)
N-etylmaleimid senzitivní fúzní protein, izoforma CRA_a	vzestup	cytoplazma	transport	regulace membránového transportu, podíl na primingu váčků (Abul-Husn a kol., 2011)
malát dehydrogenáza, mitochondriální prekurzor	vzestup	matrix mitochondrie	metabolismus	L-malátová dehydrogenázová aktivita; oxidativní stres má vliv na up-regulaci tohoto proteinu (Shi a kol., 2011)
glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	vzestup	cytoplazma	metabolismus	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázová a nitrosylázová aktivita; překvapivá role v apoptóze (Chuang a kol., 2005); hlavní cílový protein oxidativního stresu (Hwang a kol., 2009)
aldoláza A	vzestup	mitochondrie	metabolismus	role v glykolýze a glukoneogenezi; potenciální vliv na regulaci volné intracelulární koncentrace InsP ₃ a následně na dynamiku kalcia (Koppitz a kol., 1986; Baron a kol., 1999); exprese aldolázy A může být regulována chronickým podáváním litia (Hua a kol., 2000)
kreatin kináza typ-B	pokles	cytoplazma	metabolismus	fosforylace kreatinu na kreatinfosfát pomocí ATP (kosterní svalstvo, myokard, mozková tkáň), vývoj mozku (Shen a kol., 2002)
akonitát hydratáza, mitochondriální prekurzor	vzestup	mitochondrie	metabolismus	isomerace citrátu na izocitrát, Fe-S protein, náchylnost k oxidativnímu poškození může být vztažena k [4Fe-4S] klastru a jeho aktivnímu místu (Perluigi a kol., 2005)

Tabulka č. 10. Funkční charakteristika proteinů PNS změněných vlivem dlouhodobé expozice morfiu.

Analyzované proteiny jsou lokalizovány v **cytoplasmě** (**1**-guanin deamináza, ↑2,5x; **4**-dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2, ↑3,6x; **5**-*N*-etylmaleimid senzitivní fúzní protein, izoforma CRA_a, ↑2,0x; **7**-glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, ↑1,6x; **9**-kreatin kináza typ-B, ↓0,86x), **buněčné membráně** (**2**-V-ATPáza, mozková izoforma, ↑2,6x), **endoplazmatickém retikulu** (**3**-protein disulfid-izomeráza A3 ↑3,4x) a **mitochondriích** (**6**-malát dehydrogenáza, mitochondriální prekurzor, ↑1,4x; **8**-aldoláza A, ↑1,3x; **10**-akonitát hydratáza, mitochondriální prekurzor, ↑1,3x). Devět z deseti proteinů bylo up-regulováno, 1,3-3,6x. Tento vzestup byl zaznamenán u bílkovin, které se podílí na degradaci guaninu (**1**), vakuolární acidifikaci (**2**), apoptóze (**3,7**), oxidativním stresu (**4, 6, 7, 10**), membránovém transportu (**5**) a glykolýze (**8**). Kreatin kináza typ-B, regulační enzym cytozolárního energetického metabolismu, byl jediný down-regulovaný protein PNS (↓0,86x); (Ujčíková a kol., 2014).

5.5. Identifikace proteinů PM izolovaných z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; analýza pomocí LC-MS/MS

Vzorky PM (400 µg pro barvení stříbrem, 2 mg pro barvení CBB) byly zpracovány a hodnoceny stejným způsobem jako vzorky PNS. Barvení stříbrem pomocí kitu ProteoSilverTM Plus Silver Stain Kit (Sigma) rozlišilo celkem 300 proteinových spotů (obr. č. 18, levý panel). Barvení koloidní Coomassie blue G-250 pro analýzu kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií rozlišilo 490 proteinových spotů, z nichž bylo vybráno 18 signifikantně odlišných proteinových skvrn (obr. č. 18, pravý panel). Seznam identifikovaných změněných proteinů spolu s jejich buněčnou lokalizací a charakterizací je uveden v tabulkách č. 11 a 12.

Spot	Označení proteinu	Název proteinu	Skóre proteinu	Počet přířaz. peptidů	[%] Pokrytí sekvence	MH ^a (kDa)	pI ^b	Násobek změny
1	BASP1_RAT	membránový neuronální signální protein 1	284,0	6	47,3	21,8	4,30	↓2,1
2	GBB1_RAT	G beta podjednotka-1	676,3	13	51,5	37,4	5,60	↓2,0
3	KCRB_RAT	kreatin kináza typ-B	945,4	17	55,6	42,7	5,30	↓2,6
4	AINX_RAT	alfa-intermexin	222,5	5	16	56,1	5,10	↑5,2
5	DPYL2_RAT	dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2	702,0	14	39,0	62,2	5,90	↑4,9
6	SIRT2_RAT	NAD-dependenční deacetyláza sirtuin-2	136,4	3	17,4	39,3	6,80	↑2,5
7	SYUA_RAT	alfa-synuklein	445,1	6	44,3	14,5	4,60	↑2,0
8	PRDX2_RAT	peroxiredoxin-2	239,3	6	27,3	21,8	5,20	↑2,2
9	TERA_RAT	tranzitorní ATPáza endoplazmatického retikula	457,3	10	16,6	89,3	5,00	↑2,1
10	DHE3_RAT	glutamát dehydrogenáza 1, mitochondriální	342,2	7	18,8	61,4	8,80	↑2,7
11	SCOT1_RAT	sukcinyl-CoA:3-ketoacyl-koenzym A transferáza 1, mitochondriální	102,6	2	7,5	56,2	9,50	↑2,2
12	AATM_RAT	aspartát aminotransferáza, mitochondriální	705,3	13	31,4	47,3	9,80	↑2,2
13	UCHL1_RAT	ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza L1	219,9	5	36,8	24,8	5,00	↓2,0
14	PHB_RAT	prohibitin	476,4	11	47,1	29,8	5,50	↑2,2
15	COR1A_RAT	koronin-1A	143,4	3	12,1	51,0	6,00	↓5,4
16	SEP11_RAT	septin-11	112,5	2	10,0	49,7	6,20	↑2,2
17	MBP_RAT	základní myelinový protein S	312,6	8	33,3	21,5	11,8	↓2,5
18	RL12_RAT	60S ribozomální protein L12	115,6	3	18,8	17,8	10,3	↑2,7

Tabulka č. 11: Proteomická analýza PM izolovaných z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem.

^a Teoretická hodnota molekulové hmotnosti.

^b Teoretická hodnota izoelektrického bodu.

Název proteinu	Změna (závislost vs. kontrola)	Subcelulární lokalizace	Funkční kategorie	Charakteristika proteinu - PM
membránový neuronální signální protein 1	pokles	buněčná membrána; lipidová kotva	neuronální vývoj a regulace	DNA-dependntní, změny v lokalizaci během vývoje polaritý neuronů (Kashihara a kol., 2000)
G beta podjednotka-1	pokles	buněčná membrána	signalizace	proliferace a neonatální vývoj (Okabe a Iwakura, 2010), stimulovaná ACII, AC IV, AC VII, inhibovaná ACI, ACVII, ACVIII (Sunahara a Taussig, 2002; Wang a Burns, 2006)
kreatin kináza typ-B	pokles	cytoplazma	metabolismus	fosforylace kreatinu na kreatinfosfát pomocí ATP (kosterní svalstvo, myokard, mozková tkáň), vývoj mozku (Shen a kol., 2002), stámutí (Perluigi a kol., 2010); jeden ze základních činitelů v kontrole oxidativního stresu (Drabik a kol., 2007)
alfa-internexin	vzestup	cytoplazma	neuronální vývoj a regulace	podíl na vývoji morfogeneze neuronů (Kaplan a kol., 1990)
dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2	vzestup	cytoplazma	neuronální vývoj a regulace	neuronální vývoj (Kim a kol., 2005), jeden ze základní činitelů v kontrole oxidativního stresu (Drabik a kol., 2007)
NAD-dependntní deacetyláza sirtuin-2	vzestup	cytoplazma	buněčný vývoj a regulace	podíl na kontrole konce mitotické fáze buněčného cyklu, možná úloha up-regulace v ochraně mozku před oxidativním poškozením (Wu a kol., 2006)
alfa-synuklein	vzestup	cytoplazma	neuronální vývoj a regulace	specificky exprimován v tělech nervových buněk a na synapsích, negativní regulace apoptózy; podíl na patogenezi Parkinsonovy nemoci (Maries a kol., 2003)
peroxiredoxin-2	vzestup	cytoplazma	neuronální vývoj a regulace	negativní regulace apoptózy neuronů; ochranný efekt buněčných komponent pomocí odstranění nízké hladiny hydroperoxidu a peroxinilritů produkovaných jako výsledek buněčného metabolismu v cytosolu (Rhee a kol., 2005)
tranzitorní ATPáza endoplazmatického retikula	vzestup	cytoplazma jádro	buněčný vývoj a regulace	podíl na formaci tranzitního endoplazmatického retikula, nezbytná pro fragmentaci vakuů Golgiho aparátu během mitózy (Woodman a kol., 2003); interaguje s neurofibrominem kvůli kontrole hustoty dendritických výběžků (Wang a kol., 2011)
glutamat dehydrogenáza 1, mitochondriální	vzestup	matrix mitochondrie	metabolismus	glutamátový katabolický proces, dlouhodobá paměť, v krysím mozku probíhá glutamátová dehydrogenací reakce ve prospěch produkce amoniaku (Cooper et al., 2011)
sukcinyl-CoA:3-ketoacyl-koenzym A transferáza 1, mitochondriální	vzestup	matrix mitochondrie	metabolismus	mitochondriální aktivační enzym (Ohnuki a kol., 2005); vývoj mozku
aspartát aminotransferáza, mitochondriální	pokles	matrix mitochondrie	metabolismus	metabolismus aminokyselin, výměna metabolitů mezi mitochondriemi a cytosolem, transport mastných kyselin; podíl na udržení homeostázy mastných kyselin, možný indikátor poškození mitochondrií (Das a kol., 2007)
ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza L1	pokles	cytoplazma	deubikvitinace neuronální vývoj a regulace	podíl na tvorbě prekurzorů ubikvitinu a ubikvitinací proteinů, vliv na synaptickou plasticitu (Murphey a kol., 2002)
prohibitin	vzestup	vnitřní mitochondriální membrána	buněčný vývoj a regulace	antiproliferační aktivita, role v regulaci mitochondriální respirační aktivity a stárnutí (Artal-Sanz a kol., 2009; Merkwirth a kol., 2009; Mishra a kol., 2010); down-regulace prohibitinu způsobuje vyšší náchylnost neuronů k poškození a zvyšuje produkci ROS, zatímco up-regulace má neuroprotektivní účinek (Zhou a kol., 2012)
koronin-1A	pokles	cytoplazma	buněčný vývoj a regulace	invaginace plasmatické membrány, aktivita koroninu 1A je regulována pomocí fosfoinozitudů (Tsujita a kol., 2010)
septin-11	vzestup	cytoplazma	buněčný vývoj a regulace	filamenta-formující cytoskeletální GTPáza, podíl na maturaci neuronů (Tada et al., 2007)
základní myelinový protein S	pokles	myelinová membrána	neuronální vývoj a regulace	myelinizace, negativní regulace axonogeneze, expozice morfiu může způsobit snížení počtu myelinizovaných axonů (Traudt a kol., 2012)
60S ribozomální protein L12	pokles	cytoplazma	regulace	váže se přímo k 26S ribozomální RNA, zpřístupňuje dráhu importu 11 do jádra (Plafker a kol., 2002)

Tabulka č. 12: Funkční charakteristika proteinů PM změněných vlivem dlouhodobé expozice morfiu.

Analyzované proteiny jsou lokalizovány v **plazmatické membráně** (**1**-membránový neuronální signální protein 1, ↓2,1x; **2**-G beta podjednotka-1, ↓2,0x), **myelinové membráně** (**17**-základní myelinový protein S, ↓2,5x), **cytoplazmě** (**3**-kreatin kináza typ-B, ↓2,6x; **4**-alfa-internexin, ↑5,2x; **5**-dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2, ↑4,9x; **6**-NAD-dependentní deacetyláza sirtuin-2, ↑2,5x; **7**-alfa-synuklein, ↑2,0x; **8**-peroxiredoxin-2, ↑2,2x; **9**-tranzitorní ATPáza endoplazmatického retikula, ↑2,1x; **13**-ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza L1, ↓2,0x; **15**-koronin-1A, ↓5,4x; **16**-septin-11, ↑2,2x; **18**-60S ribozomální protein L12, ↑2,7x) a **mitochondriích** (**10**-glutamát dehydrogenáza 1, mitochondriální, ↑2,7x; **11**-sukcinyl-CoA:3-ketoacyl-koenzym A transferáza 1, mitochondriální, ↑2,2x; **12**-aspartát aminotransferáza, mitochondriální, ↓2,2x; **14**-prohibitin, ↑2,2x;); (Ujčíková a kol., 2014).

Jediným zástupcem GPCR-signálních kaskád byla Gβ podjednotka, jejíž hodnota integrální absorbance klesla 2x ve vzorcích ovlivněných morfiem. Tento pokles byl následně ověřen pomocí 2D elektroforézy a techniky imunoblot s použitím specifické protilátky od Santa Cruz orientované proti C-terminálnímu peptidu Gβ (T-20, sc-378); (obr. č. 19). Rozsah oblasti Gβ v PM ukázal, že pokles zaznamenaný u spotu 2 indukovaný morfiem (tabulka č. 11) představoval snížení integrální absorbance pouze *aktivní* části Gβ, celkový signál klesl nepatrně (1,2x); (obr. č. 19 a 20).

Na základě zjištění lokalizace Gβ pomocí výsledků imunoblotu bylo vyříznuto z gelů barvených CBB osm spotů, které odpovídaly rozložení signálu. Tyto spoty byly analyzovány pomocí LC-MS/MS pro ověření rozsahu a typu podjednotek Gβ (obr. č. 19, tabulka č. 13).

Spot	Označení proteinu	Název proteinu	Skóre proteinu	Počet přiřaz. peptidů	[%] Pokrytí sekvence	MH ^a (kDa)	pI ^b
3	GBB1_RAT	G beta podjednotka-1	184,3	6	16,8	37,4	5,6
4	GBB1_RAT	G beta podjednotka-1	471,0	12	32,9	37,4	5,6
4	GBB2_RAT	G beta podjednotka-2	413,9	10	14,4	37,3	5,6
5	GBB1_RAT	G beta podjednotka-1	199,1	5	14,1	37,4	5,6
5	GBB2_RAT	G beta podjednotka-2	188,7	5	3,50	37,3	5,6

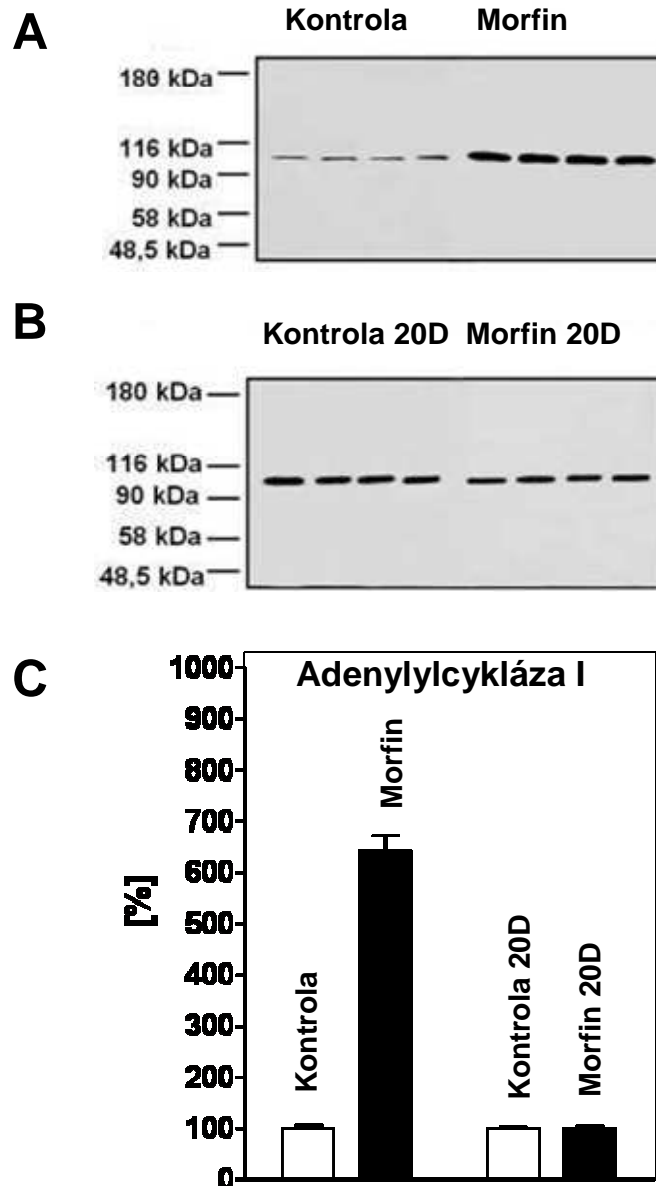
Tabulka č. 13: Proteomická analýza Gβ podjednotek izolovaných z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem.

^a Teoretická hodnota molekulové hmotnosti.

^b Teoretická hodnota izoelektrického bodu.

Signifikantní vzestup prohibitinu zaznamenaný u spotu 14 (tabulka č. 11) potvrdil stejně jako u G β zvýšení hladiny pouze *aktivní* části tohoto standardu mitochondriálních membrán, celkový signál se nezměnil (obr. č. 21 a 22). Množství standardu plazmatických membrán Na, K-ATPázy bylo také beze změny (obr. č. 23).

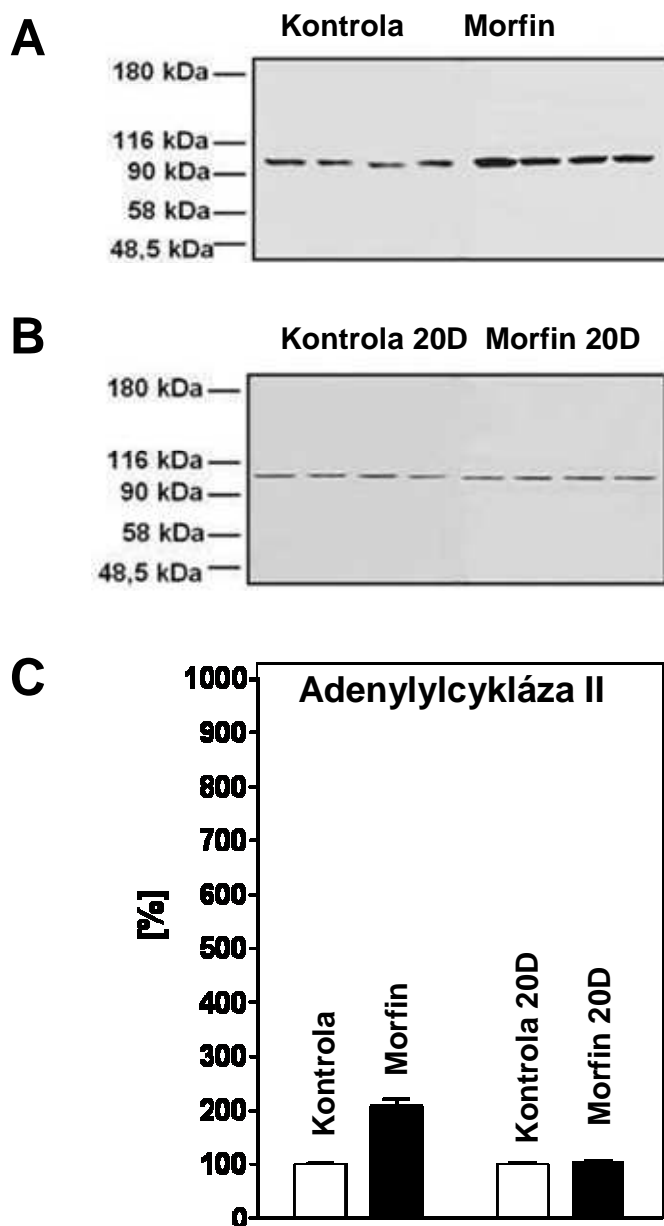
Adenylylcykláza I



Obr. č. 9: **Adenylylcykláza I**; *imunoblot*.

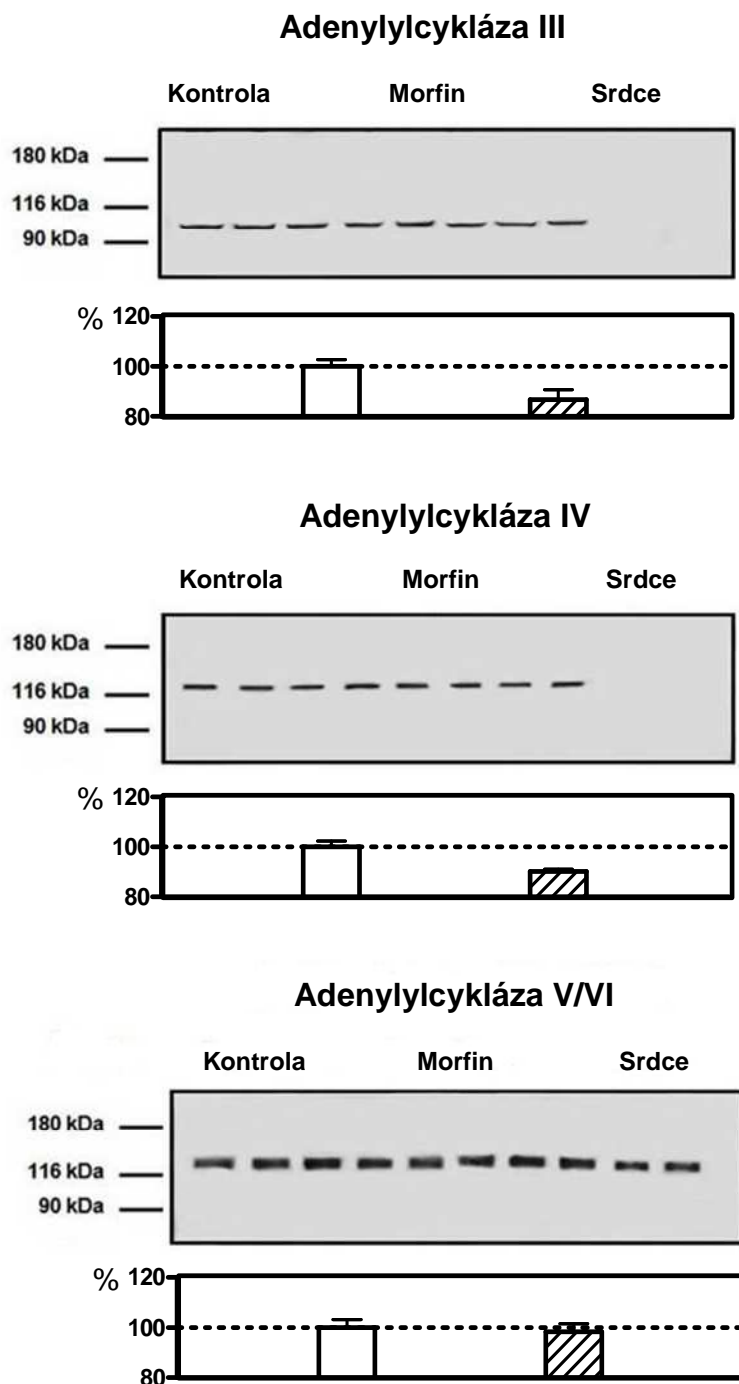
A- Obsah AC I ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních vzorcích potkanů, kterým byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina –M10). **B-** Obsah AC I ve vzorcích potkanů, kterým bylo podáváno morfium podle stejného protokolu (viz kapitola Materiál a metody), ale byli usmrceni 20 dní po podání poslední dávky (skupina +M10/-M20), kontrolní vzorky (skupina –M10/-M20). **C-** Statistická analýza signálu.

Adenylylcykláza II



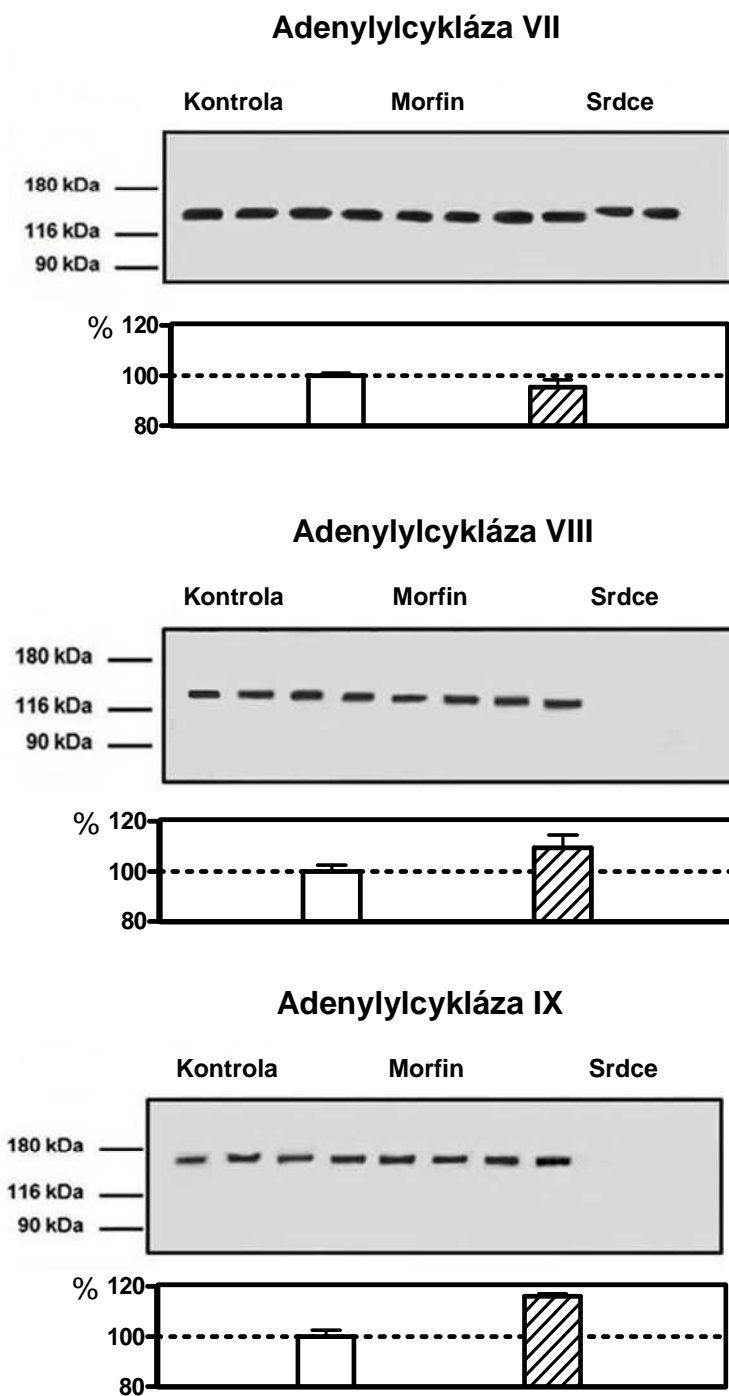
Obr. č. 10: **Adenylylcykláza II**; *imunoblot*.

A- Obsah AC II ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních vzorcích potkanů, kterým byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M10). **B-** Obsah AC II ve vzorcích potkanů, kterým bylo podáváno morfium podle stejného protokolu (viz Materiál a metody), ale byli usmrceni 20 dní po podání poslední dávky (skupina +M10/-M20), kontrolní vzorky (skupina -M10/-M20). **C-** Statistická analýza signálu.



Obr. č. 11: **Adenylylcykláza III-V/VI**; *imunoblot*.

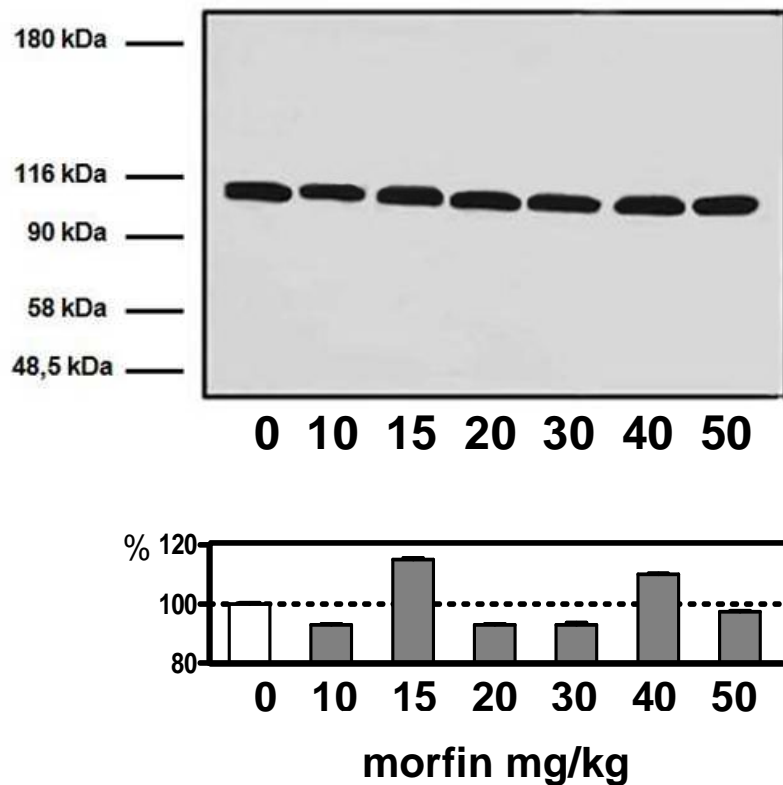
Obsah AC III-V/VI ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních vzorcích potkanů, kterým byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M10). Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů pro danou izoformu adenylylcyklázy.



Obr. č. 12: **Adenylylcykláza VII-IX**; *imunoblot*.

Obsah AC VII-IX ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních vzorcích potkanů, kterým byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M10). Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů pro danou izoformu adenylylcyklázy.

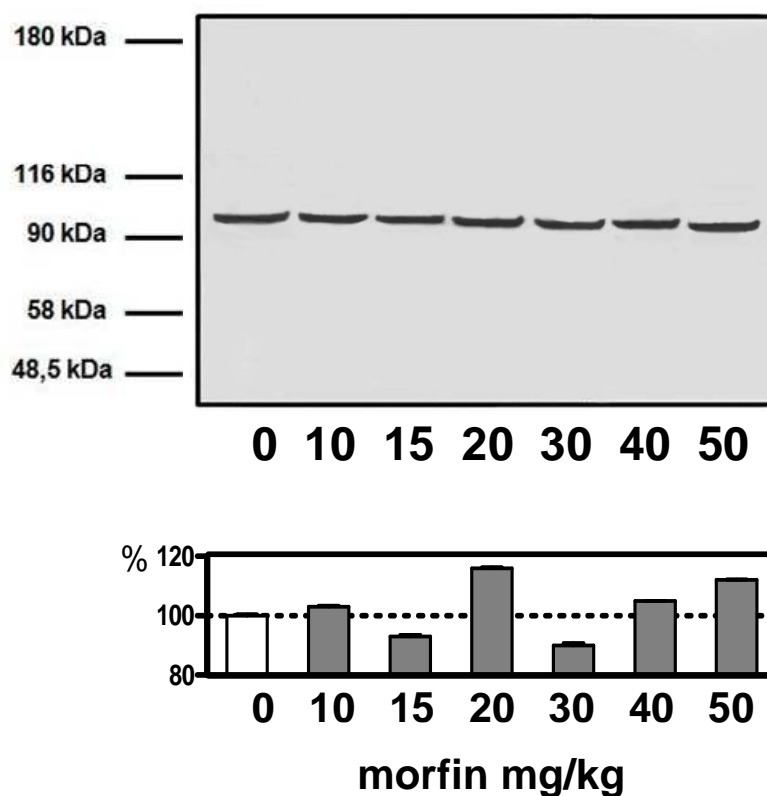
Adenylylcykláza I



Obr. č. 13: **Adenylylcykláza I**; *akutní expozice*

Obsah AC I ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů - *akutní expozici morfiu* - stejný protokol jako u dlouhodobé expozice: 10-50 mg/kg, ale potkani byli usmrceni 24 hodin po aplikaci jednotlivých dávek (skupina +M1), kontrolním potkanům byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M1). Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů.

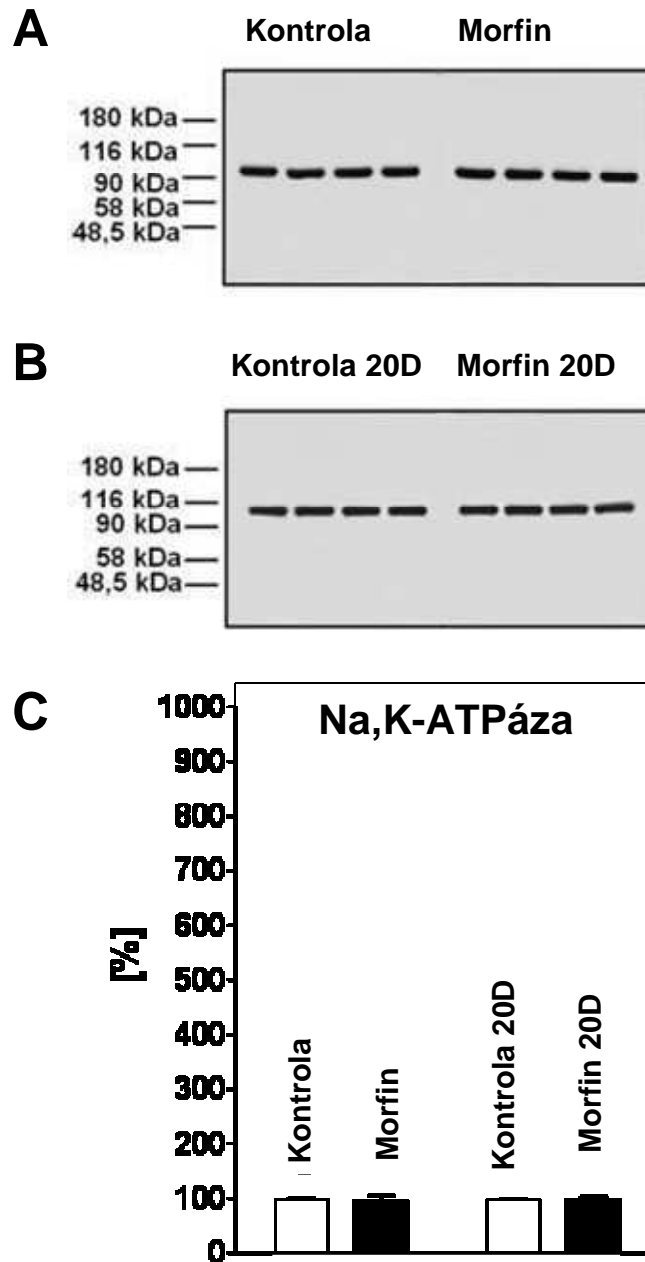
Adenylylcykláza II



Obr. č. 14: **Adenylylcykláza II**; *akutní expozice*

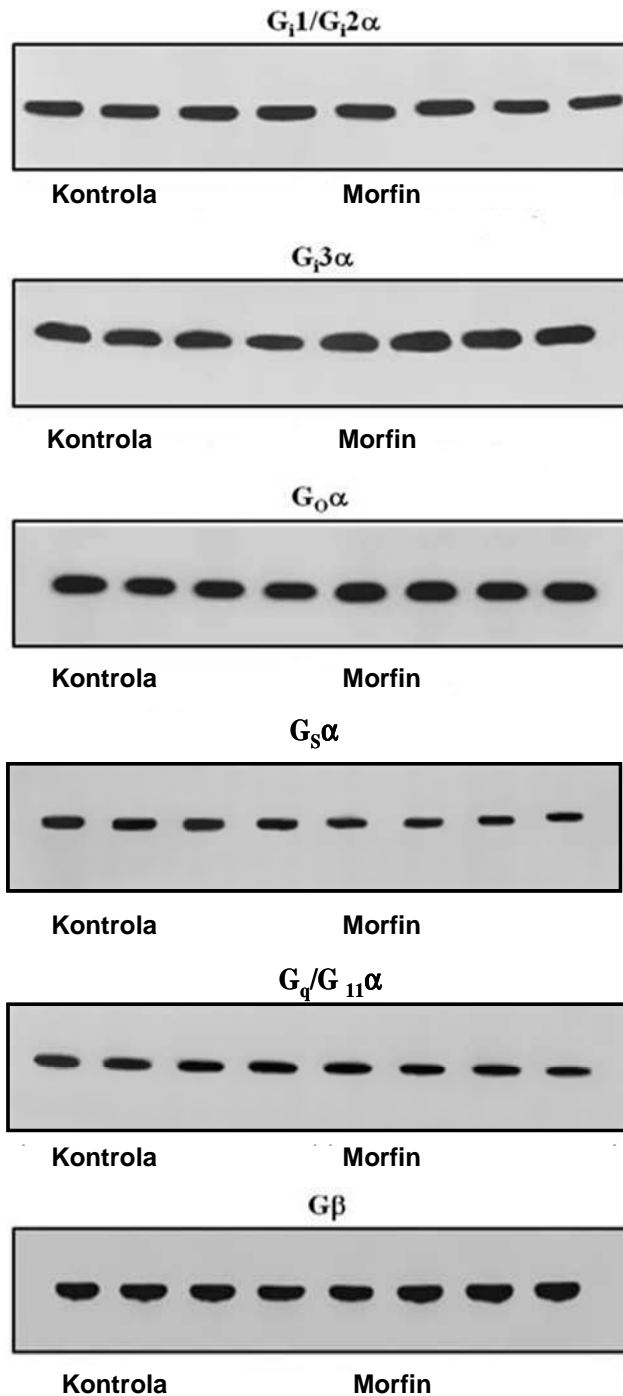
Obsah AC II ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů - *akutní expozici morfiu* - stejný protokol jako u dlouhodobé expozice: 10-50 mg/kg, ale potkani byli usmrceni 24 hodin po aplikaci jednotlivých dávek (skupina +M1), kontrolním potkanům byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M1). Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů.

Na, K-ATPáza



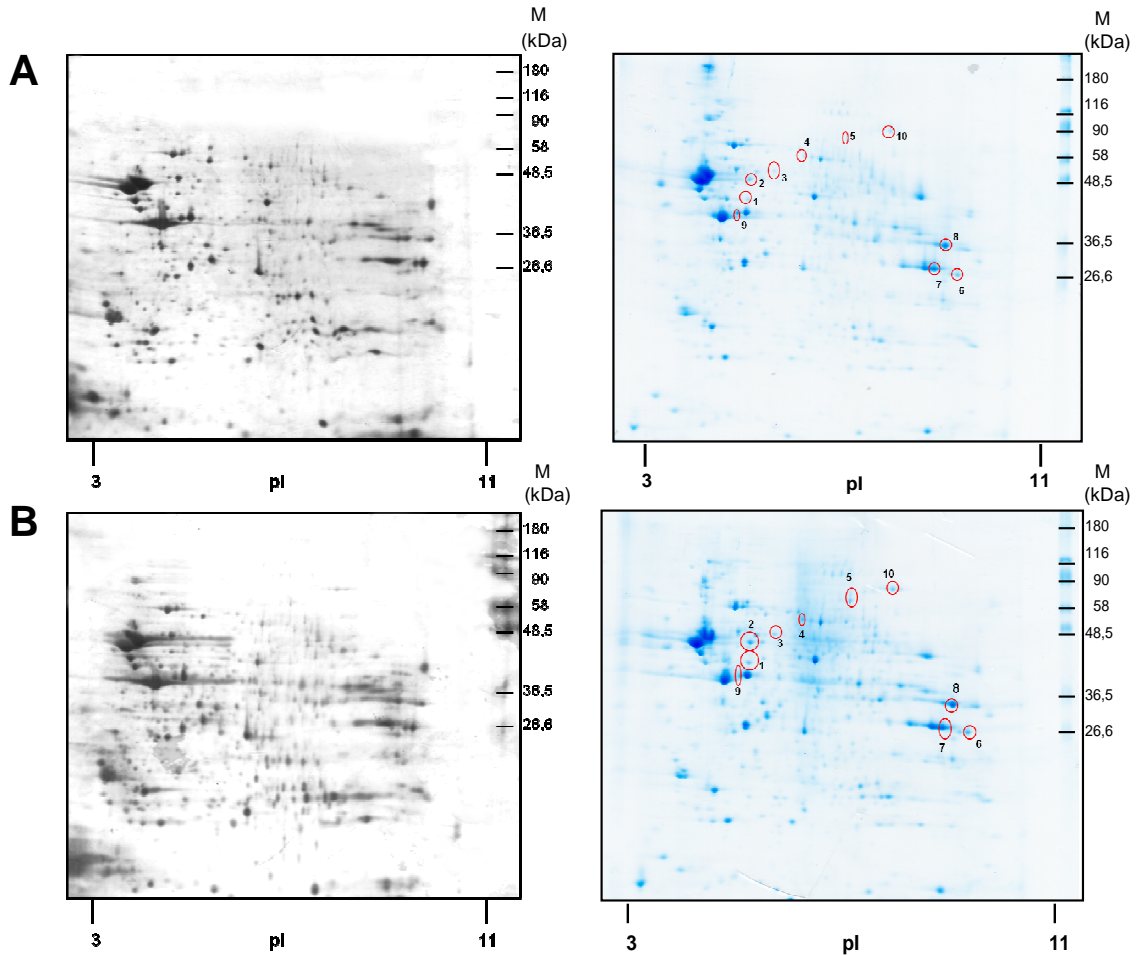
Obr. č. 15: Na, K-ATPáza; *imunoblot*.

A- Obsah Na, K-ATPázy ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních vzorcích potkanů, kterým byla podávána injekce se sterilním 0,9% NaCl (skupina -M10). **B-** Obsah Na, K-ATPázy ve vzorcích potkanů, kterým bylo podáváno morfiem podle stejného protokolu (viz Materiál a metody), ale byli usmrceni 20 dní po podání poslední dávky (skupina +M10/-M20), kontrolní vzorky (skupina -M10/-M20). **C-** Statistická analýza signálu.



Obr. č. 16: **Trimerní G proteiny; imunoblot.**

Srovnání obsahu trimerních G proteinů ($G\alpha_{i1,2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_s$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ a $G\beta$) ve frakcích plazmatických membrán izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (skupina +M10) a kontrolních potkanů (skupina -M10). α (10 μg proteinu/jamka) a β (5 μg proteinu/jamka) podjednotky byly detekovány s použitím specifických protilátek (viz Materiál a metody). Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů.

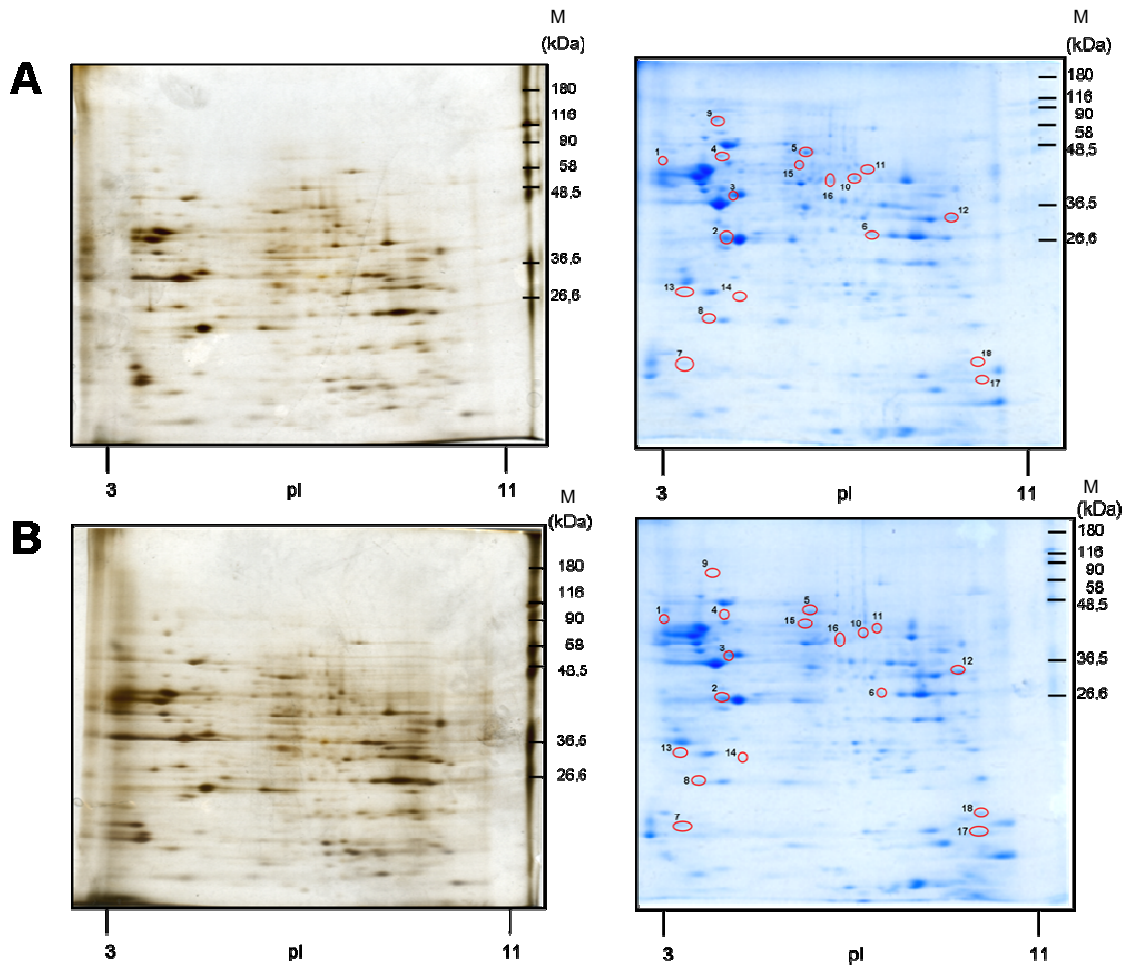


Obr. č. 17: 2D elektroforetická mapa proteinů PNS z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (A) a kontrolních potkanů (B); barvení stříbrem a CBB.

600 μg proteinu (pro barvení stříbrem i CBB) bylo separováno v prvním rozměru izoelektrickou fokusací s použitím stripů o rozsahu pH 3-11. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v aparatuře Hoefer SE 600. Obarvené naskenované gely byly rozděleny do replikačních skupin, které tvořily 4 zástupci dané skupiny (kontrola/morfium) a byly vyhodnoceny kvantitativní změny pomocí programu PDQuest. Hodnoty integrálních absorbancí, které se lišily alespoň dvakrát, byly považovány za signifikantní. Na gelech barvených CBB bylo vybráno 10 spotů, které byly analyzovány pomocí MALDI-TOF MS/MS.

Levý panel - gely barvené stříbrem

Pravý panel - gely barvené CBB

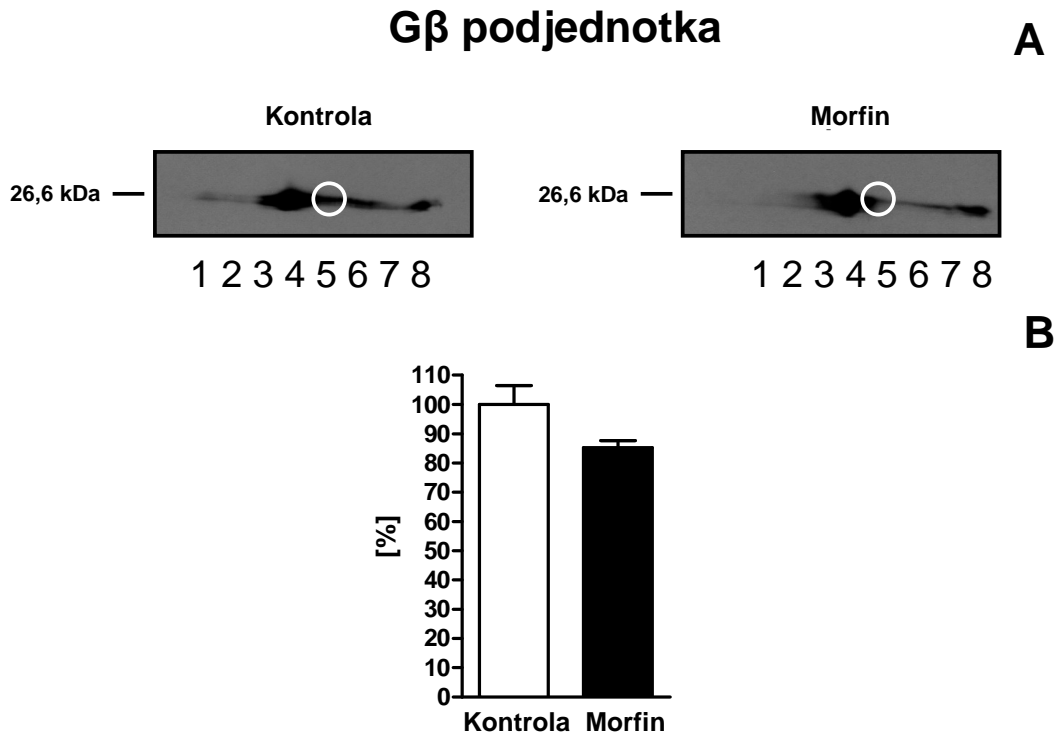


Obr. č. 18: 2D elektroforetická mapa proteinů PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (A) a kontrolních potkanů (B); barvení stříbrem a CBB.

400 μ g proteinu (pro barvení stříbrem) a 2 mg proteinu (pro barvení CBB) bylo separováno v prvním rozměru izoelektrickou fokusací s použitím stripů o rozsahu pH 3-11. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v aparatuře Hofer SE 600. Obarvené naskenované gely byly rozděleny do replikačních skupin, které tvořily 4 zástupci dané skupiny (kontrola/morfium) a byly vyhodnoceny kvantitativní změny pomocí programu PDQuest. Hodnoty integrálních absorbancí, které se lišily alespoň dvakrát, byly považovány za signifikantní. Na gelech barvených CBB bylo vybráno 18 spotů, které byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií – LC-MS/MS.

Levý panel - gely barvené stříbrem

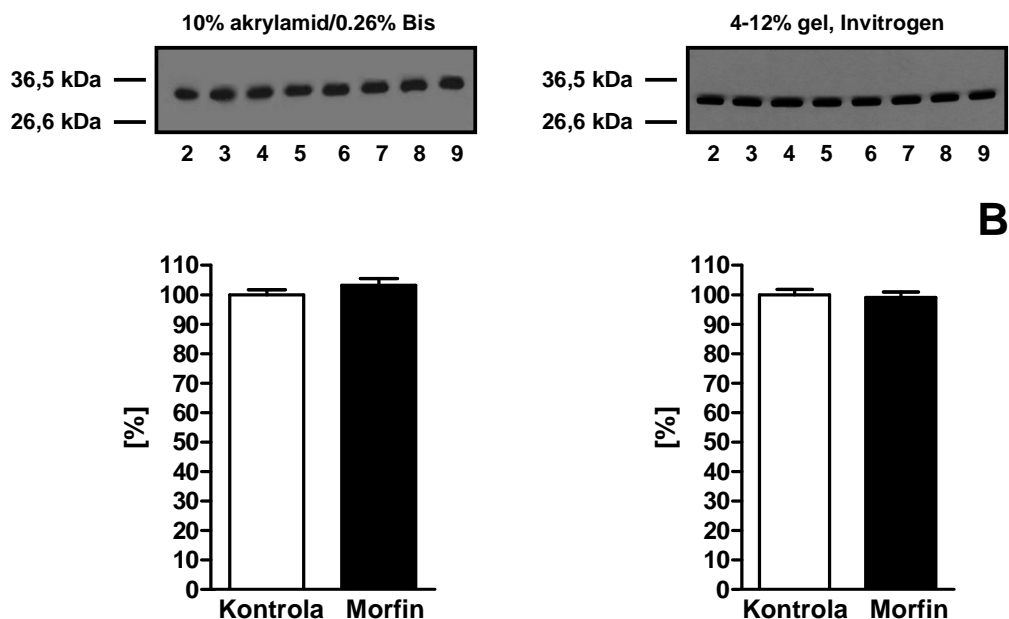
Pravý panel - gely barvené CBB



Obr. č. 19: **Gβ podjednotka**; 2D imunoblot.

A- Detekce obsahu Gβ podjednotky v PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem a kontrolních potkanů. 400 μg proteinu bylo separováno v prvním rozměru izoelektrickou fokusací s použitím stripů o rozsahu pH 3-11. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v aparatuře Hoefer SE 600. Gβ podjednotka byla detekována použitím specifické protilátky (viz Materiál a metody). Bílý kroužek označuje část signálu Gβ, která byla analyzována pomocí LC-MS/MS. Čísla 1-8 reprezentují frakce signálu Gβ, které byly vyřezány z gelu podle imunoblotové detekce a následně analyzovány LC-MS/MS pro ověření rozsahu a typu podjednotek Gβ.

B- Statistická analýza signálu.

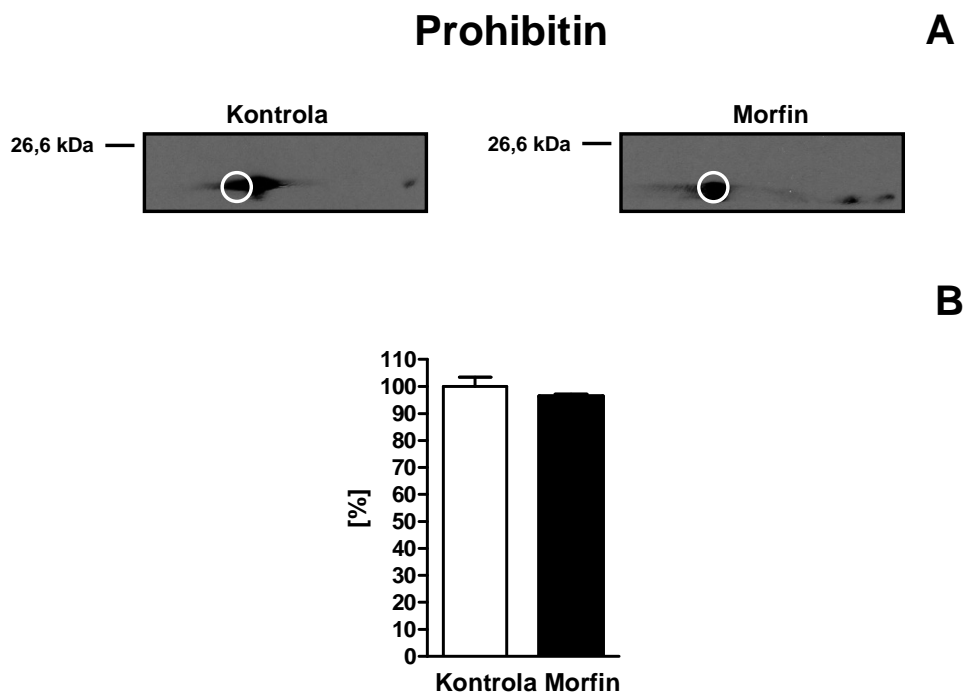
G β podjednotka

Obr. č. 20: **G β podjednotka**; *imunoblot*.

A- Srovnání obsahu G β podjednotky v PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (č. 6-9) a kontrolních potkanů (č. 2-5). 5 μ g proteinu/jamka bylo detekováno pomocí specifické protilátky (viz Materiál a metody). **B**- Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů.

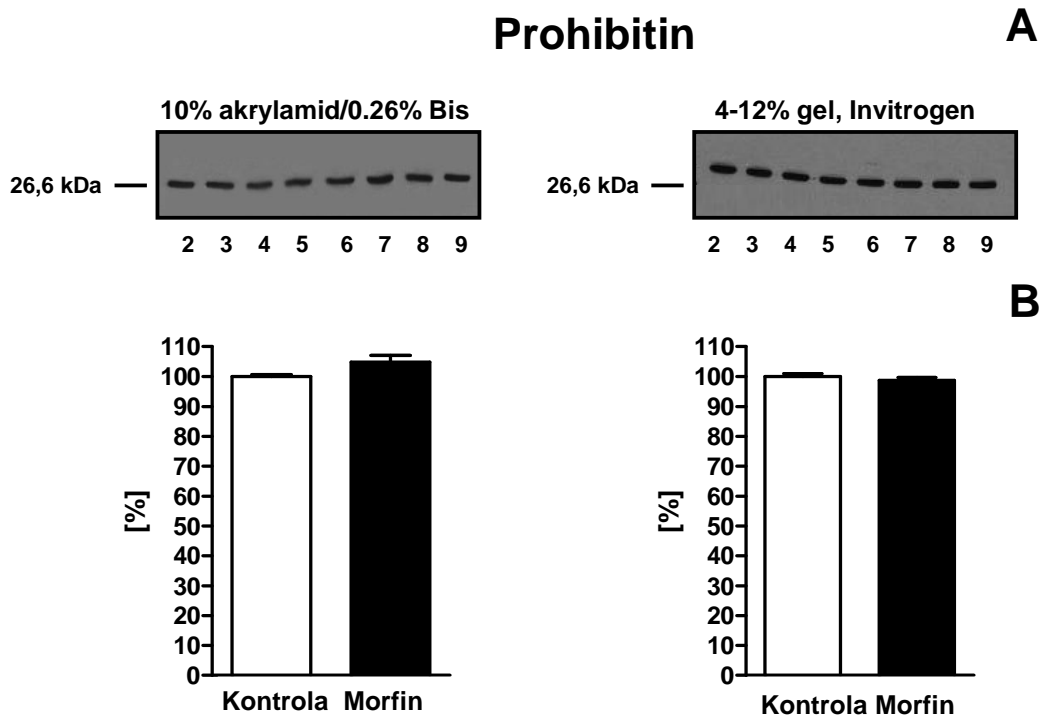
Levý panel – 10% gel, aparatura Mini Protean II (Biorad)

Pravý panel – 4-12% gradientový gel, NuPAGE systém, Invitrogen



Obr. č. 21: **Prohibitin**; 2D imunoblot.

A- Detekce obsahu prohibitinu v PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem a kontrolních potkanů. 400 μ g proteinu bylo separováno v prvním rozměru izoelektrickou fokusací s použitím stripů o rozsahu pH 3-11. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v aparatuře Hoefer SE 600. Prohibitin byl detekován s použitím specifické protilátky (viz Materiál a metody). Bílý kroužek označuje část signálu prohibitinu, která byla analyzována pomocí LC-MS/MS. **B-** Statistická analýza signálu.



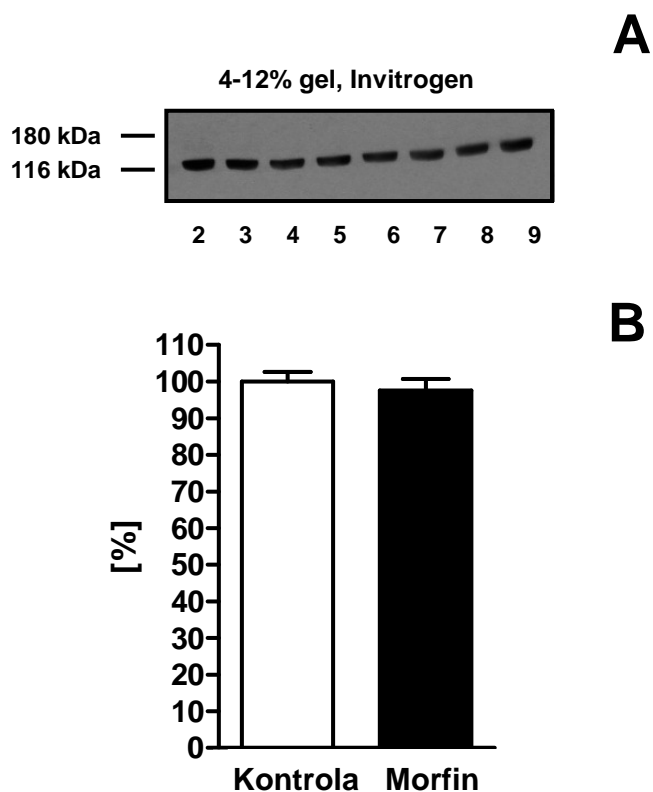
Obr. č. 22: **Prohibitin**; *imunoblot*.

A- Srovnání obsahu prohibitinu v PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem (č. 6-9) a kontrolních potkanů (č. 2-5). 10 μ g proteinu/jamka bylo detekováno pomocí specifické protilátky (viz Materiál a metody). **B-** Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů.

Levý panel – 10% gel, aparatura Mini Protean II (Biorad)

Pravý panel – 4-12% gradientový gel, NuPAGE systém, Invitrogen

Na, K-ATPáza



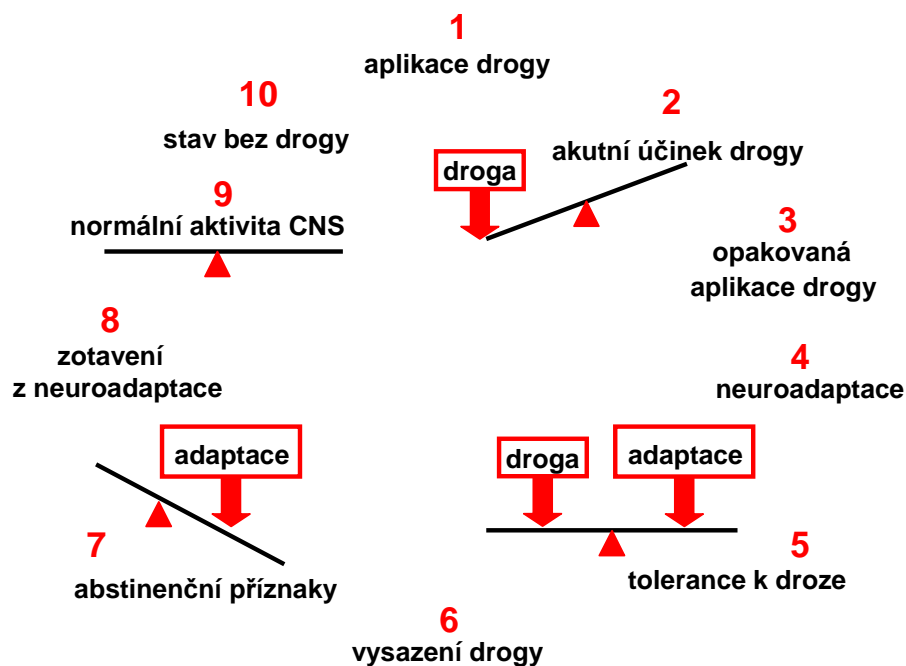
Obr. č. 23: Na, K-ATPáza; *imunoblot*.

Srovnání obsahu Na, K-ATPázy v PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfiem a kontrolních potkanů (tyto PM byly použity na proteomickou analýzu pomocí LC-MS/MS). 10 μ g proteinu/jamka bylo rozděleno na 4-12% gradientovém gelu, NuPAGE systém (Invitrogen), a detekováno pomocí specifické protilátky (viz Materiál a metody). **B**- Statistická analýza signálu byla založena na hodnocení 3 imunoblotů.

6. DISKUZE

6.1. Vzestup obsahu adenylycyklázy I a II ve frakcích plazmatických membrán indukovaný morfiem

Drogová adikce (toxikomanie, narkomanie) je stav psychické i fyzické závislosti na návykových látkách, který je již řadu let řazen mezi *chronická onemocnění* centrální nervové soustavy (CNS); (Preston a kol., 1991). Mechanismus účinku drog lze obecně shrnout tak, jak je uvedeno na obr. č. 24. Droga vyvolává nutkavou touhu po opakovaných aplikacích dávky ovlivněním řady neurologických procesů v CNS za účasti rozvoje adaptačních změn při dalším podávání. Mozek se tak přizpůsobuje opakovanému přísunu cizorodé látky a nastoluje se „*patologická homeostáza*“, pro jejíž udržení se musí droga stále dodávat. Její vysazení bývá doprovázeno nepříjemnými abstinenčními příznaky. Další aplikace narkotika však prohlubuje poškození CNS. Otázkou zůstává, do kdy a do jaké míry jsou probíhající adaptační změny reverzibilní.



Obr. č. 24: Mechanismus účinku drog a vzniku závislosti. Převzato a upraveno podle Fišerová, 2000.

Morfium je jedno z nejvíce účinných analgetik používaných pro utišení akutní i chronické bolesti. Je součástí opia získávaného z pryskyřice máku setého *Papaver somniferum* a poprvé bylo izolováno německým lékárníkem Sertürnerem v roce 1806 (Waldhoer a kol., 2004). Opakovaná expozice zvířat morfiu vede k rozvoji tolerance

k droze (stavu snížené senzitivity k droze), psychické a fyzické závislosti, která je spojená s nepříjemnými pocity při abstinenci (zvedání žaludku, zvracení, vzestup krevního tlaku, nespavost, střevní dysfunkce, třes); (Contet a kol., 2004). Funkční změny byly pozorovány především v mozковém kmeni a hipokampu (Chen a kol., 2007; Connor a Christie, 1999; Law a kol., 2000; Law a kol., 2004). Byly asociovány například s rozdílnou synaptickou konektivitou (Robinson a Kolb, 1999), neurotransmisí (Li a kol., 2006), energetickým metabolismem (Miller a kol., 1972) a stabilitou proteinových molekul (Li a kol., 2009).

Úsilí objasnit molekulární a buněčnou podstatu drogové adikce vedlo k řadě výsledků, které mohou být shrnuty pomocí dvou hlavních hypotéz. **Teorie homeostázy** vychází z předpokladu, že droga narušuje buněčnou homeostázu a tento efekt je kompenzován aktivací řady protichůdných mechanismů, což vede k obnově stálosti vnitřního prostředí. Podle **desenzitizační teorie** vzniká závislost primárně díky snížení odpovědi nervových buněk na první dávky drogy. Z fyziologického hlediska představuje desenzitizace komplex regulačních mechanismů, které vedou k utlumení biologické odpovědi na daný hormon a chrání buňky před nadměrnou stimulací. Tato teorie specifikuje fenomén desenzitizace na úrovni receptorů (Whistler a Zastrow, 1998; Law a kol., 2004; He a Whistler, 2005; He a Whistler, 2007). Tyto dvě hypotézy spolu pravděpodobně korelují. Dlouhodobé nebo opakované stimulování cílové buňky nebo tkáně agonistou pro receptory spřažené s G proteiny indukuje desenzitizaci hormonální odpovědi, která je kompenzována vzestupem některých makromolekul. Zásadní rozdíl však spočívá v tom, že model homeostázy mění množství makromolekul syntézou nových proteinových struktur, což může být vysvětleno změnou aktivity již existujících signalizačních molekul (receptory, G-proteiny, adenylycykláza); (Bouřová a kol., 2010).

Výsledky naší pracovní skupiny již dříve prokázaly, že dlouhodobá expozice potkanů zvyšujícím se dávkám morfia vedla ke snížení odpovědi trimerních G proteinů třídy Gi/Go na stimulaci MOR a DOR agonisty. Účinnost κ -OR se nezměnila (Bouřová a kol., 2010). Jedná se o specifickou změnu, protože funkční aktivita jiných receptorů, například metabotropních receptorů pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA_B-R), se nezměnila. Desenzitizace G proteinů byla měřena ve frakcích plazmatických membrán izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů (Bouřová a kol., 2009; 2010). Behaviorální studie provedené se stejnou skupinou zvířat potvrdily stav závislosti na droze. Po vysazení morfia trpěla zvířata průjmy, poklesem očních víček, cvakáním zubů a zvýšenou citlivostí na dotek (Bouřová a kol., 2010). Dřívější studie jiných autorů popisovaly snížení odpovědi trimerních G proteinů ve specifických oblastech mozkového kmene a hipokampu potkanů

ovlivněných morfiem a heroinem (Sim a kol., 1996; Sim-Selley a kol., 2000; Maher a kol., 2005). Desenzitizace G proteinů na stimulaci agonisty μ -OR a δ -OR ve frontální mozkové kůře podpořila význam primární role v interakci mezi receptorem a G proteiny v genezi drogové závislosti (Tso a Wong, 2003; Law a kol., 2004). Chování závislých zvířat je tedy doprovázeno biochemickými změnami v cerebrálním kortexu, jedná se o originální výsledek, protože výzkum drogové závislosti byl dosud spíše prováděn ve strukturách mozkového kmene a při studiu „hrubých“ membránových preparátů.

V práci Ujčíková a kol. (2011) jsme stanovovali pomocí kvantitativní determinace obsah všech typů izoform adenylcyklázy (AC I-IX) ve frakcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů, kteří byli vystaveni 10 dní zvyšujícím se dávkám morfia. Rozhodli jsme se tak proto, že fenomén superaktivace (supersenzitizace, hypersenzitizace) tohoto enzymu, který je považován za jeden z klíčových molekulárních mechanismů spojených s drogovou závislostí, byl v literatuře popsán zejména ve smyslu měření funkční aktivity adenylcyklázy (Sharma a kol., 1975; Attali a Vogel, 1989; Avidor-Reiss a kol., 1995; Avidor-Reiss a kol., 1996; Ammer a Schulz, 1997; Ammer a Schulz, 1998; Whistler a Zastrow, 1998; Whistler a kol., 1999; Bayewitch a kol., 2000; Ammer a Christ, 2002; Tso a Wong, 2003; Law a kol., 2004; Schallmach a kol., 2006). Krátkodobé působení opioidů vede ke snížení hladiny cAMP v buňce, jejich chronická expozice aktivitu adenylcyklázy naopak zvyšuje.

Signifikantní vzestup AC I (až 8x) a AC II (až 2,5x), který jsme stanovili na základě kvantitativního hodnocení 32 imunoblotů (obr. č. 9 a 10, panel A), se projevil jako specifický, protože hladina ostatních izoform adenylcyklázy (AC III-IX) se nezměnila (obr. č. 11 a 12). Tento vzestup nebyl rovněž zaznamenán u krátkodobé expozice morfiu, kdy byla zvířata usmrcena 24 hodin po aplikaci posledních dávek (10-50 mg/kg). Zvýšená hladina AC I a AC II se překvapivě neprojevila ve vzorcích PM izolovaných z potkanů vystavených dlouhodobé expozici morfiu, ale byli usmrceni 20 dní po aplikaci poslední dávky (obr. č. 9 a 10, panel B), což vypovídá o *reverzibilní adaptaci* organismu na tuto drogu. Z pohledu praktického významu se jedná o optimistické zjištění, vzhledem k tomu, že prosté vysazení drogy vede k obnově původního stavu. Data prezentovaná v práci Ujčíková a kol. (2011) potvrzují korelaci mezi teorií desenzitizace a teorií homeostázy. Dlouhodobá inhibice enzymu cAMP-dependentních kaskád nutí organismus vyrovnat se s tímto problémem. Mechanismy homeostázy a aktivace specifické proteosyntézy způsobují vzestup obsahu molekul AC I a AC II ve frakcích PM, který je *kompenzační odezvou* na snížení odpovědi trimerních G proteinů inhibičního typu

na stimulaci MOR a DOR agonisty (Bouřová a kol., 2010). Zároveň se ale nemění množství G proteinů (obr. č. 16) a stejná je i hladina Na, K-ATPázy (obr. č. 15).

V současné době je známo devět savčích membránově vázaných a jedna rozpustná izoforma AC (Sunahara a Taussig, 2002). AC I a AC II patří k nejvíce exprimovaným a fyziologicky nejvýznamnějším izoformám v cerebrálním kortexu mozku (Hanoune a Defer, 2001; Patel a kol., 2001; Sunahara a Taussig, 2002; Sanabra a Mengod, 2011). AC I je inhibována volnou $G\alpha_o$ podjednotkou a také $G\beta\gamma$ (Carter a Medzihradsky, 1993; Hanoune a Defer, 2001; Patel a kol., 2001; Sunahara a Taussig, 2002), zatímco aktivita AC II je zvyšována $G\beta\gamma$ v přítomnosti volné $G\alpha_s$ podjednotky (Ammer a Schulz, 1997; Ammer a Schulz, 1998; Tso a Wong, 2003; Sunahara a Taussig, 2002).

Naše výsledky ukazují, že snížení odpovědi trimerních G proteinů třídy Gi/Go na stimulaci MOR a DOR agonisty ve frontální mozkové kůře potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia je primárním impulzem pro následnou kompenzační odezvu v podobě vzestupu hladiny AC I a AC II, která je plně reverzibilní.

6.2. Identifikace proteinů PNS připraveného z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; analýza pomocí MALDI-TOF MS/MS

Proteomická analýza změn indukovaných morfiem byla dosud prováděna ve vzorcích homogenizované tkáně cerebrálního kortexu, hipokampu a striatu izolovaných z mozku potkana (Bierczynska-Krzysik a kol., 2006a,b), dále v nucleus accumbens (Li a kol., 2006) a primárních buněčných kulturách striatu (Bodzon-Kuřakowska a kol., 2009). My jsme se snažili o přesnější analýzu provedenou v postnukleárním supernatantu a frakcích plazmatických membrán izolovaných z frontální mozkové kůry potkana (Ujčková a kol., 2014). PNS byl analyzován kvůli obsahu rozpustných bílkovin mitochondrií, endoplazmatického retikula, plazmatických membrán a cytoplazmy. Proteomická analýza zjistila vzestup zejména mitochondriálních a cytoplazmatických bílkovin (tabulka č. 9 a 10). 9 z 10 proteinů změněných vlivem morfia signifikantně vzrostlo: **1**-guanin deamináza, $\uparrow 2,5x$; **2**-V-ATPáza, mozková izoforma, $\uparrow 2,6x$; **3**-protein disulfid-izomeráza A3 $\uparrow 3,4x$; **4**-dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2, $\uparrow 3,6x$; **5**-N-etylmaleimid senzitivní fúzní protein, izoforma CRA_a, $\uparrow 2,0x$; **6**-malát dehydrogenáza, mitochondriální prekurzor, $\uparrow 1,4x$; **7**-glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, $\uparrow 1,6x$; **8**-aldoláza A, $\uparrow 1,3x$; **10**-akónitát hydratáza, mitochondriální prekurzor, $\uparrow 1,3x$. 4 z 9 proteinů zvýšené hladiny (dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2, malát dehydrogenáza, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza a akónitát hydratáza) bylo

v literatuře spojeno s kontrolou oxidativního stresu (Perluigi a kol., 2005; Drabik a kol., 2007; Hwang a kol., 2009; Shi a Gibson, 2011).

Oxidační stres je proces, kdy dochází k nadměrné produkci oxidantů (reaktivních kyslíkových nebo dusíkových částic) nebo inhibici antioxidantních mechanismů buňky. Proti volným kyslíkovým radikálům (ROS) působí celá řada enzymů (dismutázy, katalázy, peroxidázy) i antioxidanty (vitamin C, E). Centrální nervový systém vykazuje vysokou citlivost na oxidativní stres. Při nedostatečné adaptaci organismu se inhibuje mitochondriální respirace, což vede k peroxidacím lipidů a zvýšení pravděpodobnosti apoptózy. Největší vzestup byl zaznamenán u protein disulfid-izomerázy A3, jejíž zvýšená hladina může přispívat k nárůstu odolnosti vůči mozkové mrtvici a poškození mozku vlivem ischemie. Tanaka a kol. (2000) zjistili výrazný vzestup protein disulfid-izomerázy (PDI) na úrovni mRNA v cerebrálním kortexu, ne však v hipokampu, cerebelu či jinde. Tento neuroprotektivní účinek může souviset s chaperonou aktivitou PDI. Ischemický stres způsobuje denaturaci a rozvinutí řady proteinů a současně indukuje expresi řady stresových proteinů či chaperonů lokalizovaných v endoplazmatickém retikulu. Zajímavá je spojitost PDI s Parkinsonovou chorobou. Toto neurodegenerativní onemocnění CNS souvisí přímo s úbytkem nervových buněk v části mozku nazvané *Substantia nigra*. Tyto buňky za normálního stavu produkují dopamin. Nedostatek dopaminu způsobuje, že pacient postupně není schopen ovládat svůj pohyb, trpí stavy ztuhlosti, třesem, samovolnými pohyby a špatnou artikulací. Kromě úbytku dopaminu je typickým znakem nemoci také přítomnost Levyho tělísek (homogenních, acidofilních kulovitých útvarů složených z jemných filament a granulárního materiálu) v neuronech. Zvýšená exprese PDI v dopaminergních neuronech může přispívat k tvorbě Levyho tělísek, rozvoji neurodegenerativních procesů a může být výsledkem špatné funkce proteazomů. Možné je působení chaperonové aktivity PDI na proteinové substráty, například na tyrosin hydroxylázu určenou pro degradaci v proteazomech (Conn a kol., 2004).

Překvapivou roli v programované buněčné smrti zastává glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH); (Chuang a kol., 2005). Tento glykolytický enzym se podílí také na regulaci cytoskeletu, membránové fúze a transportu, akumulaci glutamátu v presynaptických váčcích a vazbě k nízkomolekulárním G proteinům (Huitorel a kol., 1985; Füchtbauer a kol., 1986; Doucet a Tuana, 1991; Glaser a Gross, 1995; Robbins a kol., 1995; Tisdale, 2001; Ikemoto a kol., 2003). Působí jako intracelulární senzor oxidativního stresu během rané fáze apoptózy. GAPDH se během procesu apoptózy up-reguluje a přemísťuje se z cytoplazmy do jádra (Saunders a kol., 1999). Velké množství

GAPDH v apoptotické buňce by mohlo souviset s kompenzací ztráty energie díky poškození mitochondrií. Jeho předpokládaná funkce v jádře je spojována se schopností aktivovat transkripci a opravovat DNA (Morgenegg a kol., 1986; Meyer-Siegler a kol., 1991). S rozvojem studia neurodegenerativních chorob bylo zjištěno, že se GAPDH selektivně váže k β -amyloidu (Alzheimerova choroba), huntingtinu (Huntingtonova choroba) a proteinům s velkým množstvím glutaminu (tzv. CAG triplet opakující se choroby); (Mazzola a Sirover, 2002). GAPDH tak představuje jeden z možných cílů vedoucích k rozvoji nových léčiv bojujících proti těmto chorobám.

Další up-regulované proteiny byly spojeny s purinovým metabolismem (guanin deamináza), protonovým transportem (V-ATPáza, mozková izoforma), regulací membránového transportu (*N*-etylmaleimid senzitivní fúzní protein) a glykolýzou (aldoláza A); (Koppitz a kol., 1986; Paletzki, 2002; Toei a kol., 2010; Abul-Husn a kol., 2011). Jediným proteinem, jehož hladina vlivem expozice morfiu klesla, byla kreatin kináza, která fosforyluje kreatin na kreatinfosfát za spotřeby ATP (kosterní svalstvo, myokard, mozková tkáň). V mozku je dimerní cytozolická forma označována jako kreatin kináza typ-B. Tento enzym je velmi náchylný k oxidativnímu poškození, v jehož důsledku bylo prokázáno snížení jeho aktivity v kortexu potkanů (Di Domenico a kol., 2010). S tím souvisí snížení obsahu ATP, porucha energetického metabolismu a narušení správné funkce neuronů, které vyžadují velké množství ATP ke správnému fungování neurotransmise a iontové homeostázy (Ames, 2000).

Významné zvýšení bílkovin funkčně vázaných na genezi oxidativního stresu a apoptózy indikuje stav narušení nervové tkáně a celkovou změnu energetického metabolismu.

6.3. Identifikace proteinů PM izolovaných z frontální mozkové kůry kontrolních potkanů a potkanů ovlivněných morfiem; analýza pomocí LC-MS/MS

Proteomická analýza frakcí plazmatických membrán izolovaných v perkolovém gradientu ukázala na kompletní reorganizaci bílkovin (tabulka č. 11 a 12). Při přípravě vzorků pro 2D elektroforézu se frakce PM precipitovaly nejprve acetonem a poté TCA. Aceton odstraňuje horizontální „streaking“ na 2D mapách, zároveň však jeho použití může vést ke ztrátám proteinů, které jsou modifikovány lipidy. Vzestup indukovaný morfiem byl zaznamenán u 10 proteinů (**4**-alfa-internexin, $\uparrow 5,2x$; **5**-dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2, $\uparrow 4,9x$; **6**-NAD-dependentní deacetyláza sirtuin-2, $\uparrow 2,5x$; **7**-alfa-synuklein, $\uparrow 2,0x$; **8**-peroxiredoxin-2, $\uparrow 2,2x$; **9**-tranzitorní ATPáza endoplazmatického retikula, $\uparrow 2,1x$;

10-glutamát dehydrogenáza 1, mitochondriální, ↑2,7x; **11**-sukcinyl-CoA:3-ketoacyl-koenzym A transferáza 1, mitochondriální, ↑2,2x; **14**-prohibitin, ↑2,2x; **16**-septin-11, ↑2,2x), pokles indukovaný morfiem u 8 proteinů (**1**-membránový neuronální signální protein 1, ↓2,1x; **2**-G beta podjednotka-1, ↓2,0x; **3**-kreatin kináza typ-B, ↓2,6x; **12**-aspartát aminotransferáza, mitochondriální, ↓2,2x; **13**-ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza L1, ↓2,0x; **15**-koronin-1A, ↓5,4x; **17**-základní myelinový protein S, ↓2,5x; **18**-60S ribozomální protein L12, ↑2,7x). Analyzované proteiny jsou lokalizovány v cytoplazmě (11), mitochondriích (4), plazmatické (2) a myelinové membráně (1).

Nejvíce stoupla hladina alfa-internexinu, bílkoviny, která je typická pro raná stádia vývoje nervových buněk (Kaplan a kol., 1990). Vzestup alfa-internexinu vlivem expozice morfiu může naznačovat možnost rychlejšího axonálního růstu, který by mohl způsobit změny ve struktuře neuronů (Lull a kol., 2009). Vysoká plasticita CNS, schopnost detekovat nové děje a správně na ně reagovat, je základní podmínkou přežití v měnícím se prostředí. Sirtuiny (SIRT) jsou enzymy, které deacetylují lysinové zbytky na aminokoncích histonů, proteinů vázajících DNA. Během zvýšené produkce nebo hromadění volných kyslíkových radikálů se sirtuiny aktivují, jsou schopné ROS detoxikovat a snižovat tak oxidativní stres aktivací např. superoxid dismutázy. Zvýšenou expresi SIRT2 lze pozorovat v oligodendrocytech, v nichž hraje klíčovou roli při vzniku myelinové pochvy. Schopnost SIRT2 deacetylovat α -tubulin ovlivňuje také hybnost neuronů, prodlužování axonů a migraci buněk gliomů, čímž zabraňuje jejich šíření v mozku (Harting a Knöll, 2010).

Dalšími up-regulovanými proteiny spojenými s kontrolou oxidativního stresu byly: dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2, peroxiredoxin-2 a prohibitin. Peroxiredoxin-2 odstraňuje nízkou hladinu hydroperoxidů a peroxinitritů produkovaných jako výsledek buněčného metabolismu (Rhee a kol., 2005). Vzestup mitochondriálního proteinu prohibitinu má neuroprotektivní charakter, jeho pokles naopak způsobuje vyšší náchylnost neuronů k poškození a zvyšuje produkci ROS (Zhou a kol., 2012).

Alfa-synuklein je specificky exprimován v tělech nervových buněk a na synapsích, tvoří 1 % celkového obsahu cytozolických proteinů. Tento anti-apoptotický protein se podílí na patogenezi Parkinsonovy nemoci (Maries a kol., 2003). Jeho abnormální solubilní oligomerní konformace působí toxicky a narušuje buněčnou homeostázu (Stefanis, 2012). Tranzitorní ATPáza endoplazmatického retikula a septin 11 jsou regulační proteiny, jejichž obsah vlivem dlouhodobé expozice morfiu také vzrostl. ATPáza

endoplazmatického retikula se podílí na fragmentaci váčků Golgiho aparátu během mitózy (Woodman a kol., 2003), interaguje s neurofibrominem kvůli kontrole hustoty dendritických výběžků (Wang a kol., 2011). Septin-11 je filamenta-formující cytoskeletární GTPáza, která má vliv na maturaci neuronů (Tada a kol., 2007).

Vzestup metabolických bílkovin glutamát dehydrogenázy a sukcinyl-CoA:3-ketoacyl-koenzymu A transferázy naznačuje změnu energetického metabolismu. Aktivace opioidních receptorů (μ -, δ - a κ -OR) vysokými dávkami morfia je energeticky náročný proces (Kraus a kol., 1997; Magistretti a Pellerin, 1999). Jako energetická rezerva v mozku je mobilizován glykogen v astrocytech, po jeho vyčerpání nastává stav oxidativního stresu v důsledku nerovnováhy mezi spotřebou kyslíku v mitochondriích a zásobením mitochondriální matrix redukčními ekvivalenty (Magistretti a Allaman, 2007).

Nejvíce byla vlivem morfia snížena hladina koroninu-1A, který napomáhá invaginaci plazmatické membrány při fagocytóze. Tento aktin-vázající protein je výrazně exprimován ve tkáních spojených s imunitou jako je slezina, krční mandle a lymfatické uzliny (Suzuki a kol., 1995; Ferrari a kol., 1999). Ahmed a kol. (2007) identifikovali koronin-1A také jako účinný standard mikroglíí. Mikroglie jsou malé buňky v nervové tkáni, které se chovají jako fagocyty. Snížené množství koroninu-1A naznačuje oslabení obranyschopných dějů v mozku. Stejně jako u postnukleárního supernatantu i u frakcí PM byl snížen obsah kreatin kinázy typu-B, jednoho ze základních činitelů v kontrole oxidativního stresu (Drabik a kol., 2007).

Jediným členem GPCR-signálních kaskád identifikovaným pomocí LC-MS/MS byla G β podjednotka (Ujčíková a kol., 2014). G β podjednotka je schopná přímo aktivovat adenylylcyklázu II, IV, VII (v přítomnosti aktivované G α_s); (Okoe a Iwakura, 2010), naopak inhibuje adenylylcyklázu I, V/VI a VIII (Wang a Burns, 2006). Naše výsledky ukazují, že dlouhodobá expozice potkanů zvyšujícím se dávkám morfia vede k desenzitizaci trimerních G proteinů třídy Gi/Go na stimulaci MOR a DOR agonisty (Bouřová a kol., 2010), současně dochází k up-regulaci adenylylcyklázy, která se projevuje jako specifické zvýšení izoform AC I a AC II (Ujčíková a kol., 2011). Pokles G β podjednotky-1 indukovaný morfiem představoval snížení pouze *aktivní* části, celkový signál se změnil nepatrně (obr. č. 19).

Snížená hladina byla také detekována u mitochondriální aspartát aminotransferázy, metabolického enzymu, který může být indikátorem poškození mitochondrií (Das a kol., 2007). Mezi proteiny s regulační funkcí byl pokles zaznamenán u membránového neuronálního signálního proteinu 1, ubikvitin karboxyl-terminální hydrolázy L1,

základního myelinového proteinu S a ribozomálního proteinu L12. Membránový neuronální signální protein 1 je kalmodulin-vázající bílkovina zakotvená v membránových doménách s vysokým obsahem cholesterolu, která společně s cholesterolem redukuje laterální difuzi membrán (Kashihara a kol., 2000). Ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza L1 má podíl na tvorbě volného ubikvitinu i ubikvitinaci proteinů. Bylo zjištěno, že morfiem snižuje aktivitu 20S proteazomových podjednotek a zvyšuje množství volného ubikvitinu, čímž snižuje množství proteinů určených k degradaci (Rambhia a kol., 2005). Pokles hladiny základního myelinového proteinu S může způsobit snížení počtu myelinizovaných axonů (Traudt a kol., 2012). Ribozomální protein L12 se váže přímo k 26S ribozomální RNA a zpřístupňuje dráhu importinu 11 do jádra (Plafker a kol., 2002).

*Spektrum změn indukovaných morfiem spojených především s oxidativním stresem, apoptózou a energetickým metabolismem naznačuje, že mozek potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia **není plně adaptován**. Ve srovnání s prací Sim-Selley a kol., 2000, kde byla zvířatům podávána droga formou intravenózního katetru po dobu až 39 dní, je desetidenní intramuskulární expozice krátká doba. Předmětem dalšího výzkumu zůstává otázka, zda jsou tyto změny reverzibilní, stejně jako byla prokázána reverzibilita u vzestupu ACI a AC II ve vzorcích plazmatických membrán potkanů usmrcených 20 dní po poslední dávce drogy.*

7. ZÁVĚR

Výsledky **první části** této dizertační práce prokázaly:

- specifický signifikantní vzestup AC I (8x) a AC II (2,5x) ve vzorcích PM izolovaných z frontální mozkové kůry samců potkanů kmene Wistar, kteří byli usmrceni **24 hodin** po poslední dávce morfia, obsah ostatních izoforem AC (III-IX) se nezměnil, krátkodobá expozice morfiu neměla vliv na změnu AC I a AC II
- zvýšená hladina AC I a AC II se překvapivě neprojevila ve vzorcích PM izolovaných z potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia po dobu 10 dní, ale byli usmrceni **20 dní** po aplikaci poslední dávky
- hladina všech hlavních tříd trimerních G proteinů a standardu plazmatických membrán Na, K-ATPázy se nezměnila

*Dlouhodobá inhibice AC nutí organismus vyrovnat se s tímto problémem s cílem udržení homeostázy. Snížení odpovědi trimerních G proteinů třídy Gi/Go na stimulaci MOR a DOR agonisty ve frontální mozkové kůře potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia je primárním impulzem pro následnou **kompenzační odpověď** v podobě **vzestupu hladiny AC I a AC II**, která je **plně reverzibilní**. Zároveň se ale nemění množství G proteinů a Na, K-ATPázy ve frakcích PM.*

Výsledky **druhé části** dizertační práce přinesly tato zjištění:

- proteomická analýza 10 bílkovin PNS pomocí MALDI-TOF MS/MS zjistila vzestup zejména mitochondriálních a cytoplazmatických proteinů funkčně vázaných na genezi oxidativního stresu, apoptózy a změnu energetického metabolismu; proteomická analýza 18 bílkovin PM pomocí LC-MS/MS ukázala na kompletní reorganizaci ve složení zvýšeného i sníženého obsahu proteinů
- jediným zástupcem GPCR-signálních kaskád byla G β podjednotka, jejíž pokles (2x) indukovaný morfiem představoval snížení pouze specifické *aktivní* části tohoto regulačního proteinu
- proteomická analýza G β podjednotek potvrdila rozsah celkového signálu G β , který klesl pouze nepatrně (1,2x); ověření změny identifikovaného proteinu pomocí následné 2D elektroforézy a imunoblotové detekce s využitím specifické protilátky je dosud ojedinělý výsledek

*Výsledky proteomické analýzy bílkovin PNS a frakcí PM naznačují, že mozek potkanů vystavených zvyšujícím se dávkám morfia **není plně adaptován**.*

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abul-Husn, N.S., Annangudi, S.P., Ma'ayan, A., Ramos-Ortolaza, D.L., Stockton, S.D. Jr., Gomes, I., Sweedler, J.V., Devi, L.A., 2011. Chronic morphine alter the presynaptic protein profile: identification of novel molecular targets using proteomics and network analysis. *PLoS One* **6**, e25535.

Aggarwal, K., Choe, L.H., Lee, K.H., 2006. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**, 112-120.

Ahmed, Z., Shaw, G., Sharma, V.P., Yang, C., McGowan, E., Dickson, D.W., 2007. Actin-binding proteins Coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **55**, 687-700.

Ames, A. III, 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* **34**, 42-68.

Ammer, H., Christ, T.E., 2002. Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity. *J Neurochem* **83**, 818-827.

Ammer, H., Schulz, R., 1997. Enhanced stimulatory adenylyl cyclase signaling during opioid dependence is associated with a reduction in palmitoylated Gs alpha. *Mol Pharmacol* **52**, 993-999.

Ammer, H., Schulz, R., 1998. Adenylyl cyclase super-sensitivity in opioid-withdrawn NG108-115 hybrid cells requires Gs but is not mediated by Gs alpha subunit. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 855-862.

Arshavsky, V.Y., Lamb, T.B., Pugh, E.N. Jr., 2002. G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* **64**, 153-187.

Artal-Sanz, M., Tavernarakis, N., 2009. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C.elegans*. *Nature* **461**, 793-797.

Attali, B., Vogel, Z., 1989. Long-term opiate exposure leads to reduction of the alpha i-1 subunit of GTP-binding proteins. *J Neurochem* **53**, 1636-1639.

Avidor-Reiss, T., Baywatch, M., Levy, R., Matus-Leibovitch, N., Nevo, I., Vogel, Z., 1995. Adenylylcyclase super-sensitization in mu-opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. *J Biol Chem* **270**, 29732-29738.

Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Levy, R., Pfeuffer, T., Vogel, Z., 1996. Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gβγ. *J Biol Chem* **271**, 21309-21315.

Baron, C.B., Tolan, D.R., Choi, K.H., Coburn, R.F., 1999. Aldolase A Ins(1,4,5)P₃-binding domains ad determined by site-directed mutagenesis. *Biochem J* **341**, 805-812.

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.H., Gianazza, E., Goerg, A., Westermeier, R., Postel, W., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**, 317-339.

Backlund, P.S., Jr., Aksamit, R.R., Unson, C.G., Goldsmith, P., Spiegel, A.M., Milligan, G., 1988. Immunochemical and electrophoretic characterization of the major pertussis toxin substrate of the RAW264 macrophage cell line. *Biochemistry* **27**, 2040-2046.

Bayewitch, M.L., Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Simonds, W.F., Vogel, Z., 2000. Alterations in detergent solubility of heterotrimeric G proteins after chronic activation of G(i/o)-coupled receptors: changes in detergent solubility are in correlation with onset of adenylyl cyclase superactivation. *Mol Pharmacol* **57**, 820-825.

Benesova, K., Pluhackova, H., Belakova, S., Vaculova, K., Mikulikova, R., Ehrenbergerova, J., Brezinova-Belcredi, N., 2012. Utilization of ultra performance liquid chromatography (UPLC)-modern separation technique for determination of vitamin E in barley cereals. *Chem Listy* **106**, 672-676.

Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P., Patton, W.F., 2000. Background-free, high sensitivy staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* **21**, 2509-2521.

Bierczynska-Krzysik, A., Bonar, E., Drabik, A., Noga, M., Suder, P., Dylag, T., Dubin, A., Kotlinska, J., Silberring, J., 2006a. Rat brain proteome in morphine dependence. *Neurochem Int* **49** , 401-406.

Bierczynska-Krzysik, A., Pradeep John, J.P., Silberring, J., Kotlinska, J., Dylag, T., Cabatic, M., Lubec, G., 2006b. Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine. *Int J Mol Med* **18**, 775-784.

Bodzon-Kułakowska, A., Suder, P., Mak, P., Bierczynska-Krzysik, A., Lubec, G., Walczak, B., Kotlinska, J., Silberring, J., 2009. Proteomic analysis of striatal neuronal cell cultures after morphine administration. *J Sep Sci* **32**, 1200-1210.

Bourova, L., Stohr, J., Lisy, V., Rudajev, V., Novotny, J., Svoboda, P., 2009. Isolation of plasma membrane compartments from rat brain cortex; detection of agonist-stimulated G protein activity. *Med Sci Monit* **15**, BR111-BR122.

Bourova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Dlouha, K., Novotny, J., Svoboda, P., 2010. Long-term adaptation to high doses of morphine causes desensitization of μ -OR- and δ -OR-stimulated G-protein response in forebrain cortex but does not decrease the amount of G-protein alpha subunit. *Med Sci Monit* **16**, 260-270.

Cali, J.J., Parekh, R.S., Krupinski, J., 1996. Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **271**, 1089-1095.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G., 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.

Carter, B.D., Medzihradsky, F., 1993. Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 4062-4066.

Casey, P.J., 1994. Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 219-225.

Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., Buck, J., 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**, 625-628.

Chen, X.L., Lu, G., Gong, Y.X., Zhao, L.C., Chen, J., Chi, Z.Q., Yang, Y.M., Chen, Z., Li, Q.L., Liu, J.G., 2007. Expression changes of hippocampal energy metabolism enzymes contribute to behavioural abnormalities during chronic morphine treatment. *Cell Res* **17**, 689-700.

Chmelik, J., 2005. Proteomic guide. *Chem Listy* **99**, 883-885.

Choi, E.J., Xia, Z., Storm, D.R., 1992. Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* **31**, 6492-6498.

Chuang, D.M., Hough, C., Senatorov, V.V., 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 269-290.

Collinsova, M., Jiracek, J., 2004. Current development in proteomics. *Chem Listy* **98**, 1112-1118.

Contet, C., Kieffer, B.L., Befort, K., 2004. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 370-378.

Cooper, A. J.L., 2011. ^{13}N as a tracer for studying glutamate metabolism. *Neurochem Int* **59**, 456-464.

Conn, K.J., Gao, W., McKee, A., Lan, M.S., Ullman, M.D., Eisenhauer, P.B., Fine, R.E., Wells, J.M., 2004. Identification of the protein disulfide isomerase family member PDip in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. *Brain Res* **1022**, 164-172.

Connor, M., Christie, M.D., 1999. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 493-499.

Corbett, A.D., Henderson, G., McKnight, A.T., Paterson, S.J., 2006. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol* **147**, S153-S162.

Das, S.K., Hiran, K.R., Mukherjee, S., Vasudevan, D.M., 2007. Oxidative stress is the primary event: effects of ethanol consumption in brain. *Indian J Clin Biochem* **22**, 99-104.

Davies, M.N., Secker, A., Halling-Brown, M., Moss, D.S., Freitas, A.A., Timmis, J., Clark, E., Flower, D.R., 2008. GPCRTree:online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Res Notes* **1**, 67.

Dhanasekaran, N., Dermott, J.M., 1996. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* **8**, 235-245.

Di Domenico, F., Perluigi, M., Butterfield, D.A., Cornelius, C., Calabrese, V., 2010. Oxidative damage in rat brain during aging: interplay between energy and metabolic key target proteins. *Neurochem Res* **35**, 2184-2192.

Doucet, J.P., Tuana, B.S., 1991. Identification of low molecular weight GTP-binding proteins and their sites of interaction in subcellular fractions from skeletal muscle. *J Biol Chem* **266**, 17613-17620.

Domon, B., Aebersold, R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**, 212-217.

Drabik, A., Bierczynska-Krzysik, A., Bodzon-Kulakowska, A., Suder, P., Kotlinska, J., Silberring, J., 2007. Proteomics in neurosciences. *Mass Spectrom Rev* **26**, 432-450.

Drastichova, Z., Bourova, L., Hejnova, L., Jedelsky, P., Svoboda, P., Novotny, J., 2010. Protein alterations induced by long-term agonist treatment of HEK293 cells expressing thyrotropin-releasing hormone receptor and G₁₁ α protein. *J Cell Biochem* **109**: 255-264.

Ellis, C., 2004. The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 577-626.

Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., Pieters, J. 1999 A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**, 435–447.

Fišerová, M., 2000. Historie, příčiny a léčení drogových závislostí. *Postgraduální medicína* **2**, 288-298.

Fountoulakis, M., Takács, M.F., Berndt, P., Langen, H., Takács, B., 1999. Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* **20**, 2181-2195.

Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.G., Schiöth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272.

Füchtbauer, A., Jockusch, B.M., Leberer, E., Pette, D., 1986. Actin-severing activity copurifies with phosphofruktokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 9502-9506.

George, S.R., O'Dowd, B.F., Lee, S.P., 2002. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 808-820.

Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., Mische, S.M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 601-605.

Gierschik, P., Milligan, G., Pines, M., Goldsmith, P., Codina, J., Klee, W., Spiegel, A., 1986. Use of specific antibodies to quantitate the guanine nucleotide-binding protein Go in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2258-2262.

Glaser, P.E., Gross, R.W., 1995. Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms. *Biochemistry* **34**, 12193-12203.

Goldsmith, P., Gierschik, P., Milligan, G., Unson, C.G., Vinitzky, R., Malech, H.L., Spiegel, A.M., 1987. Antibodies directed against synthetic peptides distinguish between GTP-binding proteins in neutrophil and brain. *J Biol Chem* **262**, 14683-14688.

Gouw, J.W., Krijgsveld, J., Heck A.J.R., 2010. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol Cell Proteomics* **9**, 11-24.

Guiochon, G., 2005. Csaba Horváth and preparative liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1079**, 7-23.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R., 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-999.

Han, D.K., Eng, J., Zhou, H., Aebersold, R., 2001. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **19**, 946-951.

Hanoune, J., Defer, N., 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-174.

Harting, K., Knöll, B., 2010. SIRT2-mediated protein deacetylation: an emerging key regulator in brain physiology and pathology. *Eur J Cell Biol* **89**, 262-269.

He, L., Whistler, J.L., 2005. An opiate cocktail that reduces morphine tolerance and dependence. *Curr Biol* **15**, 1028-1033.

He, L., Whistler, J.L., 2007. The biochemical analysis of methadone modulation on morphine-induced tolerance and dependence in brain, *Pharmacology* **79**, 193-202.

Hendry, I.A., Kelleher, K.L., Bartlett, S.E., Leck, K.J., Reynolds, A.J., Heydon, K., Mellick, A., Megirian, D., Matthaei, K.I., 2000. Hypertolerance to morphine in G α -deficient mice. *Brain Res* **870**, 10-19.

Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C., 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 5011-5015.

Hildebrandt, J.D., 1997. Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* **54**, 325-339.

Horvath, C.G., Preiss, B.A., Lipsky, S.R., 1967. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal Chem* **39**, 1422-1428.

Hua, L.V., Green, M., Warsh, J.J., Li, P.P., 2000. Lithium regulation of aldolase A expression in the rat frontal cortex: identification by differential display. *Biol Psychiatry* **48**, 58-64.

Huitorel, P., Pantaloni, D., 1985. Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem* **150**, 265-269.

Hwang, N.R., Yim, S.H., Kim, Y.M., Jeong, J., Song, E.J., Lee, Y., Choi, S., Lee, K.J., 2009. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J* **423**, 253-264.

Ihnatovych, I., Novotny, J., Haugvicova, R., Bourova, L., Mares, P., Svoboda, P., 2002. Ontogenetic development of the G protein-mediated adenylyl cyclase signaling in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **133**, 69-75.

Ikemoto, A., Bole, D.G., Ueda, T., 2003. Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem* **278**, 5929-5940.

Janák, J., 2011. Zamyšlení nad chromatografií. *Chem Listy* **105**, 292-293.

Jones, D.T., Masters, S.B., Bourne, H.R., Reed, R.R., 1990. Biochemical characterization of three stimulatory GTP-binding proteins. The large and small forms of Gs and the olfactory-specific G-protein, Golf. *J Biol Chem* **265**, 2671-2676.

Jordan, B.A., Devi, L.A., 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**, 697-700.

Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., 1983. Capillary zone electrophoresis. *Science* **222**, 266-272.

Kaplan, M.P., Chin, S.S.M., Fliegner, K.H., Liem, R.K.H., 1990. α -internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J Neurosci* **10**, 2735-2748.

Kashihara, M., Miyata, S., Kumanogoh, H., Funatsu, N., Matsunaga, W., Kiyohara, T., Sokawa, Y., Maekawa, S., 2000. Changes in the localization of NAP-22, a calmodulin binding membrane protein, during the development of neuronal polarity. *Neurosci Res* **37**, 315-325.

Kasicka, V., 1997. Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chem Listy* **91**, 320-329.

Kawabe, J.I., Iwami, G., Ebina, T., Ohno, S., Katada, T., Ueda, Y., Homcy, C.J., Ishikawa, Y., 1994. Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. *J Biol Chem* **269**, 16554-16558.

Koppitz, B., Vogel, F., Mayr, G.W., 1986. Mammalian aldolases are isomer-selective high-affinity inositol polyphosphate binders. *Eur J Biochem* **161**, 421-433.

Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., Hirth, C.G., 1992. The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expressing cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 12048-12052.

Kim, S.Y., Chudapongse, N., Lee, S.M., Levin, M.C., Oh, J.T., Park, H.J., Ho, I.K., 2005. Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in morphine-dependent rat brains. *Brain Res Mol Brain Res* **133**, 58-70.

Kraus, M.A., Piper, J.M., Kornetsky, C., 1997. Persistent increases in basal cerebral metabolic activity induced by morphine sensitization. *Pharmacol Biochem Behav* **57**, 89-100.

- Krupinski, J., Lehman, T.C., Frankenfield, C.D., Zwaagstra, J.C., Watson, P.A., 1992. Molecular diversity in the adenylyl cyclase family. *J Biol Chem* **267**, 24858-24862.
- Lai, H.L., Lin, T.H., Kao, Y.Y., Lin, W.J., Hwang, M.J., Chern, Y., 1999. The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **56**, 644-650.
- Law, P.Y., Loh, H.H., Wei, L.N., 2004. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology* **47**, 300-311.
- Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H., 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 389-430.
- Li, K.W., Jimenez, C.R., van der Schors, R.C., Hornshaw, M.P., Schoffelmeer, A.N.M., Smit, A.B., 2006. Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. *Proteomics* **6**, 2003-2008.
- Li, Q., Zhao, X., Zhong, L.J., Yang, H.Y., Wang, Q., Pu, X.P., 2009. Effects of chronic morphine treatment on protein expression in rat dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol* **612**, 21-28.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lull, M.E., Erwin, M.S., Morgan, D., Roberts, D.C.S., Vrana, K.E., Freeman, W.M., 2009. Persistent proteomic alterations in the medial prefrontal cortex with abstinence from cocaine self-administration. *Proteomics Clin Appl* **17**, 462-472.
- Lupi, R., Corda, D., Girolamo, M.D., 2000. Endogenous ADP-ribosylation of the G protein β subunit prevents the inhibition of type I adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **275**, 9418-9424.
- Magistretti, P.J., Allaman, I., 2007. Glycogen: a Trojan horse for neurons. *Nat Neurosci* **10**, 1341-1342.
- Magistretti, P.J., Pellerin, L., 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **1999**, 1155-1163.
- Maher, C.E., Martin, T.J., Childers, S.R., 2005. Mechanisms of mu opioid receptor/G-protein desensitization in brain by chronic heroin administration, *Life Sci* **77**, 1140-1154.

Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Granier, S., 2012. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**, 321-327.

Maries, E., Dass, B., Collier, T.J., Kordower, J.H., Steece-Collier, K., 2003. The role of α -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci* **4**, 727-738.

Mazzola, J.L., Sirover, M.A., 2002. Alternation of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? *Neurotoxicology* **23**, 603-609.

McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., Willard, F.S., 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* **62**, 551-577.

Merkwirth, C., Langer, T., 2009. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 27-32.

Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., de Riel, J.K., Sirover, M.A., 1991. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8460-8464.

Miller, A.L., Hawkins, R.A., Harris, R.L., Veech, R.L., 1972. The effects of acute and chronic morphine treatment and of morphine withdrawal on rat brain in vivo. *Biochem J* **129**, 463-469.

Milligan, G., 2004. G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* **66**, 1-7.

Milligan, G., Marshall, F., Rees, S., 1996. G16 as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 235-237.

Minami, M., Satoh, M., 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* **23**, 121-145.

Mishra, S., Ande, S.R., Nyomba, B.L., 2010. The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS J* **277**, 3937-3946.

Mitchell, F.M., Griffiths, S.L., Saggerson, E.D., Houslay, M.D., Knowler, J.T., Milligan, G., 1989. Guanine-nucleotide-binding proteins expressed in rat white adipose tissue. Identification of both mRNAs and proteins corresponding to Gi1, Gi2 and Gi3. *Biochem J* **262**, 403-408.

Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., Meunier, J.C., 1994. ORL1, a novel of the opioid receptor family. *FEBS Lett* **341**, 33-38.

Morgenegg, G., Winkler G.C., Hübscher, U., Heizmann, C.W., Mous, J., Kuenzle, C.C., 1986. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription in neurons. *J Neurochem* **47**, 54-62.

Mullaney, I., Dodd, M.W., Buckley, N. and Milligan, G., 1993. Agonist activation of transfected human M1 muscarinic acetylcholine receptors in CHO cells results in down-regulation of both the receptor and the α subunit of the G protein Gq. *Biochem J* **289**, 125-131.

Mullaney, I., Milligan, G., 1990. Identification of two distinct isoforms of the guanine nucleotide binding protein Go in neuroblastoma x glioma hybrid cells: independent regulation during cyclic AMP-induced differentiation. *J Neurochem* **55**, 1890-1898.

Murphey, R.K., Godenschwege, T.A., 2002. New roles for ubiquitin in the assembly and function of neuronal circuits. *Neuron* **36**, 5-8.

Myung, C.S., Lim, W.K., DeFilippo, J.M., Yasuda, H., Neubig, R.R., Garrison, J.C., 2006. Regions in the G protein γ subunit important for interaction with receptors and effectors. *Mol Pharmacol* **69**, 877-887.

Neubert, T.A., Johnson, R.S., Hurley, J.B., Walsh, K.A., 1992. The rod transducin α subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. *J Biol Chem* **267**, 18274-18277.

Norkova, R., Jaklova-Dytrtova, J., Kasicka, V., 2013. Ionization techniques and interfaces for coupling of capillary electromigration methods with mass spectrometry detection. *Chem Listy* **107**, 949-955.

Nürnberg, B., Tögel, W., Krause, G., Storm, R., Breitweg-Lehmann, E., Schunack, W., 1999. Non-peptide G-protein activators as promising tools in cell biology and potential drug leads. *Eur J Med Chem* **34**, 5-30.

Nygaard, R., Frimurer, T.M., Holst, B., Rosenkilde, M., Schwartz, T.W., 2009. Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 249-259.

O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-4021.

Ohnuki, M., Takahashi, N., Yamasaki, M., Fukui, T., 2005. Different localization in rat brain of the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, as compared to succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Biochim Biophys Acta* **1729**, 147-153.

Okabe, H., Iwakura, Y., 2010. Neural tube defects and impaired neural progenitor cell proliferation in G β ₁-deficient mice. *Dev Dyn* **239**, 1089-1101.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376-386.

Paletzki, R.F., 2002. Cloning and characterization of guanine deaminase from mouse and rat brain. *Neuroscience* **109**, 15-26.

Patel, T.B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L., Scholich, K., 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function, *Gene* **269**, 13-25.

Paterson, J.M., Smith, S.M., Harmar, A.J., Antoni, F.A., 1995. Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 1000-1008.

Perluigi, M., Poon, H.F., Maragos, W., Pierce, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C., Butterfield, D.A., 2005. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in R6/2 transgenic mice. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1849-1861.

Perluigi, M., Domenico, F.D., Giorgi, A., Shininà, M.E., Coccia, R., Cini, C., Bellia, F., Cambria, M.T., Cornelius, C., Butterfield, D.A., Calabrese, V., 2010. Redox proteomics in aging rat brain involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J Neurosci Res* **88**, 3498-3507.

Petrak, J., 2005. Proteomics and its role in medicine. *Cas Lek Cesk* **144**, 365-370.

Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R., 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650.

Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G., Scholich, K., 2009. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 321-335.

Plafker, S.M., Macara, I.G., 2002. Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Mol Cell Biol* **22**, 1266-1275.

Preininger, A.M., Hamm, H.E., 2004. G protein signaling: insights from new structures. *Sci STKE* **218**, re3.

Preston, K.L., 1991. Drug abstinence effects: opioids. *Br J Addict* **86**, 1641-1646.

Rambhia, S., Mantione, K.J., Stefano, G.B., Cadet, P., 2005. Morphine modulation of the ubiquitin-proteasome complex is neuroprotective. *Med Sci Monit* **11**, BR 386-396.

Raymond, S., Weintraub, L., 1959. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711.

Rhee, S.G., Chae, H.Z., Kim, K., 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**, 1543-1552.

Robbins, A.R., Ward, R.D., Oliver, C., 1995. A mutation in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J Cell Biol* **130**, 1093-1104.

Robinson, T.E., Kolb, B., 1999. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* **33**, 160-162.

Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D.J., 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* **3**, 1154-1169.

Sanabra, C., Mengod, G., 2011. Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain. *J Chem Neuroanatomy* **41**, 43-54.

Saunders, P.A., Chen, R., Chuang, D., 1999. Nuclear translocation of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms during neuronal apoptosis. *J Neurochem* **72**, 925-932.

Schallmach, E., Steiner, D., Vogel, Z., 2006. Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and opioid exposure, *Neuropharmacology* **50**, 998-1005.

Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W., 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 3363-3367.

Sharma, S.K., Klee, W.A., Nierenberg, M., 1975. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance, *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3092-3096.

Shen, W., Willis, D., Zhang, Y., Schlattner, U., Wallimann, T., Molloy G.R., 2002. Expression of creatine kinase isoenzyme genes during postnatal development of rat brain cerebellum:evidence for transcriptional regulation. *Biochem J* **367**, 369-380.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins nad proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860.

- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858.
- Shi, Q., Gibson, G.E., 2011. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem* **118**, 440-448.
- Sim, L.J., Selley, D.E., Dworkin, S.I., Childers, S.R., 1996. Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [³⁵S] GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* **16**, 2684-2692.
- Simonds, W.F., 1999. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 66-73.
- Sim-Selley, L.J., Selley, D.E., Vogt, L.J., Childers, S.R., Martin, T.J., 2000. Chronic heroin self-administration desensitizes mu opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *J Neurosci* **20**, 4555-4562.
- Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M., Rabilloud, T., 2001. A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **1**, 835-840.
- Smejkal, P., Foret, F., 2012. Microfluidics in bioanalytical instrumentation. *Chem Listy* **106**, 104-112.
- Smithies, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* **61**, 629-641.
- Stefanis, L., 2012. α -synuklein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a009399.
- Sunahara, R.K., Taussig, R., 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**, 168-184.
- Suzuki, K., Nishihata, J., Arai, Y., Honma, N., Yamamoto, K., Irimura, T., Toyoshima, S. 1995. Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett* **364**, 283-288.
- Svoboda, P., Novotny, J., 2002. Hormone-induced subcellular redistribution of trimeric G proteins. *Cell Mol Life Sci* **59**, 501-512.
- Svoboda, P., Teisinger, J., Novotny, J., Bourova, L., Drmota, T., Hejnova, L., Moravcova, Z., Lisy, V., Rudajev, V., Stöhr, J., Vokurkova, A., Svandova, I., Durchankova, D., 2004. Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res* **53** (Suppl.1): S141-S152.
- Switzer, R.C. 3rd, Merril, C.R., Shifrin, S., 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **98**, 231-237.

Tada, T., Simonetta, A., Batteredon, M., Kinoshita, M., Edbauer, D., Sheng, M., 2007. Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr Biol* **17**, 1752-1758.

Tanaka, S., Uehara, T., Nomura, Y., 2000. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Bioch Chem* **275**, 10388-10393.

Tang, W.J., Hurley, J.H., 1998. Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol Pharmacol* **54**, 231-240.

Tang, W.J., Gilman, A.G., 1991. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* **254**, 1500-1503.

Tang, W.J., Gilman, A.G., 1995. Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by G α and forskolin. *Science* **268**, 1769-1772.

Tang, X.L., Wang, Y., Li, D.L., Luo, J., Liu, M.Y., 2012. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin* **33**, 363-371.

Templin, M.F., Stoll, D., Schwenk, J.M., Pötz, O., Kramer, S., Joos, T.O., 2003. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* **3**, 2155-2166.

Tesmer, J.J.G., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., Sprang, S.R., 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* **278**, 1907-1916.

Tisdale, E.J., 2001. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **276**, 2480-2486.

Toei, M., Saum, R., Forgac, M., 2010. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry*, **49**, 4715-4723.

Tomancová, A., Sedo, O., Zdráhal, Z., Mayer, J., Pospíšilová, S., 2009. Proteomic analysis of cancer cells. *Klin Onkol* **22**, 210-217.

Tso, P.H., Wong, Y.H., 2003. Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**, 307-316.

Tsujita, K., Itoh, T., Kondo, A., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Irino, Y., Hasegawa, J., Takenawa, T., 2010. Proteome of acidic phospholipid-binding proteins: spatial and temporal regulation of coronin 1A by phosphoinositides. *J Biol Chem* **285**, 6781-6789.

Traudt, C.M., Tkac, I., Ennis, K.M., Sutton, L.M., Mammel, D.M., Rao, R., 2012. Postnatal morphine administration alters hippocampal development in rats. *J Neurosci Res*, **90**, 307-314.

Ujcikova, H., Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P., 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant and percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Sci* **12**:11.

Ujcikova, H., Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Svoboda, P., 2011. Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 1220-1229.

Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-2077.

Vorderwülbecke, S., Cleverley, S., Weinberger, S.R., Wiesner, A., 2005. Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip[®] Systems. *Nat Methods* **2**, 393-395.

Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**, 953-990.

Wang H.Y., Burns, L.H., 2006. G $\beta\gamma$ that interacts with adenylyl cyclase in opioid tolerance originates from a Gs protein. *J Neurobiol* **12**, 1302-1310.

Wang, H.F., Shih, Y.T., Chen, C.Y., Chao, H.W., Lee, M.J., Hsueh, Y.P., 2011. Valosin-containing protein and neurofibromin interact to regulate dendritic spine density. *J Clin Invest* **121**, 4820-4837.

Watson, P.A., Krupinski, J., Kempinski, A.M., Frankenfield, C.D., 1994. Molecular cloning and characterization of the type VII isoform of mammalian adenylyl cyclase expressed widely in mouse tissues and in S49 mouse lymphoma cells. *J Biol Chem* **269**, 28893-28898.

Watts, V.J., Neve, K.A., 2005. Sensitization of adenylate cyclase by G α i/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **106**, 405-421.

Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T., Bourne, H.R., 1995. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem* **270**, 503-506.

Whistler, J.L., von Zastrow, M., 1998. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9914-9919.

Whistler, J.L., Chuang, H.H., Chu, P., Jan, L.Y., von Zastrow, M., 1999. Functional dissociation of μ -opioid receptor signaling and receptor endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**, 737-746.

Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 1995. Progress with proteome projects: why all

proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotech Gen Eng Rev* **13**, 19-50.

Woodman, P.G., 2003. p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci* **116**, 4283-4290.

Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2006. Oxidative stress modulates Sir2 α in rat hippocampus and cerebral cortex. *Eur J Neurosci* **22**, 5213-5216.

Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E., Hurley, J.H., 1997. Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**, 247-253.

Zhou P., Qian, L., D'Aurelio, M., Cho, S., Wang, G., Manfredi, G., Pickel, V., Iadecola, C., 2012. Prohibitin reduces mitochondrial free radical production and protects brain cells from different injury modalities. *J Neurosci* **32**, 583-592.

PŘÍLOHA - PUBLIKACE