

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra fyziologie  
a  
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.



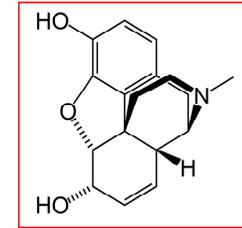
**Morfiem navozené změny membránových a solubilních bílkovin frontální mozkové kůry potkana**

**Mgr. Hana Ujčíková**  
Doktorandská dizertační práce  
2014

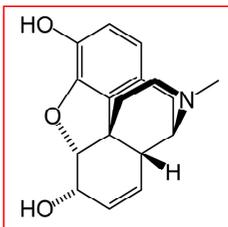
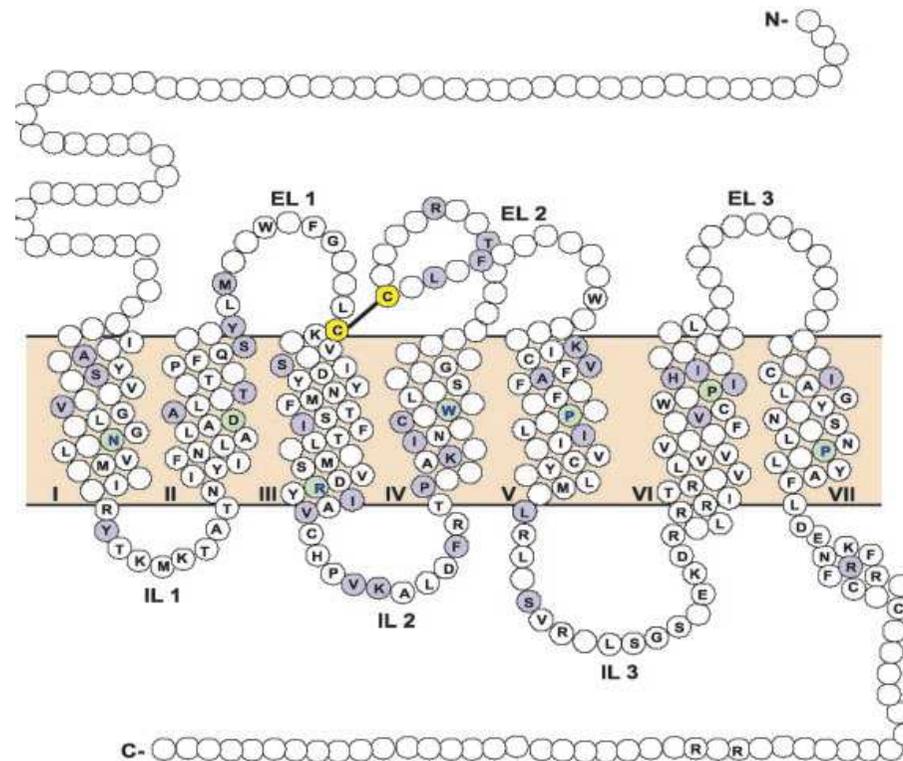
Školitel: **Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.**  
FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR  
*Biochemie membránových receptorů*

# Opioidy

- endogenní opioidní peptidy
- opiové alkaloidy
- polosyntetické opioidy
- syntetické opioidy

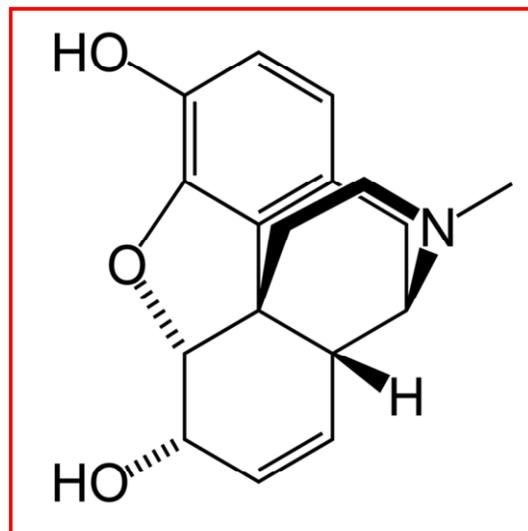


## Opioidní receptory – MOR, DOR, KOR, NOP-OR

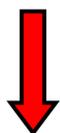


Waldhoer a kol., 2004. *Annu Rev Biochem* **73**, 953-990.

*Opiové alkaloidy* → **morfium**



*Desetidenní expozice potkanů samců kmene **Wistar**:*

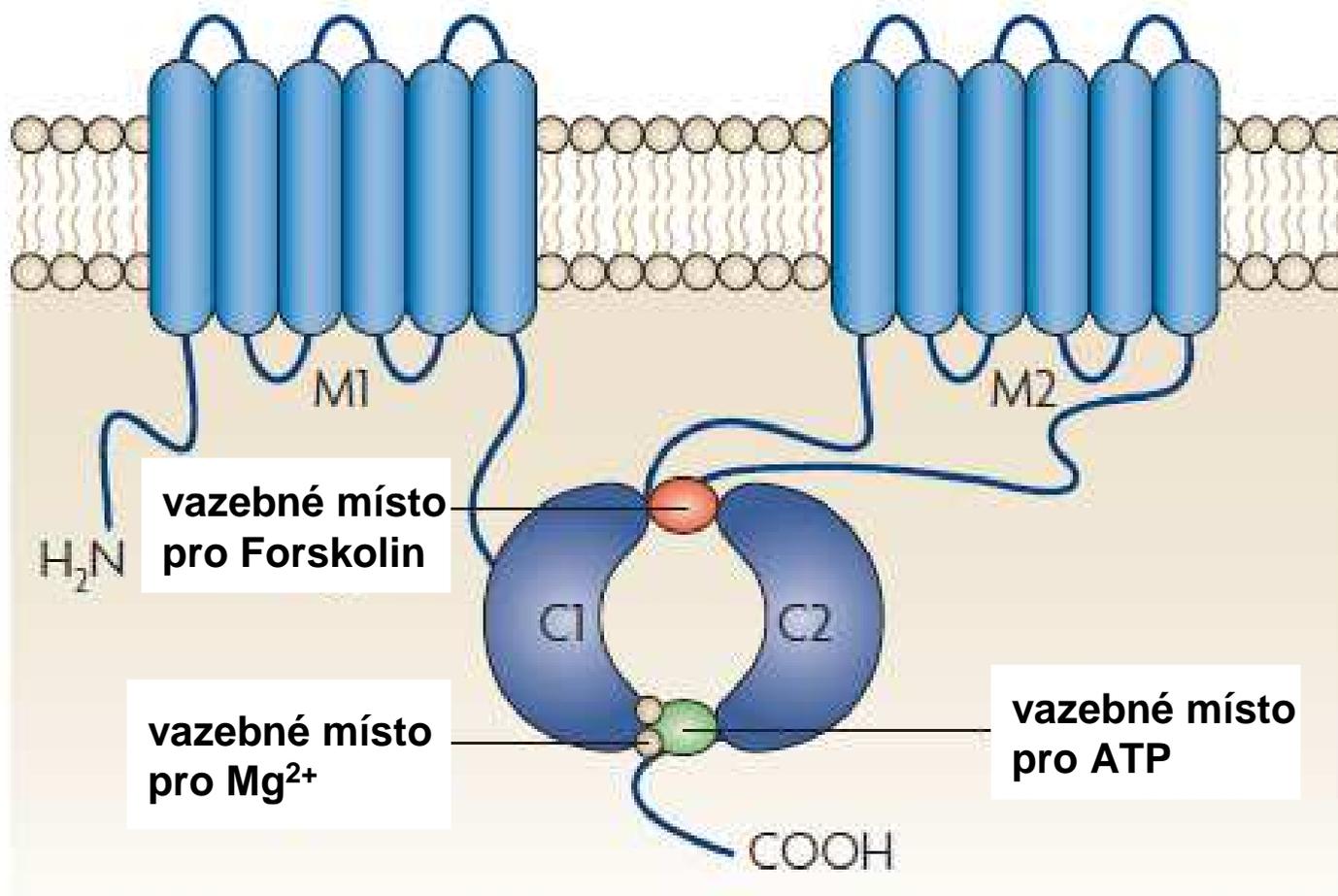


10 mg/kg (den 1. a 2.)  
15 mg/kg (den 3. a 4.)  
20 mg/kg (den 5. a 6.)  
30 mg/kg (den 7. a 8.)  
40 mg/kg (den 9.)  
50 mg/kg (den 10.)



**kontroly:** 0,9% NaCl

## Adenylylcykláza (AC)



Převzato a upraveno podle Pierre a kol., 2009, *Nat Rev Drug Discov* **8**, 321-335.

# Regulace AC

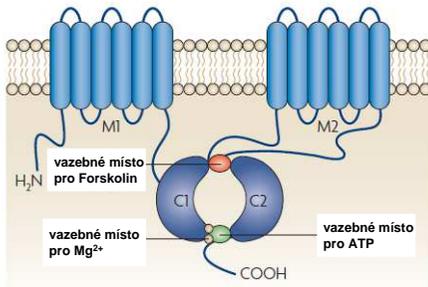
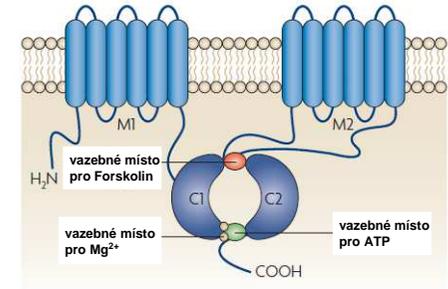
AC I, AC III, AC VIII

AC II, AC IV, AC VII

AC V, AC VI

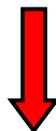
AC IX

solubilní AC



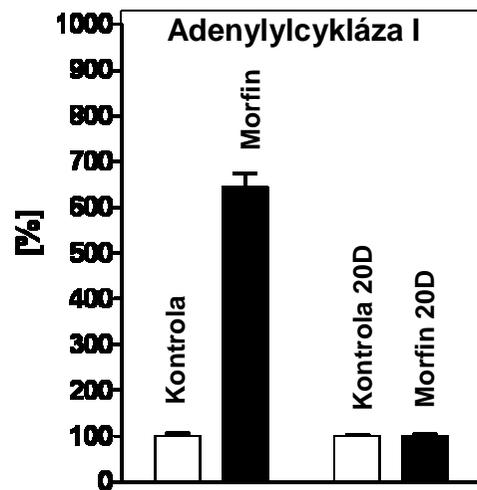
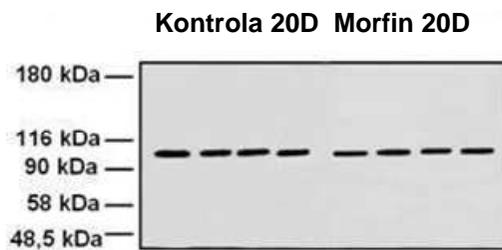
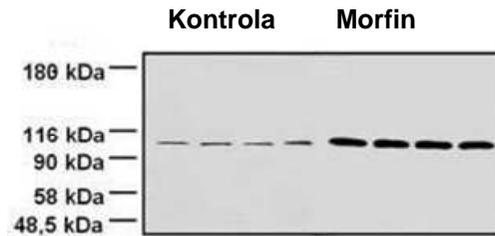
## ***Cíle dizertační práce:***

- stanovení obsahu **všech izoform adenylcyklázy (AC I-IX)** ve frakcích PM (morfium/kontrola, usmrceni **24 hodin** po aplikaci poslední dávky morfia)
- provedení stejné analýzy ve vzorcích PM izolovaných z potkanů, kteří byli vystaveni stejné expozici morfia, ale **byli usmrceni 20 dní po podání poslední dávky**
- stanovení obsahu **všech hlavních tříd G proteinů a Na, K-ATPázy**

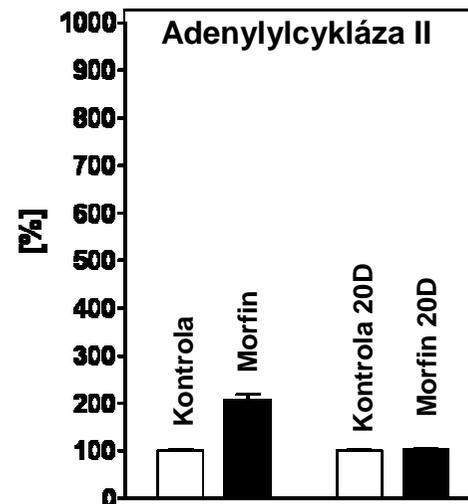
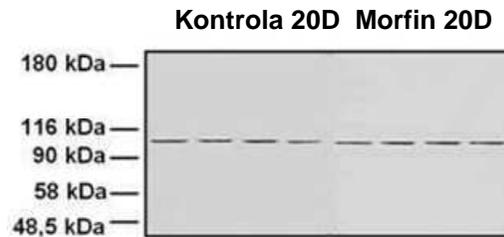
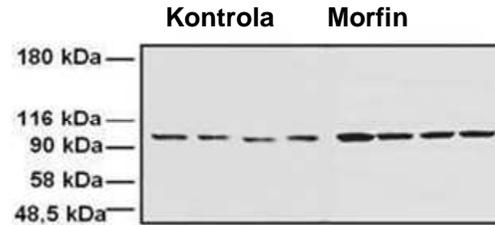


- **detekce kvantitativních změn** indukovaných morfiem ve frakcích **PNS a PM**
- **proteomická analýza** frakcí **PNS a PM**
- detekce a **proteomická analýza Gβ** podjednotek

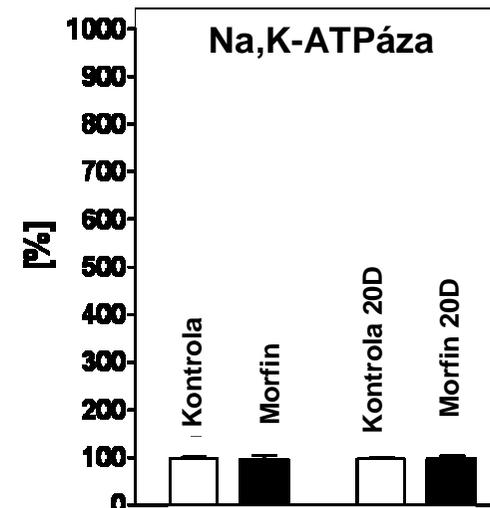
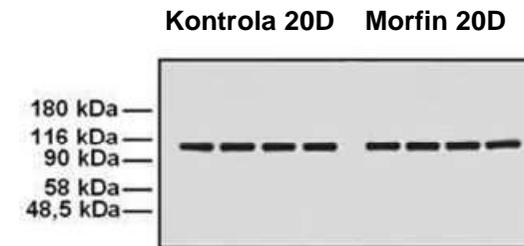
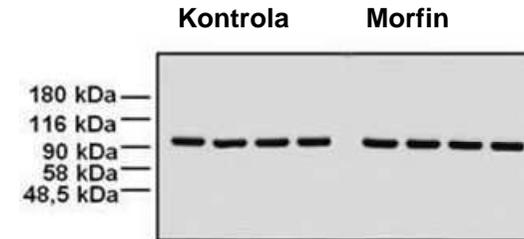
## Adenylylcykláza I



## Adenylylcykláza II

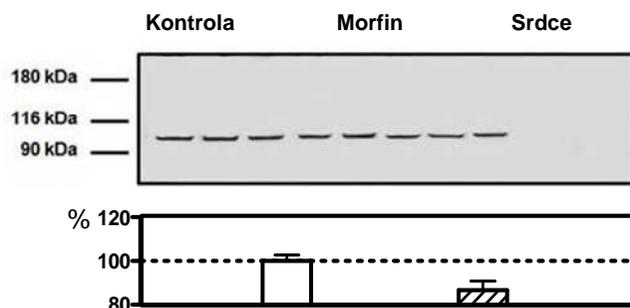


## Na, K-ATPáza

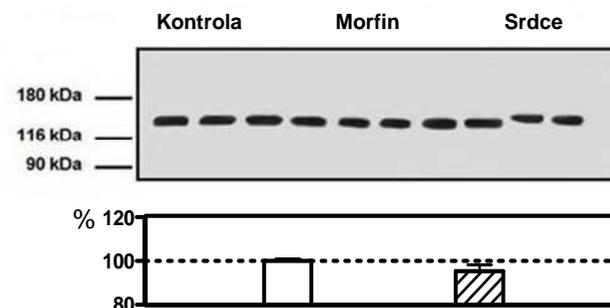


**Ujcikova, H., Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Svoboda, P. (2011). Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *BBA General Subjects* 1810: 1220 -1229.**

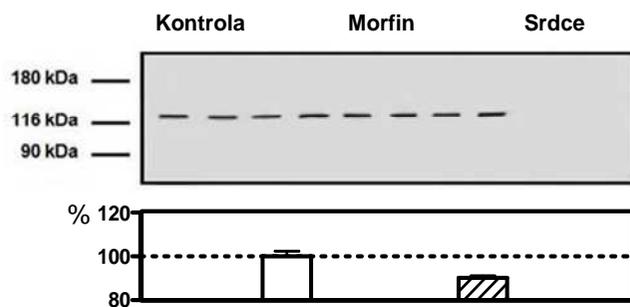
### Adenylylcykláza III



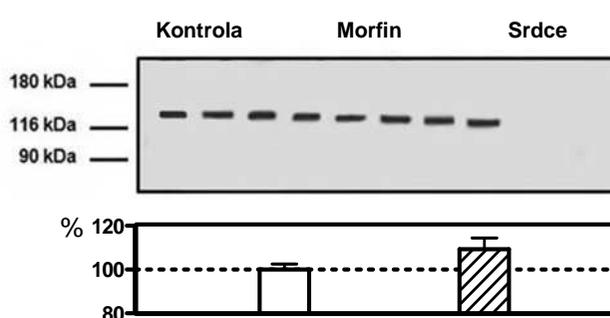
### Adenylylcykláza VII



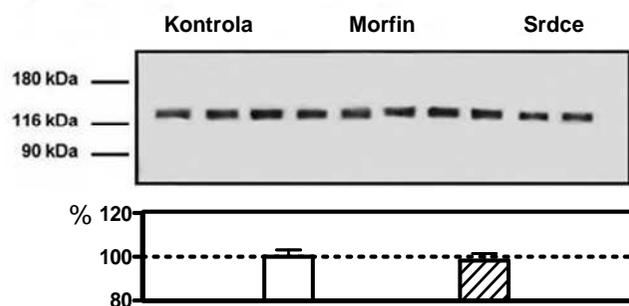
### Adenylylcykláza IV



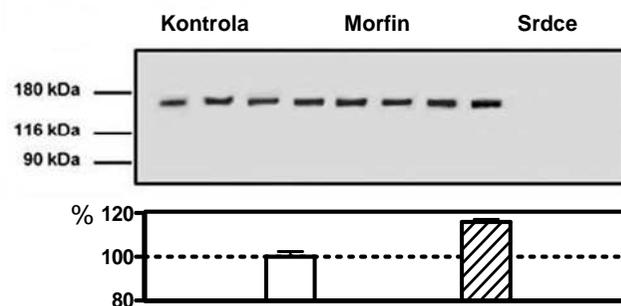
### Adenylylcykláza VIII



### Adenylylcykláza V/VI

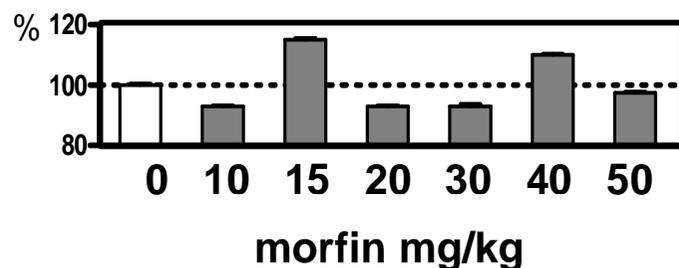
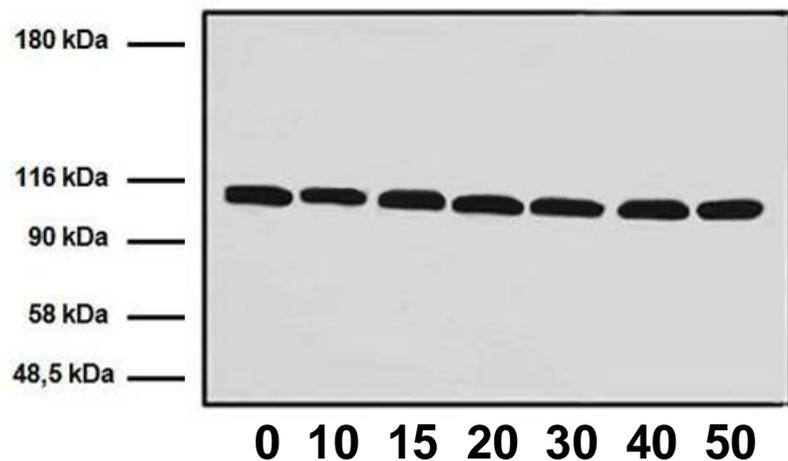


### Adenylylcykláza IX

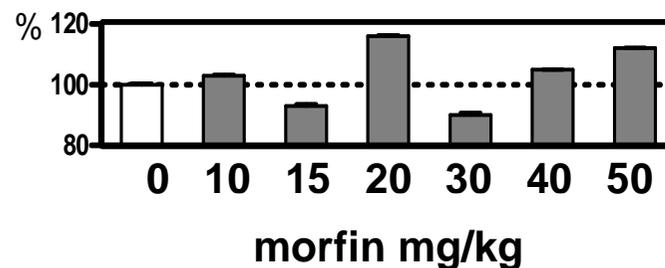
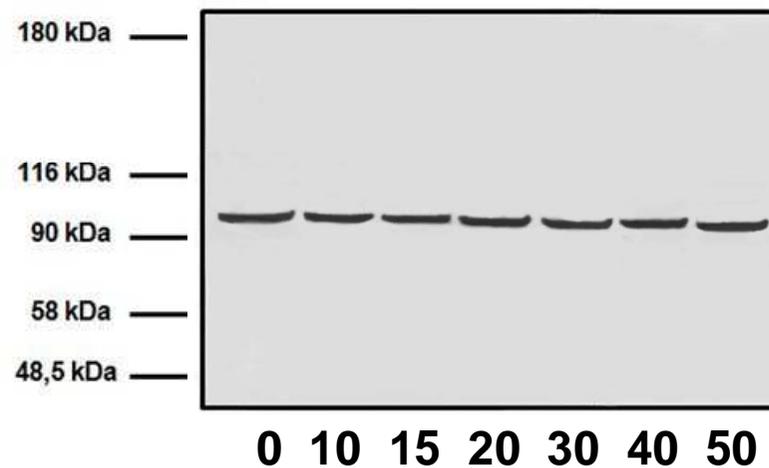


**Ujcikova, H., Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Svoboda, P. (2011). Up-regulation of adenylylcycluses I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *BBA General Subjects* 1810: 1220 -1229.**

## Adenylylcykláza I

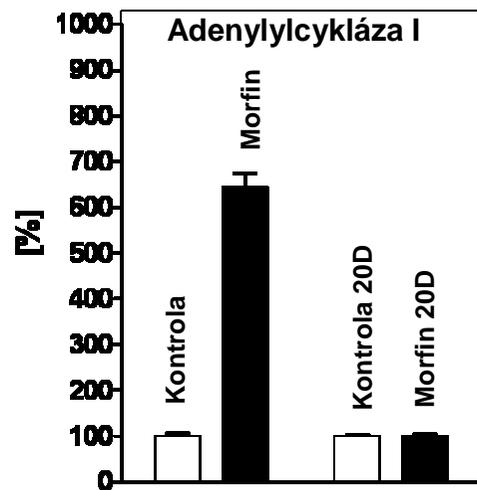
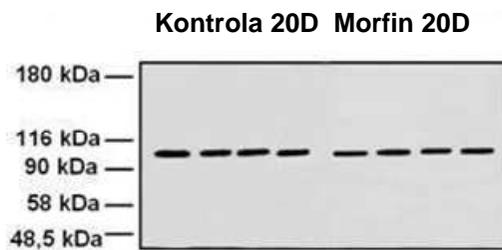
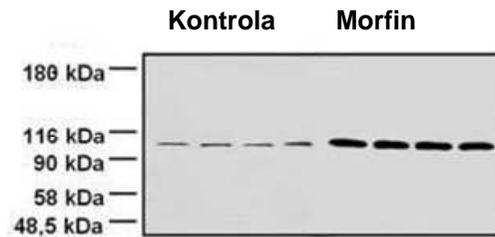


## Adenylylcykláza II

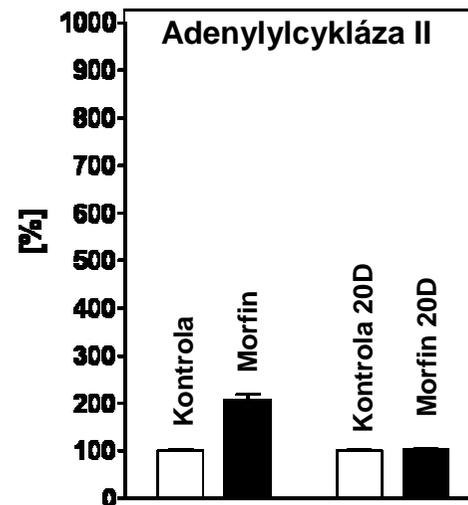
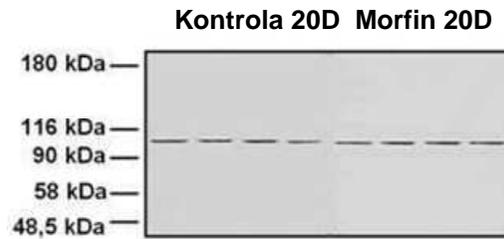


**Ujcikova, H.,** Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Svoboda, P. (2011). Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *BBA General Subjects* **1810**: 1220 -1229.

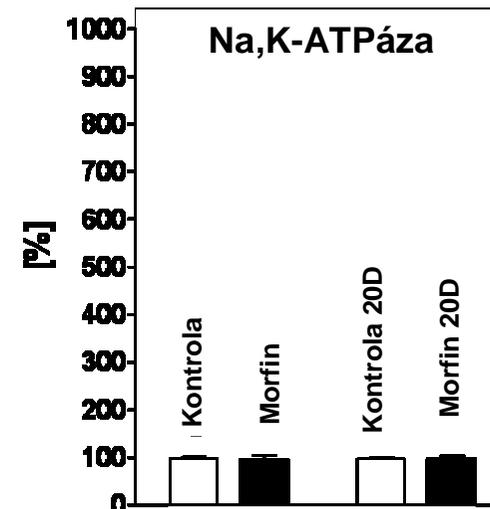
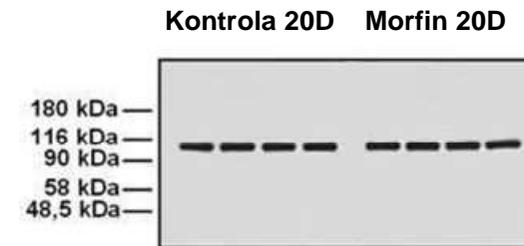
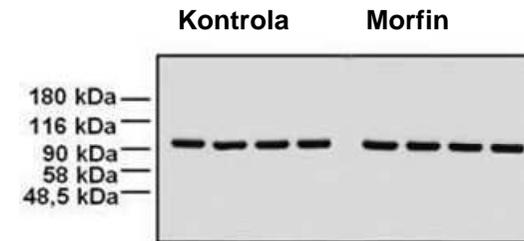
## Adenylylcykláza I



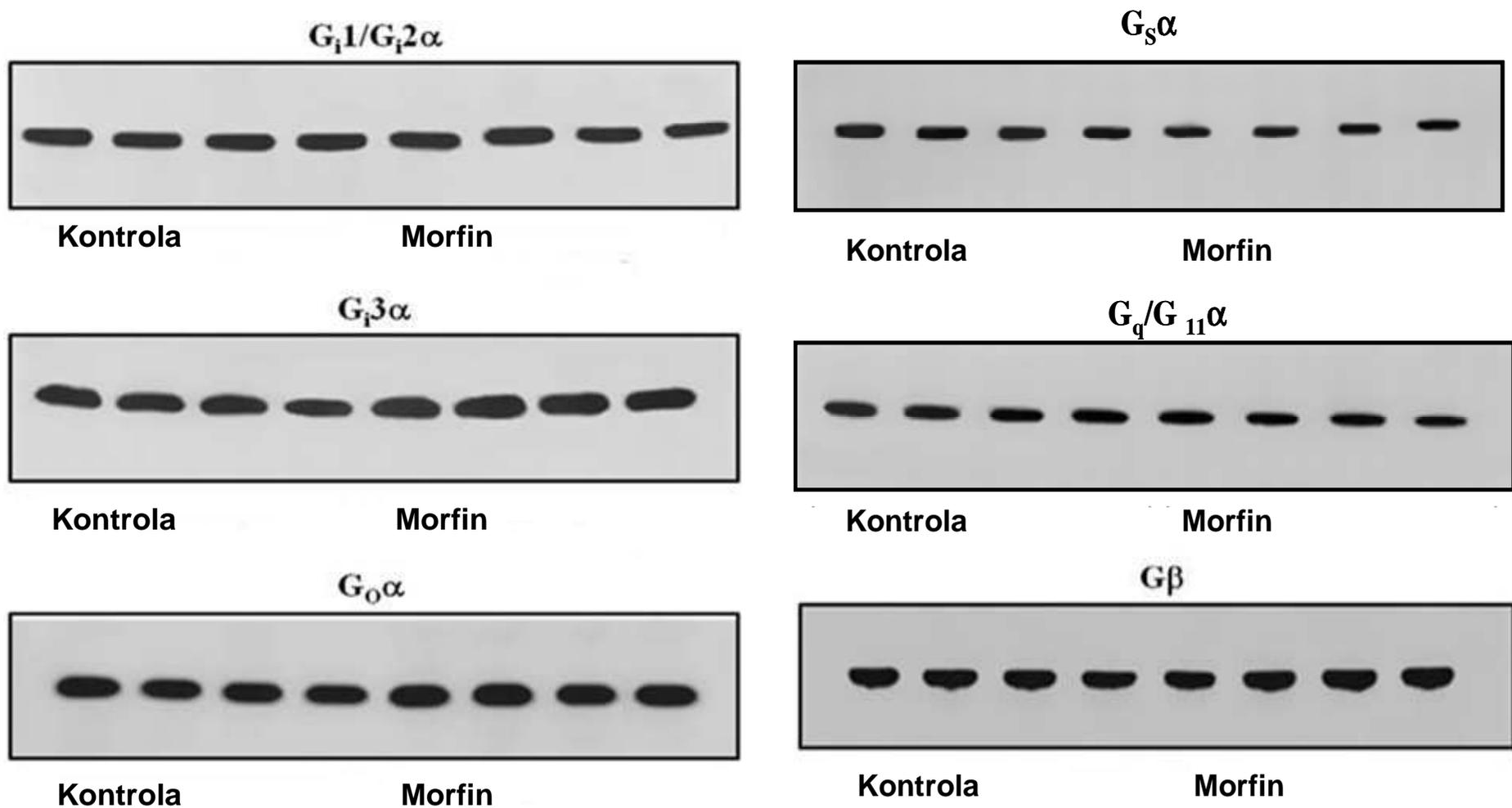
## Adenylylcykláza II



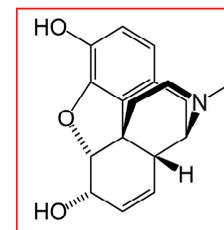
## Na, K-ATPáza



**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. *BBA General Subjects* 1810: 1220 -1229.**

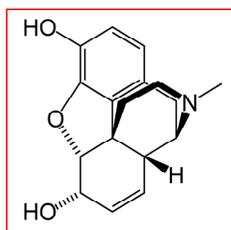


**Ujcikova, H.**, Dlouha, K., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Kagan, D., Svoboda, P. (2011). Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *BBA General Subjects* **1810**: 1220 -1229.



## ***Shrnutí první části dizertační práce:***

- byl prokázán **specifický vzestup AC I (8x) a AC II (2,5x)** ve vzorcích PM izolovaných z potkanů usmrcených **24 hodin** po aplikaci poslední dávky morfia (10-50 mg/kg, 10 dní)
- hladina obsahu **AC III-IX se nezměnila**
- **krátkodobá expozice** zvířat morfiu **neměla vliv** na změnu AC I a AC II
- specifický **vzestup AC I a AC II** se projevil jako **plně reverzibilní**
- hladina obsahu **všech hlavních tříd G proteinů a Na, K-ATPázy se nezměnila**



# 2D elektroforéza

strip

IF



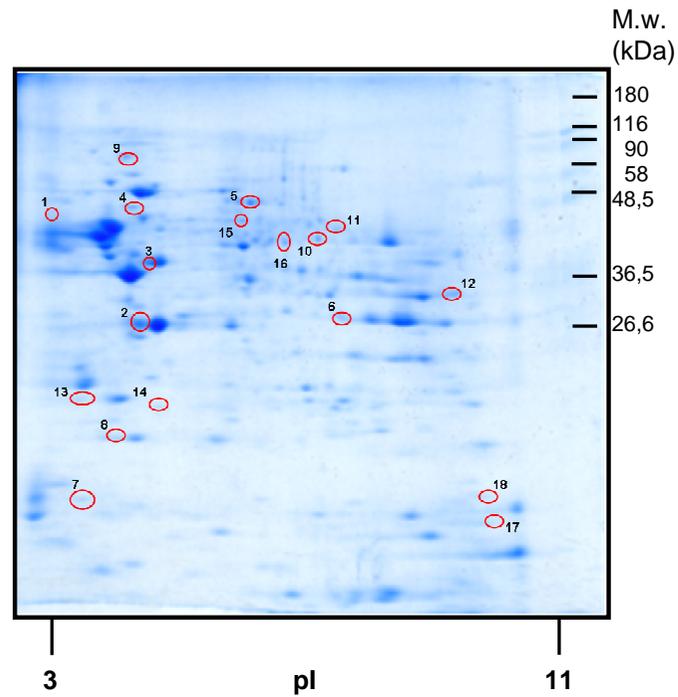
alkylace

redukce

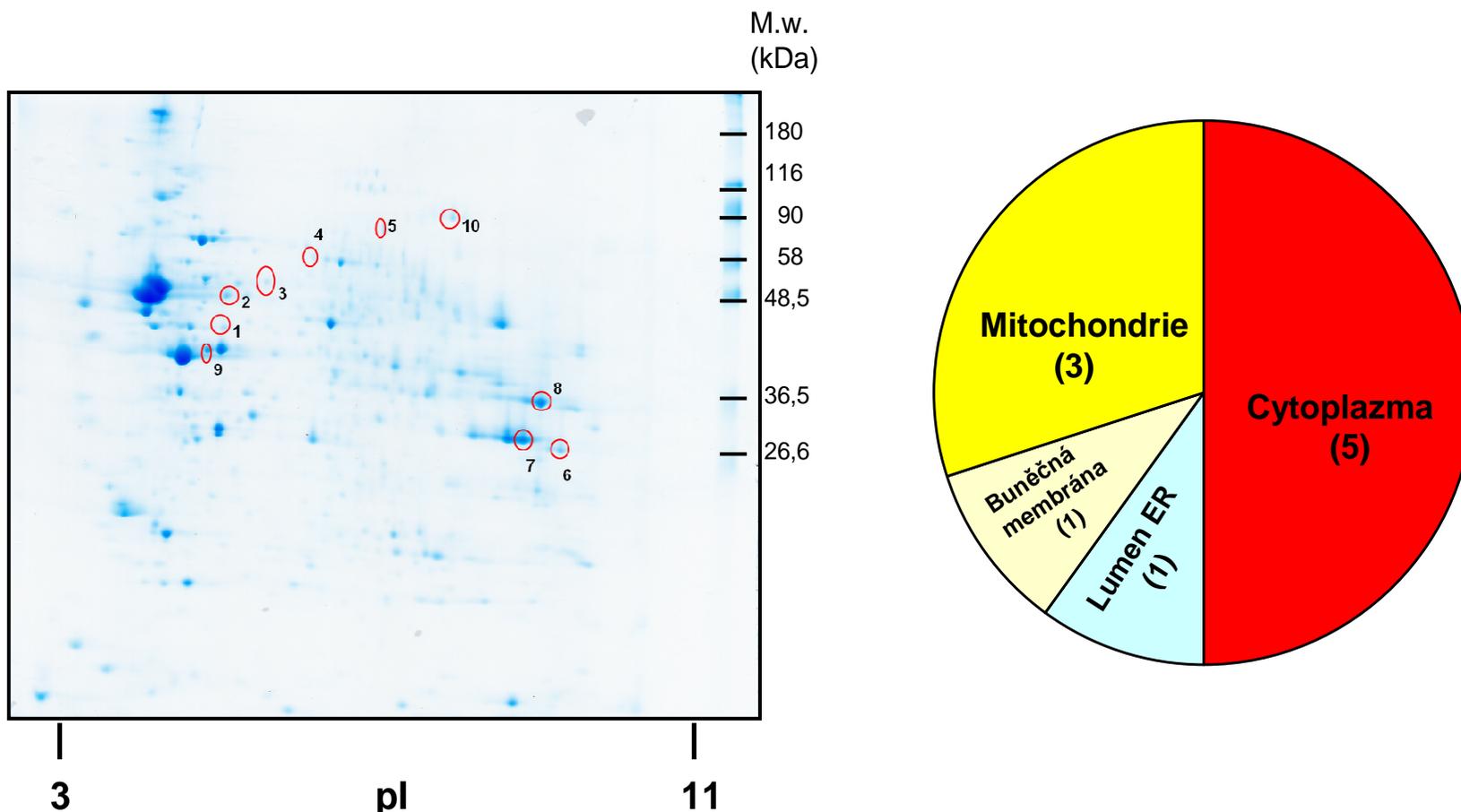
SDS-PAGE

vizualizace

analýza obrazu,  
MS analýza



## Identifikace proteinů PNS – analýza pomocí *MALDI-TOF MS/MS*



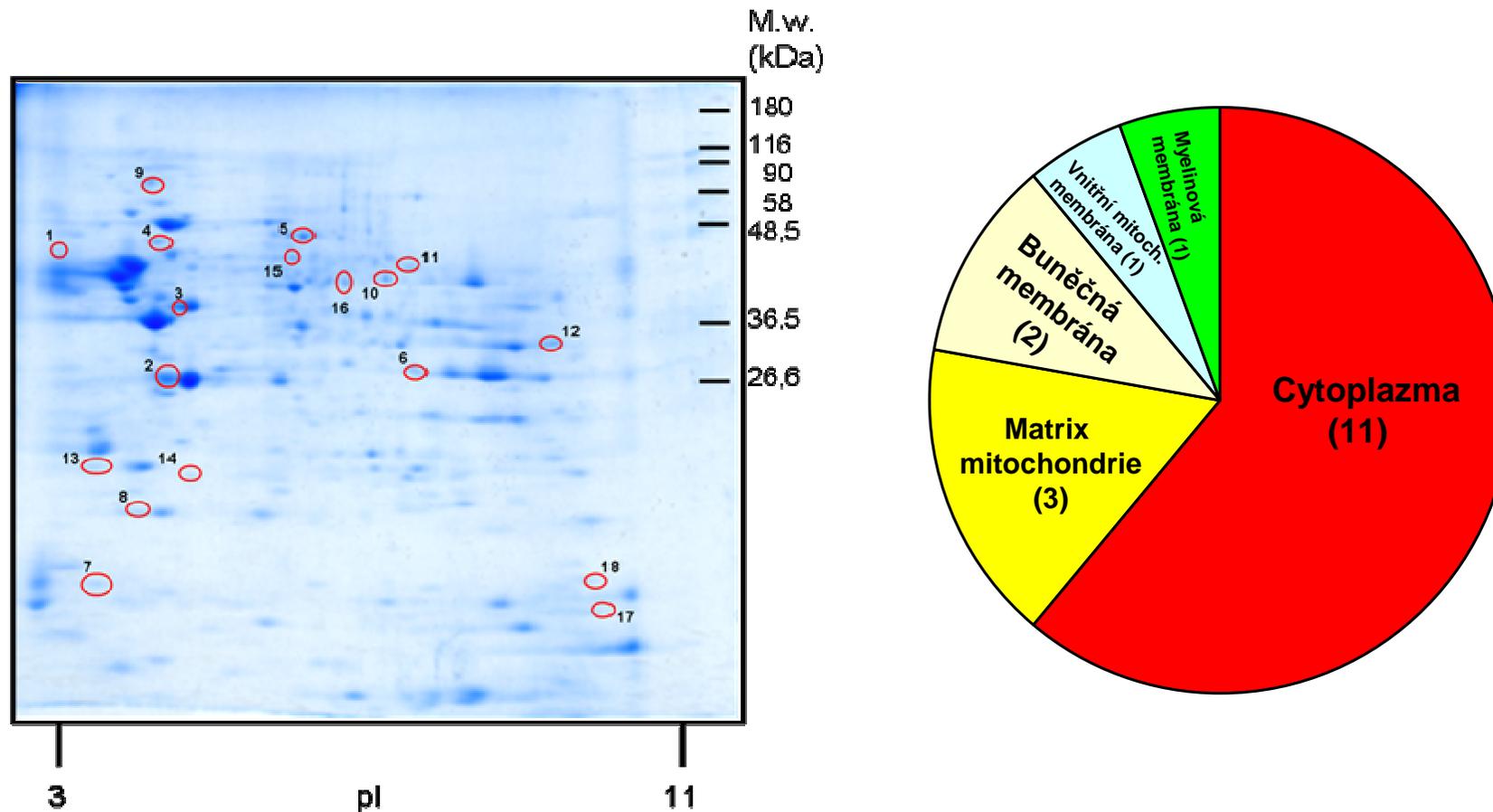
**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Sci* **12**:11.

## Identifikace proteinů PNS – analýza pomocí *MALDI-TOF MS/MS*

Spot	Označení proteinu	Název proteinu	Násobek změny
1	gi 148747414	guanin deamináza	↑2,5
2	gi 17105370	V-ATPáza, mozková izoforma	↑2,6
3	gi 1352384	protein disulfid-izomeráza A3	↑3,4
4	gi 40254595	dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2	↑3,6
5	gi 149054470	<i>N</i> -etylmaleimid senzitivní fúzní protein, izoforma CRA_a	↑2,0
6	gi 42476181	malát dehydrogenáza, mitochondriální prekurzor	↑1,4
7	gi 62653546	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	↑1,6
8	gi 202837	aldoláza A	↑1,3
9	gi 31542401	kreatin kináza typ-B	↓0,86
10	gi 40538860	akonitát hydratáza, mitochondriální prekurzor	↑1,26

**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. 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.

## Identifikace proteinů PM - analýza pomocí LC-MS/MS



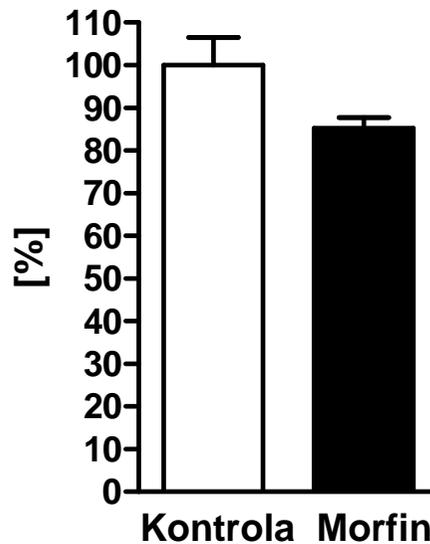
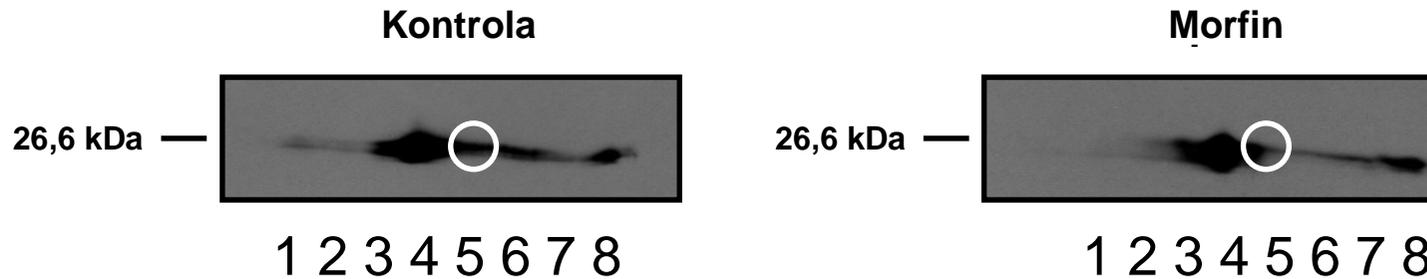
**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Sci* **12**:11.

## Identifikace proteinů PM - analýza pomocí LC-MS/MS

Spot	Označení proteinu	Název proteinu	Násobek změny
1	BASP1_RAT	membránový neuronální signální protein 1	↓2,1
2	GBB1_RAT	G beta podjednotka-1	↓2,0
3	KCRB_RAT	kreatin kináza typ-B	↓2,6
4	AINX_RAT	alfa-internexin	↑5,2
5	DPYL2_RAT	dihydropyrimidinázový příbuzný protein 2	↑4,9
6	SIRT2_RAT	NAD-dependentní deacetyláza sirtuin-2	↑2,5
7	SYUA_RAT	alfa-synuklein	↑2,0
8	PRDX2_RAT	peroxiredoxin-2	↑2,2
9	TERA_RAT	tranzitorní ATPáza endoplazmatického retikula	↑2,1
10	DHE3_RAT	glutamát dehydrogenáza 1, mitochondriální	↑2,7
11	SCOT1_RAT	sukcynyl-CoA:3-ketoacyl-koenzym A transferáza 1, mitochondriální	↑2,2
12	AATM_RAT	aspartát aminotransferáza, mitochondriální	↓2,2
13	UCHL1_RAT	ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza L1	↓2,0
14	PHB_RAT	prohibitin	↑2,2
15	COR1A_RAT	koronin-1A	↓5,4
16	SEP11_RAT	septin-11	↑2,2
17	MBP_RAT	základní myelinový protein S	↓2,5
18	RL12_RAT	60S ribozomální protein L12	↑2,7

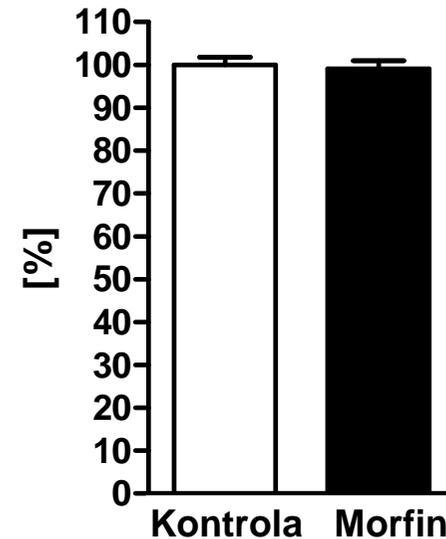
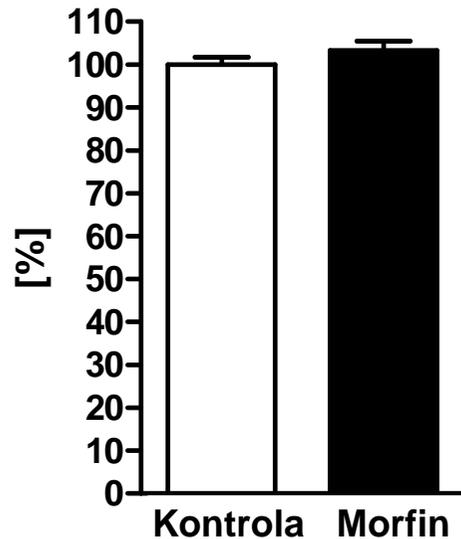
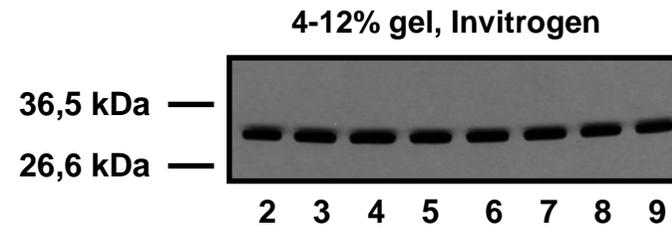
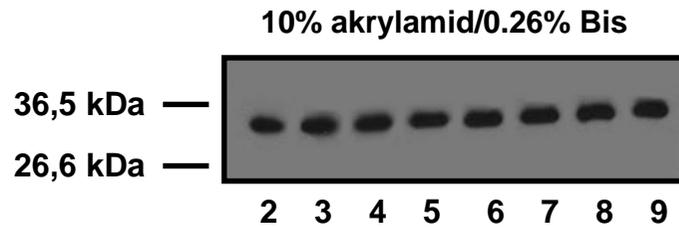
**Ujcikova, H.,** Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Sci* **12**:11.

# Gβ podjednotka

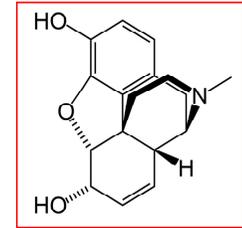


**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Sci* 12:11.

# G $\beta$ podjednotka

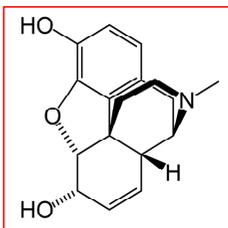


**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. Proteomic analysis of post-nuclear supernatant fraction and Percoll-purified membranes prepared from brain cortex of rats exposed to increasing doses of morphine. *Proteome Sci* **12**:11.

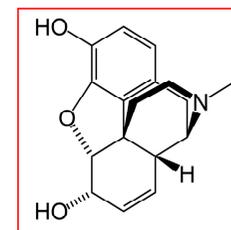


### ***Shrnutí druhé části dizertační práce:***

- analýza **10 proteinů PNS** identifikovala vzestup bílkovin funkčně spojených především s **oxidativním stresem, apoptózou a změnou energetického metabolismu**
- analýza **18 proteinů** frakcí **PM** identifikovala jediného zástupce **GPCR**-signálních kaskád - **Gβ podjednotku (↓2x)**
- byla stanovena specifická *aktivní* část **Gβ**, která byla změněna vlivem morfia, celkový signál klesl pouze nepatrně (1,2x)

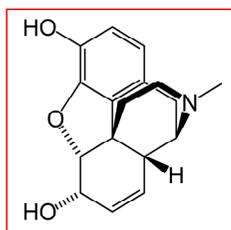


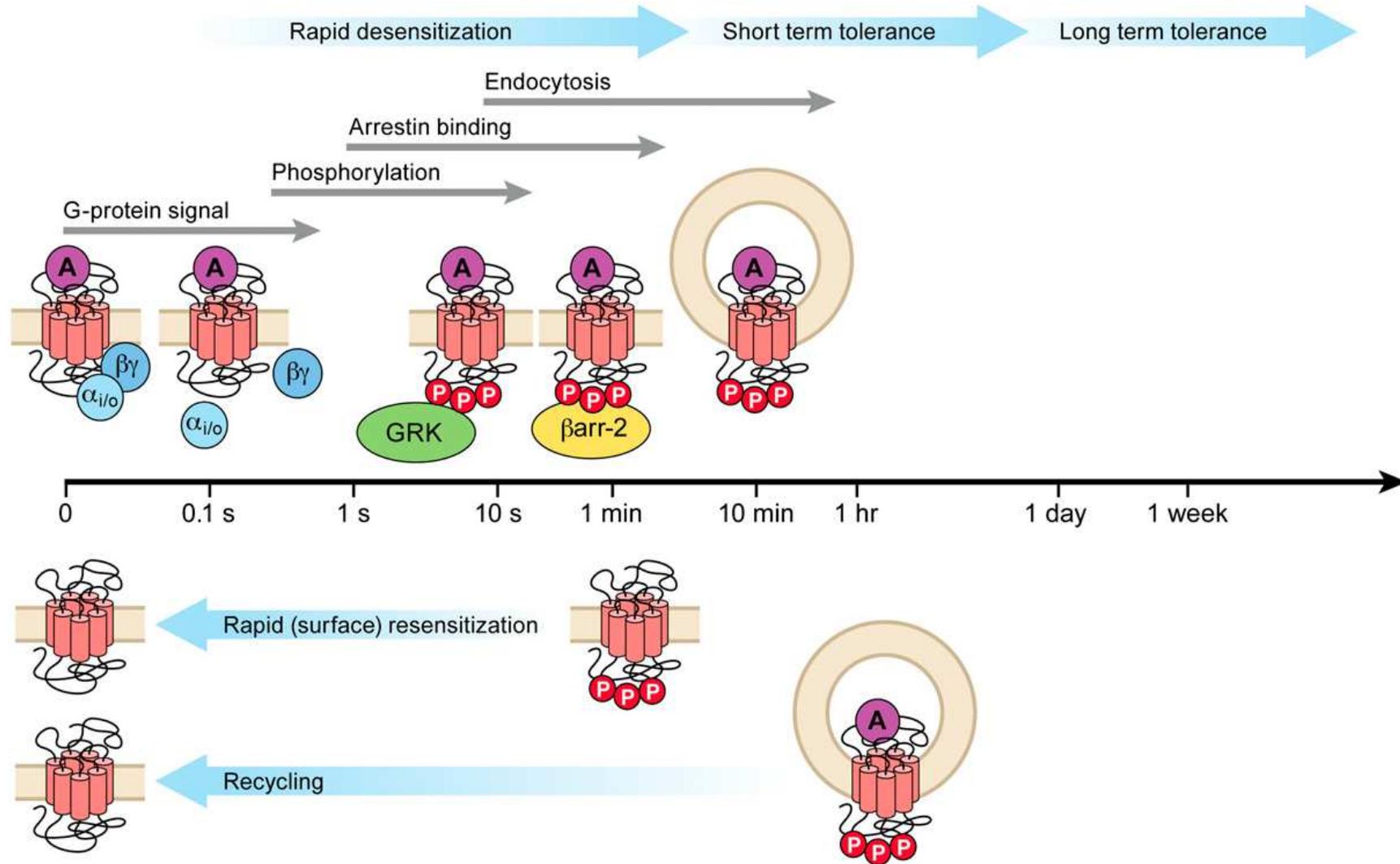
***Děkuji Vám za pozornost.***



10 mg/kg (den 1. a 2.)  
20 mg/kg (den 3. a 4.)  
40 mg/kg (den 5. a 6.)  
80 mg/kg (den 7. a 8.)  
160 mg/kg (den 9. a 10.)  
320 mg/kg (den 11. a 12.)

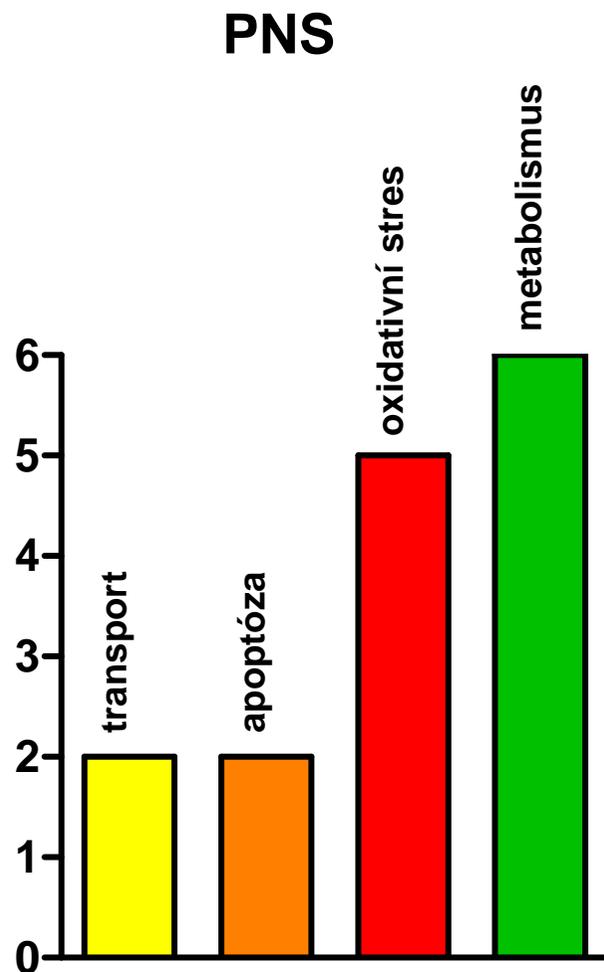
Převzato podle Sim a kol., 1996, *J Neurosci* **16**, 2684-2692.





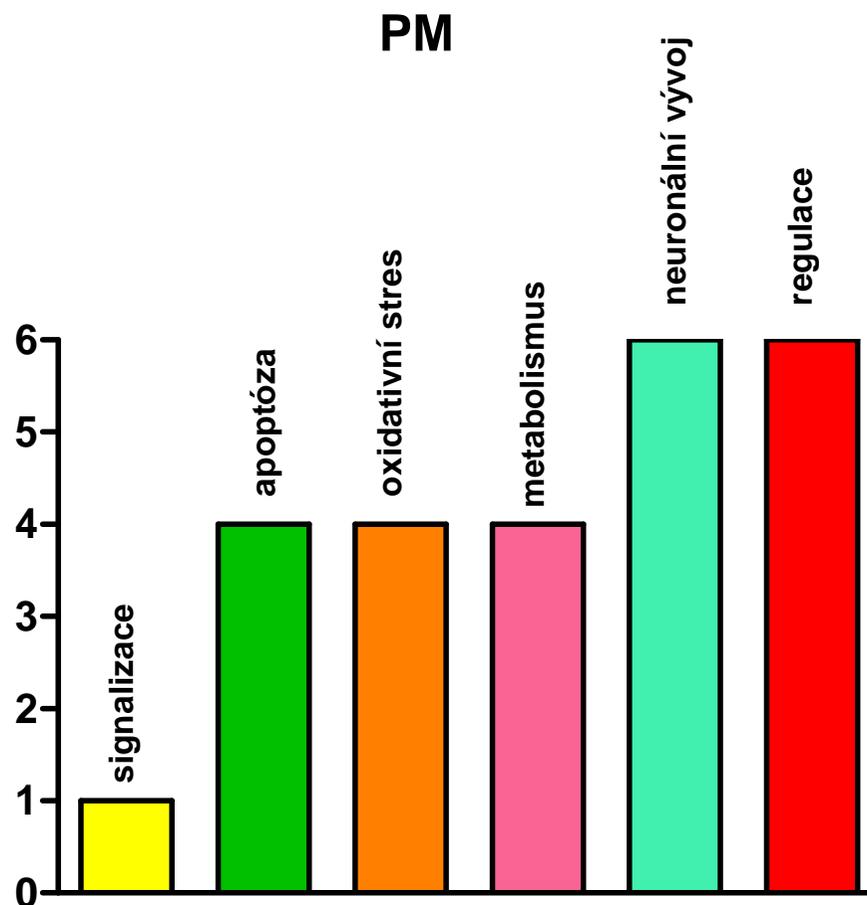
Převzato a upraveno podle Williams a kol., 2013, *Pharmacol Rev* **65**, 223-254.

## Identifikace proteinů PNS – analýza pomocí *MALDI-TOF MS/MS*



**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. 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.

## Identifikace proteinů PM - analýza pomocí LC-MS/MS



**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. 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.

## Identifikace G $\beta$ podjednotek pomocí LC MS/MS

Spot	Označení proteinu	Název proteinu	Skóre proteinu	Počet přiřaz. peptidů	[%] Pokrytí sekvence	MH <sup>a</sup> (kDa)	pI <sup>b</sup>
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

**Ujcikova, H.**, Eckhardt, A., Kagan, D., Roubalova, L., Svoboda, P. 2014. 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.