

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Fyziologie živočichů



Bc. Anna Hronová

Zkoumání změn v epigenetických modifikacích v mozku
potkana vyvolaných působením morfinu

Investigation of changes in epigenetic modifications in rat
brain induced by morphine treatment

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2024

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho pomoc, ochotu a trpělivost při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Zuzaně Čočkové, PhD., která mě zasvětila do metody izolace nukleových kyselin a proteinů. Velký dík patří také Mgr. Elišce Přítulové, Mgr. Daniele Novákové a Mgr. Monice Tmějové za veškerou pomoc a bezbřehou podporu. Stejně tak děkuji celému kolektivu naší laboratoře za skvělé pracovní prostředí a přátelskou atmosféru. V neposlední řadě děkuji své rodině a kamarádům za pomoc a velkou podporu při sepisování této práce.

Tato práce byla podpořena grantem GAUK 377821.

Abstrakt

Tato práce se zabývala vlivem různě dlouhých abstinčních období na epitranskriptomickou modifikaci m⁶A a enzymy účastnící se této modifikace, stejně jako na transkripční faktory v mozku potkanů závislých na morfinu. Použité metody zahrnovaly využití kolorimetrického kitu pro určení hladin m⁶A a Western blot metodu pro kvantifikaci hladin enzymů a transkripčních faktorů. Výsledky ukázaly, že různě dlouhé úseky morfinové abstinence neměly významný vliv na m⁶A modifikaci, což naznačuje, že tato dráha pravděpodobně nebyla ovlivněna morfinovou abstinencí. Nicméně byly pozorovány signifikantní změny v hladinách enzymů, které jsou zapojené do regulace m⁶A, které byly místně a časově specifické, ale bez jasného trendu. Zkoumání transkripčních regulátorů Δ FosB a MeCP2 taktéž odhalilo signifikantní změny jen v některých částech mozku a v určitých časech, ale bez jasného trendu ve změnách hladin. Výsledkem této práce je, že dynamika hladin transkripčních regulátorů, N⁶-metyl-adenosinu a enzymů, které se účastní m⁶A modifikace je místně a časově specifické a otevírá nové otázky ohledně mechanismů, které řídí neurobiologické pochody během abstinčního období.

Klíčová slova: Morfin, potkan, mozek, epigenetické modifikace

Abstract

This study addressed the impact of varying lengths of abstinence periods on the epitranscriptomic modification of m⁶A and the enzymes involved in this modification as well as on transcription factors in the brains of morphine-dependent rats. The methods used included a colorimetric kit to determine m⁶A levels and Western blotting to quantify the levels of enzymes and transcription factors. The results showed that different lengths of morphine abstinence did not have a significant effect on m⁶A modification, suggesting that this pathway was likely not influenced by morphine abstinence. However, significant changes were observed in the levels of enzymes involved in the regulation of m⁶A, which were localized and time-specific, without a clear trend. Examination of transcriptional regulators Δ FosB and MeCP2 also revealed significant changes only in certain parts of the brain and at specific times, but without a clear trend in changes in levels. The outcome of this study is that the dynamics of transcriptional regulators, N⁶-methyl-adenosine, and enzymes involved in m⁶A modification are localized and time-specific, opening new questions regarding the mechanisms that govern neurobiological processes during the abstinence period.

Keywords: Morphine, rat, brain, epigenetic modifications

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
Úvod	5
1 Literární přehled	6
1.1 Drogová závislost a abstinenční syndrom	6
1.2 Základní vlastnosti morfinu	6
1.2.1 Mozkové struktury zapojené do závislosti a abstinenčního syndromu	7
1.2.2 Molekulární mechanismus působení morfinu	8
1.2.3 Morfinový abstinenční syndrom	11
1.3 Epigenetické a epitranskriptomické modifikace	13
1.3.1 Modifikace histonů	14
1.3.2 Metylace DNA	16
1.3.3 Interakce mezi epigenetickými modulacemi	18
1.3.4 m ⁶ A metylace RNA	18
1.4 Epigenetické a epitranskriptomické modifikace a drogová závislost	19
1.4.1 Acetylace histonů	20
1.4.2 Metylace histonů	20
1.4.3 DNA metylace	20
1.4.4 Transkripční faktory	21
1.4.5 Metylace RNA m ⁶ A	22
1.4.6 Vliv morfinové abstinence na epigenetické modifikace . . .	22
2 Cíle práce	23
3 Materiál a metody	24
3.1 Laboratorní zvířata	24
3.2 Příprava vzorků ze tkání	24
3.3 Izolace RNA, DNA a proteinů pomocí TRIzol® Reagent	25
3.3.1 Precipitace RNA	26
3.3.2 Precipitace DNA	26
3.3.3 Precipitace proteinů	27
3.4 SDS-PAGE elektroforéza	29
3.5 Western blot	31
3.6 Stanovení hladin N ⁶ -metyl-adenosinu	32
3.7 Statistická analýza	33
4 Výsledky	34
4.1 Hladiny N ⁶ -metyl-adenosinu	34
4.2 Vliv morfinové abstinence na expresi enzymů m ⁶ A dráhy	35
4.2.1 Expresce METTL3 v mozkových strukturách	36
4.2.2 Expresce FTO v mozkových strukturách	38
4.2.3 Expresce ALKBH5 v mozkových strukturách	41
4.2.4 Expresce YTHDF1 v mozkových strukturách	45
4.3 Vliv morfinové abstinence na expresi transkripčních faktorů	47

4.3.1	Exprese Δ FosB v mozkových strukturách	48
4.3.2	Exprese MeCP2 v mozkových strukturách	50
5	Diskuse	54
	Závěr	60
	Seznam použité literatury	61

Seznam použitých zkratek

5hmC	5-hydroxymetylcytosin
5mC	5-metylcytosin
AC	adenylátcykláza
AID/APOBEC	angl. <i>activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex</i>
ALKBH5	angl. <i>alkB homolog 5</i>
APS	persulfát amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BER	angl. <i>base excision repair</i>
BLA	bazolaterální <i>amygdala</i>
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBL1	angl. <i>Casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1)</i>
CBP	angl. <i>CREB-binding protein</i>
CeA	centrální jádro <i>amygdaly</i>
CG	cytosin-guanin
CNS	centrální nervová soustava
CPP	podmíněná preference místa
CRB	<i>cerebellum</i> ; mozeček
CREB	vazebný protein pro cAMP responzivní element
DA	dopamin
DAG	diacylglycerol
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	kyselina deoxyribonukleová
Dnmt	DNA metyltransferáza
DOR	δ opioidní receptor
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ERK	angl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FTO	angl. <i>fat mass and obesity-associated protein</i>
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GIRK	draslíkové kanály ovládané G-proteinem
GNAT	angl. <i>GCN5-related N-acetyltransferas</i>
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
G-protein	GTP vázající protein
GDP	guanosindifosfát
GRK	kináza receptorů spřažených s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HAT	histonová acetyltransferáza
HDAC	histonová deacetyláza
HDM	histonová demetyláza
HMT	histonová metyltransferáza
HIPP	hipokampus

HMT	histonová metyltransferáza
i.p.	intraperitoneální podání
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
K	lysin
KOR	κ opioidní receptor
LC	<i>locus coeruleus</i>
LTP	dlouhodobá potenciace
MAP	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MBD	angl. <i>methyl-CpG-binding domain</i>
MeCP2	angl. <i>methyl CpG-binding protein 2</i>
METTL3	angl. <i>methyltransferase Like 3</i>
METTL14	angl. <i>methyltransferase Like 14</i>
MOR	μ opioidní receptor
m ⁶ A	N ⁶ -metyl-adenosin
NE	noradrenalin
NAc	<i>nucleus accumbens</i>
OR	opioindní receptor
PBS	fyziologický roztok
PFC	prefrontální mozková kůra
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PLC	fosfolipáza C
PRL	prelimbická kůra
PVT	paraventrikulární jádro
RNA	kyselina ribonukleová
SAM	S-adenosylmethionin
SDS	dodecylsírán sodný
STD _i	interní standard
STR	<i>striatum</i>
TBS	Tris-pufrovaný roztok
TET	angl. <i>ten-eleven translocation proteins</i>
TF	transkripční faktor
TH	tyrozin hydroxyláza
TRD	angl. <i>transcriptional repression domain</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
VTA	<i>area ventralis tegmentalis</i>
WB	Western blot
WTAP	angl. <i>Wilms Tumor 1 Associated Protein</i>
YTHDF	protein obsahující YTH doménu
Zc3h13	angl. <i>zinc finger CCCH domain-containing protein 13</i>

Úvod

Závislost na návykových látkách je s lidstvem spjata již odpradávná. Zvláště pak závislost na opiátech, jako je morfin, představuje dlouhodobý a komplexní problém s významnými dopady jak na jedince, tak na společnost.

Morfin je přírodní alkaloid, který se stále hojně využívá v klinické praxi pro své unikátní analgetické účinky. Nicméně jeho dlouhodobé užívání vede k závislosti a toleranci. Ukončení užívání morfinu je spojeno s obdobím abstinence, které je doprovázeno abstinenciími příznaky, které mohou být pro závislého jedince velmi obtížné. Tento stav je často klíčovým momentem ve snaze překonat závislost a začít život bez drogy.

Bylo publikováno již mnoho prací o působení morfinu na molekulární úrovni. V posledních letech je na vzestupu výzkum epigenetických modifikací, které jsou spojené s akutním či chronickým užíváním drog. Tyto výzkumy ukazují, že mnohé modifikace histonů či metylace DNA mohou být zapojeny do procesu drogové závislosti. Práce, které zkoumají epigenetické a epitranskriptomické mechanismy v období abstinence, jsou však relativně vzácné.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem různě dlouhých období abstinence na epitranskriptomickou modifikaci m⁶A a enzymy, které tuto dráhu regulují. Stejně jako vlivem morfinové abstinence na expresi transkripčních faktorů u potkanů, kterým byl po dobu deseti dnů podáván morfin a následně procházeli různě dlouhými intervaly abstinence. Cílem této práce je poskytnout nové poznatky o epitranskriptomické modifikaci v období abstinence a roli transkripčních faktorů v této zásadní periodě závislosti.

1. Literární přehled

1.1 Drogová závislost a abstinenční syndrom

Návykové látky jsou spjaty s lidstvem již po staletí. Přesto mechanismy, které vedou k závislosti a některé jedince činí zvláště náchylné k návyku, stále zůstávají částečně neodkryté. Pojmy, které se neoddělitelně pojí s touto problematikou, jsou zejména závislost, tolerance, abstinence a abstinenční syndrom.

Drogová závislost je definována jako léčitelná, chronická nemoc zahrnující složité interakce mezi mozkovými obvody, genetikou a epigenetikou, prostředím a životními zkušenostmi jednotlivce. Je předpokládána jako výsledek adaptivních změn, které se vyvíjejí v tkáních těla po dlouhodobém užívání. Závislé jedince užívající tyto látky provází chování, které se stává nutkavým a často pokračuje i přes škodlivé následky (Liu and Li, 2018; Goodman, 1990). Tento termín by měl splňovat alespoň následujících pět kritérií:

1. Časté myšlení na drogu
2. Užívání drogy ve větší rozsahu, než je plánováno
3. Opakované pokusy o ovládnutí chování
4. Ztráta zálib
5. Pokračování i přes vědomí nepříznivého účinku na organismus

Tolerance představuje snížený účinek látky při opakovaném užívání a konstantní dávce vyžadující zvýšení dávky k udržení původní úrovně účinnosti (Justinova et al., 2009).

Za abstinenci je obecně považována zdrženlivost nebo vzdání se látky, která závislému jedinci způsobuje požitok. Obzvláště u látkových závislostí bývá provázána abstinenčním syndromem.

Abstinenční syndrom je soubor fyzických a psychických příznaků a symptomů, které se objevují u závislého jedince při ukončení užívání nebo snížení dávky drogy. Tyto symptomy jsou obvykle důsledkem adaptivních změn v těle a mozku doprovázející opakovanou expozici droze. Typické příznaky abstinenčního syndromu zahrnují bolest, nespavost, zvýšený krevní tlak a pulz, pocení, nevolnost, zvracení, podrážděnost, úzkost a deprese (West and Gossop, 1994).

1.2 Základní vlastnosti morfinu

Morfin patří mezi opioidy a je přírodním alkaloidem, který se získává z nedozrálých makovic máku setého (*Papaver somniferum*) (Serturmer, 1805). Morfin zůstává významným lékem díky své rozsáhlé účinnosti na organismus. Jeho nejdůležitějším působením je analgetický efekt, který hraje klíčovou roli při léčbě bolesti. Díky schopnosti ovlivňovat centrální nervový systém morfin účinně redukuje vnímání bolesti a paralelně s tím má také anxiolytické vlastnosti, které mohou přispívat k jeho užívání jako prostředku k úlevě od úzkosti nebo stresu, ale zároveň mohou přispět k závislosti na něm (Wikler and Masseman, 1943; Nutt

et al., 2010). Vedlejší účinky morfinu zahrnují pocity euforie, sedaci a snížení bdělosti, což dále může podporovat vytváření závislosti (Beach, 1957).

1.2.1 Mozkové struktury zapojené do závislosti a abstinčního syndromu

Hlavním místem, kde se vytváří pocit euforie, nutkavého užívání drogy a následně rozvoj závislosti, je mezolimbický systém, který je taktéž nazýván jako „systém odměny“. Tento systém zahrnuje několik klíčových mozkových struktur, které úzce spolupracují a hrají důležitou roli ve zpracování odměny, motivace a zprostředkování pocitů euforie.

Jednou z důležitých struktur mezolimbického systému je *Area ventralis tegmenti* (VTA), která se nachází ve středním mozku. VTA obsahuje populaci dopaminergních neuronů, které projikují do různých oblastí mozku, včetně *nucleus accumbens* (NAc) a prefrontálního kortexu (PFC). VTA je považována za klíčový zdroj dopaminu pro mezolimbický systém. Další podstatnou strukturou je NAc, která je umístěna v přední části mozku. NAc je cílovým bodem dopaminergních neuronů z VTA. Nadměrná neurotransmise dopaminu je zprostředkována ve VTA díky GABAergním interneuronům. Po navázání molekuly morfinu na MOR v GABAergních interneuronech, dochází k inhibici výlevu GABA, což je jeden z hlavních inhibičních neurotransmiterů v mozku. V případě dishinhibice dopaminergních neuronů VTA dojde k neregulovanému výlevu DA právě do oblasti NAc a způsobuje již zmíněné pocity euforie a podporuje rozvoj závislosti (Mamoon et al., 1995; Olmstead and Franklin, 1997; Johnson and North, 1992). Kromě toho mohou opioidní receptory ovlivňovat uvolňování dopaminu v NAc interakcí s kanabinoidními nebo cholinergními systémy, což zahrnuje složité mechanismy regulace (Khaleghzadeh-Ahangar and Haghparast, 2015; Rezaïof et al., 2008).

Amygdala je také důležitou součástí mezolimbického systému. Tato struktura se nachází v mediálním temporálním laloku a skládá se z několika podoblastí, včetně bazolaterální *amygdaly* (BLA) a centrální *amygdaly* (CeA). *Amygdala* hraje důležitou roli v přenosu informací o odměně do NAc. Zvláště pak BLA a CeA hraje roli v chování, které je spojené s hledáním odměny (Stamatakis et al., 2014). BLA odesílá glutamatergní projekce do NAc a hipokampu, což ovlivňuje odměnové a učební procesy spojené s morfinem (Ford et al., 2006). Tento vztah pak může modulovat výskyt závislosti a relapsu (Kaufling and Aston-Jones, 2015).

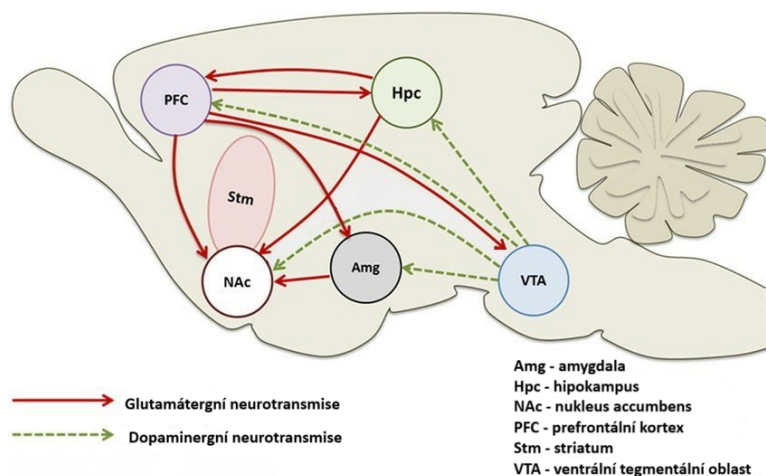
Další klíčovou strukturou je prefrontální kortex (PFC), který se nachází v přední části mozku. PFC je propojen s VTA a NAc a je zapojen do regulace motivace a emocí spojených s odměnou. PFC taktéž přijímá glutamatergní vstupy z BLA a je zapojen do konsolidace paměti a emocionálního zpracování, což ovlivňuje chování spojené s užíváním morfinu (Ou et al., 2023). Obvod BLA-PFC hraje důležitou roli v učení souvisejícím s drogami a v emocionálním zpracování morfinu (Gholizadeh et al., 2013).

Spojení mezi hipokampem a mezolimbickým systémem je důležité pro formování paměťových stop spojených s odměnou a učením očekávání odměny. Hipokampus přijímá vstupy z různých částí mezolimbického systému, včetně *amygdaly* a NAc, a hraje klíčovou roli v integrování těchto informací a formování paměťových stop. Dopaminergní projekce z VTA do hipokampu umožňují přenos signálů

odměny a motivace. Přenos dopaminu může vést k dlouhodobé potenciaci neuronálních spojů v hipokampu, což přispívá k transformaci krátkodobých vzpomínek na dlouhodobé vzpomínky a podporuje prostorové a kontextuální učení (Gasbarri et al., 1997).

Další struktura, která nepatří do mezolimbického systému, ale podílí se na vzniku závislosti a abstinčního syndromu, je *locus coeruleus* (LC). LC je noradrenergické jádro, které hraje významnou roli nejen ve fyzických projevech závislosti, ale také v udržování pozornosti, bdělosti a regulaci autonomního nervového systému. Tato struktura je bohatá na expresi opioidních receptorů typu MOR a KOR, které jsou aktivovány morfinem. Při podání morfinu dojde k aktivaci MOR a sníženému výlevu noradrenalinu (NE), což má za následek celkové fyzické uvolnění, sedaci a snížení svalového tonusu, včetně respirační deprese (Foote et al., 1983; Christie et al., 1987).

Tyto struktury, společně s dalšími oblastmi mozku, tvoří složitou síť, která reguluje vznik závislosti na morfinu a projevy abstinčního syndromu. Znárodnění propojení těchto mozkových oblastí ukazuje obrázek 1.1.



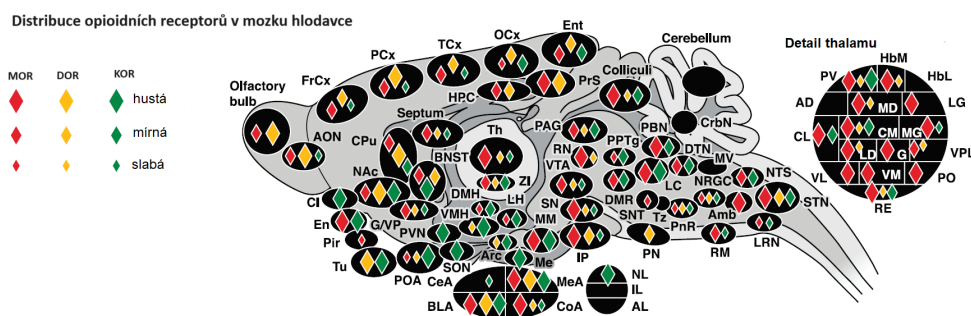
Obrázek 1.1: Názorné propojení mozkových struktur v mezolimbickém systému. *Amg* – amygdala; *Hpc* – hipokampus; *NAc* – nucleus accumbens; *PFC* – prefrontální kortex; *Stm* – striatum; *VTA* – ventrální tegmentální oblast (upraveno podle Kim et al., 2016)

1.2.2 Molekulární mechanismus působení morfinu

Morfin prochází přes hematoencefalickou bariéru do mozku, kde se váže na opioidní receptory (OR) (Oldendorf et al., 1972). Morfin aktivuje receptory spřažené s G-proteiny (GPCR), konkrétně μ (MOR), κ (KOR) a δ (DOR) OR. S nejvyšší afinitou se však morfin váže k MOR a s následně snižující se afinitou k KOR a poté k DOR (Brownstein, 1993; Snyder and Childers, 1979). Právě aktivace MOR je hlavně zodpovědná za behaviorální odpověď na morfin (Pert and Snyder, 1973; Bozarth and Wise, 1982). Opioidní receptory, které jsou typicky asociovány s G_i a G_o proteiny, inhibují adenylátcyklázu (AC), což působí snížení intracelulární hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). OR jsou vysoce exprimovány napříč celou centrální nervovou soustavou (CNS) (Pert and Snyder, 1973). Mapa výskytu OR napříč CNS je znázorněna na obrázku 1.2.

Při navázání molekuly morfinu na μ OR dochází k aktivaci G_i/G_o proteinu a fosforylaci receptoru rodinou kináz GRKs (kinázy spřažené s G-proteinem). Tento mechanismus vyvolá molekulární změny v navázání β arresтину.

U G-proteinu, který se skládá se tří podjednotek α , β a γ , dochází ke změně na jeho C-terminální doméně. Dojde k rozpadu heterotrimeru na α podjednotku a komplex β , γ , které se podílejí na signální transdukci. Při aktivaci na podjednotce G_α dochází k nahrazení GDP za GTP, stane se aktivním a může inhibovat AC (Sharma et al., 1977; Fleming et al., 1992; Carter and Medzihradsky, 1993). cAMP pak funguje v buňce jako druhý posel, který ovlivňuje aktivitu proteinkinázy A (PKA) (Delorenzo and Greengard, 1973). PKA fosforylací ovlivňuje aktivitu CREB (angl. *cAMP response element-binding protein*) (Bullock and Habener, 1998). G_α také aktivuje fosfolipázu C (PLC) a mitogenem aktivované proteiny (MAP). PLC hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG), což jsou druzí poslové s transdukční funkcí (Smart et al., 1994). IP₃ zvyšuje uvolňování vápenatých kationtů z endoplazmatického retikula, což vede k aktivaci signalizace závislé na vápenatých kationtech (Smart et al., 1997). Dále dochází k aktivaci draslíkových kanálů (GIRK-3), a to vede k hyperpolarizaci buňky a nepřímo snižuje její excitabilitu (Yan and Gautam, 1996). Komplex β , γ přímo blokuje vápníkové kanály a snižuje tak hladinu vápenatých kationtů v intracelulárním prostoru buňky, což vede k potlačení neurotransmisy (Ikeda, 1996). Na obrázku 1.3 je znázorněn mechanismus účinku morfinu na molekulární úrovni.

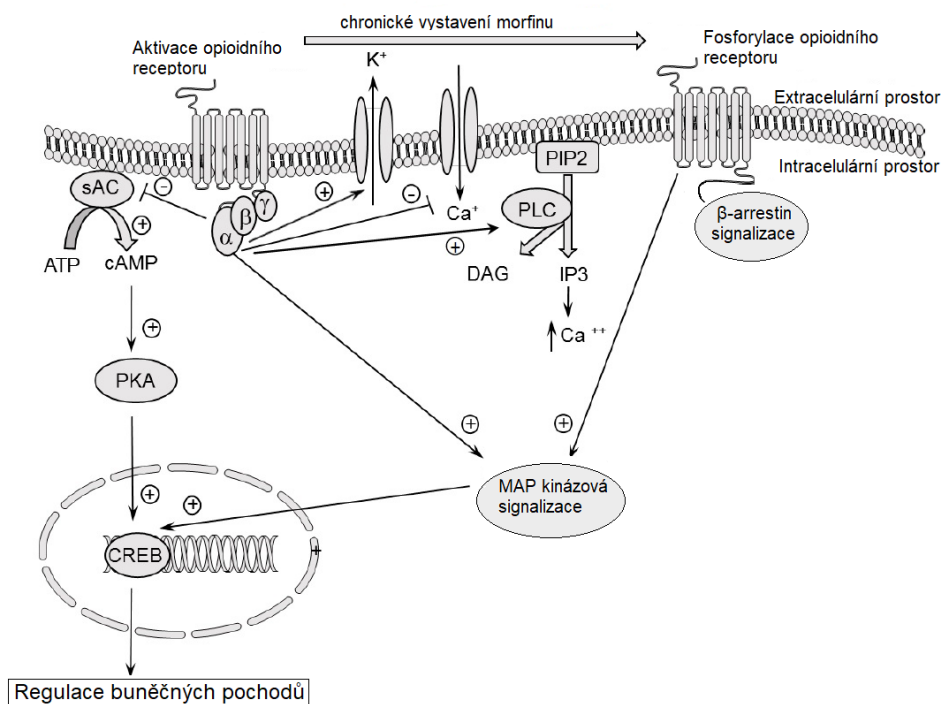


Obrázek 1.2: Distribuce opioidních receptorů v mozku hlodavce. Barvy odpovídají typu OR a hustota je znázorněna velikostí symbolu (upraveno podle Le Merrer et al., 2009)

Chronické užívání morfinu

Jak již bylo uvedeno, akutní podání morfinu má hlavní efekt na inhibici AC, a tudíž snížení hladiny cAMP a enzymů, které jsou na cAMP závislé. Dochází taktéž k hyperpolarizaci buněk a ta je indukovaná změnami v draslíkových a vápníkových kanálech. Nicméně chronická stimulace morfinem vyvolává adaptivní změny v OR, které jsou tak chráněny před hyperstimulací. V důsledku toho se vyvíjí desenzitizace a internalizace MOR. Všechny tyto mechanismy vedou ke snížení akutní odpovědi receptoru a ke ztlumení farmakologické aktivity morfinu, které je často pozorováno při chronickém podávání. Při chronickém užívání morfinu dochází k mnoha adaptacím, které jsou způsobené jeho přítomností. Organismus se snaží o znovuobnovení homeostázy v CNS a zprostředkovává tak

farmakologickou toleranci k morfinu. Adaptace na trvalou přítomnost morfinu obvykle spadají do dvou hlavních kategorií. Existují mechanismy, které vedou k reálné ztrátě specifické signalizace OR, zatímco druhý mechanismus zahrnuje zdánlivou ztrátu této aktivity prostřednictvím maskování. Příklady mechanismů vedoucích k reálné ztrátě opioidního účinku zahrnují zmenšení počtu rezervních OR (Chavkin and Goldstein, 1984), změny v hustotě nebo internalizaci opioidních receptorů (Bohn et al., 2000). Druhý mechanismus se týká hlavně proteinů, které se účastní signalizace a transdukce. Desenzitizace se vyvíjí přímo po expozici opioidům a rychle se obrací v podmínkách bez agonistů. Rychlá desenzitizace závisí na aktivitě draselných a vápenatých iontů, zatímco trvalá desenzitizace je spojena s aktivitou enzymů (adenylátcykláza nebo MAP kinázy). Dnes se zvýšená desenzitizace opioidních receptorů považuje za důležitý mechanismus tolerance na morfin, který vyplývá z mnoha neuroadaptivních změn. Desenzitizace může být způsobena zvýšenou aktivitou AC, a tudíž i zvýšenou hladinou cAMP, což ovlivňuje aktivitu CREB (Guitart et al., 1992). Kromě toho desenzitizace zahrnuje oddělení G proteinu, protože u zvířat léčených morfinem je vázání komplexu GTP sníženo ve srovnání s kontrolními zvířaty. Navíc je desenzitizace vyvolaná morfinem úzce spojena s deregulací hladin β -arrestin-1 a β -arrestin-2 v buňce (Bohn et al., 2000; Fan et al., 2003). β -arrestin, cytosolický protein, je vázán na povrch opioidního receptoru po fosforylaci opioidního receptoru GRK. Aktivace β -arrestinu inhibuje další buněčný signál, což přímo vyvolává desenzitizaci receptoru (Bohn et al., 1999). Proces desenzitizace je také vyvolán zvýšenou fosforylací MAP kináz. MAP kinázy mají širokou škálu potenciálních substrátů, včetně transkripčních faktorů ovlivňujících exprese genů. Role ERK1/2 (angl. *extracellular signal-regulated kinase* v efektu chronického podání morfinu byla také potvrzena, i když jsou tyto výsledky protichůdné. Bylo pozorováno, že chronické vystavení morfinu vyvolává zvýšení fosforylace ERK1/2 (Narita et al., 2002; Macey et al., 2009), zatímco jiní autoři ukázali nedostatek účinku. Jsou také některé údaje ukazující roli PLC ve vyvolání desenzitizace morfinem. Fosfolipáza C zvyšuje hladiny dalších druhých poslů, jako je (IP₃) a DAG. Ty vedou k zvýšení hladiny vápenatých kationtů v buňce. PLC také katalyzuje uvolňování kyseliny arachidonové z buněčných membrán, která se účastní tvorby zánětu (Nabemoto et al., 2008). Fosfolipáza C hraje významnou roli v aktivitě morfinu. Inhibitory fosfolipázy C zesilují antinociceptivní účinek jediné dávky morfinu a snižují toleranci na morfin (Smith et al., 1999). Molekulární mechanismus morfinu při akutním a chronickém užívání dokládá obrázek 1.3.



Obrázek 1.3: Znázornění molekulárního působení morfinu. *sAC* – *solubilní adenylcykláza*; *PKA* – *proteinkináza A*; *CREB* – *cAMP response element binding protein*; *PIP₂* – *fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát*; *PLC* – *fosfolipáza C*; *DAG* – *1,2-diacylglycerol*; *IP₃* – *inositol-1,4,5-trisfosfát*; *MAPK* – *mitogenem aktivovaná proteinkináza* (upraveno podle Listos et al., 2019)

1.2.3 Morfinový abstinenční syndrom

Příznaky abstinenčního syndromu jsou souborem subjektivních a klinických projevů, které se podobají chřipce. Chronické zneužívání morfinu vede k fyzické a psychické závislosti (Beach, 1957). Fyzická závislost na morfinu se projevuje charakteristickými příznaky abstinenčního syndromu, které se mohou objevit po náhlém ukončení podávání léku (Listos et al., 2013; Taylor et al., 2016). Tyto příznaky u lidí zahrnují pocit nemoci, gastrointestinální potíže, zimnici, palpitaci, svalové napětí a bolesti, insomni, pocení, třes, mravenčení kůže, neklid, podrážděnost a úzkosti. Kvůli závažnosti a trvání těchto nekomfortních stavů se užívání morfinu často udržuje i přes zájem o ukončení užívání, a to i částečně za účelem se vyhnout právě abstinenčnímu syndromu (Chalana et al., 2015). Pozorované abstinenční projevy u zvířat zahrnují skákání, cvakání zuby, průjem a intenzivní třes a třes tlapek (Schulteis et al., 1994; Zhang and Schulteis, 2008).

V dnešní době se léčba závislosti stále řeší pomocí farmakologické léčby. Farmakologická léčba opioidní závislosti spojená s opioidním abstinenčním syndromem se obvykle provádí jednou z následujících metod: detoxikace pomocí opioidních antagonistů (tj. naltrexon a naloxon); postupné ukončení užívání opioidního agonisty (tj. metadon); krátkodobé užívání částečného opioidního agonisty (tj. buprenorfin); náhlé přerušení užívání opioidů a užívání léků, které nepůsobí přímo na opioidní receptory (2 adrenergní agonisté, např. klonidin a lofexidin) k zmírnění abstinenčních příznaků (K Rehni et al., 2013). Ačkoliv současná farmakologická terapie snižuje touhu po užívání opioidů a abstinenční příznaky do

určité míry, abstinenci symptomy pravděpodobně objeví pokaždé, když je dávka snížena. Relaps v užívání opioidů se vyskytuje u 32–70 % pacientů během šesti měsíců po zahájení léčby a u 72–88 % pacientů po 12–36 měsících (Sadock et al., 2000).

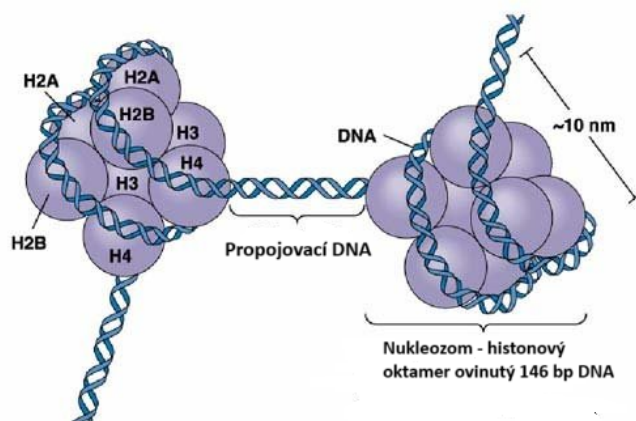
Snížená signalizace dopaminu během abstinenciho syndromu způsobeného morfinem může nastat v důsledku zvýšeného GABAergního signalizování na dopaminergní neurony ve VTA (Bagley et al., 2011). Tento nárůst inhibičních signálů je důsledkem zvýšených hladin cAMP (superaktivace cAMP) v GABAergních interneuronech způsobených morfinovým abstinenciho syndromem (Bonci and Williams, 1997; Madhavan et al., 2010; Meye et al., 2012). Tato zjištění naznačují důležitou roli GABAergní signalizace na dopaminové neurony VTA při vzniku abstinenciho příznaků po užívání opioidů.

Chronické užívání opioidů vede k rozsáhlým adaptacím v mozku, které ovlivňují různé neurochemické dráhy a neuronální obvody. Jednou z klíčových oblastí, zapojenou do abstinenciho syndromu u závislých jedinců, je *locus coeruleus* (LC), který je hlavním zdrojem noradrenalinu v mozku. Během abstinence dochází k hyperstimulaci noradrenergických neuronů. Tato hyperaktivace souvisí s rozvojem abstinenciho syndromu, který se projevuje různými somatickými a psychickými symptomy. Jedním z mechanismů stojícím za těmito adaptacemi je upregulace dráhy cAMP. Tato upregulace vede ke změně v aktivitě transkripčního faktoru CREB (angl. *cAMP response element-binding protein*), který reguluje expresi genů zodpovědných za dlouhodobé změny v neuronální plasticitě a chování. Během abstinenciho syndromu dochází k dalšímu zvýšení aktivity CREB v LC, což přispívá k nadměrné aktivaci noradrenergického systému a k vzniku abstinenciho symptomů (Maldonado et al., 1992; Han et al., 2006).

1.3 Epigenetické a epitranskriptomické modifikace

Epigenetika se zabývá studiem dědičných informací, které nezasahují do nukleotidové sekvence DNA (Wu and Morris, 2001). Od objevení DNA sekvence, jakožto nositele genetické informace a kódu, bylo zjištěno, že i jiné dědičné, epigenetické, informace mohou být předány potomkům (Waddington, 1942). Epigenetické mechanismy jsou zapojené do funkcí, jako je replikace, transkripce nebo sestavování chromatinu. DNA v eukaryotických jádrech je sbalená do kompaktní struktury zvané chromatin. Chromatin je složitá struktura, která se skládá z genomové DNA, histonových a dalších proteinů. Jeho funkcí je organizace a uspořádání dlouhých řetězců DNA do kompaktních struktur, jež lze efektivně uchovávat a regulovat jejich expresi. Existuje v různých formách a stavech, které se liší podle úrovně kondenzace. Rozlišujeme dvě extrémní formy – euchromatin a heterochromatin. Přičemž termín euchromatin popisuje stav chromatinu jako dekonzenzovaný, obsahující aktivně transkribované geny. Heterochromatin je kondenzovanou formou chromatinu s potlačením transkripce.

Základní jednotkou chromatinu je nukleozom, ten se skládá z histonového jádra a DNA. Histonové jádro tvoří oktamer s jedním tetramerem histonů H2A-H2B a dvěma dimery H3-H4, okolo kterých se vine DNA dlouhá 146–145 párů bází (Luger et al., 1997). Struktura nukleozomu je znázorněna na obrázku 1.4.



Obrázek 1.4: Znázornění složení a struktury nukleozomu (upraveno podle Kedves, 2005)

Chromatin je považován za klíčového hráče v regulaci genové exprese a může být dynamicky modifikován různými epigenetickými mechanismy, jako jsou histonové modifikace, metylace DNA a modifikace RNA. Tyto modifikace mohou ovlivnit dostupnost genů pro transkripci a přispět k buněčné diferenciaci, vývoji a odpovědi na vnější podněty.

Epitranskriptomika se zabývá funkčními změnami transkriptomu, které ale nezasahují do sekvence RNA. Ovlivnění genové exprese je v případě epitranskriptomických mechanismů zprostředkováno skrze regulaci jednotlivých kroků metabolismu mRNA (processing, jaderný export, stabilita, translace).

1.3.1 Modifikace histonů

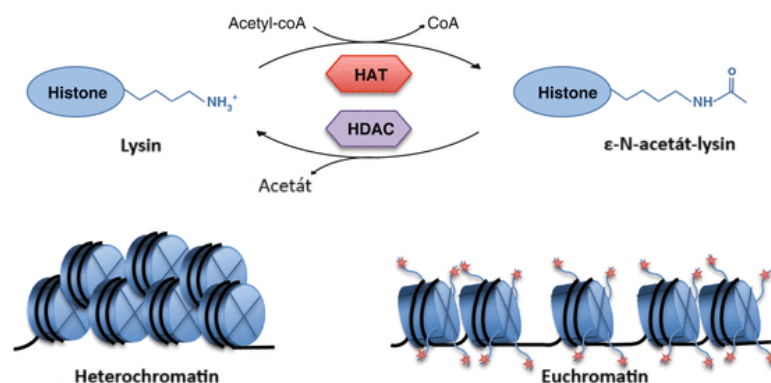
Histonové jádro je oktamer s jedním tetramerem histonů H2A-H2B a dvěma dimery H3-H4, okolo kterého se vine DNA o délce 146–145 párů bází. Vyčnívající N-terminální a C-terminální konce těchto histonových proteinů mohou být modifikovány. Histony jsou klíčovými strukturami v jádře buněk zajišťující kompaktní uspořádání DNA. Tyto bazické proteiny jsou složeny z osmičlenných komplexů, kolem kterých se vinou DNA vlákna a vytvářejí tak pevnou strukturu. Histony jsou tvořeny kombinacemi 4 proteinů: H2A, H2B, H3 a H4 (Luger et al., 1997). N-terminální konce těchto proteinů podstupují rozsáhlé kovalentní modifikace, na kterých závisí exprese genů. Primárně studované modifikace histonů v souvislosti se závislostí jsou acetylace a metylace (na obrázku 1.6 jsou znázorněny tyto modifikace a jejich vliv na stav chromatinu).

Acetylace histonů

Acetylace histonů na lysinových zbytcích je jednou z nejintenzivněji studovaných histonových posttranslačních modifikací. Mimo jiné byla i první identifikovanou modifikací, která byla spojená s transkripční aktivitou (Hebbes et al., 1988). Tento proces je reverzibilní, je katalyzován histonovými acetyltransferázami (HATs) a deacetylaci zprostředkovávají histonové deacetylázy (HDACs). Histony jsou pozitivně nabitě proteiny s vysokým obsahem lysinových a argininových zbytků. Acetylace obvykle probíhá na lysinových zbytcích a neutralizuje tak jejich pozitivní náboj, což má za následek snížení afinity mezi negativně nabitými molekulami DNA a histony (Allfrey et al., 1964). Acetylace v konečném důsledku vytváří „otevřenou strukturu“ chromatinu, která je připravena na aktivní transkripci prostřednictvím vystavení vazebných míst na DNA (Shogren-Knaak et al., 2006; Vettese-Dadey et al., 1996).

Histonové acetyltransferázy přidávají acetylovou skupinu na ϵ -amino skupinu lysinu, kde acetyl-CoA funguje jako kofaktor a neutralizuje pozitivní náboj K, a tak oslabuje interakci mezi histonem a DNA. HATs jsou rozmanitou skupinou proteinů a dělí se na dva základní typy, typ A (jaderný) a typ B (cytoplazmatický). V tomto případě se zaměřím pouze na typ A, který se dále dělí do pěti rodin podle jejich katalytické domény. Je to rodina GNAT (angl. *GCN5-related N-acetyltransferas*); MYST; p300/CBP (angl. *CREB-binding protein*); obecné transkripční faktory histonových acetyltransferáz obsahující TFIID podjednotku TAF1 a jaderné s hormony související HATs SRC1 a ACTR (SRC3) (Nagy and Tora, 2007). Často jsou součástí větších proteinových komplexů a jsou rekrutovány DNA vazebnými aktivátory (Grant et al., 1997; Grant et al., 1998).

Histonové deacetylázy jsou enzymy, jež odstraňují acetylovou skupinu z ϵ -amino skupiny lysinu za vzniku acetátu, který se uvolní z reakce (Inoue and Fujimoto, 1969). Na lysinových zbytcích se obnovuje kladný náboj, který posiluje interakci mezi histony a DNA. HDACs se rozdělují do čtyř tříd: třída I, která obsahuje HDAC1/2/3/8; třída II, do které spadají HDAC4/5,/6/7/9/10. Pak je třída III, v níž se nachází sirtuiny (SIRT 1-7), a čtvrtá třída s jedním členem – HDAC 11. Proces de/acetylace je znázorněn na obrázku 1.5

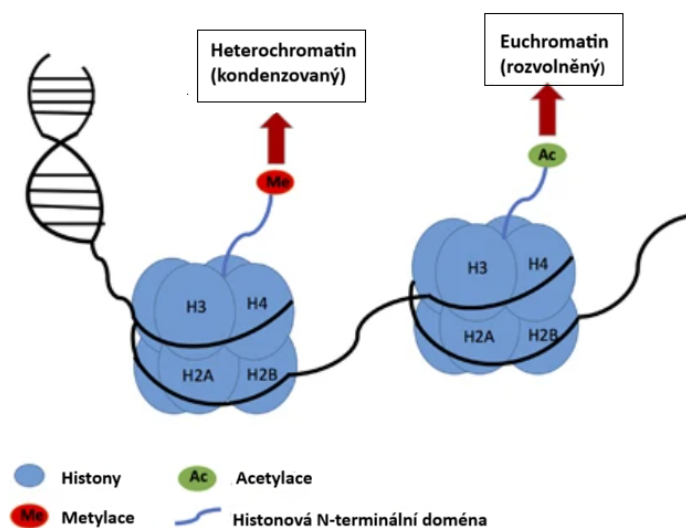


Obrázek 1.5: Znázornění procesu acetylace/deacetylace histonů a vliv modifikací na chromatin. *HAT* – *histonová acetyltransferáza*; *HDAC* – *histonová deacetyláza* (upraveno podle Steunou et al., 2014)

Metylace histonů

Metylace histonů je epigenetickou modifikací, která ovlivňuje regulaci genové exprese a dědičnosti. Při tomto biochemickém procesu jsou metylové skupiny kovalentně připojeny na specifická rezidua aminokyselin histonů. Metylace histonů probíhá na zbytcích argininu, lysinu a histidinu (Byvoet et al., 1972; Murray, 1964; Fischle et al., 2008). Lysiny mohou být monometylovány (me1), dimetylovány (me2), nebo trimetylovány (me3) na jejich ϵ aminové skupině (Kim et al., 1967; Hempel et al., 1968). Argininové zbytky podstupují monometylací (me1), symetrickou dimetylací (me2s) nebo asymetrickou dimetylací (me2a) na guaninové skupině (Borun et al., 1972). Histidiny pak mohou být monometylované, nicméně tato modifikace se jeví jako vzácná a nebyla dále charakterizovaná (Gershney et al., 1969).

Nejintenzivněji studované modifikace jsou ty, které probíhají na lysinových zbytcích. Poloha metylovaného lysinového zbytku na histonovém ocásku a stupeň metylace (zde se jedná o me1, me2, nebo me3) jsou spojeny s variabilním regulováním genové exprese (Rice et al., 2003). Například H3K4me3 je obecně provázáno s aktivní transkripcí nebo s geny, které jsou připraveny k aktivaci (Schulze et al., 2009; Santos-Rosa et al., 2002). Zatímco H3K27me3 koreluje s utlumením chromatinu, H3K4me1 se často pojí s aktivací enhancerů, a H3K4me3 je spojen s aktivitou promotoru genů (Schulze et al., 2009; Mohan et al., 2010). Existují však situace, kdy jsou stejné modifikace spojeny s protichůdnými aktivitami, jako je transkripční aktivace a utlumení. H3K4me2 a H3K4me3 jsou toho důkazem. Obecně tyto značky pojí s transkripční aktivací, ale mohou být také asociovány s transkripční represí. Pravděpodobně se změna aktivity děje prostřednictvím různých efektorových proteinů. Například když jsou značky H3K4me2 nebo H3K4me3 vázány na proteiny ING2 obsahující doménu PHD, jsou spojeny s transkripční represí prostřednictvím stabilizace komplexu histonové deacetylázy (Shi et al., 2006). Závěrem lze konstatovat, že aktivace nebo represe genové exprese jsou kontextuální a spojené s polohou a stupněm metylace lysinových zbytků na histonech.



Obrázek 1.6: Znázornění složení histonů a vliv modifikace na stav chromatinu. *Me* – *metylace*; *Ac* – *acetylace* (upraveno podle Kim and Kaang, 2017)

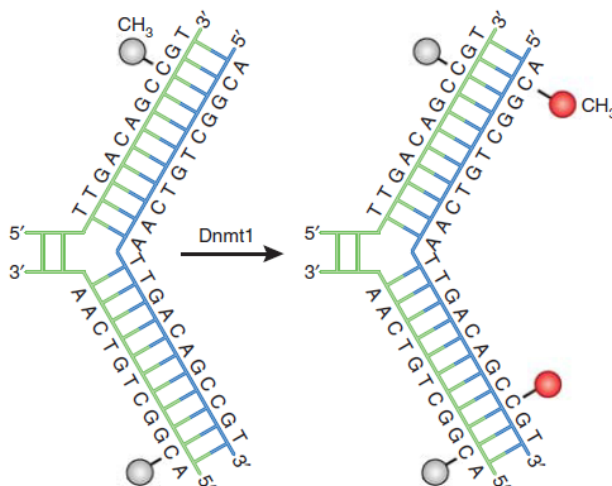
1.3.2 Metylace DNA

Metylace DNA je dědičná epigenetická „značka“, která reguluje aktivitu DNA (Holliday and Pugh, 1975; Compere and Palmiter, 1981). Tato modifikace zahrnuje kovalentní přenos metylové skupiny z S-adenosylmethioninu (SAM) na pozici pátého uhlíku na cytosinu DNA pomocí metyltransferáz (Dnmts) za vzniku 5-metyl-cytosinu (5mC). Tato modifikace převážně probíhá na cytosinu v dinukleotidech cytosin-guanin (CG). 5mC je považována za stabilnější modifikaci, než jsou histonové modifikace, které jsou snadno reverzibilní. Tato modifikace je převážně spjata se snížením genové exprese.

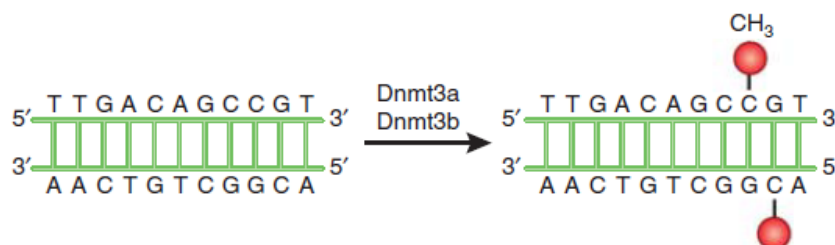
Proces metylace DNA zajišťují tři členové z rodiny DNA metyltransferáz (Dnmt), a to konkrétně Dnmt1, Dnmt3a a Dnmt3b. Dnmt přímo katalyzují přidání metylové skupiny k cytosinu za vzniku 5mC. Dnmt1 je hojně exprimována v mozku (Goto et al., 1994) a preferenčně metyluje již hemimetylovanou DNA (Pradhan et al., 1999). V průběhu replikace se nachází na replikační vidličce, kde se syntetizuje nová hemimetylovaná DNA. Dnmt1 se váže na nově syntetizované vlákno a mimikuje originální metylační vzor z originálního vlákna (Hermann et al., 2004). Také má schopnost opravovat tyto metylace (Mortusewicz et al., 2005). Proces metylace DNA katalyzovaný Dnmt1 je ukázán na obrázku 1.7.

Dnmt3a a Dnmt3b jsou si podobné ve struktuře i funkci a jsou nazývány jako *de novo* Dnmt. Na rozdíl od Dnmt1 jsou obě tyto DNA metyltransferázy schopné metylovat nativní DNA vlákna bez preference hemimetylovaného stavu (Okano et al., 1999). Proces katalyzovaný Dnmt3a a Dnmt3b je znázorněn na obrázku 1.8.

Demetylace DNA je charakterizovaná jako aktivní nebo pasivní proces. Pasivní proces demetylace probíhá v dělicích se buňkách, protože zde funguje Dnmt1 a udržuje zavedené metylace na cytosinech. Pokud dojde k inhibici této metyltransferázy, tato značka se již nepřenese na nově syntetizované vlákno a sníží tak celkové úrovně metylace 5mC po každém dalším dělení buňky.



Obrázek 1.7: Znázornění fungování Dnmt1
(upraveno podle Moore et al., 2013)



Obrázek 1.8: Znázornění fungování Dnmt3a a Dnmt3b
(upraveno podle Moore et al., 2013)

Aktivní demethylace DNA může probíhat v dělicích se i nedělicích se buňkách, protože zahrnuje enzymatické procesy, které mění 5mC na „holý“ cytosin. Neexistuje mechanismus, který by snadno dokázal odštěpit metylovou skupinu od cytosinu, protože mezi dvěma uhlíky existuje silná kovalentní vazba. Proto dochází k sérii chemických reakcí, které dále modifikují 5mC deaminací nebo oxidačními reakcemi na produkt, a ten je následně rozpoznáván BER (angl. *base excision repair*), nahrazující modifikovaný cytosin za nový, nemodifikovaný. Jedním způsobem je demethylace cytosinu zprostředkovaná komplexem enzymů TET. TET přidávají hydroxylovou skupinu na modifikovaný 5mC, a tvoří tak 5-hydroxymethylcytosin (5hmC) (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010). Jakmile je vytvořen 5hmC, mohou působit dva mechanismy, jež ho nadále modifikují. V prvním případě dochází k modifikaci, která je katalyzovaná enzymy TET, a ty oxidují 5hmC na 5-formyl-cytosin a následně na 5-hydroxy-uracil (Ito et al., 2011). Ve druhém případě může nastat deaminace, která je katalyzována AID/APOBEC za vytvoření 5-hydroxymetyl-uracilu (Guo et al., 2011). Tyto modifikované formy následně rozpoznává BER, který je nahradí novým nemodifikovaným cytosinem. Nicméně 5hmC není jenom mezistupeň při demethylaci DNA, ale může také regulovat genovou expresi. Po přeměně 5mC na 5hmC se narušuje vazba represivního MeCP2 (zkratka z anglického *methyl CpG-binding protein 2*), a tak může docházet k aktivaci exprese genů (Valinluck et al., 2004).

Metylace DNA je rozpoznávána třemi rodinami proteinů – MBD, UHRF a proteiny se zinkovým prstem. MBD (angl. *methyl-CpG-binding domain*) rodina zahrnuje MeCP2 a MBD1/2/3/4. Tyto proteiny jsou široce exprimovány hlavně mozku a jsou podstatné pro normální vývoj a funkci. Například MBD4 se váže na DNA, preferenčně rozpoznává nesouměrně spárovaný guanin s tyminem, uracilem nebo 5-fluorouracilem a následně se spojuje s proteiny, které jsou zapojené do opravy DNA nesouměrností (Meehan et al., 1989; Lewis et al., 1992; Hendrich and Bird, 1998). MeCP2 se váže přímo na metylovanou DNA přes TRD (angl. *transcriptional repression domain*) a funguje hlavně jako transkripční represor, nicméně hraje důležitou roli při udržování metylace DNA. MeCP2 se váže přes TRD na Dnmt1, a může tak rekrutovat DNA metyltransferázu 1 k hemimetylované DNA. Může díky tomu dojít k metylaci DNA (Kim et al., 2016).

1.3.3 Interakce mezi epigenetickými modulacemi

Metylační enzymy, které zajišťují metylaci a demetylaci DNA, na sebe vzájemně působí s ostatními epigenetickými modifikacemi, a to konkrétně s těmi histonovými. Dnmt interagují s enzymy, které regulují histonové modifikace a jsou obvykle spojené s genovou represí. Například Dnmt1 a Dnmt3 jsou spojené s histonovou metyltransferázou SUV39H1, jež omezuje expresi genů metylací H3K9 (Fuks et al., 2003). Dnmt1 a Dnmt3 se také mohou vázat na histonové deacetylázy, ty odstraňují acetylovou značku, a dochází tak k potlačení genové exprese (Fuks et al., 2000; Geiman et al., 2004). Obecně se dá říct, že Dnmts spolupracují s histonovými modifikačními enzymy za účelem utlumení exprese genů. Na druhou stranu, histonové modifikace mohou také ovlivnit metylaci DNA. Například Dnmt3L se váže na N-konce histonu H3, a tak přitahuje Dnmt3a a Dnmt3b, které se zapojují do metylace DNA (Ooi et al., 2007). Také MeCP2 může rekrutovat histonové deacetylázy, aby odstranily aktivační acetylace histonů a zvýšil se tak represivní účinek na transkripci genů (Nan et al., 1998). Celkově se dá říci, že jak metylace DNA, tak histonové modifikace úzce spolupracují na regulaci genové exprese.

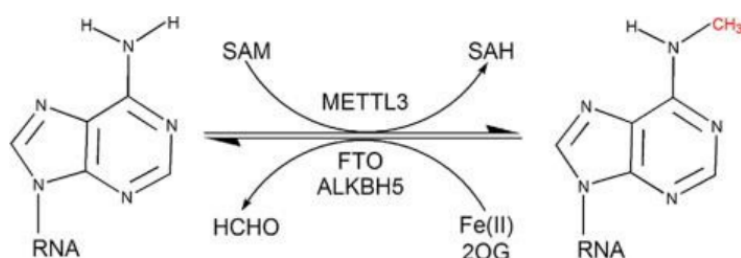
Epitranskriptomické a epigenetické mechanismy mohou také navzájem regulovat svou odpověď. Výskyt m^6A byl pozorován na transkriptech enzymů katalyzujících modifikace histonů. Manipulace m^6A dráhy v těchto případech ovlivnila expresi enzymů i hladiny modifikací cílových histonů (Wang et al., 2018; Chen et al., 2019a; Wu et al., 2020). Zároveň trimetylace histonu H3 (H3K36me3) je rozpoznávána komponentou m^6A metyltransferázového komplexu, čímž je usnadněno jeho uspořádání v okolí blízké RNA polymerázy II a depozice m^6A na nově transkribované úseky RNA (Huang et al., 2019).

1.3.4 m^6A metylace RNA

Modifikace N⁶-metyl-adenosin (m^6A) je posttranskripční modifikace, která je jednou z nejhojnějších modifikací mRNA. Vlivy m^6A na metabolismus RNA a zpracování se týkají téměř všech aspektů, včetně stability RNA, zrání, nukleárního exportu a translační efektivity. m^6A je také zapojena do řady buněčných procesů, jako je meióza, diferenciací kmenových buněk, odpovědi na poškození DNA a vývoje zárodečných buněk a neuronů. Nadále studie ukázaly důležitou

roli m⁶A dráhy ve vývoji mozku, učení a paměti, synaptické plasticitě, stresové odpovědi v nervovém systému a regulaci náladových poruch (Livneh et al., 2020, Shi et al., 2018; Widagdo et al., 2022; Engel et al., 2018; Barbon and Magri, 2020).

Fungování této modifikace je založeno na reverzibilní rovnováze mezi metyltransferázami, demethylázami a čtecími proteiny (tento proces modifikace znázorňuje obrázek 1.9.)



Obrázek 1.9: Znázornění průběhu m⁶A modifikace. *SAM* – *S*-adenosylmethionin; *SAH* – *S*-adenosyl-*L*-homocystein; *METTL3* – angl. *methyl-transferase Like 3*; *FTO* – angl. *fat mass and obesity associated protein*; *ALKBH5* – angl. *alkB homolog 5* (upraveno podle Niu et al., 2013)

Modifikace m⁶A je zajišťována pomocí katalytické funkce komplexu MAC (komplex m⁶A-METTL). Tento komplex se skládá z *METTL3* (angl. *methyl-transferase Like 3*), *METTL14* (angl. *methyltransferase Like 14*), *WTAP* (angl. *Wilms Tumor 1 Associated Protein*), *Zc3h13* (angl. *zinc finger CCCH domain-containing protein 13*) a *CBL1* (angl. *Casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1*). Studie ukázaly, že právě *METTL3* je katalytickou složkou, která váže kofaktor *SAM*, zatímco *METTL14* hraje klíčovou roli při stabilizaci konformace *METTL3* pro optimální vazbu substrátu (Bokar et al., 1997; Knuckles et al., 2018; Su et al., 2022; Yue et al., 2018; Wang et al., 2016).

m⁶A modifikace může být specificky odstraňována pomocí demethyláz *FTO* (angl. *fat mass and obesity associated protein*) a *ALKBH5* (angl. *alkB homolog 5*) (Jia et al., 2011; Zheng et al., 2013). Ty odstraňují metylovou skupinu z α -ketoglutarátu, přičemž tento způsob je závislý na přítomnosti železnatých kationtů.

Po modifikaci m⁶A čtecí proteiny, jako jsou proteiny obsahující doménu *YTH* (*YTHDF1/2/3*), jsou schopny se na ni vázat, což vede k regulaci zrání RNA, sestřihu, alternativní polyadenylaci, rozkladu RNA a translaci, což nakonec ovlivňuje expresi genů (Meyer et al., 2012).

1.4 Epigenetické a epitranskriptomické modifikace a drogová závislost

V posledních letech je stále větší pozornost věnována epigenetickým modifikacím po vystavení opioidům. Jak akutní, tak chronická expozice opioidům způsobuje epigenetické změny v nervových buňkách, které následně vedou k trvalým změnám v transkripční aktivitě a celkové fyziologii buněk. Tyto modifikace

ovlivňují expresi genů, aniž by měnily nukleotidové sekvence, ale působí na konformační stav chromatinu. To následně ovlivňuje aktivitu genů zapojených do procesů, jako je závislost, tolerance a abstinenční syndrom po ukončení užívání drogy. Tyto modifikace připravují určité geny na aktivaci, nebo naopak dochází ke snížení jejich citlivosti. Tyto změny následně ovlivňují efektorové geny, které regulují různé buněčné funkce, což nakonec vede ke změnám v signálních kaskádách, synaptické aktivitě, buněčných a molekulárních mechanismech. Epigenetické modifikace mají vliv na expresi genů a pravděpodobně sehrávají klíčovou roli v kontextu závislosti, která přispívá k bažení a recidivě.

1.4.1 Acetylace histonů

Velká část studií, která je zaměřená na zkoumání drogami indukované epigenetické modifikace, se právě zaměřuje na acetylaci lysinových (K) zbytků na histonových terminálních doménách. Jak již bylo zmíněno, tato modifikace je především spjatá se zvýšenou genovou transkripcí a v důsledku změněné genové exprese dochází u závislých jedinců k behaviorálním změnám, dysregulaci neurotransmise nebo ovlivnění synaptické plasticity.

Užívání heroinu vede ke zvýšené fosfoacetylaci histonu H3 v NAc (Sheng et al., 2011) a hyperacetylacím H3K18, H3K45 a H4K8 ve dřeni a plášti NAc. Přičemž tyto zvýšené hladiny potencují bažení po droze (Chen et al., 2016). Zvýšená úroveň acetylace byla také zaznamenána ve *striatu*, konkrétně u lysinových zbytků K27 a K23 na histonu H3 (H3K27, H3K23). V důsledku heroinem indukované hyperacetylace dochází ke zvýšené expresi genu *GRIA1* (gen pro glutamátergní receptor 1), který by mohl mít vliv na chování spojené s návykovostí (Egervari et al., 2017). Studie zabývající se dlouhodobým užíváním morfinu také prokázaly hyperacetylaci H3K14 v BLA. Tato hyperacetylaci zvyšuje expresi genů Δ FosB, BDNF a aktivaci CREB. K hyperacetylaci dochází i ve VTA a LC u histonů H3K9 a H3K14, kde dochází k upregulaci exprese genů pro tyrozin hydroxylázu (TH), která je zapojena do syntézy DA a NE, a tudíž hraje důležitou roli při závislosti (Jalali Mashayekhi et al., 2019).

1.4.2 Metylace histonů

Zkoumání metylace histonů v problematice závislosti není tak rozšířené jako již zmíněná acetylace histonů. Některé studie doposud identifikovaly změny pouze v metylačním stavu histonů, zejména se jednalo o případy snížení dimetylace na histonech spjatých s aktivací genové exprese. Bylo v nich prokázáno, že při chronickém podávání morfinu, dochází v NAc a CeA ke snížení hladiny dimetylace H3K9me₂ a taktéž u metyltransferázy G9a, která zajišťuje metylaci (Sun et al., 2012). Další studie ukazuje opětovné snížení hladiny dimetylace u histonu H3K4me₂ ve *striatu* (Chen et al., 2019b). Obě tyto studie ukazují, že právě tato pozměněná modifikace indukuje expresi genu Δ FosB, který, jak již bylo řečeno, hraje klíčovou roli v posilování odměny a vytváření závislosti (Nestler et al., 2001).

1.4.3 DNA metylace

Metylace DNA, především 5-metylace cytosinů v cytosin-guaninových dinukleotidech (5mC), obvykle utlumuje genovou expresi. Alternativní formy methylace

DNA, jako je 5-hydroxymethylace cytosinu (5hmC), na kterou je mozek bohatý, se častěji asociují s transkripční aktivací. V krvi jedinců závislých na opiátech byla pozorována odlišná metylace v genech pro mozkový neurotrofický faktor (BDNF) a *mu* opioidní receptor (OPRM1) (Nielsen et al., 2009; Schuster et al., 2017). Při akutním i dlouhodobém působení morfinu vzrostla metylace BDNF v mozkovém kmeni. Globální hladiny 5mC významně klesly v *superior colliculus* po akutní i chronické expozici morfinu a zvýšily se v hypotalamu po chronické expozici. Chronická expozice byla také spojena se zvýšenými globálními hladinami 5hmC v mozkové kůře, hipokampu a hypothalamu. Naopak v oblasti středního mozku došlo k poklesu této modifikace (Barrow et al., 2017). Po vystavení oxykodonu dochází k hypometylaci DNA v oblasti hipokampu a ke snížení hladin DNA metyltransferáz (Dnmt1, Dnmt3a a Dnmt3b) a zvýšení hladin enzymů, které se účastní demetylace DNA (Tet1, Tet3). Tyto změny zahrnují zvýšenou expresi genů, které jsou spojené se synaptickou plasticitou a zvýšenou hustotou synapsí (Fan et al., 2021). Tyto výsledky ukazují vysoce lokalizované změny 5mC v mozku potkana po akutní a chronické expozici opioidům.

1.4.4 Transkripční faktory

Důležitou složkou v procesu regulace genové exprese při vzniku tolerance a závislosti jsou transkripční faktory. Transkripční faktory se váží na specifické sekvencní motivy DNA, kde interagují s chromatin-modifikujícími enzymy a vyvolávají permissivní či represivní efekt na transkripci. Kovalentní modifikace CpG ostrůvku v DNA může oslabovat vazbu některých transkripčních faktorů. Mezi hlavní transkripční faktory, jež jsou indukovány opioidními substancemi, patří Δ FosB a MeCP2.

Jednou z klíčových molekulárních součástí vývoje a udržování závislosti je transkripční faktor Δ FosB. Δ FosB je forma transkripčního faktoru FosB, která se hromadí v mozku v důsledku opakovaného užívání opioidů. Tato hromadění Δ FosB jsou spojena s dlouhodobými změnami v genové expresi, a ty přispívají k rozvoji a udržování závislosti na opiátech. Studie ukazují, že opiáty jako morfin nebo heroin vyvolávají hromadění Δ FosB v NAc a CeA. Tyto změny v genové expresi, které jsou mediované Δ FosB, mohou vést k dlouhodobým neuroadaptacím, které zvyšují citlivost na opiáty a zároveň snižují citlivost na přirozené odměny. Opakované podávání morfinu zvyšuje hladiny Δ FosB v jádře NAc a *amygdaly* (Nestler et al., 2001). Δ FosB je klíčovým faktorem v rozvoji závislosti na opiátech. Inhibice hromadění Δ FosB může snížit bažení a zmírnit abstinenční příznaky (Zachariou et al., 2006). Δ FosB hraje signifikantní roli v behaviorálních změnách v reakci na opiáty (Kaplan et al., 2011).

Protein MeCP2 (angl. *methyl CpG-binding protein 2*) rozpoznává metylované úseky DNA a působí zejména jako transkripční represor. Studie, která se zabývala transkripčním regulátorem MeCP2, zjistila, že opakované podávání morfinu zvýšilo jeho hladiny v CeA. MeCP2 se váže na histonovou metyltransferázu G9a a snižuje represivní dimetylací H3K9me2. Potlačení aktivity G9a zvýšilo expresi BDNF (Zhang et al., 2014). Morfin ovlivňuje hladiny MeCP2 v několika regionech mozku.

1.4.5 Metylace RNA m⁶A

Tato modifikace hraje důležitou roli ve vývoji mozku, učení a paměti, synaptické plasticitě, stresové odpovědi v nervovém systému a regulaci náladových poruch (Livneh et al., 2020; Shi et al., 2018; Widagdo et al., 2022; Engel et al., 2018; Barbon and Magri, 2020). Relativně málo studií se věnovalo m⁶A dráze v ohledu závislostí. Regulační účinky FTO a YTHDF1 na návykové látky naznačují, že m⁶A může hrát funkční roli ve změnách vyvolaných chování souvisejících s odměnou za užívání drog. U myši závislých na kokainu byla zjištěna downregulace FTO a hladiny metylace m⁶A byly naopak zvýšené v oblasti hipokampu (Xue et al., 2021). Další studie zabývající se působením kokainu u myši ukazuje, že gen *Fto* je klíčovým regulátorem dopaminergních signálních drah. Jeho inaktivace vede k poruše funkce receptorů D2 a D3, což ovlivňuje neuronální aktivitu a behaviorální reakce spojené s působením kokainu. FTO má schopnost ovlivňovat modifikaci mRNA, zejména zvýšením m⁶A modifikace, což může ovlivnit exprese proteinů důležitých pro dopaminergní signalizaci. Tyto poznatky naznačují, že FTO hraje klíčovou roli v regulaci dopaminergních funkcí (Hess et al., 2013). YTHDF1-TRAF6 dráha reguluje neuroinflamační reakci a přispívá k toleranci k morfinu (Ouyang et al., 2022). Také je zajímavé zmínit, že rizikové varianty FTO korelují se zvýšeným rizikem rozvoje alkoholové závislosti (Sobczyk-Kopciol et al., 2011). V letošním roce byla publikována studie, která se zaměřila na vliv m⁶A a s ní asociované proteiny při akutní a chronické expozici morfinu. Nicméně, výsledky této práce neprokázaly žádné signifikantní změny. Měření úrovní m⁶A metylace a expresí genů spojených s touto modifikací (ALKBH5, FTO, METTL3, M3TTL14, KIAA1429, YTHDF1/2/3) nevykázaly žádné signifikantní změny po akutní ani chronické stimulaci morfinem v různých částech mozku (PRL, PVT, NAc a HIPPO). Z uvedených informací lze usuzovat, že m⁶A pravděpodobně nehraje klíčovou roli v epigenetické regulaci odpovědi na morfin (Wu et al., 2024).

1.4.6 Vliv morfinové abstinence na epigenetické modifikace

O abstinčním vlivu na epigenetické a epitranskriptomické modifikace není mnoho informací. Nicméně ve VTA a LC dochází ke snížení trimetylce H3K9me3 po vysazení chronicky užívaného morfinu. Na základě této změny dochází ke zvýšení exprese genu pro BDNF (Jalali Mashayekhi et al., 2012). Ve ventrální části *pallida* a NAc se vyskytuje zvýšená hladina transkripčního faktoru Δ FosB tři dny po vysazení morfinu. V dalších časových úsecích abstinence jeho hladiny klesají (McDaid et al., 2006). V době abstinence od morfinu také dochází ke snížení hladin MeCP2 v CeA. Snížení represivního regulátoru genové exprese došlo ke zvýšení transkripce genu GRIA1 (gen pro glutamátergní receptor 1), který by mohl mít vliv na chování spojené s návykovostí (Hou et al., 2015). Další výsledky morfinové abstinence ukázaly, že dochází ke zvýšené fosforylaci histonu H3 v NAc a laterálním septu, která je doprovázená zvýšenou expresí časných genů *c-fos* a *Arc/Arg3.1*. Dále byla pozorována zvýšená acetylce histonu H3K14 v jádru NAc. Odvykání morfinu indukovalo fosforylaci MeCP2 v laterálním septu a jádru NAc (Ciccarelli et al., 2013).

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo provést zkoumání epigenetických a epitranskriptomických modifikací v mozku potkanů, kteří byli závislí na morfinu a prošli různě dlouhými obdobími abstinence. Konkrétně jsem se zaměřila na čtyři časové úseky: 1 den, 1 týden, 4 týdny a 12 týdnů abstinence. Modifikace byly zkoumané v prefrontální kůře, hipokampu, striatu a mozečku. Tyto modifikace byly zkoumány pomocí kolorimetrických kitů a metody Western blot. Hlavní důraz byl kladen na analýzu m⁶A dráhy a enzymů, které se jí účastní – METTL3, FTO, ALKBH5 a YTHDF1. Dále byly prozkoumány hladiny transkripčních regulátorů Δ FosB a MeCP2.

3. Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

Pro experimenty byli použiti mladí dospělí samci potkanů kmene Wistar, o hmotnosti zhruba 300 g (dodavatel Velaz, s.r.o., ČR). Zvířata byla ustájena ve skupinách po pěti ve standardních podmínkách (20–24 °C, v pravidelném světelném režimu světlo/tma 12/12 hodin) s volným přístupem ke krmné dietě a vodě. Potkanům byl podáván intraperitoneálně (i.p.) morfin po dobu 10 dnů v postupně se zvyšujících dávkách 10–50 mg/kg/den (viz 3.1). Již dříve bylo prokázáno, že aplikace morfinu v takovýchto dávkách vede k vytvoření tolerance a závislosti. Paralelně s každou skupinou potkanů ovlivněných morfinem ($n = 5$) byla testována věkově odpovídající skupina kontrolních zvířat ($n = 5$), kterým byl i.p. aplikován fyziologický roztok (PBS). Po ukončení podávání morfinu a po celou dobu abstinence byli potkani chováni ve standardních podmínkách stejně jako kontrolní skupina. Všechny postupy na zvířatech byly v souladu s českým zákonem o ochraně zvířat a směrnicí EU 2010/63/EU.

Tabulka 3.1: Časové schéma podávání morfinu ve zvyšujících se dávkách po dobu 10 dnů

Den	Dávka morfinu (i.p.)
1. a 2.	10 mg/kg
3. a 4.	15 mg/kg
5. a 6.	20 mg/kg
7. a 8.	30 mg/kg
9.	40 mg/kg
10.	50 mg/kg

3.2 Příprava vzorků ze tkání

Potkani byli usmrceni cervikální dislokací v časových intervalech 1 den, 1 týden, 4 týdny a 12 týdnů od aplikace poslední dávky morfinu/PBS (viz 3.2). Po usmrcení byly mozky vyjmuty z lebeční dutiny a z nich byly odebrány čtyři mozkové struktury. A to konkrétně prefrontální kůra (PFC), hipokampus (HIP), *striatum* (STR) a mozeček (CRB). Vzorky těchto struktur byly váženy na přibližně 100 mg, následně zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy v mrazáku při -80 °C.

Tabulka 3.2: Značení vzorků a model podávání morfinu/PBS a délky abstinence

Označení vzorků	Model podávání a abstinence
K 1D	10denní podávání PBS 1 den abstinence
M 1D	10denní podávání morfinu ve zvyšujících se dávkách 10-50 mg/kg/den 1 den abstinence
K 1T	10denní podávání PBS 1 týden abstinence
M 1T	10denní podávání morfinu ve zvyšujících se dávkách 10-50 mg/kg/den 1 týden abstinence
K 4T	10denní podávání PBS 4 týdny abstinence
M 4T	10denní podávání morfinu ve zvyšujících se dávkách 10-50 mg/kg/den 4 týdny abstinence
K 12T	10denní podávání PBS 12 týdnů abstinence
M 12T	10denní podávání morfinu ve zvyšujících se dávkách 10-50 mg/kg/den 12 týdnů abstinence

3.3 Izolace RNA, DNA a proteinů pomocí TRIzol® Reagent

Z mozkové tkáně byly vyizolovány tři frakce, celková RNA, DNA a proteiny, pomocí chemikálie TRIzol®. Tyto tři frakce byly izolovány z mozkové tkáně abstinujících potkanů v různých časových úsecích a ze čtyř mozkových struktur – prefrontální kortex, hipokampus, *striatum* a mozeček. Současně s abstinujícími potkany byly RNA, DNA a proteiny izolovány i z kontrolní skupiny potkanů (viz 3.2). Do kuličkových zkumavek obsahujících 1 ml chemikálie TRIzol® byla vložena část mozku o hmotnosti přibližně 100 mg. Poté byla provedena homogenizace vzorků pomocí kuličkového homogenizéru (BEADBUG™3 MICROTUBE HOMOGENIZER) při nastavení rychlosti 300 rpm po dobu 45 sekund. Po homogenizaci byl vzorek inkubován 5 minut při pokojové teplotě a následně byl celý obsah zkumavky přenesen do 1,5ml sterilní zkumavky. K homogenátu bylo přidáno 200 μ l chloroformu, následně byl vzorek promíchán a inkubován 2-3 minuty při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován při 4 °C, 12 000 \times g po dobu 15 minut (Hettich® MIKRO 200/200R centrifuge). Po centrifugaci se směs rozdělila na tři frakce, přičemž spodní fenol-chloroformová fáze obsahovala proteiny, interfáze obsahovala DNA a svrchní vodná fáze obsahovala RNA.

3.3.1 Precipitace RNA

Do sterilní 1,5ml zkumavky byla pipetou opatrně přenesena svrchní vodná fáze obsahující RNA. K vodné fázi bylo přidáno 500 μ l isopropanolu, následovalo promíchání vzorku a inkubace na ledu po dobu 10 minut. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 4 °C, 12 000 \times g po dobu 10 minut (Hettich® MIKRO 200/200R centrifuge). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu byl přidán 1 ml 75% etanolu, následně bylo vše krátce zvortexováno a centrifugováno při 4 °C, 7500 \times g po dobu 5 minut. Po stočení byl supernatant odebrán a znovu byl přidán 1 ml 75% etanolu. Tento krok byl ještě jednou zopakován pro lepší precipitaci. Po odebrání etanolu byl pelet ponechán v otevřené zkumavce 5-10 minut v digestoři pro vyschnutí. K vysušenému peletu RNA bylo přidáno 35 μ l vody, která neobsahuje RNázy. Takto připravený vzorek byl následně inkubován 10 minut při teplotě 60 °C na termobloku (Techne®Dri-Block®heater). Tímto způsobem izolovaná RNA byla uložena do mrazáku při -80 °C.

Zjištění koncentrace RNA

Tentýž den, po dokončení precipitace RNA, byla změřena koncentrace vyizolované RNA. Koncentrace a čistota byla zjištěna pomocí spektrofotometru (NanoDrop™One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific). Poměr A260/A280 u čisté RNA by měl být okolo hodnoty 2, což odpovídalo vzorkům izolované RNA.

3.3.2 Precipitace DNA

Do zkumavky s interfází a fenol-chloroformovou fází bylo přidáno 300 μ l ledově vychlazeného 100% etanolu. Směs byla promíchána a inkubována 2-3 minuty při pokojové teplotě. Následně proběhla centrifugace při 4 °C, 2000 \times g po dobu 5 minut. Po centrifugaci se vytvořil jemný pelet DNA, který byl „nalepený“ na stěnách zkumavky. Fenol-etanolový supernatant obsahující proteiny byl přenesen do nové sterilní 2ml zkumavky a byl uchován při 4 °C pro precipitaci proteinů. Pelet DNA byl resuspendován v 1 ml roztoku 0.1 M citranu sodného (připravený podle tabulky 3.3) a inkubován 30 minut při pokojové teplotě a neustálém promíchávání na rotační míchačce. Následně proběhla centrifugace při 4 °C, 2000 \times g po dobu 5 minut. Pipetou byl odsát supernatant a znovu přidán 1 ml roztoku 0.1 M citranu sodného a tento krok byl ještě dvakrát zopakován. K peletu byly následně přidány 2 ml 75% etanolu a vzorek byl inkubován 10-20 minut při pokojové teplotě na rotační míchačce. Po inkubaci byl vzorek stočen při 4 °C, 2000 \times g po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán a pelet byl ponechán v otevřené zkumavce 5-10 minut pro vysušení. Vysušený pelet byl resuspendován v 80 μ l 8mM roztoku NaOH, následovala inkubace při pokojové teplotě 1 minutu. Následovala centrifugace 12 000 \times g po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant obsahující DNA byl odsát a přenesen do nové 1,5ml sterilní zkumavky. Takto připravený vzorek byl uchován v mrazáku při teplotě -20 °C.

Zjištění koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena pomocí fluorometru (DeNovix QFX) a kitu DeNovix Broad Range Assay. Před provedením měření byly všechny produkty

vytemperovány na pokojovou teplotu. Pracovní roztok byl připraven smícháním testovacího pufru s barvivem a enhancerem v poměru 1:100. Následně byly připraveny standardy o koncentraci 0 ng/ μ l a 200 ng/ μ l smícháním 190 μ l pracovního roztoku a 10 μ l standardů. Stejně tak byly připraveny i vzorky o neznámé koncentraci. Následovala inkubace vzorků a standardů při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Následně byla změřena koncentrace standardů a vzorků.

Čištění DNA

DNA izolovaná pomocí chemikálie TRIzol® nevykazovala dostatečnou kvalitu a koncentraci. Proto byla provedena etanolová precipitace DNA.

Vyizolovaná DNA byla doplněna do objemu 200 μ l H₂O bez RNáz. Následně bylo přidáno 20 μ l 3M roztoku octanu sodného (viz 3.3) a 500 μ l ledově vychlazeného 100% etanolu. Tato směs byla pro lepší výsledek precipitace ponechána přes noc v mrazáku při -20 °C. Následující den byla směs centrifugována při nastavení 14 000 \times g po dobu 15 minut a teplotě 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant. Do zkumavky bylo přidáno 200 μ l ledově vychlazeného 70% etanolu a vše bylo promícháno. Následovala centrifugace při 14 000 \times g po dobu 10 minut a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a zbylý etanol byl odpařen pomocí termobloku (Techne®Dri-Block®heater) při teplotě 37 °C. Pelet byl rozpuštěn ve 35 μ l H₂O bez RNáz

I přes použití etanolové precipitace se nepodařilo získat dostatečné množství DNA potřebné pro provedení dalších pokusů.

3.3.3 Precipitace proteinů

K fenol-etanolové fázi bylo přidáno 1,5 ml isopropanolu a při pokojové teplotě se vzorky inkubovaly 10 minut. Následovalo stočení vzorků při teplotě 4 °C, 1200 \times g po dobu 10 minut. Na dně zkumavky se vytvořil pelet a supernatant byl odstraněn. Pelet byl promyt 2 ml promývacího pufru (připravený podle tabulky 3.3) a následně byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě za neustálého promíchávání. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze při 4 °C, 7500 \times g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a tento proces byl ještě dvakrát zopakován pro zlepšení precipitace. Následně byly přidány 2 ml 100% etanolu a vzorky v něm byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 20 minut za neustálého promíchávání. Po inkubaci následovalo stočení na centrifuze při 4 °C, 7 500 \times g po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán a pelet byl ponechán v otevřené zkumavce 5-10 minut pro vysušení. Vysušený pelet byl resuspendován v 200 μ l v 1% roztoku SDS a 8M močovinně společně s inhibitory (cOmplete™Protease Inhibitor Cocktail, PhosSTOP™ (viz tabulka 3.3). Následně byly pelety sonikovány (Bandelin Sonoplus) v pěti cyklech po 15 s při účinnosti 50 %. Následovalo stočení vzorků v centrifuze při 4 °C, 10 000 \times g po dobu 10 minut. Supernatant obsahující proteiny byl odsát a přenesen do nových sterilních 1,5ml zkumavek. Proteiny byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v teplotě -80 °C .

Tabulka 3.3: Rozpis roztoků na izolaci RNA, DNA a proteinů

Promývací pufr	2.87 g guanidin hydrochlorid 80 ml 95% etanol doplněno do 100 ml 95% etanolem
0.1M citran sodný v 10% etanolu	2.94 g citran sodný dihydrát 10 ml 100 % etanol doplněno do 100 ml MilliQ H ₂ O
Roztok 1:1 SDS a 8M močoviny	12.1 g Tris 1 g SDS 48 g močovina 80 ml MilliQ H ₂ O pH 8.0 doplněno do 100 ml MilliQH ₂ O
3M roztok octanu sodného	40.83g trihydrát octanu sodného 80 ml miliQ H ₂ O pH 5.2 doplněno do 100 ml MilliQ H ₂ O

Stanovení koncentrace proteinů

Pro zjištění hodnot koncentrace proteinů ve vzorcích byla použita metoda BCA. Jako standard pro určení kalibrační křivky byl použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Byl nanesen na 96jamkovou destičku podle tabulky 3.4. Vzorky určené ke stanovení proteinů byly 100 \times naředěny dH₂O a po 100 μl nanoseny vedle standardů v triplicátech na destičku. Ke všem vzorkům a standardům bylo dále přidáno 100 μl reakční směsi připravené smícháním činidel B:C:A v poměru 25:1:26 (viz tabulka 3.5). Destička byla přikryta fólií a inkubována 30 minut při 60 °C na termobloku (Techne®Dri-Block®heater). Absorbance v jamkách byla poté měřena pomocí spektrofotometru (Biotek Synergy HT Microplate Reader) při vlnové délce 562 nm. Koncentrace proteinů byla následně určena podle kalibrační křivky BSA v programu Gen5.

Tabulka 3.4: Rozpis přípravy standardů pro sestavení kalibrační křivky

Standard	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μg BSA	0	0.2	0.5	1.0	1.5	2.5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{gl}$) (μl)	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H ₂ O	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

Tabulka 3.5: Složení činidel pro zjištění koncentrace proteinů

Činidlo A	8 g $\text{NaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 g vlnan sodný doplněno do 100 ml dH_2O pH 11.25
Činidlo B	4 g BCA doplněno do 100 ml dH_2O
Činidlo C	0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ doplněno do 10 ml dH_2O

3.4 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny tak, aby dosáhly konečné koncentrace $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Celkový objem vzorku činil 100 μl , přičemž jednu čtvrtinu této směsi tvořil Laemmliho pufr (viz tabulka 3.6). Po smíchání byly vzorky inkubovány na termobloku (Techne®Dri-Block®heater) při teplotě 95 °C po dobu 3 minut.

K provedení SDS-PAGE elektroforézy byla použita speciální aparatura. Skla s mezerou o šířce 1,5 mm byla nejprve očištěna a odmaštěna 70% etanolem a naplněna 10% polyakrylamidovým separačním gelem, který byl připraven podle tabulky 3.7. Gel byl převrstven směsí butanolu a dH_2O v poměru 3:1 a polymerizoval 45-60 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí tohoto času byla směs butanolu odstraněna a gel byl opláchnut dH_2O , zbývající vlhkost byla odstraněna pomocí filtračního papíru. Na tento separační gel byl nanesen 4% zaostřovací gel, který byl připraven podle tabulky 3.8. Do zaostřovacího gelu byl vložen 15jambkový rozdělovací hřebínek, který ztuhnutím (zhruba 20 minut) vytvořil jamky pro vzorky. Do těchto jamek bylo aplikováno 10 μl proteinových vzorků a 3 μl molekulárního standardu. Množství aplikovaných proteinů byla 10 μg . Elektroforéza byla spuštěna při konstantním napětí 200 V po dobu přibližně 60 minut v elektroforetickém pufru (viz tabulka 3.6).

Tabulka 3.6: Složení roztoků pro SDS-PAGE elektroforézu

Pufř 1	18.17 g Tris pH 8.8 doplněno do 100 ml dH ₂ O
Pufř 2	6.05 g Tris pH 6.8 doplněno do 100 ml dH ₂ O
Elektroforetický pufř 10x konc.	30.3 g Tris 141.1 g glycin 10 g SDS doplněno do 100 ml dH ₂ O
Laemmliho pufř 4x konc.	2.4 ml 1M Tris pH 6.8 1 ml glycerol 0.8 g SDS 0.8 g DTT 1 mg bromfenolová modř doplněno do 10 ml dH ₂ O

Tabulka 3.7: Složení 10% separačního gelu

Voda	4 ml
Pufř 1	2.5 ml
30% akrylamid	3.35 ml
10% SDS	100 μ l
10% APS	45 μ l
TEMED	4 μ l

Tabulka 3.8: Složení 4% zaostřovacího gelu

Voda	3 ml
Pufř 2	1.25 ml
30% akrylamid	650 μ l
10% SDS	50 μ l
10% APS	45 μ l
TEMED	4 μ l

3.5 Western blot

Po dokončení SDS-PAGE elektroforézy byly gely vyjmuty z aparatury a byla odstraněna vrstva zaostřovacího gelu. Separací gel byl vložen do blotovací aparatury společně s nitrocelulózovou membránou (Amershan, Protram, GE Healthcare). Celá aparatura byla zalita blotovacím pufrem (viz 3.9) a připojena ke zdroji. Blotování probíhalo při konstantním proudu 100 V zhruba 70 minut. Při tomto procesu dochází k přenosu záporně nabitých proteinů díky SDS z gelu na nitrocelulózovou membránu v elektrickém poli. Po dokončení procesu byla z kazety vyjmuta nitrocelulózová membrána, která byla následně obarvena v Ponceau S (Sigma-Aldrich) pro vizualizaci separace proteinů a ověření nanášky. Obarvená membrána byla oskenována a vyhodnocena pomocí softwaru ImageLab. Membrána byla opláchnuta dH₂O a zalita blokovacím pufrem (viz 3.9). Inkubace probíhala po dobu 40 minut při pokojové teplotě a za kontinuálního míchání. Po inkubaci byly membrány opláchnuty dH₂O a ponořeny do ředícího pufru (viz 3.9) společně s vybranými protilátkami (3.10). Takto se membrány inkubovaly přes noc při 4 °C na kývačkách. Druhý den byly membrány opláchnuty dH₂O a třikrát po 10 minutách promyty v promývacím pufru (viz 3.9). Následovala inkubace v ředícím pufru s příslušnými sekundárními protilátkami (viz 3.10) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po uplynutí hodiny byly membrány opět třikrát promyty v promývacím pufru. Poté byly osušeny filtračním papírem a byl nanesen substrátový roztok pro křenovou peroxidázu (Clarity Western ECL Substrate, Bio-rad; SuperSignal West Femto, ThermoFischer Scientific) po dobu 1 minuty. Následně byl substrát z membrán osušen filtračním papírem a proběhla vizualizace pomocí přístroje ChemiDoc™. Nakonec byly výsledky zpracovány v softwaru ImageLab. Normalizace výsledků Western blotu k množství nanesených proteinů byla provedena pomocí barvení Ponceau S, které sloužilo jako kontrola rovnoměrnosti nanášení proteinů. Intenzity detekovaných proteinů byly normalizovány vzhledem k intenzitě interního standardu (STD_{*i*}), jehož hodnota byla stanovena na 100 %.

Tabulka 3.9: Rozpis roztoků použitých pro metodu Western Blot

Blotovací pufr	15 g Tris 72 g glycin 1000 ml metanol doplněno do 5000 ml dH ₂ O
TBS pufr , pH 8, 10x koncentrovaný	84.15 g NaCl 11.63 g Tris pH upraveno na hodnotu 8.0 doplněno do 960 ml dH ₂ O
Oplachovací pufr	100 ml TBS pufr 900 ml dH ₂ O 3 ml Tween
Blokovací pufr	2.5 g sušené mléko 50 ml TBS pufr 50 μ l Tween
Ředící pufr	0.5 g sušené mléko 50 ml TBS pufr 50 μ l Tween

Tabulka 3.10: Tabulka použitých primárních a sekundárních protilátek

Primární protilátka	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Sekundární protilátka	Ředění
ALKBH5	16837-1-AP	Proteintech®	2000×	Anti-Rabbit	40 000×
YTHDF1	17479-1-AP	Proteintech®	2000×	Anti-Rabbit	40 000×
FTO	ab92821	Abcam	1000×	Anti-Mouse	20 000×
METTL3	96391S	Cell Signaling	1000×	Anti-Rabbit	40 000×
Δ FosB	14695S	Cell Signaling	1000×	Anti-Rabbit	40 000×
MeCP2	3456S	Cell Signaling	1000×	Anti-Rabbit	40 000×

3.6 Stanovení hladin N⁶-metyl-adenosinu

Pro měření hladin N⁶-metyl-adenosinu (m⁶A) byl použit komerční kit značky EPIGENTEK, EpiQuik™ m6A RNA Methylation Quantification Kit (Colorimetric). Nejprve bylo nutné naředit vzorky celkové izolované RNA tak, aby výsledné množství bylo 200 ng. Do každé jamky bylo napipetováno 80 μ l vazebného roztoku. V tetraplikátech bylo přidáno 2 μ l negativní a pozitivní kontroly. Do dalších jamek bylo napipetováno v monoplikátech 5 μ l vzorku, přičemž výsledné množství RNA odpovídalo 200 ng. Následně byla takto připravená destička překryta fólií a byla inkubována po dobu 90 minut při 37 °C v inkubátoru. Po uplynutí 90 minut byl odsát vazebný roztok a jamky s navázanou RNA byly třikrát promyty 150 μ l promývacího pufru. Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l zachytávací protilátky, pak byla destička přelepena fólií a inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Poté byly protilátky odsáty a jamky byly opět třikrát promyty 150

μl promývacího pufru. Do jamek bylo napipetováno $50 \mu\text{l}$ detekčních protilátek. Tato směs se inkubovala při pokojové teplotě 30 minut. Po ukončení inkubace byly jamky promyty čtyřikrát $150 \mu\text{l}$ promývacího pufru. Do všech jamek bylo napipetováno $50 \mu\text{l}$ „enhancer solution“, přičemž byla destička zakryta fólií a následovala 30minutová inkubace při pokojové teplotě. Potom byla směs z jamek odsáta a následovalo pětinasobné promytí $50 \mu\text{l}$ promývacího pufru. Do jamek bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ vývojového roztoku a celá destička byla zabalena do alobalu kvůli absenci světla. Inkubace trvala zhruba 10 minut při pokojové teplotě. Vzorky obsahující m^6A se začaly zbarvovat do modra. Poté bylo přidáno ke směsi $100 \mu\text{l}$ roztoku pro zastavení reakce a inkubace trvala zhruba 15 minut. Po přidání roztoku zastavující reakci směs v jamkách začala měnit barvu na žlutou. V takto připravených vzorcích byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru (Biotek Synergy HT Microplate Reader) při vlnové délce 450 nm . Hodnoty optické density byly vyhodnoceny s využitím softwaru Gen5. Po odečtení hodnot byla znovu přeměřena koncentrace vzorků RNA pro přesnější výpočet. Určení procentuálního zastoupení m^6A v celkové RNA bylo provedeno pomocí následujícího vzorce.

$$m^6A \% = \frac{(Sample\ OD - NC\ OD) \div S}{(PC\ OD - NC\ OD) \div P} \times 100\%$$

V tomto vzorci „Sample OD“ reprezentuje optickou densitu neznámého vzorku, „NC OD“ optickou densitu negativní kontroly a „PC OD“ optickou densitu pozitivní kontroly. „S“ označuje počáteční množství RNA v ng, zatímco „P“ je počáteční množství pozitivní kontroly v ng.

3.7 Statistická analýza

Výsledky jednotlivých měření byly zpracované v programu ImageLab, Gen5 a následně byly vyhodnocené statistickou analýzou dat v programu GraphPad Prism 8. Jednotlivá data vždy pocházejí z nejméně tří na sobě nezávislých experimentů. Na analýzy byl použit statistický test One-way ANOVA. Data jsou uvedena jako průměr \pm S.E.M. Výsledky s $p \leq 0,05$ byly označeny jako signifikantní.

4. Výsledky

Tato práce se zabývá výzkumem vlivu morfinové abstinence na epitranskrip-tomickou modifikaci m⁶A v různých časových úsecích 1 den (1D), 1 týden (1T), 4 týdny (4T), 12 týdnů (12T) a v mozku potkana. Sledovanými strukturami byl prefrontální kortex (PFC), hipokampus (HIPPO), *striatum* (STR) a *cerebellum* (CRB). Primárním úkolem této práce bylo sledování modifikace RNA m⁶A pomocí kolorimetrického kitu. Následně byly zkoumány hladiny exprese enzymů, které se účastní této modifikace, konkrétně FTO, ALKBH5, METTL3 a YTHDF1 pomocí metody Western blot. Uvedené enzymy hrají důležitou roli při regulaci m⁶A modifikace a jejich změny v průběhu morfinové abstinence mohou ovlivnit celkovou dynamiku tohoto procesu. Kromě toho byly sledovány také hladiny transkripčního faktoru Δ FosB a enzymu MeCP2 pomocí techniky Western blot. Pomocí One-way ANOVA testu byly porovnávány hladiny mezi kontrolní K a abstinující skupinou M.

4.1 Hladiny N⁶-metyl-adenosinu

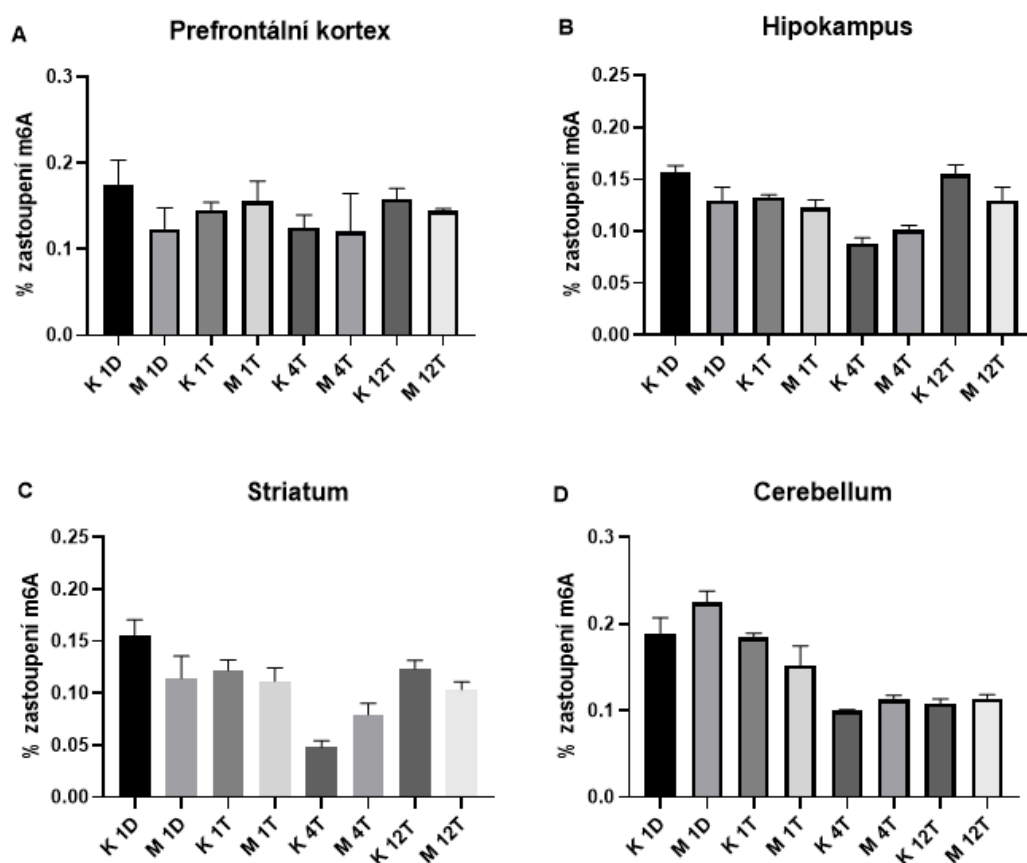
Vliv morfinové abstinence na hladiny N⁶-metyl-adenosinu (m⁶A) byl testovaný pomocí kolorimetrického kitu EpiQuik™ m⁶A RNA Methylation Quantification Kit (Colorimetric). Výpočtem bylo určeno procentuální zastoupení hladiny N⁶-metyl-adenosinu. Byl sledován vliv morfinové abstinence 1 den (1D), 1 týden (1T), 4 týdny (4T) a 12 týdnů (12T) ve čtyřech mozkových strukturách – prefrontální kůra (PFC), hipokampus (HIPPO), *striatum* (STR) a mozeček (CRB).

Analýza hladin N⁶-metyl-adenosinu (m⁶A) v prefrontální kůře (viz 4.1A) po různých obdobích abstinence vykazuje tendence ke změnám, které však nejsou statisticky signifikantní. Při jednodenní morfinové abstinenci byly hladiny m⁶A mírně snižené u zvířat závislých na morfinu M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, ale tento pokles nebyl statisticky významný. Po týdenní abstinenci byl pozorován mírný vzestup hladin u skupiny M 1T ve srovnání s K 1T, který rovněž nebyl statisticky signifikantní. Také ve skupinách po čtyřtýdenní a dvanáctitýdenní abstinenci (K 4T, M 4T a K 12T, M 12T) byly hladiny m⁶A srovnatelné mezi kontrolními a morfinovými skupinami, s tendencí k mírnému poklesu ve čtyřtýdenním intervalu u morfinové skupiny M 4T a s tendencí k mírnému nárůstu u kontrolní skupiny K 12T v dvanáctitýdenním intervalu. Ani jedna z těchto změn však nebyla statisticky signifikantní.

Podobné tendence byly pozorovány i v hipokampu (viz 4.1B), kde po jednodenní abstinenci měly hladiny m⁶A ve skupině M 1D tendenci k mírnému snížení ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D. Tato tendence k poklesu hladin m⁶A se opakovala i po týdnu abstinence u skupiny M 1T. Naopak, po čtyřtýdenní abstinenci M 4T, byl pozorován mírný nárůst hladin m⁶A oproti kontrolní skupině K 4T. Po dvanáctitýdenní abstinenci u skupiny M 12T bylo opět zjištěno mírné snížení hladin m⁶A ve srovnání s kontrolní skupinou K 12T. Žádný z těchto výsledků nebyl statisticky signifikantní.

Ve *striatu* (viz 4.1C) byly pozorovány fluktuace hladin m⁶A, které byly podobné těm pozorovaným v hipokampu, avšak žádné z těchto změn nebylo statisticky signifikantní.

V hladinách N⁶-metyl-adenosinu v *cerebellu* byly zaznamenány tendence ke změnám, ale žádná z nich nebyla statisticky signifikantní. Po jednodenní abstinenci byly hladiny m⁶A u skupiny závislých na morfinu M 1D mírně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, ale ani tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Po týdnů abstinence se hladiny m⁶A mírně snížily u morfinové skupiny M 1T oproti kontrolní skupině K 1T, avšak bez statisticky signifikantního rozdílu. Po čtyřtýdenní a dvanáctitýdenní abstinenci měly hladiny m⁶A mírnou tendenci se zvyšovat u morfinových skupin M 4T a M 12T ve srovnání s jejich kontrolními skupinami K 4T a K 12T, nicméně opět bez statisticky signifikantních změn. Výsledky těchto změn jsou ilustrovány v grafu 4.1D.



Obrázek 4.1: Stanovení hladin N⁶-metyl-adenosinu v PFC, HIPP, STR a CRB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných ze dvou nezávislých měření. Na ose y je zobrazené procentuální zastoupení N⁶-metyl-adenosinu.

4.2 Vliv morfinové abstinence na expresi enzymů m⁶A dráhy

Vliv morfinové abstinence na expresi enzymů, které se účastní m⁶A modifikace byl sledován u FTO, METTL3, ALKBH5 a YTHDF1 v různých mozkových strukturách a různých časových úsecích abstinence. Jednalo se konkrétně

o prefrontální kůru (PFC), hipokampus (HIPPO), *striatum* (STR) a *cerebellum* (CRB). Časové úseky abstinence byli 1 den (1D), 1 týden (1T), 4 týdny (4T) a 12 týdnů (12T) jak u potkanů, kteří byly závislí na morfinu (M), tak u kontrolních skupin, kterým byl podáván fyziologický roztok (K). Hladiny jednotlivých proteinů byly sledovány pomocí techniky Western blot (WB). Do statistiky bylo zahrnuto pět měření.

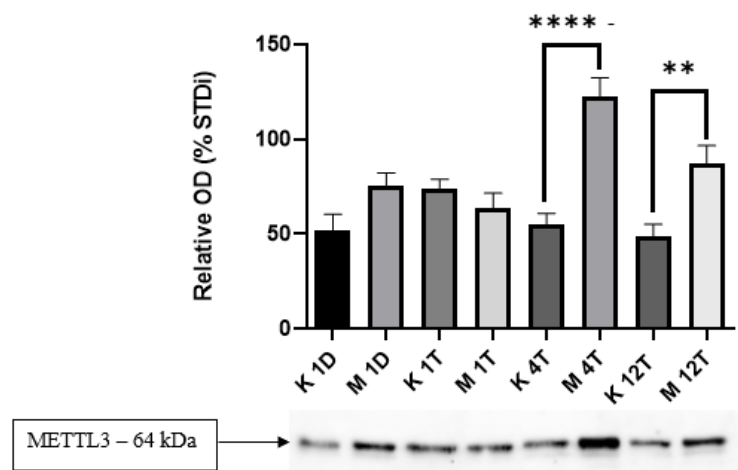
4.2.1 Exprese metyltransferázy METTL3 v mozkových strukturách

Hladiny metyltransferázy METTL3 v prefrontálním kortexu vykazaly zvýšení u skupin, které prošly morfinovou abstinencí po dobu 4 týdnů a 12 týdnů ve srovnání s jejich odpovídajícími kontrolními skupinami. Konkrétně bylo zjištěno významné zvýšení hladin METTL3 po čtyřtýdenní morfinové abstinenci u skupiny M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T ($p < 0,0001$). Tento trend pokračoval i po 12 týdnech abstinence, kde bylo také zaznamenáno významné zvýšení exprese METTL3 u skupiny M 12T oproti kontrolní skupině K 12T ($p = 0,0073$). V době jednodenní abstinence měly hladiny METTL3 tendenci k mírnému zvýšení u skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, avšak tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Po týdenní abstinenci byly hladiny METTL3 mírně sníženy u morfinové skupiny M 1T ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T, což také nebylo statisticky významné. Vliv morfinové abstinence v PFC na hladiny metyltransferázy METTL3 je zobrazen na obrázku 4.2.

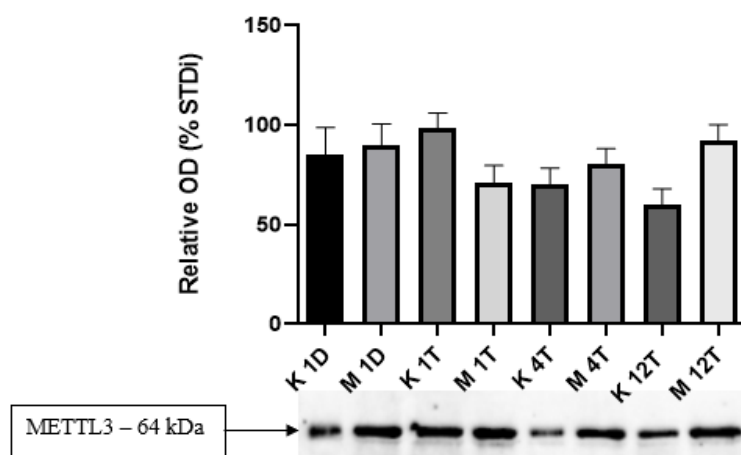
V oblasti hipokampu byly pozorovány tendence ke zvýšení hladin METTL3 u morfinových skupin abstinujících 1 den, 4 týdny a 12 týdnů ve srovnání s jejich kontrolními skupinami. U skupiny abstinující 1 týden byla hladina METTL3 mírně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T. Nicméně v této struktuře nebyly v žádném časovém bodě nalezeny statisticky signifikantní rozdíly. Výsledky vlivu morfinové abstinence na hladiny METTL3 v hipokampu jsou zobrazeny v grafu 4.3.

Ve *striatu* byl pozorován významný nárůst hladiny METTL3 po jednodenní abstinenci u morfinové skupiny M 1T ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T ($p = 0,0495$). V ostatních časových úsecích abstinence byly pozorovány pouze tendence ke změnám, které nebyly statisticky signifikantní. Konkrétně po jednodenní abstinenci byla hladina METTL3 mírně snížena u morfinové skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Po čtyřtýdenní abstinenci byl zaznamenán nárůst hladiny METTL3 u skupiny M 4T ve srovnání se skupinou K 4T, avšak bez statisticky významných změn. Po dvanáctitýdenní abstinenci byly hladiny METTL3 téměř stejné jak u kontrolní skupiny K 12T, tak u morfinové skupiny M 12T, bez signifikantních rozdílů. Výsledky jsou prezentovány v grafu 4.4.

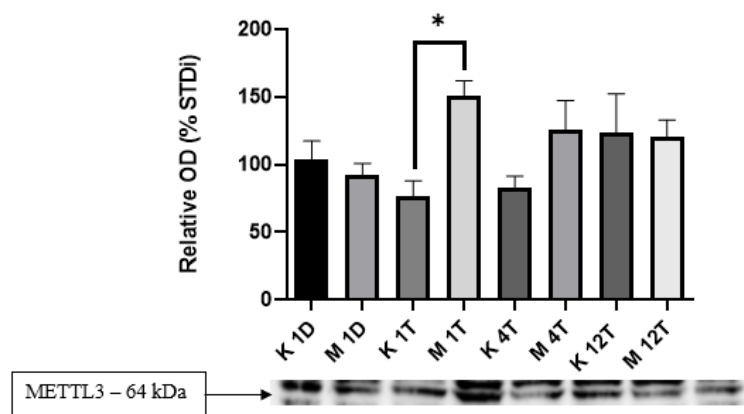
V oblasti *cerebella* bylo odhaleno významné snížení hladiny METTL3 po čtyřech týdnech abstinence u morfinové skupiny M 4T ve srovnání se skupinou kontrolní K 4T ($p = 0,0010$). V ostatních časových úsecích abstinence, tedy po jednom dni, jednom týdnu a dvanácti týdnech, nebyly mezi morfinovými skupinami a jejich odpovídajícími kontrolními skupinami zjištěny žádné statisticky signifikantní změny. Tato data jsou prezentována v grafu 4.5.



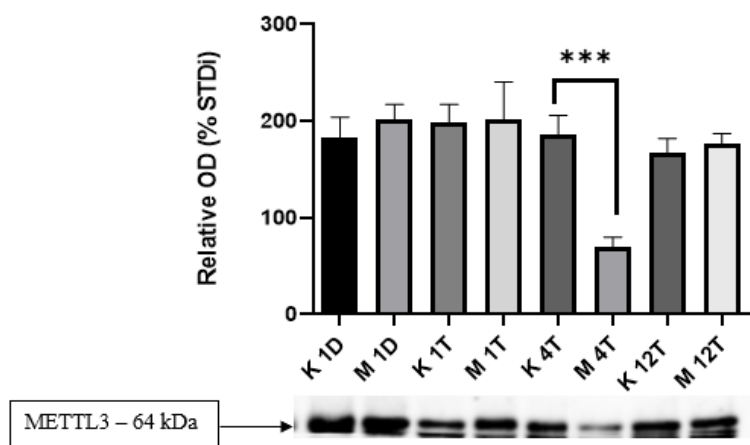
Obrázek 4.2: **Stanovení exprese proteinu METTL3 v PFC.** Hladina METTL3 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, **** odpovídá $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.3: **Stanovení exprese proteinu METTL3 v HIPP.** Hladina METTL3 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.4: **Stanovení exprese proteinu METTL3 v STR.** Hladina METTL3 byla stanovena pomocí techniky Western Blot. Hladina METTL3 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.5: **Stanovení exprese proteinu METTL3 v CRB.** Hladina METTL3 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, *** odpovídá $p < 0,001$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.

4.2.2 Exprese FTO v mozkových strukturách

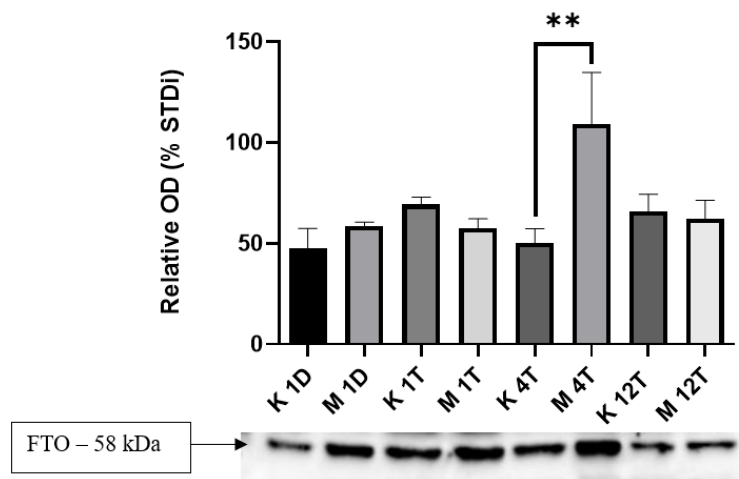
Výsledky z prefrontálního kortexu (viz graf 4.6) ukazují, že po jednodenní abstinenci došlo k mírnému, nesignifikantnímu zvýšení hladin demetylázy FTO u morfinové skupiny M 1D v porovnání s kontrolní skupinou K 1D. Po jednom týdnu abstinence bylo zaznamenáno mírné snížení hladin FTO u morfinové skupiny M 1T oproti kontrolní K 1T, které rovněž nebylo statisticky významné.

V období čtyř týdnů abstinence však došlo k signifikantnímu zvýšení hladin demetylázy u skupiny závislé na morfinu M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T ($p = 0,0043$). V dvanáctitýdenním intervalu abstinence byla pozorována tendence snížení hladiny FTO u morfinové skupiny M 12T ve srovnání se skupinou kontrolní K 12, bez statisticky významné změny.

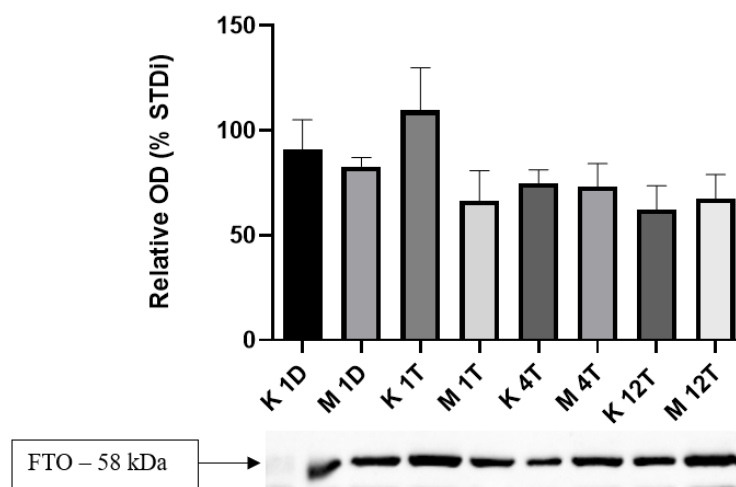
Analýza dat z hipokampu ukázala, že během sledovaných období byly tendence k různým změnám v hladinách FTO, nicméně žádná z těchto změn nebyla statisticky signifikantní. Po jednodenní abstinenci bylo zaznamenáno mírné zvýšení hladin demetylázy ve skupině závislé na morfinu M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, ale změna nebyla staticky významná. V období abstinence jednoho týdne byly mírné tendence hladiny FTO u morfinové skupiny M 1T se snižovat vůči kontrolní skupině 1T, taktéž bez signifikantní změny. Ve čtyřtýdenním intervalu abstinence byly hladiny FTO sniženy u morfinové skupiny M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T, opět bez statistické signifikance. Po dvanácti týdnech abstinence bylo zaznamenáno mírné zvýšení hladin FTO u skupiny závislé na morfinu M 12T v porovnání se skupinou kontrolní K 12T, které rovněž nebylo statisticky významné. Výsledky těchto pozorování jsou ilustrovány v grafu 4.7.

Ve *striatu* byly výsledky analýzy hladin FTO proměnlivé, ale bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami závislými na morfinu a kontrolními skupinami ve všech časových úsecích. Konkrétně, po jednodenní abstinenci nebyl mezi morfinovou skupinou M 1D a kontrolní skupinou K 1D zaznamenán signifikantní rozdíl. Obdobně tomu tak bylo při abstinenci jeden týden. Po čtyřtýdenní abstinenci měly hladiny FTO tendenci klesat u morfinové skupiny M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T, nicméně tento rozdíl nebyl zaznamenán jako signifikantní. V období abstinence dvanácti týdnů se hladiny FTO mírně zvýšily u skupiny závislé na morfinu M 12T v porovnání se skupinou kontrolní K 12T, ale toto mírné zvýšení nebylo statisticky významné. Tyto výsledky jsou vizuálně prezentovány na grafu 4.8.

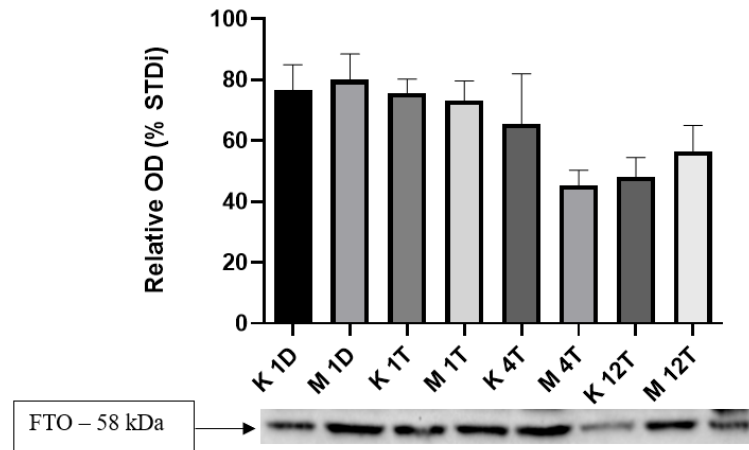
V *cerebellu* byl pozorován významný nárůst hladiny FTO u morfinové skupiny M 1D v porovnání se skupinou kontrolní K 1D, přičemž tato změna byla signifikantní ($p = 0,0010$). V období jednoho týdne abstinence byly hladiny FTO stabilní, bez signifikantní změny. Naopak, v časovém úseku čtyřtýdenní abstinence došlo k výraznému snížení hladiny FTO u morfinové skupiny M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T, což bylo také signifikantní ($p < 0,0001$). Ve dvanácti týdnech abstinence byla pozorována tendence ke zvýšení hladin FTO u morfinových skupin M 12T ve srovnání s kontrolními K 12T, ale bez signifikantního rozdílu. Výsledky jsou ilustrovány na grafu 4.9.



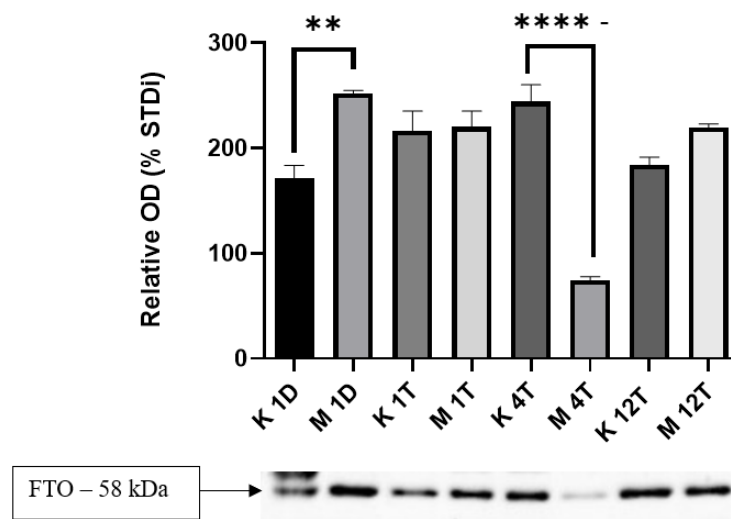
Obrázek 4.6: **Stanovení exprese proteinu FTO v PFC.** Hladina FTO byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, ** odpovídá $p < 0,01$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i; 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.7: **Stanovení exprese proteinu FTO v HIPP.** Hladina FTO byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i; 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.8: **Stanovení exprese proteinu FTO v STR.** Hladina FTO byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.9: **Stanovení exprese proteinu FTO v CRB.** Hladina FTO byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, ** odpovídá $p < 0,01$; **** odpovídá $p < 0,0001$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.

4.2.3 Exprese demethylázy ALKBH5 v mozkových strukturách

V prefrontálním kortexu byly během období jednoho dne, jednoho týdne a dvanácti týdnů pozorovány tendence ke změnám hladin demethylázy ALKBH5, které však nebyly statisticky signifikantní. Po jednodenní abstinenci bylo zaznamenáno

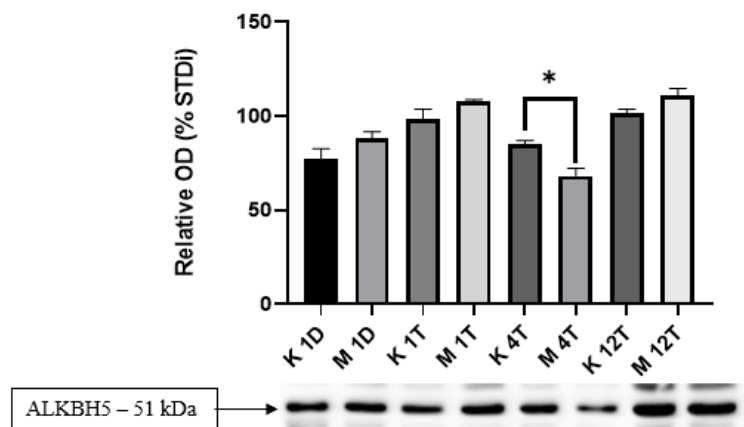
mírné zvýšení hladin tohoto proteinu u morfinové skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, avšak bez statistického významu. Tato tendence ke zvýšení hladiny ALKBH5 byla pozorována i po týdnu abstinence u skupiny M 1T ve srovnání s kontrolou, ale rovněž bez statistické signifikance. Ve čtvrtém týdnu abstinence došlo k významnému, statisticky signifikantnímu poklesu hladiny ALKBH5 u morfinové skupiny M 4T oproti kontrolní skupině K 4T ($p = 0,0230$).

Po dvanácti týdnech abstinence byla pozorována tendence ke zvýšení hladiny této demetylázy u morfinové skupiny M 12T ve srovnání s kontrolní skupinou K 12T, avšak bez signifikantního rozdílu. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 4.10.

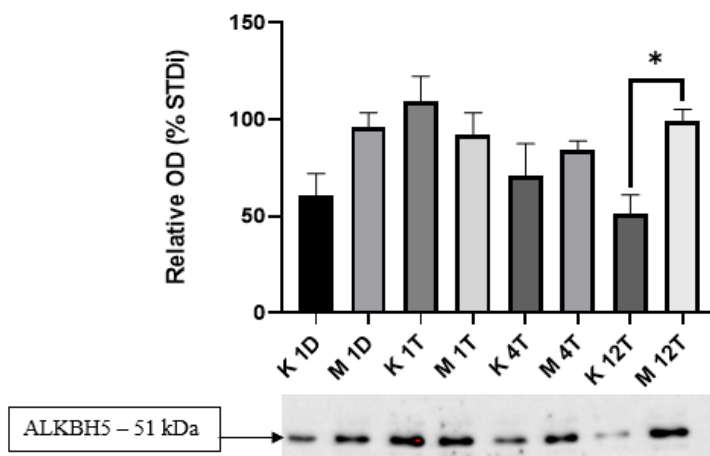
Analýza hladin demetylázy ALKBH5 v hipokampu (viz graf 4.11) ukazuje, že během různých časových úseků abstinence došlo k variabilním změnám v hladinách této demetylázy. V prvních třech časových úsecích abstinence (1D, 1T, a 4T) nebyly nalezeny statisticky významné změny. V období jednodenní abstinence byly pozorovány tendence ke zvýšení hladin ALKBH5 u morfinové skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, avšak tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Po jednotýdenní abstinenci byly hladiny ALKBH5 mírně snižené u skupiny závislé na morfinu M 1T ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T, ale ani tyto změny nebyly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní. Ve čtyřtýdenním intervalu abstinence bylo pozorováno mírné zvýšení hladiny ALKBH5 u morfinové skupiny M 4T ve srovnání se skupinou kontrolní K 4T, nicméně tento rozdíl také nebyl statisticky signifikantní. Po 12 týdnech abstinence bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení hladin demetylázy ALKBH5 u morfinové skupiny M 12T ve srovnání s kontrolní skupinou K 12T ($p = 0,0283$).

Analýza hladin demetylázy ALKBH5 ve *striatu* po různých obdobích abstinence ukazuje, že žádné z období nevykázalo statisticky signifikantní rozdíly mezi závislými a kontrolními skupinami. Konkrétně po jednodenní abstinenci bylo zjištěno, že hladiny ALKBH5 v morfinové skupině M 1D byly mírně snižené oproti kontrolní skupině K 1D, avšak tento rozdíl nebyl statisticky významný. Po jednotýdenní abstinenci nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna hladin mezi skupinou M 1T a kontrolou K 1T. Také ve čtyřtýdenním a dvanáctitýdenním období abstinence (M 4T a M 12T) byly hladiny ALKBH5 podobné jako u příslušných kontrolních skupin (K 4T a K 12T), s jen mírnými fluktuacemi, které nebyly statisticky signifikantní. Tyto výsledky jsou zobrazené v grafu 4.12.

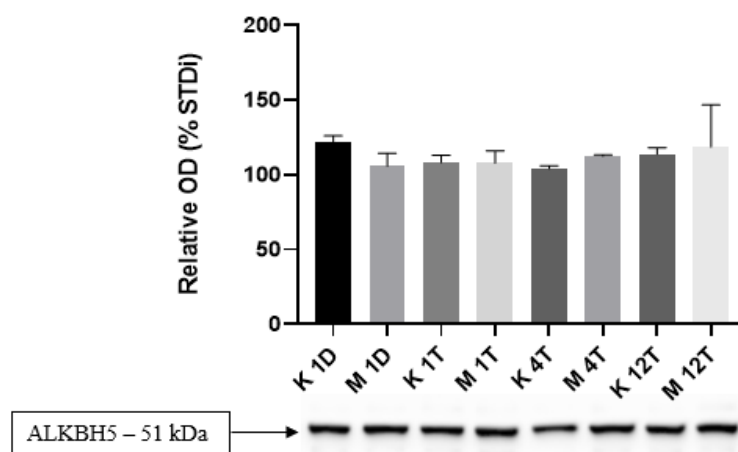
Výsledky z *cerebella* ukazují, že ve skupině po jednodenní abstinenci byly hladiny ALKBH5 statisticky významně vyšší u morfinové skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D ($p = 0,0033$). V období jednotýdenní abstinence měly hladiny demetylázy tendenci snižovat se u morfinové skupiny M 1T ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T, ale tato změna nebyla statisticky signifikantní. Ve čtvrtém týdnu abstinence došlo k výraznému zvýšení hladiny ALKBH5 u morfinové skupiny M 4T oproti kontrolní skupině K 4T, což bylo signifikantní ($p = 0,0011$). Tento trend zvýšení pokračoval i po dvanáctitýdenní abstinenci, kdy hladiny ALKBH5 u morfinové skupiny M 12T byly vyšší než u kontrolní K 12T ($p = 0,0212$). Výsledky jsou ukázány v grafu 4.13.



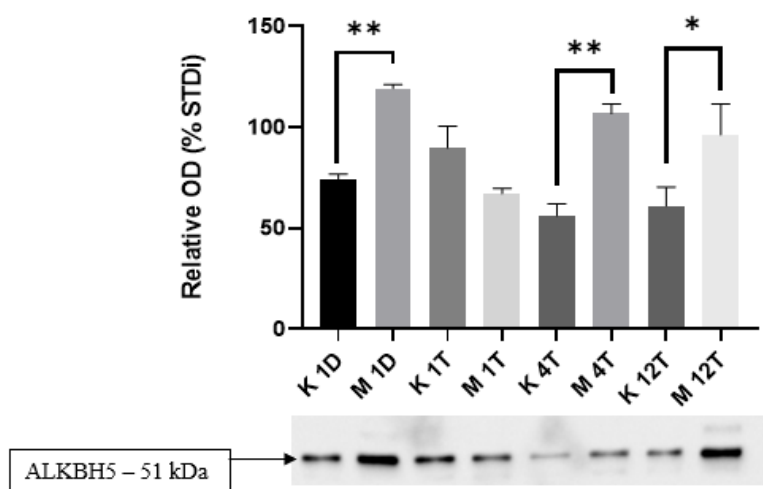
Obrázek 4.10: **Stanovení exprese proteinu ALKBH5 v PFC.** Hladina ALKBH5 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i ; 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.11: **Stanovení exprese proteinu ALKBH5 v HIPP.** Hladina ALKBH5 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i ; 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.12: **Stanovení exprese proteinu ALKBH5 v STR.** Hladina ALKBH5 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.13: **Stanovení exprese proteinu ALKBH5 v CRB.** Hladina ALKBH5 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, ** odpovídá $p < 0,01$; * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.

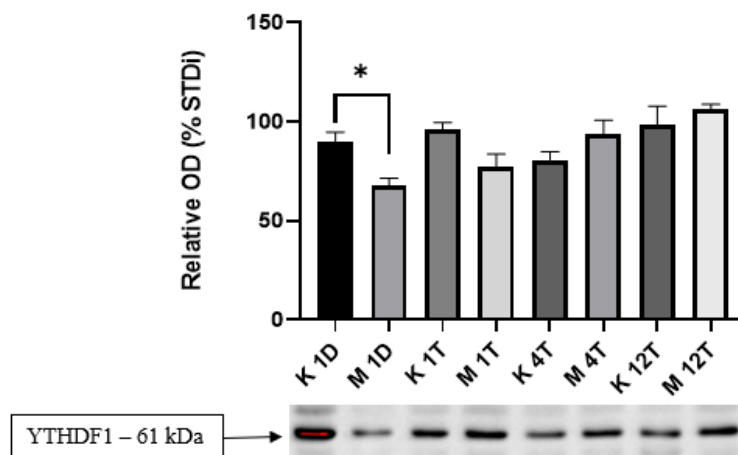
4.2.4 Exprese čtecího proteínu YTHDF1 v mozkových strukturách

Graf 4.14 ukazuje, že statisticky významný rozdíl v hladinách proteínu YTHDF1 v prefrontálním kortexu byl zjištěn pouze mezi kontrolní skupinou K 1D a skupinou závislou na morfinu M 1D po 1 dni abstinence, přičemž morfinová skupina měla nižší hladiny YTHDF1 než kontrolní ($p = 0,0380$). V ostatních časových intervalech (1 týden, 4 týdny, 12 týdnů) nebyly mezi kontrolními a morfinovými skupinami zjištěny statisticky významné rozdíly. Po 1 týdnu abstinence byla tendence k mírnému snížení hladin YTHDF1 u morfinové skupiny M 1T ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T, avšak tato změna nebyla statisticky signifikantní. V obdobích čtyř a dvanácti týdnů abstinence měly hladiny YTHDF1 tendenci ke zvýšení ve srovnání s kontrolními skupinami, avšak ani tyto změny nebyly statisticky signifikantní.

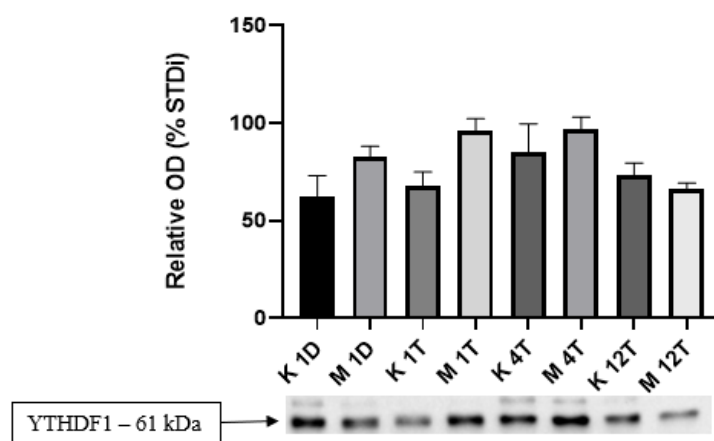
Hladiny YTHDF1 v hipokampu vykazovaly tendenci k mírnému zvýšení u morfinových skupin M 1D, M 1T a M 4T ve srovnání s jejich kontrolními skupinami. Tyto změny však nebyly statisticky signifikantní. Při dvanáctitýdenní abstinenci vykazovala morfinová skupina M 12T opačnou tendenci snížení ve srovnání s kontrolní skupinou K 12T, avšak ani tato změna nebyla statisticky významná. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 4.15.

V analýze hladin YTHDF1 ve *striatu* nebyly v žádném z časových intervalů (1 den, 1 týden, 4 týdny, 12 týdnů) zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kontrolními skupinami a skupinami závislými na morfinu. Během jednodenní abstinence nebyly mezi morfinovou skupinou M 1D a kontrolní skupinou K 1D pozorovány žádné výrazné změny, a případné rozdíly nebyly statisticky signifikantní. V období jednotýdenní abstinence měly hladiny YTHDF1 tendenci mírně stoupat u skupiny závislé na morfinu M 1T ve srovnání s kontrolní skupinou K 1T, avšak bez statistického významu. Podobný vzor byl pozorován i po čtyřech týdnech abstinence, kdy tendence ke změně hladin také nebyla statisticky signifikantní. Po dvanácti týdnech abstinence byly hladiny YTHDF1 mezi kontrolní skupinou K 12T a morfinovou skupinou M 12T relativně stabilní, a podobné, bez statisticky významného rozdílu. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 4.16.

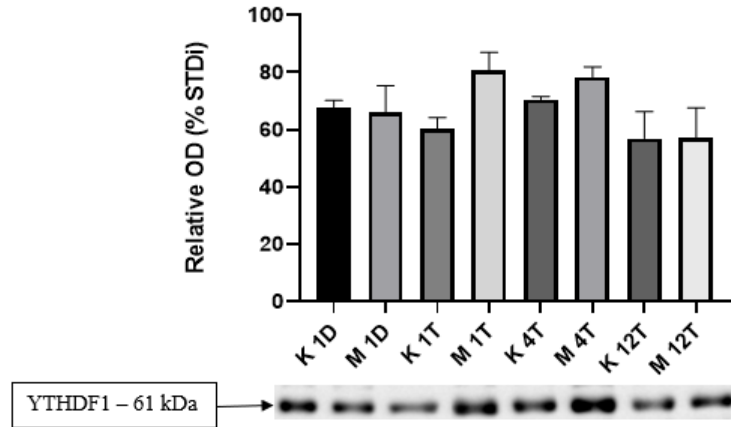
Výsledky exprese hladin čtecího proteínu YTHDF1 v *cerebellu* ukázaly, že po jednodenní abstinenci došlo k výraznému zvýšení tohoto proteínu u morfinové skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, které bylo statisticky signifikantní ($p = 0,0002$). Po jednom týdnu abstinence hladiny YTHDF1 u morfinové skupiny M 1T vykazovaly mírný pokles oproti kontrolní skupině K 1T, avšak tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Podobná tendence poklesu hladin YTHDF1 byla pozorována i ve čtvrtém týdnu abstinence, ale ani v tomto případě nedošlo k statisticky významným rozdílům. Po dvanácti týdnech abstinence bylo u morfinové skupiny M 12T zaznamenáno mírné zvýšení hladin YTHDF1 ve srovnání s kontrolní K 12T, ale ani tyto změny nebyly statisticky významné. Výsledky jsou zobrazené v grafu 4.17.



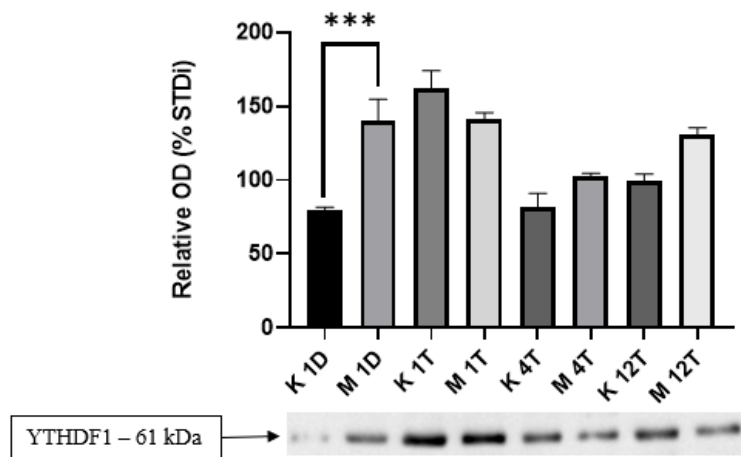
Obrázek 4.14: **Stanovení exprese proteinu YTHDF1 v PFC.** Hladina YTHDF1 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.15: **Stanovení exprese proteinu YTHDF1 v HIPP.** Hladina YTHDF1 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.16: **Stanovení exprese proteinu YTHDF1 v STR.** Hladina YTHDF1 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.17: **Stanovení exprese proteinu YTHDF1 v CRB.** Hladina YTHDF1 byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, *** odpovídá $p < 0,001$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.

4.3 Vliv morfinové abstinence na expresi transkripčních faktorů

Vliv morfinové abstinence na expresi transkripčních faktorů byl zkoumán u Δ FosB a transkripčního represoru MeCP2 v různých mozkových strukturách a různých časových úsecích abstinence. Zkoumané mozkové struktury zahrnovaly prefrontální kůru (PFC), hipokampus (HIPP), *striatum* (STR) a *cerebellum*

(CRB). Časové úseky abstinence byly 1 den (1D), 1 týden (1T), 4 týdny (4T) a 12 týdnů (12T) jak u skupiny závislé na morfinu (M), tak u kontrolních skupin, kterým byl podáván fyziologický roztok (K). Úrovně exprese jednotlivých proteinů byly sledovány pomocí techniky Western blot. Pro statistickou analýzu One-way ANOVA bylo použito pět měření.

4.3.1 Exprese Δ FosB v mozkových strukturách

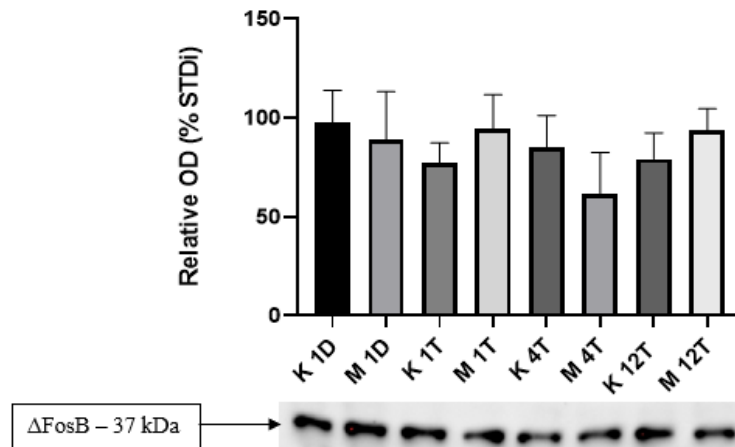
Výsledky z prefrontálního kortexu ukazují (viz graf 4.18), že po jednodenní abstinenci měly hladiny Δ FosB tendenci k mírnému snížení v morfinové skupině M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, avšak tento pokles nebyl statisticky signifikantní. Po jednotýdenní abstinenci bylo naopak pozorováno mírné zvýšení hladin Δ FosB v morfinové skupině M 1T, které rovněž nepřesáhlo hranici statistické významnosti. Ve čtyřtýdenním intervalu se hladiny Δ FosB u závislé skupiny M 4T opět snížily, ale bez signifikantních rozdílů. Po dvanácti týdnech abstinence bylo zaznamenáno další zvýšení hladin Δ FosB u morfinové skupiny M 12T, které však také nebylo statisticky významné.

Analýza dat z hipokampu ukázala, že během sledovaných období byly tendence k různým změnám v hladinách Δ FosB, nicméně žádná z těchto změn nebyla statisticky signifikantní. Po jednodenní abstinenci bylo zaznamenáno mírné zvýšení hladin Δ FosB ve skupině závislé na morfinu M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D. Podobná situace byla pozorována i po jednom týdnu abstinence, avšak ani tyto změny nebyly statisticky signifikantní. Ve čtyřtýdenním intervalu abstinence byly hladiny Δ FosB mezi zvířaty závislými na morfinu M 4T a kontrolní skupinou K 4T podobné. Po dvanácti týdnech abstinence bylo zaznamenáno mírné snížení hladin Δ FosB u skupiny závislé na morfinu M 12T, které rovněž nebylo statisticky významné. Výsledky těchto pozorování jsou ilustrovány na příloženém grafu, který zobrazuje fluktuace hladin Δ FosB v průběhu různých období abstinence 4.19.

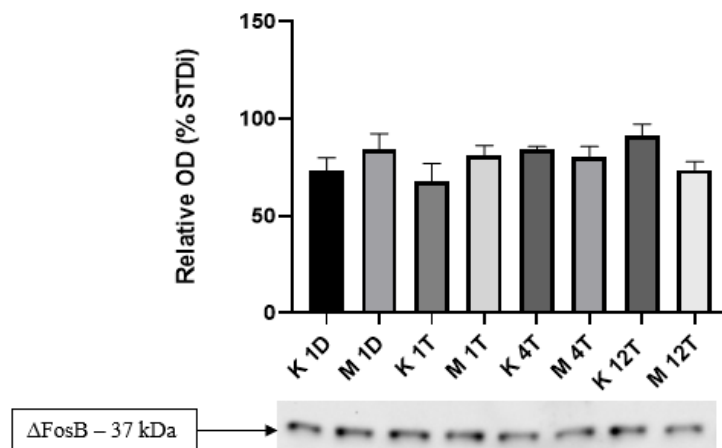
Ve *striatu* analýza hladin Δ FosB ukazuje (viz graf 4.20), že během různých časových úseků abstinence došlo k variabilním změnám hladin tohoto faktoru. V prvních třech časových úsecích abstinence (1D, 1T a 4T) nebyly nalezeny statisticky významné změny. V období jednodenní abstinence byly pozorovány tendence hladin Δ FosB u morfinové skupiny M 1D být lehce zvýšené oproti kontrolní skupině K 1D, ačkoliv tento rozdílní nebyl statisticky signifikantní. Naopak tomu bylo po 1 týdnu abstinence, kdy hladiny transkripčního faktoru byly sníženy u skupiny závislé na morfinu M 1T vůči kontrolní skupině K 1T. Tyto změny nebyly rovněž vyhodnoceny jako statisticky signifikantní, i když se blížily hranici statistické významnosti. V období 4 týdnů abstinence byly pozorovány podobné tendence ve zvýšení hladiny Δ FosB u morfinové skupiny M 4T vůči kontrolní skupině K 4T jako u jednodenní abstinence. Nicméně tento rozdíl nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Po 12 týdnech abstinence bylo zaznamenáno významné zvýšení hladin transkripčního faktoru u morfinové skupiny M 12T v porovnání se skupinou kontrolní K 12T ($p = 0,0342$).

Analýza dat v *cerebellu*, ilustrovaná grafem 4.21, ukázala, že v období jednodenní a jednotýdenní abstinence měly hladiny Δ FosB u skupin závislých na morfinu tendenci být mírně zvýšené oproti kontrolním skupinám. Tyto změny však nebyly statisticky signifikantní. Ve čtvrtém týdnu abstinence došlo k vý-

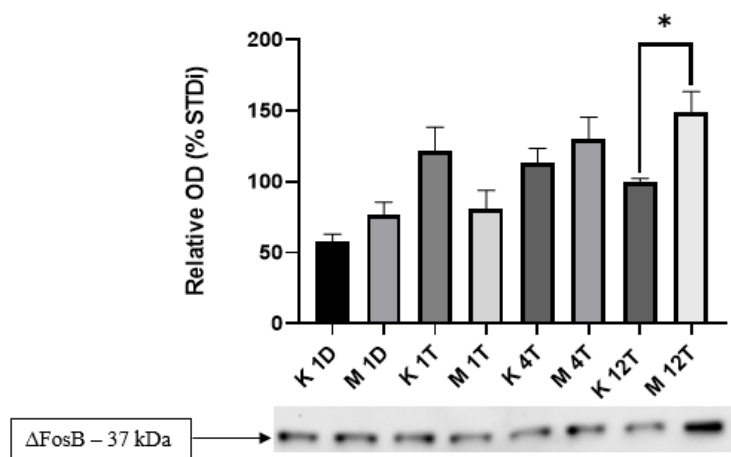
znamnému poklesu hladin Δ FosB u skupin závislých na morfinu M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T. Tato změna byla statisticky signifikantní ($p = 0,0487$). V období dvanácti týdnů abstinence byly hladiny transkripčního faktoru mírně sniženy u morfinové skupiny M 12T ve srovnání s kontrolní skupinou K 12T, ale nebyla zde statisticky významná změna.



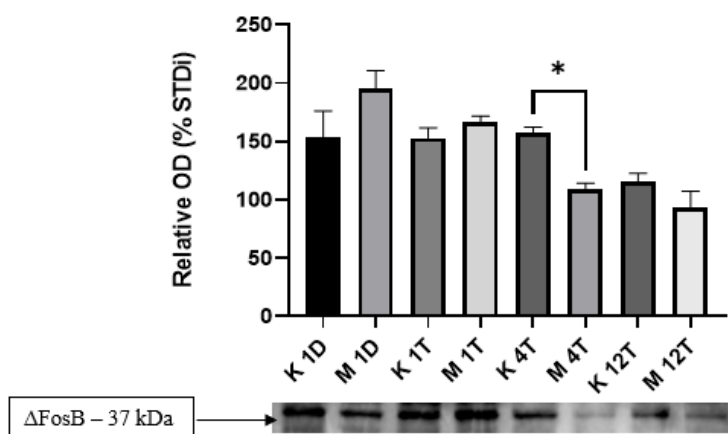
Obrázek 4.18: **Stanovení exprese proteinu Δ FosB v PFC.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.19: **Stanovení exprese proteinu Δ FosB v HIPp.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.20: **Stanovení exprese proteinu Δ FosB v STR.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.21: **Stanovení exprese proteinu Δ FosB v CRB.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.

4.3.2 Exprese MeCP2 v mozkových strukturách

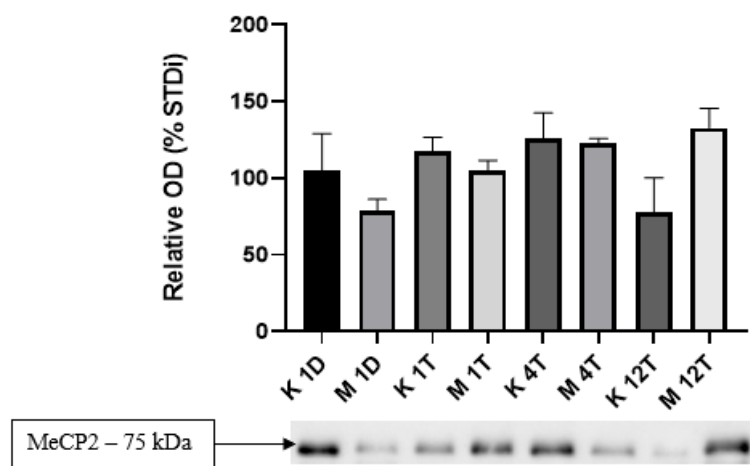
Analýzy hladin MeCP2 v prefrontálním kortexu (demonstrace výsledků viz graf 4.22) ukazují tendence ke změnám, ale žádná změna nebyla signifikantní. Konkrétně po jednodenní abstinenci byly hladiny MeCP2 ve skupině závislé na morfinu M 1D mírně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D. Stejně tomu tak bylo i u 1 týdne abstinence, avšak tyto rozdíly nebyly statisticky signifikantní. Ve čtyřtýdenním intervalu byly hladiny MeCP2 téměř shodné mezi závislými M 4T

a kontrolními skupinami K 4T bez statisticky významných rozdílů. Po dvanácti týdnech abstinence bylo zaznamenáno mírné zvýšení hladin MeCP2 v morfinové skupině M 12T ve srovnání s kontrolní skupinou K 12T, avšak i tento rozdíl zůstal pod hranicí statistické signifikance.

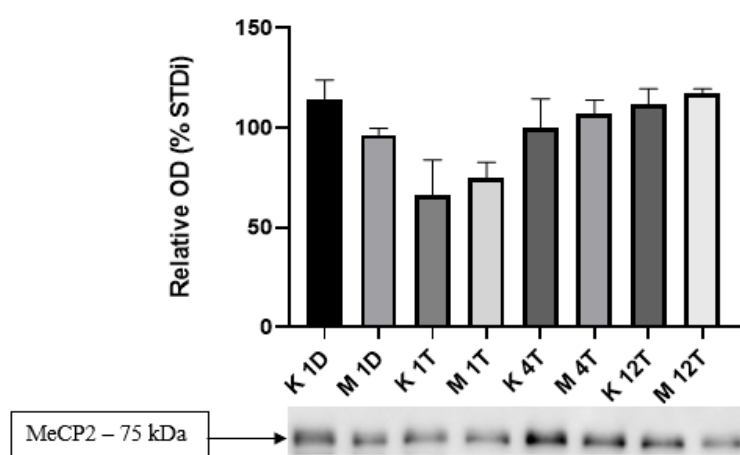
Výsledky zkoumání hladin MeCP2 z hipokampu ukazují tendence ke změnám, avšak konkrétní srovnání mezi skupinami závislými na morfinu v různých úsecích abstinence (M) a odpovídajícími kontrolními skupinami (K) nevykázalo žádné statisticky signifikantní rozdíly. Konkrétně, po jednodenní abstinenci došlo k mírnému poklesu hladiny MeCP2 u morfinové skupiny M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D, ale rozdíl nebyl statisticky významný. U skupin, které abstinovaly 1 týden, 4 týdny a 12 týdnů, byly hladiny MeCP2 mírně vyšší u morfinových skupin ve srovnání s příslušnými kontrolními skupinami, avšak ani tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Tyto výsledky jsou zobrazeny v grafu 4.23.

Analýza hladin transkripčního represoru MeCP2 ve *striatu* během různých období abstinence (viz graf 4.24) neodhalila žádné statisticky signifikantní změny v expresi. Během prvního dne a prvního týdne abstinence byla pozorována tendence k mírnému snížení hladin MeCP2 ve skupinách závislých na morfinu (M) ve srovnání s příslušnými kontrolními skupinami (K). Avšak tyto změny nebyly statisticky signifikantní. Naopak po čtyřech a dvanácti týdnech abstinence byly tendence hladin MeCP2 ve skupinách závislých lehce zvýšené oproti kontrolním skupinám, ale ani tyto rozdíly nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné.

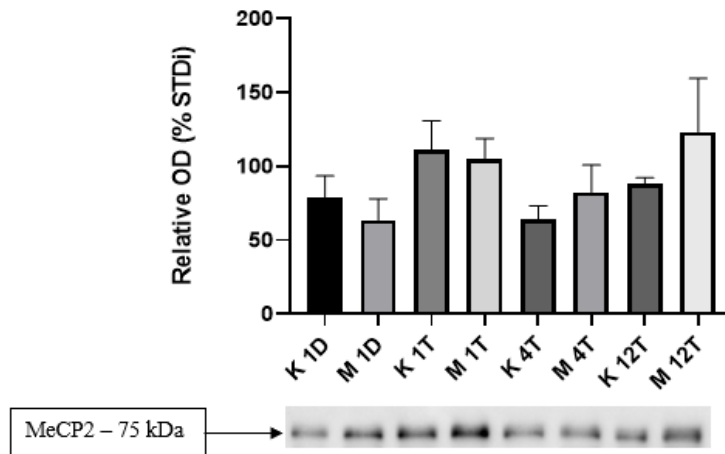
Hladiny exprese MeCP2 v *cerebellu*, zobrazené v grafu 4.25, vykazují statisticky významné rozdíly mezi některými porovnávanými skupinami v různých obdobích abstinence. Jednodenní abstinence ukázala signifikantní zvýšení hladin MeCP2 ve skupině závislé na morfinu M 1D ve srovnání s kontrolní skupinou K 1D ($p = 0,0499$). Po jednom týdnu abstinence byly hladiny MeCP2 podobné mezi morfinovou skupinou M 1T a kontrolní skupinou K 1T, bez statisticky signifikantního rozdílu. Ve čtyřtýdenním abstinencečním intervalu bylo zaznamenáno signifikantní snížení hladin MeCP2 ve skupině závislé na morfinu M 4T ve srovnání s kontrolní skupinou K 4T ($p < 0.0001$). Po dvanácti týdnech abstinence nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi morfinovou skupinou M 12T a kontrolní skupinou K 12T. Hladiny MeCP2 byly v tomto intervalu velmi podobné, s minimální tendencí ke zvýšení ve skupině M12T.



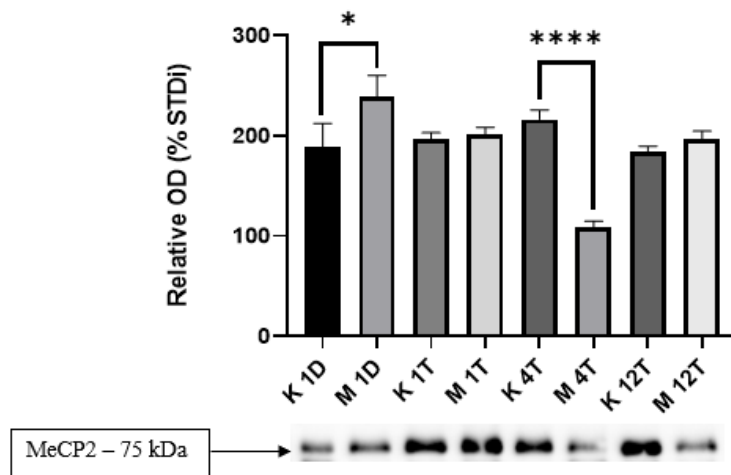
Obrázek 4.22: **Stanovení exprese proteinu MeCP2 v PFC.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.23: **Stanovení exprese proteinu MeCP2 v HIPP.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.24: **Stanovení exprese proteinu MeCP2 v STR.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.



Obrázek 4.25: **Stanovení exprese proteinu MeCP2 v CRB.** Hladina Δ FosB byla stanovena pomocí techniky WB. Sloupce grafů zobrazují průměr 4 až 5 hodnot \pm S.E.M. získaných z pěti nezávislých měření, * odpovídá $p < 0,05$; **** odpovídá $p < 0,0001$. Na ose y je zobrazená relativní optická denzita jednotlivých skupin K a M vzhledem k internímu standardu (STD_i 100 %). Ve spodní části je přiložen reprezentativní imunoblot.

5. Diskuse

Přestože některé studie odhalily řadu epigenetických změn po expozici morfinu a obecně opioidům, stále zůstávají neprozkoumaná časová období po ukončení užívání morfinu. Stále jsou mezery v poznání časové dynamiky těchto změn. Výzkumy věnujících se abstinenci období po ukončení užívání morfinu ve spojitosti s epigenetickými mechanismy je jen velmi málo. Studie zabývající se funkcí epitranskriptomu v závislosti na morfinu nebo morfinovou abstinencí prakticky neexistují. I proto bylo cílem této práce pozorovat vliv různých časových úseků morfinové abstinence na epitranskriptom – konkrétně m⁶A modifikaci a enzymů, které se této modifikaci účastní. Dalším dílčím úkolem bylo prozkoumat vliv morfinové abstinence na transkripční regulátory, které jsou taktéž zapojené do epigenetických mechanismů v opiátové závislosti, ale jejich vliv v období abstinence zatím nebyl příliš prozkoumaný.

Jednou z nejčastějších RNA posttranskripčních úprav je m⁶A modifikace. Vzhledem k tomu, že výzkumy ukazují zapojení m⁶A modifikace v reakcích organismu na stres (Engel et al., 2018), modulaci synaptické plasticity (Widagdo et al., 2022) a regulaci náladových poruch (Barbon and Magri, 2020), bylo vhodné zkoumat její potenciální roli v morfinové abstinenci.

V naší práci byly analyzovány hladiny N⁶-metyl-adenosinu (m⁶A) v různých oblastech mozku potkanů, kteří procházeli různě dlouhými úseky abstinence. Výsledky ukázaly tendence ke změnám v hladinách m⁶A, ale tyto změny nebyly statisticky signifikantní v žádné z testovaných mozkových struktur. Tato zjištění korespondují s výsledky studie Wu et al., 2024, která také nenalezla signifikantní rozdíly v globálních hladinách m⁶A při akutní ani chronické expozici morfinu. Konkrétně naše výsledky z prefrontálního kortexu u skupin závislých na morfinu v období jednodenní a čtyřtýdenní abstinence ukazují tendenci k poklesu hladin m⁶A. Naopak u morfinových skupin v době čtyřtýdenní a dvanáctitýdenní abstinence došlo k mírnému nárůstu hladin oproti kontrolním skupinám, avšak tyto změny nebyly statisticky významné. V hipokampu a *striatu* byla zjištěna tendence k mírnému snížení hladin m⁶A u skupin závislých na morfinu oproti kontrolám během jednodenní, týdenní a dvanáctitýdenní abstinence. Naopak ve čtvrtém týdnu abstinence byly hladiny m⁶A mírně zvýšené ve srovnání s kontrolami, ale opět bez statistické významnosti. V *cerebellu* se u skupin závislých na morfinu během jednodenní, čtyřtýdenní a dvanáctitýdenní abstinence projevila tendence ke zvýšení hladin m⁶A ve srovnání s příslušnými kontrolními skupinami.

Tato zjištění poukazují na možné potvrzení, že změny v m⁶A modifikacích nejsou klíčové pro adaptivní změny v mozku potkana vyvolané morfinovou abstinencí. To může podporovat předpoklad, že reakce mozku na morfinovou abstinenci může být ovlivněna jinými mechanismy, než je modifikace m⁶A. Jako například změny v metylaci DNA nebo posttranslační modifikace histonů, které byly prokázány při akutním nebo chronickém podání morfinu. Je nutné zdůraznit, že i když analýzy neprokázaly statisticky signifikantní změny, citlivost metody mohla ovlivnit schopnost detekovat jemnější změny. Navíc analýza enzymů zapojených do m⁶A modifikace odhalila několik signifikantních změn. Jedním z limitujících faktorů experimentu bylo použití monoplíkatů pro každý vzorek, což omezovalo možnost opakování měření a mohlo zvyšovat riziko náhodných odchylek v datech.

METTL3 je metyltransferáza, která se účastní m⁶A modifikace. Funguje společně s dalšími komponentami metyltransferázového komplexu (MAC) pro efektivní a přesnou metylaci RNA (Wang et al., 2016). Nicméně v současné době nejsou známy konkrétní informace o roli METTL3 ve spojení se závislostí. V již zmíněné studii Wu et al., 2024, která se zabývala m⁶A dráhou, bylo zjištěno, že nedošlo k žádným signifikantním změnám v expresi tohoto enzymu v mozku myši po akutním vystavení morfinu.

Naše výsledky analýzy hladin METTL3 ukazují, že v prefrontálním kortexu v období jednodenní abstinence bylo pozorováno mírné, nesignifikantní zvýšení METTL3 u skupiny závislé na morfinu ve srovnání se skupinou kontrolní. Naopak tomu bylo po jednom týdnu abstinence, kde byla tendence k mírnému poklesu hladin METTL3, také bez statistické významnosti. Čtyřtýdenní a dvanáctitýdenní abstinence ukázaly zajímavý trend, kdy došlo k signifikantnímu zvýšení hladin METTL3 u skupin závislých na morfinu ve srovnání se skupinami kontrolními. To může naznačovat možnou adaptivní reakci na střednědobou až dlouhodobou abstinenci v prefrontálním kortexu. V hipokampu nedošlo k žádné signifikantní změně v hladinách METTL3. Tendence ke zvýšení hladin METTL3 byla pozorována téměř ve všech časových úsecích u morfinových skupin vůči kontrolním skupinám. Nicméně žádná ze změn nebyla statisticky signifikantní. To může naznačovat mírnější nebo kompenzovanou reakci v hipokampu na morfinovou abstinenci. Ve *striatu* byl zajímavý abstinence úsek jeden týden, kde došlo k významnému nárůstu hladin METTL3 u skupiny závislé na morfinu oproti skupině kontrolní, což může odrážet specifickou reakci v této mozkové oblasti na krátkodobou abstinenci nebo reakci na stres ze vzniklých abstinence symptomů (Engel et al., 2018). V ostatních časových úsecích abstinence nebyly zaznamenány žádné změny v hladinách METTL3 jako statisticky signifikantní. V *cerebellu* došlo během čtyřtýdenní abstinence k významnému poklesu hladin METTL3 u skupiny závislé na morfinu v porovnání s kontrolní skupinou. Tato změna může představovat adaptivní procesy v *cerebellu*, které by mohly ovlivnit motorické a kognitivní funkce. Změny v hladinách METTL3 naznačují, že *cerebellum* se může aktivně účastnit regulace těchto funkcí v reakci na dlouhodobou absenci morfinu.

I když je METTL3 enzymem odpovědným za metylaci, námi zjištěné změny v jeho hladinách nekorelovaly přímo se změnami v hladinách m⁶A. To může naznačovat, že jiné faktory, jako jsou kofaktory a další enzymy z komplexu MAC, mohou ovlivňovat aktivitu a efektivitu METTL3.

FTO je enzym, který společně s ALKBH5 katalyzuje demetylaci N⁶-metyl-adenosinu. Jsou k dispozici studie, které uvádí, že hladiny FTO v hipokampu se snižují u myši závislých na kokainu (Xue et al., 2021). Také bylo prokázáno že gen *Fto*, je klíčovým regulátorem dopaminergních signálních drah a že jeho inaktivace vede k poruše dopaminových receptorů D2 a D3 u myši závislých na kokainu (Hess et al., 2013). Některé varianty FTO mohou korelovat se zvýšeným rizikem rozvoje alkoholové závislosti (Sobczyk-Kopciol et al., 2011). Již v mnohokrát zmiňované studii Wu et al., 2024, nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v hladinách transkriptu pro FTO u myši, kterým byl akutně podáván morfin.

V rozporu se studií Wu et al., 2024 v naší práci byly odhaleny značné fluktuace a signifikantní změny v hladinách FTO. Naše výsledky analýzy hladin FTO z prefrontálního kortexu ukazují, že byly změny v hladinách této demetylázy během abstinence proměnlivé, což může naznačovat, že dynamika změn v hladi-

nách FTO může být spojena s rozdílnými fázemi procesu abstinence. Signifikantní zvýšení hladin FTO po čtyřech týdnech abstinence u skupiny závislé na morfinu v porovnání se skupinou kontrolní může poukazovat na adaptivní změnu v reakci na střednědobou absenci morfinu, zatímco krátkodobé tendence k fluktuacím mohou odrážet přechodné adaptivní procesy. V hipokampu nebyly zaznamenány statisticky významné změny, což může naznačovat, že v této oblasti mozku mohou být hladiny FTO méně ovlivněny morfinovou abstinencí. Ve *striatu* hladiny FTO ukázaly jen mírné, nevýznamné tendence k fluktuacím během různých fází abstinence. Tato zjištění odpovídají i výsledkům z analýzy m⁶A modifikace. V *cerebellu* byly zaznamenány statisticky významné změny ve dvou fázích abstinence, což poukazuje na možnou specifickou roli FTO v této oblasti mozku v odpovědi na morfinovou abstinenci. Významné zvýšení hladin FTO bylo prokázáno v období jednodenní abstinence u skupiny závislé na morfinu v porovnání se skupinou kontrolní. Naopak další významná změna proběhla ve čtyřech týdnech abstinence. Došlo k velice výraznému snížení hladiny FTO v morfinové skupině vůči té kontrolní. Ve dvanácti týdnech abstinence měly hladiny FTO tendence k růstu u morfinové skupiny, které ale nebyly signifikantní.

Celkově byly pozorovány signifikantní změny, zejména ve čtyřtýdenním a dvanáctitýdenním intervalu abstinence v prefrontálním kortexu a *cerebellu*, což naznačuje, že FTO může hrát roli v reakci na střednědobou až dlouhodobou morfinovou abstinenci. Na druhou stranu, změny v hladinách m⁶A nebyly statisticky signifikantní v žádném zkoumaném časovém období ani mozkové oblasti. To může naznačovat, že i když FTO je zapojena do regulace m⁶A, její aktivita a výsledné změny v hladinách m⁶A mohou být ovlivněny i jinými faktory. Navíc ve studii Engel et al., 2018 bylo zjištěno, že delece genu *Fto* neovlivnila hladiny m⁶A, což naznačuje, že je místně specifická.

ALKBH5 je demetyláza, která společně s FTO zajišťuje m⁶A demetylaci. Stejně jako u předchozích enzymů studie Wu et al., 2024 neodhalila žádné významné změny v hladinách této demetylázy v období akutního podávání morfinu. To je ovšem v rozporu s výsledky, které přinesla naše práce.

V prefrontálním kortexu, i přes mírné tendence k fluktuacím hladin ALKBH5 během jednodenní a týdenní abstinence, se neprokázal žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami závislými na morfinu a jejich odpovídajícími kontrolními skupinami. Signifikantní pokles u skupiny závislé na morfinu ve srovnání se skupinou kontrolní nastal pouze po čtyřech týdnech abstinence. Tato změna může ukazovat na adaptivní epitranskriptomickou odpověď v této mozkové oblasti, která je známá svou rolí v regulaci kognitivních a emocionálních funkcí. V hipokampu měly hladiny ALKBH5 tendence k fluktuacím v období abstinence jeden den, jeden a čtyři týdny, ale žádná z těchto změn nebyla statisticky významná. Až ve dvanáctém týdnu abstinence bylo pozorováno signifikantní zvýšení u skupiny závislé na morfinu v porovnání se skupinou kontrolní. Ve *striatu* nebyly prokázány žádné signifikantní změny, stejně jako u hladin FTO nebo N⁶-metyl-adenosinu. Hladina demetylázy zde byla poměrně konstantní. To může naznačovat, že v této oblasti není vliv morfinové abstinence na hladiny ALKBH5, FTO a N⁶-metyl-adenosinu přímo zřejmý nebo že jejich aktivita je stabilizována jinými regulačními mechanismy. V *cerebellu* byl zaznamenán signifikantní vzestup hladin ALKBH5 po jednodenní abstinenci a opětovný nárůst po čtyřech a dvanácti týdnech u skupin závislých na morfinu v porovnání s jejich kontrolními skupinami. Zvláště

pozoruhodné je, že výrazné změny hladin ALKBH5 v hipokampu a *cerebellu* po dvanácti týdnech abstinence mohou naznačovat dlouhodobější adaptace v těchto oblastech, které jsou klíčové pro paměť a motorickou kontrolu.

Bylo zjištěno, že v reakci na stres demetylázy FTO a ALKBH5 jsou odlišně regulovány regionálně specifickým způsobem, což může být vysvětlením odlišných hladin u FTO, ALKBH5 a m⁶A modifikace (Engel et al., 2018). Celkově výsledky naznačují, že dynamika hladin ALKBH5 v mozku potkana v morfinovém abstinčním období je místně specifická a závisí na délce abstinence.

YTHDF1 je čtecí protein, který hraje klíčovou roli v rozpoznávání a vázání se na RNA obsahující modifikaci N⁶-metyladenosin. YTHDF1 specificky rozpoznává m⁶A značky a vede k regulaci zrání a různých dalších modifikací RNA (Meyer et al., 2012). Ve studii Wu et al., 2024 autoři neobjevily žádné signifikantní změny v hladinách YTHDF1. Ale například u transkriptu čtecího proteinu Ythdf2 našly signifikantní snížení v hipokampu u závislých skupin myší. Stejně tak tomu bylo i u hladin Ythdf3 v oblastech NAc a hipokampu. Nicméně v hladinách transkriptu Ythdf1 změna nebyla, což ovšem nekoreluje s poznatky naší práce.

V naší práci bylo zjištěno, že hladiny YTHDF1 nevykázaly žádný konzistentní trend v reakci na morfinovou abstinenci ve většině mozkových oblastí a časových úsecích abstinence. Výjimkou bylo statisticky signifikantní snížení hladiny YTHDF1 ve skupině závislé na morfinu v porovnání se skupinou kontrolní v prefrontálním kortexu v době abstinence jednoho dne. Další signifikantní změnou v hladinách YTHDF1 bylo zvýšení v *cerebellu* u skupiny závislých na morfinu ve srovnání s jejich kontrolní skupinou v období jednoho dne abstinence.

Obecně v této práci nebyl prokázán jasný trend v růstu nebo poklesu hladin N⁶-metyl-adenosinu a enzymů zapojených do m⁶A modifikace. Možný rozkol ve výsledcích hladin N⁶-metyl-adenosinu a enzymů účastnících se této modifikace mohl být také důsledkem nevhodně zvolených metod. Ve studii Wu et al., 2024, která zjišťovala hladiny enzymů pomocí metody qPCR, nebyla pozorována žádná signifikantní změna v hladinách transkriptů proteinů zapojených do této modifikace, jako jsou METTL3, FTO, ALKBH5 a YTHDF1, což v důsledku korelovalo s výsledky z měření hladin m⁶A modifikace. Tato metoda může být vhodnější pro přesnější stanovení hladin těchto enzymů.

Známým účinkem jak akutního, tak chronického užívání morfinu je jeho vliv na epigenetické modifikace, které ovlivňují expresi transkripčního faktoru Δ FosB. Bylo zjištěno, že hyperacetylace H3K14 v BLA vyvolává zvýšenou expresi tohoto faktoru (Jalali Mashayekhi et al., 2019). Další výzkumy prokázaly, že zvýšené hladiny exprese Δ FosB jsou také spojeny se snížením metylačního stavu histonů (Chen et al., 2019a). Vliv akutní expozice morfinu byl zkoumán v *nucleus accumbens* (NAc), kde byly odhaleny vyšší hladiny transkripčního faktoru Δ FosB (Zachariou et al., 2006). Při chronickém podávání morfinu byl prokázán vliv na zvýšení hladin Δ FosB v NAc, prefrontálním kortexu a putamenu (Muller and Unterwald, 2005). Studie zabývající se obdobími abstinence po třech a čtrnácti dnech ukázala, že po třech dnech abstinence došlo v NAc k signifikantnímu zvýšení hladiny Δ FosB, nicméně po čtrnácti dnech abstinence tento trend vymizel a hladiny Δ FosB měly tendenci k poklesu. V oblasti ventrálního pallida bylo během tří dnů abstinence zaznamenáno stejné signifikantní zvýšení v morfinové

skupině. Tato tendence přetrvala i po čtrnácti dnech abstinence, ale již nebyla statisticky významná (McDaid et al., 2006).

Vzhledem k výsledkům studie Muller and Unterwald, 2005, která během chronického užívání morfinu zaznamenala zvýšení hladin Δ FosB v prefrontálním kortexu u skupiny závislých, se očekávalo, že hladiny Δ FosB v morfinových skupinách budou během prvního dne abstinence vyšší než v kontrolních skupinách. Naše výsledky však tento předpoklad nepotvrdily. V prvním dnu abstinence bylo zjištěno, že hladiny Δ FosB mají tendenci k poklesu u skupiny závislé na morfinu ve srovnání s kontrolní skupinou, avšak bez statisticky významné změny. V dalších obdobích abstinence, po jednom a dvanácti týdnech, byly hladiny Δ FosB mírně zvýšené u morfinových skupin ve srovnání s kontrolními, opět bez statisticky signifikantních změn. V hipokampu také nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v expresi transkripčního faktoru Δ FosB. V období abstinence jeden den a jeden týden měly hladiny Δ FosB tendenci být mírně zvýšené ve skupinách závislých na morfinu ve srovnání s kontrolními skupinami. Po čtyřtýdenní a dvanáctitýdenní abstinenci byly tendence hladin Δ FosB opačné, byly mírně sniženy v morfinových skupinách oproti kontrolním skupinám. Ve *striatu* byly pozorovány výraznější fluktuaace hladin Δ FosB. Bylo zde zaznamenáno statisticky významné zvýšení hladiny Δ FosB u skupiny závislé na morfinu ve srovnání s kontrolní skupinou po dvanácti týdnech abstinence. Tento náš nálezn není v souladu s výsledky studie, která zaznamenala signifikantní zvýšení hladiny Δ FosB v morfinové skupině potkanů po třídenní abstinenci, zatímco po čtrnácti dnech abstinence byla pozorována tendence ke snížení v oblasti NAc (McDaid et al., 2006). Zvýšené hladiny Δ FosB po dlouhodobé abstinenci mohou odrážet trvalé neuroplastické změny, které přispívají k prodlouženému bažení a riziku recidivy. V *cerebellu* měly hladiny Δ FosB tendenci ke zvýšení u závislých skupin na morfinu v porovnání s kontrolními skupinami v době abstinence jeden den a jeden týden, ale nebyly to změny signifikantní. Statisticky signifikantní pokles hladin Δ FosB byl zaznamenán u morfinové skupiny po čtyřech týdnech abstinence ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento nálezn naznačuje, že morfinová abstinence může významně ovlivnit i tuto oblast mozku, přestože její role v mechanismech závislosti na drogách je méně prozkoumána.

Celkově tato data naznačují, že dynamika hladin Δ FosB je místně specifická, ale jasný trend ve změnách hladin Δ FosB v závislosti na čase abstinence nebyl prokázán.

MeCP2 je protein, který hraje klíčovou roli v epigenetické regulaci genové exprese prostřednictvím vazby na metylované úseky DNA, kde většinou funguje jako transkripční represor. Dříve bylo prokázáno, že během opakované expozice morfinu, dochází ke zvýšení hladin MeCP2 v centrální části amgdaly, a ovlivňuje tak expresi genů (Zhang et al., 2014). Naopak v době morfinové abstinence bylo zjištěno, že jeho hladiny v CeA klesají (Ciccarelli et al., 2013)

V naší práci bylo zjištěno, že v prefrontálním kortexu, oblasti klíčové pro rozhodování a zpracování odměn, byly zaznamenány pouze mírné a statisticky nevýznamné změny v hladinách MeCP2 napříč všemi časovými body. Tyto nálezny mohou naznačovat, že morfinová abstinence nemusí mít významný dopad na regulaci MeCP2 v této oblasti mozku, což může odrážet adaptivní neuroplasticitu v reakci na morfinovou expozici a následnou abstinenci. V hipokampu byly také pozorovány pouze tendence k mírným změnám v hladinách MeCP2

bez dosažení statistické signifikance. Ve *striatu*, klíčové oblasti zapojené do systému odměny a motivace, nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní změny v expresi MeCP2. I když hladiny MeCP2 měly tendence k fluktuacím, nebyly vyhodnoceny jako signifikantní. Naproti tomu v *cerebellu* bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení hladin MeCP2 u skupiny závislé na morfinu ve srovnání se skupinou kontrolní po jednodenní abstinenci, což poukazuje na to, že *cerebellum* může být citlivé na počáteční fáze abstinence. Zvýšení hladiny MeCP2 může být reakcí na akutní absenci morfinu, která je spojená s abstinenčními příznaky. Naopak ve čtvrtém týdnu abstinence došlo k výraznému snížení hladiny MeCP2 ve skupině závislé na morfinu v porovnání se skupinou kontrolní. Tato změna může být reakcí na dlouhodobou absenci morfinu a může odrážet pokus o stabilizaci hladin MeCP2. Ve dvanáctitýdenní periodě již byly hladiny MeCP2 u morfinové skupiny srovnatelné se skupinou kontrolní.

Výsledky naší práce, která se týkala zkoumání hladin transkripčního regulátoru MeCP2, ukazují, že tento transkripční regulátor možná nehraje významnou roli v morfinové abstinenci. Ve většině mozkových oblastí nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna.

Součástí této diplomové práce měla být také analýza hladin metylace a hydroxymethylace DNA (5mC, 5hmC). Bohužel, jak jsem již zmínila v kapitole 3, nepodařilo se mi získat dostatečné množství DNA ze tkáně pro provedení těchto pokusů.

Závěr

V této práci jsme sledovali vliv morfinové abstinence na epitranskriptomické mechanismy a transkripční regulátory v mozku potkana závislého na morfinu během různě dlouhých období abstinence. Naše zjištění ukazují, že vliv morfinové abstinence na hladiny N⁶-metyl-adenosinu nebyl významný. Hladiny m⁶A měly tendence ke změnám v různých mozkových oblastech a úsecích abstinence, ale nebyly to změny signifikantní. Toto zjištění může poukazovat na fakt, že tato konkrétní epitranskriptomická modifikace nemusí být přímo ovlivněna morfinovou abstinencí. Významné statistické změny byly ale pozorovány v hladinách enzymů, které jsou zapojené do řízení m⁶A modifikace. Tyto signifikantní změny byly místně a časově specifické. Nicméně nebyl nalezen jasný trend ve změnách jejich hladin, což poukazuje na složitost regulace této epitranskriptomické modifikace v morfinovém abstinenciálním období.

Dále byly zkoumány úrovně hladin transkripčních faktorů Δ FosB a MeCP2, které hrají důležitou roli v neuronální adaptaci během drogové závislosti. V některých oblastech mozku během určitých období abstinence byly zaznamenány signifikantní změny v hladinách těchto transkripčních regulátorů, ale nebyl prokázán žádný konzistentní trend v jejich poklesu nebo růstu. Tyto nespécifické změny v hladinách ukazují na složitost neuronálních adaptací na abstinenci. Mohou také zdůrazňovat fakt, že dynamika těchto transkripčních regulátorů může být ovlivněna různými faktory, které nebyly v této práci zkoumány.

Celkově naše data naznačují, že dynamika hladin transkripčních faktorů a enzymů, které se účastní m⁶A modifikace v reakci na morfinovou abstinenci je místně specifická a proměnlivá v čase. Z výsledků měření hladin N⁶-metyl-adenosinu vyplývá, že morfinová abstinence nemá pravděpodobně vliv na tuto modifikaci. Tyto nedostatky v konzistenci výsledků v reakci na morfinovou abstinenci otevírají další otázky ohledně mechanismů, které se mohou podílet na řízení této modifikace a transkripčních faktorů v abstinenciálním období. Získané výsledky zdůrazňují potřebu dalšího zkoumání pro lepší pochopení role epigenetických a epitranskriptomických mechanismů v období morfinové abstinence.

Seznam použité literatury

- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(5):786–794.
- Bagley, E. E., Hacker, J., Chefer, V. I., Mallet, C., McNally, G. P., Chieng, B. C., Perroud, J., Shippenberg, T. S., and Christie, M. J. (2011). Drug-induced GABA transporter currents enhance GABA release to induce opioid withdrawal behaviors. *Nature neuroscience*, 14(12):1548–1554.
- Barbon, A. and Magri, C. (2020). RNA editing and modifications in mood disorders. *Genes*, 11(8):872.
- Barrow, T. M., Byun, H.-M., Li, X., Smart, C., Wang, Y.-X., Zhang, Y., Bacca-relli, A. A., and Guo, L. (2017). The effect of morphine upon DNA methylation in ten regions of the rat brain. *Epigenetics*, 12(12):1038–1047.
- Beach, H. D. (1957). Morphine addiction in rats. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*, 11(2):104.
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F.-T., Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (2000). μ -opioid receptor desensitization by β -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813):720–723.
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., and Lin, F.-T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science*, 286(5449):2495–2498.
- Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., and Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *Rna*, 3(11):1233–1247.
- Bonci, A. and Williams, J. T. (1997). Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *Journal of Neuroscience*, 17(2):796–803.
- Borun, T. W., Pearson, D., and Paik, W. K. (1972). Studies of histone methylation during the HeLa S-3 cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 247(13):4288–4298.
- Bozarth, M. A. and Wise, R. A. (1982). Localization of the reward-relevant opiate receptors. *Problems of drug dependence*, 158.
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12):5391–5393.
- Bullock, B. P. and Habener, J. F. (1998). Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry*, 37(11):3795–3809.

- Byvoet, P., Shepherd, G., Hardin, J., and Noland, B. (1972). The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 148(2):558–567.
- Carter, B. D. and Medzihradsky, F. (1993). G_o mediates the coupling of the μ opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9):4062–4066.
- Chalana, H., Sachdeva, J. K., Kundal, T., Malhari, A. S., and Choudhary, R. (2015). A double-blind, placebo-controlled, randomized study comparing quetiapine with placebo, along with oral naltrexone, in the treatment of opioid dependent patients. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 4(53):9158–9167.
- Chavkin, C. and Goldstein, A. (1984). Opioid receptor reserve in normal and morphine-tolerant guinea pig ileum myenteric plexus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(22):7253–7257.
- Chen, J., Zhang, Y.-C., Huang, C., Shen, H., Sun, B., Cheng, X., Zhang, Y.-J., Yang, Y.-G., Shu, Q., Yang, Y., et al. (2019a). m6A regulates neurogenesis and neuronal development by modulating histone methyltransferase Ezh2. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(2):154–168.
- Chen, M., Zhang, X., and Hao, W. (2019b). H3K4 dimethylation at FosB promoter in the striatum of chronic stressed rats promotes morphine-induced conditioned place preference. *Plos one*, 14(8):e0221506.
- Chen, W.-S., Xu, W.-J., Zhu, H.-Q., Gao, L., Lai, M.-J., Zhang, F.-Q., Zhou, W.-H., and Liu, H.-F. (2016). Effects of histone deacetylase inhibitor sodium butyrate on heroin seeking behavior in the nucleus accumbens in rats. *Brain research*, 1652:151–157.
- Christie, M. J., Williams, J. T., and North, R. A. (1987). Mechanisms of tolerance to opiates in locus coeruleus neurons. *NIDA Res Monogr*, 78:158–168.
- Ciccarelli, A., Calza, A., Santoru, F., Grasso, F., Concas, A., Sassoè-Pognetto, M., and Giustetto, M. (2013). Morphine withdrawal produces ERK-dependent and ERK-independent epigenetic marks in neurons of the nucleus accumbens and lateral septum. *Neuropharmacology*, 70:168–179.
- Compere, S. J. and Palmiter, R. D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell*, 25(1):233–240.
- Delorenzo, R. J. and Greengard, P. (1973). Activation by Adenosine 3':5'-Monophosphate of a Membrane-Bound Phosphoprotein Phosphatase from Toad Bladder. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(6):1831–1835.
- Egervari, G., Landry, J., Callens, J., Fullard, J. F., Roussos, P., Keller, E., and Hurd, Y. L. (2017). Striatal H3K27 acetylation linked to glutamatergic gene dysregulation in human heroin abusers holds promise as therapeutic target. *Biological psychiatry*, 81(7):585–594.

- Engel, M., Eggert, C., Kaplick, P. M., Eder, M., Röh, S., Tietze, L., Namendorf, C., Arloth, J., Weber, P., Rex-Haffner, M., et al. (2018). The role of m6A/mRNA methylation in stress response regulation. *Neuron*, 99(2):389–403.
- Fan, X., Zhang, J., Zhang, X., Yue, W., and Ma, L. (2003). Differential regulation of β -arrestin 1 and β -arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience*, 117(2):383–389.
- Fan, X.-Y., Shi, G., He, X.-J., Li, X.-Y., Wan, Y.-X., and Jian, L.-Y. (2021). Oxytocin prevents cue-induced reinstatement of oxycodone seeking: Involvement of DNA methylation in the hippocampus. *Addiction Biology*, 26(6):e13025.
- Fischle, W., Franz, H., Jacobs, S. A., Allis, C. D., and Khorasanizadeh, S. (2008). Specificity of the chromodomain Y chromosome family of chromodomains for lysine-methylated ARK (S/T) motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28):19626–19635.
- Fleming, L. M., Ponjee, G., and Childers, S. R. (1992). Inhibition of protein phosphorylation by opioid-inhibited adenylyl cyclase in rat brain membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 260(3):1416–1424.
- Foote, S. L., Bloom, F. E., and Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiological reviews*, 63(3):844–914.
- Ford, C. P., Mark, G. P., and Williams, J. T. (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *Journal of Neuroscience*, 26(10):2788–2797.
- Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics*, 24(1):88–91.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic acids research*, 31(9):2305–2312.
- Gasbarri, A., Sulli, A., and Packard, M. G. (1997). The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 21(1):1–22.
- Geiman, T. M., Sankpal, U. T., Robertson, A. K., Zhao, Y., Zhao, Y., and Robertson, K. D. (2004). DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(2):544–555.
- Gershey, E., Haslett, G., Vidali, G., and Allfrey, V. (1969). Chemical studies of histone methylation: evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone fractions. *Journal of Biological Chemistry*, 244(18):4871–4877.

- Gholizadeh, S., Sun, N., De Jaeger, X., Bechard, M., Coolen, L., and Laviolette, S. R. (2013). Early versus late-phase consolidation of opiate reward memories requires distinct molecular and temporal mechanisms in the amygdala-prefrontal cortical pathway. *PLoS One*, 8(5):e63612.
- Goodman, A. (1990). Addiction: definition and implications. *British journal of addiction*, 85(11):1403–1408.
- Goto, K., Numata, M., Komura, J.-I., Ono, T., Bestor, T. H., and Kondo, H. (1994). Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation*, 56(1-2):39–44.
- Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., et al. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development*, 11(13):1640–1650.
- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., and Workman, J. L. (1998). A subset of TAFIIs are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, 94(1):45–53.
- Guitart, X., Thompson, M. A., Mirante, C. K., Greenberg, M. E., and Nestler, E. J. (1992). Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Journal of neurochemistry*, 58(3):1168–1171.
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.-l., and Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3):423–434.
- Han, M.-H., Bolanos, C. A., Green, T. A., Olson, V. G., Neve, R. L., Liu, R.-J., Aghajanian, G. K., and Nestler, E. J. (2006). Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. *Journal of Neuroscience*, 26(17):4624–4629.
- Hebbes, T. R., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *The EMBO journal*, 7(5):1395–1402.
- Hempel, K., Lange, H., and Birkofer, L. (1968). Epsilon-N-trimethyllysine, a new amino acid in histones. *Die Naturwissenschaften*, 55(1):37.
- Hendrich, B. and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl CpG-binding proteins. *Genetics Research*, 72(1):59–72.
- Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. (2004). The dnmt1 DNA-(cytosine-c5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46):48350–48359.

- Hess, M. E., Hess, S., Meyer, K. D., Verhagen, L. A., Koch, L., Brönneke, H. S., Dietrich, M. O., Jordan, S. D., Saletore, Y., Elemento, O., et al. (2013). The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nature neuroscience*, 16(8):1042–1048.
- Holliday, R. and Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and Gene Activity During Development: Developmental clocks may depend on the enzymic modification of specific bases in repeated DNA sequences. *Science*, 187(4173):226–232.
- Hou, Y.-Y., Cai, Y.-Q., and Pan, Z. Z. (2015). Persistent pain maintains morphine-seeking behavior after morphine withdrawal through reduced MeCP2 repression of GluA1 in rat central amygdala. *Journal of Neuroscience*, 35(8):3689–3700.
- Huang, H., Weng, H., Zhou, K., Wu, T., Zhao, B. S., Sun, M., Chen, Z., Deng, X., Xiao, G., Auer, F., et al. (2019). Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m6A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 567(7748):414–419.
- Ikeda, S. R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta \gamma$ subunits. *Nature*, 380(6571):255–258.
- Inoue, A. and Fujimoto, D. (1969). Enzymatic deacetylation of histone. *Biochemical and biophysical research communications*, 36(1):146–150.
- Ito, S., D’Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., and Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310):1129–1133.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047):1300–1303.
- Jalali Mashayekhi, F., Rasti, M., Khoshdel, Z., and Owji, A. A. (2019). Expression levels of the tyrosine hydroxylase gene and histone modifications around its promoter in the locus coeruleus and ventral tegmental area of rats during forced abstinence from morphine. *European Addiction Research*, 24(6):304–311.
- Jalali Mashayekhi, F., Rasti, M., Rahvar, M., Mokarram, P., Namavar, M. R., and Owji, A. A. (2012). Expression levels of the BDNF gene and histone modifications around its promoters in the ventral tegmental area and locus coeruleus of rats during forced abstinence from morphine. *Neurochemical research*, 37:1517–1523.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., et al. (2011). N-6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature chemical biology*, 7(12):885–887.
- Johnson, S. and North, R. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *Journal of neuroscience*, 12(2):483–488.

- Justinova, Z., Panlilio, L. V., and Goldberg, S. R. (2009). Drug addiction. *Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System*, pages 309–346.
- K Rehni, A., S Jaggi, A., and Singh, N. (2013). Opioid withdrawal syndrome: emerging concepts and novel therapeutic targets. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 12(1):112–125.
- Kaplan, G. B., Leite-Morris, K. A., Fan, W., Young, A. J., and Guy, M. D. (2011). Opiate sensitization induces FosB/ Δ FosB expression in prefrontal cortical, striatal and amygdala brain regions. *PloS one*, 6(8):e23574.
- Kaufling, J. and Aston-Jones, G. (2015). Persistent adaptations in afferents to ventral tegmental dopamine neurons after opiate withdrawal. *Journal of Neuroscience*, 35(28):10290–10303.
- Kedves, A. T. (2005). Analysis of Matrix Attachment Region in an Experimental Vector, pA205. *W PI Major Qualifying Project, Submitted March*.
- Khaleghzadeh-Ahangar, H. and Haghparast, A. (2015). Intra-accumbal CB1 receptor blockade reduced extinction and reinstatement of morphine. *Physiology & behavior*, 149:212–219.
- Kim, J., Ham, S., Hong, H., Moon, C., and Im, H.-I. (2016). Brain reward circuits in morphine addiction. *Molecules and cells*, 39(9):645–653.
- Kim, S. and Kaang, B.-K. (2017). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Experimental & molecular medicine*, 49(1):e281–e281.
- Kim, W. et al. (1967). ϵ -N-dimethyllysine in histones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27:479–483.
- Knuckles, P., Lence, T., Haussmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S. H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., et al. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/F1 (2) d. *Genes & development*, 32(5-6):415–429.
- Le Merrer, J., Becker, J. A., Befort, K., and Kieffer, B. L. (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological reviews*.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 69(6):905–914.
- Listos, J., Baranowska-Bosiacka, I., Talarek, S., Listos, P., Orzelska, J., Fidecka, S., Gutowska, I., Kolasa, A., Rybicka, M., and Chlubek, D. (2013). The effect of perinatal lead exposure on dopamine receptor D2 expression in morphine dependent rats. *Toxicology*, 310:73–83.

- Listos, J., Łupina, M., Talarek, S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., and Kotlińska, J. (2019). The mechanisms involved in morphine addiction: an overview. *International journal of molecular sciences*, 20(17):4302.
- Liu, J. F. and Li, J. X. (2018). Drug addiction: a curable mental disorder? *Acta Pharmacol Sin*, 39(12):1823–1829.
- Livneh, I., Moshitch-Moshkovitz, S., Amariglio, N., Rechavi, G., and Dominis-sini, D. (2020). The m6A epitranscriptome: transcriptome plasticity in brain development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(1):36–51.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–260.
- Macey, T. A., Bobeck, E. N., Hegarty, D. M., Aicher, S. A., Ingram, S. L., and Morgan, M. M. (2009). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation counteracts morphine tolerance in the periaqueductal gray of the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(2):412–418.
- Madhavan, A., He, L., Stuber, G. D., Bonci, A., and Whistler, J. L. (2010). μ -opioid receptor endocytosis prevents adaptations in ventral tegmental area GABA transmission induced during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience*, 30(9):3276–3286.
- Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L., and Koob, G. F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261(2):669–677.
- Mamoon, A. M., Barnes, A. M., Ho, K., and Hoskins, B. (1995). Comparative rewarding properties of morphine and butorphanol. *Brain research bulletin*, 38(5):507–511.
- McDaid, J., Dallimore, J. E., Mackie, A. R., and T Napier, C. (2006). Changes in accumbal and pallidal pCREB and Δ FosB in morphine-sensitized rats: Correlations with receptor-evoked electrophysiological measures in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology*, 31(6):1212–1226.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D., McKay, S., Kleiner, E. L., and Bird, A. P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, 58(3):499–507.
- Meye, F. J., van Zessen, R., Smidt, M. P., Adan, R. A., and Ramakers, G. M. (2012). Morphine withdrawal enhances constitutive μ -opioid receptor activity in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 32(46):16120–16128.
- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., and Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149(7):1635–1646.

- Mohan, M., Herz, H.-M., Takahashi, Y.-H., Lin, C., Lai, K. C., Zhang, Y., Washburn, M. P., Florens, L., and Shilatifard, A. (2010). Linking H3K79 trimethylation to Wnt signaling through a novel Dot1-containing complex (DotCom). *Genes & development*, 24(6):574–589.
- Moore, L. D., Le, T., and Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1):23–38.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(25):8905–8909.
- Muller, D. L. and Unterwald, E. M. (2005). D1 dopamine receptors modulate Δ FosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(1):148–154.
- Murray, K. (1964). The occurrence of ϵ -n-methyl lysine in histones. *Biochemistry*, 3(1):10–15.
- Nabemoto, M., Mashimo, M., Someya, A., Nakamura, H., Hirabayashi, T., Fujino, H., Kaneko, M., Okuma, Y., Saito, T., Yamaguchi, N., et al. (2008). Release of arachidonic acid by 2-arachidonoyl glycerol and HU210 in PC12 cells; roles of Src, phospholipase C and cytosolic phospholipase A2 α . *European journal of pharmacology*, 590(1-3):1–11.
- Nagy, Z. and Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, 26(37):5341–5357.
- Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-cpg-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683):386–389.
- Narita, M., Ioka, M., Suzuki, M., Narita, M., and Suzuki, T. (2002). Effect of repeated administration of morphine on the activity of extracellular signal regulated kinase in the mouse brain. *Neuroscience letters*, 324(2):97–100.
- Nestler, E. J., Barrot, M., and Self, D. W. (2001). Δ FosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20):11042–11046.
- Nielsen, D. A., Yuferov, V., Hamon, S., Jackson, C., Ho, A., Ott, J., and Kreek, M. J. (2009). Increased OPRM1 DNA methylation in lymphocytes of methadone-maintained former heroin addicts. *Neuropsychopharmacology*, 34(4):867–873.
- Niu, Y., Zhao, X., Wu, Y.-S., Li, M.-M., Wang, X.-J., and Yang, Y.-G. (2013). N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 11(1):8–17.
- Nutt, D. J., King, L. A., Phillips, L. D., et al. (2010). Drug harms in the uk: a multicriteria decision analysis. *The Lancet*, 376(9752):1558–1565.

- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3):247–257.
- Oldendorf, W., Hyman, S., Braun, L., and Oldendorf, S. (1972). Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science*, 178(4064):984–986.
- Olmstead, M. C. and Franklin, K. B. (1997). The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites. *Behavioral neuroscience*, 111(6):1324.
- Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.-P., Allis, C. D., et al. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448(7154):714–717.
- Ou, C. Y., Yu, Y. H., Wu, C.-W., Kozłowska, A., Shyu, B.-C., and Huang, A. C. W. (2023). Neuronal activity of the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and basolateral amygdala in conditioned taste aversion and conditioned place preference induced by different doses of morphine administrations in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 14:1062169.
- Ouyang, Y., Tu, Y., Chen, S., Min, H., Wen, Z., Zheng, G., Wan, T., Fan, H., Yang, W., and Sun, G. (2022). Characterization of immune microenvironment infiltration and m6A regulator-mediated RNA methylation modification patterns in osteoarthritis. *Frontiers in Immunology*, 13:1018701.
- Pert, C. B. and Snyder, S. H. (1973). Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8):2243–2247.
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D., and Roberts, R. J. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase: I. expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46):33002–33010.
- Rezayof, A., Darbandi, N., and Zarrindast, M.-R. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors of the ventral tegmental area are involved in mediating morphine-state-dependent learning. *Neurobiology of learning and memory*, 90(1):255–260.
- Rice, J. C., Briggs, S. D., Ueberheide, B., Barber, C. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Shinkai, Y., and Allis, C. D. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Molecular cell*, 12(6):1591–1598.
- Sadock, B. J., Sadock, V. A., and Ruiz, P. (2000). *Comprehensive textbook of psychiatry*, volume 1. lippincott Williams & wilkins Philadelphia.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. T., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905):407–411.

- Schulteis, G., Markou, A., Gold, L. H., Stinus, L., and Koob, G. F. (1994). Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(3):1391–1398.
- Schulze, J. M., Jackson, J., Nakanishi, S., Gardner, J. M., Hentrich, T., Haug, J., Johnston, M., Jaspersen, S. L., Kobor, M. S., and Shilatifard, A. (2009). Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle regulation of H3K79 dimethylation. *Molecular cell*, 35(5):626–641.
- Schuster, R., Kleimann, A., Rehme, M.-K., Taschner, L., Glahn, A., Groh, A., Frieling, H., Lichtinghagen, R., Hillemacher, T., Bleich, S., et al. (2017). Elevated methylation and decreased serum concentrations of BDNF in patients in levomethadone compared to diamorphine maintenance treatment. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 267:33–40.
- Serturner, F. (1805). Darstellung der reinen mohnsaure (opiumsaurer) nebst einer chemischen untersuchung des opiums unter vorzuglicher hinsicht auf einen darin neu entdeckten stoff und die dahin gehorigen bemerkungen. *Journal der Pharmacie*, 14(1):47–93.
- Sharma, S. K., Klee, W. A., and Nirenberg, M. (1977). Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(8):3365–3369.
- Sheng, J., gang Lv, Z., Wang, L., Zhou, Y., Hui, B., et al. (2011). Histone H3 phosphoacetylation is critical for heroin-induced place preference. *Neuroreport*, 22(12):575–580.
- Shi, H., Zhang, X., Weng, Y.-L., Lu, Z., Liu, Y., Lu, Z., Li, J., Hao, P., Zhang, Y., Zhang, F., et al. (2018). m6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature*, 563(7730):249–253.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K. L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M. R., et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*, 442(7098):96–99.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M. J., Davie, J. R., and Peterson, C. L. (2006). Histone H4K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762):844–847.
- Smart, D., Hirst, R., Hirota, K., Grandy, D., and Lambert, D. (1997). The effects of recombinant rat μ -opioid receptor activation in CHO cells on phospholipase C, $[Ca^{2+}]_i$ and adenylyl cyclase. *British journal of pharmacology*, 120(6):1165–1171.
- Smart, D., Smith, G., and Lambert, D. (1994). μ -opioid receptor stimulation of inositol (1, 4, 5) trisphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Journal of neurochemistry*, 62(3):1009–1014.

- Smith, F. L., Lohmann, A. B., and Dewey, W. L. (1999). Involvement of phospholipid signal transduction pathways in morphine tolerance in mice. *British journal of pharmacology*, 128(1):220–226.
- Snyder, S. H. and Childers, S. R. (1979). Opiate receptors and opioid peptides. *Annual review of neuroscience*, 2(1):35–64.
- Sobczyk-Kopciol, A., Broda, G., Wojnar, M., Kurjata, P., Jakubczyk, A., Klimkiewicz, A., and Ploski, R. (2011). Inverse association of the obesity predisposing FTO rs9939609 genotype with alcohol consumption and risk for alcohol dependence. *Addiction*, 106(4):739–748.
- Stamatakis, A. M., Sparta, D. R., Jennings, J. H., McElligott, Z. A., Decot, H., and Stuber, G. D. (2014). Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis circuitry: implications for addiction-related behaviors. *Neuropharmacology*, 76:320–328.
- Steunou, A.-L., Rossetto, D., and Côté, J. (2014). Regulating chromatin by histone acetylation. *Fundamentals of chromatin*, pages 147–212.
- Su, S., Li, S., Deng, T., Gao, M., Yin, Y., Wu, B., Peng, C., Liu, J., Ma, J., and Zhang, K. (2022). Cryo-em structures of human m6A writer complexes. *Cell Research*, 32(11):982–994.
- Sun, H., Maze, I., Dietz, D. M., Scobie, K. N., Kennedy, P. J., Damez-Werno, D., Neve, R. L., Zachariou, V., Shen, L., and Nestler, E. J. (2012). Morphine epigenomically regulates behavior through alterations in histone H3 lysine 9 dimethylation in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 32(48):17454–17464.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929):930–935.
- Taylor, A. M., Castonguay, A., Ghogha, A., Vayssiere, P., Pradhan, A. A., Xue, L., Mehrabani, S., Wu, J., Levitt, P., Olmstead, M. C., et al. (2016). Neuroimmune regulation of GABAergic neurons within the ventral tegmental area during withdrawal from chronic morphine. *Neuropsychopharmacology*, 41(4):949–959.
- Valinluck, V., Tsai, H.-H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., and Sowers, L. C. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic acids research*, 32(14):4100–4108.
- Vettese-Dadey, M., Grant, P., Hebbes, T., Crane-Robinson, C., Allis, C., and Workman, J. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *The EMBO journal*, 15(10):2508–2518.
- Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. *Endeavour*, 1:18–20.

- Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., Gong, Z., Wang, Q., Huang, J., Tang, C., et al. (2016). Structural basis of N-6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature*, 534(7608):575–578.
- Wang, Y., Li, Y., Yue, M., Wang, J., Kumar, S., Wechsler-Reya, R. J., Zhang, Z., Ogawa, Y., Kellis, M., Duester, G., et al. (2018). N-6-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nature neuroscience*, 21(2):195–206.
- West, R. and Gossop, M. (1994). Overview: a comparison of withdrawal symptoms from different drug classes. *Addiction*, 89(11):1483–1489.
- Widagdo, J., Wong, J. J.-L., and Anggono, V. (2022). The m6A-epitranscriptome in brain plasticity, learning and memory. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, volume 125, pages 110–121. Elsevier.
- Wikler, A. and Masseman, J. H. (1943). Effects of morphine on learned adaptive responses and experimental neuroses in cats. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 50(4):401–404.
- Wu, C., Chen, W., He, J., Jin, S., Liu, Y., Yi, Y., Gao, Z., Yang, J., Yang, J., Cui, J., et al. (2020). Interplay of m6A and H3K27 trimethylation restrains inflammation during bacterial infection. *Science advances*, 6(34):eaba0647.
- Wu, C.-T. and Morris, J. R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293(5532):1103–1105.
- Wu, X., Wu, C., and Zhou, T. (2024). No significant change of N6-methyladenosine modification landscape in mouse brain after morphine exposure. *Brain and Behavior*, 14(1):e3350.
- Xue, A., Huang, Y., Li, M., Wei, Q., and Bu, Q. (2021). Comprehensive analysis of differential m6A RNA methylomes in the hippocampus of cocaine-conditioned mice. *Molecular Neurobiology*, 58:3759–3768.
- Yan, K. and Gautam, N. (1996). A domain on the G protein β subunit interacts with both adenylyl cyclase 2 and the muscarinic atrial potassium channel. *Journal of Biological chemistry*, 271(30):17597–17600.
- Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., et al. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell discovery*, 4(1):10.
- Zachariou, V., Bolanos, C. A., Selley, D. E., Theobald, D., Cassidy, M. P., Kelz, M. B., Shaw-Lutchman, T., Berton, O., Sim-Selley, L. J., Dileone, R. J., et al. (2006). An essential role for Δ FosB in the nucleus accumbens in morphine action. *Nature neuroscience*, 9(2):205–211.
- Zhang, Z. and Schulteis, G. (2008). Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89(3):392–403.

- Zhang, Z., Tao, W., Hou, Y.-Y., Wang, W., Kenny, P. J., and Pan, Z. Z. (2014). MeCP2 repression of G9a in regulation of pain and morphine reward. *Journal of Neuroscience*, 34(27):9076–9087.
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.-M., Li, C. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W.-L., Song, S.-H., et al. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular cell*, 49(1):18–29.