

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní obor: Fyziologie živočichů –Neurobiologie



Bc. Karolína Daňková

Studium vybraných signálních systémů řízených GPCRs v lidských SH-SY5Y a iPSC buňkách: vliv buněčné diferenciacce

A study of selected GPCR-mediated signaling systems in human SH-SY5Y and iPSC cells: the effect of cell differentiation

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2024

## **Prohlášení o samostatném vypracování práce**

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

V Praze dne 6.8.2024

.....

Bc. Karolína Daňková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za konzultace a cenné rady, které mi při psaní této práce trpělivě poskytoval. Dále děkuji svému konzultantovi RNDr. Vladimíru Rudajevovi, Ph.D., za vstřícnost, trpělivost a pomoc zejména s praktickou částí práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu dodávanou po celou dobu magisterského studia.

## Abstrakt

Skupina s G proteiny spřažených receptorů (GPCRs) představuje početnou a významnou rodinu membránových receptorů, které přenášejí extracelulární signál dovnitř buňky. Známe mnoho druhů GPCRs zapojených do většiny mediátorových systémů nervové soustavy. V rámci této práce jsme se blíže zaměřili na  $\beta$  adrenergní receptory, adenosinové receptory, muskarinové acetylcholinové receptory a opioidní receptory.

Hlavním cílem této práce bylo pomocí SDS-PAGE a Western blot metody detekovat a analyzovat změny v expresi vybraných GPCRs, ke kterým dochází v průběhu diferenciaci v neurální typ buněk. Experimenty byly provedeny za využití lidské neuroblastomální modelové linie SH-SY5Y, u které byla diferenciaci indukována pomocí kyseliny retinové. Druhou použitou modelovou linií byly lidské pluripotentní kmenové buňky (iPSC), které diferencovaly po vysazení fibroblastového růstového faktoru 2. Následným cílem práce bylo porovnat naměřená data napříč oběma liniemi a získané výsledky zasadit do kontextu již existujících publikací.

Výsledky experimentů ukázaly, že při buněčné diferenciaci SH-SY5Y a iPSC linie dochází ke změnám v hladinách GPCRs. Zaznamenáno bylo zvýšení i snížení exprese jednotlivých receptorů. Změny v expresi se lišily nejen u různých podtypů zkoumaných receptorů, ale závisely také na použité buněčné linií, což naznačuje, že změny na úrovni GPCRs mohou být v průběhu diferenciaci značně variabilní.

Klíčová slova:

Indukované pluripotentní kmenové buňky, SH-SY5Y buňky, receptory spřažené s G proteiny, diferenciaci, adrenergní receptory, adenosinové receptory, muskarinové acetylcholinové receptory, opioidní receptory

## **Abstract**

The group of G protein-coupled receptors (GPCRs) represents a large and important family of membrane receptors that transduce extracellular signals into the cell. There are many known types of GPCRs involved in most mediator systems of the nervous system. The present thesis focused on  $\beta$  adrenergic receptors, adenosine receptors, muscarinic acetylcholine receptors and opioid receptors.

The main goal of this paper was to use SDS-PAGE and Western blot methods to detect and analyse changes in the expression of selected GPCRs that occur during differentiation into neural cell types. Experiments were performed using the human neuroblastoma model line SH-SY5Y, where differentiation was induced by retinoic acid. The second used model line was human pluripotent stem cells (iPSCs) that differentiated after fibroblast growth factor 2 withdrawal. The consequent aim of the thesis was to compare the measured data across the two lines and to put the results into the context of existing publications.

The results of the experiments showed that changes in the levels of GPCRs occur during cellular differentiation of SH-SY5Y and iPSC lines. Both increases and decreases in the expression of individual receptors were observed. Changes in expression not only varied among the different receptor subtypes examined, but also depended on the cell line used, suggesting that changes at the level of GPCRs can be highly variable during differentiation.

Keywords:

induced pluripotent stem cells, SH-SY5Y cells, G protein-coupled receptors, differentiation, adrenergic receptors, adenosine receptors, muscarinic acetylcholine receptors, opioid receptors

# Obsah

Seznam zkratek.....	8
1 Úvod .....	11
2 Literární přehled .....	12
2.1 Buněčná linie SH-SY5Y .....	12
2.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky .....	13
2.3 Diferenční markery .....	14
2.3.1 Neuron specifická enoláza .....	14
2.3.2 Tyrozin hydroxyláza .....	15
2.3.3 Synaptofyzin.....	15
2.4 GPCRs .....	16
2.4.1 Proces signalizace skrze GPCRs .....	17
2.4.2 $\beta$ adrenergní receptory.....	19
2.4.3 Adenosinové receptory.....	20
2.4.4 Muskarinové acetylcholinové receptory .....	21
2.4.5 Opioidní receptory.....	22
3 Cíle diplomové práce.....	24
4 Metody a materiál.....	25
4.1 Kultivace a diferenciaci SH-SY5Y buněk .....	25
4.1.1 Diferenciaci SH-SY5Y .....	25
4.2 Kultivace a diferenciaci iPSC buněk.....	26
4.2.1 Diferenciaci iPSC buněk .....	27
4.3 Sklizení a homogenizace buněk.....	27
4.4 Měření obsahu proteinů ve vzorku .....	28
4.5 SDS-PAGE .....	29
4.6 Western blot a barvení Ponceau.....	31
5 Výsledky.....	35

5.1 Buněčná linie SH-SY5Y .....	35
5.1.1 Potvrzení diferenciacie SH-SY5Y linie .....	35
5.1.2 $\beta$ adrenergní receptory.....	37
5.1.3 Adenosinové receptory.....	38
5.1.4 Muskarinové acetylcholinové receptory .....	39
5.1.5 Opioidní receptory.....	40
5.2 iPSC linie .....	41
5.2.1 Potvrzení diferenciacie iPSC linie.....	41
5.2.2 $\beta$ adrenergní receptory.....	43
5.2.3 Adenosinové receptory.....	44
5.2.4 Muskarinové acetylcholinové receptory .....	45
5.2.5 Opioidní receptory.....	46
6 Diskuse .....	47
7 Závěr.....	53
8 Seznam literatury .....	54

## Seznam zkratek

A <sub>1</sub> -R	adenosinový A1 receptor
A <sub>2A</sub> -R	adenosinový A2A receptor
A <sub>2B</sub> -R	adenosinový A2B receptor
A <sub>3</sub> -R	adenosinový A3 receptor
AC	adenylátcykláza
AKAP-Lbc	A-kinázový kotvící faktor 13
AD	Alzheimerova choroba
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
APOE4	apolipoprotein E 4
BDNF	mozkový neurotrofický faktor (brain-derived neurotrophic factor)
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
CREB	vazebný protein cAMP responzivního elementu (cAMP response element binding protein)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DOR-1	δ opioidní receptor 1
ECL	extracelulární smyčka (extracellular loop)
ESC	embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells)
FBS	fetální bovinní sérum
FGF-2	fibroblastový růstový faktor 2 (fibroblast growth factor 2)
GABA	kyselina γ-aminomáselná
GDP	guanosindifosfát
GEFs	výměnné faktory guaninových nukleotidů (guanine nucleotide exchange factors)
GPCRs	s G proteiny spřažené receptory (G protein-coupled receptors)
GRK	kináza receptorů spřažených s trimerními G proteiny (G protein-coupled receptor kinase)
GTP	guanosintrifosfát



HD	Huntingtonova choroba
ICL	intracelulární smyčka (intracellular loop)
IGF-2	inzulinu podobný růstový faktor 2 (insulin-like growth factor 2)
IP3	inositol-3-fosfát
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
Klf4	Krüppel-like faktor 4
KOR-1	$\kappa$ opioidní receptor 1
Lbc	s lymfomem a leukemií asociovaný výměnný faktor Rho guaninových nukleotidů
LARG	s leukemií asociovaný výměnný faktor Rho guaninových nukleotidů
mAChR M <sub>1</sub>	muskarinový acetylcholinový receptor M <sub>1</sub>
mAChR M <sub>2</sub>	muskarinový acetylcholinový receptor M <sub>2</sub>
mAChR M <sub>3</sub>	muskarinový acetylcholinový receptor M <sub>3</sub>
mAChR M <sub>4</sub>	muskarinový acetylcholinový receptor M <sub>4</sub>
mGluR2	metabotropní glutamátový receptor 2
MAP2	s mikrotubuly asociovaný protein 2
MOR-1	$\mu$ opioidní receptor
NSE	neuron specifická enoláza
Oct3/4	octamer binding transcription factor 3/4
P115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF	výměnné faktory Rho guaninových nukleotidů (Rho guanine nucleotide exchange factors)
PBS	fosfátový pufr
PI3K $\gamma$	fosfatidylinositol-3-kináza $\gamma$
PAK	p21 aktivovaná proteinkináza
PKC	proteinkináza C
PLC $\beta$	fosfolipáza C $\beta$
PNS	periferní nervová soustava
PS1	presenilin 1
PSEN1	gen kódující presenilin 1
RA	kyselina retinová (retinoic acid)
SYP	synaptofyzin
TF	transkripční faktor
TH	tyrozin hydroxyláza

TM	transmembránový helix
TPA	tetradekanoylforbol-13-acetát
$\beta_1$ -AR	$\beta_1$ adrenergní receptor
$\beta_2$ -AR	$\beta_2$ adrenergní receptor
$\beta_3$ -AR	$\beta_3$ adrenergní receptor

## 1 Úvod

Skupina s G proteiny spřažených receptorů je jednou z nejpočetnějších rodin membránových receptorů v savčích buňkách. GPCRs hrají významnou roli prakticky ve všech signálních drahách, které moduluji rozličné fyziologické procesy v organismu. Díky tomu se na tyto receptory soustředí mnohé studie. Ty cíleně zkoumají potencionální látky a léčiva, které mohou ovlivnit jejich funkci či výskyt na membránách a přispět tak k léčbě chorob, v průběhu kterých jsou konkrétní signální dráhy aktivované skrze GPCRs zasaženy.

Modelem, který se využívá například ke zkoumání neurodegenerativních procesů, je lidská neuroblastomální buněčná linie SH-SY5Y. Tuto linii lze v současnosti díky ustáleným a ověřeným postupům v laboratorních podmínkách poměrně dobře kultivovat i diferencovat. Diferencované SH-SY5Y buňky se navíc morfologicky velmi podobají maturovaným neuronům, díky čemuž na nich lze pozorovat jevy a změny, ke kterým by mohlo za daných podmínek docházet i v *in vivo* systémech. Mezi další užívané modely patří lidské indukované pluripotentní kmenové buňky, tedy buňky odvozené z maturovaných somatických buněk (například fibroblastů), u nichž byla opětovně navozena pluripotence.

U obou zmíněných modelových buněčných linií lze specifickými postupy navodit diferenciaci, v průběhu které buňky procházejí přeměnou v neurální fenotyp. Na diferenciovaných buňkách je možné sledovat a změřit změny v hladinách exprese jednotlivých GPCRs, ke kterým v průběhu diferenciaci dochází, a na základě toho zhodnotit, jak kvalitní model tyto diferencované buňky pro studie zaměřené na konkrétní typy receptorů představují. Publikovaná data se často liší; některá poukazují na zvýšení míry exprese receptoru, jiná na snížení. Tento nesoulad může být způsoben rozdílnou metodikou měření, různými způsoby indukce diferenciaci nebo délkou jejího probíhání. Souhrnných studií, které měří a porovnávají hladiny vícero typů GPCRs právě na SH-SY5Y a iPSC modelu, není mnoho, což může být jedním z hlavních přínosů této práce.

Lepší pochopení a vyhodnocení těchto procesů je důležité pro správný výběr vhodné modelové buněčné linie, která může být dále použita pro studie detekující expresi jednotlivých GPCRs například při vývoji případných léčiv.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Buněčná linie SH-SY5Y

Buněčná linie SH-SY5Y je lidská buněčná linie, která je často využívána pro studium neurobiologie a neurofarmakologie. Předchůdce SH-SY5Y, buněčná linie SK-N-SH, byla izolována v roce 1970 ze vzorku kostní dřeně čtyřleté pacientky s neuroblastomem (Biedler *et al.*, 1973). Při kultivaci SK-N-SH buněk byly nalezeny dva fenotypově odlišné typy buněk, buňky epiteliálního typu (tzv. S-typ) a buňky neuroblastomové (N-typ). Na základě toho byly pomocí klonování vytvořeny nové buněčné linie SH-SY (neuroblast-like linie) a SH-EP a SH-EF (epithelial-like linie). Následným subklonováním byla z SH-SY linie, jež se díky svým vlastnostem ukázala jako perspektivnější pro další výzkum, získána SH-SY5 linie. Ta byla poté znovu subklonována na výslednou SH-SY5Y linii (Biedler *et al.*, 1978).

U SH-SY5Y kultur lze indukovat proces diferenciaci, v průběhu kterého buňky přestávají proliferovat a vzniká homogenní buněčná kultura plně maturovaných buněk neurálního typu. Tato kultura zahrnuje mj. populace dopaminergních neuronů, noradrenergických neuronů i cholinergních neuronů, což nám umožňuje na této buněčné linii studovat širokou škálu neurotransmiterů a signálních drah (Korecka *et al.*, 2013).

Jednou z nejpoužívanějších látek navozujících diferenciaci je kyselina retinová (RA). Do kultury mohou být přidávány i další indukční faktory, typicky mozkový neurotrofický faktor (BDNF) (Jämsä *et al.*, 2004), 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát (TPA) (Pählman *et al.*, 1983) či inzulinu podobný růstový faktor 2 (IGF-2) (Kim *et al.*, 1997). Diferencované buňky vykazují změny v expresi široké škály biomarkerů typických pro zralé neurální buňky, například neuron specifické enolázy (NSE), s mikrotubuly asociovaného proteinu 2 (MAP2), tyrosin hydroxylázy (TH) nebo tau proteinu (Ducray *et al.*, 2020). Diferenciaci je doprovázena výraznými morfologickými změnami (prodlužování a větvení neuritů) a zvýšením metabolické aktivity buněk (Schneider *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2022).

Díky tomu, že lze SH-SY5Y buňky kultivovat a diferencovat poměrně snadno, levně a v dostatečném množství, je tato linie v rámci vědeckých studií dodnes hojně využívána jakožto *in vitro* model pro výzkumy vyžadující stabilní buněčnou linii lidského původu. Tyto buňky jsou například využívány pro studie zaměřené na průběh a příčiny Parkinsonovy choroby (Ramalingam and Kim, 2016; Avola *et al.*, 2018). Jiné práce se soustředí na

Alzheimerovu chorobu a proteiny, které k jejímu rozvoji mohou přispívat, jako je třeba amyloid  $\beta$  prekurzorový protein a presenilin (Uemura et al., 2003; Riegerová et al., 2021). Další publikace pak SH-SY5Y model využívají ke studiu neuroprotektivity (např. neuroprotektivní efekt flavonoidů dle Rehfeldt et al., 2022) nebo k vývoji nanočástic, které mohou pomáhat v regenerativních procesech nervové tkáně při léčbě míšních poranění (Gao et al., 2022).

## 2.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) jsou typem kmenových buněk, který je získáván z již diferencovaných somatických buněk. U těchto buněk může být pomocí specifických transkripčních faktorů znovu navozena pluripotence, čímž iPSC získávají vlastnosti podobné embryonálním kmenovým buňkám (ESC), mimo jiné schopnost další diferenciaci v buňky ektodermu, mezodermu i endodermu. Ve studii z roku 2006 byly mezi rozličnými transkripčními faktory (TF) přítomnými v ESC identifikovány čtyři hlavní, které mohou toto přeprogramování indukovat a které byly autory prohlášeny za tzv. esenciální reprogramační faktory. Tyto faktory, jmenovitě Oct3/4, Sox2, c-Myc a Klf4, hrají v embryonálních buňkách klíčovou roli během embryonálního vývoje a při regulaci buněčného růstu. Indukcí jejich exprese byla poprvé navozena přeměna myších fibroblastů na iPSC (Takahashi and Yamanaka, 2006) a stejná metoda byla později využita k reprogramování lidských fibroblastů (Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008) a jiných somatických buněk jako jsou například adipocyty (Sun et al., 2009), keratinocyty (Maherali et al., 2008) či B lymfocyty (Hanna et al., 2008).

Kromě použití těchto čtyř původních faktorů mohou být iPSC buňky generovány také pomocí kombinace jiných TF (například Oct3/4, Sox2, Nanog, a Lin-28 (Yu et al., 2007)). Vyvíjely se i metody, pomocí kterých jsou reprogramační faktory do buněk vpravovány. Kromě původně využívaných virálních vektorů v podobě retrovirů a lentivirů, které při inzerci do genomu hostitelských buněk nesou značné riziko mutagenese, jsou dále používány metody zahrnující DNA plasmidy, transpozony, adenoviry, rekombinantní proteiny či mRNA (každý z nosičů má ale své nevýhody, které jeho použití limitují – náročné provedení, nízká účinnost a tudíž nutnost opakování, vysoké riziko vyvolání imunitní reakce aj.) (shrnuto v Omole and Fakoya, 2018).

V praxi je linie iPSC využívána jako modelová linie pro studium široké škály procesů a struktur. Na astrocytech diferencovaných z iPSC lze zkoumat hematoencefalickou bariéru (Shaltouki et al., 2013), průběh zánětlivých procesů (Santos et al., 2017) nebo role jednotlivých proteinů, jako je APOE4 spojovaný s Alzheimerovou chorobou (Lundin et al., 2018). Tyto buňky je také možné diferenciovat v kardiomyocyty (Feyen et al., 2020) a na nich dále studovat srdeční arytmie (Brown et al., 2024) a ischemii (Peters et al., 2022). Linie iPSC a buňky z ní diferencované mohou být modelem pro výzkum cukrovky (Kim et al., 2020; Panova et al., 2022), amyotrofické laterální sklerózy (Workman et al., 2023) nebo Parkinsonovy choroby (Cooper et al., 2012; di Domenico et al., 2019).

Námi používané iPSC buňky byly obdrženy z laboratoře paní doktorky Mgr. Dášy Bohačiakové, Ph.D., vedoucí výzkumné skupiny z ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Tyto iPSC byly v laboratoři paní doktorky manuálně derivovány z fibroblastů zakoupených v Coriell Institute (dle (Bohaciakova et al., 2019)), které byly odebrány jedinci s diagnostikovanou AD familiárního typu a nesly mutaci v genu PSEN1 pro presenilin (Coriell Institute). Výzkumná skupina paní doktorky tuto buněčnou linii dále používá mj. na kultivaci a výzkum organoidů (Vanova et al., 2023).

## 2.3 Diferenční markery

### 2.3.1 Neuron specifická enoláza

Enolázy jsou glykolytické enzymy katalyzující přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfenolpyruvát. Rozlišujeme tři izoenzymy, které k enolázám patří, a které se liší typem tkání, kde se typicky vyskytují. Enoláza  $\alpha$  (také enoláza 1) je tkáňově nespecifická, enoláza  $\beta$  (enoláza 3) se vyskytuje ve svalové tkáni a enoláza  $\gamma$  (enoláza 2) je v nejvyšší míře exprimována ve tkáni nervové. Jednotlivé formy tohoto enzymu tvoří homo i hetero dimery, přičemž  $\gamma\gamma$  enoláza je primárně přítomna v neuronech a  $\alpha\gamma$  enoláza v gliových buňkách (Shimizu et al., 1983; Deloulme et al., 1997).

Díky tkáňové specifitě NSE lze tento enzym použít jako biomarker při identifikaci buněk nervového typu, čehož se dá dále v praxi využít při identifikaci karcinomů neuroendokrinního typu jako je malobuněčný karcinom plic, gastroinestinální a pankreatické neuroendokrinní tumory, neuroblastomy, meduloblastomy apod. (Mjones et al., 2017). Zvýšené hladiny NSE v krevním oběhu či mozkomíšním moku mohou také poukazovat na

poškození neuronů doprovázející traumatická poranění mozku, mozkovou mrtvici či různá neurodegenerativní onemocnění (Muley et al., 2003; shrnuto v Isgrò et al., 2015).

Diferencované iPSC a SH-SY5Y buňky vykazují, vzhledem k nárůstu metabolické aktivity doprovázející proces diferenciaci v neurální fenotyp, výrazně zvýšené hladiny NSE, díky čemuž lze pomocí měření hladiny tohoto enzymu zhodnotit úspěšnost navození diferenciaci (Kunzler et al., 2017; Simões et al., 2021).

### 2.3.2 Tyrozin hydroxyláza

Hlavní rolí enzymu tyrozin hydroxylázy je katalýza přeměny L-tyrozinu na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA), což je klíčová reakce v procesu biosyntézy katecholaminních neurotransmiterů (dopamin, adrenalin, noradrenalin) (Nagatsu *et al.*, 1964). V centrální nervové soustavě (CNS) je, vzhledem k její úloze, TH produkována především v oblastech s vysokou koncentrací dopaminergních neuronů (nigrostriatální a mesokortikální dráhy) a noradrenergických neuronů (*locus coeruleus*), dále pak také v hypotalamu (Segal and Kuczenski, 1974; Morigaki and Goto, 2016). Mimo CNS dále TH produkují například buňky sympatických ganglií, periferní nervový systém ve střevech (Chevalier et al., 2008) a chromafinní buňky dřeně nadledvin (shrnuto v Berends et al., 2019).

Snížená exprese genu pro TH je zkoumána mj. v souvislosti s nástupem a rozvojem Parkinsonovy choroby, která je doprovázena degenerací dopaminergních neuronů ve výše zmíněných oblastech CNS (Zhu et al., 2012). K těmto výzkumům je často využívána právě SH-SY5Y linie (Alrashidi et al., 2021; Yao et al., 2024). Diferencované SH-SY5Y a iPSC buňky produkují větší množství TH než buňky proliferující, což dělá z TH podobně jako z NSE užitečný marker při studiích vyžadujících diferenciaci těchto buněk (Presgraves et al., 2003; Robinson et al., 2015).

### 2.3.3 Synaptofyzin

Synaptofyzin (SYP, v literatuře také značen jako p38) je membránový glykoprotein účastnící se procesu neurotransmise. SYP je ukotvený v membráně presynaptických vezikul, kde interaguje s dalšími proteiny jako je například synaptobrevin, se kterými organizuje a reguluje výlev neurotransmiteru do synaptické štěrby (Jahn et al., 1985; Edelmann et al., 1995).

Imunohistochemicky lze přítomnost SYP odhalit nejen ve tkáních CNS, ale i v neuroendokrinních tkáních (nadledviny, pankreatická tkáň, plicní a enterochromafinní buňky a jiné). Zvýšená exprese genu pro SYP může značit přítomnost nádorového bujení, proto se tento protein také používá jako specifický marker pro odhalení tumorů neuroendokrinního původu, podobně jako NSE (Wiedenmann *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1990; Uhlig *et al.*, 2022). Synaptofyzin je také zkoumán v souvislosti s rozličnými neurodegenerativními onemocněními. U vzorků tkání získaných od pacientů s Alzheimerovou chorobou byly například oproti kontrolám detekovány snížené hladiny synaptofyzinu v mozkové kůře, což může značit korelaci mezi mírou exprese SYP (a dalších pre a post synaptických proteinů, u kterých byl pokles také zdokumentován) s procesy neurodegenerace, ztráty synaptických spojení a s úpadkem kognitivních funkcí u pacientů s AD (Masliah *et al.*, 1989; Sze *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2005)

## 2.4 GPCRs

Receptory spřažené s G proteiny (G protein-coupled receptors, GPCRs) jsou membránové receptory přenášející signál z extracelulárního prostředí dovnitř buňky. Tato skupina receptorů čítá přes 800 členů, což z GPCRs dělá nejrozšířenější typ receptorů na membránách lidských buněk. Jednotlivé receptory jsou na základě jejich sekvenční podobnosti v rámci tzv. GRAFS systému děleny do pěti hlavních rodin (Rhodopsin, Adhesion, Secretin, Glutamate a Frizzled/Taste), jejichž zástupci sdílejí charakteristické domény potřebné k interakci s jejich typickými ligandy (Fredriksson *et al.*, 2003).

Molekula GPCRs obsahuje sedm transmembránových  $\alpha$  helixů (transmembrane domains, TM 1-7), tři intracelulární smyčky (intracellular loops, ICL 1-3) interagující s heterotrimerním G proteinem a tři extracelulární smyčky (extracellular loops, ECL 1-3) s vazebnými a regulačními místy. C konec je orientován intracelulárně, N konec směřuje ven z buňky a jeho primární struktura obsahuje specifické funkční domény důležité pro navázání ligandu (Schwartz, 1994). N konec se ale může podílet i na regulaci aktivity či na oligomeraci receptorů - shrnuto v Gacasan *et al.*, 2017). GPCRs mohou fungovat jako monomery, mnohé z nich ale mohou tvořit homodimery, heterodimery či vyšší oligomery (Angers *et al.*, 2001).

Ligandy, se kterými GPCRs interagují, jsou z hlediska chemické struktury velmi různorodé. Může jít o neurotransmitery (například dopamin, serotonin, adrenalin,



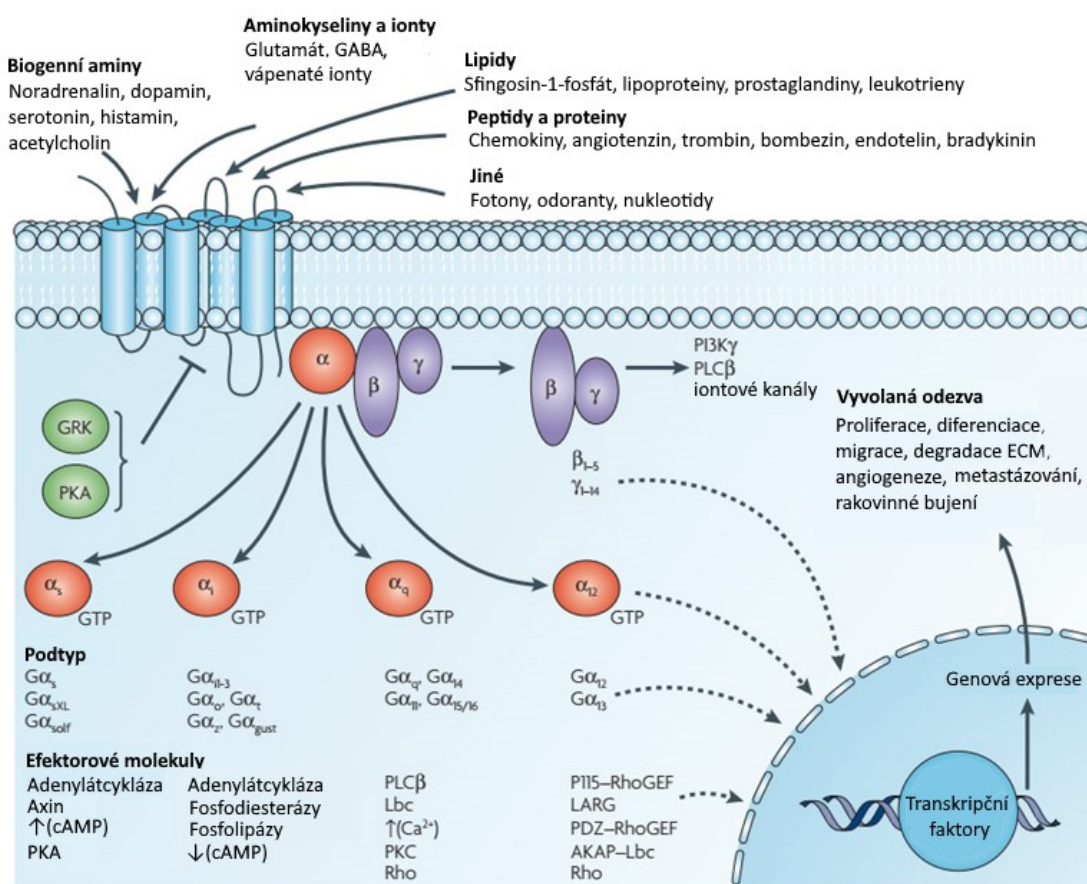
noradrenalin a acetylcholin), peptidové i nepeptidové hormony, chemokiny, odoranty, tastanty, ionty, fotony, lipidy a jiné molekuly (Buck and Axel, 1991; shrnuto v Bockaert et al., 2002) . Díky tomu jsou tyto receptory schopné zastávat mnoho rozličných funkcí a jsou tedy nepostradatelnou součástí prakticky všech signálních a regulačních procesů, které se v lidském těle odehrávají. Tato univerzálnost z nich dělá významný terapeutický cíl při léčbě chorob a mnoho nových či vyvíjejících se léků působí cíleně na konkrétní GPCRs.

#### 2.4.1 Proces signalizace skrze GPCRs

GPCRs dokáží v reakci na přijetí extracelulárního signálu aktivovat v buňce celou řadu rozličných signálních drah. K tomu využívají heterotrimerní G proteiny, signální molekuly s hydrolázovou aktivitou schopné vázat GTP (proto se jim také v angličtině říká „guanine nucleotide-binding proteins“). Molekula heterotrimerního G proteinu se skládá ze tří podjednotek značených  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  a každá z podjednotek existuje ve více variantách (v současnosti rozlišujeme 16  $\alpha$  podjednotek, 5  $\beta$  podjednotek a 12  $\gamma$  podjednotek), jejichž kombinace určuje vlastnosti výsledného proteinu. Hlavní katalytické centrum, kde dochází k hydrolýze GTP na GDP, se nachází na  $G\alpha$ . Dle typických efektorů jednotlivých  $\alpha$  podjednotek rozlišujeme čtyři základní skupiny:  $G_s$  (stimulující, např.  $G_{\alpha s}$  aktivující adenylátcyklázu),  $G_{i/o}$  (inhibiční, obvykle inhibují AC),  $G_{q/11}$  (obvykle aktivují fosfolipázu C  $\beta$ ) a  $G_{12/13}$  (podílejí se na regulaci Rho, Rac a CDC42 signálních drah) (Chen-Goodspeed *et al.*, 2005).

Navázání ligandu na vazebná místa GPCRs vede ke konformačním změnám v molekule receptoru, díky kterým dochází na  $G\alpha$  podjednotce, která je asociovaná s receptorem, k výměně GDP za GTP a k její aktivaci (GPCRs fungují v tomto případě jako guanine nucleotide exchange factors, tzv. „GEFs“) (Oldham et al., 2006; shrnuto v Kim et al., 2016). Aktivovaná  $G\alpha$  podjednotka disociuje od  $\beta\gamma$  komplexu a dle svého typu stimuluje nebo inhibuje své efektorové molekuly, které mohou dále produkovat druhé posly a pokračovat tak v přenosu signálu (shrnutí v Wess', 1997) . U komplexu  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotky po aktivaci k disociaci nedochází a zůstává ukotven v membráně. Aktivovaná  $G\beta\gamma$  může následně řídit propustnost iontových kanálů (Logothetis *et al.*, 1987) či aktivovat fosfolipázu C $\beta$  (Katz *et al.*, 1992) (podrobnější schéma s výpisem efektorových molekul jednotlivých G podjednotek viz obrázek 1).

Poté, co na  $G\alpha$  podjednotce dojde k hydrolýze GTP na GDP a  $P_i$ , přechází  $G\alpha$  zpět do inaktivního stavu, znovu se spojuje s  $G\beta\gamma$  a celý heterotrimerní G protein se opět váže na GPCRs kde čeká na začátek nového aktivačního cyklu (Wall *et al.*, 1998). Samotný příjem signálu skrze receptor může být ke konci signální kaskády cíleně regulován tak, aby nedošlo k nadměrné aktivaci receptoru a přílišné produkci druhých posílů. Receptory mohou být desenzitizovány fosforylací nebo internalizovány pomocí klatrin-dependentní endocytózy, kterou zprostředkovává  $\beta$ -arrestin (shrnutí v Calebiro and Godbole, 2018).



**Obrázek 1:** Schéma signální kaskády, jejíž součástí je membránový s G proteiny spřažený receptor. Mezi ligandy, které s GPCRs typicky interagují, patří aminy, aminokyseliny a ionty, lipidy, peptidy a proteiny a jiné (fotony, odoranty, nukleotidy). Trimerní G protein s podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  se po aktivaci skrze komplex GPCRs/agonista rozpadá na aktivní  $\alpha$  podjednotku s navázaným GTP a na komplex  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek, vázaný na membránu.  $G\alpha$  podjednotka dále dle svého podtypu interaguje s efektorovými molekulami jako je například adenylátcykláza, proteinkinázy a fosfolipázy. Komplex  $G\beta\gamma$  aktivuje mj. iontové kanály, fosfolipázu C $\beta$  a fosfatidylinositol-3-kinázu. Důsledkem může být snížení či zvýšení množství iontů nebo tzv. druhých posílů (cAMP) v buňce, po čemž následují další kroky signalizační kaskády, případně aktivace transkripčních faktorů v jádře a změny v genové expresi. Výslednou odpovědí může být ovlivnění proliferace buňky, diferenciace, migrace apod. Převzato a upraveno dle (Dorsam and Gutkind, 2007).

### 2.4.2 $\beta$ adrenergní receptory

$\beta$  adrenergní receptory jsou zástupci rhodopsinové rodiny GPCRs. Jejich agonistou jsou katecholaminy, zejména adrenalin a noradrenalin. První práce popisující účinky adrenalinu na adrenergní receptory (tehdy dělené pouze na  $\alpha$  a  $\beta$  receptory) byly publikovány již v padesátých letech minulého století (Ahlquist, 1948). O pár let později byly objeveny dva subtypy  $\beta$  adrenergních receptorů, které dnes značíme jako  $\beta_1$  a  $\beta_2$  (Lands *et al.*, 1967), a následně i poslední známý subtyp  $\beta$  adrenergních receptorů,  $\beta_3$ -AR. V námi prováděné studii se ani u jednoho z typů použitých buněčných linií nepodařilo  $\beta_3$  receptory detekovat, proto se jimi v rámci literárního přehledu nebudu blíže zabývat.

Po navázání agonisty  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR receptory nejčastěji aktivují trimerní  $G_s$  protein, jehož  $G_\alpha$  podjednotka dále stimuluje adenylát cyklázu (AC) a iniciuje tvorbu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP). Receptory se vzájemně liší účinností, s jakou AC aktivují, přičemž míra aktivace prostřednictvím některých variant  $\beta_1$  receptoru je nižší než v případě stimulace skrze aktivovaný  $\beta_2$  (Levy *et al.*, 1993). Receptory se rovněž liší svou afinitou k agonistům.  $\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR mohou také tvořit homodimery a heterodimery, a to jak mezi sebou, viz. (Lavoie *et al.*, 2002; Mercier *et al.*, 2002), tak i s jinými typy receptorů, například s adenosinovými  $A_1$  receptory (Chandrasekera *et al.*, 2013), bradykininovými receptory (Haack *et al.*, 2010) či  $\mu$ -opioidními receptory (Samoshkin *et al.*, 2015). Vzniklé dimery mohou oproti monomerům vykazovat vyšší míru afinity k ligandu, lépe odolávat internalizaci receptoru nebo celkově modulovat průběh spouštěné signální kaskády (shrnuto v Zhu *et al.*, 2005),.

$\beta_1$ -AR a  $\beta_2$ -AR zastávají zásadní role v centrální i periferní sympatické regulaci autonomního nervového systému.  $\beta_1$  adrenergní receptory se vyskytují převážně v srdečních tkáních, najdeme je ovšem i v mozkové kůře, v plicích a v tkáni tukové. Jejich aktivací dochází ke zrychlení srdeční činnosti, zvýšení kontraktility srdečních vláken a ke zvýšené produkci reninu.  $\beta_2$ -AR jsou oproti tomu dominantně zastoupeny v bronchiální oblasti plicních tkání, jsou ale exprimovány i v hipokampu a v kůře mozkové (Hellgren *et al.*, 2000; Bathe-Peters *et al.*, 2021). Oba receptory jsou také v mnoha tkáních exprimovány současně, díky čemuž mohou spolupracovat a vzájemně se regulovat například při zmíněné modulaci srdeční činnosti.

Role těchto receptorů je podrobněji zkoumána zejména v souvislosti s kardiovaskulárními chorobami a srdečním selháním (Tanner *et al.*, 2021; Seidel *et al.*,

2022). Mnohé studie se také soustředí na možné změny v zastoupení a aktivitě těchto receptorů v důsledku nástupu a rozvoje Alzheimerovy choroby, a to zejména kvůli AD způsobené brzké degradaci oblasti locus coeruleus, která je v mozku hlavním místem produkce noradrenalinu (shrnutí v Matchett et al., 2021).

Typické zhoršení kognitivních funkcí, konkrétně úpadek paměťových schopností, jež AD doprovází, je také spojováno s  $\beta$  adrenergními receptory, jejichž správná funkce je klíčová pro procesy ukládání, vybavování a rekonsolidace paměťových stop (Kemp and Manahan-Vaughan, 2008). Aplikace agonisty  $\beta_2$ -AR clenbuterolu vedla u myši ke zvýšení míry neokortikální long-term potenciace a zlepšení visuospeciální komponenty paměti a schopnosti učit se (Sáez-Briones *et al.*, 2014), stejný agonista také dle studie z roku 2017 prováděné na APP/PS1 myších podporuje dendritické větvení a snižuje míru fosforylace amyloid prekurzorového proteinu a hromadění amyloidu  $\beta$  skrze stimulaci  $\alpha$  sekretázy, výsledkem čehož je opět zlepšení paměťových schopností (Chai et al., 2017). Další studie poukazuje na to, že dlouhodobé podávání kompetitivních antagonistů  $\beta$ -AR může v CNS působit prozánětlivě a podporovat synaptickou degradaci (Branca *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2020)

#### 2.4.3 Adenosinové receptory

Doposud byly objeveny čtyři typy adenosinových receptorů, které značíme zkratkami  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  a  $A_3$ . Všechny tyto typy patří mezi GPCRs, konkrétně do rodiny rhodopsinových receptorů, a jejich hlavním agonistou je adenosin.  $A_1$  a  $A_3$  receptory po navázání agonisty interagují s trimerními G proteiny rodiny  $G_i$ , prostřednictvím kterých inhibují aktivitu AC a tvorbu cAMP. Receptory  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  aktivují  $G_{s/olf}$  proteiny, které naopak aktivitu AC stimulují, což vede ke zvýšení intracelulární koncentrace cAMP a aktivaci PKA. Adenosinové receptory mohou také mimo jiné modulovat aktivitu iontových kanálů ( $K^+$  a  $Ca^{2+}$  kanálů) nebo PLC (Fredholm *et al.*, 2000). Studie ukazují, že adenosinové receptory mohou také dimerizovat. Detekovány byly například  $A_1$  homodimery (Ciruela *et al.*, 1995),  $A_1R/P2Y_2$  heteromery ((Namba *et al.*, 2010) či  $A_{2A}$  homodimery (Canals *et al.*, 2004).

$A_1$  receptory jsou v CNS hojně exprimovány na membránách glií i neuronů, kde modulují procesy neurotransmise (zejména acetylcholinergní, glutamatergní a GABA dráhy).  $A_{2A}$  receptory jsou také rozšířeným typem adenosinových receptorů a najdeme je především ve striatu a olfaktorickém regionu, zatímco  $A_{2B}$  receptory se na neurálních buňkách a gliích vyskytují v omezenější míře stejně jako  $A_3$  receptory (ty se nachází

především v oblastech kortexu, hippocampu a mozečku). Mimo nervovou soustavu jsou adenosinové receptory exprimovány také například v srdci, gastrointestinálním traktu či v plicích a na membránách imunitních buněk (shrnutí v Sheth et al., 2014).

Role adenosinových receptorů je hojně zkoumána v souvislosti se zánětlivými procesy a s rozvojem autoimunitních onemocnění jako je například revmatoidní artritida či Crohnova choroba (Ochaion *et al.*, 2009; Varani *et al.*, 2009). Zatímco některé studie poukazují na možné využití agonistů adenosinových receptorů při potlačování zánětu, který chronické choroby často doprovází (Szabó *et al.*, 1998; van der Putten *et al.*, 2009), výzkum z roku 2019 například uvádí, že přílišná aktivace určitých typů adenosinových receptorů (zde jde konkrétně o A<sub>2A</sub> receptor) může naopak podporovat rozvoj Parkinsonovy choroby (Carmo *et al.*, 2019). Jiné studie poukazují na možnou neuroprotektivní roli aktivovaných A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> a A<sub>3</sub> receptorů u myši a krys s navozenou cévní mozkovou příhodou (Chen *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2022).

#### 2.4.4 Muskarinové acetylcholinové receptory

Muskarinové acetylcholinové receptory (zkráceně mAChR) jsou receptory spřažené s G proteiny, jejichž hlavním agonistou je neurotransmiter acetylcholin. Rozlišujeme pět typů muskarinových acetylcholinových receptorů značených písmeny M<sub>1</sub> až M<sub>5</sub>. Subtypy M<sub>1</sub> M<sub>3</sub> a M<sub>5</sub> aktivují G<sub>q/11</sub> proteiny, skrze které stimulují PLCβ a tvorbu IP<sub>3</sub>, subtypy M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub> aktivují G<sub>i</sub> proteiny inhibující AC a produkci cAMP. V CNS jsou z těchto typů nejrozšířenější M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub> receptory, M<sub>3</sub> a M<sub>5</sub> receptory jsou ale exprimovány také, pouze v nižší míře. Mimo CNS můžeme muskarinové receptory dle konkrétního typu nalézt mimo jiné také v periferní nervové soustavě (zejm. jako součást parasymptického nervového systému), gastrointestinálním traktu či v srdečních tkáních (shrnutí v Servent and Fruchart-Gaillard, 2009; Falk et al., 2020). V rámci mé diplomové práce jsem se zabývala pouze detekcí mAChR M<sub>2</sub> a mAChR M<sub>4</sub>, proto se i v následujících odstavcích zaměřím primárně na tyto subtypy receptoru.

Muskarinový receptor M<sub>2</sub> je v nervové soustavě exprimován na post i presynaptických membránách, kde se podílí na regulaci výlevu acetylcholinu v rámci negativní zpětné vazby jako autoreceptor (Levey *et al.*, 1991; Wang and Yuan, 2009). V srdečních tkáních mAChR M<sub>2</sub> zprostředkovávají negativní ionotropní a chronotropní efekt a regulují tak srdeční činnost, proto jsou zkoumány mj. v kontextu srdečních chorob, jako je arytmie a tachykardie (Moss *et al.*, 2018). Spolu s mAChR M<sub>3</sub> receptory také ovládají

kontrakci a relaxaci hladkého svalstva dýchacích cest, mohou tedy být významnými terapeutickými cíli při léčbě astmatu a jiných poruch, které tyto tkáně zasahují (Hirshman *et al.*, 1999; Buels and Fryer, 2012).

MACHR M<sub>4</sub> receptory regulují kromě cholinergní signalizace i dopaminergní dráhy. Jejich funkce je důležitá pro udržení rovnováhy mezi těmito mediátorovými systémy a její narušení může vést ke vzniku kognitivních disfunkcí a psychóz (Tzavara *et al.*, 2004). Stejně jako mAChR M<sub>2</sub> receptory může být i M<sub>4</sub> subtyp lokalizován postsynapticky i presynapticky (Rouse *et al.*, 1998). Role obou receptorů je také zkoumána v souvislosti s paměťovými funkcemi a s procesy učení a jejich úbytek by mohl přispívat k rozvoji AD (Levey, 1996; Mulugeta *et al.*, 2003).

#### 2.4.5 Opioidní receptory

Dalšími receptory, které patří mezi GPCRs rhodopsinového typu, jsou opioidní receptory. Tyto receptory jsou hojně rozšířeny v centrální a periferní nervové soustavě, kde se účastní mimo jiné regulace bolesti, nálady a zánětlivých a stresových procesů. Zastoupeny jsou ale i ve tkáních trávicího traktu či v imunitních orgánech (Wang *et al.*, 2023). Jejich hlavními agonisty jsou opioidní peptidy endorfiny, enkefaliny, endomorfíny a dynorfiny. Kromě těchto látek mohou ale tyto receptory aktivovat i návykové látky jako je morfin a heroin. Díky jejich roli v dráhách regulujících bolest na tyto receptory stále cílí mnohá analgetika, která jsou sice účinná, ale také často návyková a potenciálně nebezpečná kvůli možnému riziku předávkování. V současnosti se do popředí výzkumu dostávají také bezpečnější, synteticky vyrobené upravené opioidy, jejichž užívání s sebou nese taková rizika (Selley *et al.*, 2001; El Daibani *et al.*, 2023)

Rozlišujeme čtyři hlavní typy opioidních receptorů, kterými jsou  $\mu$  receptory,  $\delta$  receptory,  $\kappa$  receptory a nocicepční opioidní peptidové receptory (Chen *et al.*, 1993; Mollereau *et al.*, 1994). Jednotlivé typy receptorů se liší jednak svou afinitou ke konkrétnímu ligandu (například  $\kappa$  receptory interagují převážně s dynorfiny) a jednak přesnějšími místy exprese v rámci nervové soustavy (Ananthan *et al.*, 2004). Všechny čtyři typy interagují po aktivaci agonistou s G<sub>i</sub> proteiny, což vede k inhibici AC a následnému snížení množství cAMP v buňce (Johnson *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1997).

Kappa opioidní receptor (KOR-1) je hojně zkoumán ve spojitosti s nocicepcí a analgezií (Ko *et al.*, 2000), přičemž absence genu pro KOR-1 vede ke snížené toleranci vůči viscerální bolesti (Simonin *et al.*, 1998). Umělá aplikace agonistů KOR-1 také vede k

projevům chování spojeného s depresí, antagonisté naopak zprostředkovávají antidepressivní efekt (Mague et al., 2003; Smart et al., 2021). KOR-1 receptory a dynorfiny se dále podílejí na regulaci dopaminových a glutamatergických drah, čímž jsou také zapojeny do mechanismu vzniku závislosti (Spanagel et al., 1992; Chefer et al., 2005). Také hrají roli při vyvolání stresové odpovědi (McLaughlin et al., 2005; Rosa et al., 2018). Vývoj periferně selektivních agonistů KOR-1 receptorů představuje jeden ze slibných cílů současných výzkumů opioidních receptorů. Noví periferně selektivní  $\kappa$  agonisté by zprostředkovali analgetický účinek bez vyvolání vedlejších účinků jako je nauzea, sedace, deprese nebo úzkost, které v případě jiných agonistů zasahují CNS (Binder et al., 2001; Jonas et al., 2021).

### **3 Cíle diplomové práce**

- 1) Diferencovat buňky SH-SY5Y linie do fenotypu neurálních buněk.
- 2) Diferencovat buňky iPSC linie do fenotypu neurálních buněk.
- 3) Na obou modelových liniích detekovat a analyzovat změny v expresi vybraných GPCRs u diferencovaných buněk oproti kontrolám.
- 4) Vzájemně porovnat změny v zastoupení GPCRs napříč SH-SY5Y a iPSC linií a získané poznatky srovnat s dosud publikovanými studiemi.



## 4 Metody a materiál

### 4.1 Kultivace a diferenciacie SH-SY5Y buněk

SH-SY5Y buňky byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích (Thermo Fisher Scientific, plocha 75 cm<sup>2</sup>) v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% atmosférickým obsahem CO<sub>2</sub>. Jako kultivační médium bylo používáno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose (Sigma-Aldrich, typ D6429) obsahující 5% FBS (Fetal bovine serum, Gibco), do kterého byly přidávány antibiotika a antimykotika v poměru 10 µl na 1 ml (Sigma-Aldrich).

Médium bylo ve sterilním prostředí laminárního boxu měněno po dvou až třech dnech. Buňky byly po dosažení optimální konfluencie pasážovány (obvykle dvakrát týdně). Pro uvolnění buněk od podkladu bylo použito 3 ml trypsinu (Sigma Aldrich), který byl ředěn PBS v poměru 1:5. Po přidání trypsinu byly buňky ponechány zhruba 5 minut v inkubátoru, poté byla po kontrole pod mikroskopem suspenze uvolněných buněk přepipetována do 15 ml centrifugační zkumavky. Přidání 5 ml média zneutralizovalo trypsin a vzorek byl stočen na centrifuze (Hettich Universal 320R) při teplotě 27°C, 1 250 RPM po dobu tří minut. Následně bylo médium s trypsinem odebráno, peleta resuspendována s novým médiem a obsah zkumavky byl rozdělen do nových lahví s 10 ml média a 100 µl antibiotika a umístěn do inkubátoru.

#### 4.1.1 Diferenciacie SH-SY5Y

U části buněk byla prostřednictvím kyseliny retinové (Sigma Aldrich) indukována diferenciacie v neurální fenotyp. RA byla uchovávána v mrazáku při teplotě -78°C. Po přidání RA byly buňky pěstovány v DMEM médiu (Sigma-Aldrich, typ D6429) s 0,5 % FBS (Gibco). K diferenciaci bylo přistoupeno při dosažení přibližně 50% konfluencie, RA byla spolu s výměnou média přidána třikrát, poprvé jeden den po pasážování a podruhé a potřetí po dalších dvou dnech. Dávka RA činila 10 µl na 10 ml média, práce s RA byla prováděna za tmy. Buňky byly sedmý den od pasážování, spolu s kontrolami, které rostly v médiu s 5% obsahem FBS a bez přídatku RA, mechanicky sklizeny.

## 4.2 Kultivace a diferenciacie iPSC buněk

Používané iPSC buňky ke své kultivaci vyžadovaly, na rozdíl od SH-SY5Y buněk, speciálně upravené misky a lahve. Potažení dna kultivačních nádob zajišťovalo zvýšenou adhezi buněk k povrchu a umožňovalo jejich proliferaci. Požadované Petriho misky (ThermoFisher Scientific, průměr 35 mm) a lahve (ThermoFisher Scientific, plocha 25 cm<sup>2</sup> a 75 cm<sup>2</sup>) byly nejprve hodinu inkubovány s ornitinem (Sigma Aldrich) a sterilní dH<sub>2</sub>O. Poté, co byl ornitin s vodou odsát a povrch třikrát opláchnut sterilní dH<sub>2</sub>O, byl přidán laminin (Gibco) a PBS (přesné množství všech chemikálií potřebné pro jednotlivé plochy je uvedeno níže v tab. 1). Po dalších 30 minutách byl laminin a PBS odsát a misky či lahve mohly být v tomto stavu ihned použity nebo zamrazeny až po dobu jednoho měsíce. Veškerá práce s kultivačními nádobami i iPSC buňkami probíhala uvnitř laminárního boxu.

*Tab.1: Ředění ornitinu a lamininu pro přípravu misek a lahví.*

	9,6 cm <sup>2</sup>	25 cm <sup>2</sup>	75 cm <sup>2</sup>
<b>Ředění ornitinu:</b>	150 µl ornitin	390 µl ornitin	1 170 µl ornitin
	600 µl dH <sub>2</sub> O	1 560 µl dH <sub>2</sub> O	4 680 µl dH <sub>2</sub> O
<b>Ředění lamininu:</b>	25 µl laminin	65 µl laminin	195 µl laminin
	475 µl PBS	1 235 µl PBS	3 705 µl PBS

Ke kultivaci iPSC buněk bylo použito médium DMEM (Sigma Aldrich) bez přídavku FBS, do kterého byly přidávány suplementy N2 (ThermoFisher Scientific), B27 (ThermoFisher Scientific), L-Glut (ThermoFisher Scientific) a NEAA (ThermoFisher Scientific). Přesné množství suplementů na 100 ml média je uvedeno v tab. 2. Médium bylo měněno každý třetí den a buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% atmosférickým obsahem CO<sub>2</sub>. Po dosažení optimální konfluencí pro pasážování byly buňky opláchnuty PBS, bylo přidáno 0,5 ml akutázy (Sigma Aldrich) na 2 ml média a následně se buňky ponechaly 3 minuty v inkubátoru. Poté byla buněčná suspenze přemístěna do centrifugační zkumavky s 5 ml média a stočena na centrifuze při teplotě 27 °C, 1 250 RPM po dobu tří minut. Médium s akutázou bylo odsáto, peleta byla resuspendována s novým

médiem a buňky byly rozděleny do nových potažených misek nebo lahví. K buňkám bylo přidáno 2  $\mu$ l FGF<sub>2</sub> (ThermoFisher Scientific) na 1 ml média (celkové množství dle plochy kultivační nádoby) a 10  $\mu$ l antibiotika (Sigma-Aldrich) na 1 ml média a buňky byly vráceny do inkubátoru.

*Tab.2: Dávkování suplementů na 100 ml kultivačního iPSC média*

<b>množství na 100 ml média</b>	
N2	0,5 ml
B27	1 ml
L-Glut	1 ml
NEAA	1 ml

#### *4.2.1 Diferenciace iPSC buněk*

Kultury iPSC buněk určené k diferenciaci byly pěstovány ve stejném typu nádob se stejným kultivačním médiem a množstvím antibiotika, jako nediferencované iPSC. Na rozdíl od kontrolních iPSC buněk nebyl k těmto buňkám ale při výměně média a při pasážování přidáván růstový faktor FGF2. Médium těchto buněk bylo také měněno každý třetí den a 21. den od počátku diferenciace byly diferencované buňky spolu s kontrolami sklizeny.

#### 4.3 Sklizení a homogenizace buněk

Postup sklizení a homogenizace vypěstovaných buněk byl shodný pro SH-SY5Y i iPSC buňky. Sklizení buněčného materiálu probíhalo na ledu. Po odsátí starého média byly buňky opláchnuty PBS, následně byly pomocí škrabky manuálně uvolněny do čistého PBS. Suspenze buněk byla stočena na centrifuze (Hettich Universal 320R) při 27 °C a 1 250 RPM po dobu tří minut. Peleta byla resuspendována ve 100  $\mu$ l PBS, vzorky buněk byly přeneseny do mikrozkuvek a obsah zkuvek byl doplněn PBS na 200  $\mu$ l. K buňkám byl přidán inhibitor proteáz (Complete Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich) v množství 4  $\mu$ l na 200  $\mu$ l. Následovala homogenizace pomocí sonikátoru (Bandelin Sonoplus), při které byly vzorky pro zachování co nejvyšší kvality buněčného materiálu stále umístěny na ledu. Sonikace

probíhala po dobu 2 x 10 s s nastaveným 40% výkonem. Po sonikaci byly vzorky znovu stočeny na centrifuze při teplotě 4 °C a 1 000 RPM po dobu 10 min a 45 s. Ze stočených vzorků byl odebrán postnukleární supernatant, který byl následně v čistých mikrozkumavkách skladován v mrazáku při teplotě -20°C nebo rovnou zpracováván BCA metodou.

#### 4.4 Měření obsahu proteinů ve vzorku

Ke změření koncentrace proteinů ve vzorcích byla využita metoda BCA. Složení činidla pro pracovní roztok potřebný pro tuto metodu je uvedeno v tabulce č. 3. Na 96 jamkovou destičku byly nejdříve nanесeny standardy pro vytvoření kalibrační křivky, viz tab. 4. Vzorky sklizených buněčných kultur byly 100x ředěny vodou a následně byly v triplicátech nanášeny na destičku po 100 µl. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl pracovního roztoku a destička byla třicet minut inkubována na suchém bloku při teplotě 60 °C. Absorbance byla měřena spektrofotometrem (Synergy HT, Biotek) při vlnové délce 562 nm, k interpretaci získaných výsledků byl použit program Gen5 .

*Tab. 3: Příprava činidel pro pracovní roztok*

<b>Činidlo A</b>	8 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1,6 g vinan sodný, doplněno do 100 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Činidlo B</b>	4g BCA do 100 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Činidlo C</b>	0,4 g CuSO <sub>4</sub> do 10 ml dH <sub>2</sub> O

Tab. 4: Ředění standardů pro kalibrační křivku

Pozice na destičce	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	2A	2B	2C	2D	2E
Číslo standardu	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 µg/µl) µl	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 µg/µl) µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H <sub>2</sub> O µl	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

#### 4.5 SDS-PAGE

Složení roztoků použitých pro elektroforézu je uvedeno v tab. 5. Vzorky byly naředěny na výslednou koncentraci 10 µg proteinů na vzorek a ke vzorkům byl přidán Laemmliho pufr v poměru 1:3.

Pro elektroforézu byl připraven 10% separační gel a 4% zaostřovací gel, složení gelů viz tab. 6. Tloušťka připravovaných gelů byla 1,5 mm. Po nalití roztoku pro separační gel mezi skla byl přes gel navrstven roztok butanolu. Butanol byl po polymeraci separačního gelu (zhruba 45 minut) odlit, gel byl opláchnut dH<sub>2</sub>O, přebytečná voda byla odsáta pomocí filtračního papíru. Následně byl mezi skla nalit roztok pro zaostřovací gel a vložen hřebínek pro tvorbu jamek. Zaostřovací gel po cca 20 minutách plně zpolymeroval, hřebínek byl odstraněn a skla s gely byla upevněna do aparatury pro elektroforézu, do které byl nalit elektroforetický pufr. Poté byly do jamek pomocí automatické pipety nanášeny vzorky, které byly před nanášením promíchány na vortexu, a standard. Aparatura byla připojena ke zdroji, na kterém bylo zvoleno konstantní napětí 200 V. Elektroforéza probíhala zhruba 50-60 minut (dokud čelo nedoběhlo ke konci gelu). Po ukončení separace proteinů byly gely vyjmuty

z aparatury, zaostřovací gel byl odříznut a následoval přenos proteinů na membránu pomocí metody Western blot.

*Tab. 5: Složení roztoků pro elektroforézu*

<b>Pufr 1</b> 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	18,17 g Tris-HCL doplněno dH <sub>2</sub> O do 100 ml
<b>Pufr 2</b> 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	6,05 g Tris-HCL doplněno dH <sub>2</sub> O do 100 ml
<b>30% akrylamid</b> (0,8% N,N-methylenbisakrylamid)	30 g akrylamidu 0,8 g N,N-methylenbisakrylamidu doplněno dH <sub>2</sub> O do 100 ml
<b>Elektroforetický pufr</b> 10x koncentrovaný	30,3 g Tris-HCL 141,1 g glycin 10 g SDS (dodecylsírán sodný) doplněno dH <sub>2</sub> O do 1 000 ml
<b>Laemmliho pufr (SLB)</b> 4x koncentrovaný	2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml glycerol 0,8 g SDS (dodecylsírán sodný) 0,8 g DTT (dithiotheritol) 1 mg bromfenolové modři doplněno dH <sub>2</sub> O do 10 ml

Tab. 6: Složení gelů pro elektroforézu

<b>10% separační gel</b> (množství potřebné pro dva gely)		<b>4% zaostřovací gel</b> (množství potřebné pro dva gely)	
destilovaná voda	8 ml	destilovaná voda	6 ml
pufř 1 (pH 8,8)	5 ml	pufř 2 (pH 6,8)	2,5 ml
30% akrylamid	6,7 ml	30% akrylamid	1,3 ml
10% SDS	200 $\mu$ l	10% SDS	100 $\mu$ l
10% APS	90 $\mu$ l	10% APS	90 $\mu$
TEMED	8 $\mu$ l	TEMED	8 $\mu$ l

#### 4.6 Western blot a barvení Ponceau

Gely byly po elektroforéze spolu s nitrocelulózovou membránou přemístěny do aparatury pro blotování, která byla naplněna blotovacím pufrem. Složení roztoků použitých pro Western blot je uvedeno v tab. 7. Aparatura byla připojena ke zdroji s nastaveným konstantním napětím 100 V, přenos trval 60 minut. Po dokončení přenosu proteinů na membránu byla aparatura rozebrána, membrány byly opláchnuty v dH<sub>2</sub>O a vloženy do roztoku Ponceau, se kterým se nechaly zhruba 5-10 minut inkubovat na kývačce. Přebytké Ponceau barvivo bylo opláchnuto stříčkou s dH<sub>2</sub>O, membrány byly osušeny a naskenovány pro pozdější kvantifikaci celkového množství proteinů na membránách.

Tab. 7: Složení roztoků pro Western blot

<b>Blotovací pufř</b>	15 g Tris 72 g glycin 1 000 ml methanol doplněno dH <sub>2</sub> O do 5 000 ml
<b>TBS pufř</b> 10x koncentrovaný, pH 8	84,15 g NaCl 11,63 g Tris doplněno dH <sub>2</sub> O do 960 ml

<b>Oplachovací pufr</b>	100 ml TBS pufr 900 ml dH <sub>2</sub> O 3 ml Tween 20
<b>Blokovací pufr</b>	2,5 g sušeného mléka 5 ml TBS pufr 45 ml dH <sub>2</sub> O 50 µl Tween 20
<b>Ředící pufr</b>	0,5 g sušeného mléka 5 ml TBS pufr 45 ml dH <sub>2</sub> O 50 µl Tween 20
<b>Stripovací roztok</b> pH 2,2	7,51 g glycin 0,5 g SDS 5 ml Tween 20 doplnit dH <sub>2</sub> O do 500 ml upravit pH na 2,2

Poté byly membrány 40 minut inkubovány v blokovacím pufru, následně byly přemístěny do ředícího pufru s primárními protilátkami (druh a ředění primárních protilátek uvedeno v tab. 8). V primárních protilátkách byly membrány inkubovány přes noc v místnosti s teplotou 4°C. Druhý den byl ředící pufr odlit, membrány byly opláchnuty dH<sub>2</sub>O a 3 x 10 minut promývány oplachovacím pufr. Následovala hodinová inkubace se sekundárními protilátkami (druh sekundárních protilátek a jejich ředění v tab. 8), která probíhala za pokojové teploty. Sekundární protilátky byly odlity a membrány byly znovu 3 x 10 minut promývány v oplachovacím pufru. Po dokončení oplachování byly membrány lehce osušeny pomocí filtračního papíru a na proteiny přenesené na membránu byl nanesen roztok chemiluminiscenčního substrátu (na jednu membránu bylo použito množství 300 µl). Použit byl buď roztok SuperSignal West Dura, nebo SuperSignal West Femto (výrobce obou je ThermoFisher Scientific) dle pozorované intenzity luminiscence v reakci na



konkrétní použitou protilátku. Membrány byly po minutové inkubaci přeneseny do vyvolávacích kazet, následně byly v temnici exponovány na film (Agfa), který byl vyvolán pomocí přístroje Optimax. Vyvolané filmy byly následně skenovány a signály byly dále vyhodnocovány v programu ImageJ a ImageLab. Data byla statisticky zpracována v programu GraphPad Prism 10.

Membrány byly po vyvolání promyty oplachovacím puřrem a protilátky byly ostripovány stripovacím roztokem. Stripování probíhalo po dobu 3 x 10 minut, poté byly membrány 2 x 10 minut promyty s PBS. Po ostripování byly membrány uchovány v lednici v oplachovacím puřru nebo ihned znovu inkubovány s blokovacím puřrem a následně s novými protilátkami.

*Tab. 8: Primární a sekundární protilátky použité pro Western blot*

<b>Primární protilátka</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Označení Výrobce</b>	<b>Původ</b>	<b>Ředění</b>	<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Ředění</b>
A <sub>1</sub> -R	Santa Cruz	sc-28995	králík	2 000x	anti-R	40 000x
A <sub>2A</sub> -R	Santa Cruz	sc-13937	králík	1 000x	anti-R	40 000x
A <sub>2B</sub> -R	Santa Cruz	sc-28996	králík	2 000x	anti-R	40 000x
A <sub>3</sub> -R	Santa Cruz	sc-13938	králík	2 000x	anti-R	40 000x
DOR-1	Santa Cruz	sc9111	králík	2 000x	anti-R	40 000x
KOR-1	Santa Cruz	sc-9112	králík	1 000x	anti-R	40 000x
mAChR M <sub>1</sub>	Santa Cruz	sc-7470	koza	2 000x	anti-G	40 000x
mAChR M <sub>2</sub>	Santa Cruz	sc-9107	králík	2 000x	anti-R	40 000x
mAChR M <sub>4</sub>	Santa Cruz	sc-9109	králík	2 000x	anti-R	40 000x

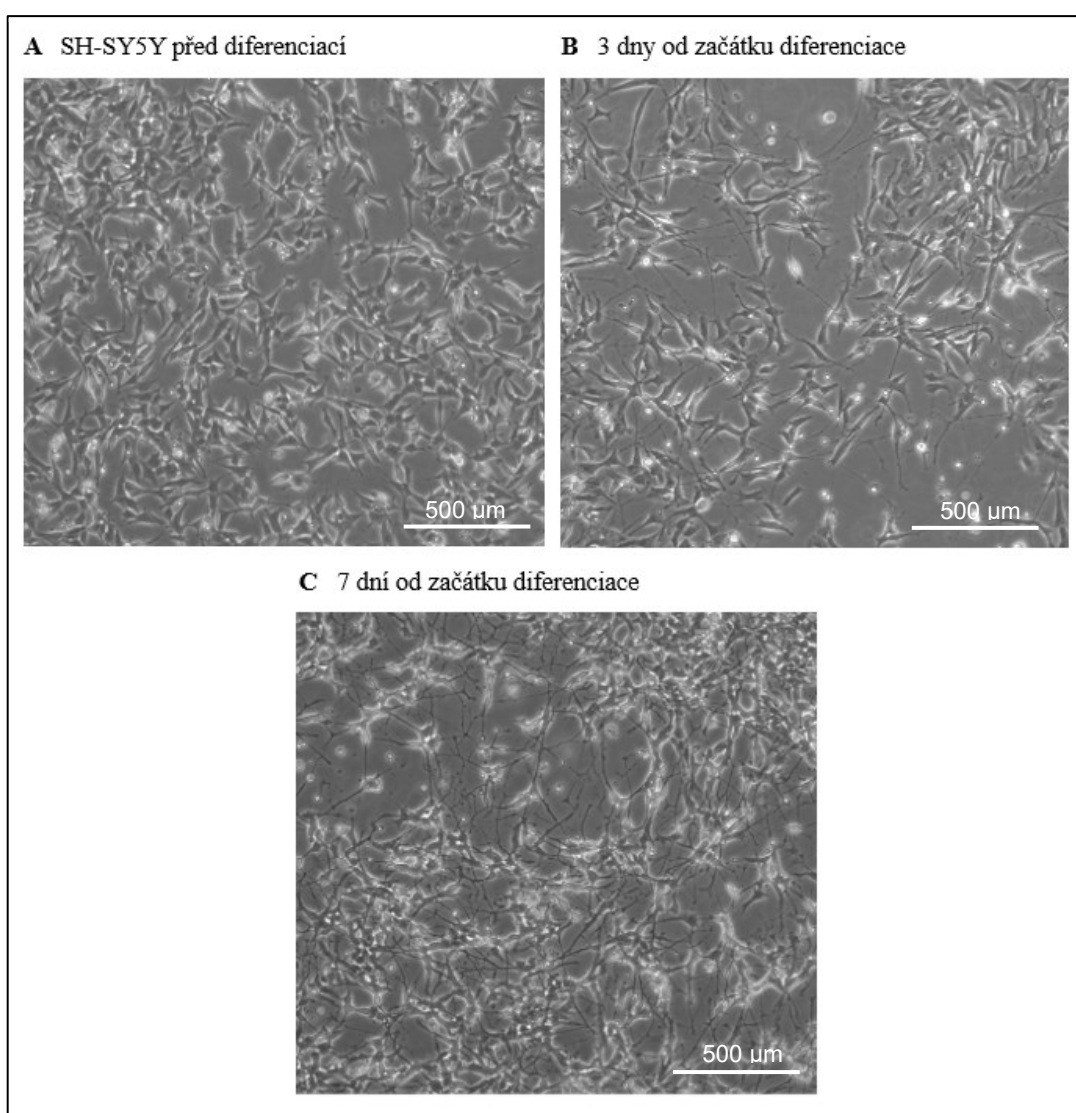
MAP-2	Santa Cruz	sc-20172	králík	1 000x	anti-R	40 000x
mGluR2	Abcam	ab-150387	králík	15 000x	anti-R	40 000x
MOR-1	OriGene	AP53000PU-N	králík	2 000x	anti-R	40 000x
NSE	Invitrogen	PA1-46203	králík	40 000x	anti-R	40 000x
SYP	Santa Cruz	SC-9116	králík	2 000x	anti-R	40 000x
TH	Abcam	ab-194760	králík	1 000x	anti-R	40 000x
$\beta$ 1-AR	Alomone	AAR-023	králík	1 000x	anti-R	40 000x
$\beta$ 2-AR	Alomone	AAR-016	králík	1 000x	anti-R	40 000x
$\beta$ 3-AR	Santa Cruz	sc-50436	králík	2 000x	anti-R	40 000x

## 5 Výsledky

### 5.1 Buněčná linie SH-SY5Y

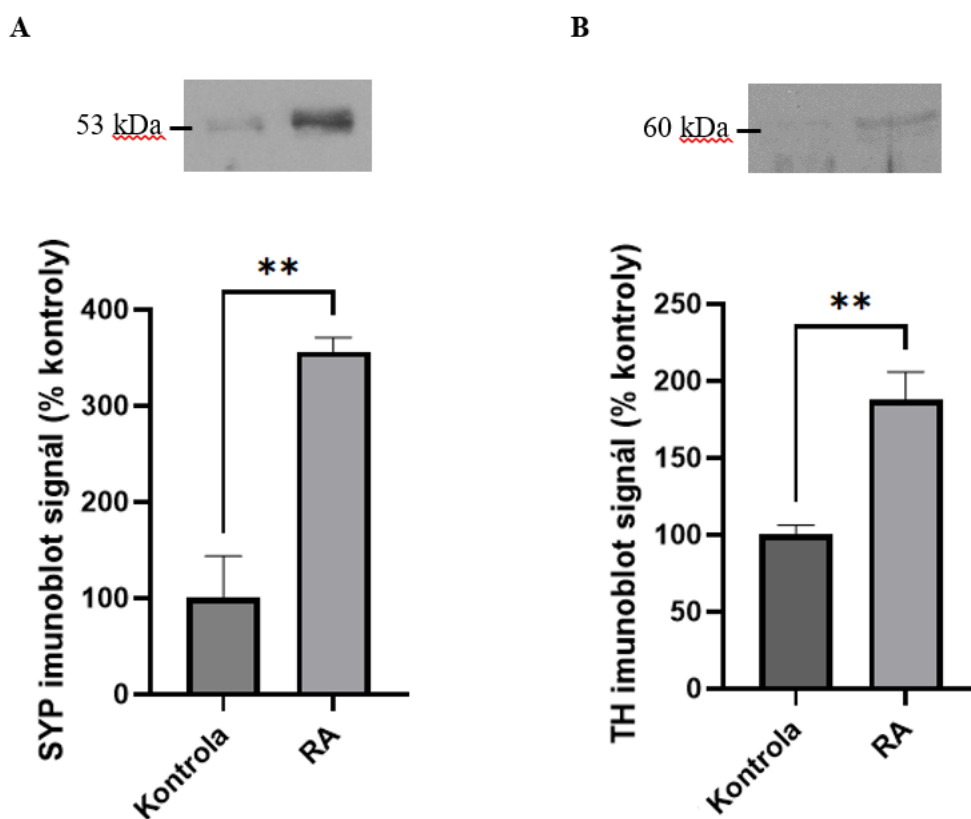
#### 5.1.1 Potvrzení diferenciací SH-SY5Y linie

Buňky byly v průběhu diferenciací pravidelně monitorovány pomocí mikroskopu. Z pořízených snímků lze vyzorovat výrazné morfologické změny, ke kterým po přidání RA postupně docházelo. SH-SY5Y kultivované s RA tvořily delší a větvenější výběžky, pomocí kterých se propojovaly do husté sítě (obr. 2).



**Obrázek 2:** Mikroskopické snímky SH-SY5Y kultur zachycující morfologické změny během diferenciací. A - buněčná kultura po pasážování a před první dávkou RA. Buňky jsou nepolarizované, tvoří krátké výběžky a rychle proliferují. B - buněčná kultura třetí den po přidání první dávky RA. Buňky začínají tvořit delší výběžky, přestávají proliferovat. C - buněčná kultura sedmý den od přidání první dávky RA. Buňky se fenotypově podobají maturovaným neuronům, tvoří dlouhé větvené výběžky, kterými se vzájemně propojují.

Za využití SDS-PAGE a Western blot metody byla u SH-SY5Y kultur dále měřena exprese biomarkerů synaptofyzinu a tyrozin hydroxylázy. Porovnávány byly buňky pěstované bez přídavku RA a buňky, ke kterým byla RA postupně přidána třikrát v průběhu sedmi dní. Hladiny obou markerů byly u buněk kultivovaných s RA oproti kontrolám signifikantně zvýšeny. Hladina exprimovaného SYP (molekulová hmotnost cca 53 kDa) byla u diferencovaných buněk oproti kontrolám vyšší o 256 % ( $p < 0,01$ ), exprese TH (molekulová hmotnost cca 60 kDa) byla oproti kontrolám vyšší o 87 % ( $p < 0,01$ ), viz graf 1.

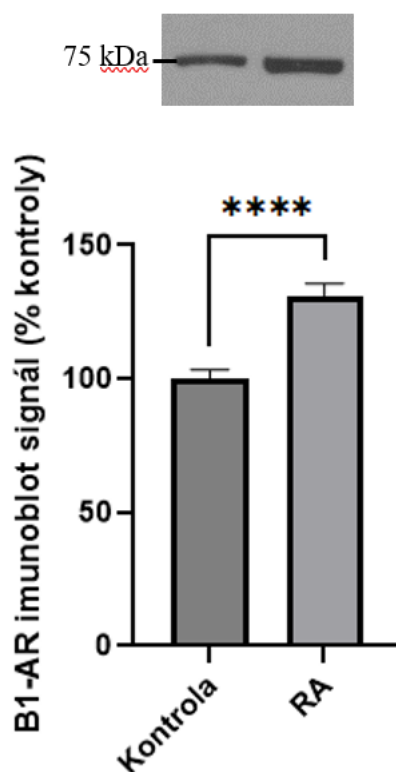


**Graf 1:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi biomarkerů synaptofyzinu (A) a tyrozin hydroxylázy (B) u kontrolních SH-SY5Y buněk a u diferencovaných SH-SY5Y kultivovaných s RA. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze tří pokusů (\*\*  $p < 0,01$ ).

### 5.1.2 $\beta$ adrenergní receptory

Možné změny v membránovém zastoupení  $\beta$  adrenergních receptorů probíhající při diferenciaci SH buněk byly zkoumány na subtypu  $\beta_1$ -AR, který se u obou typů zkoumaných SH-SY5Y buněk podařilo detekovat. Molekulová hmotnost receptoru odpovídala přibližně 75 kDa. Dle získaných výsledků došlo u SH-SY5Y po diferenciaci k signifikantnímu nárůstu exprese  $\beta_1$ -AR, přičemž u buněk kultivovaných s RA byl pozorován 31% nárůst ( $p < 0,0001$ ) oproti kontrolám (graf 2).

Aplikovány byly i protilátky proti  $\beta_3$ -AR a  $\beta_2$ -AR subtypu, jejich exprese u SH-SY5Y vzorků ale detekována nebyla.

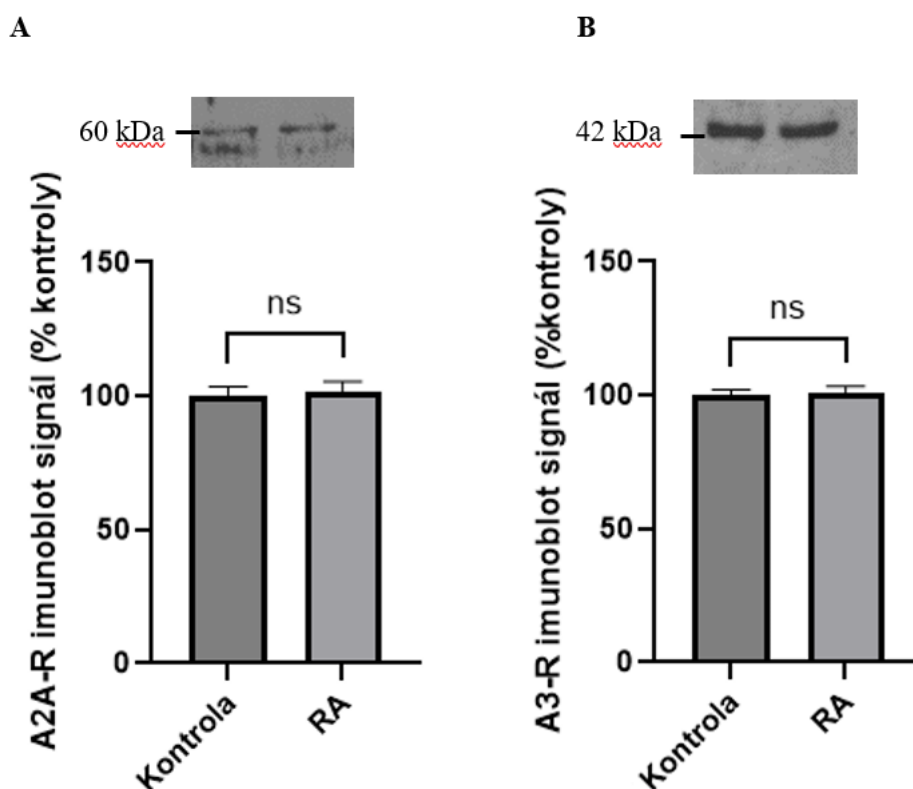


**Graf 2:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi  $\beta_1$ -AR u kontrolních SH-SY5Y buněk a u diferencovaných SH-SY5Y buněk kultivovaných s RA. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze tří pokusů (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 5.1.3 Adenosinové receptory

U kultivovaných SH-SY5Y buněk se podařilo úspěšně změřit expresi dvou adenosinových receptorů, A<sub>2A</sub> receptoru a A<sub>3</sub> receptoru. V případě A<sub>2A</sub> receptoru bylo vyhodnocení signálu komplikováno silným šumem a výrazným pozadím, které protilátka produkovala. Molekulová hmotnost detekovaného receptoru činila přibližně 60 kDa, po porovnání nediferencovaných a diferencovaných buněk nebyly u SH-SY5Y pozorovány signifikantní změny v expresi A<sub>2A</sub>-R. Molekulová hmotnost A<sub>3</sub>-R odpovídala 42 kDa a ani v případě tohoto receptoru nebyly odhaleny signifikantní rozdíly v jeho kvantitativním zastoupení u kontrolních a diferencovaných SH-SY5Y buněk (graf 3).

Dále byly na membrány aplikovány protilátky proti A<sub>2B</sub> a A<sub>1</sub> receptorům. V případě A<sub>2B</sub> receptoru se s dostupnou protilátkou nepodařilo signál detekovat a v případě A<sub>1</sub>-R byl měřený signál příliš slabý a nepravidelný pro spolehlivé vyhodnocení.

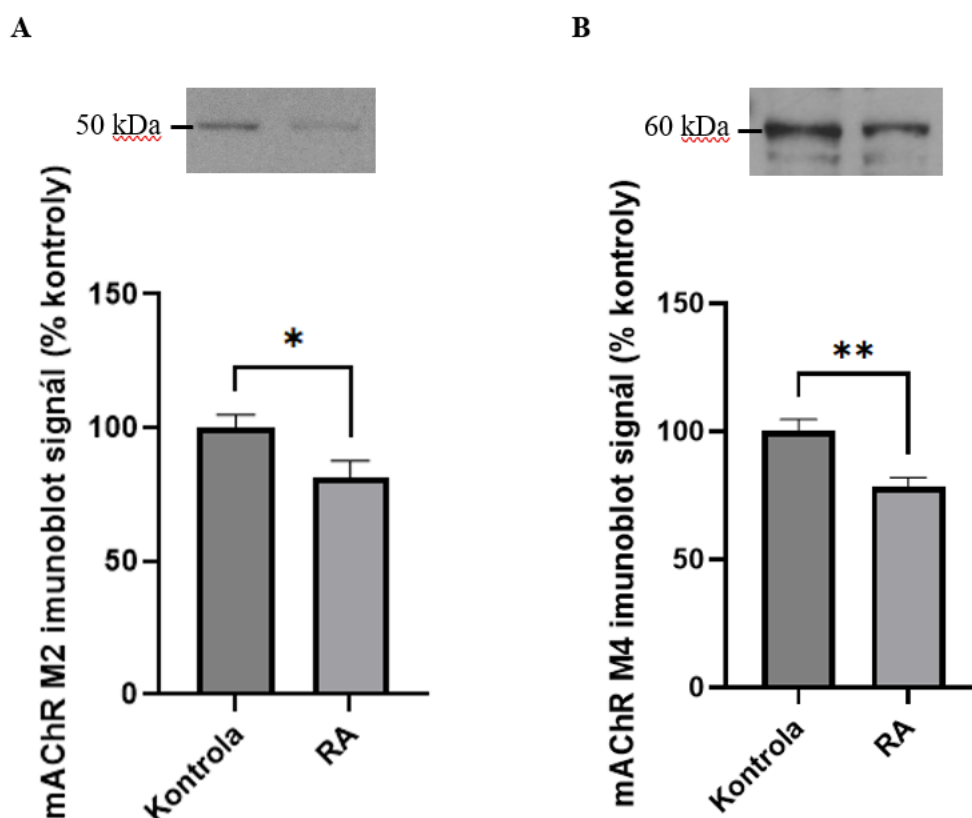


**Graf 3:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi adenosinových receptorů A<sub>2A</sub>-R (A) a A<sub>3</sub>-R (B) u kontrolních SH-SY5Y buněk a u diferencovaných SH-SY5Y kultivovaných s RA. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM ze čtyř pokusů.

#### 5.1.4 Muskarinové acetylcholinové receptory

V rámci mé práce byla u SH-SY5Y kultur kvantifikována míra exprese dvou subtypů muskarinových acetylcholinových receptorů, konkrétně mAChR M<sub>2</sub> a mAChR M<sub>4</sub>. Naměřená data ukazují, že po diferenciaci došlo k signifikantnímu poklesu v expresi obou sledovaných typů receptorů. V případě mAChR M<sub>2</sub> receptoru, jehož signál byl detekován v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 50 kDa, byl zaznamenán u diferencovaných SH-SY5Y buněk 19% pokles oproti kontrolám ( $p < 0,05$ ). Hladina mAChR M<sub>4</sub> receptoru (mol. hmotnost cca 60 kDa) byla dle získaných výsledků po diferenciaci snížena o 22 % ( $p < 0,01$ ) (graf 4).

Přítomnost posledního zkoumaného subtypu muskarinových acetylcholinových receptorů, receptoru mAChR M<sub>1</sub>, se u sklizených vzorků detekovat nepodařilo.

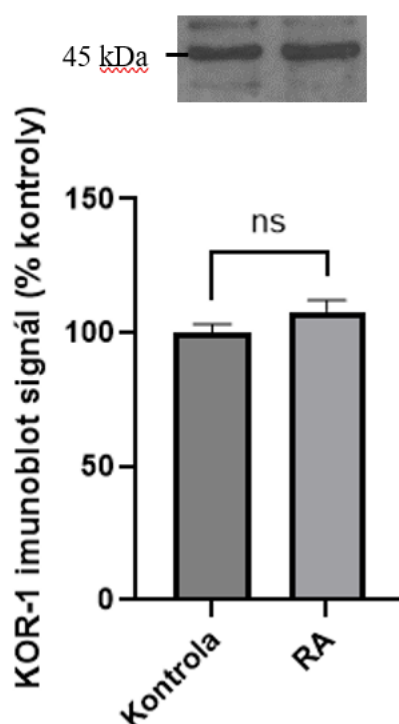


**Graf 4:** Repräsentativní imunoblots a grafy srovnávající expresi muskarinových acetylcholinových receptorů mAChR M<sub>2</sub> (A) a mAChR M<sub>4</sub> (B) u kontrolních SH-SY5Y buněk a u diferencovaných SH-SY5Y buněk kultivovaných s RA. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM ze tří (B) a čtyř (A) pokusů (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 5.1.5 Opioidní receptory

Posledním typem receptorů, jejichž hladina byla zkoumána, byly receptory opioidní. Úspěšně jsme změřili expresi KOR-1 receptoru, jehož molekulová hmotnost činila dle oblasti zaznamenaného signálu přibližně 45 kDa. U diferencovaných SH-SY5Y buněk byl oproti kontrolám zaznamenán lehký nárůst v hladinách KOR-1, změny ovšem nebyly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní. Kvantifikaci signálu v průběhu všech pokusů komplikovalo, podobně jako v případě A<sub>2A</sub> receptoru, silné pozadí (graf 5).

DOR-1 typ opioidního receptoru nebyl u mých vzorků detekován. Signál způsobený expresí MOR-1 receptoru se naměřit podařilo, množství získaných dat však nestačilo na přesné a spolehlivé vyhodnocení a proto jsem se rozhodla ho v této práci vynechat.



**Graf 5:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi opioidního receptoru KOR-1 u kontrolních SH-SY5Y buněk a u diferencovaných SH-SY5Y buněk kultivovaných s RA. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM ze tří pokusů.

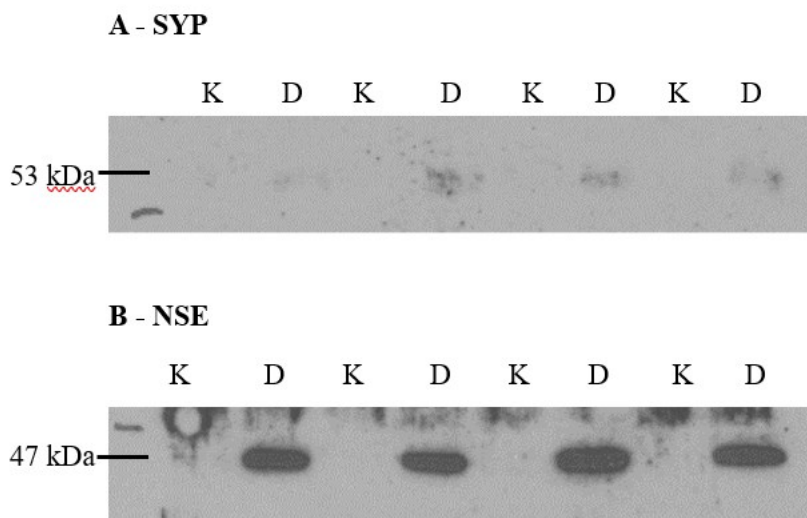


## 5.2 iPSC linie

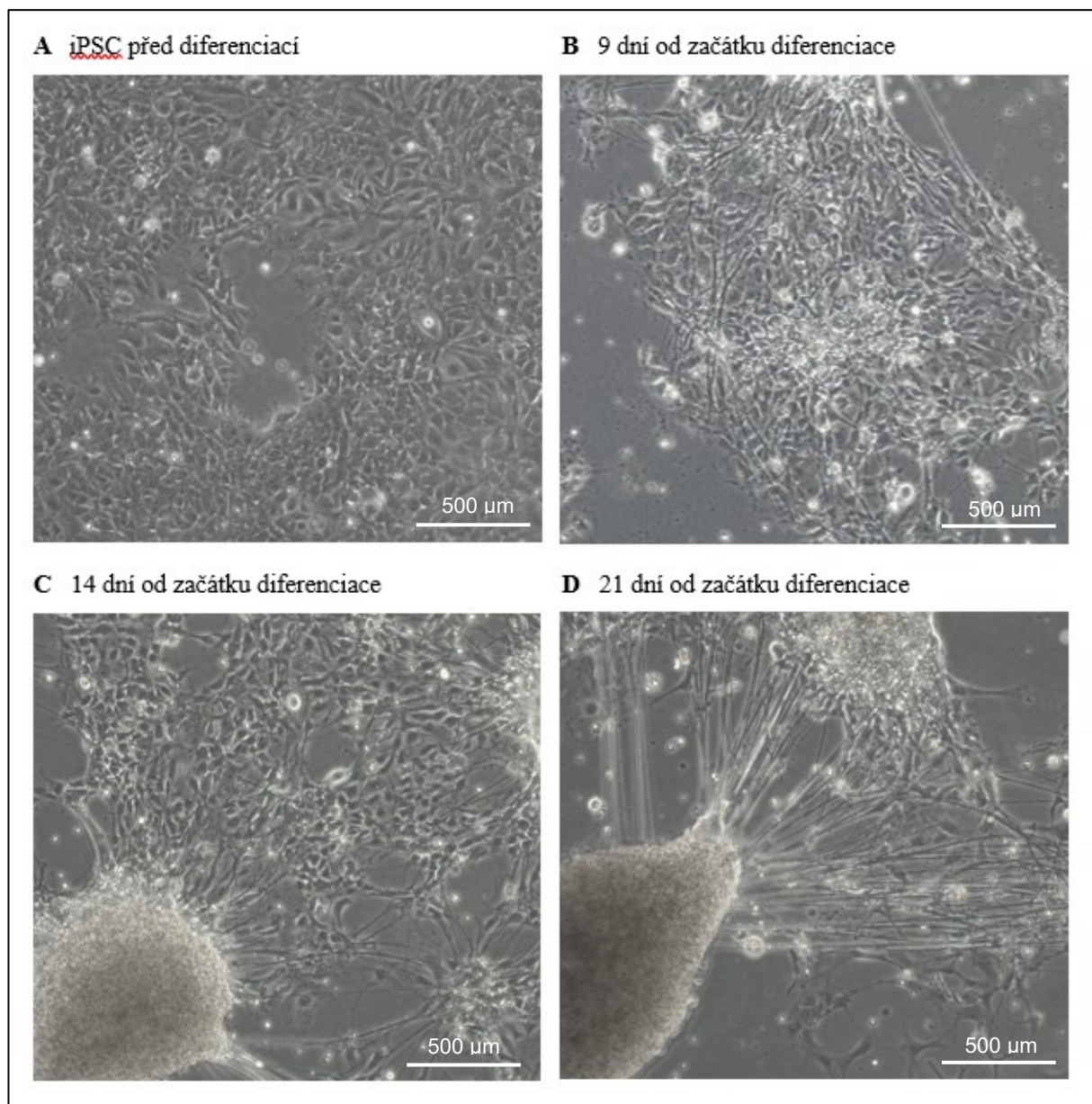
### 5.2.1 Potvrzení diferenciaci iPSC linie

Průběh navození diferenciaci byl průběžně sledován pomocí mikroskopu. Přejít iPSC buněk k maturovanému neurálnímu fenotypu doprovázely morfologické změny, ke kterým v průběhu 21 dní docházelo. Buňky postupně přestaly proliferovat, prodlužovaly délku svých výběžků a tvořily výrazné shluky (obr. 4).

Úspěšnost diferenciaci byla dále ověřena detekcí exprese biomarkerů diferenciaci NSE a SYP, k čemuž byla opět použita SDS-PAGE a Western blot. Získaná data vykazují výrazný nárůst hladin NSE (molekulová hmotnost zhruba 53 kDa) i SYP (molekulová hmotnost zhruba 47 kDa) u diferencovaných buněk oproti kontrolám (viz. obr. 3). Exprese obou biomarkerů byla u kontrol prakticky nedetekovatelná a vyvolané imunoblotty prokazují změnu v expresi NSE a SYP samy o sobě, proto nebyly dále kvantitativně vyhodnocovány.



**Obrázek 3:** Reprezentativní imunoblotty znázorňující expresi synaptofyzinu (A) a neuron specifické enolázy (B) u iPSC buněčné linie. Porovnávají jsou kontroly (K) a buňky, které prošly 21denní diferenciací (D).

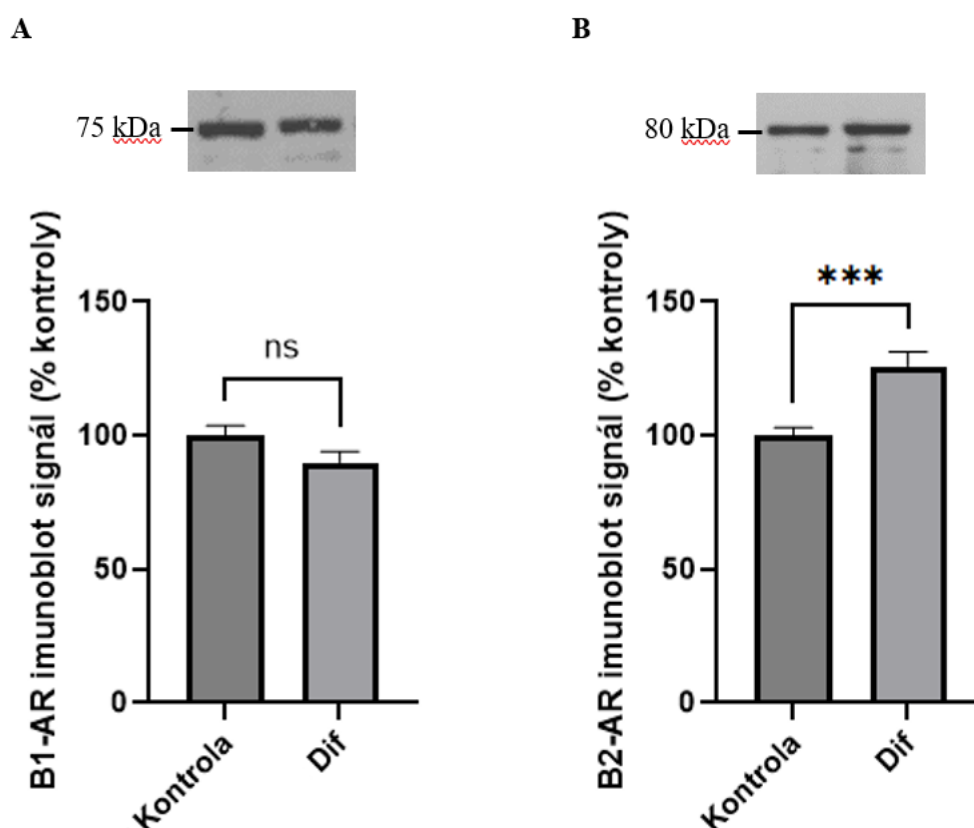


**Obrázek 4:** Mikroskopické snímky iPSC kultur zachycující morfologické změny během diferenciace. A - buněčná kultura před zahájením diferenciace. Buňky jsou nepolarizované, tvoří krátké výběžky, proliferují a jsou takřka rovnoměrně rozptýleny na podkladu. B - buněčná kultura devátý den po zahájení diferenciace. Buňky začínají tvořit delší výběžky, přestávají proliferovat a začínají se shlukovat. C - buněčná kultura 14. den od začátku diferenciace. Buňky prodlužují své výběžky a tvoří výrazné shluky na podkladu. D- buněčná kultura 21. den od začátku diferenciace. Shluky buněk se dále zvětšují, buňky zastavují proliferaci. Kultura se morfologicky podobá vyspělým nervovým buňkám.

### 5.2.2 $\beta$ adrenergní receptory

Rozdíly v hladinách  $\beta$  adrenergních receptorů byly zkoumány na kontrolních nediferencovaných iPSC buňkách a iPSC buňkách, u kterých byla indukována diferenciace. V případě iPSC kultur se podařilo, stejně jako u SH-SY5Y linie, detekovat a kvantifikovat přítomnost  $\beta_1$ -AR. Molekulová hmotnost tohoto receptoru odpovídala zhruba 75 kDa. Naměřená data sice naznačují mírné snížení hladiny  $\beta_1$ -AR, změna ale nebyla považována za signifikantní. Dále byla u diferencovaných a nediferencovaných iPSC buněk porovnávána exprese  $\beta_2$ -AR, kterou se u SH-SY5Y linie nepodařilo spolehlivě změřit. Hladina  $\beta_2$ -AR, jehož molekulová hmotnost činila přibližně 80 kDa, byla u iPSC buněk prošlých diferenciací výrazně vyšší než u kontrol, a to o 26 % ( $p < 0,001$ ) (graf 6).

$\beta_3$ -AR protilátky nebyly po zkušenosti s SH-SY5Y linií na iPSC vzorky z důvodů šetření se získaným materiálem aplikovány.

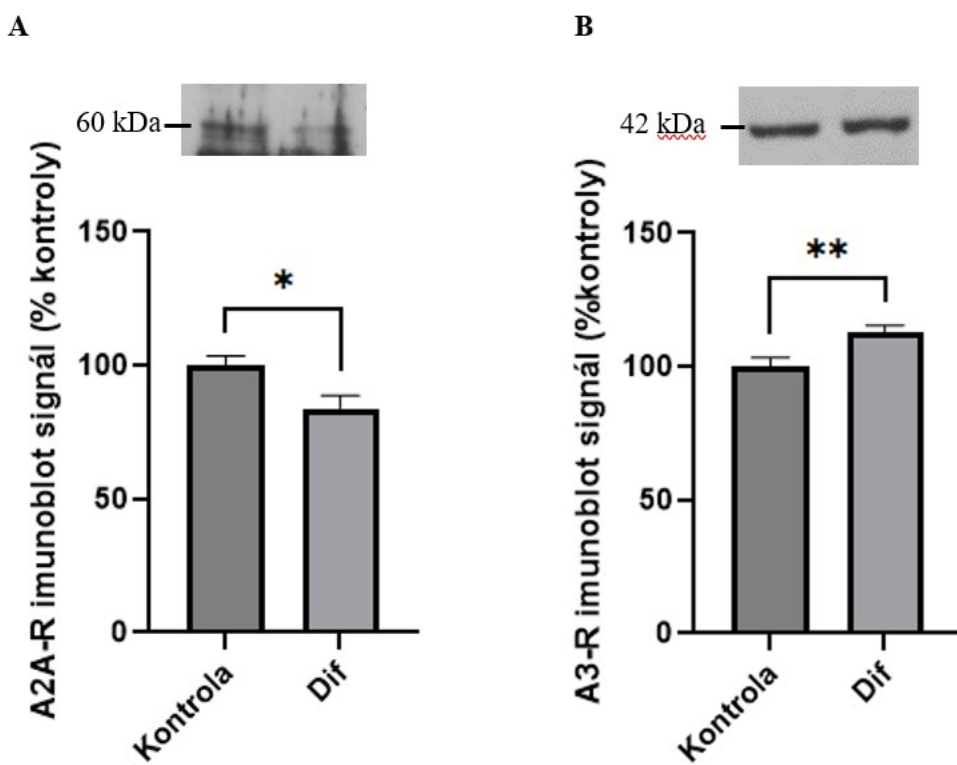


**Graf 6:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi  $\beta$  adrenergních receptorů  $\beta_1$ -AR (A) a  $\beta_2$ -AR (B) u kontrolních iPSC buněk a u diferencovaných iPSC buněk. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze čtyř pokusů (\*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.2.3 Adenosinové receptory

Zastoupení adenosinových receptorů v diferencovaných a nediferencovaných iPSC buňkách bylo opět demonstrováno na receptorech A<sub>2A</sub>-R a A<sub>3</sub>-R. Signál odpovídající adenosinovému A<sub>2A</sub> receptoru se podařilo detekovat v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 60 kDa. Naměřené výsledky značí snížení hladiny A<sub>2A</sub>-R o 16 % ( $p < 0,05$ ) u diferencovaných iPSC buněk oproti kontrolám. Použitá protilátka ovšem generovala silné pozadí, které ztěžovalo interpretaci bandů, podobně jako u SH-SY5Y vzorků (viz reprezentativní imunoblot níže). V případě A<sub>3</sub>-R (detekovaná molekulová hmotnost cca 42 kDa) bylo naopak naměřeno signifikantní zvýšení hladiny tohoto receptoru o 13 % oproti kontrolám ( $p < 0,01$ ) (graf 7).

Protilátky proti A<sub>2B</sub> a A<sub>1</sub> receptorům na získaných iPSC vzorcích zkoušeny nebyly.

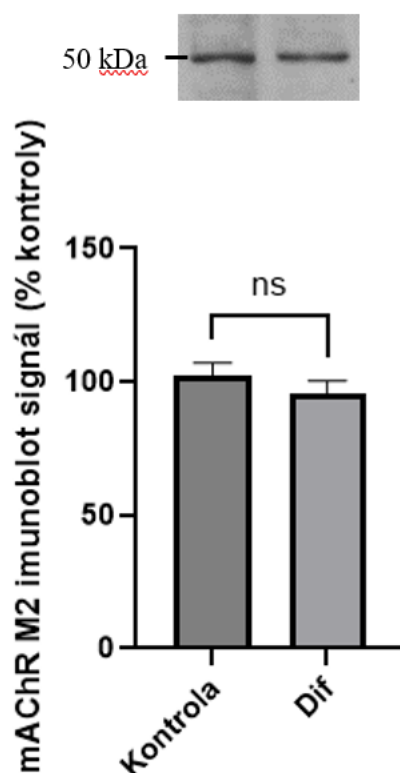


Graf 7: Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi adenosinových receptorů A<sub>2A</sub>-R (A) a A<sub>3</sub>-R (B) u kontrolních iPSC buněk a u diferencovaných iPSC buněk. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr  $\pm$  SEM ze tří (A) a čtyř (B) pokusů (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 5.2.4 Muskarinové acetylcholinové receptory

Při práci s iPSC buňkami se podařilo úspěšně kvantifikovat hladiny pouze jednoho typu muskarinových acetylcholinových receptorů, a to receptoru mAChR M<sub>2</sub>. Naměřený signál odpovídal molekulové hmotnosti 50 kDa. Výsledky analýzy signálu neodhalily statisticky významné změny v zastoupení tohoto receptoru u diferencovaných iPSC oproti kontrolám, a to i přes zdánlivý lehký pokles v expresi mAChR M<sub>2</sub> u diferencovaných buněk, který se ale nedá považovat za signifikantní (graf 8).

Receptory mAChR M<sub>1</sub> a mAChR M<sub>4</sub> nebyly na vzorcích iPSC kultur zkoumány.

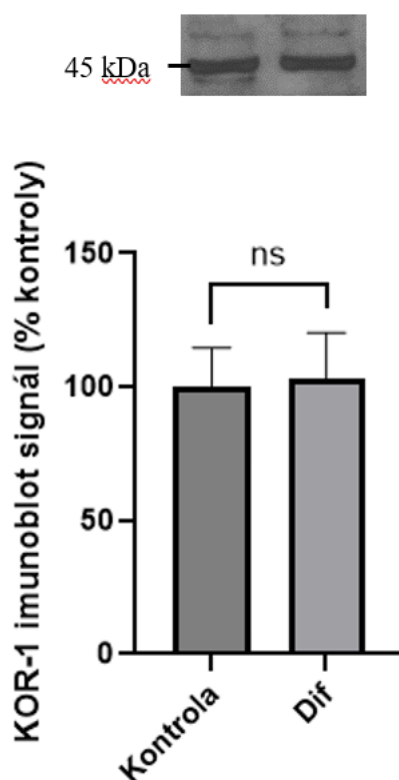


**Graf 8:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající expresi muskarinového acetylcholinového receptoru mAChR M<sub>2</sub> u kontrolních iPSC buněk a u diferencovaných iPSC buněk. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM ze čtyř pokusů.

### 5.2.5 Opioidní receptory

Z řad opioidních receptorů byl k analýze znovu vybrán KOR-1. Práce s protilátkou proti tomuto typu receptoru byla opět komplikována silnějším šumem pozadí podobně jako u SH-SY5Y linie, zkoumaný receptor se ale podařilo identifikovat v oblasti odpovídající 45 kDa. Získaná data však neprokazují žádné signifikantní změny, ke kterým by po diferenciaci u iPSC buněk docházelo (graf 9).

Na vzorcích byly také zkoušeny protilátky proti DOR-1, které negenerovaly detekovatelný signál, a protilátky proti MOR-1, u kterého bohužel nebylo nasbíráno potřebné množství spolehlivých dat pro vyhodnocení jeho exprese.



**Graf 9:** Reprezentativní imunoblotty a grafy srovnávající KOR-1 u kontrolních iPSC buněk a u diferencovaných iPSC buněk. Hodnoty na ose y odpovídají relativní míře exprese v % oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM ze tří pokusů.

## 6 Diskuse

Naše studie byla provedena za využití lidské neuroblastomální SH-SY5Y linie a lidských iPSC buněk. Obě modelové linie se podařilo kultivovat a sklídit v dostatečném množství pro následné analýzy tak, aby bylo možné následné experimenty opakovat nejméně třikrát až čtyřikrát a u obou typů buněk se také úspěšně podařilo navodit diferenciaci v neurální buněčný typ. Mezi jeden ze znaků, kterými se diferencované buňky mohou odlišovat od nediferencovaných kontrol, patří míra zastoupení jednotlivých GPCRs na membránách zkoumaných buněk. V souvislosti s přeměnou ve zralý neurální fenotyp buňky vykazují zvýšenou metabolickou aktivitu a procházejí výraznými morfologickými změnami, s čímž souvisí i případné modulace v signálních drahách, do kterých jsou GPCRs zapojeny (Schneider et al., 2011b; Pandey et al., 2022). V rámci této práce se podařilo prostřednictvím SDS-PAGE a Western blotu změřit a porovnat hladiny několika vybraných receptorů, a to jak u kontrolních SH-SY5Y a iPSC vzorků, tak u diferencovaných SH-SY5Y a iPSC buněk.

V případě SH-SY5Y buněk byla diferenciaci indukována aplikací RA. Tato metoda byla vybrána proto, že se jedná o metodu v praxi hojně využívanou a její průběh je dobře popsán (Encinas et al., 2002). U diferencovaných SH-SY5Y buněk byly pozorovány výrazné fenotypové změny typické pro buňky inkubované s RA - buňky tvořily delší a více větvené neurity a přestaly proliferovat. Proběhlá diferenciaci byla také dokázána pomocí měření exprese diferenciačních biomarkerů, jmenovitě TH a SYP, jejichž přítomnost ve sklizených vzorcích byla kvantifikována za využití techniky Western blot. Detekovaná molekulová hmotnost TH činila 60 kDa, což odpovídalo hmotnostem uváděným v dostupných publikacích. Molekulová hmotnost SYP byla na základě získaných dat odhadnuta na 53 kDa, je tedy mírně vyšší, než typické molekulové hmotnosti odpovídající monomeru SYP, po srovnání s obvykle uváděnou hmotností (35-55 kDa) je však stále přijatelná a dle jiné studie může detekovaný SYP hmotnostně odpovídat dimeru či komplexu SYP a membránového proteinu asociovaného s vezikuly (Johnston and Südhof, 1990; Calakos and Scheller, 1994). Získaná data poukazují na 256% zvýšení exprese SYP a 87% nárůst v expresi TH u diferencovaných SH-SY5Y buněk, což je v souladu s výsledky jiných studií, kde u buněk kultivovaných s RA k nárůstu těchto markerů také dochází (Cheung et al., 2009; Lopes et al., 2010; Khwanraj et al., 2015).

Diferenciaci kultivovaných iPSC buněk byla prokázána podobným způsobem. Sledovanými biomarkery diferenciaci byl znovu SYP (detekovaná mol. hm. 53 kDa) a NSE

(detekovaná mol. hm. 47 kDa). Ze získaných imunoblotů vyplývalo, že hladina obou proteinů byla u diferencovaných vzorků výrazně vyšší než u kontrol, u kterých byly tyto markery prakticky nedetekované. NSE a SYP nebyly dále kvantitativně vyhodnocovány, poněvadž reprezentativní imunoblotty dostatečně prokazují diferenciací navozené zvýšení jejich exprese (Koehler et al., 2011).

První skupinou GPCRs, na které jsme se zaměřili, byly adrenergní receptory. Publikované studie se zaměřují spíše na skupinu  $\alpha$  adrenergních receptorů (Bawa-Khalfe et al., 2007), zatímco v mé práci byly zkoumány  $\beta$ -AR. V případě  $\beta_1$ -AR odpovídala detekovaná velikost receptoru, která činila zhruba 75 kDa, obvyklé molekulové velikosti uváděné v publikacích. Pozorovaná molekulová hmotnost  $\beta_2$ -AR odpovídala přibližně 80 kDa přičemž uváděné velikosti tohoto receptoru se běžně pohybují v rozmezí 46 kDa až 85 kDa (vyšší hmotnosti spíše naznačují detekci dimeru) (Strohsacker et al., 1985).  $\beta_3$ -AR receptory detekovány nebyly, nejspíše vzhledem k jejich rozšíření zejména v buňkách tukové tkáně a močového systému (shrnuto v Schena and Caplan, 2019).

Naměřené hladiny  $\beta_1$ -AR v SH-SY5Y vzorcích vykazovaly signifikantní 31% nárůst exprese u diferencovaných buněk oproti kontrolám. Zajímavé je, že u iPSC linie byl naopak pozorován lehký pokles v hladinách  $\beta_1$ -AR u diferencovaných vzorků, který ovšem nebyl považován za signifikantní. iPSC buňky dále vykazovaly signifikantní nárůst v expresi  $\beta_2$ -AR, jehož výskyt byl u diferencovaných buněk zvýšený o 26 %. Výzkum z roku 2016 provedený na lidských iPSC buňkách diferencovaných v kardiomyocyty (hiPSC) poskytuje zajímavé srovnání s naším pozorováním. Cílí na  $\beta_1$ -AR, jehož hladina byla u diferencovaných hiPSC signifikantně zvýšena zejména mezi 30. a 60. dnem diferenciaci (nárůst od 1. dne do 30. byl minimální a nebyl považován za signifikantní), což naznačuje, že k nárůstu exprese tohoto receptoru může docházet až v průběhu delšího časového horizontu. Zkoumá i hladiny  $\beta_2$ -AR, u kterého dochází k výraznému zvýšení exprese již na začátku diferenciaci mezi 1. a 30. dnem. Tyto výsledky poměrně dobře korelují s našimi daty, jelikož naše buňky byly sklizeny 21. den od počátku diferenciaci, tudíž by nemohlo dojít k signifikantnímu nárůstu  $\beta_1$ -AR a zvýšená exprese  $\beta_2$ -AR naopak mohla být detekována. Celkový vliv  $\beta$ -AR zprostředkované signalizace dle této publikace výrazně roste až v pozdějších stádiích diferenciaci (kolem 90. dne a později) (Jung et al., 2016).

Ze skupiny adenosinových receptorů se podařilo kvantifikovat expresi dvou subtypů, a to  $A_{2A}$  a  $A_3$  receptoru. I přes to, že byl detekovaný  $A_{2A}$ -R signál oproti zbytku použitých



protilátek u obou použitých buněčných linií poněkud rozmazaný (viz reprezentativní imunoblots na grafu 3 a grafu 7), dle vzorové studie uvedené v katalogovém listu konkrétní protilátky byl však stále v normě a mohl být vyhodnocen. Odhadovaná velikost  $A_{2A}$ -R receptoru, která činila přibližně 60 kDa, byla mírně vyšší než obvykle uváděná detekovaná velikost (45-50 kDa), rozdíly však mohou být způsobeny přítomností případných modifikací receptoru. V případě  $A_3$ -R korespondovala pozorovaná molekulová hmotnost (zhruba 42 kDa) s hmotností ze vzorového blotu uvedeného v katalogovém listu protilátky (43 kDa).

Změřené hladiny  $A_{2A}$  a  $A_3$  receptorů se u diferencovaných a kontrolních SH-SY5Y buněk signifikantně nelišily. Data ze studie z roku 2011 provedené na lidských mezenchymálních kmenových buňkách diferencovaných v osteoblasty ale popisují signifikantní nárůst exprese  $A_{2A}$ -R (přibližně o 75 % po sedmi dnech diferenciaci) u diferencovaných buněk oproti kontrolám, což ukazuje, že za využití jiného modelu může v rámci diferenciaci v různé buněčné typy ke změně v expresi tohoto receptoru docházet. Tato studie také poukazuje na skutečnost, že adenosinové receptory mohou představovat cíle například pro farmakologickou léčbu osteoporózy či revmatické artritidy. Stejná studie se zabývala také měřením hladin  $A_3$ -R, v tomto případě však nebyl pozorovaný nárůst považován za signifikantní, a měřením exprese  $A_{2B}$ -R a  $A_1$ -R, u kterých byl pozorovaný nárůst po diferenciaci ještě výraznější než u  $A_{2A}$ -R (Gharibi et al., 2011).

V případě iPSC buněk byly u obou sledovaných adenosinových receptorů pozorovány signifikantní rozdíly v jejich expresi. Hladina  $A_{2A}$  receptoru byla u diferencovaných iPSC snížena o 16 % oproti kontrolám. Stejný typ receptoru byl zkoumán v rámci studie Chiu et al. z roku 2015, která probíhala také na lidských iPSC buňkách (všechny vzorky byly diferencovány v DARPP32-positivní GABAergní neurony) a porovnávala iPSC buňky získané od pacienta s Huntingtonovou chorobou (HD) s mutací v genu pro huntingtin s kontrolními iPSC bez mutace. Jedním z výsledků této studie byl pokles hladiny  $A_{2A}$ -R mRNA i samotného  $A_{2A}$ -R receptoru u HD-iPSC diferencovaných buněk oproti diferencovaným kontrolám (vzorky buněk bez HD mutace) (Chiu et al., 2015). Je tedy možné, že bychom pozorovali podobný pokles i při porovnávání našich iPSC buněk s mutací v genu PSEN1 s iPSC buňkami získanými od zdravého jedince bez predispozic pro AD. Aktivace  $A_{2A}$ -R je dále spojována s ochranou buněk před oxidativním stresem a apoptózou (Huang et al., 2001; Bshesh et al., 2002), tudíž by sledovaný úbytek těchto receptorů mohl souviset s rozvojem neurodegenerace, která HD a jiné choroby napadající nervovou soustavu doprovází.

Hladina dalšího měřeného adenosinového receptoru A<sub>3</sub>-R pak byla u diferencovaných iPSC o 13 % vyšší než u nediferencovaných buněk. Zdá se ale, že jeho výskyt může v průběhu diferenciaci také klesat, například při porovnávání nediferencovaných a diferencovaných lidských dendritických buněk (Novitskiy et al., 2008), což znovu poukazuje na důležitost vhodně zvolené modelové linie v závislosti na tom, co konkrétní studie zkoumá.

Třetím měřeným typem receptorů byly muskarinové receptory, GPCRs typicky aktivované acetylcholinem. Receptor mAChR M<sub>2</sub> o molekulové hmotnosti 50 kDa byl úspěšně detekován u SH-SY5Y linie, kde byl u diferencovaných buněk zaznamenán 19% pokles v jeho hladině oproti kontrolám. Podobný pokles byl pozorován i v případě mAChR M<sub>4</sub> receptoru (detekovaná hmotnost odpovídala zhruba 60 kDa), u kterého došlo dle naměřených dat ke 22% snížení v množství tohoto receptoru u diferencovaných SH buněk. Jedna ze starších studií zveřejněná v roce 1993, která byla provedená na SK-N-SH buňkách a měřila všechny známé typy muskarinových receptorů, však prezentuje zvýšení exprese mAChR M<sub>2</sub>, zatímco exprese mAChR M<sub>4</sub> byla u diferencovaných buněk snížena stejně jako v naší studii (Baumgartner et al., 1993).

mAChR M<sub>2</sub> receptor byl změřen také ve vzorcích iPSC buněk. U této linie vykazovaly diferencované buňky pouze lehký pokles v expresi receptoru oproti kontrolám, který nebyl považován za signifikantní. Muskarinové M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub> receptory se mohou také přímo zapojovat do procesu diferenciaci iPSC buněk v neurální kmenové buňky. Aplikace agonistů těchto receptorů v rámci studie prováděné na myších iPSC, které exprimovaly mAChR M<sub>2</sub> i mAChR M<sub>4</sub>, vedla k potlačení procesu diferenciaci skrze inhibici AC, snížení tvorby cAMP a utlumení cAMP/PKA dráhy, která aktivuje transkripční faktor CREB (Ishizuka et al., 2018).

Výsledky jiných publikovaných experimentů provedených na buňkách myšního embryonálního karcinomu P19 poukazují na výrazný nárůst v expresi mRNA pro mAChR M<sub>2</sub> v průběhu diferenciaci, který dosáhl maxima okolo šestého dne od počátku diferenciaci. Hladina mRNA ovšem poslední (osmý) den diferenciaci klesla zpět přibližně na hladinu před diferenciací (Resende et al., 2008). Je možné, že jsme podobný nárůst u iPSC buněk nezaznamenali z důvodu výrazně delší diferenciaci, v průběhu které nebyly sklizeny vzorky pro dílčí měření, nebo proto, že se procesy diferenciaci u těchto modelových linií příliš liší.

Měření exprese opioidních receptorů, konkrétně KOR-1, bylo u všech vzorků komplikováno poměrně silným pozadím, které použitá protilátka generovala, a které muselo být důkladně odfiltrováno. Identifikovaný KOR-1 se nacházel v oblasti velikostně odpovídající 45 kDa, což souhlasí s obvykle uváděnou molekulovou hmotností v jiných publikacích. Jak u SH-SY5Y buněk, tak u iPSC buněk však nebyly naměřeny takové změny v expresi KOR-1, které by bylo možné považovat za statisticky signifikantní.

Hladiny KOR-1 se i přes to, že se nám po 21 dnech diferenciaci nedařilo detekovat žádný výrazný nárůst nebo pokles, mohou v průběhu buněčné diferenciaci měnit. Publikovaná studie z roku 2022, která měří expresi KOR-1 na mozkových organoidech generovaných z iPSC, ukazuje, že jsou případné změny indukované přidáváním agonistů opioidních receptorů v průběhu diferenciaci. V rámci této studie došlo po pěti dnech k signifikantnímu zvýšení množství KOR-1 mRNA po aplikaci morfinu a buprenorfinu oproti kontrolám. Lze tedy předpokládat, že právě aplikace agonisty je nezbytná pro aktivaci konkrétních drah řízených KOR-1, výsledkem čehož je i zvýšení tvorby samotného receptoru (Fernandes et al., 2022).

V průběhu této práce bylo provedeno mnoho experimentů s protilátkami, které negenerovaly při aplikaci na membrány detekovatelný signál nebo byla míra získaného signálu i po zopakování pokusu příliš nekonzistentní pro spolehlivé statistické vyhodnocení. Konkrétně jde o protilátky proti adenosinovým receptorům A<sub>1</sub>-R a A<sub>2B</sub>-R, opioidním receptorům DOR-1 a MOR-1, muskarinovému receptoru mAChR M<sub>1</sub>, glutamátovému receptoru mGluR2 a β adrenergnímu receptoru β<sub>3</sub>-AR. To, že se nám tyto receptory nepodařilo na vybraných liniích detekovat, nemusí znamenat, že je tyto buňky neexprimují. Jednou z možných příčin mohla být chyba v postupu blotování či špatné ředění primárních protilátek, experimenty byly ale vždy prováděny několikrát s různými ředěními a s novými membránami tak, aby se postup optimalizoval. Dalším důvodem, proč se výše zmíněné receptory nepodařilo kvantifikovat, může být nevhodná nebo prošlá protilátka nebo fakt, že se signál generovaný protilátkou mohl částečně překrývat se signálem dříve použité protilátky, který se po ostripování membrány nepodařilo zcela odstranit. Vzhledem k časové náročnosti kultivace a diferenciaci použitých linií a výčtu receptorů, které jsme chtěli detekovat, bylo množství sklizeného materiálu omezené a proto nebylo možné zkoušet všechny dostupné protilátky až do získání uspokojivých výsledků.

Studie pro tento typ experimentů využívají také další modelové linie (mimo iPSC a SH-SY5Y buňky např. HEK-293 nebo HeLa linie) a zveřejněné výsledky jsou často protichůdné v závislosti na tom, v jaký buněčný typ buňky diferencují a jaké metody jsou použity. Příkladem může být studie z roku 2019, která demonstruje vliv zvolené metody na SH-SY5Y buňkách. Ty byly diferencovány za využití různých metod a výsledkem byly kultury, které se odlišovaly citlivostí k toxickému amyloidu  $\beta$  (Krishtal et al., 2019). Případné snížení či zvýšení hladiny receptorů navíc nemusí přímo korelovat s množstvím funkčních receptorů, které buňka aktuálně využívá, jelikož může zároveň docházet například k desenzitizaci a internalizaci receptoru. Celková míra odpovědi na extracelulární signál může být dále ovlivněna i na úrovni heterotrimerních G proteinů a jejich efektorů, popřípadě v dalších fázích signální kaskády.

## 7 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat změny v hladinách exprimovaných GPCRs, ke kterým by mohlo docházet v průběhu buněčné diferenciaci v neurální fenotyp. Pro tyto účely byla vybrána modelová linie SH-SY5Y a lidské iPSC buňky. Úspěšnost indukované diferenciaci byla dokázána detekcí a kvantifikací biomarkerů typických pro zralé neurální buňky.

Ze získaných dat a z dalších dostupných publikací je zřejmé, že se množství jednotlivých receptorů při diferenciaci často mění, a to v obou směrech. V průběhu našich experimentů byla pozorována signifikantně vyšší exprese  $\beta_1$ -AR u diferencovaných SH-SY5Y buněk, exprese  $\beta_2$ -AR byla rovněž signifikantně zvýšena u diferencovaných iPSC. V případě adenosinových receptorů se u SH-SY5Y linie neprokázal signifikantní rozdíl v expresi  $A_{2A}$ -R a  $A_3$ -R, při detekci totožných receptorů na iPSC vzorcích byl však pozorován pokles v hladinách  $A_{2A}$ -R a nárůst  $A_3$ -R. Muskarinové receptory mAChR  $M_2$  a mAChR  $M_4$  vykazovaly u diferencovaných SH-SY5Y buněk úbytek, přičemž pokles v hladině mAChR  $M_4$  pozitivně koreluje s již dříve zveřejněnými daty o změnách v poměrech jednotlivých subtypů muskarinových receptorů v průběhu diferenciaci. V případě KOR-1 nebyly ani u jedné z vybraných modelových linií pozorovány signifikantní změny v jeho expresi.

Z výše uvedeného je jasné, že charakter pozorované změny souvisí nejen s konkrétním podtypem daného receptoru, ale i s buněčnou linií, na které je proces demonstrován. Další získané znalosti v této oblasti by proto mohly být užitečné při výběru správné modelové linie pro experimenty cílící na konkrétní GPCRs.

Dalšími typy receptorů, jejichž expresi by bylo přínosné zejména u SH-SY5Y linie porovnávat, jsou receptory dopaminové. SH-SY5Y buňky totiž přirozeně vykazují dopaminergní charakter a obdržaná data by mohla být využita pro studie, které se zabývají nástupem a léčbou Parkinsonovy choroby. Případným pokračováním této práce by také mohla být studie zaměřená na změny v expresi heterotrimerních G proteinů či efektorových molekul G proteinů, jako jsou jednotlivé subtypy AC, v rámci které by se mohly signální dráhy a jejich komponenty mezi diferencovanými a nediferencovanými buňkami porovnat důkladněji.

## 8 Seznam literatury

- Ahlquist, RP (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153, 586–600.
- Alrashidi, H, Eaton, S, and Heales, S (2021). Biochemical characterization of proliferative and differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Parkinson's disease. *Neurochem Int* 145, 105009.
- Ananthan, S, Khare, NK, Saini, SK, Seitz, LE, Bartlett, JL, Davis, P, Dersch, CM, Porreca, F, Rothman, RB, and Bilsky, EJ (2004). Identification of Opioid Ligands Possessing Mixed  $\mu$  Agonist/ $\delta$  Antagonist Activity among Pyridomorphinans Derived from Naloxone, Oxymorphone, and Hydroprmorphone. *J Med Chem* 47, 1400–1412.
- Angers, S, Salahpour, A, and Bouvier, M (2001). Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci* 68, 2243–2250.
- Avola, R, Graziano, ACE, Pannuzzo, G, Albouchi, F, and Cardile, V (2018). New insights on Parkinson's disease from differentiation of SH-SY5Y into dopaminergic neurons: An involvement of aquaporin4 and 9. *Mol Cell Neurosci* 88, 212–221.
- Bathe-Peters, M, Gmach, P, Boltz, HH, Einsiedel, J, Gotthardt, M, Hübner, H, Gmeiner, P, Lohse, MJ, and Annibale, P (2021). Visualization of  $\beta$ -adrenergic receptor dynamics and differential localization in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2101119118.
- Baumgartner, MK, Wei, J, and Aronstam, RS (1993). Retinoic acid-induced differentiation of a human neuroblastoma cell line alters muscaric receptor expression. *Brain Res* 72, 305–308.
- Bawa-Khalfe, T, Altememi, GF, Mandyam, CD, Schwarz, LA, Eikenburg, DC, and Standifer, KM (2007). The presence of  $\beta$ 2-adrenoceptors sensitizes  $\alpha$ 2A-adrenoceptors to desensitization after chronic epinephrine treatment. *BMC Pharmacol* 7, 1–12.
- Berends, AMA, Eisenhofer, G, Fishbein, L, Van Der Horst-Schrivers, ANA, Kema, IP, Links, TP, Lenders, JWM, and Kerstens, MN (2019). Intricacies of the Molecular Machinery of Catecholamine Biosynthesis and Secretion by Chromaffin Cells of the Normal Adrenal Medulla and in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers (Basel)* 11, 1121–1153. \*

- Biedler, JL, Helson, L, and Spengler, BA (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33, 2643–2652.
- Biedler, JL, Roggler-Tarlov, S, Schachner, M, and Freedman, LS (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38, 3751–3757.
- Binder, W, Machelska, H, Mousa, S, Schmitt, T, Rivière, PJM, Junien, JL, Stein, C, and Schäfer, M (2001). Analgesic and Antiinflammatory Effects of Two Novel  $\kappa$ -Opioid Peptides. *Anesthesiology* 94, 1034–1044.
- Bockaert, J, Claeysen, S, Bécamel, C, Pinloche, S, and Dumuis, A (2002). G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. *Int Rev Cytol* 212, 63–132. \*
- Bohaciakova, D, Hruska-Plochan, M, Tsunemoto, R, Gifford, WD, Driscoll, SP, Glenn, TD, Wu, S, Marsala, S, Navarro, M, Tadokoro, T, *et al.* (2019). A scalable solution for isolating human multipotent clinical-grade neural stem cells from ES precursors. *Stem Cell Res Ther* 10, 30867054.
- Branca, C, Wisely, E V., Hartman, LK, Caccamo, A, and Oddo, S (2014). Administration of a selective  $\beta$ 2 adrenergic receptor antagonist exacerbates neuropathology and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 35, 2726–2735.
- Brown, GE, Han, YD, Michell, AR, Ly, OT, Vanoye, CG, Spanghero, E, George, AL, Darbar, D, and Khetani, SR (2024). Engineered cocultures of iPSC-derived atrial cardiomyocytes and atrial fibroblasts for modeling atrial fibrillation. *Sci Adv* 10, 1222–1239.
- Bshesh, K, Zhao, B, Spight, D, Biaggioni, I, Feokistov, I, Denenberg, A, Wong, HR, and Shanley, TP (2002). The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J Leukoc Biol* 72, 1027–1036.
- Buck, L, and Axel, R (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187.
- Buels, KS, and Fryer, AD (2012). Muscarinic receptor antagonists: effects on pulmonary function. *Handb Exp Pharmacol* 208, 317–341.

Calakos, N, and Scheller, RH (1994). Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J Biol Chem* 269, 24534–24537.

Calebiro, D, and Godbole, A (2018). Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 32, 83–91. \*

Canals, M, Burgueño, J, Marcellino, D, Cabello, N, Canela, EI, Mallol, J, Agnati, L, Ferré, S, Bouvier, M, Fuxe, K, *et al.* (2004). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* 88, 726–734.

Carmo, M, Gonçalves, FQ, Canas, PM, Oses, JP, Fernandes, FD, Duarte, F V., Palmeira, CM, Tomé, AR, Agostinho, P, Andrade, GM, *et al.* (2019). Enhanced ATP release and CD73-mediated adenosine formation sustain adenosine A2A receptor over-activation in a rat model of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 176, 3666–3680.

Chai, G-S, Wang, Y-Y, Zhu, D, Yasheng, A, and Zhao, P (2017). Activation of 2-adrenergic receptor promotes dendrite ramification and spine generation in APP/PS1 mice. *Neurosci Lett* 636, 158–164.

Chandrasekera, PC, Wan, TC, Gizewski, ET, Auchampach, JA, and Lasley, RD (2013). Adenosine A1 receptors heterodimerize with  $\beta$  1- and  $\beta$  2-adrenergic receptors creating novel receptor complexes with altered G protein coupling and signaling. *Cell Signal* 25, 736–742.

Chefer, VI, Czyzyk, T, Bolan, EA, Moron, J, Pintar, JE, and Shippenberg, TS (2005). Endogenous  $\kappa$ -Opioid Receptor Systems Regulate Mesoaccumbal Dopamine Dynamics and Vulnerability to Cocaine. *J Neurosci* 25, 5029–5037.

Chen, GJ, Harvey, BK, Shen, H, Chou, J, Victor, A, and Wang, Y (2006). Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents. *J Neurosci Res* 84, 1848–1855.

Chen, Y, Mestek, A, Liu, J, and Yu, L (1993). Molecular cloning of a rat  $\kappa$  opioid receptor reveals sequence similarities to the  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors. *Biochem J* 295, 625–628.

Chen-Goodspeed, M, Lukan, AN, and Dessauer, CW (2005). Modeling of *Gas* and *Gai* regulation of human type V and VI adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 280, 1808–1816.



Cheung, YT, Lau, WKW, Yu, MS, Lai, CSW, Yeung, SC, So, KF, and Chang, RCC (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 30, 127–135.

Chevalier, J, Derkinderen, P, Gomes, P, Thinard, R, Naveilhan, P, Vanden Berghe, P, and Neunlist, M (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* 586, 1963–1975.

Chiu, FL, Lin, JT, Chuang, CY, Chien, T, Chen, CM, Chen, KH, Hsiao, HY, Lin, YS, Chern, Y, and Kuo, HC (2015). Elucidating the role of the A2A adenosine receptor in neurodegeneration using neurons derived from Huntington's disease iPSCs. *Hum Mol Genet* 24, 6066–6079.

Ciruela, F, Casadó, V, Mallol, J, Canela, EI, Lluís, C, and Franco, R (1995). Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex. *J Neurosci Res* 42, 818–828.

Cooper, O, Seo, H, Andrabi, S, Guardia-Laguarta, C, Graziotto, J, Sundberg, M, McLean, JR, Carrillo-Reid, L, Xie, Z, Osborn, T, *et al.* (2012). Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 4, 22764206.

Coriell Institute AG06848 Fibroblasts. Available at: [https://www.coriell.org/0/Sections/Search/Sample\\_Detail.aspx?Ref=AG06848&Product=C](https://www.coriell.org/0/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=AG06848&Product=C). Accessed June 4, 2024.

El Daibani, A, Paggi, JM, Kim, K, Laloudakis, YD, Popov, P, Bernhard, SM, Krumm, BE, Olsen, RHJ, Diberto, J, Carroll, FI, *et al.* (2023). Molecular mechanism of biased signaling at the kappa opioid receptor. *Nat Commun* 14, 1–13.

Deloulme, JC, Helies, A, Ledig, M, Lucas, M, and Sensenbrenner, M (1997). A comparative study of the distribution of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -enolase subunits in cultured rat neural cells and fibroblasts. *Int J Dev Neurosci* 15, 183–194.

di Domenico, A, Carola, G, Calatayud, C, Pons-Espinal, M, Muñoz, JP, Richaud-Patin, Y, Fernandez-Carasa, I, Gut, M, Faella, A, Parameswaran, J, *et al.* (2019). Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Stem Cell Rep* 12, 213–229.

- Dorsam, RT, and Gutkind, JS (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 79–94.
- Ducray, AD, Wiedmer, L, Herren, F, Widmer, HR, and Mevissen, M (2020). Quantitative Characterization of Phenotypical Markers After Differentiation of SH-SY5Y Cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 19, 618–629.
- Edelmann, L, Hanson, PI, Chapman, ER, and Jahn, R (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J* 14, 224–231.
- Encinas, M, Iglesias, M, Liu, Y, Wang, H, Muhaisen, A, Ceña, V, Gallego, C, and Comella, JX (2002). Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *J Neurochem* 75, 991–1003.
- Evans, AK, Ardestani, PM, Yi, B, Park, H, Lam, RK, and Shamloo, M (2020). Beta-adrenergic receptor antagonism is proinflammatory and exacerbates neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer’s Disease. *Neurobiol Dis* 146, 105089.
- Falk, S, Lund, C, and Clemmensen, C (2020). Muscarinic receptors in energy homeostasis: Physiology and pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 126, 66–76. \*
- Fernandes, AM, Campos, J, Silva, D, Barata Antunes, S, Lima, R, Coelho, C, Marote, AM, Leite-Almeida, H, Silva, N, and Salgado, AJ (2022). Cerebral Organoids to Study Central Mechanisms of Pain: The Effect of Stem Cell Secretome on Opioid Receptors and Neuroplasticity. *Stem Cells Dev* 31, 641–657.
- Feyen, DAM, McKeithan, WL, Bruyneel, AAN, Spiering, S, Hörmann, L, Ulmer, B, Zhang, H, Briganti, F, Schweizer, M, Hegyi, B, *et al.* (2020). Metabolic Maturation Media Improve Physiological Function of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Cell Rep* 32, 107925.
- Fisher, ES, Chen, Y, Sifuentes, MM, Stubblefield, JJ, Lozano, D, Holstein, DM, Ren, J, Davenport, M, DeRosa, N, Chen, T, *et al.* (2022). Adenosine A1R/A3R agonist AST-004 reduces brain infarction in mouse and rat models of acute ischemic stroke. *Front Stroke* 1, 1010928.

- Fredholm, BB, Arslan, G, Halldner, L, Kull, B, Schulte, G, and Wasserman, W (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 364–374.
- Fredriksson, R, Lagerström, MC, Lundin, LG, and Schiöth, HB (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256–1272.
- Gacasan, SB, Baker, DL, and Parrill, AL (2017). G protein-coupled receptors: The evolution of structural insight. *AIMS Biophys* 4, 491–527. \*
- Gao, X, Han, Z, Huang, C, Lei, H, Li, G, Chen, L, Feng, D, Zhou, Z, Shi, Q, Cheng, L, *et al.* (2022). An anti-inflammatory and neuroprotective biomimetic nanoplatform for repairing spinal cord injury. *Bioact Mater* 18, 569–582.
- Gharibi, B, Abraham, AA, Ham, J, and Evans, BA (2011). Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Res* 26, 2112–2124.
- Haack, KKV, Tougas, MR, Jones, KT, El-Dahr, SS, Radhakrishna, H, and McCarty, NA (2010). A novel bioassay for detecting GPCR heterodimerization: Transactivation of beta 2 adrenergic receptor by bradykinin receptor. *J Biomol Screen* 15, 251–260.
- Hanna, J, Markoulaki, S, Schorderet, P, Carey, BW, Beard, C, Wernig, M, Creighton, MPP, Steine, EJ, Cassady, JP, Foreman, R, *et al.* (2008). Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes To Pluripotency. *Cell* 133, 250–264.
- Hellgren, I, Sylvén, C, and Magnusson, Y (2000). Study of the  $\beta$ 1 Adrenergic Receptor Expression in Human Tissues : Immunological Approach. *Biol Pharm Bull* 23, 700–703.
- Hirshman, CA, Lande, B, and Croxton, TL (1999). Role of M2 muscarinic receptors in airway smooth muscle contraction. *Life Sci* 64, 443–448.
- Huang, NK, Lin, YW, Huang, CL, Messing, RO, and Chern, Y (2001). Activation of Protein Kinase A and Atypical Protein Kinase C by A 2A Adenosine Receptors Antagonizes Apoptosis Due to Serum Deprivation in PC12 Cells. *J Biol Chem* 276, 13838–13846.
- Isgrò, MA, Bottoni, P, Scatena, R, Isgrò, MA, Bottoni, P, and Scatena, • R (2015). Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* 867, 125–143. \*

- Ishizuka, T, Ozawa, A, Katsuura, M, Nomura, S, and Satoh, Y (2018). Effects of muscarinic acetylcholine receptor stimulation on the differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45, 1198–1205.
- Jahn, R, Schiebler, W, Ouimet, C, and Greengard, P (1985). A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles (synapsin I/subcellular fractionation/integral membrane protein). *Cell Biol* 82, 4137–4141.
- Jämsä, A, Hasslund, K, Cowburn, RF, Bäckström, A, and Vasänge, M (2004). The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 993–1000.
- Johnson, PS, Wang, JB, Wang, WF, and Uhl, GR (1994). Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover. *Neuroreport* 5, 507–509.
- Johnston, PA, and Südhof, TC (1990). The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *J Biol Chem* 265, 8869–8873.
- Jonas, H, Aiello, D, Frehland, B, Lehmkuhl, K, Schepmann, D, Köhler, J, Diana, P, and Wünsch, B (2021). Synthesis and pharmacological evaluation of enantiomerically pure endo-configured KOR agonists with 2-azabicyclo[3.2.1]octane scaffold. *Org Biomol Chem* 19, 8384–8396.
- Jung, G, Fajardo, G, Ribeiro, AJS, Kooiker, KB, Coronado, M, Zhao, M, Hu, DQ, Reddy, S, Kodo, K, Sriram, K, *et al.* (2016). Time-dependent evolution of functional vs. remodeling signaling in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and induced maturation with biomechanical stimulation. *FASEB Journal* 30, 1464–1479.
- Katz, A, Wu, D, and Simon, MI (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686–689.
- Kemp, A, and Manahan-Vaughan, D (2008).  $\beta$ -Adrenoreceptors Comprise a Critical Element in Learning-Facilitated Long-Term Plasticity. *Cereb Cortex* 18, 1326–1334.
- Khwanraj, K, Phruksaniyom, C, Madlah, S, and Dharmasaroja, P (2015). Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated

and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP+. *Neurol Res Int* 2015, 734703.

Kim, B, Leventhal, PS, Saltiel, AR, and Feldman, EL (1997). Insulin-like Growth Factor-I-mediated Neurite Outgrowth in Vitro Requires Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *J Biol Chem* 272, 21268–21273. \*

Kim, MH, Kim, YJ, Kim, HR, Jeon, TJ, Choi, JB, Chung, KY, and Kim, MK (2016). Computational Simulation of the Activation Cycle of G $\alpha$  Subunit in the G Protein Cycle Using an Elastic Network Model. *PLoS One* 11, e0159528.

Kim, MJ, Lee, EY, You, YH, Yang, HK, Yoon, KH, and Kim, JW (2020). Generation of iPSC-derived insulin-producing cells from patients with type 1 and type 2 diabetes compared with healthy control. *Stem Cell Res* 48, 101958.

Ko, MCH, Tuchman, JE, Johnson, MD, Wiesenauer, K, and Woods, JH (2000). Local administration of mu or kappa opioid agonists attenuates capsaicin-induced thermal hyperalgesia via peripheral opioid receptors in rats. *Psychopharmacol (Berl)* 148, 180–185.

Koehler, KR, Tropel, P, Theile, JW, Kondo, T, Cummins, TR, Viville, S, and Hashino, E (2011). Extended passaging increases the efficiency of neural differentiation from induced pluripotent stem cells. *BMC Neurosci* 12, 82.

Korecka, JA, van Kesteren, RE, Blaas, E, Spitzer, SO, Kamstra, JH, Smit, AB, Swaab, DF, Verhaagen, J, and Bossers, K (2013). Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS One* 8.

Krishtal, J, Metsla, K, Bragina, O, Tõugu, V, and Palumaa, P (2019). Toxicity of Amyloid- $\beta$  Peptides Varies Depending on Differentiation Route of SH-SY5Y Cells. *J Alzheimers Dis* 71, 879–887.

Kunzler, A, Zeidán-Chuliá, F, Gasparotto, J, Girardi, CS, Klafke, K, Petiz, LL, Bortolin, RC, Rostirolla, DC, Zanotto-Filho, A, de Bittencourt Pasquali, MA, *et al.* (2017). Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. *Mol Neurobiol* 54, 6903–6916.

Lands, AM, Arnold, A, McAuliff, JP, Luduena, FP, and Brown, TG (1967). Differentiation of Receptor Systems activated by Sympathomimetic Amines. *Nature* 1967 214:5088 214, 597–598.

Lavoie, C, ois Mercier, J-F, Salahpour, A, Umapathy, D, Breit, A, Villeneuve, L-R, Zhu, W-Z, Xiao, R-P, Lakatta, EG, Bouvier, M, *et al.* (2002).  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Heterodimerization Regulates  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Internalization and ERK Signaling Efficacy. *J Biol Chem* 277, 35402–35410.

Levey, AI (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: Implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13541–13546.

Levey, AI, Kitt, CA, Simonds, WF, Price, DL, and Brann, MR (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11, 3218–3226.

Levy, FO, Zhu, X, Kauman, AJ, and Birnbaumer, L (1993). Efficacy of  $\beta$ 1-adrenergic receptors is lower than that of  $\beta$ 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10798–10802.

Logothetis, DE, Kurachi, Y, Galper, J, Neer, EJ, and Clapham, DE (1987). The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325, 321–326.

Lopes, FM, Schröder, R, Júnior, MLC da F, Zanotto-Filho, A, Müller, CB, Pires, AS, Meurer, RT, Colpo, GD, Gelain, DP, Kapczinski, F, *et al.* (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res* 1337, 85–94.

Lundin, A, Delsing, L, Clausen, M, Ricchiuto, P, Sanchez, J, Sabirsh, A, Ding, M, Synnergren, J, Zetterberg, H, Brolén, G, *et al.* (2018). Human iPS-Derived Astroglia from a Stable Neural Precursor State Show Improved Functionality Compared with Conventional Astrocytic Models. *Stem Cell Rep* 10, 1030–1045.

Mague, S, Pliakas, A, ... MT-... of P and, and 2003, undefined (2003). Antidepressant-like effects of  $\kappa$ -opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 305, 323–330.

- Maherali, N, Ahfeldt, T, Rigamonti, A, Utikal, J, Cowan, C, and Hochedlinger, K (2008). A high efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 340–345.
- Masliah, E, Terry, RD, DeTeresa, RM, and Hansen, LA (1989). Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 103, 234–239.
- Matchett, BJ, Grinberg, LT, Theofilas, P, and Murray, ME (2021). The mechanistic link between selective vulnerability of the locus coeruleus and neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol* 141, 631–650.
- McLaughlin, JP, Land, BB, Li, S, Pintar, JE, and Chavkin, C (2005). Prior Activation of Kappa Opioid Receptors by U50,488 Mimics Repeated Forced Swim Stress to Potentiate Cocaine Place Preference Conditioning. *Neuropsychopharmacol* 31, 787–794.
- Mercier, J-FO, Salahpour, A, Breit, A, and Bouvier, M (2002). Quantitative Assessment of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* 277, 44925–44931.
- Miller, DC, Koslow, M, Budzilovich, GN, and Burstein, DE (1990). Synaptophysin: A sensitive and specific marker for ganglion cells in central nervous system neoplasms. *Hum Pathol* 21, 271–276.
- Mjølnes, P, Sagatun, L, Nordrum, IS, and Waldum, HL (2017). Neuron-Specific Enolase as an Immunohistochemical Marker Is Better Than Its Reputation. *J Histochem Cytochem* 65, 687–703.
- Mollereau, C, Parmentier, M, Mailleux, P, Butour, JL, Moisand, C, Chalon, P, Caput, D, Vassart, G, and Meunier, JC (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family: Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341, 33–38.
- Morigaki, R, and Goto, S (2016). Putaminal mosaic visualized by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in the human neostriatum. *Front Neuroanat* 10, 34.
- Moss, R, Sachse, FB, Moreno-Galindo, EG, Navarro-Polanco, RA, Tristani-Firouzi, M, and Seemann, G (2018). Modeling effects of voltage dependent properties of the cardiac muscarinic receptor on human sinus node function. *PLoS Comput Biol* 14, 1006438.

- Muley, T, Ebert, W, Stieber, P, Raith, H, Holdenrieder, S, Nagel, D, Fürst, H, Roth, HJ, Luthe, H, Blijenberg, BG, *et al.* (2003). Technical performance and diagnostic utility of the new Elecsys neuron-specific enolase enzyme immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 41, 95–103.
- Mulugeta, E, Karlsson, E, Islam, A, Kalaria, R, Mangat, H, Winblad, B, and Adem, A (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res* 960, 259–262.
- Nagatsu, T, Levitt, M, and Udenfriend, S (1964). Tyrosine Hydroxylase - The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 239, 2910–2917.
- Namba, K, Suzuki, T, and Nakata, H (2010). Immunogold electron microscopic evidence of in situ formation of homo- and heteromeric purinergic adenosine A1 and P2Y2 receptors in rat brain. *BMC Res Notes* 3, 1–8.
- Novitskiy, S V., Ryzhov, S, Zaynagetdinov, R, Goldstein, AE, Huang, Y, Tikhomirov, OY, Blackburn, MR, Biaggioni, I, Carbone, DP, Feoktistov, I, *et al.* (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 112, 1822–1831.
- Ochaion, A, Bar-Yehuda, S, Cohen, S, Barer, F, Patoka, R, Amital, H, Reitblat, T, Reitblat, A, Ophir, J, Konfino, I, *et al.* (2009). The anti-inflammatory target A 3 adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease q. *Cell Immunol* 258, 115–122.
- Oldham, WM, Van Eps, N, Preininger, AM, Hubbell, WL, and Hamm, HE (2006). Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G proteins. *Nat Struct Mol Biol* 13, 772–777.
- Omole, AE, and Fakoya, AOJ (2018). Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* 6, 4370. \*
- Pählman, S, Ruusala, A-I, Abrahamsson, L, Odelstad, L, and Nilsson, K (1983). Kinetics and concentration effects of TPA-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells. *Cell Differ* 12, 165–170.



- Pandey, A, Sarkar, S, Yadav, SK, Yadav, SS, Srikrishna, S, Siddiqui, MH, Parmar, D, and Yadav, S (2022). Studies on Regulation of Global Protein Profile and Cellular Bioenergetics of Differentiating SH-SY5Y Cells. *Mol Neurobiol* 59, 1799–1818.
- Panova, A V., Klementieva, N V., Sycheva, A V., Korobko, E V., Sosnovtseva, AO, Krasnova, TS, Karpova, MR, Rubtsov, PM, Tikhonovich, Y V., Tiulpakov, AN, *et al.* (2022). Aberrant Splicing of INS Impairs Beta-Cell Differentiation and Proliferation by ER Stress in the Isogenic iPSC Model of Neonatal Diabetes. *Int J Mol Sci* 23, 8824.
- Park, IH, Zhao, R, West, JA, Yabuuchi, A, Huo, H, Ince, TA, Lerou, PH, Lensch, MW, and Daley, GQ (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146.
- Peters, MC, Maas, RGC, Van Adrichem, I, Doevendans, PAM, Mercola, M, Šarić, T, Buikema, JW, Van Mil, A, Chamuleau, SAJ, Sluijter, JPG, *et al.* (2022). Metabolic Maturation Increases Susceptibility to Hypoxia-induced Damage in Human iPSC-derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med* 11, 1040–1051.
- Presgraves, SP, Ahmed, T, Borwege, S, and Joyce, JN (2003). Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res* 5, 579–598.
- van der Putten, C, Zuiderwijk-Sick, EA, van Straalen, L, de Geus, ED, Boven, LA, Kondova, I, IJzerman, AP, and Bajramovic, JJ (2009). Differential Expression of Adenosine A3 Receptors Controls Adenosine A2A Receptor-Mediated Inhibition of TLR Responses in Microglia. *J Immunol* 182, 7603–7612.
- Ramalingam, M, and Kim, SJ (2016). The Neuroprotective Role of Insulin Against MPP<sup>+</sup>-Induced Parkinson's Disease in Differentiated SH-SY5Y Cells. *J Cell Biochem* 117, 917–926.
- Reddy, PH, Mani, G, Park, BS, Jacques, J, Murdoch, G, Whetsell, W, Kaye, J, and Manczak, M (2005). Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimer's Dis* 7, 103–117.
- Rehfeldt, SCH, Silva, J, Alves, C, Pinteus, S, Pedrosa, R, Laufer, S, and Goettert, MI (2022). Neuroprotective Effect of Luteolin-7-O-Glucoside against 6-OHDA-Induced Damage in Undifferentiated and RA-Differentiated SH-SY5Y Cells. *Int J Mol Sci* 23, 2914.

- Resende, RR, Gomes, KN, Adhikari, A, Britto, LRG, and Ulrich, H (2008). Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in vitro. *Cell Calcium* 43, 107–121.
- Riegerová, P, Brejcha, J, Bezděková, D, Chum, T, Mašínová, E, Čermáková, N, Ovsepian, S V., Cebecauer, M, and Štefl, M (2021). Expression and Localization of A $\beta$ PP in SH-SY5Y Cells Depends on Differentiation State. *J Alzheimer's Dis* 82, 485–491.
- Robinson, M, Yau, SY, Sun, L, Gabers, N, Bibault, E, Christie, BR, and Willerth, SM (2015). Optimizing Differentiation Protocols for Producing Dopaminergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells for Tissue Engineering Applications: Supplementary Issue: Stem Cell Biology. *Biomark Insights* 10, 61–70.
- Rosa, SG, Pesarico, AP, Martini, F, and Nogueira, CW (2018). m-Trifluoromethyl-diphenyl Diselenide Regulates Prefrontal Cortical MOR and KOR Protein Levels and Abolishes the Phenotype Induced by Repeated Forced Swim Stress in Mice. *Mol Neurobiol* 55, 8991–9000.
- Rouse, ST, Gilmor, ML, and Levey, AI (1998). Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1–m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* 86, 221–232.
- Sáez-Briones, P, Soto-Moyano, R, Burgos, H, Castillo, A, Valladares, L, Morgan, C, Pérez, H, Barra, R, Constandil, L, Laurido, C, *et al.* (2014).  $\beta$ 2-Adrenoceptor stimulation restores frontal cortex plasticity and improves visuospatial performance in hidden-prenatally-malnourished young-adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 119, 1–9.
- Samoshkin, A, Convertino, M, Viet, CT, Wieskopf, JS, Kambur, O, Marcovitz, J, Patel, P, Stone, LS, Kalso, E, Mogil, JS, *et al.* (2015). Structural and functional interactions between six-transmembrane  $\mu$ -opioid receptors and  $\beta$ 2-adrenoreceptors modulate opioid signaling. *Sci Rep* 5, 1–13.
- Santos, R, Vadodaria, KC, Jaeger, BN, Mei, A, Lefcochilos-Fogelquist, S, Mendes, APD, Erikson, G, Shokhirev, M, Randolph-Moore, L, Fredlender, C, *et al.* (2017). Differentiation of Inflammation-Responsive Astrocytes from Glial Progenitors Generated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep* 8, 1757–1769.
- Schena, G, and Caplan, MJ (2019). Everything You Always Wanted to Know about  $\beta$ 3-AR (But Were Afraid to Ask). *Cells* 8, 357–380. \*

Schneider, L, Giordano, S, Zelickson, BR, S. Johnson, M, A. Benavides, G, Ouyang, X, Fineberg, N, Darley-Usmar, VM, and Zhang, J (2011a). Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51, 2007–2017.

Schneider, L, Giordano, S, Zelickson, BR, S. Johnson, M, A. Benavides, G, Ouyang, X, Fineberg, N, Darley-Usmar, VM, and Zhang, J (2011b). Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51, 2007–2017.

Schwartz, TW (1994). Locating ligand-binding sites in 7tm receptors by protein engineering. *Curr Opin Biotechnol* 5, 434–444.

Segal, DS, and Kuczenski, R (1974). Tyrosine hydroxylase activity: Regional and subcellular distribution in brain. *Brain Res* 68, 261–266.

Seidel, F, Scheibenbogen, C, Heidecke, H, Opgen-Rhein, B, Pickardt, T, Klingel, K, Berger, F, Messroghli, D, and Schubert, S (2022). Compensatory Upregulation of Anti-Beta-Adrenergic Receptor Antibody Levels Might Prevent Heart Failure Presentation in Pediatric Myocarditis. *Front Pediatr* 10, 881208.

Selley, DE, Cao, CC, Sexton, T, Schwegel, JA, Martin, TJ, and Childers, SR (2001).  $\mu$  Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochem Pharmacol* 62, 447–455.

Servent, D, and Fruchart-Gaillard, C (2009). Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem* 109, 1193–1202. \*

Shaltouki, A, Peng, J, Liu, Q, Rao, MS, and Zeng, X (2013). Efficient Generation of Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells in Defined Conditions. *Stem Cells* 31, 941–952.

Sheth, S, Brito, R, Mukherjea, D, Rybak, LP, and Ramkumar, V (2014). Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *Int J Mol Sci* 15, 2024–2052. \*

Shimizu, A, Suzuki, F, and Kato, K (1983). Characterization of  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\gamma\gamma$  and  $\alpha\gamma$  human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases ( $\alpha\gamma$ ,  $\beta\gamma$  and  $\alpha\beta$ ) from homodimeric forms. *Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol* 748, 278–284.

Simões, RF, Ferrão, R, Silva, MR, Pinho, SLC, Ferreira, L, Oliveira, PJ, and Cunha-Oliveira, T (2021). Refinement of a differentiation protocol using neuroblastoma SH-SY5Y cells for use in neurotoxicology research. *Food Chem Toxicol* 149, 111967.

Simonin, F, Valverde, O, Smadja, C, Slowe, S, Kitchen, L, Dierich, A, Le Meur, M, Roques, BP, Maldonado, R, and Kieffer, BL (1998). Disruption of the  $\kappa$ -opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective  $\kappa$ -agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 17, 886–897.

Smart, D, Hirst, RA, Hirota, K, Grandy, DK, and Lambert, DG (1997). The effects of recombinant rat  $\mu$ -opioid receptor activation in CHO cells on phospholipase C,  $[Ca^{2+}]_i$  and adenylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 120, 1165–1171.

Smart, K, Yttredahl, A, Oquendo, MA, Mann, JJ, Hillmer, AT, Carson, RE, and Miller, JM (2021). Data-driven analysis of kappa opioid receptor binding in major depressive disorder measured by positron emission tomography. *Transl Psychiatry* 2021 11, 1–9.

Spanagel, R, Herz, A, and Shippenberg, TS (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2046–2050.

Strohsacker, MW, Rebar, R, Stadel, JM, Crooke, ST, McCaslin, DR, Alianell, G, and Shorr, RGL (1985). Molecular structure of the beta-adrenergic receptor. *Biochem* 24, 6869–6875.

Sun, N, Panetta, NJ, Gupta, DM, Wilson, KD, Lee, A, Jia, F, Hu, S, Cherry, AM, Robbins, RC, Longaker, MT, *et al.* (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15720–15725.

Szabó, C, Scott, GS, Virág, L, Egnaczyk, G, Salzman, AL, Shanley, TP, and Haskó, G (1998). Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br J Pharmacol* 125, 379–387.

Sze, CI, Troncoso, JC, Kawas, C, Mouton, P, Price, DL, and Martin, LJ (1997). Loss of the Presynaptic Vesicle Protein Synaptophysin in Hippocampus Correlates with Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 933–944.

Takahashi, K, Tanabe, K, Ohnuki, M, Narita, M, Ichisaka, T, Tomoda, K, and Yamanaka, S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

Takahashi, K, and Yamanaka, S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Tanner, MA, Maitz, CA, and Grisanti, LA (2021). Immune cell  $\beta_2$ -adrenergic receptors contribute to the development of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 321, 633–649.

Tzavara, ET, Bymaster, FP, Davis, RJ, Wade, MR, Perry, KW, Wess, J, McKinzie, DL, Felder, C, and Nomikos, GG (2004). M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related central nervous system pathologies. *FASEB J* 18, 1410–1412.

Uemura, K, Kitagawa, N, Kohno, R, Kuzuya, A, Kageyama, T, Shibasaki, H, and Shimohama, S (2003). Presenilin 1 mediates retinoic acid-induced differentiation of SH-SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling. *J Neurosci Res* 73, 166–175.

Uhlig, R, Dum, D, Gorbokon, N, Menz, A, Büscheck, F, Luebke, AM, Hube-Magg, C, Hinsch, A, Höflmayer, D, Fraune, C, *et al.* (2022). Synaptophysin and chromogranin A expression analysis in human tumors. *Mol Cell Endocrinol* 555, 111726.

Vanova, T, Sedmik, J, Raska, J, Amruz Cerna, K, Taus, P, Pospisilova, V, Nezvedova, M, Fedorova, V, Kadakova, S, Klimova, H, *et al.* (2023). Cerebral organoids derived from patients with Alzheimer's disease with PSEN1/2 mutations have defective tissue patterning and altered development. *Cell Rep* 42, 113310.

Varani, K, Massara, A, Vincenzi, F, Tosi, A, Padovan, M, Trotta, F, and Borea, PA (2009). Normalization of A2A and A3 adenosine receptor up-regulation in rheumatoid arthritis patients by treatment with anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  but not methotrexate. *Arthritis Rheum* 60, 2880–2891.

Wall, MA, Posner, BA, and Sprang, SR (1998). Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* 6, 1169–1183.

Wang, L, and Yuan, LL (2009). Activation of M2 muscarinic receptors leads to sustained suppression of hippocampal transmission in the medial prefrontal cortex. *J Physiol* 587, 5139–5147.

Wang, Y, Zhuang, Y, DiBerto, JF, Zhou, XE, Schmitz, GP, Yuan, Q, Jain, MK, Liu, W, Melcher, K, Jiang, Y, *et al.* (2023). Structures of the entire human opioid receptor family. *Cell* 186, 413–427.

Wess', J (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 11, 346–354. \*

Wiedenmann, B, Franke, WW, Kuhn, C, Moll, R, and Gould, VE (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3500–3504.

Workman, MJ, Lim, RG, Wu, J, Frank, A, Ornelas, L, Panther, L, Galvez, E, Perez, D, Meepe, I, Lei, S, *et al.* (2023). Large-scale differentiation of iPSC-derived motor neurons from ALS and control subjects. *Neuron* 111, 1191–1204.

Yao, JY, Li, L, Xu, JX, Liu, YH, Shi, J, Yu, XQ, Kong, QQ, and Li, K (2024). Real-Time Monitoring of Tyrosine Hydroxylase Activity with a Ratiometric Fluorescent Probe. *Anal Chem* 96, 7082–7090.

Yu, J, Vodyanik, MA, Smuga-Otto, K, Antosiewicz-Bourget, J, Frane, JL, Tian, S, Nie, J, Jonsdottir, GA, Ruotti, V, Stewart, R, *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

Zhu, W-Z, Chakir, K, Zhang, S, Yang, D, Lavoie, C, Bouvier, M, Hébert, TE, Lakatta, EG, Cheng, H, and Xiao, R-P (2005). Heterodimerization of 1-and 2-Adrenergic Receptor Subtypes Optimizes-Adrenergic Modulation of Cardiac Contractility. *Cell Biol* 97, 244–251.

Zhu, Y, Zhang, J, and Zeng, Y (2012). Overview of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11, 350–358. \*

\* Review