

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Biochemie a patobiochemie



Ing. Miroslava Vošahlíková

Modulační vliv monovalentních iontů na δ -opioidní receptory

Modulatory effect of monovalent ions on δ -opioid receptors

Doktorandská dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR

Oddělení biochemie membránových receptorů

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24.3.2014

Ing. Miroslava Vošahlíková

Podpis

Identifikační záznam:

VOŠAHLÍKOVÁ, Miroslava. *Modulační vliv monovalentních iontů na δ -opioidní receptory*. [*Modulatory effect of monovalent ions on δ -opioid receptors*]. Praha, 2014. 67 s., 4 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Vedoucí závěrečné práce Svoboda, Petr.

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc., za odborné vedení, podporu a zajištění podmínek pro mou práci. Dále děkuji všem členům Oddělení biochemie membránových receptorů Fyziologického ústavu AV ČR, zvláště pak RNDr. Lence Roubalové, Ph.D., za užitečné rady, pomoc při experimentální práci a přátelské prostředí. Upřímné poděkování také patří kolegům z Oddělení biofyzikální chemie Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR.

Největší poděkování patří mým rodičům, kteří mě po celou dobu studia vždy plně podporovali.

ABSTRAKT

Přesná role opioidních receptorů v drogové závislosti a také modulační mechanismus, jakým jsou tyto receptory ovlivňovány monovalentními ionty, nejsou doposud zcela vysvětleny. Naše výsledky podporují názor, že mechanismus závislosti na morfinu je primárně založen na desenzitizaci odpovědi μ - a δ -opioidních receptorů. Desenzitizace nastává již na úrovni funkční aktivity G proteinů. Dlouhodobé vystavení potkanů působení morfinu mělo za následek zvýšení počtu δ -opioidních receptorů a změnu jejich citlivosti vůči sodným iontům. Analýza inhibičního vlivu různých monovalentních iontů na vazbu agonisty v buněčné linii δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 potvrdila preferenční citlivost δ -opioidního receptoru k sodným iontům. Podařilo se nám rozlišit vysoko- a nízkoafinní vazebná místa pro sodné ionty.

Biofyzikální analýza interakce iontů lithia, sodíku, draslíku a cesia s plazmatickou membránou buněk HEK293 pomocí fluorescenčních technik ukázala na význam polárních skupin přítomných v povrchové vrstvě membrány. Právě do této oblasti je možné umístit vazebná místa s nízkou afinitou.

Klíčová slova: morfin, frontální mozková kůra, opioidní receptory, G proteiny, monovalentní ionty, plazmatická membrána, metody fluorescenční spektroskopie.

ABSTRACT

The exact role of opioid receptors in drug addiction and modulatory mechanism of action of monovalent cations on these receptors are still not fully understood. Our results support the view that the mechanism of addiction to morphine is primarily based on desensitization of μ - and δ -opioid receptors. Desensitization of agonist response proceeds already at the level of G protein functional activity. Long-term exposure of rats to morphine resulted in increase of number of δ -opioid receptors and change of their sensitivity to sodium ions. Analysis of the effect of different monovalent ions on agonist binding in δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 cell line confirmed the preferential sensitivity of δ -opioid receptor to sodium ions. We have distinguished the high- and low-affinity Na⁺ sites.

Biophysical analysis of interaction of lithium, sodium, potassium and cesium ions with plasma membranes isolated from HEK293 cells with the help of fluorescent probes indicated that monovalent ions interact, in low-affinity manner, with the polar, membrane-water interface of membrane bilayer.

Key words: morphine, forebrain cortex, opioid receptors, G proteins, monovalent ions, plasma membrane, fluorescence spectroscopy.

OBSAH

SEZNAM PUBLIKACÍ.....	1
Publikační podklad pro dizertační práci.....	1
Ostatní publikace.....	1
Abstrakta z konferencí.....	2
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	3
1. ÚVOD.....	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1 Receptory spřažené s G proteiny (GPCRs).....	7
2.1.1 Struktura GPCRs.....	8
2.1.2 Klasifikace GPCRs	10
2.2 Přenos signálu pomocí GPCRs	11
2.2.1 Aktivace receptoru.....	12
2.2.2 Heterotrimerní G proteiny, efektorový systém.....	12
2.2.2.1 G_s proteiny (G_s , G_{olf})	15
2.2.2.2 G_i/G_o proteiny (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o , $G_{\tau1}$, $G_{\tau2}$, G_{gust} , G_z).....	15
2.2.2.3 G_q/G_{11} proteiny (G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} , G_{16}).....	16
2.2.2.4 G_{12}/G_{13} proteiny (G_{12} , G_{13}).....	16
2.3 GPCR- $G\alpha$ fúzní proteiny	16
2.4 Konstitutivní aktivita a inverzní agonisté	17
2.5 Opioidy a opioidní receptory (OR)	20
2.5.1 Opium, morfin, drogová závislost	20
2.5.2 Objev OR a jejich klonování	23
2.5.3 Struktura a funkce OR	24
2.5.3.1 μ -opioidní receptory (μ -OR)	26
2.5.3.2 δ -opioidní receptory (δ -OR).....	27
2.5.3.3 κ -opioidní receptory (κ -OR).....	27

2.5.3.4	Receptor pro nociceptin/orfanin FQ (NOP)	27
2.6	Interakce monovalentních iontů s OR.....	27
3.	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	31
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Aktivita G proteinů ve frontální mozkové kůře potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu	32
4.1.1	Stanovení agonistou stimulované vysokoafinní aktivity GTPázy	33
4.1.2	Stanovení agonistou stimulované vazby [³⁵ S]GTPγS.....	33
4.1.3	Porovnání obsahu G proteinů v plazmatických membránách	34
4.1.4	Behaviorální studie	35
4.1.5	Závěr <i>Publikace I</i>	35
4.2	Vliv sodných iontů na vazebné parametry δ-OR v plazmatických membránách izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu.....	36
4.2.1	Obsah adenylyl cyklázy I a II v plazmatických membránách	37
4.2.2	Stanovení obsahu Na, K-ATPázy, α- a β-podjednotek G proteinů a kaveolinu-1 v plazmatických membránách.....	38
4.2.3	Stanovení aktivity adenylyl cyklázy	38
4.2.4	Stanovení počtu δ-OR.....	39
4.2.5	Závěr <i>Publikace II</i>	40
4.3	Inhibice signalizace δ-OR monovalentními ionty v δ-OR-G _i 1α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293	41
4.3.1	Stanovení agonistou stimulované vazby [³⁵ S]GTPγS.....	42
4.3.2	Vazba agonisty [³ H]DADLE	43
4.3.3	Závěr <i>Publikace III</i>	44
4.4	Vysokoafinní a nízkoafinní místa pro Na ⁺ v δ-OR-G _i 1α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293, korelace s biofyzikálním stavem plazmatické membrány	45
4.4.1	Vazba agonisty [³ H]DADLE a antagonisty [³ H]naltrindolu.....	46

4.4.2	Stanovení agonistou stimulované vazby [³⁵ S]GTP γ S.....	48
4.4.3	Stanovení excitační generalizované polarizace Laurdanu.....	48
4.4.4	Stanovení rovnovážné anizotropie fluorescence DPH.....	50
4.4.5	Vliv monovalentních aniontů na vazbu [³ H]DADLE a agonistou stimulovanou vazbu [³⁵ S]GTP γ S.....	50
4.4.6	Závěr <i>Publikace IV</i>	50
5.	ZÁVĚR	52
6.	SHRNUTÍ	53
7.	SUMMARY	55
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
	PŘÍLOHY <i>Publikace I-IV</i>	

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikační podklad pro dizertační práci

Publikace I

Bouřová, L., Vošahlíková, M., Kagan, D., Dlouhá, K., Novotný, J., Svoboda, P. (2010). Long-term adaptation to high doses of morphine causes desensitization of mu-OR- and delta-OR-stimulated G-protein response in forebrain cortex but does not decrease the amount of G-protein alpha subunits. *Med Sci Monit*, 16(8), BR260-BR270.

IF = 1.699 (rok 2010)

Publikace II

Ujčíková, H., Dlouhá, K., Roubalová, L., Vošahlíková, M., Kagan, D., Svoboda, P. (2011). Up-regulation of adenylylcyclases I and II induced by long-term adaptation of rats to morphine fades away 20 days after morphine withdrawal. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*, 1810(12), 1220-1229.

IF = 5.000 (rok 2011)

Publikace III

Vošahlíková, M., Svoboda, P. (2011). The influence of monovalent cations on trimeric G protein G_i1 α activity in HEK293 cells stably expressing DOR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) fusion protein. *Physiol Res*, 60(3), 541-547.

IF = 1.555 (rok 2011)

Publikace IV

Vošahlíková, M., Jurkiewicz, P., Roubalová, L., Hof, M., Svoboda, P. (2014). High- and low-affinity sites for sodium in δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) fusion protein stably expressed in HEK293 cells; functional significance and correlation with biophysical state of plasma membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, doi:10.1007/s00210-014-0962-8.

IF = 2.147 (rok 2012)

Ostatní publikace

Brejchová, J., Sýkora, J., Dlouhá, K., Roubalová, L., Ostašov, P., Vošahlíková, M., Hof, M., Svoboda, P. (2011). Fluorescence spectroscopy studies of HEK293 cells expressing DOR-G_i1 α fusion protein; the effect of cholesterol depletion. *Biochim Biophys Acta-Biomembr*, 1802(18), 2819-2829.

IF = 3.990 (rok 2011)

Drahota, Z., Páleníčková, E., Endlicher, R., Milerová, M., Brejchová, J., Vošahlíková, M., Svoboda, P., Kazdová, L., Kalous, M., Červinková, Z., Cahová, M. (2014). Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*, 63(1), 1-11.

IF = 1.531 (rok 2012)

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

IF = 1.531 (rok 2012)

Abstrakta z konferencí

Vošahlíková, M., Surá, K., Bouřová, L., Svoboda, P. (2010). Vliv monovalentních kationtů na aktivitu trimerních G-proteinů. **86. Fyziologické dny** (Organizátor: Fyziologický ústav 1. lékařské fakulty UK), Praha, 9. - 11. února, 2010

Vošahlíková, M., Surá, K., Bouřová, L., Svoboda, P. (2010). The influence of monovalent cations on δ -OR-stimulated trimeric G protein activity. **Key-Stone Meeting: Transmembrane Signaling by GPCRs and Channels** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7-12, 2010

Bouřová, L., **Vošahlíková, M.**, Kagan, D., Novotný, J., Svoboda, P. (2010). Desensitisation of μ - and δ -opioid receptor-stimulated G-protein response in plasma membranes isolated from the rat brain cortex of morphine-treated rats; mechanism of the long-term adaptation to high doses of morphine. **Key-Stone Meeting: Transmembrane Signaling by GPCRs and Channels** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7-12, 2010

Svoboda, P., Rudajev, V., Bouřová, L., **Vošahlíková, M.**, Stöhr, J. (2010). High-efficacy of δ -opioid (DOR) receptors in Brij-58-resistant membrane domains. **Key-Stone Meeting: Transmembrane Signaling by GPCRs and Channels** (Organizers: Brian K. Kobilka, Martin J. Lohse and Thue W. Schwartz), Breckenridge, Colorado, USA, April 7-12, 2010

Vošahlíková, M., Svoboda, P. (2011) High potency but low efficacy of δ -opioid receptors (DOR) when activating trimeric G protein $G_{i1\alpha}$ in the presence of lithium cations. **Key-Stone Meeting: G Protein Coupled Receptors** (Organizers: Oliver P. Ernst, U. Benjamin Kaupp), Taos, New Mexico, USA, January 23-28, 2011

Brejchová, J., Sýkora, J., Ostašov, P., Roubalová, L., **Vošahlíková, M.**, Hof, M., Svoboda, P. (2011). FLIM, TCSPC and Laurdan generalized polarization studies of the effect of cholesterol depletion on hydrophobic interior and polar head group region of the cell membrane. **Key-Stone Meeting: G Protein Coupled Receptors** (Organizers: Oliver P. Ernst, U. Benjamin Kaupp), Taos, New Mexico, USA, January 23-28, 2011

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylyl cykláza
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (<u>A</u> cquired <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency <u>S</u> ndrome) následkem poškození imunitního systému člověka virem HIV (virus lidské imunitní nedostatečnosti, <u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus)
AK	aminokyselina
Asp ⁹⁵	kyselina asparagová v pozici 95 (pořadí aminokyseliny v proteinu od N-konce)
ATP	adenosintrifosfát
[α - ³² P]ATP	ATP s fosforem nahrazeným v poloze α radionuklidem [³² P]
A _{2A} AR	adenosinový receptor A _{2A}
B _{max}	maximální vazebná kapacita
b ₅₂₆ RIL	termostabilní apocytochrom obsahující hemovou skupinu b
β -AR	β -adrenergní receptor
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
[³² P]cAMP	radioaktivně značené cAMP které je generováno z [α - ³² P]ATP
cDNA	komplementární DNA
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
C-konec	COOH konec proteinu
CNS	centrální nervový systém
Cys ³⁵¹	cystein v pozici 351 (pořadí aminokyseliny v proteinu od N-konce)
DADLE	agonista δ -OR; (2-D-alanin-5-D-leucin)-enkefalin Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol
DAG	1,2-diacylglycerol
DAMGO	agonista μ -OR; (2-D-alanin-4-methylfenylalanin-5-glycinol)-enkefalin Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol
DPDPE	agonista δ -OR [2-D-penicillamin,5-D-penicillamin]-enkefalin, [D-Pen ² , D-Pen ⁵]EK)
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
Δ	net increment
δ -OR	δ -opioidní receptor
ECL	extracelulární smyčka (<u>E</u> xtrac <u>e</u> llular <u>L</u> oop)
EC ₅₀	50 % efektivní koncentrace

$G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$	jednotlivé podjednotky G proteinu (α , β , γ)
$G\alpha$ -GTP	α -podjednotka G proteinu s navázaným GTP
$G\alpha$ -GDP	α -podjednotka G proteinu s navázaným GDP
$G\beta\gamma$	komplex podjednotek β a γ G proteinu
GABA	kyselina γ -aminomáselná
$GABA_B$	kyselina γ -aminomáselná typu B
$GABA_{B-R}$	$GABA_B$ receptor
GDP	guanosindifosfát
GEF	faktor pro výměnu guaninových nukleotidů (G uanine nukleotide E xchange F actor)
GP_{ex}	excitační generalizovaná polarizace Laurdanu
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (G P rotein C oupled R eceptor)
G protein	trimerní GTP-vazebný protein
GTP	guanosintrifosfát
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$	GTP s fosforem nahrazeným v poloze γ radionuklidem [^{32}P]
$\text{GTP}\gamma\text{S}$	guanosin 5'-O-thiotrifosfát, nehydrolyzovatelný analog GTP
$[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$	$\text{GTP}\gamma\text{S}$ s kyslíkem nahrazeným v poloze γ radionuklidem [^{35}S]
HEK293	buněčná linie HEK (lidské embryonální buňky z ledvin, H uman E mryonic K idney)
H8	intracelulární amfipatický helix
ICL	intracelulární smyčka (I ntracelular L oop)
Ile ³⁵¹	isoleucin v pozici 351 (pořadí aminokyseliny od N-konce)
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
K_d	rovnovážná disociační konstanta
κ -OR	κ -opioidní receptor
LUV	velké unilamelární vezikuly (L arge U nilamellar V esicles)
λ_{ex}	excitační vlnová délka
mACh-R	muskarinový acetylcholinový receptor
MAP kináza	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MR	molekulové nahrazení (M olecular R eplacement)
μ -OR	μ -opioidní receptor
NAD^+	nikotinamid adenin dinukleotid v oxidované formě
NG108-15	neuroblastom \times gliom hybridní buněčná linie
N-konec	NH_2 konec proteinu

NMDG	N-methyl-D-glukamin
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOP	receptor pro nociceptin/orfanin FQ
OR	opioidní receptor
ORF	otevřený čtecí rámec (O pen R eading F rame)
ORL-1	receptor pro nociceptin/orfanin FQ
PCR	polymerázová řetězová reakce (P olymerase C hain R eaction)
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PLCβ	β forma fosfolipázy C
PKC	proteinkináza C
PM	plazmatická membrána
POPC	1,2-palmitoyl-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
POPS	1,2-palmitoyl-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoserin
PTX	pertussis toxin
³² P _i	γ- ³² P _i ; radioaktivně značený fosfor uvolněný při hydrolýze [γ- ³² P]GTP
r _{DPH}	rovnovážná anizotropie fluorescence DPH
r ²	koeficient determinace
Rho	Rho rodina GTPáz
RGS	regulátory G proteinové signalizace (R egulators of G protein S ignaling)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti SDS
SST-R	somatostatinový receptor
SUV	malé unilamelární vezikuly (S mall U nilamellar V esicles)
TAS	chuťové receptory
TM	hydrofóbní transmembránový úsek (α-helix) GPCRs
U-69593	agonista κ-OR (5α, 7α, 8β)-(-)-N-methyl-N-(7-(1-pyrrodinyl)-1-oxaspiro(4,5)dec-8-yl) benzenacetamid
Wnt	skupina signálních glykoproteinů (podle genů Wingless a Int-1)

1. ÚVOD

Receptory spřažené s G proteiny (GPCRs) reprezentují největší skupinu membránových proteinů v lidském genomu. Působí především prostřednictvím aktivace regulačních proteinů vázajících guaninové nukleotidy - tzv. G proteinů, kterým také vděčí za svůj název. Vazba hormonu nebo neurotransmiteru na receptor způsobí změny v jeho struktuře, které potom aktivují G proteiny zprostředkovávající spojení s buněčnými efektory. Stanovení struktury GPCRs a pochopení molekulárního mechanismu jejich aktivace je nejen jedním ze základních biologických zájmů, ale má také velký potenciál pro zlepšení lidského zdraví. Opioidní receptory jsou zvláště zajímavými členy rodiny GPCRs. Jsou aktivovány jak endogenně produkovánými opioidními peptidy, tak i exogenně podávanými opioidními látkami, z nichž některé jsou nejen jedny z nejúčinnějších známých analgetik, ale také vysoce návykových drog. Drogová závislost postihuje lidstvo po staletí. Přesné mechanismy, kterými konkrétní látky vedou k závislosti, a genetické faktory, které činí některé jedince zvláště náchylnými k závislosti, zůstávají stále neobjasněné.

GPCRs mohou aktivovat G proteiny i v nepřítomnosti agonistů. Tato tzv. konstitutivní aktivita je běžnou vlastností některých přirozených receptorů z této rodiny, ale je zároveň i příčinou některých onemocnění. Opioidní receptory byly prvními GPCRs, pro které byly předloženy důkazy o konstitutivní aktivitě. V současné době se o ní diskutuje i v souvislosti se zvládáním drogové závislosti na opioidech a chronické bolesti. Inverzní agonisté jsou ligandy, které mohou tuto aktivitu tlumit. Jako allosterický inverzní agonista (allosterický stabilizátor neaktivního stavu receptoru) působí i monovalentní kationt Na^+ . Monovalentní ionty obecně modulují signalizaci GPCRs dosud ne zcela definovaným mechanismem. Jejich interakce se signální kaskádou iniciovanou opioidními receptory byly studovány již od počátku výzkumu zaměřeného na GPCRs.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Receptory spřažené s G proteiny (GPCRs)

Receptory spřažené s G proteiny ("G protein coupled receptors", GPCRs) tvoří velmi početnou, neustále se rozrůstající rodinu integrálních membránových proteinů s mnoha důležitými fyziologickými funkcemi. Nedávná detailní analýza lidského genomu odhalila přes 800 unikátních GPCRs (Fredriksson R. et al., 2003). Působí především prostřednictvím aktivace regulačních proteinů vázajících guaninové nukleotidy - tzv. G proteinů.

GPCRs jsou velmi různorodé co do struktury i funkce. Jsou odpovědné za převod pozoruhodného množství endogenních signálů do buněčné odpovědi. Zprostředkovávají většinu našich fyziologických reakcí na hormony, neurotransmitery, jsou zodpovědné za zrak, čich i chuť (Deupi X. a Kobilka B., 2007; Rosenbaum D. M. et al., 2009). Mezi ligandy pro GPCRs jsou obrovské rozdíly – jsou to ionty, organické odoranty, aminy, peptidy, bílkoviny, lipidy, nukleotidy a dokonce i fotony (Fredriksson R. et al., 2003).

Jsou zároveň velmi důležitým předmětem zájmu farmaceutického výzkumu. Mají velký potenciál jako terapeutické cíle pro široké spektrum nemocí. Odhaduje se, že 40-50 % (Marinissen M. J. a Gutkind J. S., 2001; Fredriksson R. et al., 2003; Fredholm B. B. et al., 2007; Lin H. H., 2013) všech moderních léků je zaměřeno na tyto receptory. Změna aktivity GPCRs pomocí léků se již používá v léčbě mnoha onemocnění, včetně srdečních poruch, astmatu a migrény (Venkatakrishnan A. J. et al., 2013). Vzhledem k obrovské rozmanitosti GPCRs zde stále zůstává obrovský počet možností pro rozvoj dalších léků na zmírnění neurologických poruch, zánětlivých onemocnění, rakoviny a metabolických nerovnováh (Venkatakrishnan A. J. et al., 2013).

Nobelovu cenu za chemii získali v roce 2012 dva američtí vědci: Robert J. Lefkowitz z Dukeovy univerzity v Severní Karolíně a Brian K. Kobilka ze Stanfordské univerzity v Kalifornii a to "za studium receptorů spřažených s G proteiny" (Latek D. et al., 2012; Kenakin T., 2013; Lin H. H., 2013). Jejich práce poskytuje chemický pohled na způsob, jakým GPCRs přijímají a přenášejí buněčné signály přes plazmatickou membránu. Úspěchy nejen Lefkowitze a Kobilky, ale i dalších vědců zabývajících se GPCRs, umožnily farmaceutickému průmyslu vývoj selektivnějších léků díky lepšímu pochopení mechanismu signalizace. Základní molekulární mechanismy a strukturní rysy zodpovědné za mnoho procesů, včetně přenosu signálu, allosterické modulace, funkční

selektivity a konstitutivní aktivity, zůstávají ovšem i nadále, navzdory pokroku v porozumění aktivaci GPCR, ne zcela vysvětleny (Fenalti G. et al., 2014).

2.1.1 Struktura GPCRs

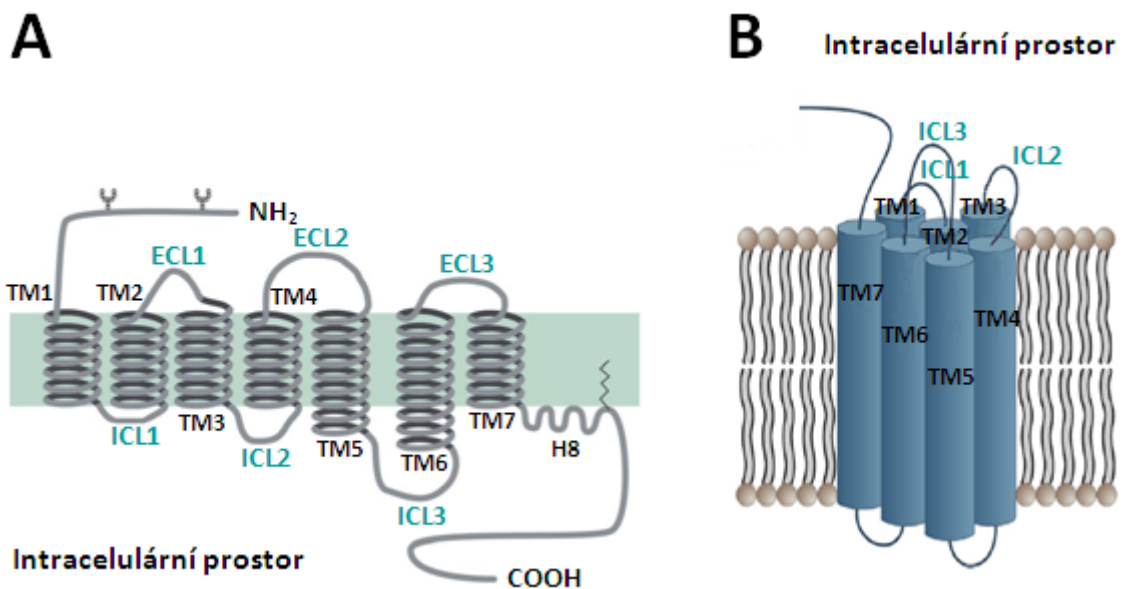
I přes jejich hluboký význam v oblasti lidského zdraví byly strukturní informace o GPCRs až do nedávné doby velmi omezené. S příchodem různých nových biochemických a krystalografických metod postupovala strukturní biologie GPCRs rychle a nyní nabízí základní molekulární pohled na jejich aktivaci a signalizaci.

Pochopení struktury GPCR je z velké části založeno na strukturách rhodopsinu (tj. receptoru pro vnímání světla) určených metodami s vysokým rozlišením. Rhodopsin je vhodnější pro strukturní studie v porovnání s jinými GPCRs, protože je možné získat velké množství čistého proteinu z hovězí sítnice. Je také pozoruhodně stabilní. Zachovává si své funkce i za podmínek, při kterých mnoho jiných GPCRs denaturuje. Struktura rhodopsinu obratlovců stanovená v roce 2000 určila první trojrozměrnou strukturu nativního GPCR (Palczewski K. et al., 2000). Poskytla další informace o mechanismu aktivace receptoru a původu interakcí mezi specifickým ligandem a G proteinem.

K dnešnímu dni byly téměř všechny struktury GPCRs objasněny pomocí techniky molekulového nahrazení ("molecular-replacement", MR) - metody, která řeší tzv. fázový problém ("phase problem") v rentgenové krystalografii (Kruse A. C. et al., 2013). Tato metoda se opírá o existenci již dříve určené struktury proteinu, která je podobná neznámé struktuře, ze které jsou difrakční data odvozena. Upřesnění krystalizačních podmínek přineslo vyšší rozlišení dat až na 2.2 Å, což je metoda se zatím nejvyšším rozlišením struktury rhodopsinu (Okada T. et al., 2004). Vrcholem je pak určení struktury připraveného lidského adenosinového receptoru A_{2A} (A_{2A}AR) s jeho třetí intracelulární smyčkou nahrazenou apocytochromem b₅₆₂RIL (termostabilní apocytochrom obsahující hemovou skupinu b) (Liu W. et al., 2012) a δ-opioidního receptoru (δ-OR) (Fenalti G. et al., 2014) s rozlišením 1.8 Å.

GPCRs sdílejí společný charakteristický strukturní rys – centrální doménu receptoru tvořenou sedmi hydrofóbními transmembránovými α-helixy (TM1-TM7) s extracelulárním aminokoncem (N-konec) a intracelulárním karboxylovým koncem (C-konec) (**Obrázek 1A,B**). Jednotlivé α-helixy jsou navzájem spojeny třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami (ECL1-ECL3, ICL1-ICL3, **Obrázek 1A**). Ačkoli GPCRs sdílejí podobnou architekturu sedmi transmembránových šroubovic,

jejich sekvence jsou různorodé. Kromě sekvenčních rozdílů se GPCRs liší v délce a funkci jednotlivých oblastí. Každý ze sedmi α -helixů se obecně skládá z 20 až 27 aminokyselin, naproti tomu N-koncové segmenty (7-595 aminokyselin), smyčky (5-230 aminokyselin) a C-koncové segmenty (12-359 aminokyselin) se liší ve velikosti, což naznačuje jejich různé struktury a funkce (Ji T. H. et al., 1998).



Obrázek 1: Struktura GPCRs. (A) Všechny GPCRs sdílejí podobnou strukturu skládající se ze sedmi hydrofóbních transmembránových α -helixů (TM1-TM7) spojených třemi intracelulárními (ICL1-ICL3) a třemi extracelulárními (ECL1-ECL3) smyčkami a z N-koncové a C-koncové domény. Některé receptory mají amfipatický helix H8. Převzato z práce (Deupi X. a Kobilka B., 2007) a upraveno. (B) TM1-TM7 jsou uspořádány ve směru chodu hodinových ručiček při pohledu z intracelulárního prostoru. Převzato z práce (Moreira I. S., 2014) a upraveno.

Extracelulární oblast, která se skládá z N-konce a smyček ECL1-ECL3, je zodpovědná za vazbu ligandu - moduluje jeho přístup. N-konec se může pohybovat od relativně krátkých sekvencí u rhodopsinové rodiny až po velké extracelulární domény v jiných třídách GPCRs. Aminokoncová oblast tvoří orthosterickou (ligand vázající) doménu některých receptorů. Extracelulární region se vyznačuje vysokou strukturální rozmanitostí, ale malým pohybem při aktivaci. Oblast sedmi α -helixů (TM1-TM7) může vázat ligandy a převádí informace do intracelulární oblasti prostřednictvím konformačních změn. Orientace TM1-TM7 způsobuje stereo- a geometrickou specifitu pro vstup ligandu a jeho navázání (Ji T. H. et al., 1998). Intracelulární oblast, která se skládá z ICL1-ICL3,

C-konce a u některých receptorů také z intracelulárního amfipatického helixu (H8), je propojena s cytosolickými signálními proteiny. Interaguje s G proteiny (podílí se na jejich rozpoznání a aktivaci), arrestiny a dalšími efekty. Intracelulární region je více konzervovaný a je vystaven mnohem větší konformační změně po aktivaci receptoru než extracelulární region.

Existuje stále více důkazů, že GPCRs existují jako dimery (nebo oligomery), a že tyto dimery mohou být důležité pro aktivaci G proteinu alespoň u některých GPCR rodin (Deupi X. a Kobilka B., 2007; Fredholm B. B. et al., 2007; Kobilka B. K., 2007; Park P. S. et al., 2008; Moreira I. S., 2014). První skutečně přesvědčivý důkaz byl zjištěn pro GABA_B receptor (White J. H. et al., 1998). Fyziologický význam dimerizace je stále tématem diskuzí. Jedním z důvodů pro oligomerní strukturu se zdá být to, že GPCRs často nemohou úspěšně dosáhnout buněčné membrány jako monomery (Fredholm B. B. et al., 2007).

2.1.2 Klasifikace GPCRs

Pro klasifikaci GPCRs se používá několik systémů – některé rozdělují receptory podle ligandů, které vážou, některé používají fyziologické a strukturní znaky. Jedním z nejčastěji používaných systémů je Kolakowského rozdělení do 5 tříd A-F na základě sekvenční podobnosti (Kolakowski L. F., Jr., 1994). Tento systém je navržen tak, aby pokryl všechny GPCRs, jak u obratlovců, tak i bezobratlých. Celkovou klasifikaci GPCRs totiž ztěžuje fakt, že mezi GPCRs savců a bezobratlých existují velké sekvenční rozdíly. Některé rodiny v A-F systému ovšem neexistují u lidí (např. D – feromonové receptory hub a F – cAMP receptory).

První fylogenetickou studii celé superrodiny GPCRs savčího genomu provedl Fredriksson a jeho tým v roce 2003 (Fredriksson R. et al., 2003). Na základě fylogenetické analýzy všech dosud známých receptorů kódovaných lidským genomem byly GPCRs rozděleny podle sekvenční podobnosti uvnitř sedmi transmembránových α -helixů do 5 následujících tříd (tzv. GRAFS klasifikační systém): glutamátová (G), rhodopsinová (R), adhezní (A), "frizzled/taste" (F), a sekretinová (S).

Rhodopsinová třída je největší a patří do ní i opioidní receptory, kterým je tato práce věnována. Má několik charakteristik jako je NSxxNPxxY motiv v TM7 a DRY motiv nebo D(E)-R-Y(F) na hranici mezi TM3 a ICL2 (Fredriksson R. et al., 2003). Ligandy pro většinu receptorů z rhodopsinové třídy se váží uvnitř dutiny mezi TM1-TM7.

Kromě opioidních receptorů sem řadíme například adrenergní, muskarinové nebo prostaglandinové receptory. Do glutamátové třídy řadíme například GABA receptory (GABA - kyselina γ -aminomáselná), metabotropní receptory a některé chuťové receptory (TAS1). Adhezní třída je pojmenována podle dlouhého N-konce, který obsahuje motivy pravděpodobně se účastníci buněčné adheze. Tzv. "frizzled/taste" třída obsahuje chuťové receptory (TAS2) a tzv. "frizzled" receptory, které jsou aktivovány signálními Wnt glykoproteiny hrajícími úlohu ve vývoji tkání. Do sekretinové třídy řadíme kromě sekretinového receptoru také receptory pro kalcitonin, glukagon nebo hormon uvolňující kortikotropin.

2.2 Přenos signálu pomocí GPCRs

Přenos signálu je základním biologickým procesem, který je potřebný k udržení buněčné homeostázy a zajištění koordinované buněčné aktivity ve všech organizmech. Všechny buňky mají transmembránový signalizační systém, který jim umožňuje přijímat informace z extracelulárního prostoru a komunikovat mezi sebou. Povrch buněk je stále pod palbou stovek chemických a fyzikálních signálů, které aktivují receptory vázané na membránu (Neer E. J., 1994). Tyto membránové proteiny na povrchu buněk slouží jako komunikační rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky. Jednou z největších a nejrůznorodějších rodin membránových proteinů jsou GPCRs. Většina transmembránových přenosů signálu v odpovědi na hormony nebo neurotransmitery je zprostředkována právě těmito receptory.

Aktivované GPCRs zprostředkovávají tok informací přes relativně malou rodinu vysoce homologních heterotrimerních G proteinů k efektorovým enzymům nebo iontovým kanálům, které nakonec vedou k požadované biologické odpovědi. Vazba hormonu nebo neurotransmiteru na receptor způsobí změny v jeho struktuře, které potom aktivují G protein. Aktivovaný receptor po interakci s G proteinem slouží jako tzv. faktor pro výměnu guaninových nukleotidů ("guanine nucleotide exchange factor", GEF) - zvyšuje rychlost uvolňování GDP z vazebného místa na α -podjednotce G proteinu a umožňuje tak jeho okamžité nahrazení molekulou GTP a tedy aktivaci G proteinu (Pierce K. L. et al., 2002). G proteiny hrají klíčovou roli při definování specifity a charakteristiky buněčné odpovědi. Každá buňka obsahuje receptory pro mnoho druhů chemických signálů, stejně jako více různých typů G proteinů.

2.2.1 Aktivace receptoru

To, že aktivace receptoru agonistou zahrnuje konformační změnu receptoru, poprvé uvedli ve své práci del Castillo a Katz (Del Castillo J. a Katz B., 1957). Zjistili, že navázání ligandu na acetylcholinový receptor vede k otevření tohoto kanálu. Takový model aktivace receptoru uplatňoval existenci dvou stavů receptoru. Tzv. dvoustavový ("two-state") model aktivace receptoru předpokládá, že GPCRs existují v rovnováze mezi neaktivním (R) a aktivním (R*) stavem (Leff P., 1995; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002; Deupi X. a Kobilka B., 2007; Kobilka B. K., 2007; Park P. S. et al., 2008). Intracelulární signalizace je dosaženo aktivní konformací, která umožňuje efektivní aktivaci G proteinů a následných signalizačních molekul.

V nepřítomnosti ligandů je úroveň bazální aktivity receptoru určena rovnováhou mezi R a R*. Účinnost ("efficacy") ligandů odráží jejich schopnost měnit rovnováhu mezi těmito dvěma stavy a používá se k popisu účinku ligandu na funkční vlastnosti receptoru (Deupi X. a Kobilka B., 2007). Aktivita receptorů může být buď zvýšena, nebo snížena v závislosti na typu ligandu.

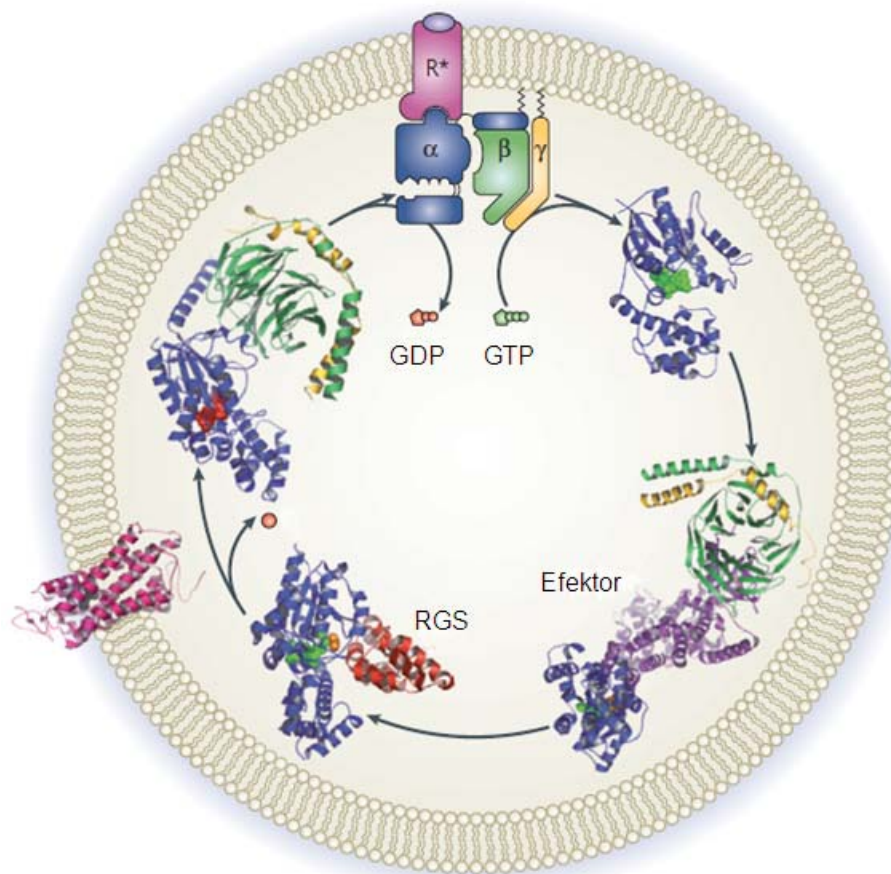
Dvoustavový model může popsat většinu funkčního chování GPCRs a vysvětlit spektrum odpovědí na ligandy různých účinností v jednoduchých experimentálních systémech sestávajících z jednoho receptoru a jednoho G proteinu. Nedávné studie ale naznačují, že mechanismy aktivace receptoru jsou mnohem složitější, než tento jednoduchý systém. Stále přibývá důkazů pro existenci vícenásobných konformačních stavů. V reakci na typ ligandu a způsob jeho vazby dosahují GPCRs různých konformací, které tvoří základ pro funkční selektivitu (Moreira I. S., 2014).

Nejvýraznější změny konformace při aktivaci rhodopsinu pravděpodobně zahrnují změnu orientace cytoplazmatických konců TM3, TM6 a TM7, a případně otáčení TM6 kolem své osy (Park P. S. et al., 2008). Proto lze předpokládat, že tyto klíčové pozice tvoří skelet vazebné kapsy pro ligand a že změny v aminokyselinách, které zaujímají topologicky ekvivalentní pozice, přispívají ke specifičnosti ligandu u různých receptorů (Venkatakrishnan A. J. et al., 2013).

2.2.2 Heterotrimerní G proteiny, efektorový systém

G proteiny jsou heterotrimery skládající se z α -, β - a γ -podjednotky, z nichž každá má několik izoform (Neer E. J., 1994, 1995; Hamm H. E., 1998; Cabrera-Vera T. M. et al., 2003; Wettschureck N. a Offermanns S., 2005). α -podjednotka ($G\alpha$) váže

a hydrolyzuje GTP (všechny izoformy α -podjednotky jsou GTPázy), zatímco β - ($G\beta$) a γ -podjednotka ($G\gamma$) tvoří pevný $\beta\gamma$ komplex ($G\beta\gamma$), který není disociovatelný s výjimkou denaturace. (Neer E. J., 1995; Pierce K. L. et al., 2002; Cabrera-Vera T. M. et al., 2003). Pokud je navázáno GDP na α -podjednotce, α -podjednotka je spojena s $\beta\gamma$ komplexem a tvoří neaktivní heterotrimer. G proteiny procházejí signalizačním cyklem mezi neaktivní formou s navázaným GDP a aktivní formou s navázaným GTP na α -podjednotce (Milligan G. a Kostenis E., 2006; Oldham W. M. a Hamm H. E., 2008) (**Obrázek 2**).



Obrázek 2: Pohled na signalizační cyklus G proteinu. V klidovém (neaktivním) stavu jsou G proteiny heterotrimery skládající se z $G\alpha$ (modrá barva) s navázaným GDP (malá kolečka reprezentují 2 fosfáty), $G\beta$ (zelená barva) a $G\gamma$ (žlutá barva). Po navázání extracelulárního ligandu receptor podléhá konformačním změnám, které aktivují G protein a katalyzují uvolnění GDP z $G\alpha$. Je vytvořen stabilní, vysokoafinní komplex mezi aktivovaným receptorem a G proteinem. Navázání GTP (malá kolečka reprezentují 3 fosfáty) ke $G\alpha$ tento komplex destabilizuje, $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ se tak stávají volnými a mohou interagovat s dalšími efektorovými proteiny (fialová barva). Přenos signálu je ukončen hydrolyzou GTP, která může být katalyzována proteiny regulujícími G proteinovou signalizaci (RGS, červená barva). Převzato z práce (Oldham W. M. a Hamm H. E., 2008) a upraveno.

Po navázání agonisty podléhá GPCR konformačním změnám, které vedou k aktivaci heterotrimerního G proteinu; dojde k nahrazení GDP na α -podjednotce G proteinu ($G\alpha$ -GDP) za GTP ($G\alpha$ -GTP) a následnému odpojení $G\alpha$ -GTP od pevně vázaného $\beta\gamma$ komplexu. Tato aktivace G proteinu je nutná pro spuštění kaskády reakcí, které jsou vyžadovány pro následný přenos signálu. $G\alpha$ -GTP a $G\beta\gamma$ individuálně zahájí různé signalizační dráhy. Aktivovaný stav trvá tak dlouho, dokud není GTP hydrolyzováno na GDP vnitřní aktivitou GTPázy $G\alpha$. Jakmile se tak stane, $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ se znovu spojí, a stanou se neaktivními. Rychlost hydrolyzy GTP řídí dobu trvání aktivace jak $G\alpha$, tak i $G\beta\gamma$ a je tedy krokem určujícím rychlost ukončení buněčné odpovědi (Neer E. J., 1995; Hamm H. E., 1998). Ta se liší v závislosti na α -podjednotce. Krokem určujícím rychlost aktivace G proteinu je uvolnění GDP z heterotrimerního G proteinu (Preininger A. M. a Hamm H. E., 2004).

Během posledních několika let se pozornost v oblasti studia regulačních signalizačních drah aktivovaných prostřednictvím GPCRs obrací k novému mechanismu regulace, kterého se účastní tzv. RGS bílkoviny neboli regulátory G proteinové signalizace ("regulators of G protein signaling", **Obrázek 2**). Tyto proteiny jsou negativními regulátory signalizace pomocí G proteinů - jsou schopné zvýšit aktivitu GTPázy $G\alpha$. Zabráňují vazbě GTP na $G\alpha$ nebo v případě navázaného GTP na $G\alpha$ omezují jeho životnost (Hollinger S. a Hepler J. R., 2002). Také ovlivňují specifitu signalizačního procesu a v některých případech mohou plnit funkci efektorů (Wettschureck N. a Offermanns S., 2005).

$G\alpha$ a $G\beta\gamma$ stimulují různé efektorové molekuly, které zahrnují adenylyl a guanylyl cyklázy, fosfodiesterázy, fosfolipázu A_2 (PLA_2), fosfolipázu C (PLC) a fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), které aktivují nebo inhibují produkci tzv. druhých posílů ("second messengers") jako je cAMP, cGMP, 1,2-diacylglycerol (DAG), inositol-1,4,5-trisfosfát (IP3), fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3), kyselina arachidonová, kyselina fosfatidová a Rho GTPázy (Marinissen M. J. a Gutkind J. S., 2001; Moreira I. S., 2014). Dále podporují zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} a otevření nebo zavření různých iontových kanálů (Marinissen M. J. a Gutkind J. S., 2001; Moreira I. S., 2014). Konkrétní efektorové proteiny aktivované $G\alpha$ jsou závislé na typu $G\alpha$. Po dlouhou dobu převládala hypotéza, že $G\alpha$ -GTP aktivuje efektor, zatímco $G\beta\gamma$ byl považován jen za negativní regulátor $G\alpha$ signalizace (Neer E. J., 1995). Dnes je již známo, že $G\beta\gamma$ aktivuje širokou škálu efektorů, včetně fosfolipázy $C\beta$ a adenylyl cykláz, a jejich seznam se stále rozšiřuje (Cabrera-Vera T. M. et al., 2003).

V současné době se také ukazuje, že GPCRs jsou zapojeny i do signálních drah, které heterotrimerní G proteiny nezahrnují (Marinissen M. J. a Gutkind J. S., 2001; Deupi X. a Kobilka B., 2007; Fredholm B. B. et al., 2007).

U lidí je známo 21 $G\alpha$ (39-52 kDa) kódovaných 16 geny, 6 $G\beta$ (35 kDa) kódovaných 5 geny a 12 $G\gamma$ (8-10 kDa) (Neer E. J., 1994; Sandhya K. a Vemuri M. C., 1997; Wettschureck N. a Offermanns S., 2005; Milligan G. a Kostenis E., 2006; Oldham W. M. a Hamm H. E., 2008; Moreira I. S., 2014). V přírodě se nacházejí v mnoha, ale zdaleka ne všech, možných kombinacích. Na základě podobnosti aminokyselinové sekvence $G\alpha$ lze rozdělit G proteiny do 4 tříd: G_s , G_i/G_o , G_q/G_{11} a G_{12}/G_{13} (Neer E. J., 1995; Pierce K. L. et al., 2002; Latek D. et al., 2012). Členové jedné třídy jsou si strukturně podobní a často sdílejí některé ze svých funkčních vlastností.

2.2.2.1 G_s proteiny (G_s , G_{olf})

G_s proteiny stimulují adenyl cyclázu, která katalyzuje produkci cAMP z ATP (Pierce K. L. et al., 2002; Wettschureck N. a Offermanns S., 2005; Latek D. et al., 2012; Lin H. H., 2013). Zvýšení intracelulární koncentrace cAMP vede k aktivaci proteinkinázy A (PKA), která je schopná fosforylovat cílové proteiny (Lin H. H., 2013). Jsou citlivé vůči cholera toxinu (toxin bakterie *Vibrio cholerae*). Jeho působením dochází k ADP-ribozylaci specifického argininu, což vede k inhibici vnitřní aktivity GTPázy $G\alpha$ a její následné stálé aktivaci (Obara S. et al., 1991).

2.2.2.2 G_i/G_o proteiny (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o , G_{r1} , G_{r2} , G_{gust} , G_z)

G proteiny třídy G_i/G_o zprostředkovávají na receptoru závislou inhibici různých typů adenyl cycláz a inhibují tedy produkci cAMP (Wettschureck N. a Offermanns S., 2005). Toxin z *Clostridium botulinum* (pertussis toxin, PTX) je schopen ADP-ribozylvat většinu členů G_i/G_o rodiny v blízkosti jejich C-konců. Konkrétně se jedná o cysteinový zbytek umístěný čtyři aminokyseliny od C-konce (pozice 351) (Avigan J. et al., 1992; Mullaney I. et al., 1996; Bahia D. S. et al., 1998; Carr I. C. et al., 1998). Takto ADP-ribozylované G_i/G_o pak nejsou schopny interakce s receptorem - dojde k jejich odpražení od receptoru (Wettschureck N. a Offermanns S., 2005). Protože PTX modifikuje konzervovaný cysteinový zbytek nacházející se v klíčovém rozhraní receptor a G protein, výměna za jinou aminokyselinu ruší citlivost k PTX (Milligan G. a Kostenis E., 2006). Fyzikálně-chemická povaha aminokyseliny používané k náhradě tohoto cysteinu může určovat účinnost interakce s receptorem (Bahia D. S. et al., 1998).

2.2.2.3 G_q/G₁₁ proteiny (G_q, G₁₁, G₁₄, G₁₅, G₁₆)

Třída G_q/G₁₁ proteinů aktivuje β izoformu fosfolipázy C (PLCβ) (Pierce K. L. et al., 2002; Wettschureck N. a Offermanns S., 2005; Latek D. et al., 2012; Lin H. H., 2013). PLCβ stěpí PIP2 (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát) na IP3 a DAG. IP3 a DAG aktivují uvolňování Ca²⁺ a proteinkinázu C (PKC).

2.2.2.4 G₁₂/G₁₃ proteiny (G₁₂, G₁₃)

G proteiny G₁₂ a G₁₃ jsou často aktivovány receptory spřaženými s G_q/G₁₁ (Wettschureck N. a Offermanns S., 2005). Působí přes RhoGEFs (Rho guanin-nukleotid výměnné faktory) a aktivují tak členy rodiny Rho GTPáz, dále aktivují transportní systém pro sodné a draselné ionty (Na⁺/H⁺ antiport) (Wettschureck N. a Offermanns S., 2005; Lin H. H., 2013).

2.3 GPCR-Gα fúzní proteiny

Většina studií vzájemného působení mezi GPCRs a α-podjednotkou různých heterotrimerních G proteinů využívala jejich koexpresi do vhodných buněčných systémů. To však představuje problém pro detailní kvantitativní analýzu účinnosti a specifčnosti těchto interakcí, protože je jen zřídka možné dosáhnout stejné úrovně exprese jednotlivých G proteinů nebo identické buněčné distribuce GPCR a G proteinu (Milligan G., 2002a). Účinnost vzájemného působení mezi GPCRs a heterotrimerními G proteiny je totiž do značné míry ovlivněna jejich absolutními a relativními obsahy v plazmatické membráně (Seifert R. et al., 1999). Výzkum těchto interakcí byl usnadněn použitím nové rodiny rekombinantních proteinů - GPCR-Gα fúzních proteinů, které byly představeny jako originální strategie pro zkoumání receptoru za definovaných experimentálních podmínek. Na rozdíl od koexpresi poskytují fúzní proteiny možnost napodobit fyziologicky se vyskytující interakce a ačkoli se jedná o nepřírozené subjekty, mají spoustu výhod a unikátních vlastností (Milligan G., 2002a; Schneider E. H. a Seifert R., 2010).

Fúzní proteiny mezi GPCR a α-podjednotkou G proteinu se staly široce používanými nástroji ke zkoumání mnoha bílkovin. Mohou ve své podstatě zvýšit účinnost aktivace G proteinu pomocí GPCRs, protože zajišťují fyzickou blízkost obou polypeptidů (Seifert R. et al., 1999; Wurch T. a Pauwels P. J., 2001; Milligan G., 2002a; Schneider E. H. a Seifert R., 2010). Další výhodou GPCR-Gα fúzních proteinů je přesně definována

stechiometrie signalizačních partnerů 1:1 (GPCR : G protein) (Seifert R. et al., 1999; Wurch T. a Pauwels P. J., 2001; Milligan G., 2002a; Schneider E. H. a Seifert R., 2010).

GPCR-G α fúzní proteiny jsou vytvořeny spojením C-konce GPCR, který se nachází na intracelulární straně membrány, a N-konce G α (Seifert R. et al., 1999; Milligan G., 2002b). Jedná se o proteiny vzniklé prostřednictvím spojení dvou a více genů, které kódují různé bílkoviny. Toho je dosaženo fúzí otevřeného čtecího rámce ("open reading frame", ORF) těchto dvou proteinů s použitím restrikčního enzymu nebo techniky na bázi polymerázové řetězové reakce ("polymerase chain reaction", PCR), nebo kombinací obou (Seifert R. et al., 1999). Mutantní G α , která je rezistentní vůči PTX, se často používá v GPCR-G α fúzních proteinech, protože účinek endogenního G $_i$ je selektivně odstraněn působením PTX (Suga H. a Haga T., 2007).

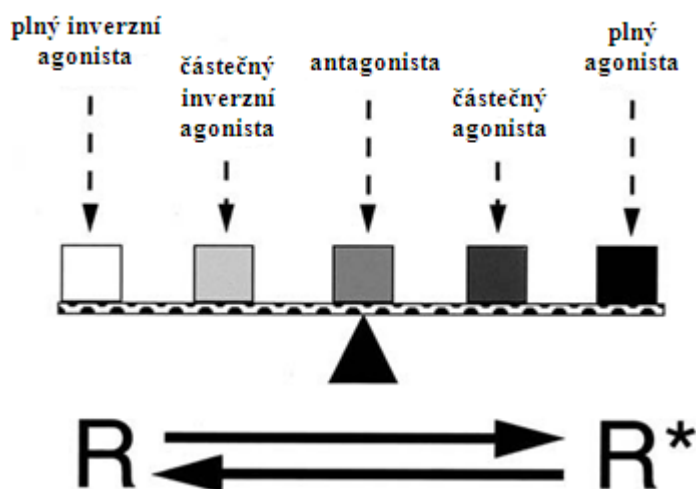
Technika GPCR-G α fúzních proteinů umožňuje vysoce citlivé srovnání blízké příbuzných podtypů GPCR podle přesně definovaných experimentálních podmínek (Ellis C., 2004). Receptory mohou být zkoumány přímo na úrovni G proteinu, který je na proximální úrovni přenosu signálu, bez spoléhání se na aktivitu efektorového systému (Ellis C., 2004).

2.4 Konstitutivní aktivita a inverzní agonisté

Jak již bylo uvedeno výše, GPCRs existují v rovnováze mezi neaktivní (R) a aktivní konformací (R*) (**Obrázek 3**). Plní agonisté (agonisté) se podílejí na posunu rovnováhy tím, že mají zvýšenou afinitu k R* a maximálně tento stav stabilizují (Bond R. A. et al., 1995; Milligan G. et al., 1995; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002) (**Obrázek 3**). To má za následek zvýšení podílu aktivních receptorů a tedy zvýšení jejich aktivity (Bond R. A. et al., 1995; Prather P. L., 2004). Agonisté účinně zvyšují rychlost výměny bazální GDP za GTP u G proteinů a zvyšují (méně často snižují) aktivitu efektorového systému (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Částeční (parciální) agonisté jsou méně účinní než agonisté. Schopnost GPCRs přejít do aktivní konformace v nepřítomnosti agonisty nazýváme konstitutivní aktivita (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002, 2003). Konstitutivní aktivita GPCR zvyšuje bazální aktivitu G proteinů a efektorů.

Antagonisté přednostně nestabilizují ani jednu formu receptoru, mají stejnou afinitu k R i R*, nemají tedy vliv na rovnováhu (**Obrázek 3**), postrádají vnitřní aktivitu, nemění bazální aktivitu G proteinů a mohou konkurenčně působit proti stimulačním účinkům

agonistů a inhibičním účinkům inverzních agonistů (Bond R. A. et al., 1995; Milligan G. et al., 1995; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002; Prather P. L., 2004).



Obrázek 3: Dvoustavový model aktivace GPCR. GPCRs existují v rovnováze mezi neaktivním (R) a aktivním (R*) stavem. Plní agonisté maximálně stabilizují R* stav zatímco plní inverzní agonisté maximálně stabilizují R stav. Antagonisté neovlivňují rovnováhu R/R*, ale blokují účinek agonistů a inverzních agonistů. Částeční agonisté a částeční inverzní agonisté mají nižší účinnost než plní agonisté a plní inverzní agonisté. Převzato z práce (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002) a upraveno.

Plní inverzní agonisté (inverzní agonisté), na rozdíl od agonistů, maximálně stabilizují neaktivní R stav a způsobují pokles bazální aktivity G proteinů - redukují bazální GDP/GTP výměnu (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002, 2003; Prather P. L., 2004) (**Obrázek 3**). To vede ke zvýšení podílu neaktivních receptorů a snížení spontánní, na agonistovi nezávislé, aktivity receptoru. Částeční (parciální) inverzní agonisté jsou v tomto směru méně účinní.

Konstitutivní aktivita je běžnou vlastností přirozeně se vyskytujících (tzv. "wild-type") GPCRs a je pozorována u mnoha z nich (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Dále bylo identifikováno několik mutantů GPCR se zvýšenou konstitutivní aktivitou, kteří způsobují různá onemocnění, většinou endokrinní poruchy (Lefkowitz R. J. et al., 1993; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2003). První důkazy o existenci konstitutivní aktivity GPCRs byly získány pro δ -opioidní receptor v roce 1982 (Koski G. et al., 1982). Na ligandu nezávislá aktivita tohoto receptoru byla následně prokázána i v dalších studiích s různými buněčnými liniemi (Costa T. a Herz A., 1989; Costa T. et al., 1990; Mullaney I. et al., 1996; Merkouris M. et al., 1997; Neilan C. L. et al., 1999).

Nejdůležitějšími farmakologickými nástroji pro analýzu konstitutivní aktivity jsou inverzní agonisté, sodné ionty Na^+ , které stabilizují R stav, a PTX, který odděluje GPCRs od G_i/G_o proteinů (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002).

Monovalentní kationt Na^+ působí jako allosterický inverzní agonista, stabilizuje R stav a snižuje bazální aktivitu G proteinů (Gierschik P. et al., 1989; Costa T. et al., 1990; Kong H. et al., 1993a; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Vzhledem k tomu, že jak Na^+ tak i inverzní agonisté stabilizují R stav, účinnost inverzních agonistů je v přítomnosti Na^+ snížena (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Přesným molekulárním cílem Na^+ je vysoce konzervované reziduum kyseliny asparagové v TM2 GPCRs (Ceresa B. P. a Limbird L. E., 1994; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002, 2003). Stabilizace R stavu pomocí Na^+ byla prokázána především u receptorů spojených s G_i/G_o proteiny.

PTX přenáší část ADP-ribózy z NAD^+ na cystein v blízkosti C-konce G_i a G_o . Změna konformace po přidání ADP-ribózového zbytku ke G_i/G_o narušuje vzájemné působení mezi GPCR v R^* stavu a G proteiny, bez ohledu na to, zda je na GPCR navázán agonista nebo není. PTX byl úspěšně použit k odmaskování konstitutivní aktivity několika GPCRs, u kterých nejsou inverzní agonisté k dispozici (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002).

Inverzní agonisté mohou být užiteční při léčbě neurologických a kardiovaskulárních chorob a chorob způsobených konstitutivně aktivními mutanty GPCRs (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002; Fredholm B. B. et al., 2007). Někteří inverzní agonisté jsou běžně používanými léky. Přesná úloha konstitutivní aktivity *in vivo* není dosud plně vysvětlena, protože jsou obrovské problémy se zajištěním toho, aby receptor nebyl ovlivněn endogenním agonistou (Fredholm B. B. et al., 2007).

Problematika konstitutivní aktivity GPCRs může být potenciálně zkreslena tím, že aktivita receptoru může být také regulována na jiných místech než na orthosterickém vazebném místě pro agonistu (Langmead C. J. a Christopoulos A., 2006; Fredholm B. B. et al., 2007; Park P. S. et al., 2008). Stále častěji jsou syntetizovány sloučeniny, které mění aktivitu GPCRs prostřednictvím interakce s allosterickým vazebným místem. Taková allosterická modulace nabízí nové možnosti farmakologické intervence, ale také poskytuje nové možnosti pro fyziologickou modulaci (Fredholm B. B. et al., 2007).

2.5 Opioidy a opioidní receptory (OR)

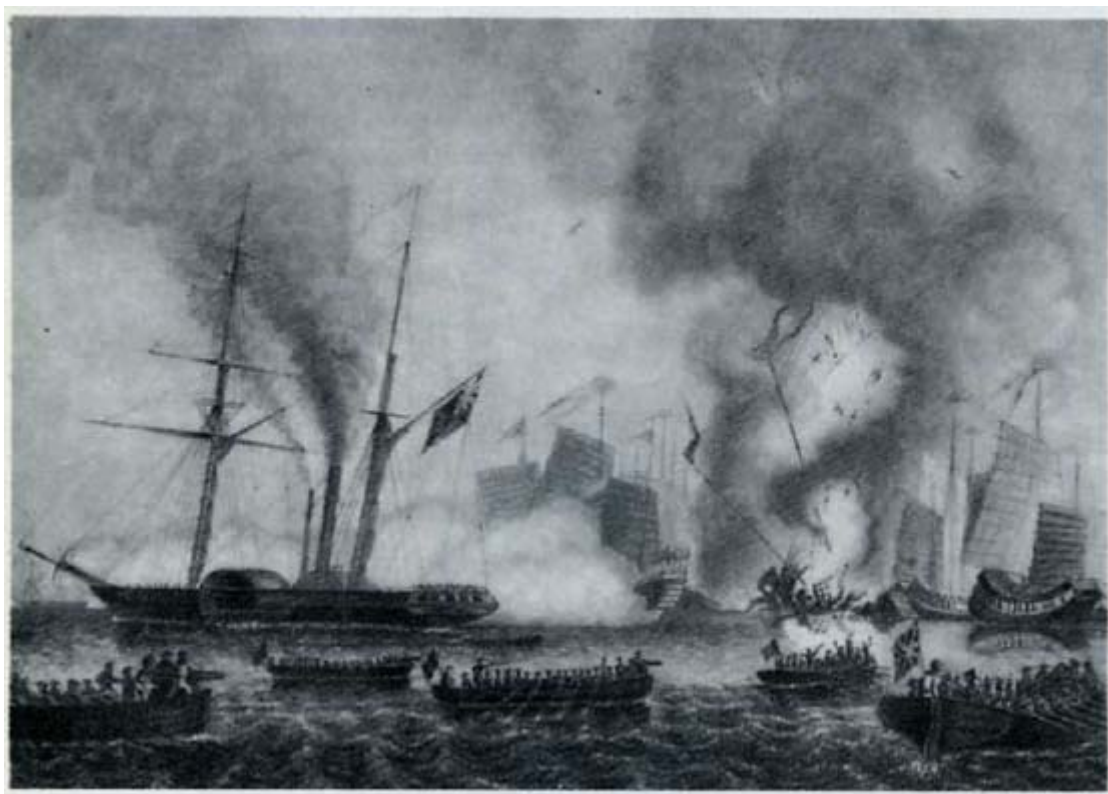
Opioidní látky jsou nejúčinnějšími analgetiky pro léčbu akutní a chronické bolesti. Jejich klinické využití jako analgetik je zásadní v medicíně, ale je omezeno vedlejšími účinky a potenciálem k jejich zneužívání (Pasternak G. W., 2014). Představují jednu z největších složek trhu s nelegálními drogami po celém světě (Manglik A. et al., 2012). Drogová závislost má velké sociální a ekonomické důsledky. Intravenózní podání opioidních léků je nejčastější příčinou úmrtí předávkováním v Evropě a Severní Americe a hlavním faktorem přispívajícím k celosvětové epidemii AIDS. Závislost na předepisovaných opioidech je v současnosti jednou z nejzávažnějších forem drogové závislosti, a skutečnost, že vyvolává významné zdravotní problémy, zdůrazňuje naléhavou potřebu rozvoje bezpečnějších léků proti bolesti (Filizola M. a Devi L. A., 2012).

Aby bylo možné pochopit terapeutické účinky opioidních analgetik, jejich vedlejší účinky a související problémy jako je tolerance a závislost, je nezbytné pochopit mechanismy, kterými opioidy mění aktivitu buněk exprimujících receptory, na které působí. Identifikace OR v roce 1973 znamenala počátek našeho chápání molekulárních mechanismů těchto látek (Pasternak G. W., 2014). Hledání bezpečných, nenávykových verzí morfinu a dalších opioidů se nyní opět významně posunulo dopředu díky vyřešení krystalových struktur OR (Granier S. et al., 2012; Manglik A. et al., 2012; Thompson A. A. et al., 2012; Wu H. et al., 2012), na které se tyto látky vážou.

2.5.1 Opium, morfin, drogová závislost

Opium patří mezi nejstarší známé drogy. Výtažky z máku setého (*Papaver somniferum*) jsou používány pro léčebné (analgetické) a rekreační (euforické) účinky po tisíce let. Opium bylo lidstvu známo od pozdního neolitu (Gilman S. L. a Xun Z., 2006). Záznamy ukazují, že již kolem roku 3400 př. n. l., pěstovali mák setý Sumerové v dolní Mezopotámii (Brownstein M. J., 1993; Balch R. J. a Trescot A., 2010). Opium bylo od počátku svázáno s obchodem a obchodními stezkami. Arabové viděli v opiu již od 7. století našeho letopočtu ideální obchodní zboží. Vozili je ze Středního Východu přes Persii a Indii až do Číny a potom mezi 10. a 13. stoletím do všech částí Evropy (Snyder S. H. a Lader M. H., 1988). Na rozvoji používání opia se významně podílel švýcarský lékař Paracelsus, který na počátku 16. století rozpustil opium v alkoholu a vzniklou tinkturu nazval laudanum, které se postupně stalo velmi populárním (Snyder S. H. a Lader M. H., 1988; Dikötter F. et al., 2004).

Vítězství oddílů anglické Východoindické společnosti nad spojenými indo-francouzskými vojsky v bitvě u Plassey v roce 1757 předznamenalo počátek rychlé britské územní expanze v Indii (Pendell D., 2004). Angličané ovládli i provincie Bengálsko a Bihár, v té době největší producenty opia na světě, a s nimi i obchod s touto drogou. Postupně se anglické Východoindické společnosti podařilo obchod s opiem zcela ovládnout. Část z opia se dostávala i do Číny a toto množství každoročně vzrůstalo. Kromě zvýšené aktivity vnitrozemských obchodníků ovládaly vlny Jihočínského moře mezi lety 1780-1810 i pirátské flotily, které se zmocňovaly nákladů opia a pak s ním obchodovaly (Dikötter F. et al., 2004). Ve 40. a 50. letech 19. století propukly jako reakce čínského císařství proti dovozu a prodeji opia v Číně tzv. opiové války (**Obrázek 4**).

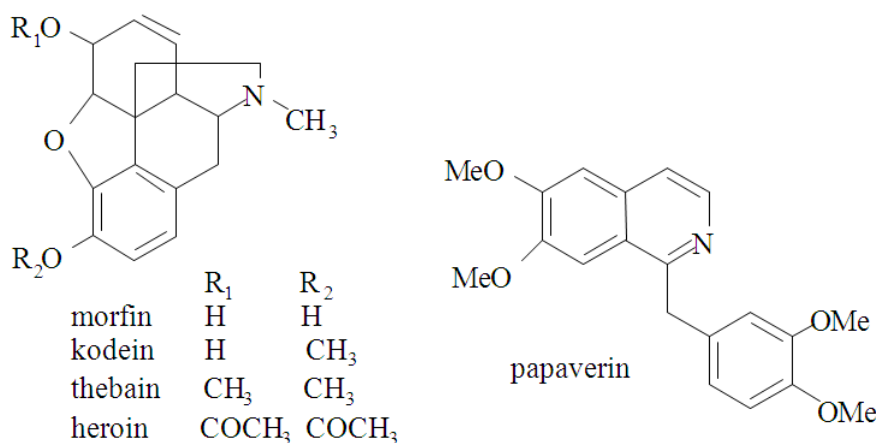


Obrázek 4: Rytina znázorňuje bitvu z roku 1842 během opiové války mezi Čínou a Británií. Převzato z práce (Snyder S. H. a Lader M. H., 1988).

Po rozmachu užívání opia během 1. světové války se jeho zlatý věk začal chýlit ke konci a postupně bylo vytlačováno jinými drogami - zejména syntetickými nebo izolovanými a vyčištěnými deriváty opia (Gilman S. L. a Xun Z., 2006). Surové opium se

dnes užívá výhradně jako droga. Největším producentem opia je Afghánistán, dále se pěstuje v Thajsku, Barmě a Laosu.

V roce 1806 izoloval německý chemik Sertürner alkaloid opia, který pojmenoval po řeckém bohu snů Morfeovi morfin (**Obrázek 5**) (Brownstein M. J., 1993; Waldhoer M. et al., 2004). Zanedlouho poté byly izolovány i další účinné složky opia (kodein, thebain a papaverin) (**Obrázek 5**). V roce 1874 byl syntetizován heroin (**Obrázek 5**), který pak byl po léta považován za účinný lék závislosti na morfinu. K rozšíření opiátů velmi přispěla Občanská válka v USA (1861-1865). Během ní se morfin běžně používal jako anestetikum ve válečných nemocnicích a mnoho vojáků se na něm stalo závislými. Opium a morfin byly dávány vojákům na obou stranách jako součást polní výbavy. Další dosud neznámé rozměry účinků některých drog přinesl převratný vynález injekční jehly (1853). Na přelomu 19. a 20. století pak pozorujeme další nárůst drogových závislostí. Současně prudce narůstají i společenské komplikace a dopady zdravotní i sociální. V této době začínají mezinárodní jednání o narkotikách (Šanghaj 1909, Haag 1912, Ženeva 1925) a postupně vznikají v jednotlivých zemích protidrogové zákony. Společenské hodnocení postupně vede k rozdělení drog na legální a nelegální. Výroba nelegálních drog je zakázána a trestána. V případě důležitých léčiv jsou velmi zpřísněna pravidla pro zacházení s těmito látkami.



Obrázek 5: Strukturní vzorce alkaloidů opia (morfinu, thebainu, kodeinu a papaverinu) a heroinu.

Morfin a kodein jsou nejúčinnější složky opia. U lidí působí na centrální nervový systém a tak produkují široké spektrum účinků, včetně analgezie, euforie, sedace, respirační deprese a potlačení kašle a mají periferní účinky jako je zácpa (Manglik A. et

al., 2012). Morfin působí jako nejefektivnější analgetikum a jeho účinky jsou dodnes nenahraditelné. Nejčastěji se podává pacientům trpícím rakovinou, AIDS nebo jinými život ohrožujícími nemocemi (Walwyn W. M. et al., 2010).

Závislost na opioidech má důležité psychologické a sociální příčiny a důsledky (Law P. Y. et al., 2004). Jedná se o chronické recidivující onemocnění, které je výsledkem postupné adaptace mozku k opakovanému vystavení droze (Contet C. et al., 2004). Zahrnuje vývoj komplexu chování, jako je drogová tolerance, adaptace a touha po drogách, které jsou charakteristické pro návykové stavy (Contet C. et al., 2004).

2.5.2 Objev OR a jejich klonování

Existence OR byla poprvé navržena již v roce 1954 Beckettem a Casym (Beckett A. H. a Casy A. F., 1954) na základě jejich studií vzájemných vztahů mezi strukturou a antinociceptivní aktivitou syntetických opioidů. V roce 1965 uvedl Portoghese (Portoghese P. S., 1965), že pravděpodobně existuje buď více než jeden typ OR nebo více způsobů interakce ligandů s tímto receptorem. Nezávislé zprávy o identifikaci OR přinesly tři výzkumné týmy v roce 1973 (Pert C. B. a Snyder S. H., 1973; Simon E. J. et al., 1973; Terenius L., 1973). Použitím radioaktivních ligandů byla zjištěna přítomnost vysokoafinních stereospecifických vazebných míst pro opioidní ligandy v mozku. Následné studie opioidních vazebných míst také jako první prokázaly účinek sodných iontů a jejich schopnost rozlišovat mezi vazbou agonistů a antagonistů (Pert C. B. a Snyder S. H., 1974; Pasternak G. W. et al., 1975; Wilson H. A. et al., 1975).

Potvrzená přítomnost specifických receptorů pro rostlinné opiátové alkaloidy a příbuzné látky naznačovala, že i v živočišných tkáních musí existovat endogenní ligandy. To vedlo k hledání endogenních ligandů pro tyto receptory a k objevu enkefalinů (Hughes J. et al., 1975), β -endorfinů (Li C. H. et al., 1976) a dynorfinů (Goldstein A. et al., 1979).

Odlišnosti mezi opioidními peptidy podporovaly hypotézu o existenci více typů OR. První definitivní důkaz, že OR netvoří homogenní populaci, byl prezentován Martinem a jeho kolegy v roce 1976 v jejich detailní studii o účinku některých analgetických látek u chronicky spinalizovaných psů (psů s chronicky porušenou míchou; jedná se o zvířecí model, který umožňuje rozlišit účinek těchto látek na několik reflexních odpovědí; modulující vliv mozku je odstraněn předcházejícím protětím míchy) (Martin W. R. et al., 1976). Navrhované formy receptorů byly pojmenovány podle prototypických látek používaných v těchto studiích, tj. μ -opioidní receptor (mí, podle morfinu, μ -OR)

a κ -opioidní receptor (kappa, podle ketocyklazocinu, κ -OR). Farmakologická analýza účinků opioidních peptidů v ileu morčete a chámovodu myši vedla k objevu třetího OR pojmenovaného δ -opioidní receptor (delta, podle vas deferens – chámovod, δ -OR) (Lord J. A. et al., 1977).

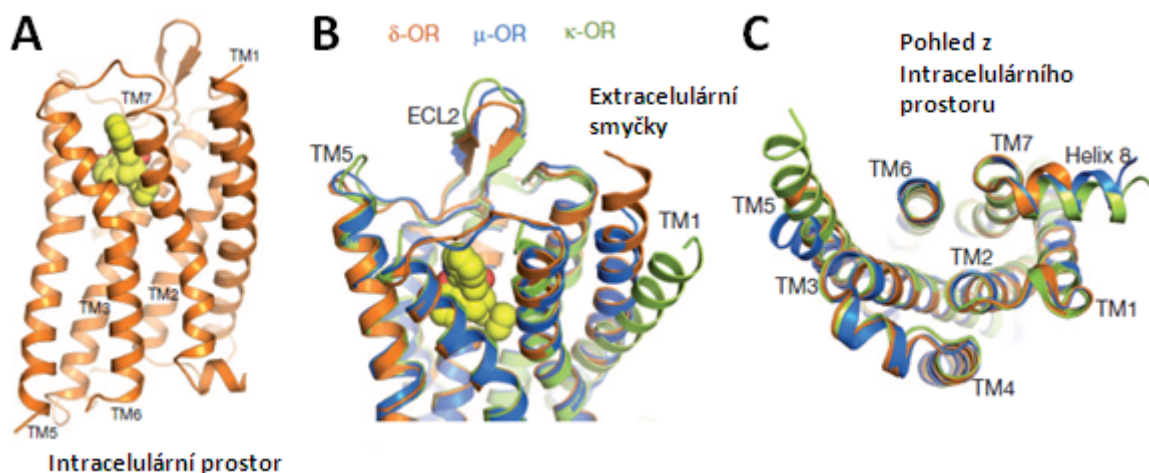
Informace dostupné ze studií OR byly omezeny skutečností, že hladina exprese receptorů v nativních tkáních a nádorových buňkách, které endogenně tyto receptory exprimují, je nízká (Blake A. D. et al., 1996). Klonování genů pro OR poskytlo nové nástroje k identifikaci domén receptorů zapojených do vazby ligandu, G proteinu a regulace agonistou (Blake A. D. et al., 1996). Pokusy o purifikaci OR byly komplikovány jejich nízkou expresí ve většině tkání a také jejich labilitou po solubilizaci detergentem. Struktura OR zůstávala záhadou až do roku 1992, kdy dvě skupiny řešitelů zveřejnily popis izolace cDNA kódující δ -OR s použitím neuroblastom \times gliom (NG108-15) buněk, které exprimují δ -OR endogenně (Evans C. J. et al., 1992; Kieffer B. L. et al., 1992). Postupně byly naklonovány další dva opioidní receptory μ -OR a κ -OR (Chen Y. et al., 1993; Yasuda K. et al., 1993). Krátce po naklonování μ -OR, δ -OR a κ -OR byl identifikován čtvrtý receptor, který měl přibližně z 60 % shodnou sekvenci aminokyselin s ostatními OR (Bunzow J. R. et al., 1994; Mollereau C. et al., 1994). Ukázalo se, že má velmi nízkou afinitu k většině opioidních ligandů. Jedinými známými endogenními ligandy pro tento receptor jsou nociceptin/orfanin FQ a tak byl podle nich tento receptor označen jako receptor pro nociceptin/orfanin FQ (NOP).

2.5.3 Struktura a funkce OR

OR jsou nejhojnější v CNS, ale jejich přítomnost byla také prokázána v mnoha periferních tkáních savců. Jejich fyziologická role není přesně definovaná. Zmírnění bolesti zprostředkovávají všechny tři typy receptorů, avšak v různé míře. Rozlišujeme dva typy ligandů OR s ohledem na jejich chemické struktury: alkaloidy a peptidy (Janecka A. et al., 2004). Mezi alkaloidy můžeme zařadit morfin nebo naloxon, mezi typické opioidní peptidy pak enkefaliny, dynorfiny a β -endorfiny.

OR a endogenní opioidní peptidy tvoří neuromodulačním systém, který hraje důležitou roli při kontrole systému nociceptivních drah. Opioidní systém je nejen klíčovým prvkem vnímání bolesti, ale také ovlivňuje afektivní chování a neuroendokrinní funkce. Navíc ovládá autonomní funkce, jako je dýchání, krevní tlak, termoregulace a gastrointestinální motilita (Massotte D. et al., 2002).

OR patří do rhodopsinové rodiny GPCRs. Jsou shodné v přibližně 60 % sekvence aminokyselin. Nejvíce podobné jsou v tomto směru transmembránové α -helixy, nejvíce rozmanité pak jejich N- a C-konce a extracelulární smyčky (Chen Y. et al., 1993; Blake A. D. et al., 1996). Všechny čtyři typy OR mají dva konzervované cysteinové zbytky v ECL1 a ECL2, které pravděpodobně tvoří disulfidové můstky (Waldhoer M. et al., 2004). Jsou také N-glykosylovány na asparaginovém zbytku na různých místech N-koncové domény (Waldhoer M. et al., 2004). Krystalové struktury všech čtyř OR v konformacích s navázaným antagonistou, tedy v neaktivním stavu, byly publikovány před dvěma roky (Granier S. et al., 2012; Manglik A. et al., 2012; Thompson A. A. et al., 2012; Wu H. et al., 2012). V případě δ -OR se jednalo o strukturu s navázaným naltrindolem (Granier S. et al., 2012) (**Obrázek 6**).



Obrázek 6: Struktura δ -OR. (A) Typická struktura sedmi transmembránových α -helixů, která je společná všem GPCRs. (B), (C) Velmi konzervované oblasti společné δ -OR (oranžová barva), μ -OR (modrá barva), κ -OR (zelená barva). Převzato z práce (Granier S. et al., 2012) a upraveno.

OR vykazují různé farmakologické vlastnosti, ale všechny zprostředkovávají své buněčné efekty aktivací heterotrimerních G proteinů inhibičního typu (G_i , G_o nebo G_z), které inhibují adenylyl cyklázu (AC) což má za následek pokles produkce cAMP. OR, stejně jako mnoho dalších receptorů, které využívají G proteiny G_i/G_o pro přenos signálu, inhibují kromě AC i Ca^{2+} kanály, naopak stimuluje K^+ kanály a zvyšují hladinu intracelulárních Ca^{2+} iontů (Law P. Y. et al., 2004). V nedávné době bylo prokázáno, že OR také regulují MAP kinázové kaskády (Law P. Y. et al., 2004).

Krátkodobá inhibice aktivity AC iniciovaná OR a následné snížení hladiny intracelulárního cAMP byly studovány velmi intenzivně již v 70. letech (Sharma S. K. et al., 1975b; Sharma S. K. et al., 1977). Bylo zjištěno, že snížení intracelulární hladiny cAMP může vést ke kompenzačnímu posunu v syntéze, degradaci nebo aktivitě enzymu, který obnovuje normální hladinu cAMP. Buňka, potažmo organizmus, je pak závislá na droze, protože hladina cAMP je normální v její přítomnosti a abnormálně vysoká po jejím odnětí - počet molekul AC se zvyšuje, protože buňky se stávají závislé na droze (Sharma S. K. et al., 1975b). Toto také vede k toleranci, poněvadž při dané koncentraci drogy je množství neinhibovaného enzymu větší v drogu ovlivněných než v normálních buňkách (Sharma S. K. et al., 1975b).

Dlouhodobé působení opioidních agonistů má za následek tzv. superaktivaci AC (Tso P. H. a Wong Y. H., 2003; Zhao H. et al., 2006). Pokud totiž receptory procházejí dlouhodobou aktivací, dochází k postupné ztrátě její inhibice (desenzitizace receptoru). Desenzitizaci odpovědi GPCR můžeme popsat jako ztrátu biologické odpovědi (snížení odezvy na interakci agonisty s receptorovým vazebným místem, snížení citlivosti receptorů), která následuje po dlouhodobém nebo opakovaném podání agonisty (Kelly E. et al., 2008). Předpokládá se, že tento děj je počátečním impulzem pro rozvoj tolerance a závislosti na opioidech. Bylo také navrženo, že takováto regulace AC by mohla být obecným způsobem buněčné adaptace na aktivaci OR (Chakrabarti S. et al., 1997). Fenomén desenzitizace je klíčový pro pochopení dlouhodobého působení některých látek na organizmus, ať už se jedná o drogovou závislost či získání odolnosti vůči různým léčivům či cizorodým látkám obecně. Desenzitizace je ochranný mechanismus zabraňující nadměrnému dráždění buňky, které by mohlo ve svém konečném důsledku vést až k buněčné smrti. Buněčné mechanismy, které buňka vytváří za účelem snížení biologické odpovědi při opakovaném dráždění, probíhají jednak na úrovni receptorů, jednak na úrovni G proteinů (Pierce K. L. et al., 2002).

2.5.3.1 μ -opioidní receptory (μ -OR)

μ -OR představují hlavní cíl opioidů při léčbě bolesti, akutního plicního edému, kašle, průjmu a třesu (Manglik A. et al., 2012). Jejich aktivace potlačuje těžkou akutní bolest, jsou hlavním cílem pro pooperační léčbu bolesti a tlumení bolesti při rakovinových onemocněních. Zjištění, že analgetické a návykové vlastnosti morfinu vymizí u myší postrádajících μ -OR jednoznačně prokázala, že tyto receptory zprostředkovávají jak terapeutické tak i nežádoucí účinky této sloučeniny (Matthes H. W. et al., 1996). μ -OR

mají vysokou afinitu k enkefalinům a β -endorfinům a nízkou afinitu k dynorfinům. Prototypickým agonistou je morfin.

2.5.3.2 δ -opioidní receptory (δ -OR)

Endogenními ligandy δ -OR jsou enkefaliny. Agonisté δ -OR slabě zmírňují akutní bolesti. Mají potenciál pro léčbu chronických bolestí, emocionálních a neurologických poruch (Pradhan A. A. et al., 2011). Aktivita δ -OR ovlivňuje procesy závislosti na odměně a také návykového chování včetně touhy po droze, dále emocionální reakce, paměť a proces učení.

2.5.3.3 κ -opioidní receptory (κ -OR)

Aktivace κ -OR také vyvolává antinociceptivní účinky. Jejich primárním endogenním ligandem je dynorfin. Agonisté κ -OR jsou silně senzitivizující a potenciálně halucinogenní, což omezuje terapeutický potenciál v léčbě bolesti (Pradhan A. A. et al., 2011). Blokáda κ -OR může příznivě zmírnit reakce na stres, snížit touhu po droze a upravit depresivní stavy. Zdá se, že aktivace κ -OR antagonizuje mnohé účinky μ -OR (Pan Z. Z., 1998).

2.5.3.4 Receptor pro nociceptin/orfanin FQ (NOP)

NOP receptor (také známý jako ORL-1) sice sdílí vysokou sekvenční podobnost s klasickými OR (60 %), ale má výrazně odlišné farmakologické vlastnosti a unikátní selektivitu pro exogenní ligandy. Žádný z dříve identifikovaných klasických endogenních opioidů nemá významnou afinitu k NOP. Systém NOP hraje důležitou roli v kontrole centrálních a periferních funkcí, včetně bolesti, úzkosti a nálady, příjmu potravy, učení a paměti, lokomoce, kašle a mikčního reflexu, kardiovaskulární homeostázy, střevní motility a imunitní odpovědi (Lambert D. G., 2008).

2.6 Interakce monovalentních iontů s OR

Interakce monovalentních iontů se signální kaskádou iniciovanou OR byly studovány od počátku výzkumu zaměřeného na GPCRs. Již v roce 1974 se Pertová a Snyder (Pert C. B. a Snyder S. H., 1974) zabývali působením sodných iontů na vazbu agonisty a antagonisty k OR v membránách izolovaných z mozku krys. Zjistili, že vazba radioaktivně značených opioidních antagonistů, jako je naloxon, nalorfin a levallorfan, je

v přítomnosti sodných iontů zvýšena, zatímco vazba radioaktivně značených agonistů, jako je oxymorfon, dihydromorfin a levorfanol, je snížena. Dále prokázali, že je tento rozdílný účinek Na^+ vysoce specifický a je v menší míře vyvolán i Li^+ (jehož atomový poloměr a biologická aktivita jsou podobné Na^+). Další monovalentní kationty draslíku, rubidia a cesia, divalentní kationty a také anionty nebyly schopné rozlišovat mezi agonisty a antagonisty. Pertová a Snyder také vyslovili hypotézu, že sodné ionty allostericky mění vazebná místa OR z konformace, která váže snadněji agonistu, do konformace, která snadněji váže antagonistu.

Originální data Pertové a Snydera byla potvrzena a rozšířena studii membránových suspenzí připravených z mozku (bez mozečku) nebo jen mozečku morčat (Paterson S. J. et al., 1986). Cílem této práce bylo porovnat vliv čtyř monovalentních kationtů chloridů a to Na^+ , Li^+ , NH_4^+ a K^+ a tří divalentních kationtů chloridů a to Ca^{2+} , Mn^{2+} a Mg^{2+} na rovnovážnou vazbu radioaktivně značených opioidů k μ -OR, δ -OR a κ -OR. Bylo zjištěno, že NaCl, LiCl, NH_4Cl a KCl snižují při 25 °C rovnovážnou vazbu selektivního agonisty μ -OR [^3H]DAMGO, selektivního agonisty δ -OR [^3H]DPDPE a selektivního agonisty κ -OR [^3H]dynorfinu A s pořadím účinnosti $\text{NaCl} > \text{LiCl} > \text{NH}_4\text{Cl} \geq \text{KCl}$.

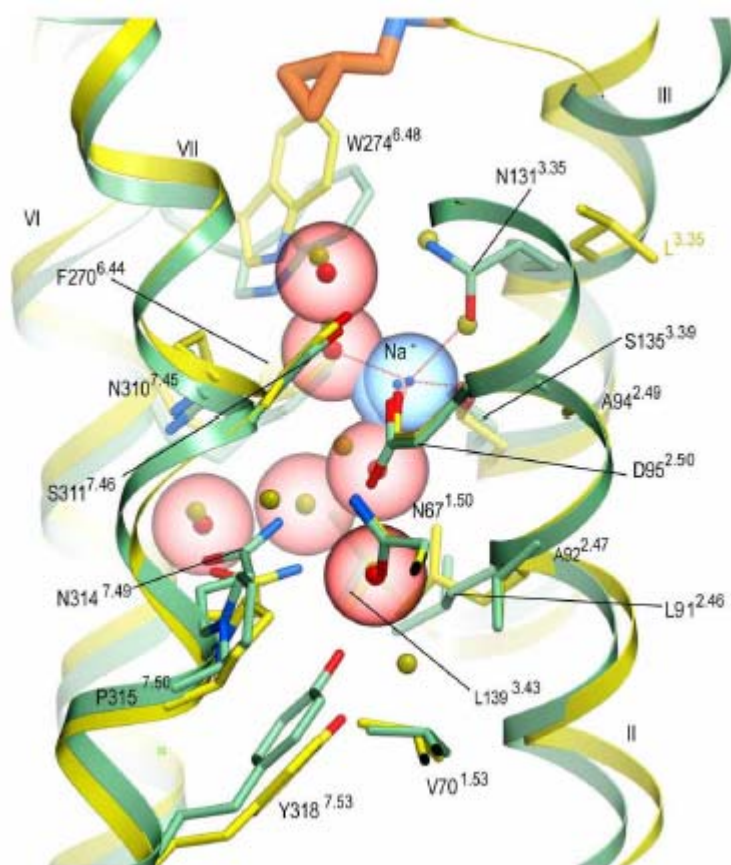
Rovněž v roce 1974 zjistili Klee a Nirenberg při práci s NG105-18 hybridní buněčnou linií, že morfin inhibuje aktivitu adenylyl cyklázy (AC) (Klee W. A. a Nirenberg M., 1974). Ve spolupráci s Shailem K. Sharmou navrhli, že OR jsou funkčně spojeny s AC a vyslovili hypotézu týkající se molekulárního mechanismu pro drogovou závislost a toleranci (Sharma S. K. et al., 1975a; Sharma S. K. et al., 1975b), jak bylo diskutováno v kapitole 2.5.3. Studie inhibice aktivity AC v buňkách NG108-15 vlivem opioidů rozšířil Blume (Blume A. J. et al., 1979) o poznatek, že jsou pro snížení aktivity AC vyžadovány Na^+ a GTP a později také Koski a Klee (Koski G. a Klee W. A., 1981), kteří zjistili, že opioidy inhibují AC tím, že stimulují hydrolyzu GTP a že oba tyto procesy, tedy jak inhibice AC, tak stimulace hydrolyzy GTP, vyžadují přítomnost Na^+ . Na^+ v přítomnosti Mg^{2+} snižuje aktivitu GTPázy v membránách izolovaných z NG108-15 a opioidy tuto inhibici pomocí Na^+ antagonizují (Koski G. et al., 1982).

Pozdější studie vzájemného působení mezi Na^+ a δ -OR, které používaly známou AK sekvenci δ -OR, označily konzervovanou asparagovou kyselinu v pozici 95 v TM2 jako kritickou pro regulaci vazby agonisty sodnými ionty (Kong H. et al., 1993b). Mutace v tomto místě snižuje vazbu agonisty (ale ne antagonisty) a ovlivňuje aktivaci G proteinu (Kong H. et al., 1993b; Surratt C. K. et al., 1994; Chakrabarti S. et al., 1997). Důležitost

Asp⁹⁵ pro vazbu Na⁺ byla prokázána cílenými mutacemi ("site-directed mutagenesis") (Horstman D. A. et al., 1990; Kong H. et al., 1993b; Ceresa B. P. a Limbird L. E., 1994).

Počítačové modelové studie 3D struktury δ -OR (Pogozheva I. D. et al., 1998) a dalších GPCRs (Lomize A. L. et al., 1999) dokazují, že tyto receptory obsahují 4 hlavní shluky/klastry ("clusters") polárních postranních řetězců, které vytvářejí rozsáhlou síť interhelikálních vodíkových vazeb. Klastry 1 a 2 jsou situovány uprostřed transmembránové domény a klastry 3 a 4 jsou blíže intracelulárnímu povrchu. Klastr 1 obsahuje dutinu, která může být vyplněna vodou nebo sodnými ionty spojenými s kyslíky postranních řetězců AK. V modelu δ -OR (Pogozheva I. D. et al., 1998) se Asp⁹⁵(TMII:14; pořadí aminokyseliny v transmembránovém helixu II) podílí na síti vodíkových vazeb spolu s polárními zbytky Asn¹³¹(TMIII:10), Ser¹³⁵(TMIII:14), Ser³¹¹(TMVII:14) a Asn³¹⁴(TMVII:17), které spolu s molekulami vody, mohou interagovat s ionty sodíku. Sodné ionty změňjí síť vodíkových vazeb. Je známo, že jsou výše uvedená rezidua zahrnuta v přenosu signálu. Molekuly vody spolu s aminokyselinovými postranními řetězci mohou vytvářet prodloužení přenosové sítě signálu od vazebného místa pro ligand na povrchu cytoplazmatické membrány (Angel T. E. et al., 2009a; Angel T. E. et al., 2009b)

Ačkoli již bylo pro mnoho GPCRs popsáno, že sodné ionty allostericky modulují afinitu ligandu k receptoru (Costa T. et al., 1990; Gao Z. G. a Ijzerman A. P., 2000), povaha tohoto allosterického efektu není známá, stejně tak není známá ani afinita sodných iontů k allosterickému vazebnému místu. Nejnovější studie struktury δ -OR s navázaným antagonistou (naltrindolem) odhalila základní roli sodných iontů ve zprostředkování allosterické kontroly nad funkční selektivitou receptoru a konstitutivní aktivitou (Fenalti G. et al., 2014). Ukázalo se, že sodné ionty stabilizují sníženou afinitu agonisty a proto modulují přenos signálu. Allosterická kapsa pro sodné ionty umístěná v samém jádru sedmi α -helixů popsaná ve Fenaltiho práci, může být potenciálním a velmi atraktivním cílem farmaceutického výzkumu. Tato kapsa je velmi konzervovaná (**Obrázek 7**), což ukázalo srovnání struktury δ -opioidního receptor (δ -OR) a adenosinového receptor A_{2A} (A_{2A}AR). Sodné ionty v ní interagují s pěti kyslíkovými atomy, tři poskytují postranní řetězce Asp⁹⁵, Ser¹³⁵ a Asn¹³¹ a dva pocházejí od molekul vody.



Obrázek 7: Allosterická vazebná kapsa GPCRs vázající sodné ionty a vodu. Zelená barva představuje δ -opioidní receptor (δ -OR) a žlutá barva adenosinový receptor A_{2A} ($A_{2A}AR$). Molekuly vody δ -OR jsou označeny červeně, zatímco molekuly vody $A_{2A}AR$ žlutě. Sodné ionty jsou v obou strukturách vyznačeny modře s červenými tečkovanými čarami od Na^+ k 5 kyslíkovým atomům, se kterými sodné ionty interagují v případě δ -OR. Část ligandu naltrindolu je vidět v horní části obrázku (oranžová barva). Toto srovnání odhalilo identické postranní řetězce a podobné konformace v 15 pozicích kapsy. Převzato z práce (Fenalti G. et al., 2014) a upraveno.

3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem první části předkládané dizertační práce je studovat změny v signální dráze opioidních receptorů vyvolané dlouhodobým působením morfinu ve frontální mozkové kůře potkanů. V souvislosti s dlouhodobým působením morfinu je také studován klíčový fyziologický mechanismus, kterým je snižována konstitutivní aktivita receptorů, tj. inhibiční působení sodných iontů na vazebné místo δ -opioidního receptoru.

Cílem druhé části dizertační práce je pokračovat ve studiu účinků sodných ale i dalších monovalentních iontů: analyzovat účinek různých monovalentních iontů na δ -opioidní receptor i na jeho funkční spřažení s trimerními G proteiny inhibičního typu na stabilně transfekované buněčné linii HEK293 exprimující fúzní protein mezi δ -opioidním receptorem a G proteinem. Také jsou zjišťovány rozdíly mezi jednotlivými ionty při interakci s polárním rozhraním membrána-voda a hydrofóbním vnitřkem membránové lipidové dvojvrstvy.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Aktivita G proteinů ve frontální mozkové kůře potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu

Publikace I

Po mnoho let několik laboratoří zaměřuje své úsilí na objasnění molekulárních a buněčných základů drogové závislosti. Tyto studie mohou být rozděleny do dvou skupin podle navrženého mechanismu působení drogy: 1) homeostatický model, podle kterého droga narušuje buněčnou homeostázu a její účinky jsou kompenzovány aktivací drah, které produkují opačný účinek a tak homeostázu obnovují, 2) desenzitizační model, podle kterého dochází ke změně vzájemného působení mezi drogou a receptorem a tato změna činí receptor méně citlivým k droze - dochází k fenoménu zvanému desenzitizace účinku aktivní látky na úrovni receptoru (schopnost receptoru převádět signál k dalším členům signální kaskády je inaktivována) (Law P. Y. et al., 2004). Homeostatický model zahrnuje změny v koncentracích makromolekul (tzn., že zahrnuje syntézu nových molekul proteinů), zatímco model změny interakce mezi drogou a receptorem nikoliv (Law P. Y. et al., 2004).

Cílem *Publikace I* bylo porovnat opioidy stimulovanou aktivitu G proteinů v plazmatických membránách (PM) izolovaných s využitím Percollového gradientu z frontální mozkové kůry kontrolních a morfinem ovlivněných potkanů. Dospělým samcům potkanů kmene Wistar (90 denní, 160-180 g) byl dávkován intramuskulárně morfin podle následujícího postupu: 10 mg/kg (1.-2. den), 15 mg/kg (3.-4. den), 20 mg/kg (5.-6. den), 30 mg/kg (7.-8. den), 40 mg/kg (9. den) a 50 mg/kg (10. den). Zvířata byla usmrcena 24 hodin po podání poslední dávky. Ve vzorcích PM byla měřena bazální a agonistou stimulovaná vysokoafinní aktivita GTPázy a agonistou stimulovaná vazba [³⁵S]GTP γ S. Bylo nutné navrhnout vlastní metodologický postup, jak se vyrovnat s vysokou bazální aktivitou G proteinů v mozku. Funkční studie aktivity G proteinů byly dále následovány analýzou obsahu G proteinů v PM technikou imunoblot (Western Blot) s využitím SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS)). Biochemické studie byly doplněny analýzou behaviorálních efektů morfinu v *in vivo* podmínkách.

4.1.1 Stanovení agonistou stimulované vysokoafinní aktivity GTPázy

Aktivita GTPázy byla určena měřením radioaktivity anorganického fosfátu $^{32}\text{P}_i$ uvolněného z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ tak, jak je popsáno v literatuře (Fong C. W. et al., 1998; Fong C. W. a Milligan G., 1999; Bourova L. et al., 2003; Stohr J. et al., 2004). Metoda je založena na hydrolýze GTP na anorganický fosfát P_i a GDP, tedy na reakci katalyzované GTPázou. Jako substrát pro tuto reakci se používá radioaktivně značený analog GTP - $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$. Vzniklý $^{32}\text{P}_i$ je odseparován od zbytku nehydrolyzovaného $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ je zachyceno pomocí aktivního uhlí a následně odděleno pomocí centrifugace) a pak může být jednoduše kvantifikován metodou kapalínové scintigrafie. Množství uvolněného $^{32}\text{P}_i$ je přímo úměrné aktivitě GTPázy.

Porovnávali jsme schopnost různých agonistů GPCRs stimulovat vysokoafinní aktivitu GTPázy ve vzorcích PM izolovaných z kontrolních potkanů. Konkrétně byl použit baklofen (agonista GABA_B receptoru - $\text{GABA}_B\text{-R}$), somatostatin (agonista somatostatinového receptoru - SST-R), karcholol (agonista muskarinového acetylcholinového receptoru - mACh-R), isoprenalin (agonista β -adrenergního receptoru - $\beta\text{-AR}$), DADLE ((2-D-alanin-5-D-leucin)-enkefalin = Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu; agonista δ -opioidního receptoru - $\delta\text{-OR}$) a DAMGO ((2-D-alanin-4-methylfenylalanin-5-glycinol)-enkefalin = Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol; agonista μ -opioidního receptoru - $\mu\text{-OR}$).

Výsledky ukázaly, že baklofen byl jediným agonistou schopným signifikantně zvyšovat bazální aktivitu GTPázy. Vliv dalších agonistů nebyl statisticky významný. Tzn., že za standardních podmínek měření aktivity GTPázy nebyla tato aktivita stimulovaná OR měřitelná. Naše výsledky jsou v souladu s měřením uvedeným v Odagakiho práci (Odagaki Y. et al., 1998). Závěrem lze tedy konstatovat, že tato metoda není dostačující pro porovnání stimulace vysokoafinní GTPázy mezi různými GPCRs.

4.1.2 Stanovení agonistou stimulované vazby $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$

Cílem měření vazby $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ve vzorcích PM izolovaných z kontrolních potkanů bylo vylepšit metodologické podmínky pro jasnější stanovení agonistou stimulované aktivity G proteinů. Proces výměny nukleotidu totiž může být sledován také měřením vazby $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (Milligan G., 2003). Jedná se o látku odvozenou od GTP, která je odolná vůči aktivitě GTPázy $\text{G}\alpha$, která slouží k zajištění kinetického omezení doby trvání signálu. GDP/GTP výměna nastává v počáteční fázi signální kaskády a je tedy

vhodným procesem k měření aktivity G proteinů, protože je méně náchylná k zesílení nebo regulaci ze strany jiných buněčných procesů.

Vazba [³⁵S]GTPγS stimulovaná agonistou GABA_B-R baklofenem a agonistou μ-OR DAMGO byla měřena v přítomnosti rostoucí koncentrace GDP. Vysoká bazální aktivita G proteinů, se kterou jsme se potýkali v případě měření vysokoafinní aktivity GTPázy byla v případě měření vazby [³⁵S]GTPγS potlačena přebytkem GDP (optimální koncentrace 20-50 μM). GDP ovšem působí v takto vysokých koncentracích jako kompetitivní inhibiční činidlo a je proto nutné přidávat vysoké koncentrace agonistů.

Za těchto podmínek byly změřeny křivky závislosti odpovědi (vazby) na koncentraci baklofenu a agonistů OR v PM izolovaných z kontrolních potkanů a dále bylo provedeno srovnání s PM izolovanými stejným způsobem z potkanů vystavených působení morfinu. Výsledky naznačují stejné pořadí účinnosti agonistů u kontrolních i morfinem ovlivněných potkanů: baklofen > DADLE > DAMGO > U-69593 ((5α, 7α, 8β)-(-)-N-methyl-N-(7-(1-pyrrodinyl)-1-oxaspiro(4,5)dec-8-yl) benzenacetamid; agonista κ-opioidního receptoru - κ-OR). Statisticky významný pokles vazby [³⁵S]GTPγS stimulované DADLE a DAMGO (desenzitizace odpovědi μ- a δ-OR) byl zaznamenán u potkanů ovlivněných morfinem ve srovnání s kontrolními zvířaty.

4.1.3 Porovnání obsahu G proteinů v plazmatických membránách

Stanovení aktivity G proteinů bylo doplněno analýzou obsahu G proteinů ve stejných vzorcích izolovaných PM jako v případě měření vazby [³⁵S]GTPγS. Byla použita technika imunoblot. V prvním kroku dojde pomocí SDS-PAGE k rozdělení směsi proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Z polyakrylamidového gelu jsou proteiny přeneseny pomocí elektrického proudu na nitrocelulóзовou membránu (blotování), kde jsou fixovány. K detekci byly použity specifické protilátky (metoda chemiluminiscence, ECL).

Hladina hlavních G proteinů spojených s OR, tedy G_i1α a G_i2α, zjištěná u kontrolních potkanů se po aplikaci morfinu nijak nezměnila. Tyto výsledky byly považovány za další důkaz podporující desenzitizační mechanismus působení morfinu. Změna nenastala ani u G_sα a G_q/G₁₁. Mírný nárůst hladiny G_i3α a pokles G_zα byl zaznamenán u potkanů vystavených morfinu.

4.1.4 Behaviorální studie

Jeden den po aplikaci poslední dávky morfinu byla stanovena tolerance k následné dávce drogy pomocí 2 testů: testu reakce při dotyku s horkou deskou ("hot-plate test") a testu latence odtažení zadních končetin v reakci na mechanickou stimulaci ("hind paw withdrawal test"). Tolerancí rozumíme potřebu zvyšovat dávku k dosažení stejného účinku jako dříve, protože organismus reaguje postupně na původně účinnou dávku méně. Fyziologická adaptace organismu na přítomnost drogy ("dependence"), provázená vývojem tolerance a manifestovaná syndromem z odnětí (abstinenčním syndromem) byla testována po podání intraperitoneální dávky naloxonu a u všech zvířat ovlivněných morfinem se potvrdilo rozvinutí abstinenčního syndromu. Výsledky všech testů prokázaly, že se u potkanů během deseti dnů podávání morfinu vyvinula drogová tolerance a fyziologická adaptace.

4.1.5 Závěr *Publikace I*

Desenzitizace aktivity G proteinů stimulované μ - a δ -OR ve frontální mozkové kůře potkanů ovlivněných morfinem je překvapivá, protože předchozí práce studující tuto část mozku nenaznačovaly žádný rozdíl (Sim L. J. et al., 1996). Podobná data byla také publikována pro heroin (Sim-Selley L. J. et al., 2000; Maher C. E. et al., 2005). Předchozí analýzy distribuce μ -, δ - a κ -OR a aktivity G proteinů v mozku hlodavců spolu s výsledky potvrzujícími, že analgetické a návykové vlastnosti morfinu vymizely u myší postrádajících μ -OR dokládají, že terapeutické i opačné nepříznivé účinky této sloučeniny zprostředkovávají μ -OR (Matthes H. W. et al., 1996; Kieffer B. L., 1999; Contet C. et al., 2004). Stanovili jsme pořadí účinnosti agonistů opioidních receptorů DADLE (δ -OR) > DAMGO (μ -OR) > U-69593 (κ -OR) ve smyslu snížení aktivity G proteinů a zjistili jsme, že dochází k desenzitizaci odpovědi na aktivaci zprostředkovanou δ -OR na úrovni G proteinů. Naše výsledky, získané při práci s potkany vystavenými působení morfinu, přinášejí nové důkazy, které nebyly dosud publikovány. Zároveň jsou naše zjištění ve shodě s nálezy potvrzujícími relativně vysokou hustotu δ -OR v předním mozku dospělých potkanů (Kornblum H. I. et al., 1987; Ko M. C. et al., 2003) a s malou funkční významností kaskády iniciované κ -OR v této části CNS (Maurer R., 1982).

4.2 Vliv sodných iontů na vazebné parametry δ -OR v plazmatických membránách izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu

Publikace II

Up-regulace (nebo také hypersenzitizace, superaktivace) enzymové aktivity adenylyl cyklázy (AC) byla prokázána v předchozích studiích mechanismu působení morfinu, který představuje neselektivního agonistu OR (Sharma S. K. et al., 1975a; Sharma S. K. et al., 1975b; Attali B. a Vogel Z., 1989; Avidor-Reiss T. et al., 1995; Avidor-Reiss T. et al., 1996; Ammer H. a Schulz R., 1997, 1998; Whistler J. L. a von Zastrow M., 1998; Whistler J. L. et al., 1999; Bayewitch M. L. et al., 2000; Ammer H. a Christ T. E., 2002; Tso P. H. a Wong Y. H., 2003; Law P. Y. et al., 2004; Schallmach E. et al., 2006). Tyto výsledky ovšem nebyly doposud doplněny detailní analýzou jednotlivých podtypů AC v PM izolovaných z frontální mozkové kůry. Navíc pokusy vysvětlit molekulární mechanismus nárůstu aktivity AC po dlouhodobé adaptaci na morfin zatím nevyplývaly v obecně přijímanou interpretaci, protože byly získány různé, dokonce i protichůdné výsledky (Sim L. J. et al., 1996; Ammer H. a Schulz R., 1997, 1998; Whistler J. L. a von Zastrow M., 1998; Sim-Selley L. J. et al., 2000; Law P. Y. et al., 2004; He L. a Whistler J. L., 2007).

AC je regulována trimerními G proteiny, takže změně aktivity AC by měla předcházet změna aktivity trimerních G proteinů. Adenylyl cyklázy I a II (ACI a ACII) se v mozku hojně vyskytují a zároveň jsou důležitými fyziologickými enzymy signálních kaskád závislých na cAMP (Hanoune J. a Defer N., 2001; Patel T. B. et al., 2001; Sunahara R. K. a Taussig R., 2002; Sanabra C. a Mengod G., 2011).

Dříve uvedené analýzy AC prováděné při studiu drogově závislých stavů byly přednostně zaměřeny jen na funkční testy a ne na kvantitativní stanovení různých izoform tohoto enzymu v PM. Současné histochemické analýzy přitom dokazují, že hladiny exprese ACI a ACII v mozkové kůře jsou vysoké (Sanabra C. a Mengod G., 2011).

Cílem **Publikace II** bylo analyzovat obsah všech typů AC (ACI-ACIX) v PM izolovaných pomocí Percollového gradientu z frontální mozkové kůry kontrolních

a morfinem ovlivněných potkanů. Dospělým samcům potkanů kmene Wistar (90 denní, 160-180 g) byl dávkován intramuskulárně morfin podle stejného postupu jako v **Publikaci I** uvedeného výše. Zvířata byla rozdělena do několika skupin. Kontrolní a morfinem ovlivněná zvířata byla usmrcena buď po 24 hodinách po poslední dávce morfinu (skupiny -M10; +M10), nebo po 20 dnech po poslední dávce morfinu (skupiny -M10/-M20; +M10/-M20). Nezávislá skupina zvířat pak byla vystavena působení jednorázové dávky morfinu 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg a poté usmrcena po 24 hodinách (skupina +M1) a opět byla v této kategorii i kontrolní skupina (skupina -M1). Skupina vystavená akutnímu působení morfinu poskytla nezávislý soubor dat o hladině AC, která pak mohla být porovnána s daty získanými pro skupinu +M10. Zjišťovali jsme obsah všech známých typů AC (ACI-ACIX) ve vzorcích PM. Kvantitativní stanovení AC bylo provedeno pomocí imunoblotu. Byly stanoveny i hladiny dalších proteinů PM - Na, K-ATPázy, podjednotek trimerních G proteinů a kaveolinu-1. Aktivita AC byla stanovena měřením radioaktivně značeného cyklického AMP ($[^{32}\text{P}]$ cAMP, produkt enzymové reakce). Maximální katalytická aktivita AC byla stanovena pomocí forskolinu. Výsledky byly rozšířeny charakterizací δ -OR saturačními vazebnými studii s agonisty δ -OR $[^3\text{H}]$ DADLE a $[^3\text{H}]$ DPDPE a stanovením citlivosti δ -OR k inhibičnímu účinku sodných iontů Na^+ .

4.2.1 Obsah adenylyl cyklázy I a II v plazmatických membránách

Množství ACI a ACII a dalších podtypů AC bylo nejprve srovnáno ve vzorcích PM izolovaných z kontrolních a morfinem ovlivněných potkanů (skupiny -M10 a +M10). Membrány izolované z +M10 vykazovaly 8 krát vyšší obsah ACI než membrány izolované z -M10. Stejná analýza byla provedena i pro ACII, zde byl zjištěn dvojnásobný nárůst u +M10 v porovnání s -M10. V obou případech byl rozdíl mezi oběma skupinami statisticky významný. Tento nárůst hladin ACI a ACII nebyl ovšem pozorován u skupiny +M10/-M20. Tyto vzorky vykazovaly stejnou hladinu ACI a ACII jako odpovídající kontroly (-M10/-M20). Nárůst ACI a ACII představuje specifický účinek, protože hladiny ACIII-IX zůstaly nezměněné. Krátkodobé působení morfinu ve skupině +M1 nemělo vliv na obsah ACI ani ACII v PM. Nárůst ACI a ACII pozorovaný po desetidenním postupném dávkování proto nepředstavuje akutní účinek, ale může být považován za vliv dlouhodobého působení morfinu.

4.2.2 Stanovení obsahu Na, K-ATPázy, α - a β -podjednotek G proteinů a kaveolinu-1 v plazmatických membránách

Ve stejných vzorcích byl stanoven specifický obsah Na, K-ATPázy jako negativního standardu a prototypického markeru PM, který by neměl být ovlivněn působením morfinu. Byla provedena kvantitativní analýza pomocí metody imunoblot a také změřena vazba selektivního inhibitoru Na, K-ATPázy [^3H]ouabainu. Hladiny exprese Na, K-ATPázy se po desetidenním působení morfinu nezměnily a maximální vazebná kapacita B_{max} a disociační konstanta K_d [^3H]ouabainu také ne.

Důvodem, proč byla provedena i analýza obsahu G proteinů ve stejných PM jako při měření obsahu ACI-IX a Na, K-ATPázy, bylo to, že změna funkční aktivity signálních molekul nemusí nutně znamenat změnu v jejich hladinách exprese nebo obsahu v PM. Získané výsledky mohou být považovány za další podporu pro desenzitizační mechanismus působení morfinu, protože nedošlo ke snížení počtu (down-regulaci) G proteinů. Kaveolin-1 byl stanovován jako marker membránových domén. Jeho obsah v PM se rovněž nezměnil.

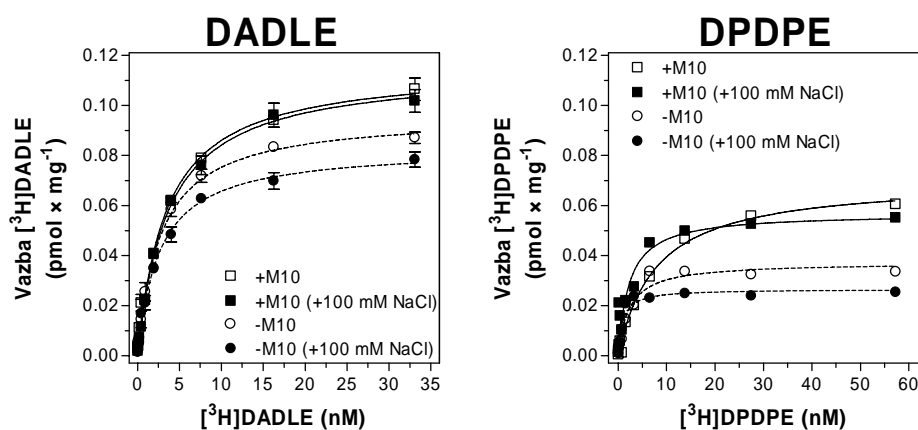
4.2.3 Stanovení aktivity adenylyl cyklázy

Aktivita AC byla měřena pomocí radioaktivně značeného cyklického AMP ($[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$), které je uvolněno z $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. K separaci $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ byla použita chromatografická kolona plněná aluminou.

Inhibiční účinek agonisty μ -OR DAMGO a agonisty δ -OR DADLE byl prokázán u kontrolních zvířat (skupina -M10), ale nebylo tomu tak u zvířat ovlivněných morfinem (skupina +M10). Tento výsledek byl zjištěn jak pro bazální tak i forskolinem (aktivuje přímo AC a tak zvyšuje hladinu cAMP) stimulovanou aktivitu AC a podporuje naše dříve publikované výsledky (**Publikace I**) i výsledky dalších skupin (Mitchell F. M. et al., 1989; Sim L. J. et al., 1996; Sim-Selley L. J. et al., 2000; Maher C. E. et al., 2005), které popisují desenzitizaci odpovědi G proteinu po stimulaci pomocí opioidů při zkoumání stavů drogové závislosti. Zároveň jsou ve shodě se zjištěním Whistlerové a členů jejího týmu (He L. a Whistler J. L., 2007), že chronické působení morfinu má za následek významné utlumení inhibice aktivity AC způsobené agonistou μ -OR DAMGO.

4.2.4 Stanovení počtu δ -OR

Rozsah odpovědi G proteinu vyvolané μ -, δ - a κ -OR v mozkové kůře a thalamu opic byl přímo úměrný obsahu odpovídajících receptorů (Ko M. C. et al., 2003). Protože byly tyto studie zaměřeny zejména na μ -OR (Selley D. E. et al., 1998; Sim-Selley L. J. et al., 1999; Maher C. E. et al., 2000), rozhodli jsme se stanovit obsah δ -OR. K charakterizaci δ -OR byly použity saturační vazebné studie s jeho agonisty [3 H]DADLE a [3 H]DPDPE (**Obrázek 8**). Rozdíl mezi těmito dvěma agonisty je takový, že [3 H]DPDPE má vyšší specifitu pro δ -OR, zatímco DADLE se kromě δ -OR váže i k μ_1 -OR (jeden z podtypů μ -OR). Maximální počet vazebných míst byl proto vyšší v případě vazby [3 H]DADLE.



Obrázek 8: Vazebné charakteristiky agonistů δ -OR. Saturační vazebné křivky [3 H]DADLE (vlevo) a [3 H]DPDPE (vpravo) byly měřeny ve vzorcích PM izolovaných z kontrolních (-M10; \circ , \bullet) a morfinem ovlivněných potkanů (+M10; \square , \blacksquare); v nepřítomnosti (\circ , \square), nebo přítomnosti 100 mM NaCl (+100 mM NaCl; \bullet , \blacksquare). Data představují průměr ze tří pokusů provedených v triplicátech (průměr \pm SEM).

Jak je patrné z **Obrázku 8**, tak v případě saturační křivky [3 H]DADLE byl maximální počet vazebných míst stanovený ve vzorcích PM izolovaných z potkanů ovlivněných morfinem vyšší než u kontrolních zvířat. Stejně tomu bylo i v případě [3 H]DPDPE. 100 mM NaCl neměl překvapivě vliv na vazbu obou agonistů u skupiny +M10. V jeho přítomnosti, jak se dalo očekávat, byla snížena vazba u skupiny -M10, protože sodné ionty působí jako účinné inhibitory vazby agonisty k mnohým GPCRs včetně OR. Nízká citlivost δ -OR k inhibičnímu účinku NaCl u skupiny +M10 může být interpretována jako narušení rovnováhy mezi aktivním a neaktivním stavem receptoru.

V případě vazby [³H]DADLE se hodnoty K_d (rovnovážná disociační konstanta) pro -M10 a +M10 před a po přidání 100 mM NaCl významně nelišily. V případě vazby [³H]DPDPE byly hodnoty K_d v přítomnosti 100 mM NaCl mírně sníženy u -M10 i +M10.

4.2.5 Závěr *Publikace II*

Dramatický nárůst obsahu ACI a ACII popsany v této práci byl podpořen dalšími výsledky, dokazujícími specifitu tohoto nárůstu, protože ostatní izoformy AC (ACIII-IX) byly nezměněny a nárůst nebyl zjištěn v PM izolovaných z potkanů dlouhodobě vystavených jednorázové dávce morfinu. Stanovení aktivity AC v PM izolovaných z potkanů ovlivněných morfinem znamená, že inhibiční účinek opioidních agonistů, jasně prokázaný v kontrolních zvířatech, není přítomný u potkanů vystavených působení morfinu. Stejný výsledek byl získán i pro bazální a forskolinem stimulovanou aktivitu AC. Desenzitizace odpovědi G proteinu slouží jako impulz pro kompenzační odpověď - dochází k proteosyntéze vedoucí ke specifickému nárůstu ACI a ACII u morfinem ovlivněných zvířat. Po odnětí drogy na dobu 20 dnů se hladiny AC vrací do normálu.

Data publikovaná v této práci jsou v souladu s výše uvedenými teoriemi mechanismu drogové závislosti (Law P. Y. et al., 2004). Homeostatický mechanismus a aktivace specifických proteosyntetických cest jsou evidentně odpovědné za nárůst obsahu ACI a ACII v PM. Pokles odpovědi G proteinu po stimulaci OR stanovený ve stejném typu membrán (*Publikace I*) může být považován za součást desenzitizačního mechanismu působení morfinu.

Nárůst hladin ACI a ACII musí být uvažován spolu s nezměněnou hladinou ostatních typů AC a markerů PM Na, K-ATPázy, podjednotek trimerních G proteinů a kaveolinu-1. Nezměněné hladiny těchto proteinů totiž přinášejí silný důkaz pro specifitu dlouhodobého vlivu morfinu na ACI a ACII.

Dlouhodobé působení morfinu má také za následek zvýšení počtu δ -opioidních receptorů a změnu jejich citlivost vůči sodným iontům.

4.3 Inhibice signalizace δ -OR monovalentními ionty **v δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293**

Publikace III

Autoři několika publikací uvedli, že μ -, δ - and κ -OR mohou aktivovat G_i/G_o proteiny se stejnou účinností (Offermanns S. et al., 1991; Roerig S. C. et al., 1992; Prather P. L. et al., 1994a; Prather P. L. et al., 1994b; Chakrabarti S. et al., 1995; Prather P. L. et al., 1995; Quinones-Jenab V. et al., 1997). Každý z OR tedy může interagovat s 5 různými formami G_i/G_o proteinů (G_i1 α , G_i2 α , G_i3 α , G_o1 α , G_o2 α) (Tso P. H. a Wong Y. H., 2003). OR specificky regulují různé třídy efektorů a tak vzniká velmi složitá signalizační síť. Buňky HEK 293 (lidské embryonální buňky z ledvin, "human embryonic kidney cells"), které stabilně exprimují fúzní protein mezi OR a α -podjednotkou G proteinu, představují užitečný model pro porovnání účinnosti vazby daných typů G proteinu se stejným receptorem. V naší práci jsme použili stabilně transferovanou linii buněk HEK293, která exprimuje fúzní bílkovinu mezi δ -OR a G proteinem rezistentním vůči PTX G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, za účelem získat informace o vazbě mezi definovaným typem OR a definovaným typem G proteinu. To, že je δ -OR v této molekule spojen kovalentní vazbou s G_i1 α , zajišťuje přesnou a známou stechiometrii 1:1 mezi receptorem a G proteinem. Tato okolnost je velmi výhodná z následujících důvodů:

- v přirozených tkáních je daný typ receptoru funkčně propojen s celou řadou G proteinů, takže konečný výsledek nelze předem odhadnout, a to nejen kvantitativně, ale i kvalitativně, tj. ve smyslu inhibičního nebo aktivačního působení na následující stupně signální kaskády;

- funkční spřažení rovněž závisí na kvantitativním poměru mezi daným receptorem a daným typem G proteinu, tj. na míře exprese těchto bílkovin v buněčné membráně. Zvýšená exprese receptoru vede ke snížení specifity při interakci mezi receptorem a G proteiny - dochází k aktivaci jiných G proteinů, které za standardních podmínek aktivovány nejsou.

Konečný výsledek stimulace daného receptoru je proto obtížné, a v řadě případů i nemožné, předem odhadnout. Taková situace je zvláště významná v nervové tkáni (mozku), jak bylo uvedeno výše.

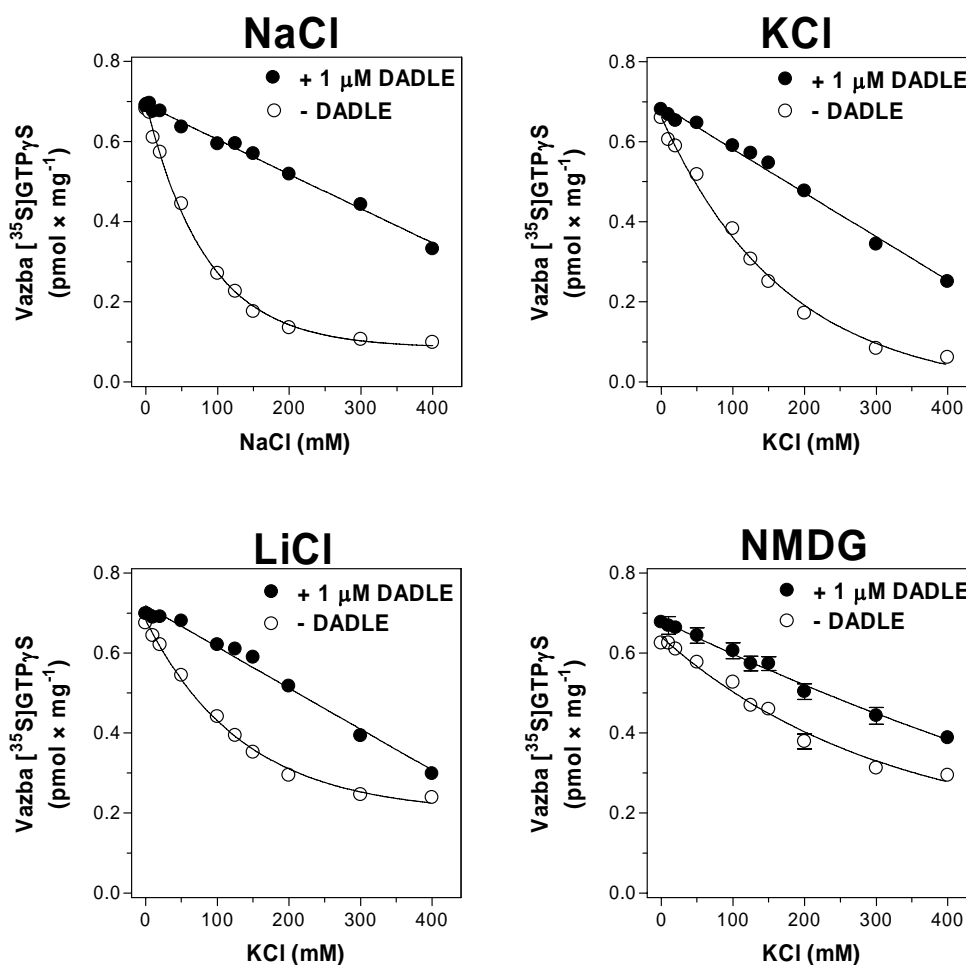
Monovalentní ionty podstatně ovlivňují odpověď trimerních G proteinů iniciovanou GPCR (Gierschik P. et al., 1989; Gierschik P. et al., 1991; Seifert R., 2001; Schnell D. a Seifert R., 2010). Mnoho předchozích studií zabývajících se vlivem agonistů OR na G_i/G_o proteiny bylo prováděno v přítomnosti 100 mM koncentrace NaCl (Mullaney I. et al., 1996; Burford N. T. et al., 2000; Moon H. E. et al., 2001a; Moon H. E. et al., 2001b; Massotte D. et al., 2002; Bourova L. et al., 2003). Za takových podmínek není možné stanovit bazální aktivitu G proteinů, jejich citlivost k sodným a dalším monovalentním iontům a účinek agonistů OR při různých koncentracích těchto iontů.

V **Publikaci III** jsme analyzovali vliv rostoucí koncentrace (0 - 400 mM) monovalentních kationtů Na^+ , K^+ , Li^+ (NaCl, KCl, LiCl) na bazální a agonistou δ -OR DADLE stimulovanou vazbu [^{35}S]GTP γ S a vliv Na^+ na vazebné parametry tohoto agonisty k δ -OR. Pokusy byly prováděny v membránách izolovaných z buněk δ -OR- $G_{i1\alpha}$ -(Cys 351 -Ile 351)-HEK293 podle metody Moonové (Moon H. E. et al., 2001a) označených jako P2 membrány. Buňky byly vystaveny působení pertussis toxinu (PTX), který zablokoval endogenně exprimované G proteiny G_i/G_o rodiny. Pokud studujeme vliv NaCl na konstitutivní aktivitu GPCR, je důležité otestovat také příslušné kontrolní soli KCl, LiCl a např. cholinchlorid (v našem případě N-methyl-D-glukamin (NMDG), organický polární monovalentní iont – data pro NMDG nejsou součástí **Publikace III**), abychom vyloučili, že je účinek NaCl způsoben změnami iontové síly nebo Cl^- (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002).

4.3.1 Stanovení agonistou stimulované vazby [^{35}S]GTP γ S

Bazální a agonistou δ -OR DADLE stimulovaná vysokoafinní vazba [^{35}S]GTP γ S byla měřena nejprve v médiu neobsahujícím žádné ze studovaných iontů a poté byla použita rostoucí koncentrace NaCl, KCl, LiCl a NMDG. Získaná data poukazují na vysokou citlivost vazby k inhibici NaCl v nepřítomnosti agonisty (**Obrázek 9**). První statisticky významný pokles vazby [^{35}S]GTP γ S byl změřen již při 1 mM koncentraci. Nárůst koncentrace nad 200 mM měl již jen malý vliv, což naznačuje, že nesespecifický vliv iontové síly na aktivitu G proteinu nehrál významnou roli. Profil účinku NaCl se dramaticky změnil po přidání agonisty. Z exponenciálního poklesu vazby pro případ bez agonisty se stala přímá inhibiční křivka klesající spojitě od 0 do 400 mM koncentrace. Rozdíl mezi agonistou stimulovanou a bazální vazbou (Δ , net increment) prudce stoupal

s rostoucí koncentrací NaCl až do 100 mM. Vliv KCl, LiCl a NMDG byl menší, net increment klesal v pořadí $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{NMDG}^+$.



Obrázek 9: Vliv rostoucí koncentrace monovalentních kationtů na bazální a agonistou stimulovanou vazbu $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v P2 membránách izolovaných z buněk $\delta\text{-OR-G}_i1\alpha\text{-(Cys}^{351}\text{-Ile}^{351})\text{-HEK293}$ ovlivněných PTX. Vysokoafinní vazba $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ byla měřena v přítomnosti (+1 μM DADLE, ●) nebo nepřítomnosti (-DADLE, ○) agonisty. Byla použita rostoucí koncentrace NaCl, KCl, LiCl a NMDG (0-400 mM). Data představují průměr ze tří pokusů provedených v triplicátech (průměr \pm SEM).

4.3.2 Vazba agonisty $[^3\text{H}]\text{DADLE}$

Inhibiční účinek sodných iontů na vazebné parametry agonisty $\delta\text{-OR}$ DADLE byl testován v druhé části této publikace. Při 200 mM koncentraci NaCl představovala maximální vazebná kapacita (B_{max}) $[^3\text{H}]\text{DADLE}$ 67 % B_{max} stanovené v nepřítomnosti NaCl.

4.3.3 Závěr *Publikace III*

V rámci této práce byla provedena analýza vlivu monovalentních kationtů na funkční spojení mezi δ -OR a $G_i1\alpha$. Výsledkem bylo potvrzení již dříve známých výsledků o nezaměnitelném významu sodných iontů a současně důkaz, že fúzní protein δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) vykazuje z tohoto hlediska podobné vlastnosti jako δ -OR v přirozené tkáni: 1) sodné ionty vykazovaly nejvyšší schopnost inhibovat aktivitu G proteinu v nepřítomnosti agonisty δ -OR, 2) maximální přírůstek vazby [³⁵S]GTP γ S byl prokázán v přítomnosti sodných iontů, 3) sodné ionty snižují vazbu specifického agonisty [³H]DADLE.

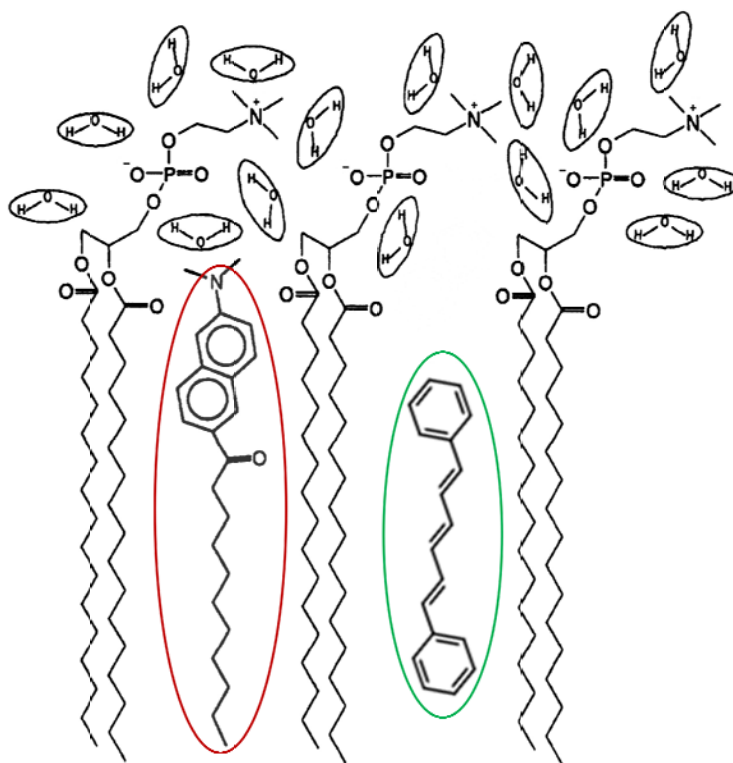
Význam sodných iontů spočívá v tom, že mají podobný účinek jako inverzní agonisté - posunují rovnováhu mezi aktivní a neaktivní konformací receptoru směrem k neaktivní konformaci (Mullaney I. et al., 1996; Burford N. T. et al., 2000; Moon H. E. et al., 2001a; Moon H. E. et al., 2001b; Massotte D. et al., 2002; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Tím dochází ke snížení schopnosti neobsazeného receptoru aktivovat G protein a snížení bazální vazby [³⁵S]GTP γ S. Za těchto podmínek lze dobře sledovat aktivaci G proteinu, protože bazální aktivita v nepřítomnosti agonisty je velmi nízká.

4.4 Vysokoafinní a nízkoafinní místa pro Na⁺ **v δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, korelace** **s biofyzikálním stavem plazmatické membrány**

Publikace IV

Cílem *Publikace IV* bylo rozšířit poznatky o monovalentních iontech uvedené v *Publikaci III* za účelem podrobnější analýzy a to zejména porovnat vliv různých koncentrací monovalentních iontů na vazebné parametry ligandů δ -opioidního receptoru (pomocí vazby agonisty [³H]DADLE, antagonisty [³H]naltrindolu) a jeho spřažení s příslušným G proteinem (pomocí vazby [³⁵S]GTP γ S). Opět byly použity P2 membrány (Moon H. E. et al., 2001a) izolované z buněk δ -OR-G_i1 α -(Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 ovlivněných PTX.

Spojení GPCRs a G proteinů s plazmatickou membránou je činí citlivými k jejich lipidovému okolí, takže interakce s lipidy jsou důležité pro jejich funkci (Anderson R. G. a Jacobson K., 2002). Studie modelových lipidových membrán složených z definovaných lipidů přinesly důležité poznatky pro pochopení spojení mezi OR a G proteinem (Salamon Z. et al., 2000; Jensen M. O. a Mouritsen O. G., 2004; Lee A. G., 2004; Alves I. D. et al., 2005). Dalším cílem proto bylo pokusit se zjistit možné rozdíly mezi jednotlivými ionty při interakci s polárním rozhraním membrána-voda a hydrofóbním vnitřkem lipidové dvojvrstvy. Biofyzikální studie byly prováděny v PM izolovaných pomocí Percollového gradientu z buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293. Polární rozhraní membrána-voda bylo studováno pomocí fluorescenční sondy Laurdanu (2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen). Laurdan je fluorescenční sonda, která postihuje změny ve vlastnostech membrány díky své citlivosti k polaritě lipidové dvojvrstvy a poskytuje informaci o lipidových karbonylech (**Obrázek 10**). Vliv monovalentních kationtů na hydrofóbní vnitřek membrány jsme studovali pomocí fluorescenční sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH) (**Obrázek 10**). Fluorescenční sonda DPH nesvítí ve vodě, ale vykazuje silnou fluorescenci, pokud je zanořena do lipidové membrány. Vliv fyziologicky významných iontů byl v minulosti studován na modelových lipidových membránách (Bockmann R. A. et al., 2003; Filippov A. et al., 2009), proto jsme kromě přirozených membrán také použili uměle připravené unilamelární (jednovrstevné) vezikuly.



Obrázek 10: Struktura Laurdanu a DPH a místa jejich interakce s lipidovou dvojvrstvou. Převzato z práce (Parasassi T. et al., 1998) a upraveno. Molekula Laurdanu je ohraničena červeně, molekula DPH zeleně.

4.4.1 Vazba agonisty [³H]DADLE a antagonisty [³H]naltrindolu

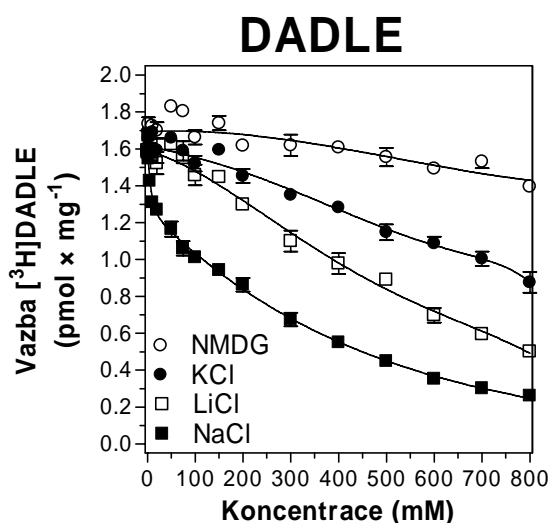
V první části *Publikace IV* jsme zjišťovali, jaký vliv mají rostoucí koncentrace NaCl, KCl, LiCl a NMDG na vazbu agonisty [³H]DADLE a antagonisty [³H]naltrindolu. V literatuře je popsáno, že existuje rovnováha OR mezi dvěma odlišnými konformacemi. Receptor v první konformaci, která je preferována v přítomnosti sodných iontů, váže antagonistu s vyšší afinitou, zatímco v druhé konformaci, která je preferována v nepřítomnosti sodných iontů, váže selektivně agonistu (Pert C. B. a Snyder S. H., 1974). Proto k inhibici vazby agonisty a naopak ke zvyšování vazby antagonisty dochází přednostně v přítomnosti sodných iontů. Schopnost sodných i ostatních kationtů rozlišit mezi vazebnými místy pro agonistu a antagonistu byla prokázána i v naší práci.

Porovnání vlivu NaCl, KCl a LiCl na vazbu ligandu k δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 (inhibice vazby agonisty a stimulace vazby antagonisty) naznačuje preferenční citlivost k Na⁺. Li⁺, jehož atomový poloměr je podobný atomovému poloměru

Na⁺, byl druhým nejúčinnějším iontem v tomto směru ve shodě s výsledky zjištěnými v buňkách NG108-15 (Blume A. J. et al., 1979; Fenalti G. et al., 2014).

V případě agonisty (**Obrázek 11**) byl inhibiční účinek NaCl silnější a vyznačoval se vyšší afinitou než v případě LiCl, KCl a NMDG. Když jsme analyzovali inhibiční křivky v celém rozsahu koncentrací pomocí programu GraphPad Prism (jako funkci rostoucí koncentrace NaCl), data bylo možné nejlépe proložit bifazickým ("two phase") exponenciálním poklesem, který uvažuje 2 vazebná místa ($r^2 = 0.99$; r^2 , koeficient determinace). Vysokoafinní místa byla charakterizována 50 % inhibicí vazby agonisty již při 5.4 mM koncentraci NaCl a nízkoafinní místa byla charakterizována 50 % inhibicí vazby agonisty při koncentraci 321 mM. Inhibice vazby agonisty vlivem LiCl, KCl a NMDG probíhala pouze s nízkou afinitou.

Specifický, vysokoafinní efekt sodných iontů na vazbu agonisty k δ -OR nastává jako interakce pozitivně nabitého sodíku s negativně nabitou karboxylovou skupinou kyseliny asparagové (Asp⁹⁵) (Kong H. et al., 1993b). Nízkoafinnímu efektu jsme se podrobněji věnovali při biofyzikálních studiích (kapitola 4.4.3 a 4.4.4).



Obrázek 11: Vazba agonisty [³H]DADLE k P2 membránám izolovaným z buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 ovlivněných PTX. Inhibice vazby agonisty byla měřena v přítomnosti rostoucí koncentrace (0-800 mM) NaCl (■), LiCl (□), KCl (●) a NMDG (○). Data představují průměr ze tří pokusů provedených v triplicátech (průměr \pm SEM).

4.4.2 Stanovení agonistou stimulované vazby [³⁵S]GTPγS

Dále byl proměřen vliv různých monovalentních kationtů chloridů na bazální a agonistou δ-OR DADLE stimulovanou vazbu [³⁵S]GTPγS. V nepřítomnosti iontů byla zjištěna vysoká bazální aktivita, která nebyla ovlivněna rostoucí koncentrací agonisty. Přidání 100 nebo 200 mM koncentrace NaCl, KCl a LiCl mělo za následek snížení vazby [³⁵S]GTPγS, které bylo kompenzováno rostoucí koncentrací agonisty. Konstitutivní aktivita, která se projevuje jako vysoká bazální aktivita v nepřítomnosti agonisty a monovalentních iontů, byla snížena s pořadím účinnosti Na⁺ > Li⁺ ≈ K⁺. Porovnání křivek závislosti odpovědi na koncentraci agonisty potvrdilo stejné pořadí, co se týče vyvolání maximální odpovědi B_{max}. Afinity agonisty DADLE ("potency"), vyjádřená pomocí hodnot EC₅₀, byla ale přednostně podporována Li⁺ (statisticky významný pokles vazby [³⁵S]GTPγS byl změřen již při 1 mM koncentraci LiCl). Stejné pořadí bylo zjištěno pro všechny parametry i v membránách izolovaných z buněk neovlivněných PTX.

Preferenční schopnost Li⁺ podporovat afinitu ("potency") odpovědi G proteinu může být interpretována jako atypický znak receptoru fúzního proteinu ve srovnání s přirozeným receptorem. Otázkou je, do jaké míry může tato zvláštní vlastnost δ-OR-G_i1α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) odrážet nebo napodobovat stav spojení δ-OR a G proteinu v patologické situaci chronické expozice mozku lithiu (Young W., 2009).

4.4.3 Stanovení excitační generalizované polarizace Laurdanu

Polární rozhraní membrána-voda jsme uvažovali jako jedno z možných míst, kde by mohl probíhat nízkoafinní typ sodné inhibice vazby agonisty [³H]DADLE. Tato interakce může následně ovlivnit vazbu ligandu na receptor allosterickou cestou prostřednictvím lipidových molekul. Nespecifické, nízkoafinní interakce monovalentních iontů s GPCRs byly připisovány vysoké iontové síle (Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Zvýšení iontové síly ve vodném médiu ale nemůže vysvětlit naše výsledky, protože iontová síla byla pro všechny použité soli stejná. Jako jeden z dalších důležitých faktorů ovlivňujících signalizaci GPCR by měla být uvažována role negativně nabitých iontů (Seifert R., 2001; Schnell D. a Seifert R., 2010). Ve všech testovaných solích byl v našem případě přítomen aniont Cl⁻.

Hydrofilní rozhraní membrána-voda jsme studovali pomocí excitační generalizované polarizace Laurdanu (GP_{ex}). Laurdan je fluorescenční sonda, která vykazuje citlovost vůči fázovému stavu membrány. Z intenzit fluorescence Laurdanu

v nejcitlivějším rozsahu excitačních vlnových délek (λ_{ex}) 320-400 nm byly vypočítány hodnoty GP_{ex} podle Parasassiové (Parasassi T. et al., 1991; Parasassi T. et al., 1994). Rostoucí hodnota GP_{ex} znamená snížení polaritu membrány a mobility membránových komponent v hydrofilní části lipidů (oblast polárních hlaviček).

Při použití 150 a 200 mM koncentrace NaCl, KCl, LiCl a CsCl nebyly změřeny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami GP_{ex} . Při 800 mM koncentraci, která byla rovněž použita při studiu LUV (velké unilamelární vezikuly) s negativním nábojem (Jurkiewicz P. et al., 2012), monovalentní kationty způsobily statisticky významný nárůst GP_{ex} s pořadím $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ oproti médiu bez iontů.

Abychom získali informace o interakcích monovalentních iontů s negativně nabitou lipidovou dvojvrstvou definovaného chemického složení, použili jsme modelový systém unilamelárních vezikulů skládajících se z amfoterního 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín (POPC) a z negativně nabitého 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoserinu (POPS). Jejich směs byla připravena v molárním poměru 4:1 (POPC:POPS) a byly připraveny velké unilamelární vezikuly (LUV) i malé unilamelární vezikuly (SUV). Data získaná studiem negativně nabitého systému POPC/POPS byla rozšířena studiem LUV složených z POPC/POPS a cholesterolu (molární poměr 46:33:20). Cholesterol byl přidán za účelem vytvoření lipidové dvojvrstvy více podobné přirozeným membránám. Pro umělé vezikuly POPC/POPS a POPC/POPS/cholesterol byly získány stejné výsledky jako pro přirozené membrány ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$). Monovalentní kationty, které jsou přitahovány negativním nábojem, pronikají dovnitř membrány na úroveň glycerolu lipidové dvojvrstvy, kde se párují s kyslíkovými atomy karbonylů a nahrazují tak molekuly vody (Jurkiewicz P. et al., 2012). Tento účinek je podle našich výsledků jasně spojený s velikostí hydratovaných kationtů a hustotou náboje daného iontu.

Porovnání mezi membránami HEK293 buněk a lipidovými vezikuly představuje příspěvek do oblasti biofyzikálních studií specifických iontových efektů spojených s historickými pracemi Franze Hofmeistera (Hofmeister F., 1888; Kunz W. et al., 2004). Bylo identifikováno mnoho experimentálních systémů, ve kterých je tzv. Hofmeisterova řada (lyotropní řada; pořadí schopnosti iontů vysolovat bílkoviny z vodného roztoku) částečně nebo zcela obrácena (Parsons D. F. et al., 2010; Schwierz N. et al., 2010). Tak tomu je i v případě analýzy GP_{ex} v přirozených membránách izolovaných z HEK293 buněk a modelových lipidových vezikulech POPC/POPS a POPC/POPS/cholesterol ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$).

4.4.4 Stanovení rovnovážné anizotropie fluorescence DPH

Na závěr jsme testovali vliv monovalentních kationtů na vnitřní hydrofóbní část membrány (oblast zbytků mastných kyselin). Biofyzikální charakteristiky byly stanoveny měřením rovnovážné anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) (Brejchova J. et al., 2011). S rostoucí hodnotou r_{DPH} klesá membránová fluidita (Shinitzky M. a Barenholz Y., 1978).

Nebyly zjištěny žádné změny hodnot r_{DPH} při 100, 200 a 800 mM koncentraci NaCl, KCl, LiCl a CsCl. Můžeme tedy říci, že vliv vysokých koncentrací monovalentních kationtů nastává výlučně jako interakce s povrchovým, polárním regionem lipidové dvojvrstvy nebo částí molekuly proteinu, která je přístupná vodě a že hydrofóbní vnitřek membrány se tohoto efektu neúčastní.

4.4.5 Vliv monovalentních aniontů na vazbu [³H]DADLE a agonistou stimulovanou vazbu [³⁵S]GTP γ S

Nezapoměli jsme ani na úlohu aniontů. Iodidové anionty I⁻ jsou hydrofóbnější než chloridové Cl⁻ a bromidové Br⁻ a proto pronikají hlouběji do lipidové dvojvrstvy (Jurkiewicz P. et al., 2012) a zároveň jsou I⁻ účinnější při modulaci vazby agonisty a spřažení receptoru s G proteinem (Seifert R., 2001; Kleemann P. et al., 2008; Schnell D. a Seifert R., 2010). Ve shodě s těmito uvedenými publikacemi byly i naše výsledky. Inhibice vazby [³H]DADLE rostla v pořadí Cl⁻ < Br⁻ < I⁻. Stejně pořadí bylo získáno i pro inhibici bazální a agonistou DADLE stimulovanou vazbu [³⁵S]GTP γ S. Je možné, že (pato)fyziologické změny koncentrace Na⁺, K⁺ nebo Cl⁻ mohou ovlivnit signalizaci. Li⁺, Br⁻ a I⁻ nemají fyziologický význam, ale představují farmakologické nástroje.

4.4.6 Závěr *Publikace IV*

Detailní analýza provedená v širokém rozsahu koncentrací vedla ke zjištění, že celkový inhibiční účinek Na⁺ na vazbu agonisty k δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 je složen ze dvou komponent - z vysoko- a nízkoafinních interakčních míst. Naše výsledky podporují představu, že vysokoafinní místa pro Na⁺ jsou umístěna hluboko uvnitř vazebné kapsy pro ligand a zprostředkovávají "inverzně agonistický" účinek Na⁺. Biofyzikální analýza interakce iontů lithia, sodíku, draslíku a cesia s plazmatickou membránou buněk HEK293 pomocí fluorescenčních technik ukázala na význam polárních skupin přítomných v povrchové vrstvě membrány. Polární rozhraní membrána-voda jsme označili jako jedno z možných míst, kde by mohl probíhat nízkoafinní typ inhibice vazby agonisty. Tato

interakce by následně mohla ovlivnit vazbu ligandu na receptor allosterickou cestou prostřednictvím lipidových molekul.

5. ZÁVĚR

V rámci předkládané dizertační práce bylo zjištěno, že mechanismus závislosti na morfinu je primárně založen na desenzitizaci odpovědi μ - a δ -opioidních receptorů, která nastává již na úrovni funkční aktivity G proteinů. Zároveň bylo stanoveno, že byl významně zvýšen obsah adenylyl cyklázy I a II v plazmatických membránách izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů ovlivněných morfinem a že tento nárůst nastává jako specifická, kompenzační (plně vratná), homeostatická odpověď na dlouhodobé působení této drogy. Dlouhodobé působení morfinu mělo dále za následek zvýšení počtu δ -opioidních receptorů a změnu jejich citlivost vůči sodným iontům.

Význam naší práce s buněčnou linií δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 je založen zejména na rozlišení vysoko- a nízkoafinních míst pro Na⁺, která nebyla doposud publikována. Dále byl porovnán účinek monovalentních iontů na vazbu agonisty a antagonisty a na spřažení δ -OR s G proteinem. V neposlední řadě byl stanoven účinek monovalentních iontů sodíku, draslíku, lithia a cesia při interakci s polárním rozhraním membrána-voda a hydrofóbním vnitřkem membránové dvojvrstvy. Polární rozhraní membrána-voda jsme označili jako jedno z možných míst, kde by mohl probíhat nízkoafinní typ inhibice vazby agonisty.

6. SHRNUTÍ

Dizertační práce se věnuje roli opioidních receptorů v drogové závislosti a také způsobu, jakým jsou tyto receptory ovlivňovány monovalentními ionty. Výsledky zde prezentované rozšiřují znalosti o dlouhodobém vystavení savčího organismu morfinu a o široce studované problematice drogové adaptace a tolerance. Zároveň přispívají k objasnění modulačního vlivu monovalentních iontů na tyto receptory.

Dizertační práce se v první části zabývá studiem mechanismu dlouhodobého působení vysokých dávek morfinu a to na úrovni G proteinů a adenylyl cyklázy. Dlouhodobé vystavení potkanů vysokým dávkám morfinu mělo za následek pokles celkové aktivity G proteinů stimulované μ - a δ -opioidními receptory v plazmatických membránách izolovaných z frontální mozkové kůry. Nedošlo ovšem ke snížení množství těchto regulačních proteinů. Naše výsledky potvrzují názor, že mechanismus závislosti na morfinu je primárně založen na desenzitizaci odpovědi opioidních receptorů, která nastává již na úrovni funkční aktivity G proteinů. Zjistili jsme, že obsah adenylyl cyklázy I a II ve studovaných vzorcích plazmatických membrán byl významně zvýšen u potkanů ovlivněných morfinem a nastává jako specifická, kompenzační (plně vratná), homeostatická odpověď na dlouhodobé působení této drogy. Bylo také zjištěno, že dlouhodobá expozice morfinu má za následek zvýšení počtu δ -opioidních receptorů a změnu jejich citlivost vůči sodným iontům.

Naše výsledky získané analýzou vlivu různých monovalentních kationtů na spojení definovaného typu opioidního receptoru (δ -opioidního receptoru) a definovaného typu G proteinu ($G_{i1\alpha}$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)), které jsou přítomny v daném fúzním proteinu v poměru 1:1, popisují preferenční citlivost tohoto proteinu k sodným iontům. Inhibice vysoké bazální vazby [³⁵S]GTP γ S ($Na^+ > K^+ > Li^+ > NMDG^+$) stejně jako stimulace δ -opioidního receptoru agonistou DADLE ($Na^+ > K^+ \approx Li^+ > NMDG^+$) vykazuje stejné pořadí účinnosti iontů.

Porovnali jsme vliv různých koncentrací sodných, draselných a lithných iontů na vazbu agonisty a antagonisty k δ -opioidnímu receptoru a na spojení tohoto receptoru s G proteinem v plazmatických membránách izolovaných z δ -OR- $G_{i1\alpha}$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buněčné linie. Rozlišili jsme vysoko- a nízkoafinní místa pro Na^+ , která nebyla doposud publikována. Účinek iontů jsme zkoumali i v polární oblasti lipidových hlaviček a hydrofóbním vnitřku plazmatických membrán. Analýza interakce iontů lithia, sodíku, draslíku a cesia s plazmatickou membránou buněk HEK293, prováděná pomocí

fluorescenčních technik, ukázala na význam polárních skupin přítomných v povrchové vrstvě membrány. Právě do této oblasti je možné umístit nízkoafinní místa pro výše uvedené monovalentní ionty.

7. SUMMARY

This Ph.D. thesis is devoted to the role of opioid receptors in drug addiction and the way how are these receptors affected by monovalent ions. Results presented here extend the knowledge about the long-term adaptation of the mammalian organism to morphine and widely studied phenomenon of drug dependence and tolerance. Simultaneously contribute to the clarification of the modulatory effect of monovalent ions on these receptors.

In the first part of this Ph.D. thesis we studied the mechanism of a long-term effect of high doses of morphine at the level of G proteins and adenylyl cyclase. Prolonged exposure of rats to high doses of morphine resulted in decrease of the over-all output of μ - and δ -opioid receptor-stimulated G protein activity in plasma membranes isolated from the forebrain cortex but does not decrease the amount of these regulatory proteins. Our results support the view that the mechanism of addiction to morphine is primarily based on desensitization of opioid receptor response, which proceed already at the level of G protein functional activity. We have found that plasma membrane density of adenylyl cyclase I and II was increased largely in morphine treated rats and proceeds as a specific, compensatory (fully reversible), homeostatic response to prolonged exposure to this drug. It was also noted, that long-term exposure to morphine resulted in increase of number of δ -opioid receptors and change of their sensitivity to sodium ions.

Our results obtained by analysis of the effect of different monovalent cations on coupling between the defined type of opioid receptor (δ -OR) and the defined type of G protein ($G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)) both present within δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) fusion protein in 1:1 stoichiometry indicated preferential sensitivity of this protein to sodium. The inhibition of very high basal level of [³⁵S]GTP γ S binding ($Na^+ > K^+ > Li^+ > NMDG^+$) as well as stimulation by δ -opioid agonist DADLE ($Na^+ > K^+ \approx Li^+ > NMDG^+$) proceeded with almost identical order.

We compared the effect of different concentrations of sodium, potassium and lithium ions on the agonist and antagonist binding and G protein coupling to δ -opioid receptor in plasma membrane isolated from δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 cell line. We distinguish between high- and low-affinity sites for Na^+ which has not been presented in the current literature. The effect of ions was also investigated in polar head-group region and hydrophobic interior of plasma membranes. Analysis of interaction of lithium, sodium, potassium and cesium ions with plasma membranes isolated from HEK293 cells with the

help of fluorescent probes indicated that monovalent ions interact, in low-affinity manner, with the polar, membrane-water interface of membrane bilayer.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alves, I.D., Salamon, Z., Hruby, V.J. a Tollin, G. (2005) Ligand modulation of lateral segregation of a G-protein-coupled receptor into lipid microdomains in sphingomyelin/phosphatidylcholine solid-supported bilayers. *Biochemistry* 44 (25): 9168-9178.
- Ammer, H. a Christ, T.E. (2002) Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity. *J Neurochem* 83 (4): 818-827.
- Ammer, H. a Schulz, R. (1997) Enhanced stimulatory adenylyl cyclase signaling during opioid dependence is associated with a reduction in palmitoylated Gs alpha. *Mol Pharmacol* 52 (6): 993-999.
- Ammer, H. a Schulz, R. (1998) Adenylyl cyclase supersensitivity in opioid-withdrawn NG108-15 hybrid cells requires Gs but is not mediated by the Gsalpha subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 286 (2): 855-862.
- Anderson, R.G. a Jacobson, K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296 (5574): 1821-1825.
- Angel, T.E., Gupta, S., Jastrzebska, B., Palczewski, K. a Chance, M.R. (2009a) Structural waters define a functional channel mediating activation of the GPCR, rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (34): 14367-14372.
- Angel, T.E., Chance, M.R. a Palczewski, K. (2009b) Conserved waters mediate structural and functional activation of family A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (21): 8555-8560.
- Attali, B. a Vogel, Z. (1989) Long-term opiate exposure leads to reduction of the alpha i-1 subunit of GTP-binding proteins. *J Neurochem* 53 (5): 1636-1639.
- Avidor-Reiss, T., Bayewitch, M., Levy, R., Matus-Leibovitch, N., Nevo, I. a Vogel, Z. (1995) Adenylyl cyclase supersensitization in mu-opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. *J Biol Chem* 270 (50): 29732-29738.
- Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Levy, R., Pfeuffer, T. a Vogel, Z. (1996) Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma. *J Biol Chem* 271 (35): 21309-21315.
- Avigan, J., Murtagh, J.J., Jr., Stevens, L.A., Angus, C.W., Moss, J. a Vaughan, M. (1992) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G(o) alpha with mutations at the carboxyl terminus. *Biochemistry* 31 (33): 7736-7740.
- Bahia, D.S., Wise, A., Fanelli, F., Lee, M., Rees, S. a Milligan, G. (1998) Hydrophobicity of residue 351 of the G protein Gi1 alpha determines the extent of activation by the alpha 2A-adrenoceptor. *Biochemistry* 37 (33): 11555-11562.
- Balch, R.J. a Trescot, A. (2010) Extended-release morphine sulfate in treatment of severe acute and chronic pain. *J Pain Res* 3: 191-200.
- Bayewitch, M.L., Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Simonds, W.F. a Vogel, Z. (2000) Alterations in detergent solubility of heterotrimeric G proteins after chronic activation of G(i/o)-coupled receptors: changes in detergent solubility are in correlation with onset of adenylyl cyclase superactivation. *Mol Pharmacol* 57 (4): 820-825.
- Beckett, A.H. a Casy, A.F. (1954) Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J Pharm Pharmacol* 6 (12): 986-1001.
- Blake, A.D., Bot, G. a Reisine, T. (1996) Structure-function analysis of the cloned opiate receptors: peptide and small molecule interactions. *Chem Biol* 3 (12): 967-972.

- Blume, A.J., Lichtshtein, D. a Boone, G. (1979) Coupling of opiate receptors to adenylate cyclase: requirement for Na⁺ and GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (11): 5626-5630.
- Bockmann, R.A., Heimbürg, T. a Grubmüller, H. (2003). *Biophys J* 85(3): 1647-55.
- Bond, R.A., Leff, P., Johnson, T.D., Milano, C.A., Rockman, H.A., McMinn, T.R., Apparsundaram, S., Hyek, M.F., Kenakin, T.P., Allen, L.F. a et al. (1995) Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374 (6519): 272-276.
- Bourova, L., Kostřnova, A., Hejnova, L., Moravcova, Z., Moon, H.E., Novotny, J., Milligan, G. a Svoboda, P. (2003) delta-Opioid receptors exhibit high efficiency when activating trimeric G proteins in membrane domains. *J Neurochem* 85 (1): 34-49.
- Brejchova, J., Sykora, J., Dlouha, K., Roubalova, L., Ostasov, P., Vosahlikova, M., Hof, M. a Svoboda, P. (2011) Fluorescence spectroscopy studies of HEK293 cells expressing DOR-Gi1alpha fusion protein; the effect of cholesterol depletion. *Biochim Biophys Acta* 1808 (12): 2819-2829.
- Brownstein, M.J. (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (12): 5391-5393.
- Bunzow, J.R., Saez, C., Mortrud, M., Bouvier, C., Williams, J.T., Low, M. a Grandy, D.K. (1994) Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347 (2-3): 284-288.
- Burford, N.T., Wang, D. a Sadee, W. (2000) G-protein coupling of mu-opioid receptors (OP3): elevated basal signalling activity. *Biochem J* 348 Pt 3: 531-537.
- Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R. a Hamm, H.E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24 (6): 765-781.
- Carr, I.C., Burt, A.R., Jackson, V.N., Wright, J., Wise, A., Rees, S. a Milligan, G. (1998) Quantitative analysis of a cysteine351glycine mutation in the G protein Gi1alpha: effect on alpha2A-adrenoceptor-Gi1alpha fusion protein activation. *FEBS Lett* 428 (1-2): 17-22.
- Ceresa, B.P. a Limbird, L.E. (1994) Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling. *J Biol Chem* 269 (47): 29557-29564.
- Contet, C., Kieffer, B.L. a Befort, K. (2004) Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol* 14 (3): 370-378.
- Costa, T. a Herz, A. (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (19): 7321-7325.
- Costa, T., Lang, J., Gless, C. a Herz, A. (1990) Spontaneous association between opioid receptors and GTP-binding regulatory proteins in native membranes: specific regulation by antagonists and sodium ions. *Mol Pharmacol* 37 (3): 383-394.
- Del Castillo, J. a Katz, B. (1957) Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 146 (924): 369-381.
- Deupi, X. a Kobilka, B. (2007) Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem* 74: 137-166.

- Dikötter, F., Laamann, L. a Xun, Z. (2004) A History of Drugs in China. C. Hurst & Co. (Publishers) Ltd, London.
- Ellis, C. (2004) The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* 3 (7): 575, 577-626.
- Evans, C.J., Keith, D.E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K. a Edwards, R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258 (5090): 1952-1955.
- Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L. a Stevens, R.C. (2014) Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature* 506(7487):191-6.
- Filippov, A., Oradd, G. a Lindblom, G. (2009). *Chem Phys Lipids* 159(2):81-7.
- Filizola, M. a Devi, L.A. (2012) Structural biology: How opioid drugs bind to receptors. *Nature* 485 (7398): 314-317.
- Fong, C.W., Bahia, D.S., Rees, S. a Milligan, G. (1998) Selective activation of a chimeric Gi1/Gs G protein alpha subunit by the human IP prostanoid receptor: analysis using agonist stimulation of high affinity GTPase activity and [³⁵S]guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding. *Mol Pharmacol* 54 (2): 249-257.
- Fong, C.W. a Milligan, G. (1999) Analysis of agonist function at fusion proteins between the IP prostanoid receptor and cognate, unnatural and chimaeric G-proteins. *Biochem J* 342 (Pt 2): 457-463.
- Fredholm, B.B., Hokfelt, T. a Milligan, G. (2007) G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)* 190 (1): 3-7.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G. a Schioth, H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63 (6): 1256-1272.
- Gao, Z.G. a Ijzerman, A.P. (2000) Allosteric modulation of A(2A) adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem Pharmacol* 60 (5): 669-676.
- Gierschik, P., Moghtader, R., Straub, C., Dieterich, K. a Jakobs, K.H. (1991) Signal amplification in HL-60 granulocytes. Evidence that the chemotactic peptide receptor catalytically activates guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in native plasma membranes. *Eur J Biochem* 197 (3): 725-732.
- Gierschik, P., Sidiropoulos, D., Steisslinger, M. a Jakobs, K.H. (1989) Na⁺ regulation of formyl peptide receptor-mediated signal transduction in HL 60 cells. Evidence that the cation prevents activation of the G-protein by unoccupied receptors. *Eur J Pharmacol* 172 (6): 481-492.
- Gilman, S.L. a Xun, Z. (2006) Příběh kouře, člověk a kouření od úsvitu dějin až po současnost. *dybbuk*.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. a Hood, L. (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (12): 6666-6670.
- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Weis, W.I. a Kobilka, B.K. (2012) Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485 (7398): 400-404.
- Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273 (2): 669-672.
- Hanoune, J. a Defer, N. (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 145-174.
- He, L. a Whistler, J.L. (2007) The biochemical analysis of methadone modulation on morphine-induced tolerance and dependence in the rat brain. *Pharmacology* 79 (4): 193-202.
- Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 24: 247-260.

- Hollinger, S. a Hepler, J.R. (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54 (3): 527-559.
- Horstman, D.A., Brandon, S., Wilson, A.L., Guyer, C.A., Cragoe, E.J., Jr. a Limbird, L.E. (1990) An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem* 265 (35): 21590-21595.
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. a Morris, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258 (5536): 577-580.
- Chakrabarti, S., Prather, P.L., Yu, L., Law, P.Y. a Loh, H.H. (1995) Expression of the mu-opioid receptor in CHO cells: ability of mu-opioid ligands to promote alpha-azidoanilido[32P]GTP labeling of multiple G protein alpha subunits. *J Neurochem* 64 (6): 2534-2543.
- Chakrabarti, S., Yang, W., Law, P.Y. a Loh, H.H. (1997) The mu-opioid receptor down-regulates differently from the delta-opioid receptor: requirement of a high affinity receptor/G protein complex formation. *Mol Pharmacol* 52 (1): 105-113.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A. a Yu, L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44 (1): 8-12.
- Janecka, A., Fichna, J. a Janecki, T. (2004) Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem* 4 (1): 1-17.
- Jensen, M.O. a Mouritsen, O.G. (2004) Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochim Biophys Acta* 1666 (1-2): 205-226.
- Ji, T.H., Grossmann, M. a Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273 (28): 17299-17302.
- Jurkiewicz, P., Cwiklik, L., Vojtkova, A., Jungwirth, P. a Hof, M. (2012) Structure, dynamics, and hydration of POPC/POPS bilayers suspended in NaCl, KCl, and CsCl solutions. *Biochim Biophys Acta* 1818 (3): 609-616.
- Kelly, E., Bailey, C.P. a Henderson, G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S379-388.
- Kenakin, T. (2013) Making receptors a reality: the 2012 Nobel Prize in Chemistry. *Trends Pharmacol Sci* 34 (1): 2-5.
- Kieffer, B.L. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 20 (1): 19-26.
- Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. a Hirth, C.G. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (24): 12048-12052.
- Klee, W.A. a Nirenberg, M. (1974) A neuroblastoma times glioma hybrid cell line with morphine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (9): 3474-3477.
- Kleemann, P., Papa, D., Vigil-Cruz, S. a Seifert, R. (2008) Functional reconstitution of the human chemokine receptor CXCR4 with G(i)/G(o)-proteins in Sf9 insect cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378 (3): 261-274.
- Ko, M.C., Lee, H., Harrison, C., Clark, M.J., Song, H.F., Naughton, N.N., Woods, J.H. a Traynor, J.R. (2003) Studies of micro-, kappa-, and delta-opioid receptor density and G protein activation in the cortex and thalamus of monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 306 (1): 179-186.
- Kobilka, B.K. (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768 (4): 794-807.

- Kolakowski, L.F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2 (1): 1-7.
- Kong, H., Raynor, K., Yasuda, K., Bell, G.I. & Reisine, T. (1993a) Mutation of an aspartate at residue 89 in somatostatin receptor subtype 2 prevents Na⁺ regulation of agonist binding but does not alter receptor-G protein association. *Mol Pharmacol* 44 (2): 380-384.
- Kong, H., Raynor, K., Yasuda, K., Moe, S.T., Portoghese, P.S., Bell, G.I. & Reisine, T. (1993b) A single residue, aspartic acid 95, in the delta opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding. *J Biol Chem* 268 (31): 23055-23058.
- Kornblum, H.I., Hurlbut, D.E. & Leslie, F.M. (1987) Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. *Brain Res* 465 (1-2): 21-41.
- Koski, G. & Klee, W.A. (1981) Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (7): 4185-4189.
- Koski, G., Streaty, R.A. & Klee, W.A. (1982) Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonists. An explanation for the dual requirement for Na⁺ and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 257 (23): 14035-14040.
- Kruse, A.C., Manglik, A., Kobilka, B.K. & Weis, W.I. (2013) Applications of molecular replacement to G protein-coupled receptors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69 (Pt 11): 2287-2292.
- Kunz, W., Lo Nostro, P. & Ninham, B.W. (2004) The present state of affairs with Hofmeister effects. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 9 (1-2): 1-18.
- Lambert, D.G. (2008) The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 7 (8): 694-710.
- Langmead, C.J. & Christopoulos, A. (2006) Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox. *Trends Pharmacol Sci* 27 (9): 475-481.
- Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K. & Filipek, S. (2012) G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta Biochim Pol* 59 (4): 515-529.
- Law, P.Y., Loh, H.H. & Wei, L.N. (2004) Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 300-311.
- Lee, A.G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666 (1-2): 62-87.
- Leff, P. (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 16 (3): 89-97.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P. & Costa, T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14 (8): 303-307.
- Li, C.H., Chung, D. & Doneen, B.A. (1976) Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 72 (4): 1542-1547.
- Lin, H.H. (2013) G-protein-coupled receptors and their (Bio) chemical significance win 2012 Nobel Prize in Chemistry. *Biomed J* 36 (3): 118-124.
- Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., AP, I.J., Cherezov, V. & Stevens, R.C. (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* 337 (6091): 232-236.
- Lomize, A.L., Pogozheva, I.D. & Mosberg, H.I. (1999) Structural organization of G-protein-coupled receptors. *J Comput Aided Mol Des* 13 (4): 325-353.
- Lord, J.A., Waterfield, A.A., Hughes, J. & Kosterlitz, H.W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267 (5611): 495-499.

- Maher, C.E., Martin, T.J. a Childers, S.R. (2005) Mechanisms of mu opioid receptor/G-protein desensitization in brain by chronic heroin administration. *Life Sci* 77 (10): 1140-1154.
- Maher, C.E., Selley, D.E. a Childers, S.R. (2000) Relationship of mu opioid receptor binding to activation of G-proteins in specific rat brain regions. *Biochem Pharmacol* 59 (11): 1395-1401.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K. a Granier, S. (2012) Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485 (7398): 321-326.
- Marinissen, M.J. a Gutkind, J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22 (7): 368-376.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E. a Gilbert, P.E. (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197 (3): 517-532.
- Massotte, D., Brillet, K., Kieffer, B. a Milligan, G. (2002) Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J Neurochem* 81 (6): 1372-1382.
- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P. a Kieffer, B.L. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383 (6603): 819-823.
- Maurer, R. (1982) Multiplicity of opiate receptors in different species. *Neurosci Lett* 30 (3): 303-307.
- Merkouris, M., Mullaney, I., Georgoussi, Z. a Milligan, G. (1997) Regulation of spontaneous activity of the delta-opioid receptor: studies of inverse agonism in intact cells. *J Neurochem* 69 (5): 2115-2122.
- Milligan, G. (2002a) Construction and analysis of function of G protein-coupled receptor-G protein fusion proteins. *Methods Enzymol* 343: 260-273.
- Milligan, G. (2002b) The use of receptor G-protein fusion proteins for the study of ligand activity. *Receptors Channels* 8 (5-6): 309-317.
- Milligan, G. (2003) Principles: extending the utility of [³⁵S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* 24 (2): 87-90.
- Milligan, G., Bond, R.A. a Lee, M. (1995) Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* 16 (1): 10-13.
- Milligan, G. a Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.
- Mitchell, F.M., Griffiths, S.L., Saggerson, E.D., Houslay, M.D., Knowler, J.T. a Milligan, G. (1989) Guanine-nucleotide-binding proteins expressed in rat white adipose tissue. Identification of both mRNAs and proteins corresponding to Gi1, Gi2 and Gi3. *Biochem J* 262 (2): 403-408.
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G. a Meunier, J.C. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341 (1): 33-38.
- Moon, H.E., Bahia, D.S., Cavalli, A., Hoffmann, M. a Milligan, G. (2001a) Control of the efficiency of agonist-induced information transfer and stability of the ternary complex containing the delta opioid receptor and the alpha subunit of G(i1) by

- mutation of a receptor/G protein contact interface. *Neuropharmacology* 41 (3): 321-330.
- Moon, H.E., Cavalli, A., Bahia, D.S., Hoffmann, M., Massotte, D. a Milligan, G. (2001b) The human delta opioid receptor activates G(i1)alpha more efficiently than G(o1)alpha. *J Neurochem* 76 (6): 1805-1813.
- Moreira, I.S. (2014) Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta* 1840 (1): 16-33.
- Mullaney, I., Carr, I.C. a Milligan, G. (1996) Analysis of inverse agonism at the delta opioid receptor after expression in Rat 1 fibroblasts. *Biochem J* 315 (Pt 1): 227-234.
- Neer, E.J. (1994) G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci* 3 (1): 3-14.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80 (2): 249-257.
- Neilan, C.L., Akil, H., Woods, J.H. a Traynor, J.R. (1999) Constitutive activity of the delta-opioid receptor expressed in C6 glioma cells: identification of non-peptide delta-inverse agonists. *Br J Pharmacol* 128 (3): 556-562.
- Obara, S., Yamada, K., Yoshimura, Y. a Shimoyama, M. (1991) Evidence for the endogenous GTP-dependent ADP-ribosylation of the alpha-subunit of the stimulatory guanyl-nucleotide-binding protein concomitant with an increase in basal adenylyl cyclase activity in chicken spleen cell membrane. *Eur J Biochem* 200 (1): 75-80.
- Odagaki, Y., Nishi, N., Ozawa, H., Saito, T., Takahata, N., Riederer, P. a Koyama, T. (1998) Measurement of receptor-mediated functional activation of G proteins in postmortem human brain membranes. *Brain Res* 789 (1): 84-91.
- Offermanns, S., Schultz, G. a Rosenthal, W. (1991) Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins, Go and Gi2, in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *J Biol Chem* 266 (6): 3365-3368.
- Okada, T., Sugihara, M., Bondar, A.N., Elstner, M., Entel, P. a Buss, V. (2004) The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol* 342 (2): 571-583.
- Oldham, W.M. a Hamm, H.E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (1): 60-71.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. a Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289 (5480): 739-745.
- Pan, Z.Z. (1998) mu-Opposing actions of the kappa-opioid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 19 (3): 94-98.
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M. a Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J* 60 (1): 179-189.
- Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G. a Gratton, E. (1994) Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 66 (1): 120-132.
- Parasassi, T., Krasnowska, E., Bagatolli, L.A. a Gratton, E. (1998) Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *Journal of Fluorescence* 8: 365-373.

- Park, P.S., Lodowski, D.T. a Palczewski, K. (2008) Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 107-141.
- Parsons, D.F., Bostrom, M., Maceina, T.J., Salis, A. a Ninham, B.W. (2010) Why direct or reversed Hofmeister series? Interplay of hydration, non-electrostatic potentials, and ion size. *Langmuir* 26 (5): 3323-3328.
- Pasternak, G.W. (2014) Opioids and their receptors: Are we there yet? *Neuropharmacology* 76 Pt B: 198-203.
- Pasternak, G.W., Wilson, H.A. a Snyder, S.H. (1975) Differential effects of protein-modifying reagents on receptor binding of opiate agonists and antagonists. *Mol Pharmacol* 11 (3): 340-351.
- Patel, T.B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L. a Scholich, K. (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269 (1-2): 13-25.
- Paterson, S.J., Robson, L.E. a Kosterlitz, H.W. (1986) Control by cations of opioid binding in guinea pig brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (16): 6216-6220.
- Pendell, D. (2004) *Pharmako Dynamis, Moc rostlin a cesty jedů, excitanty a empatogenika*. Volvox Globatos.
- Pert, C.B. a Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179 (4077): 1011-1014.
- Pert, C.B. a Snyder, S.H. (1974) Opiate Receptor Binding of Agonists and Antagonists Affected Differentially by Sodium. *Mol Pharmacol* 10: 868-879.
- Pierce, K.L., Premont, R.T. a Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (9): 639-650.
- Pogozheva, I.D., Lomize, A.L. a Mosberg, H.I. (1998) Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys J* 75 (2): 612-634.
- Portoghese, P.S. (1965) A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J Med Chem* 8 (5): 609-616.
- Pradhan, A.A., Befort, K., Nozaki, C., Gaveriaux-Ruff, C. a Kieffer, B.L. (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 32 (10): 581-590.
- Prather, P.L. (2004) Inverse agonists: tools to reveal ligand-specific conformations of G protein-coupled receptors. *Sci STKE* 2004 (215): pe1.
- Prather, P.L., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1994a) Interaction of delta-opioid receptors with multiple G proteins: a non-relationship between agonist potency to inhibit adenylyl cyclase and to activate G proteins. *Mol Pharmacol* 45 (5): 997-1003.
- Prather, P.L., McGinn, T.M., Claude, P.A., Liu-Chen, L.Y., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1995) Properties of a kappa-opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual G alpha subunit and is similar to that of other opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 29 (2): 336-346.
- Prather, P.L., McGinn, T.M., Erickson, L.J., Evans, C.J., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1994b) Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. *J Biol Chem* 269 (33): 21293-21302.
- Preininger, A.M. a Hamm, H.E. (2004) G protein signaling: insights from new structures. *Sci STKE* 2004 (218): re3.
- Quinones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Inturrisi, C. a Pfaff, D.W. (1997) Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. *Brain Res Mol Brain Res* 47 (1-2): 134-138.

- Roerig, S.C., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1992) Identification of three separate guanine nucleotide-binding proteins that interact with the delta-opioid receptor in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Mol Pharmacol* 41 (5): 822-831.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G. a Kobilka, B.K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459 (7245): 356-363.
- Salamon, Z., Cowell, S., Varga, E., Yamamura, H.I., Hruby, V.J. a Tollin, G. (2000) Plasmon resonance studies of agonist/antagonist binding to the human delta-opioid receptor: new structural insights into receptor-ligand interactions. *Biophys J* 79 (5): 2463-2474.
- Sanabra, C. a Mengod, G. (2011) Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain. *J Chem Neuroanat* 41 (1): 43-54.
- Sandhya, K. a Vemuri, M.C. (1997) Regulation of cellular signals by G-proteins. *J Biosci* 22: 375-397.
- Seifert, R. (2001) Monovalent anions differentially modulate coupling of the beta2-adrenoceptor to G(s)alpha splice variants. *J Pharmacol Exp Ther* 298 (2): 840-847.
- Seifert, R. a Wenzel-Seifert, K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366 (5): 381-416.
- Seifert, R. a Wenzel-Seifert, K. (2003) The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors. *Life Sci* 73 (18): 2263-2280.
- Seifert, R., Wenzel-Seifert, K. a Kobilka, B.K. (1999) GPCR-Galpha fusion proteins: molecular analysis of receptor-G-protein coupling. *Trends Pharmacol Sci* 20 (9): 383-389.
- Selley, D.E., Liu, Q. a Childers, S.R. (1998) Signal transduction correlates of mu opioid agonist intrinsic efficacy: receptor-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in mMOR-CHO cells and rat thalamus. *J Pharmacol Exp Ther* 285 (2): 496-505.
- Sharma, S.K., Klee, W.A. a Nirenberg, M. (1975a) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (8): 3092-3096.
- Sharma, S.K., Klee, W.A. a Nirenberg, M. (1977) Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (8): 3365-3369.
- Sharma, S.K., Nirenberg, M. a Klee, W.A. (1975b) Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (2): 590-594.
- Shinitzky, M. a Barenholz, Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta* 515 (4): 367-394.
- Schallmach, E., Steiner, D. a Vogel, Z. (2006) Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and chronic opioid exposure. *Neuropharmacology* 50 (8): 998-1005.
- Schneider, E.H. a Seifert, R. (2010) Fusion proteins as model systems for the analysis of constitutive GPCR activity. *Methods Enzymol* 485: 459-480.
- Schnell, D. a Seifert, R. (2010) Modulation of histamine H(3) receptor function by monovalent ions. *Neurosci Lett* 472 (2): 114-118.
- Schwierz, N., Horinek, D. a Netz, R.R. (2010) Reversed anionic Hofmeister series: the interplay of surface charge and surface polarity. *Langmuir* 26 (10): 7370-7379.
- Sim-Selley, L.J., Daunais, J.B., Porrino, L.J. a Childers, S.R. (1999) Mu and kappa opioid-stimulated [³⁵S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in cynomolgus monkey brain. *Neuroscience* 94 (2): 651-662.

- Sim-Selley, L.J., Selley, D.E., Vogt, L.J., Childers, S.R. a Martin, T.J. (2000) Chronic heroin self-administration desensitizes mu opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *J Neurosci* 20 (12): 4555-4562.
- Sim, L.J., Selley, D.E., Dworkin, S.I. a Childers, S.R. (1996) Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [³⁵S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* 16 (8): 2684-2692.
- Simon, E.J., Hiller, J.M. a Edelman, I. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (7): 1947-1949.
- Snyder, S.H. a Lader, M.H. (1988) *The Encyklopedia of Psychoactive Drugs, Heroin The Street Narcotic*. Burke Publishing Company Limited, London.
- Stohr, J., Bourova, L., Hejnova, L., Ihnatovych, I., Novotny, J. a Svoboda, P. (2004) Increased baclofen-stimulated G protein coupling and deactivation in rat brain cortex during development. *Brain Res Dev Brain Res* 151 (1-2): 67-73.
- Suga, H. a Haga, T. (2007) Ligand screening system using fusion proteins of G protein-coupled receptors with G protein alpha subunits. *Neurochem Int* 51 (2-4): 140-164.
- Sunahara, R.K. a Taussig, R. (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2 (3): 168-184.
- Surratt, C.K., Johnson, P.S., Moriwaki, A., Seidleck, B.K., Blaschak, C.J., Wang, J.B. a Uhl, G.R. (1994) -mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity. *J Biol Chem* 269 (32): 20548-20553.
- Terenius, L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasm a membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 32 (3): 317-320.
- Thompson, A.A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., Huang, X.P., Trapella, C., Guerrini, R., Calo, G., Roth, B.L., Cherezov, V. a Stevens, R.C. (2012) Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 485 (7398): 395-399.
- Tso, P.H. a Wong, Y.H. (2003) Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (5-6): 307-316.
- Venkatakrisnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F. a Babu, M.M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494 (7436): 185-194.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E. a Whistler, J.L. (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73: 953-990.
- Walwyn, W.M., Miotto, K.A. a Evans, C.J. (2010) Opioid pharmaceuticals and addiction: the issues, and research directions seeking solutions. *Drug Alcohol Depend* 108 (3): 156-165.
- Wettschureck, N. a Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85 (4): 1159-1204.
- Whistler, J.L., Chuang, H.H., Chu, P., Jan, L.Y. a von Zastrow, M. (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 23 (4): 737-746.
- Whistler, J.L. a von Zastrow, M. (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (17): 9914-9919.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M. a Marshall, F.H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396 (6712): 679-682.

- Wilson, H.A., Pasternak, G.W. a Snyder, S.H. (1975) Differentiation of opiate agonist and antagonist receptor binding by protein modifying reagents. *Nature* 253 (5491): 448-450.
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G.W., Vardy, E., Liu, W., Thompson, A.A., Huang, X.P., Carroll, F.I., Mascarella, S.W., Westkaemper, R.B., Mosier, P.D., Roth, B.L., Cherezov, V. a Stevens, R.C. (2012) Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485 (7398): 327-332.
- Wurch, T. a Pauwels, P.J. (2001) Analytical pharmacology of G protein-coupled receptors by stoichiometric expression of the receptor and G(alpha) protein subunits. *J Pharmacol Toxicol Methods* 45 (1): 3-16.
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C.D., Takeda, J., Reisine, T. a Bell, G.I. (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (14): 6736-6740.
- Young, W. (2009) Review of lithium effects on brain and blood. *Cell Transplant* 18 (9): 951-975.
- Zhao, H., Loh, H.H. a Law, P.Y. (2006) Adenylyl cyclase superactivation induced by long-term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid rafts and is independent of receptor internalization. *Mol Pharmacol* 69 (4): 1421-1432.